FACULTÉ DES SCIENCES

AIX MARSEILLE UNIVERSITÉ

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT (ED 251)

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

Thèse présentée et soutenue à Marseille par

Karine Lebaron

Le 10 janvier 2020

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

JURY

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

REMERCIEMENTS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Geronimo (1829-1909)

LISTE DES PUBLICATIONS, COMMUNICATIONS

Articles

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

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

Liste des communications

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

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

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

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

TABLE DES MATIERES

TABLE DES FIGURES ____ *i*

LISTE DES TABLEAUX ____ *iii*

OBJECTIFS SCIENTIFIQUES ____ *1*

INTRODUCTION ____ *3*

CHAPITRE 1 : Synthèse bibliographique - Les sous-produits de chloration dans le monde ____ *7*

1. Source, nature et niveau des contaminations aux SPC ____ **8**

1.1. Différentes sources possibles ____ 8

1.1.1. La production dite « naturelle » par les organismes marins ____ 8

1.1.2. Les sources anthropiques des sous-produits de chloration dans le milieu marin ____ 9

1.2. Nature et niveaux des concentrations environnementales ____ 14

1.2.1. Milieux aquatiques ____ 14

1.2.2. Réseau trophique ____ 16

2. L'actualité des SPC ____ **16**

2.1. Risques associés aux SPC en santé publique ____ 16

2.2. La réglementation sanitaire des SPC ____ 19

2.3. Réglementation environnementale ____ 19

3. Évaluation de la toxicité et des perturbations induites par les SPC dans l'environnement **20**

3.1. Les biomarqueurs ____ 20

3.1.1. Les variations phénotypiques ____ 21

3.1.2. Les variations biochimiques ____ 21

3.1.3. Dommages de l'ADN ____ 25

3.1.4. Expression de gènes ____ 26

3.2. Les organismes modèles ____ 27

4. Le site d'étude : le golfe de Fos ____ **31**

CHAPITRE 2 : Identification du niveau de pollution en SPC dans le golfe de Fos ____ *35*

1. Les sous-produits de chloration dans le milieu marin, méthodes d'analyses ____ **36**

2. Matériels et méthodes ____ **36**

2.1. Le déroulement des campagnes ____ 36

2.1.1. Les campagnes « eau » ____ 36

2.1.2. La campagne « sédiment » ____ 39

2.1.3. Les campagnes de prélèvement d'oursin ____ 39

2.2. Méthodes analytiques ____ 40

2.2.1. Extraction des composés à partir de la matrice d'eau ____ 41

2.2.2. Préparation des échantillons de sédiment ____ 43

2.2.3. Extraction des phénols pour les oursins ____ 43

2.2.4. Paramètres analytiques ____ 44

2.3. Analyses statistiques ____ 45

3. Résultats et discussion ____ **46**

3.1. Distribution des sous-produits de chloration dans l'eau ____ 46

3.1.1. Diversité des sous-produits de chloration ____ 46

3.1.2. Influence des paramètres environnementaux sur la formation des SPC ____ 51

3.2. Niveau de pollution dans les sédiments du golfe ____ 60

3.3. Niveau de pollution des oursins du golfe ____ 61

4. Conclusion 63

CHAPITRE 3 : Impact des sous-produits de chloration ***64***

1. Introduction 65

2. Mise en pratique 67

2.1. Prélèvement et quantification des communautés planctoniques 67
2.2. Production de larves d'oursin 68
2.3. Produits chimiques 69
2.4. Évaluations toxicologiques 69
2.5. Détermination du stress oxydant 70
2.6. Test de génotoxicité 74
2.7. Analyses statistiques 76

3. Résultats 76

3.1. Évaluation de l'impact *in vivo* des rejets préalablement chlorés industriels sur les communautés picoplanctoniques locales. 76
3.2. Évaluation de la toxicité *in-vitro* du BMF, du TBAA et du TBP sur le développement embryonnaire d'oursin 81
3.3. Evaluation du stress oxydant associé aux SPC 84
3.4. Évaluation de la génotoxicité du mélange 86

4. Conclusion 89

CHAPITRE 4 : Adaptation locale des oursins issus du golfe de Fos ***90***

1. Introduction 91

2. Plan d'expérience 93

2.1. Protocole opératoire 93
2.2. De l'extraction des ARN totaux à la quantification des ARNm suivis 95
2.3. Les gènes étudiés 97
2.4. Statistiques 98

3. Résultats et discussion 98

3.1. Le cas des témoins négatifs 98
3.2. Zoom sur l'abondance des métallothionéines 100
3.3. Le cas des larves exposées à différents niveaux de pollution 102
3.4. Influence de la nature de la pollution 106

4. Conclusion 109

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES ***110***

BIBLIOGRAPHIE ***115***

ANNEXES ***142***

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Diagramme potentiel-pH du brome ____ 5
Figure 2 : Plan d'attaque pour caractériser le stress ____ 6
Figure 3 : Cartographie des centrales électriques dans le monde ____ 10
Figure 4: Principe de chloration dans les échangeurs thermiques industriels (Institut écocitoyen) ____ 12
Figure 5 : Schéma des différentes formes de ROS ____ 23
Figure 6 : Schéma des différentes étapes de la peroxydation lipidique ____ 24
Figure 7 : Structure d'une comète et différents stades d'ADN endommagé ____ 26
Figure 8 : Principe de l'expression génique (cas d'un gène codant pour une protéine) ____ 27
Figure 9 : Cycle de vie de l'oursin Paracentrotus lividus (Couvray 2015) ____ 31
Figure 10 : Cartographie du golfe de Fos. ____ 32
Figure 11 : Concentration en zinc dans le golfe de Fos en µg/L (Benon et al. 1978). ____ 33
Figure 12 : Mesure du courant en surface et en profondeur (maximum 7m) pour chaque campagne. ____ 38
Figure 13 : Cartographie des points de prélèvement dans le golfe de Fos sur Mer. ____ 38
Figure 14 : Six différents points de prélèvement d'oursins. Les stations « éoliennes », « cavaou » et « ponteau » sont les plus proches des exutoires. Les stations « Gloria », « Fos sur mer » et « port de Bouc » sont les plus éloignés des exutoires. ____ 40
Figure 15: Distribution de la pollution en sous-produits de chloration en fonction des sites de prélèvement pour les 6 campagnes (GC-ECD). ____ 46
Figure 16 : Niveau de pollution aux SPC en fonction des campagnes. ____ 49
Figure 17 : Diversité des SPC mesurés au niveau des exutoires ____ 50
Figure 18: Paramètres physico-chimiques en fonction des campagnes ____ 51
Figure 19 : Niveaux de pollution pour les différentes familles de SPC, THM, AHA et HAN en fonction des campagnes et des sites de prélèvement. ____ 53
Figure 20 : Modèle de salinité en Méditerranée le 7 novembre 2018, jour de la campagne n°5 ____ 55
Figure 21 : Analyse en composante principale sur l'ensemble des données des campagnes ____ 56
Figure 22 : Classification descendante hiérarchique sur l'ensemble des données des campagnes ____ 57
Figure 23 : Concentrations en SPC trouvées selon les sites et les campagnes ____ 58
Figure 24: Interpolation spatiale de la distribution de la pollution en SPC à la surface du golfe lors des 6 campagnes ____ 59
Figure 25 : Concentrations (µg/kg de poids sec) dans les oursins selon leur localisation dans le Golfe de Fos ____ 62
Figure 26 : Cascade de production des principales espèces réactives de l'oxygène, selon Favier (1997) ____ 71
Figure 27 : Réactions chimiques impliquées dans la mesure du NO_2^- à l'aide du système de réactifs de Griess ____ 72
Figure 28: Principe du traitement des lames pour le test des comètes ____ 74
Figure 29: Principe d'évaluation de la comète ____ 75
Figure 30: Représentation graphique de l'analyse de redondance des variables abiotiques expliquant la distribution des données biologiques. ____ 77

Figure 31 : Contribution de chaque groupe à la variabilité biologique, toutes campagnes confondues. 78
Figure 32 : Représentation des analyses de redondance pour chaque campagne, différenciant les sites de prélèvement. 79
Figure 33 : Courbe dose-réponse pour les trois molécules testées 81
Figure 34 : Effet du bromoforme (rose), tribromophénol (bleu) et de l'acide tribromoacétique (orange) seul et en mélange de DMENO (gris), sur le pourcentage de larves Pluteus bien développées issus d'adultes pêchés dans le golfe de Fos (site pollué, PS) et d'un site non pollué (référence), après 48 heures d'exposition 84
Figure 35 : Evolution des espèces antioxydantes des larves Pluteus à la suite d'une exposition de 48 heures aux DMENOs des différents SPC (à gauche) et l'évolution de deux oxydants (à droite). 85
Figure 36 : Distribution de l'OTM et du % d'ADN dans la queue de la comète en fonction du niveau d'exposition des larves de Pluteus au mélange chimique. 86
Figure 37 : Les différentes approches « -omics » 92
Figure 38 : Photos des conditions d'aquaculture. A : ponte des oursins ; B : bassins de 80L 94
Figure 39 : Résumé du plan expérimental suivi. 3 expositions différentes ont été entreprises pour chaque site géographique étudié. 95
Figure 40 : Zoom sur le taux de transcrit de 3 métallothionéines retrouvé dans les larves de Fos (gris) et les larves de Calvi (rouge). 101
Figure 41 : Analyse en composantes principales du taux de transcrits des différents gènes (variables) et la répartition des individus en fonction de leur site géographique, après 48 heures d'exposition à l'eau réelle de Fos et au mélange de SPC. 103
Figure 42 : Analyse en composantes principales du taux de transcrits des différents gènes (variables) et la répartition des individus en fonction de leur site géographique, après 96 hpf d'exposition à l'eau réelle de Fos et au mélange de SPC 105
Figure 43 : Analyse en composante principale pour chaque site géographique en fonction de la pollution, ainsi que la contribution aux axes des variables 108

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Propriétés physico-chimiques de quelques représentants des principales familles de SPC _____ *15*

*Tableau II : Tableau récapitulatif réalisé par Richardson et al. (2007), sur les sous-produits de chloration retrouvés dans les eaux destinées à la consommation humaine et leur toxicité associée.*_____ *17*

Tableau III : Concentrations moyennes en cadmium, cuivre, zinc et plomb du golfe de Fos (µg/L) _____ *33*

Tableau IV : Liste des industries du Golfe ayant recourt à la chloration _____ *34*

Tableau V: Récapitulatif des conditions météorologiques de chaque campagne _____ *37*

Tableau VI : Liste des échantillons prélevés pour l'analyse des sédiments _____ *39*

*Tableau VII: Performances analytiques*_____ *42*

*Tableau VIII: Programmes de détection en GC-ECD en fonction des familles analysées*_____ *45*

Tableau IX : Proportions des différentes familles de SPC par rapport aux composés organohalogénés totaux mesurés _____ *49*

Tableau X : Les différentes valeurs de toxicité pour les trois SPC étudiés _____ *82*

Tableau XI : Concentrations des différents ETM utilisées pour les expositions des témoins positifs _____ *95*

Tableau XII : Programme du LightCycler 480 _____ *96*

Tableau XIII : Liste des gènes étudiés et leur fonction _____ *97*

Tableau XIV : Fluctuations d'abondance des transcrits selon le stade de développement. _____ *99*

Tableau XV : Profil d'expression pour les larves témoins âgées de 48h et de 96h. _____ *100*

Tableau XVI : Contribution des variables et des individus aux deux axes pour les expositions 48 hpf _____ *104*

Tableau XVII : Contribution des variables et des individus aux deux axes pour les expositions 96 hpf _____ *106*

OBJECTIFS SCIENTIFIQUES

Différents objectifs forment le fil conducteur de cette thèse.

- Le premier est d'identifier les sous-produits de chloration (SPC) formés, de déterminer les conditions nécessaires à leur formation et de quantifier le niveau de contamination du golfe de Fos en SPC. L'objectif du projet *in fine*, est d'arriver à modéliser en fonction des conditions physico-chimiques le devenir de la pollution en SPC du golfe.

- Le second est de caractériser l'impact de cette pollution sur le vivant. D'une part, l'influence de la contamination aux SPC sur la distribution de communautés planctoniques clés dans le golfe a été évaluée. D'autre part, des analyses sur le modèle animal oursin (*Paracentrotus lividus*), ont été réalisées afin d'établir la toxicité des trois principaux SPC observés dans le golfe ; d'évaluer de potentielles différences de réponse transcriptomique, dans la mise en place d'une réponse au stress de différentes populations au trait d'histoire de vie contrasté pour l'exposition aux SPC, et enfin de rechercher des régions génomiques potentiellement sélectionnées par le milieu, favorisant la survie dans le golfe.

- L'objectif final est de mieux comprendre et prédire la pollution aux SPC dans le golfe, ainsi que la pression exercée par cette pollution dans un contexte de multi-pollutions sur la faune endémique.

INTRODUCTION

L'océan mondial représente 71 % de la superficie globale, avec une profondeur moyenne de 3 800 m, le plaçant plus vaste milieu de vie planétaire. Il tient un rôle primordial pour le climat en régulant ce dernier via les transferts océaniques de chaleur et en participant aux grands cycles biogéochimiques tel que celui du carbone. Depuis les débuts de la révolution industrielle les émissions de dioxyde de carbone n'ont cessé d'augmenter. Les activités humaines sont mises en cause, définissant ainsi l'ère de l'anthropocène, aboutissant à une dispersion croissante des molécules synthétisées par l'homme qui terminent leur parcours dans les sols, les rivières, l'atmosphère et finalement l'océan, le réceptacle ultime (Asimov et Pohl 1991). Ce n'est que dans les années 50 que nous avons réalisé que les capacités d'épuration des océans étaient fortes mais pas infinies. La première convention internationale pour la prévention de la pollution des eaux de mer par les hydrocarbures a vu le jour en 1954 (Convention OILPOL). Malgré une prise de conscience de plus en plus vive des populations face à la pollution, force est de reconnaitre que les pratiques ont du mal à évoluer face aux enjeux économiques et sociétaux actuels. Selon l'UNESCO, 80% des pollutions océaniques sont aujourd'hui d'origine terrestre, et par ordre d'importance relèvent des pollutions plastiques, agricoles, industrielles et sonores (Boughriet 2011).

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

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

Plusieurs moyens existent pour désinfecter l'eau de mer comme l'électro chloration, la chloration, l'ozonation. Cependant l'utilisation du chlore gazeux reste la technique d'oxydation la plus utilisée par les industriels, car moins coûteuse et d'une mise en œuvre facile (Rajagopal *et al.* 2012). La concentration de molécule active ajoutée au milieu ainsi que les paramètres physico-chimiques du milieu, tels que la salinité, le pH, la température, la concentration en matière organique, influencent le niveau de diversité des SPC formés. Par conséquent, la nature et l'abondance des SPC produits varient en fonction des modalités de chloration et des environnements. Cependant, les SPC observés dans le milieu ne sont pas uniquement le résultat de l'activité humaine, une partie est naturellement produite. Plus de 5 000 composés organohalogénés ont été décrits comme issus d'organismes marins (Gribble 2010). La compétition entre les organismes marins pour la ressource a entrainé l'émergence de plusieurs molécules de défense contenant des halogènes. Ce mécanisme est mis en place notamment par les algues pour lutter contre les microorganismes pathogènes, ou les prédateurs. Ainsi, le bromoforme est le SPC le plus abondamment retrouvé dans l'environnement marin, avec une production naturelle mondiale estimée à 10^5 tonnes par an (Quack *et al.* 2004; Warwick *et al.* 2006; Butler *et al.* 2007; Stemmler *et al.* 2015). Pour autant, la source principale de bromoforme reste anthropique. Quack *et al.* (2004) estiment la quantité mondiale de SPC dans les océans à plus de 100 millions de tonnes, l'essentiel provenant

des sites industriels (env. 98%), le reste étant issus des eaux de ballasts. Les teneurs environnementales moyennes sont comprises entre 10 et 50 µg/L dans les sites pollués correspondant à environ 1 000 fois la concentration naturelle (Quack *et al.* 2004).

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

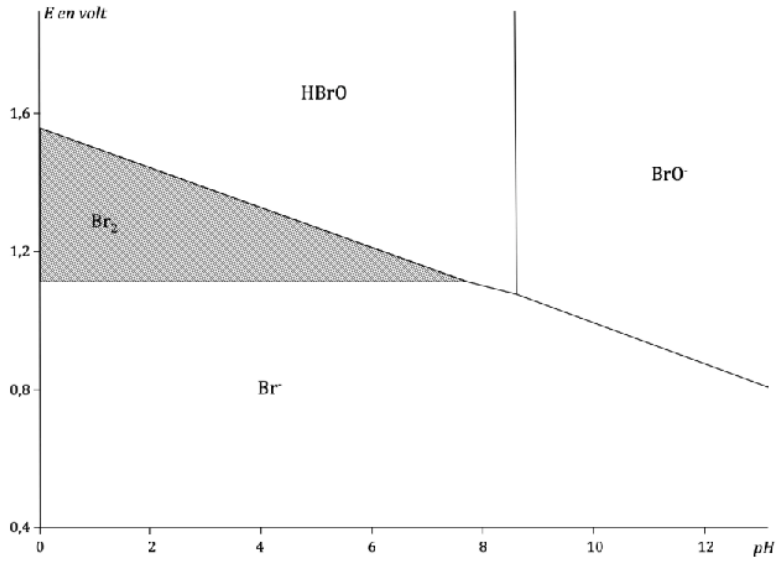


Figure 1 : Diagramme potentiel-pH du brome

La chimie des oxydants dans l'eau de mer est largement contrôlée par la forte teneur en ions halogénures (Cl^- : 19 g/L, Br^- : 65 mg/L, I^- : 0,05 mg/L). L'ion bromure est de loin le principal partenaire de réaction pour les oxydants, en raison de sa constante de vitesse du second ordre pour ses réactions avec les oxydants chimiques de l'ordre de 10^5 L/mol*s. Lors de la désinfection de l'eau de mer, les bromures sont oxydés en acide

hypobromeux/hypobromite (HOBr/OBr^-) comme nous pouvons le voir sur la Figure 1 (Von Gunten *et al.* 1996).

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

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

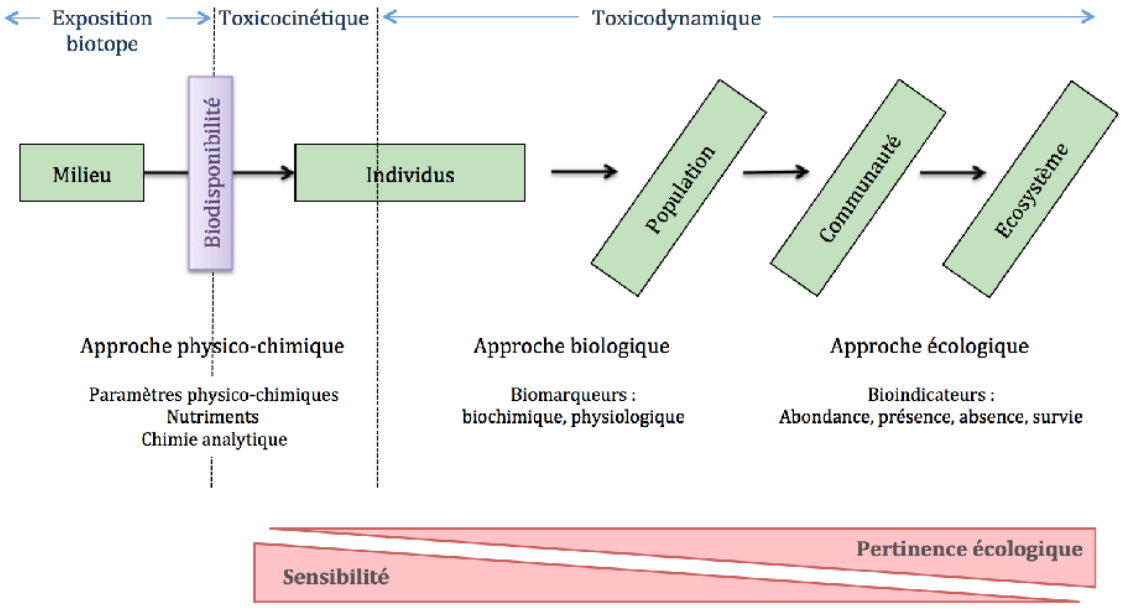


Figure 2 : Plan d'attaque pour caractériser le stress

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

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

1. Source, nature et niveau des contaminations aux SPC

1.1. Différentes sources possibles

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

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

La plupart des composés naturels identifiés sont des molécules aromatiques complexes et uniques à certains organismes, donc peu répandus dans l'environnement (Gribble 2010). Certaines de ces structures sont analogues à des composés anthropiques et même des phénols bromés complexes, des dioxines et des dibenzofurannes peuvent se former naturellement. Plusieurs bromophénols, qui se forment également pendant la désinfection de l'eau de mer, ont été trouvés aux alentours du µg/ml dans le vers marin *Notomastus lobatus* et dans de nombreuses algues (Whitfield *et al*. 1999; Lincoln *et al*. 2005; Reineke *et al.* 2006). Les précurseurs des composés phénoliques chlorés, bromés et iodés peuvent également être des substances humiques complexes. Les macroalgues benthiques brunes, vertes et rouges et les microalgues pélagiques sont dotées d'une enzyme, la bromoperoxydase qui leur permet de produire et libérer des composés organohalogénés en présence de bromure et de peroxyde d'hydrogène (Neidleman et Geigert 1986; Moore *et al.* 1996; Whitfield *et al.* 1999). Dans le milieu marin riche en bromures, le peroxyde d'hydrogène est le facteur limitant leur formation. Ce dernier peut être toxique pour les cellules d'algues, ainsi la formation d'halométabolites peut être une réponse au stress oxydatif (Pedersen *et al.* 1996). Certains auteurs ont lié la survie de certaines algues à la présence d'halométabolites, utilisés comme moyens de défense contre les infections bactériennes et fongiques (Reichelt et Borowitzka 1984; Hornsey et Hide 1985), et comme moyen de dissuasion des brouteurs (Moore *et al.* 1996; Gibson *et al.* 2008). Deux cents composés organohalogénés différents ont également été identifiés dans une espèce de cyanobactéries (McConnell et Fenical 1977; Cabrita *et al.* 2010). Alors que les microalgues produisent essentiellement un mélange d'halométhanes, dont les proportions varient d'une étude à l'autre, le tribromométhane (bromoforme) est toujours le composé dominant (Quack *et al.* 2004). De plus, le bromoforme est le produit de dégradation le plus abondant de molécules plus complexes (Gribble 2010; Paul et Pohnert 2011; Manasfi 2016). En général, les espèces des régions polaires produisent le moins de composés bromés, alors que les espèces

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

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

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

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

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

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

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

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

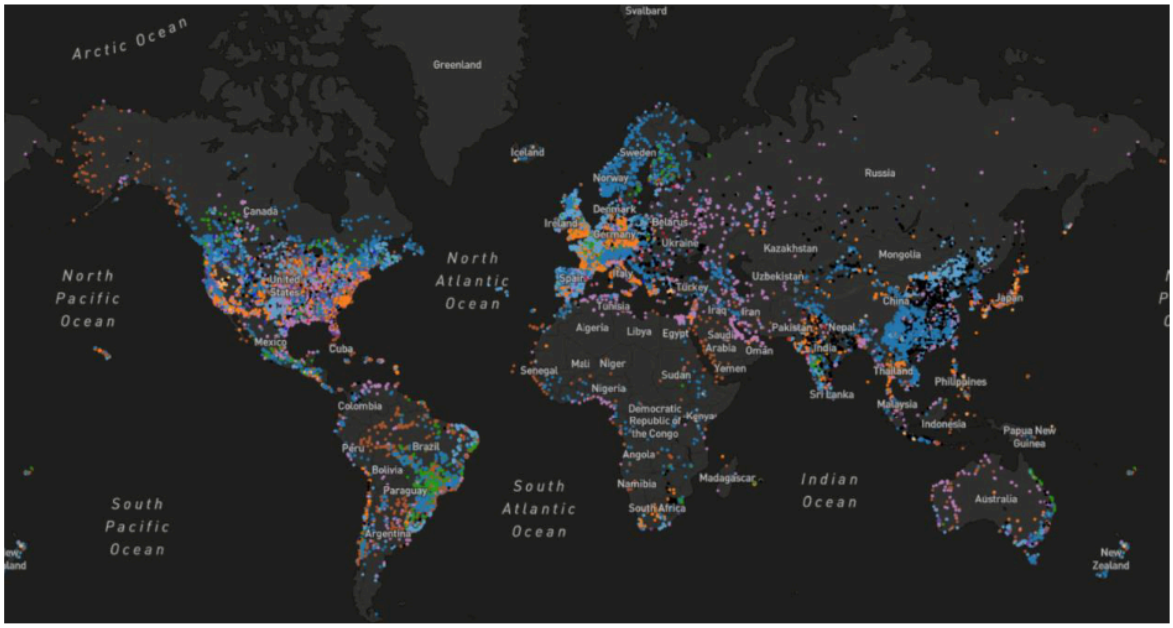


Figure 3 : Cartographie des centrales électriques dans le monde
(https://resourcewatch.org)

La croissance démographique rapide et les fréquentes sécheresses ont accéléré la demande en eau douce dans le monde. Depuis des décennies, les opérations de dessalement ont lieu dans de nombreux pays du Moyen-Orient, du bassin méditerranéen et d'Amérique du Sud, ainsi qu'en Australie, au Japon et aux États-Unis afin de fournir de l'eau potable à leur population. La capacité mondiale de production d'eau par dessalement a été estimée à environ 100 millions de m^3/j en 2015 (Latteman 2010) mais la capacité et la production devraient encore augmenter (Hanasaki *et al.* 2016). Le plus grand nombre d'usines de dessalement se trouve dans le golfe Persique. Environ 60% de la capacité mondiale de dessalement traite l'eau de mer ; le reste traite l'eau saumâtre (21%) et l'eau moins salée (Bennett 2013). Le procédé de traitement peut reposer soit sur le dessalement thermique, soit sur des techniques de dessalement à membrane (osmose inverse, par exemple). Au total, les techniques d'osmose inverse et de distillation représentent respectivement 63% et 31% de la capacité mondiale de traitement (Gude 2016). D'autres industries utilisent l'eau de mer comme échangeur thermique pour réchauffer ou refroidir leurs conduites en fonction de leurs applications.

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

Pour contrôler efficacement la formation de l'encrassement biologique, le procédé de chloration à faible niveau nécessite de maintenir une concentration résiduelle d'oxydant équivalente à environ 0,2 mg/L (exprimée en Cl_2) (Khalanski et Jenner 2012). La dose de chlore appliquée dépend de la demande en oxydant de l'eau et des circuits, elle est de l'ordre de 0,5-1,5 mg/L. En général, la croissance des biofilms est plus prononcée dans les eaux chaudes, alors qu'en hiver, lorsque le taux de croissance est extrêmement faible, un traitement oxydant n'est pas nécessaire (Newsome *et al.* 2011). Dans les centrales côtières françaises, la chloration est appliquée tant que la température de l'eau dépasse 10°C (Hartmann *et al.* 2011).

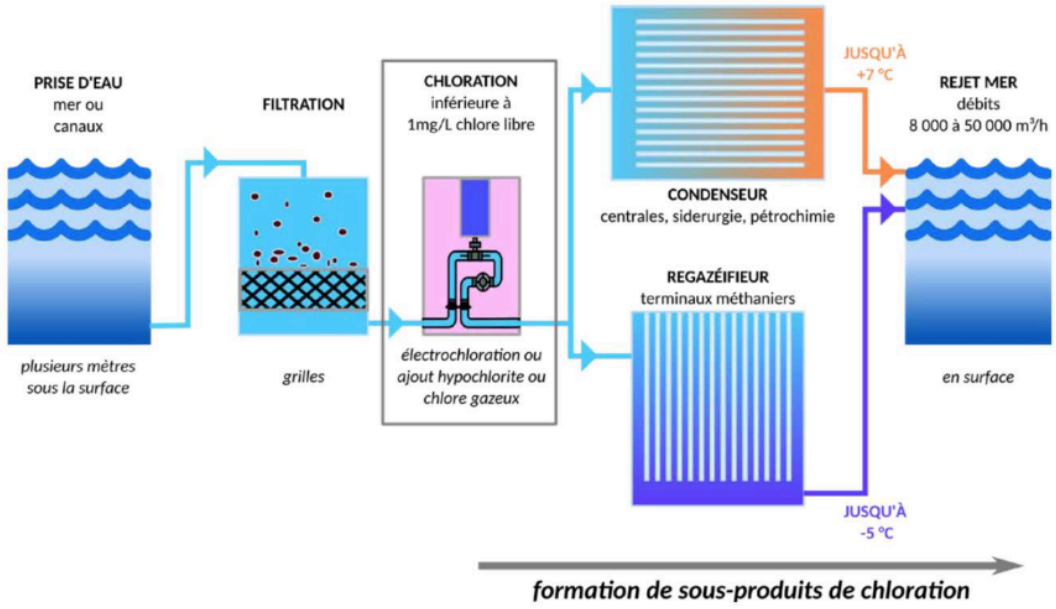


Figure 4: Principe de chloration dans les échangeurs thermiques industriels (Institut écocitoyen)

Le volume total d'eau utilisé pour le dessalement des eaux est estimé à 200 milliards de m^3 par an, soit environ le dixième des volumes utilisés pour le refroidissement (Kim *et al.* 2015).

Bien que la chloration soit utilisée dans le monde entier, seules quelques études sur la production de SPC lors de la chloration de l'eau de mer sont disponibles. L'étude la plus complète sur les SPC dans des rejets d'eau de refroidissement des centrales électriques a été publiée par Jenner *et al.* (1997) ; ils couvrent 90 analyses d'eaux de refroidissement dans 10 centrales électriques côtières différentes au Royaume-Uni, en France et aux Pays-Bas. Depuis, des données supplémentaires sur cette étude ont été présentées par Taylor (2006), et mettent en évidence le pouvoir bioaccumulatif du bromoforme dans le foie de poissons comme le bar, mais aucun effet indésirable notable malgré des débits d'eau de refroidissement moyen de 50 m^3/s et un delta de température de + ou – 10°C. Des analyses complémentaires ont été réalisées sur les centrales françaises par Allonier *et al.* (1999) et ont montré une pollution en SPC de l'ordre du µg/L, pour une concentration initiale en oxydant de l'ordre de 1 mg/L. De plus, des études sur les eaux de refroidissement d'une centrale coréenne et d'une centrale indienne ont été publiées (Yang 2001; Padhi *et al.* 2012) ainsi que des études sur les rejets de terminaux méthaniers en France (Boudjellaba *et al.* 2016; Manasfi *et al.* 2018). Ces dernières

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

Une empreinte environnementale des SPC provenant de l'eau de refroidissement en Europe est clairement visible (Jenner *et al.* 1997; Boudjellaba *et al.* 2016; Manasfi *et al.* 2018).

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

Les effets des invasions d'espèces dans de nombreuses régions du monde ont été dévastateurs et causent d'énormes dommages à la biodiversité et aux ressources. Les données quantitatives montrent que le taux de bio-invasions continue d'augmenter à un rythme alarmant et que de nouvelles zones sont constamment envahies (OMI, 2018). Les dommages causés à l'environnement sont généralement irréversibles, l'organisation maritime internationale (OMI) estime à 7 000 le nombre d'espèces différentes transportées chaque jour dans le monde (OMI 2018). Comme le commerce et le volume du trafic n'ont cessé d'augmenter au cours des dernières décennies, le problème n'a peut-être pas encore atteint son apogée. À l'échelle mondiale, cela représente dix milliards de m^3 d'eau qui se déplacent d'un continent à l'autre. Pour la France seule, c'est un volume de 22 millions de m^3 (Chauveau 2017).

Pour faire face à la propagation des espèces invasives provoquée par les eaux de ballast des navires, l'OMI a adopté en 2004 la Convention Internationale pour le Contrôle et la Gestion des Eaux de Ballast et Sédiments des navires (Convention BWM), entrée en vigueur le 8 septembre 2017. Les 52 états ayant adhéré à la convention représentent 35% du tonnage brut de la flotte mondiale des navires de commerce. La Convention exige que tous les navires en trafic international appliquent des procédures de gestion des eaux de ballast afin d'atteindre une norme de rejet qui peut impliquer l'installation de systèmes de traitement des eaux de ballast. Les microorganismes réglementés sont par exemple *Escherichia coli* (< 250 unités/100mL) ou les entérocoques intestinaux (<100 unités/100mL). Le plancton dont la taille est comprise entre 10 et 50 µm est limité à moins de 10 organismes viables/mL (OMI 2019).

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

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

1.2. Nature et niveaux des concentrations environnementales

Les données disponibles sur les occurrences de SPC sont très limitées et propres à chaque procédé. Les sous-produits de chloration connus appartiennent à différentes familles de molécules, parmi lesquelles les trihalométhanes (THM) et les acides haloacétiques (AHA) représentent environ 50% des composés organohalogénés totaux. Une grande fraction des SPC reste cependant encore inconnue (Heller-Grossman *et al.* 2001).

1.2.1. Milieux aquatiques

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

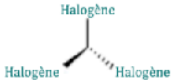
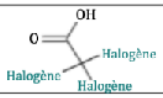
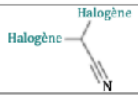
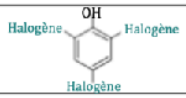
- Les trihalométhanes (THM) incluant le chloroforme ($CHCl_3$), le bromodichlorométhane ($CHBrCl_2$), le chlorodibromométhane ($CHBr_2Cl$) et le bromoforme ($CHBr_3$). Ce sont les SPC les plus volatils (constante de henry > 10^{-4}).

Les THM représentent 46 à 65 % du total des SPC (identifiés à ce jour) et le bromoforme 95% des THM.

- Les acides haloacétiques (AHA) incluant l'acide monobromoacétique ($BrCH_2COOH$, pka de 2,69), l'acide dibromoacétique ($Br_2CHCOOH$, pka de 1,48) et l'acide tribromoacétique (Br_3CCOOH, pka de 0,72). Ils sont en partie formés par hydrolyse d'haloacétonitriles et sont non volatils. L'acide di- et tri-bromoacétique représentent 25% à 45% respectivement de la pollution en SPC.
- Les haloacétonitriles (HAN) sont formés par oxydation des acides aminés. Ils sont semi-volatils et les plus hydrophiles. Le dibromoacétonitrile (Br_2CHCN) est le plus communément trouvé et occupe la troisième place avec 6% à 9% du total.
- Les halophénols (HP) incluant le 2,4,6 tribromophénol ($C_6H_3Br_3O$) qui est le plus communément rencontré, bien que le dibromophénol soit parfois signalé. Ils ne sont pas volatils. Le 2-4-6 tribromophénol demeure inférieur à 1 %, mais en raison de son Log Kow élevé (4.13) et sa faible solubilité, c'est le composé a priori le plus bioaccumulable (Almqvist 2011; Covaci *et al.* 2011).

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

Tableau I : Propriétés physico-chimiques de quelques représentants des principales familles de SPC

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

1.2.2. Réseau trophique

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

2. L'actualité des SPC

2.1. Risques associés aux SPC en santé publique

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

En 1974, la découverte des SPC dans les réseaux a déclenché de nombreuses études afin de caractériser les propriétés toxicologiques et épidémiologiques de ces nouveaux composés (Bellar *et al.* 1974; Rook *et al.* 1974). Un état des connaissances synthétisant la toxicité de 85 SPC a été réalisé en 2007 par Richardson *et al.* (2007), et une partie est résumée dans le Tableau II. La majorité des composés présentés est génotoxique et peut

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

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

SPC	Occurrence	Génotoxicité	Carcinogénicité
SPC réglementés			
Trihalométhanes THM			
Chloroforme	*****	-	+
Bromodichlorométhane	****	+	+
Chlorodibromométhane	****	+	+
Bromoforme	****	+	+
Acides haloacétiques AHA			
Acide Chloroacétique	***	+	-
Acide Bromoacétique	***	+	
Acide Dichloroacétique	*****	+	+
Acide Dibromoacétique	*****	+	+
Acide Trichloroacétique	*****	-	+
SPC non réglementés			
Halonitrométhanes			
Chloronitrométhane	**	+	
Bromonitrométhane	**	+	
Dichloronitrométhane	**	+	
Dibromonitrométhane	***	+	
Bromochloronitrométhane	**	+	
Trichloronitrométhane	****	+	
Bromodichloronitrométhane	***	+	
Dibromochloronitrométhane	***	+	
Tribromonitrométhane	***	+	
AHA			

Bromochloroacétique	*****		+
Acide Bromodichloroacétique	*****		+
Acide Dibromochloroacétique	*****	+	+
Acide Tribromoacétique	*****		
Iodo-THM et autres THM			
Dichloroiodométhane	***		
Bromochloroiodométhane	***		
Dibromoiodométhane	***		
Chlorodiiodométhane	***		
Bromodiiodométhane	***		
Iodoforme	***	+	
Dichlorométhane	***	+	
Bromochlorométhane	ND	+	
Dibromométhane	ND/**	+	
Haloacétamides AHAm			
Chloroacetamide	***	+	
Bromoacetamide	***	+	
Iodoacetamide		+	
Dichloroacetamide	***	+	
Bromochloroacetamide	***	+	
Dibromoacetamide	***	+	
Bromoiodoacetamide	***	+	
Trichloroacetamide	***	+	
Bromodichloracetamide	***	+	
Dibromochloroacetamide	***	+	
Tribromoacetamide	***	+	
Diiodoacetamide		+	
Chloroiodoacetamide		+	
Haloacétonitriles HAN			
Chloroacétonitrile	***	+	
Bromoacétonitrile	***	+	
Iodoacétonitrile		+	
Dichloroacétonitrile	***	+	
Bromochloroacétonitrile	***	+	
Dibromoacétonitrile	***	+	
Trichloroacétonitrile	***	+	
Bromodichloroacétonitrile	***		
Dibromochloroacétonitrile	***		
Tribromoacétonitrile	***		

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

+ : effet déjà démontré sur un ou plusieurs organismes modèles ; - : aucun effet publié.

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

2.2. La réglementation sanitaire des SPC

Aujourd'hui, les réglementations des SPC ne concernent que l'eau potable et se durcissent peu à peu. La première réglementation a vu le jour au Canada en 1978 et limitait la concentration totale en THMs à 350µg/L. Puis, en 1996, la limite a été abaissée à 100 µg/L, pour s'établir à 80 µg/L en 2006 (Costet-Deiber 2013). Enfin, en 2008, des recommandations concernant spécifiquement les AHAs imposent que la somme des 5 principaux composés ne dépasse pas 80 µg/L (Santé Canada). En France, la réglementation du Code de la santé publique, datant de 2007, ne considère que les THMs totaux, limités à 100 µg/L. Alors que les réglementations se durcissent dans les pays industrialisés (EU, Canada, Asie), on observe cependant une augmentation constante des THMs dans les réseaux d'eau potable d'un facteur 2 à 6, liée à une sur-chloration des réseaux (Mouly *et al.* 2009).

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

2.3. Réglementation environnementale

Sur la base de l'évaluation des risques réalisée par le Ballast Water Working Group (BWWG), une limite a été fixée pour les résidus totaux oxydés (RTO) à 0,1 mg Cl_2/L dans les eaux de ballast rejetées considérées comme « ne présentant aucun risque inacceptable pour l'environnement » (GESAMP-BWWG 2018). Concernant les eaux de refroidissement, la concentration en chlore libre injectée dans les conduites se situe généralement autour de 0,5 mg/L. La valeur de la concentration maximale autorisée en principe actif est établie par les autorités locales (arrêté préfectoral).

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

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

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

3.1. Les biomarqueurs

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

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

- Les biomarqueurs de susceptibilité : indiquent une capacité inhérente ou acquise d'un organisme à répondre à un stress.

Les biomarqueurs sont ainsi des outils qui permettent de détecter, idéalement de façon précoce et spécifique, la nature et l'intensité d'une perturbation du milieu, par exemple une pollution chimique, impactante pour le vivant local.
L'idée sous-jacente est donc d'analyser des variations naturelles d'abondances et/ou d'occurrence de biomarqueurs pertinents afin d'anticiper les effets néfastes et potentiellement irréversibles des xénobiotiques. Un bon biomarqueur est sensible, fiable, permet une analyse rapide et à moindre coût (Perrichon 2014).
En outre, de nombreux biomarqueurs sont considérés dans des bio-essais pour caractériser, dans des conditions contrôlées, la toxicité d'une substance sur un modèle biologique choisi. Ces tests permettent de déterminer les concentrations induisant ou non un effet, comme les concentrations effectives 10-50 et 90 % ou les concentrations n'induisant pas d'effet ou le premier effet (respectivement DMSENO et DMENO), sur une durée d'exposition donnée. Ces essais sont classés selon le type d'exposition, aigue ou chronique, et selon les observations souhaitées.

3.1.1. Les variations phénotypiques

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

3.1.2. Les variations biochimiques

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

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

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

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

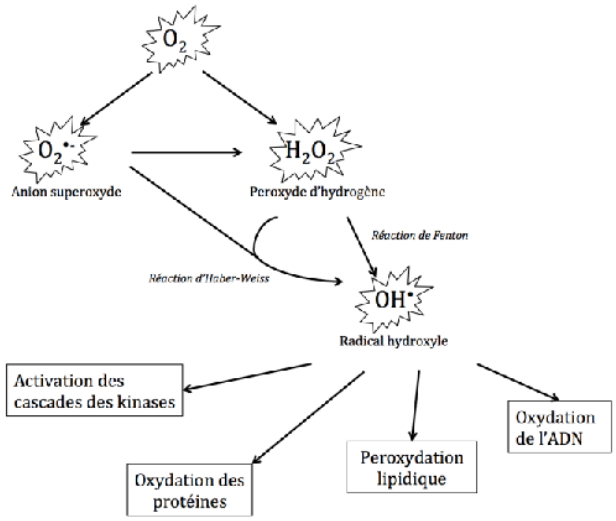


Figure 5 : Schéma des différentes formes de ROS

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

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

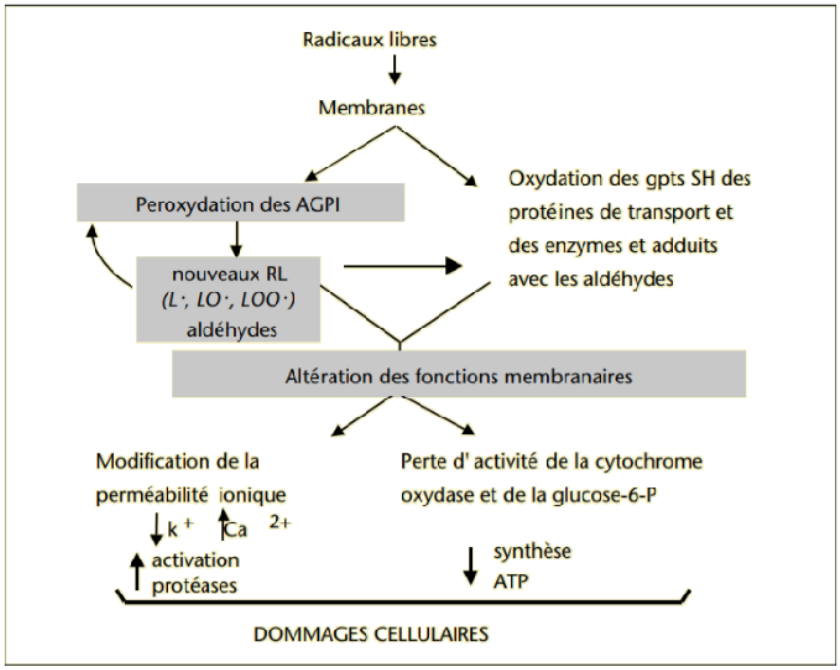


Figure 6 : Schéma des différentes étapes de la peroxydation lipidique

L : radical lipidique ; LO : radical alcoxyle ; LOO : radical peroxyle ; AGPI : acide gras polyinsaturé

Au cours de l'évolution, les organismes aérobies ont développé des mécanismes de défense antioxydants, dont la principale fonction est de bloquer et de désactiver les ROS. L'ampleur des dommages oxydatifs est directement liée à l'efficacité des systèmes antioxydants cellulaires. Parmi les systèmes antioxydants enzymatiques, la superoxyde dismutase (SOD) correspond à une famille de métallo-enzyme (contenant Cu, Zn, Fe, ou Mn), connue pour convertir l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Le peroxyde d'hydrogène peut être à son tour éliminé par deux autres enzymes, la catalase (CAT) qui est une hémoprotéine active dans les peroxysomes et la glutathione peroxydase qui est une sélénoprotéine. Ces enzymes agissent en décomposant le H_2O_2 en H_2O et O_2.

De façon plus générale, l'évaluation des défenses anti-oxydantes constitue un biomarqueur des effets néfastes des xénobiotiques (Valavanidis *et al.* 2006). Dans des conditions de stress, l'activité des enzymes de défense antioxydant peut être induite ou inhibée. Habituellement, l'induction est interprétée comme une adaptation des organismes, alors que l'inhibition reflète l'effet toxique des polluants et indique les dommages cellulaires (Vasseur et Cossu-Leguille 2003).

3.1.3. Dommages de l'ADN

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

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

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

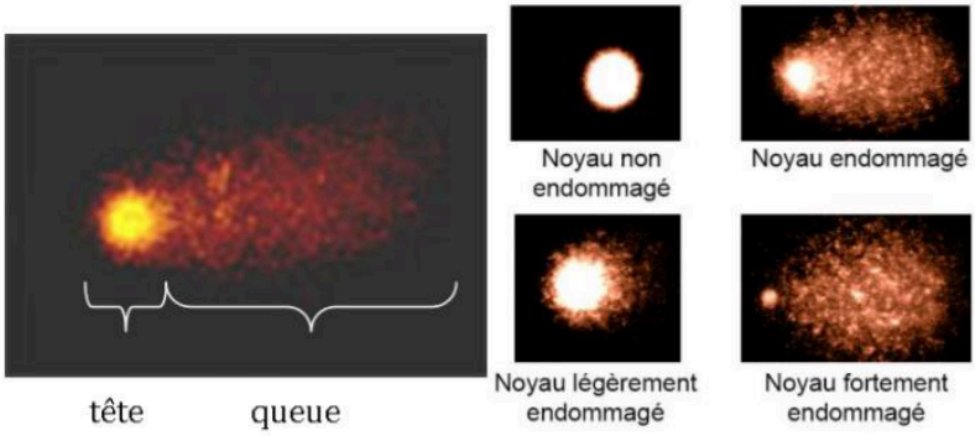


Figure 7 : Structure d'une comète et différents stades d'ADN endommagé

3.1.4. Expression de gènes

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

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

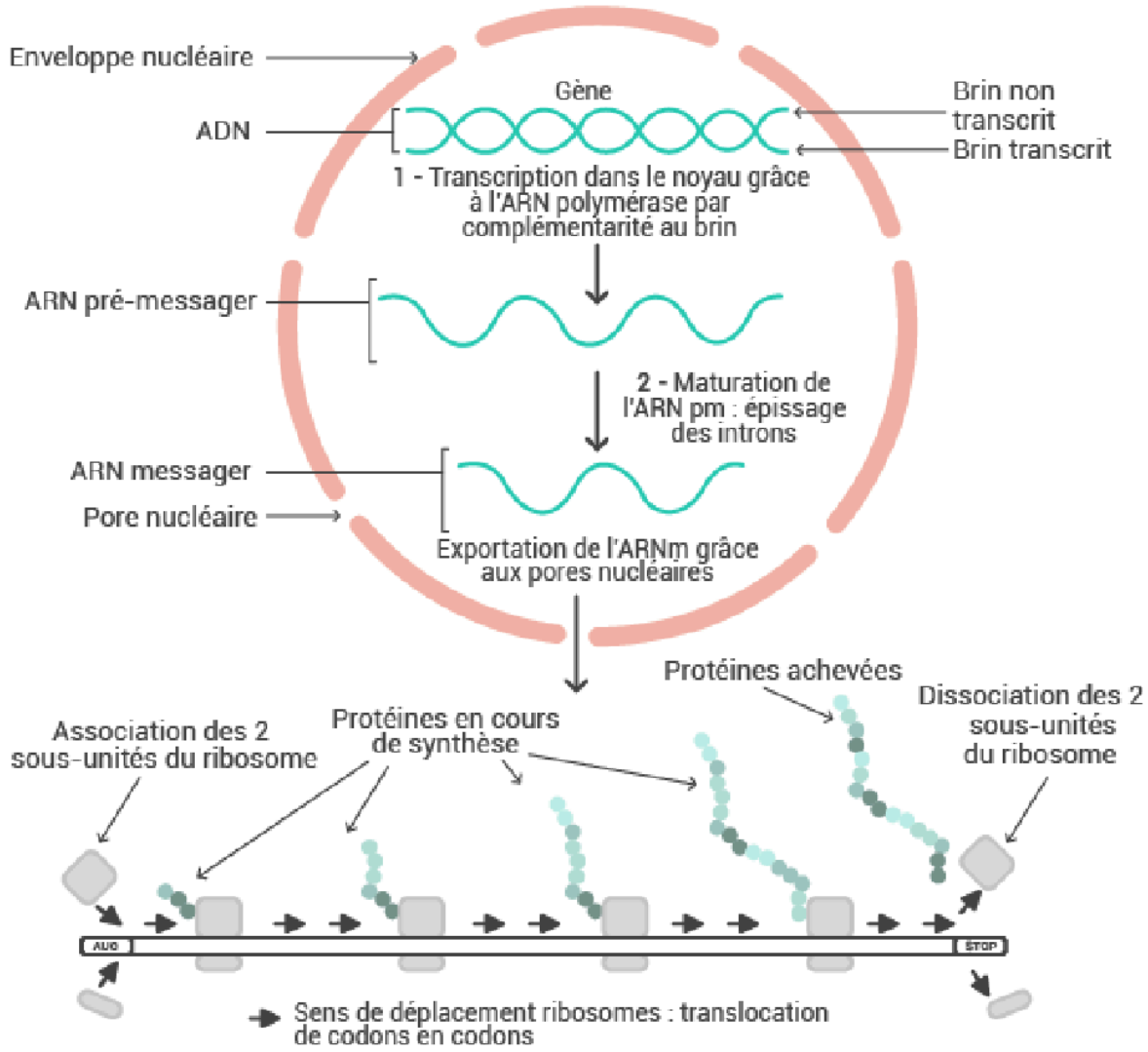


Figure 8 : Principe de l'expression génique (cas d'un gène codant pour une protéine)

3.2. Les organismes modèles

Les espèces bioindicatrices sont des organismes vivants, dont l'étude, aux différentes échelles d'organisation du vivant (i.e. moléculaires, cellulaires, populationnelles, écosystémiques), fournit des informations sur la qualité de l'environnement, des écosystèmes marins profonds aux habitats terrestres de haute altitude (Miller *et al.* 2007; Holt et Miller 2010). Ces espèces sont ainsi considérées comme des outils fiables pour détecter les changements environnementaux et ont le potentiel de rendre compte d'un état de « santé des écosystèmes », ou d'un était de « stress », avant que leur fonctionnalité ne soit compromise, en fournissant des réponses biologiques. Ces résultats peuvent alors guider les gestionnaires de l'environnement afin de prendre des

mesures de protection et de conservation (Khatri et Tyagi 2015; Bonanno et Pavone 2015; Siddig *et al.* 2016; Bonanno et Orlando-Bonaca 2018).

Tout bon bioindicateur, quelle que soit sa place dans le réseau trophique, doit posséder *a minima* les propriétés suivantes : la présence naturelle, l'abondance, la facilité d'identification et d'échantillonnage, une tolérance modérée aux perturbations et aux stress, et une large distribution géographique, de sorte que l'on puisse identifier plusieurs populations exposées à différentes concentrations de polluants ou de facteurs de stress (Hellawell 1986; Mathes et Pfetsch 1991; Carignan et Villard 2002).

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

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

Les organismes bivalves, telles que les moules et les huitres, ont fait l'objet de nombreux

travaux de suivis de qualité des eaux estuariennes et littorales, de par leur importance écologie et économique. Leur capacité à bioaccumuler les polluants a largement été démontrée. De plus, le développement embryonnaire est rapide et très sensible à la qualité du milieu. Les bivalves ont servi de bioindicateur pour des pollutions à des très nombreux polluants, parmi lesquels les métaux lourds (Dirrigl *et al.* 2018), les résidus de médicaments (Cunha *et al.* 2017) et autres polluants organiques (Lüchmann *et al.* 2015; Viñas *et al.* 2018).

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

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

Les portes d'entrée et de sortie des polluants varient selon la nature du composé et les capacités de l'organisme. Ainsi la toxicité d'un polluant dépend de la capacité d'un organisme à le stocker, le transfromer et l'excréter. Les organismes marins exposés, de manières aigues ou chroniques) à des environnements multi-pollués, déclenchent des mécanismes de réponses aux stress chimiques, à l'échelle moléculaire : c'est l'acclimatation. Spécifiquement, cette réponse résulte de la capacité de chaque individu de moduler le niveau d'expression de ses gènes, de traduction des ARN en protéines et de régulation de l'abondance et de l'activité des protéines, pour face faire à un stress. A l'échelle populationnelle, il est possible qu'une sélection s'opère sur les individus (donc les génomes) les plus aptes à répondre aux stress environnementaux. Nous le verrons par la suite à l'aide des biomarqueurs décrits précédemment.

Nous avons choisi comme modèle d'étude, l'oursin méditerranéen *Paracentrotus lividus.*

Les échinodermes sont des animaux marins benthiques qui forment un groupe très ancien, de plus de 700 millions d'années. Cet embranchement comprend les ophiuridés (ophiures), les astérides (étoiles de mer), les holothuries (concombres de mer), les crinoïdes et les échinidés (oursins). Les échinodermes sont présents dans tous les océans et ont un rôle important dans leur écosystème, les oursins herbivores ont un rôle écologique clé dans la distribution et la gestion de l'abondance des macrophytes benthiques (Jangoux et Lawrence 1982).

L'oursin comestible *Paracentrotus lividus* est le plus représenté sur le littoral méditerranéen. Son aire s'étend également de l'Ecosse jusqu'au Açores, Canaries, Maroc (Boudouresque et Verlaque 2007). Cette espèce vit dans des biotopes très hétérogènes au sein des peuplements d'algues photophiles de la roche superficielle, sur les fonds rocheux ou dans les herbiers de posidonies, mais toujours dans les premiers mètres où la nourriture y est la plus abondante.

Les oursins sont des organismes ovipares gonochoriques. Le cycle de vie commence lors de l'émission des gamètes dans l'environnement marin. Les périodes de pontes sont synchrones au sein d'une population grâce à une signalisation chimique (Keckes et al. 1966). En méditerranée, deux épisodes de reproduction ont lieu chaque année, le plus important est au printemps et le second en automne. L'œuf fertilisé se développe rapidement en une larve nageuse environ 48 heures après la fertilisation appelée larve *Pluteus*. Les larves d'oursins constitut le zooplancton pendant 3 à 4 semaines avant de se

fixer à un substrat et de se métamorphoser. Les jeunes larves métamorphosées appelées juvéniles devront attendre leur maturité sexuelle pour recommencer ce cycle (Figure 9). Le taux de croissance de l'oursin dépend de son milieu environnent et de la quantité de nourriture, il atteint en général sa taille commerciale de 5cm hors piquants au bout de 4 à 5 ans (Couvray 2015).

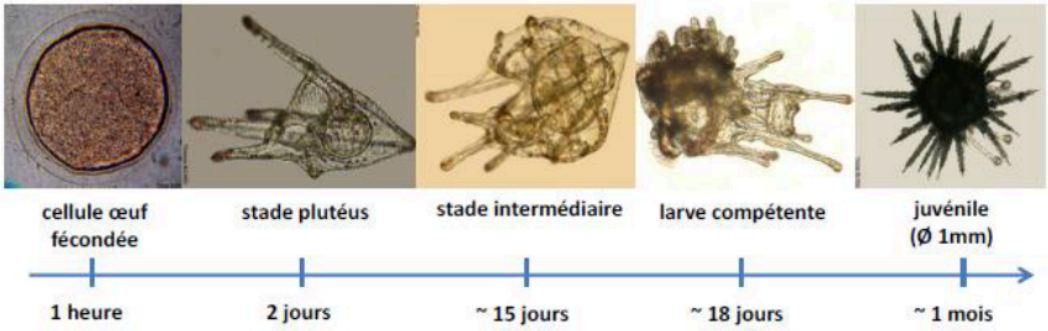


Figure 9 : Cycle de vie de l'oursin *Paracentrotus lividus* (Couvray 2015)

4. Le site d'étude : le golfe de Fos

Sur la côte méditerranéenne française, au Nord-Ouest de Marseille se trouve l'un des plus grands ports de commerce de France ainsi qu'une zone industrielle conséquente, le golfe de Fos (Figure 10).

Le golfe industriel de Fos est né au milieu du 19ième siècle, avec l'arrivée de l'industrie chimique et métallurgique. C'est en 1930, lors de la construction de 3 raffineries entre l'étang de Berre et le golfe de Fos qu'apparait la première grosse pollution aux hydrocarbures et aux PCB entrainant l'interdiction ferme de la pêche dans l'étang de Berre. Dans les années 1960, une pollution métallique s'ajoute avec l'arrivée de terminaux minéraliers et d'usines de sidérurgie. La pollution, liée à la chloration de l'eau de mer, retrouvée dans le golfe est la plus récente, puisqu'elle arrive avec la construction des terminaux méthanier et des centrales électriques dans les années 1970. Aujourd'hui 7 industries rejettent leurs eaux chlorées dans le golfe de Fos.

Le pôle industriel de Fos présente la deuxième concentration de sites classés « Seveso » en France, après l'estuaire de la Seine. Il comprend des industries de pétrochimie, de raffinerie, des centrales thermiques à gaz naturel, des terminaux méthaniers, pétroliers

et minéraliers. Ce golfe semi-fermé de 147 km² favorise le confinement de l'eau et reçoit les panaches du deuxième plus grand fleuve méditerranéen, le Rhône, entre autres apports d'eau douce (Arfi 1984; Ulses *et al.* 2005).

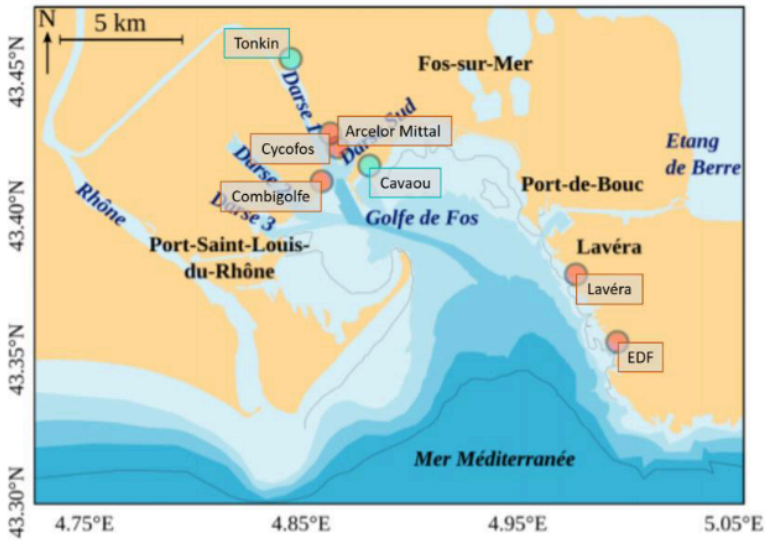


Figure 10 : Cartographie du golfe de Fos.
En vert, Tonkin et Cavaou (méthaniers) ont rejets industriels chlorés froids. En orange, Cycofos/Combigolfe/EDF (centrales électriques), Arcelor Mittal (sidérurgie) et Lavéra (pétrochimie) rejettent une eau chlorée chaude.

Selon Benon *et al.* (1978), le golfe de Fos est une des zones les plus polluées d'Europe en éléments traces métallique (ETM) (Tableau III, Figure 11). Les teneurs retrouvées sont 7, 20 et 30 fois supérieures pour le Cu, Cd, et Zn respectivement que celles de Chester et Stoner (1974) pour les eaux océaniques, considérées comme référence. Parmi les eaux côtières étudiées, de telles concentrations sont uniquement retrouvées dans les eaux de Hong-Kong (Chan *et al.* 1974), les eaux de Oslofjord (Andersen *et al.* 1973), la baie de Cardigan et le chenal de Bristol (Abdullah *et al.* 1972). Les études de Fukai et Huynh-Ngoc (1976) sur les eaux côtières et hauturières méditerranéennes ont mis en évidence le rôle exceptionnel du golfe de Fos sur la pollution aux métaux lourds. Un rapport plus récent a été réalisé à la demande du centre de traitement multi-filières de déchets ménagers de Fos en 2009, et a mis en avant une pollution au plomb à la limite des valeurs réglementaires CE pour l'eau et les sédiments, indiquant des teneurs de 7,2 µg/L et 43 mg/kg, respectivement. Concernant les poissons, la valeur limite de 0,30 mg/kg est dépassée dans les loups *Dicentrarchus labrax* du golfe, avec en moyenne 0,40 mg/kg de plomb mesuré (Golder Expertise 2009).

Tableau III : Concentrations moyennes en cadmium, cuivre, zinc et plomb du golfe de Fos (µg/L)

Golfe de Fos	Cd	Cu	Zn	Pb
Avril 1975 *Surface*	0,51		63,0	4,45
Novembre 1975 *Surface*	1,02	5,2	29,7	4,1
Novembre 1975 *5m*	2,8	6,2	34,2	6,3
Novembre 1975 *7m à 44m*	1,6	5,7	48,5	4,7

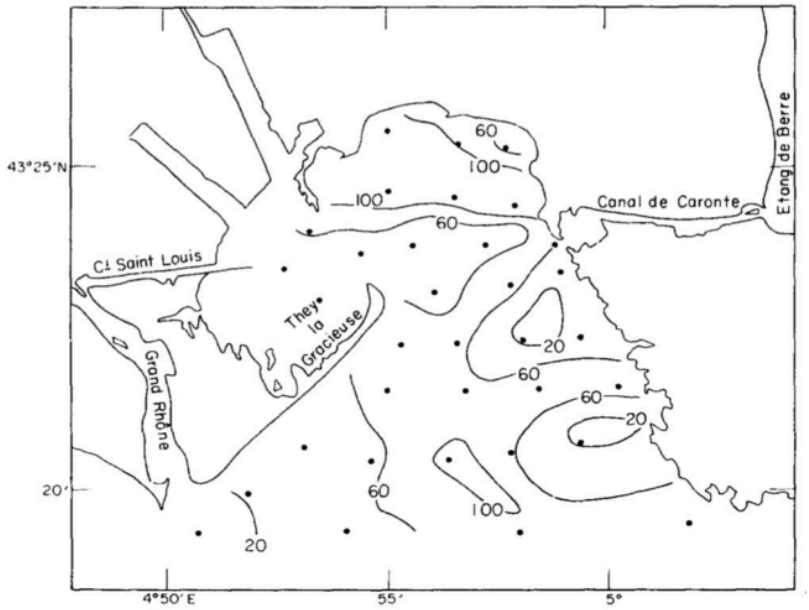


Figure 11 : Concentration en zinc dans le golfe de Fos en µg/L (Benon *et al.* 1978).

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

L'étude la plus récente sur les SPC est celle de Boudjellaba *et al.* (2016), qui décrit les concentrations trouvées dans le golfe de Fos. De nombreux sites industriels autour du

golfe utilisent des volumes d'eau importants pour le refroidissement de leurs installations (Tableau IV) : centrales électriques (Combigolfe, Cycofos, EDF), sidérurgie (ArcelorMittal), raffineries (Lavera). Le golfe est aussi caractérisé par la présence de deux terminaux méthaniers d'envergure (Fos-Cavaou et Fos-Tonkin), qui emploient des systèmes de réchauffement afin de re-gazéifier le gaz naturel importé sous forme liquéfiée (GNL). Des arrêtés préfectoraux imposent un débit maximal horaire pour chaque industriel, ces volumes sont résumés dans le Tableau IV. Ces échanges thermiques peuvent provoquer des écarts de température de ± 5°C. Une contamination généralisée aux SPC du golfe de Fos a été identifiée par Boudjellaba *et al.* (2016), avec des niveaux de bromoforme allant de 0,6 à 2,2 µg/L et de dibromoacétonitrile allant de 0,9 à 1,0 µg/L en hiver.

Tableau IV : Liste des industries du Golfe ayant recourt à la chloration

Industrie	Activité	Débit maximal autorisé m^3/h
Tonkin	Terminal méthanier	15 000
Cavaou		60 000
Arcelor Mittal	Sidérurgie	29 000
Combigolfe	Centrale électrique	90 000
Cycofos		56 000
EDF		70 000
Lavéra	Pétrochimie	45 000

Le Golfe de Fos représente donc un site d'étude particulièrement adapté à l'étude de l'impact des multi-pollutions sur les écosystèmes et sur l'identification et la quantification des SPC.

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

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

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

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

Le golfe de Fos qui est ici étudié, reçoit les eaux chlorées de 7 industries différentes (Figure 10). De plus, il abrite une large biodiversité ainsi qu'un grand parc à moules destinées à la consommation. Il y a donc, à plus large échelle, des enjeux, économiques, sanitaires et sociétaux. Dans le but de caractériser cette pollution le plus précisément possible, six campagnes de prélèvement d'eau ont été mises en place, couvrant ainsi un large spectre de conditions climatiques, une campagne de prélèvement de sédiments et plusieurs pêches d'oursins ont eu lieu.

2. Matériels et méthodes

2.1. Le déroulement des campagnes

2.1.1. Les campagnes « eau »

Six campagnes d'échantillonnage ont été réalisées (Tableau V), couvrant les 4 saisons annuelles. Les stations d'échantillonnage quadrillent l'ensemble du golfe de Fos en incluant les 7 principaux débouchés industriels (Figure 13). A propos des noms des stations, les « x » représentent des exutoires, les points « m » représentent des points en

mer, les points « c » représentent les points dans le canal de navigation du Rhône et le Rhône, et les « p » pour les points situés dans le port. Pour chaque station, des échantillons d'eau ont été prélevés à l'aide d'une bouteille Niskin™ d'un volume de 5L (General Oceanics, USA) en surface et en profondeur (en moyenne 7 m). Deux litres ont été récupérés pour l'analyse des SPC, l'un est acidifié avec 5 mL d'acide ascorbique à 120 g/L, afin de stopper toute réaction avec le chlore résiduel (Urbansky et al. 2000). Le second est conservé avec du chlorure d'ammonium à 10 g/L afin de pouvoir analyser les SPC azotés. En effet, les sous-produits de chloration azotés sont très instables dans l'acide ascorbique, c'est pour cela qu'un autre agent de conservation : le chlorure d'ammonium suggéré par l'étude de (Liew *et al.* 2012) a été utilisé. Le chlorure d'ammonium ne peut être étendu à l'ensemble des analyses, car il ne stoppe pas l'action du chlore résiduel et l'échantillon d'eau ne cesse donc pas d'évoluer entre le moment du prélèvement et l'extraction. Enfin, 250 mL sont prévus pour l'analyse des paramètres globaux. Tous les échantillons sont conservés à la température de 4 °C et à l'obscurité jusqu'à l'analyse.

Lors de la campagne 5, seules 12 stations ont été prélevées. Les différentes conditions de courant pour chaque campagne ont été cartographiées et sont résumées sur la Figure 12.

Tableau V: Récapitulatif des conditions météorologiques de chaque campagne

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

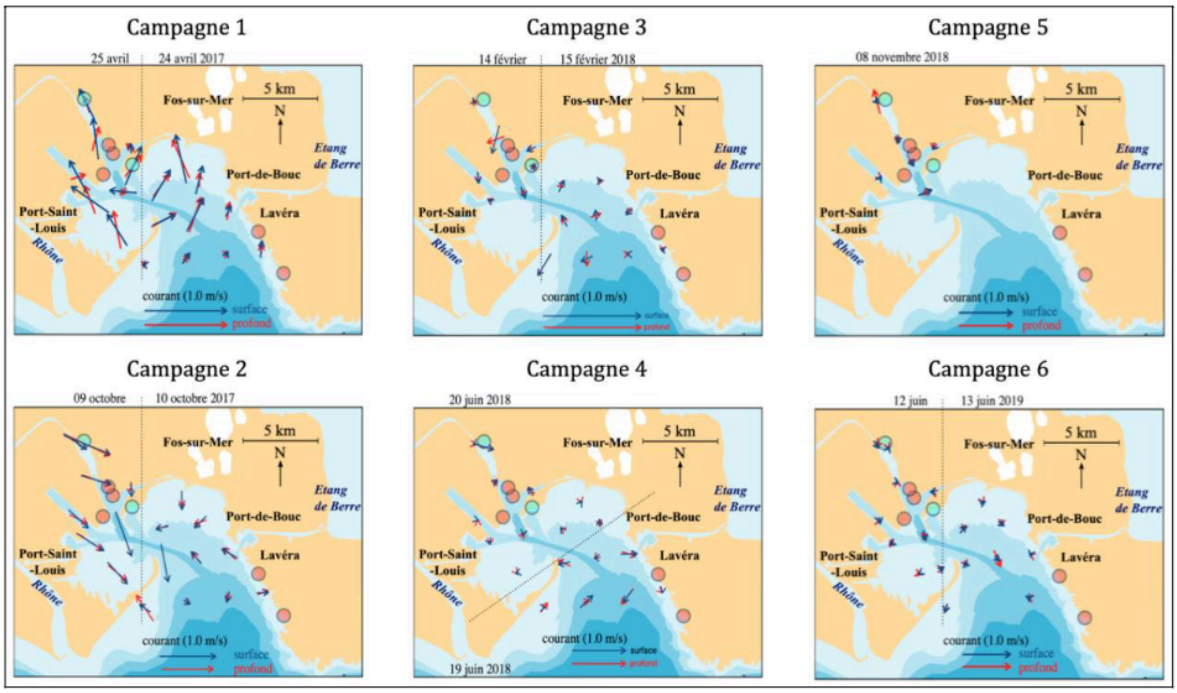


Figure 12 : Mesure du courant en surface et en profondeur (maximum 7m) pour chaque campagne.

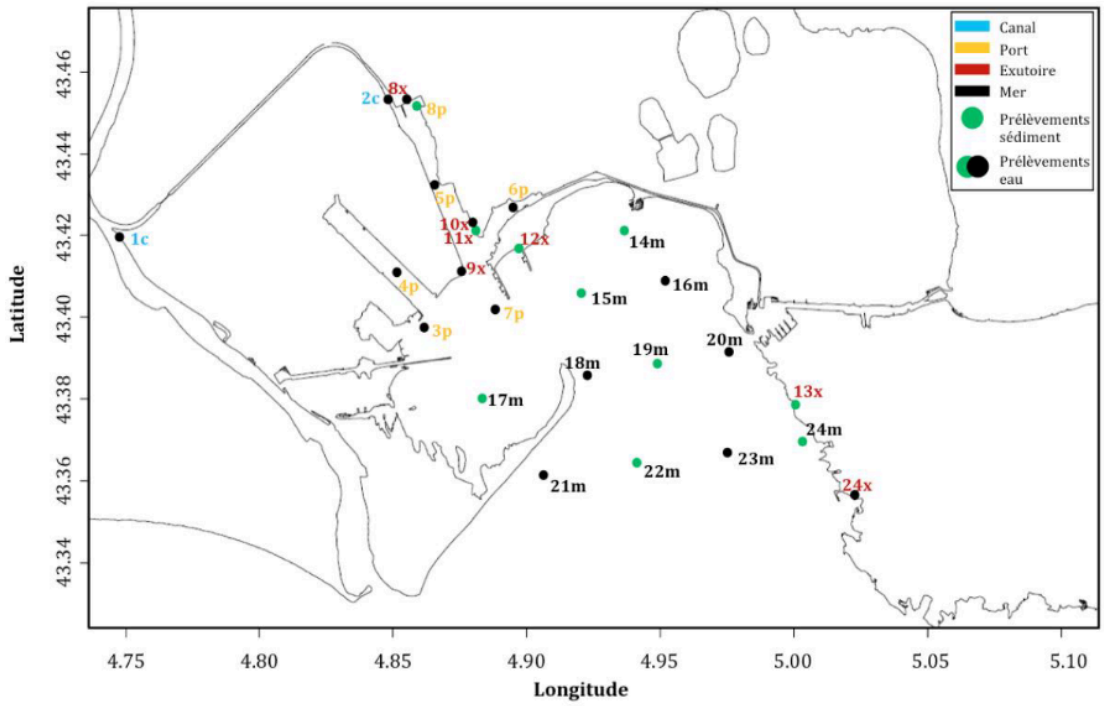


Figure 13 : Cartographie des points de prélèvement dans le golfe de Fos sur Mer.

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

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

2.1.2. La campagne « sédiment »

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

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

Prélèvements	Profondeur (m)
8p	7,4
11	6,5
12x	4,7
13x	8,0
14m	7,2
15m	11,5
17m	5,1
19m	24,5
22m	17,8
24m	6,2

2.1.3. Les campagnes de prélèvement d'oursin

Les prélèvements d'oursins ont eu lieu en hiver 2017, sur 1 semaine. Environ 50 oursins ont été pêchés en apnée sur 6 sites différents, plus ou moins proches des rejets industriels (Figure 14).

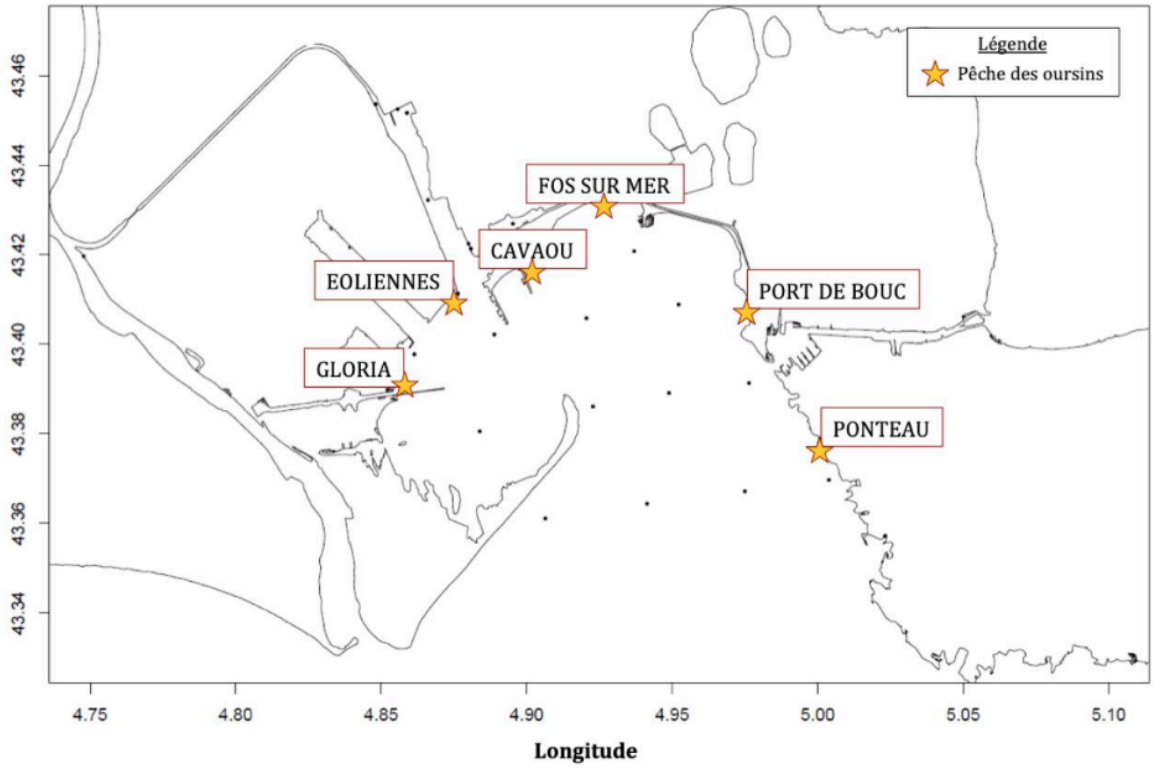


Figure 14 : Six différents points de prélèvement d'oursins. Les stations « éoliennes », « cavaou » et « ponteau » sont les plus proches des exutoires. Les stations « Gloria », « Fos sur mer » et « port de Bouc » sont les plus éloignés des exutoires.

2.2. Méthodes analytiques

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

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

À partir de nos échantillons de 1 L conservés dans l'acide ascorbique, 50 mL sont nécessaires pour réaliser les extractions des trihalométhanes, des haloacétonitriles et de l'hydrate de bromal. L'étalon interne utilisé est le 1,2,3 trichloropropane conformément à la norme U.S.EPA 551 .1 (Munch *et al.* 1995). Le pH a été ajusté entre 4,5 et 5,5 par addition d'acide sulfurique si nécessaire. Les échantillons ont été ensuite extraits par extraction liquide-liquide (ELL) en ajoutant 5 mL de méthyl tert-butyl éther (MTBE) et en agitant manuellement pendant 4 minutes. Ensuite, la phase organique a été collectée pour analyse. L'extraction est la même pour l'analyse des halonitrométhanes, cependant les échantillons utilisés sont ceux conservés avec du chlorure d'ammonium (Liew *et al.* 2012).

Pour l'analyse des acides haloacétiques, la méthode 552.3 de l'US-EPA (Domino *et al.* 2004) a été utilisée avec de légères modifications. En résumé, des aliquots d'échantillons conservés dans l'acide ascorbique (40 mL) ont été acidifiées à un pH < 1 par addition d'acide sulfurique concentré et extraits avec 4 mL de MTBE. L'acide 2,3-dibromopropionique a été ajouté aux extraits comme étalon. Après l'extraction liquide-liquide, la phase organique contenant les AHA a été recueillie et transférée dans des flacons de 65 mL auxquels 7 mL de méthanol acidifié à 10 % ont été ajoutés et placés dans un bain-marie à 50 °C pendant 2 h pour dériver les molécules (méthylation). La méthylation consiste à transformer un acide (-COOH) en ester méthylique (-$COOCH_3$). Un ester est nettement moins polaire que l'acide et donc plus volatil, par conséquent cette étape d'estérification améliore la qualité des résultats analytiques obtenus lors de leur séparation par chromatographie gazeuse. Après la dérivation, 4 mL de solution saturée de bicarbonate de sodium sont ajoutés à chaque échantillon avant de recueillir la phase organique contenant les esters d'AHA.

Pour l'analyse des halophénols (HP), la dérivation (acétylation) et l'extraction liquide-liquide (ELL) ont été effectuées en suivant la technique décrite par Allonier *et al.* (1999) avec quelques modifications. Des échantillons de 50 mL conservés dans l'acide ascorbique ont été mélangés manuellement pendant 4 minutes avec 10 g de carbonate de sodium, 5 mL d'anhydride acétique et 20 µL de 2,4,6 trichlorophénol (étalon interne), pour dériver les HP. Les halophénols doivent être dérivés avant leur analyse en chromatographie gazeuse en raison de leur polarité élevée, qui peut induire une

mauvaise résolution (pics larges) et diminuer la limite de détection. Le procédé de dérivation le plus efficace, le plus simple et le plus rapide est l'acétylation aqueuse, avec ajout de CH_3CO (Pizarro *et al.* 2010). 2,5 mL de MTBE sont ensuite ajoutés aux échantillons, après 2 minutes d'homogénéisation les phases organiques sont récupérées.

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

Tableau VII: Performances analytiques

	Limite de détection	Limite de quantification	Coefficient de variation (%)	Récupération (%)	Gamme	Linéarité (r^2)
			n=7 _ 0,1 µg/L			
Dichlorobromométhane (µg/L)	0,01	0,05	3,9	130	0,03 1	0,998
Dibromochlorométhane (µg/L)	0,01	0,03	4,1	93	0,03-1	0,999
Bromoforme (µg/L)	0,01	0,04	4,5	99	0,02-1 1-2	0,997 0,991
Tribromonitrométhane (µg/L)	0,01	0,07	1,2	111	0,1-5	0,997
Dibromoiodométhane (µg/L)	0,07	0,1	10	157	0,05-5	0,99
			n=7 _ 0,05 µg/L			
Hydrate de bromal (µg/L)	0,01	0,04	5,3	149	0,03-1	0,999
			n=10 _ 0,1 µg/L			
Monobromoacétonitrile (µg/L)	0,02	0,07	12	117	0,01-5	0,991
Dichloroacétonitrile (µg/L)	0,01	0,02	2,7	93	0,02-2	0,998
Trichloroacétonitrile (µg/L)	0,04	0,16	11,2	87	0,1-1	0,993
Bromochloroacétonitrile (µg/L)	0,01	0,02	3,6	75	0,02-2	0,999
Dibromoacétonitrile (µg/L)	0,01	0,02	3	85	0,02 2	0,999
			n=8 _ 0,05 µg/L			
2 Bromo 4 chlorophénol (µg/L)	0,01	0,02	6	95	0,01 1	0,999
2,6 Dibromophénol (µg/L)	0,01	0,03	6	104	0,03-0,6	0,995
2,4 Dibromophénol (µg/L)	0,01	0,02	4	107	0,02-1	0,999
2,4,6 Tribromophénol (µg/L)	0,01	0,01	1,6	138	0,03-1	0,992
			n=8 _ 0,5 µg/L			
Acide monobromoacétique (µg/L)	0,9	2,7	15	84	3,0-10	0,991
Acide dichloroacétique (µg/L)	0,08	0,28	6,1	91	0,3-2	0,994
Acide trichloroacétique (µg/L)	0,12	0,43	9,2	92	0,3-2	0,996
Acide bromochloroacétique (µg/L)	0,11	0,38	6,8	111	0,2-5	0,999
Acide dibromoacétique (µg/L)	0,1	0,3	6,9	91	0,3-2	0,996
Acide dichlorobromoacétique (µg/L)	0,09	0,31	10,7	116	0,3-2	0,992
Acide dibromochloroacétique (µg/L)	0,12	0,44	6,9	128	0,5-5	0,994
Acide tribromoacétique (µg/L)	0,14	0,45	7,9	113	0,5-5	0,994
			n=7 _ 0,1 mg/L			
Chlore résiduel libre (mg/L)	0,03	0,1	36	102	0,1-1	0,993
Chlore total (mg/L)	0,03	0,1	36	102	0,1-1	0,993
			n=7 _ 1 mg/L			
Carbone organique total (COT) (mg C/L)	0,11	0,33	2,4	144	0,3-3	0,99
			n=7 _ 1 mg/L			
Azote total (mg N/L)	0,17	0,51	9,7	270	0,2-2	0,99

2.2.2. Préparation des échantillons de sédiment

Les sédiments ont été amenés à température ambiante et ont été homogénéisés dans des flacons pré-nettoyés en remuant vigoureusement avec des spatules en acier inoxydable. Les poids secs ont été déterminés en plaçant des aliquotes d'échantillon dans un four à 105 °C et pesés à intervalles de 24 heures jusqu'à ce que les différences de poids successives deviennent inférieures à 4 %. Pour l'analyse des halophénols dans les sédiments, la méthode s'inspire de Lampi *et al.* (1992) avec quelques modifications. Vingt grammes de sédiments humides ont été pesés, 50 mL de solution de NaOH 1M et 50 µL d'étalon interne 2,4,6 trichlorophénol à 1 mg/L, ont été ajoutés. Ensuite, 50 mL d'hexane ont été ajoutés à l'échantillon et le tout a été exposé pendant 10 minutes aux ultrasons. La phase hexane a ensuite été éliminée, la phase aqueuse a été récupérée et introduite dans des flacons de verre de 65 mL qui ont été centrifugés à 2000 tr/min pendant 10 minutes. 40 mL du surnageant résultant ont ensuite été prélevés et traités selon les protocoles utilisés pour l'analyse des HP dans les échantillons d'eau décrits ci-dessus.

2.2.3. Extraction des phénols pour les oursins

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

2.2.4. Paramètres analytiques

Les oxydants résiduels libres et les oxydants résiduels totaux ont été mesurés par la méthode colorimétrique DPD en utilisant un spectrophotomètre portable (AQUALYTIC-AL 800, Allemagne). Les concentrations de bromures dans l'eau ont été mesurés par un système de chromatographie ionique ICS-3000 Dionex utilisant un éluant NaOH 30 mM avec un débit de 1,5 mL/min à 30 °C.

Le carbone organique total (COT) et l'azote total (NT) ont été mesurés par oxydation catalytique à haute température (Multi N/C 2100, Analytik Jena, Allemagne). Des échantillons prétraités ont été injectés (50 µl) dans le four rempli d'un catalyseur préconditionné. La combustion a été réalisée à 800 °C et les produits de combustion ont été transportés par de l'oxygène de haute pureté (Linde Gas) permettant la détection du CO_2 par infrarouge non dispersif et la détection du NO par chimiluminescence.

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

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

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

Pour l'analyse des composés organohalogénés totaux, les échantillons ont été introduits dans un tube de combustion sous flux d'argon et d'oxygène (200 mL/mn). La combustion des composés organohalogénés extraits (EOX), suivie d'une étape de pyrolyse (900 °C), conduit à la formation d'halogénures d'hydrogène (HX) qui sont dosés, après déshydratation par coulométrie. L'introduction de vapeurs d'HX dans le réacteur contenant de l'acide acétique à 85 % provoque une baisse du potentiel qui est compensée par la génération d'ions Ag^+ jusqu'au retour du potentiel initial. Selon la loi de Faraday, la quantité d'halogène (µg Cl^-) est directement proportionnelle à la quantité d'ions Ag^+ produits. Seuls les fluors ne sont pas dosés. La gamme de mesure s'étend de 0,05µg/mL à 50 µg/mL. La fiabilité de la méthode a été vérifiée au moyen du dosage d'une solution de concentration connue de 2,4,6-trichlorophenol diluée dans du MTBE.

2.3. Analyses statistiques

Afin de pouvoir comparer tous les paramètres mesurés dans la colonne d'eau, nous avons exprimé toutes les concentrations en µg/L équivalent brome. Les statistiques ont été réalisées avec le logiciel R (version 3.6.1, 2019). Pour décrire les corrélations ainsi que les relations entre pollution-environnement, des tests de Pearson ont été réalisés et des analyses en composantes principales, avec le package FactoMiner également. Une

classification descendante hiérarchique a été utilisée pour différencier des groupes ayant le même comportement avec ce même package.

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

3. Résultats et discussion

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

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

3.1.1. Diversité des sous-produits de chloration

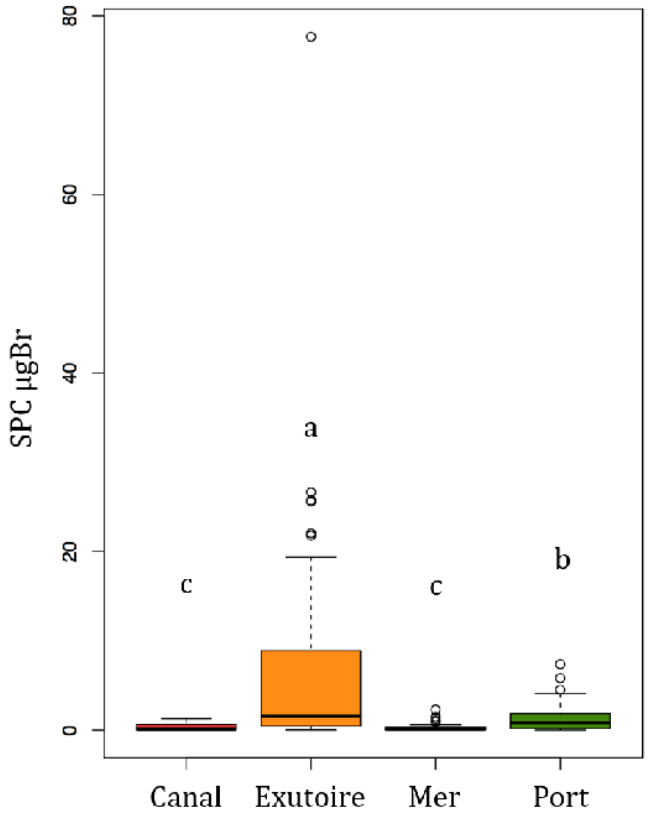


Figure 15: Distribution de la pollution en sous-produits de chloration en fonction des sites de prélèvement pour les 6 campagnes (GC-ECD).
La différence statistique entre les conditions est sous forme de lettre, selon le test Dunn.

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

AHA : Les acides di- et tri-bromoacétiques représentent 99% des AHAs totaux formés. L'équilibre entre ces deux formes dépend principalement du pH. Lors de la campagne n°5 et n°6 le pH est significativement plus faible que pour les autres campagnes, le di-AHA est sensiblement plus abondant. Les concentrations maximales mesurées en AHAs totaux atteignent la dizaine de µg/L. Les acides haloacétiques sont des composés non volatils, polaires et très stables dans l'eau, ils peuvent ainsi s'accumuler (Lagiere *et al.* 2017). De plus les AHA sont les sous-produits de dégradation ultimes de la famille des SPC azotés (Lagiere *et al.* 2017).

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

HP : Les concentrations en halophénols sont rarement au-dessus de la limite de détection lors des 6 campagnes. La concentration maximale retrouvée en bromophénols est de 0,4 µg/L lors la campagne 4, au point de prélèvement 8x. Le 2,4,6 tribromophénol est le seul composé qui a été dosé en GC-ECD. D'autres formes de phénols sont certainement présentes mais nécessiteraient une étape de pré-concentration nettement plus importante. D'autres études en parallèle de ce projet auraient détecté à l'aide de d'échantillonneurs passifs la présence de mono- et dibromo- phénols (Données non

encore publiées). La présence d'halophénols n'est pas corrélée avec le COT, et n'est même pas toujours corrélée avec les exutoires ou les courants (Figure 12). En effet, des concentrations parfois plus élevées ont été retrouvées au niveau des points « port ». La cinétique de formation des halophénols entre brome et substances humiques est encore mal connue. Cette observation témoigne soit d'un temps de réaction plus important pour la formation des halophénols, soit d'un autre facteur de formation, indépendant des rejets chlorés industriels. En effet dans le golfe de Fos, une multi-pollution a largement été établie et la présence de PCB, PBDE peut influencer la formation des phénols (Harju *et al.* 2009; Fisk *et al.* 2010; Covaci *et al.* 2011).

Dans l'ensemble, les concentrations de SPC détectées dans le golfe de Fos sont du même ordre que les pollutions déjà décrites dans une étude menée dans des centrales électriques côtières, où, aux points de rejet, les concentrations de bromoforme variaient entre 3,1 µg/L et 29,20 µg/L et les concentrations de HAN variaient de 0,10 à 11,39 µg/L (Jenner *et al.* 1997; Allonier *et al.* 1999; Khalanski et Jenner 2012; Boudjellaba *et al.* 2016).

La Figure 15, représente la distribution des concentrations en fonction des sites « mer », « port », « exutoire » et « canal », on voit très clairement que les concentrations les plus élevées sont retrouvées proches des exutoires. Les SPC mesurés en GC-ECD sont bien d'origine anthropique.

En parallèle de nos analyses, sur 6 points de prélèvement lors de la première campagne uniquement, des analyses effectuées par un partenaire du projet de recherche FOS-SEA, EDF Paris, nous ont permis d'obtenir les valeurs de composés organohalogénés totaux pour quelques échantillons. Il s'agit des points, 4p, 8p, 9x, 10x, 11x et 13x. Ces valeurs nous permettent d'obtenir une contribution ponctuelle moyenne des grandes classes de sous-produits de chloration dosées en GC-ECD. La contribution moyenne des THM est de l'ordre de 3,5% uniquement, avec un minimum de 0,2%. Les acides haloacétiques contribuent en moyenne de la même façon que les THM sur les 6 points analysés, avec un minimum de 0 puisque sur un point, aucun AHA n'a été détecté. Les haloacétonitriles contribuent moindrement, avec une moyenne de 0,8%. Ces observations montrent que la majorité des halogènes présents dans les échantillons, soit en moyenne 94%, n'ont pas été mesurés lors de la 1ère campagne en GC-ECD. Les rejets chlorés industriels

pourraient ne représenter qu'une petite partie du total halogénés du golfe ou alors la grande majorité des SPC ne sont pas encore connus (Tableau IX).

Tableau IX : Proportions des différentes familles de SPC par rapport aux composés organohalogénés totaux mesurés

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

Globalement sur les 6 campagnes, les concentrations en SPC les plus importantes ont été mesurées lors de la dernière campagne, n°6 (Figure 16).

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

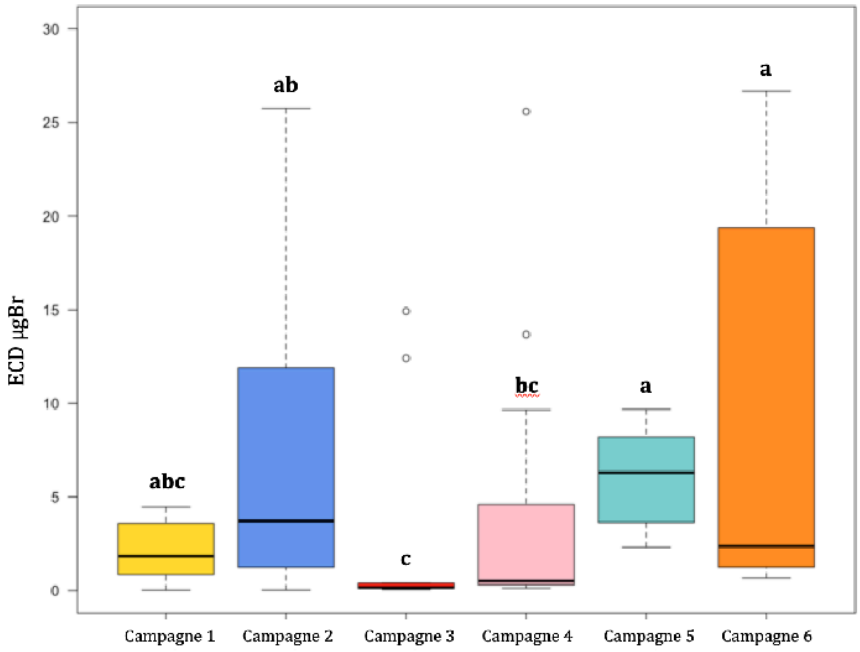


Figure 16 : Niveau de pollution aux SPC en fonction des campagnes.
Toutes les données pour chaque campagne ont été exprimées en ug/L équivalent Br, et ont contribué aux boites à moustache. n = 48, sauf pour la campagne 5, n= 24.

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

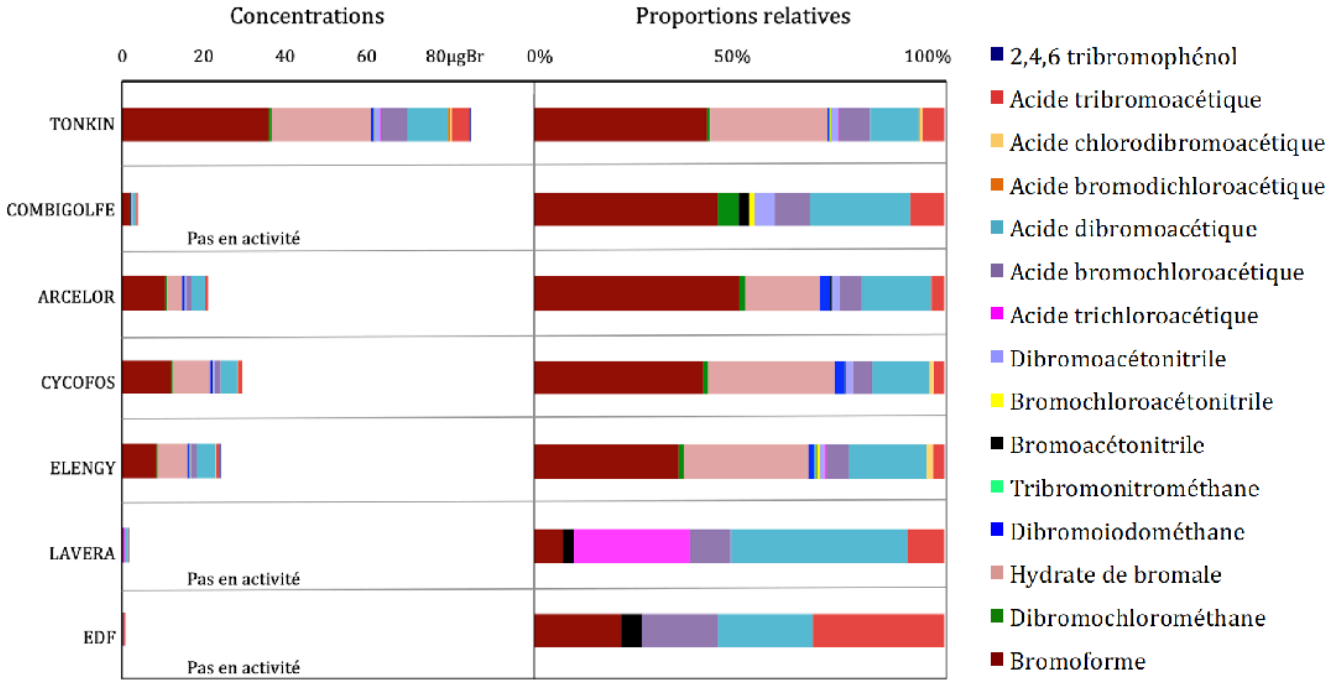


Figure 17 : Diversité des SPC mesurés au niveau des exutoires

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

La Figure 17 illustre le fait que la distribution en SPC est semblable pour les rejets chauds (Combigolfe, Arcelor, Cycofos, Lavéra et EDF) ou froids (Tonkin et Elengy), en activité. L'exutoire « Combigolfe » est situé très proche de « Arcelor Mittal » et « Cyclofos », on peut voir dans les proportions relatives, que le composé qui a disparu est l'hydrate de bromal, or c'est le moins stable et le plus volatil des SPC étudiés. Il se dégrade très rapidement en bromoforme ou alors est volatilisé (Manasfi 2016). On peut

également constater qu'entre ces rejets, qui sont séparés d'un kilomètre, on a déjà un facteur 6 de dilution.

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

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

3.1.2. Influence des paramètres environnementaux sur la formation des SPC

Tout d'abord, concernant les paramètres physico-chimiques des campagnes, on peut voir sur la Figure 18, que chaque campagne possède ses propres caractéristiques. La formation de SPC en découle directement.

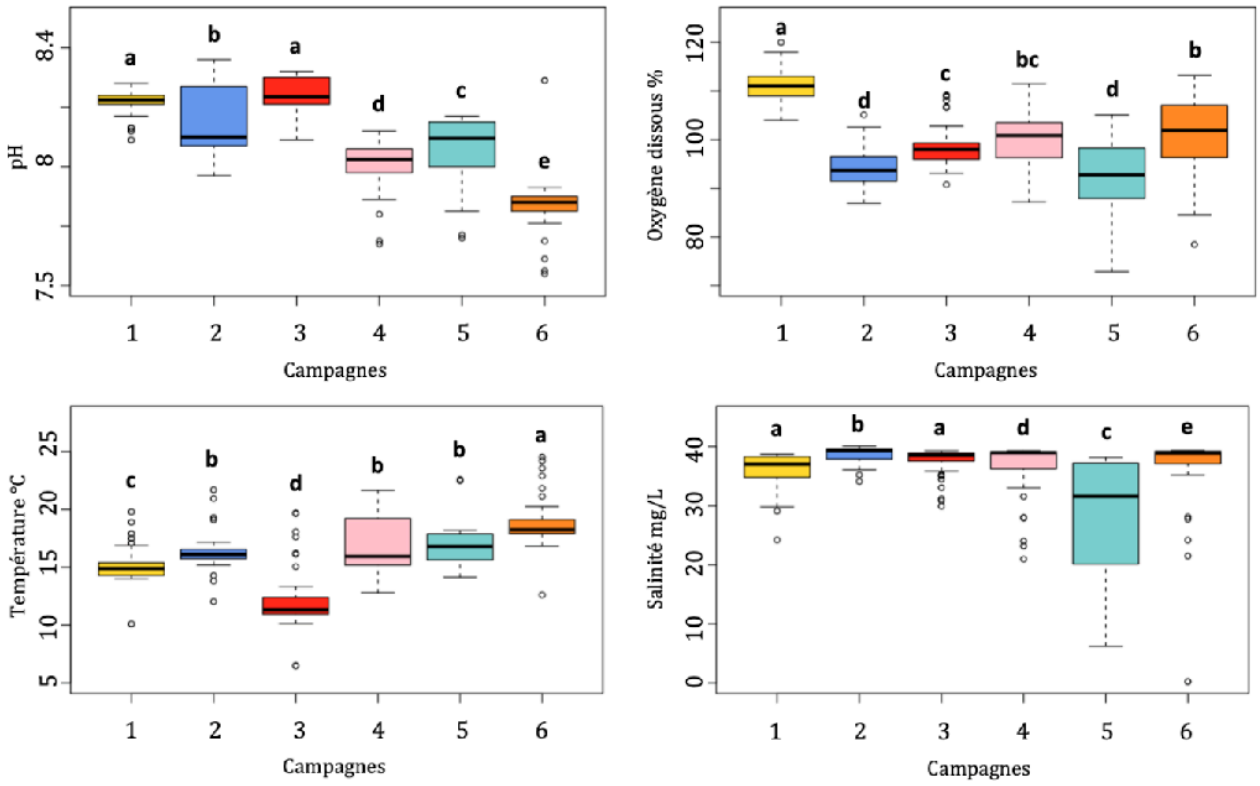


Figure 18: Paramètres physico-chimiques en fonction des campagnes
Résultats pour tous les points de prélèvements surface-profondeur. n = 48, sauf pour la campagne 5, n= 24

Il a été démontré que le pH est un facteur qui affecte la spéciation des SPC (Cimetiere *et al.* 2010). Hansen *et al.* (2012) ont démontré qu'avec la diminution du pH, la formation de THM et de tri-AHA diminuait, la formation de HAN augmentait alors que cela n'aurait pas d'impact sur les di-AHA. Ce sont des propriétés chimiques que l'on ne peut pas vérifier avec nos analyses, car en milieu naturel d'autres facteurs influencent davantage la formation des SPC que la faible variation de pH enregistrée notamment lors de la campagne 6. En effet, si on regarde la Figure 19, qui détaille les concentrations retrouvées en fonction des familles de SPC et des campagnes, on voit bien que lors de la campagne 6, aucune diminution en THM et aucune augmentation en HAN ne sont clairement visibles. Les volumes d'eaux industrielles chlorées rejetés masquent les variations liées aux paramètres physico-chimiques.

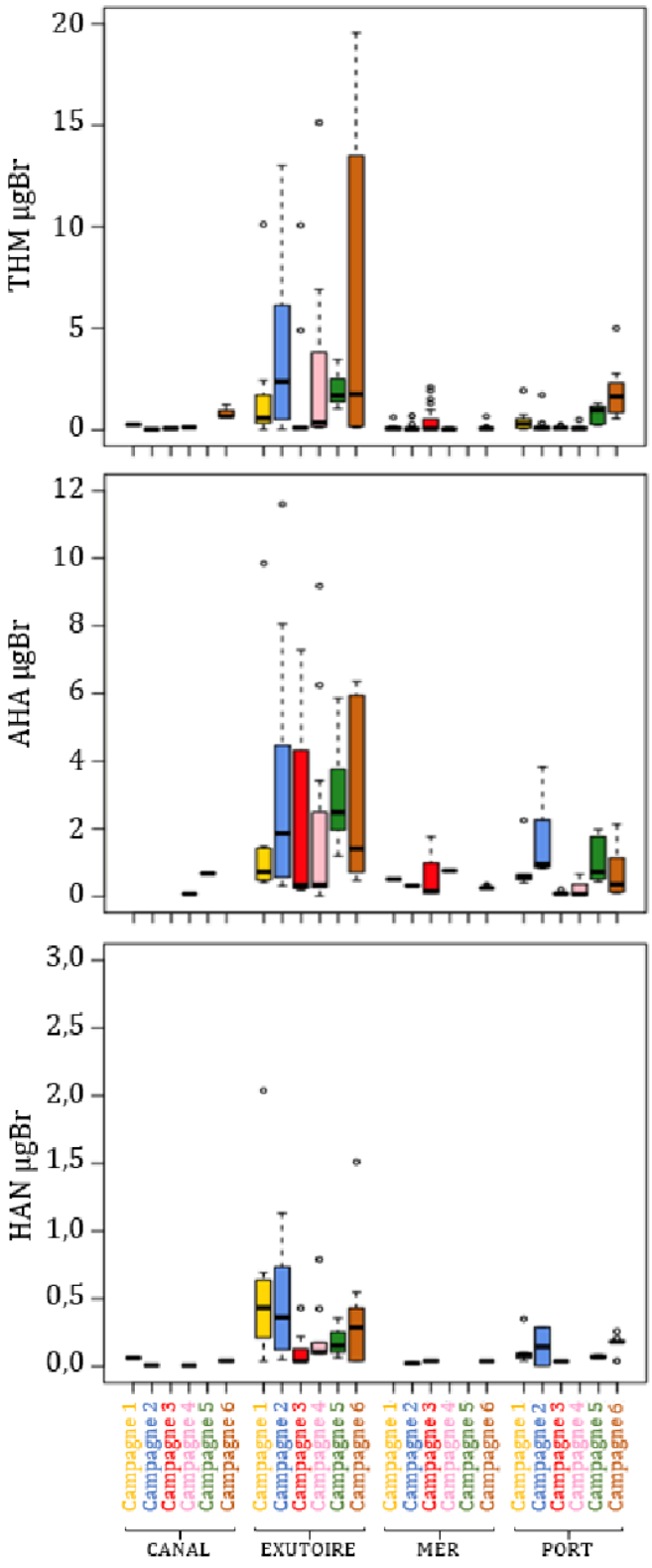


Figure 19 : Niveaux de pollution pour les différentes familles de SPC, THM, AHA et HAN en fonction des campagnes et des sites de prélèvement.

La température a un rôle important dans la dispersion des SPC et donc sur leur dilution. Lorsque que les températures diminuent, la volatilisation diminue. De plus si l'air est plus froid que l'eau de mer cela entraîne un refroidissement des eaux de surface qui vont être plus denses et plonger. Parallèlement, lorsque les températures sont trop froides (inférieures à 10 °C), la chloration de l'eau de mer n'est plus nécessaire. C'est d'ailleurs le cas de la campagne 3, où la température dans les darses était inférieure à 10 °C, la chloration n'a pas eu lieu pour tous les exutoires, les teneurs en SPC sont très faibles (Figure 16). Lors de la campagne 4, les valeurs de température sont constantes dans le golfe, aucun point n'est considéré comme cas particulier.

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

La salinité va également jouer un rôle important dans la dispersion des polluants étant donné que les variations de salinité génèrent des masses d'eaux non homogènes, concentrant ainsi les composés à la surface ou en profondeur en fonction de l'halocline. De plus une diminution de la salinité peut être induite par une entrée d'eau douce du Rhône conséquente et donc riche en matière organique ou en polluants susceptibles d'influencer la formation de SPC. Lors de la campagne 5, la salinité est significativement plus faible, en effet cette campagne a eu lieu juste après un phénomène météorologique important, caractérisé par une pluviométrie de 37 mm la semaine précédant les prélèvements, sans brise enregistrée, les masses d'eau n'ont pas eu le temps de se mélanger. Ce mois de novembre 2018 est d'ailleurs caractérisé par une augmentation de + 177 % de précipitations par rapport aux moyennes enregistrées entre 1981 et 2010. Ce phénomène est d'ailleurs confirmé par le modèle météorologique de Prévis mer, illustré en Figure 20, sur lequel la couleur violette témoigne d'une salinité de l'ordre de 11 mg/L visible dans les darses du golfe.

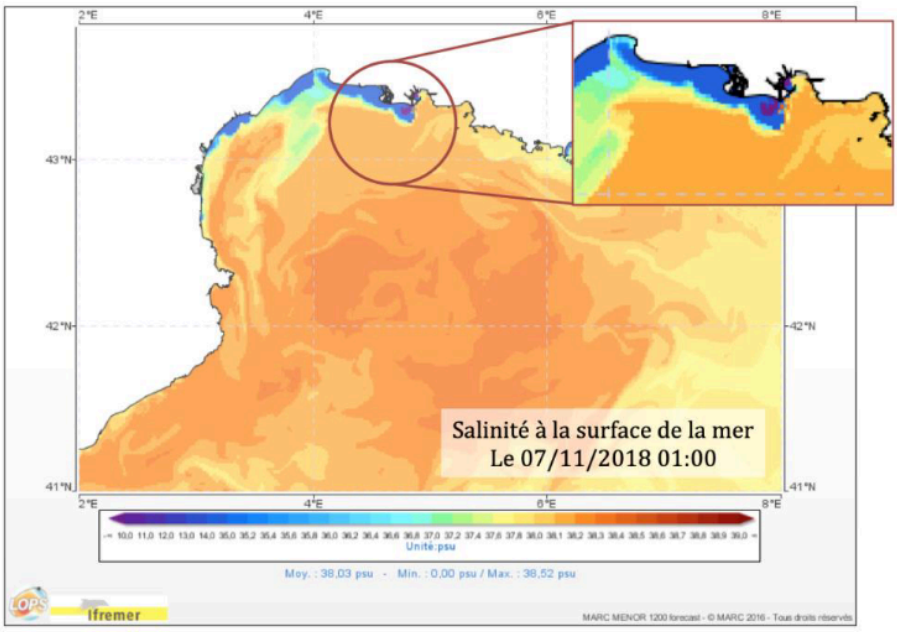


Figure 20 : Modèle de salinité en Méditerranée le 7 novembre 2018, jour de la campagne n°5
(https://marc.ifremer.fr/resultats/temperature_et_salinite)

Pour évaluer l'impact de ces facteurs, une première analyse en composante principale (ACP) regroupant l'ensemble des paramètres mesurés pour chaque campagne, nous permet de séparer 3 groupes de variables qui vont influencer la distribution de nos différents points de prélèvement (Figure 21 A). En effet, on retrouve un groupe de variables projeté sur l'axe 1 qui inclut tous les sous-produits de chloration mesurés. Il est à noter que toutes les familles de polluants suivent le même axe donc varient de la même manière en fonction des points de prélèvement. Cet axe explique 33% des variations. Le deuxième groupe de variables plutôt projeté le long de l'axe 2, est divisé en deux sous-groupes qui s'opposent le long de cet axe. Il s'agit des paramètres physico-chimiques et des nutriments. Ce second groupe explique 23% de la variabilité. Il n'y a donc pas de corrélation entre ces deux groupes et l'augmentation des SPC sur cette ACP globale. Sur la Figure 21B, ce sont les différents points de prélèvement qui sont regroupés en fonction de trois variables qualitatives. On voit que lorsqu'on projette l'intégralité des paramètres, les exutoires se différencient, largement projetés sur l'axe 1, donc expliqués par les fortes concentrations en SPC. On voit également que lorsque l'on sépare les points par campagne, les campagnes ne sont pas projetées sur les axes de la même façon. La campagne 5 est davantage projetée sur l'axe 2 : axe caractérisé par le

groupe des paramètres physico-chimiques qui s'opposent à celui des nutriments. Il est important de rappeler que lors de la campagne 5, seulement 12 points ont été prélevés, tous proches des exutoires et aucun en mer. En revanche, lorsque l'on teste la différenciation des points selon la surface ou la profondeur, il n'y a pas différence significative, par la suite ils seront donc confondus.

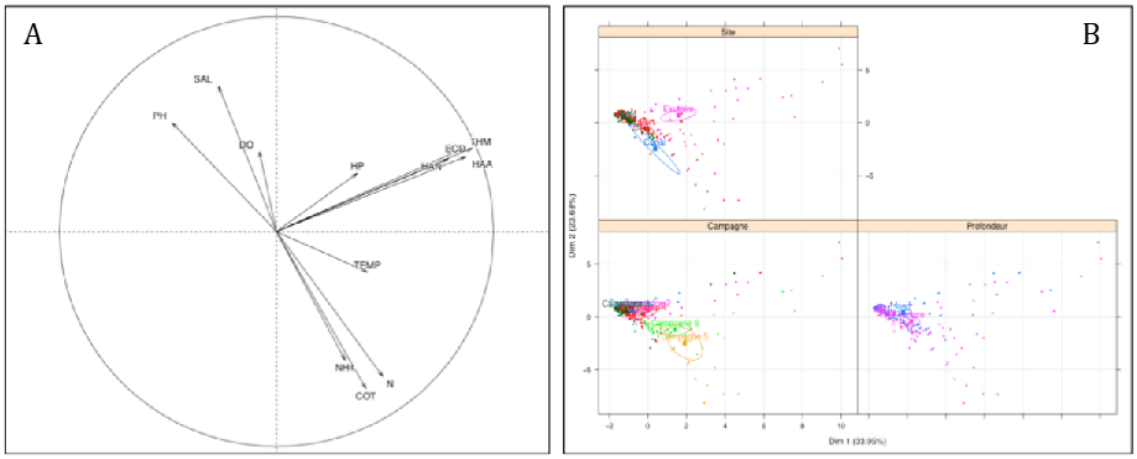


Figure 21 : Analyse en composante principale sur l'ensemble des données des campagnes

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

A partir des variables entrant dans l'ACP, la classification descendante hiérarchique, a permis de distinguer 3 groupes ou cluster (Figure 22). Le cluster 1 est corrélé à l'azote, le carbone organique et la température. Le cluster 2 qui est corrélé au pH, la salinité et l'ammonium. Le cluster 3 est corrélé aux données obtenues en GC-ECD. Dans le cluster 3, on retrouve uniquement des points correspondant aux exutoires. Une analyse avec uniquement les points aux exutoires ne met pas en évidence un effet campagne ou un effet profondeur.

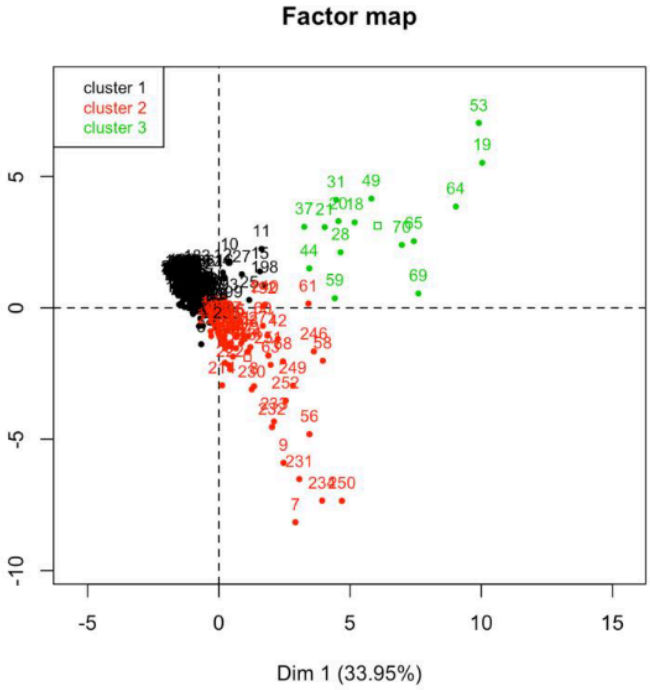


Figure 22 : Classification descendante hiérarchique sur l'ensemble des données des campagnes

Il est à noter que malgré les conditions météorologiques différentes selon les campagnes, les variations aux exutoires ne sont pas campagnes-dépendantes. Si on regarde cette fois la Figure 23, qui représente la distribution de la pollution en SPC, selon les campagnes et selon les sites de prélèvement, on peut remarquer que la pollution est très marquée aux exutoires, se dilue nettement dans les « ports » et en mer la pollution est moindre et est similaire à celle retrouvée dans le Rhône.

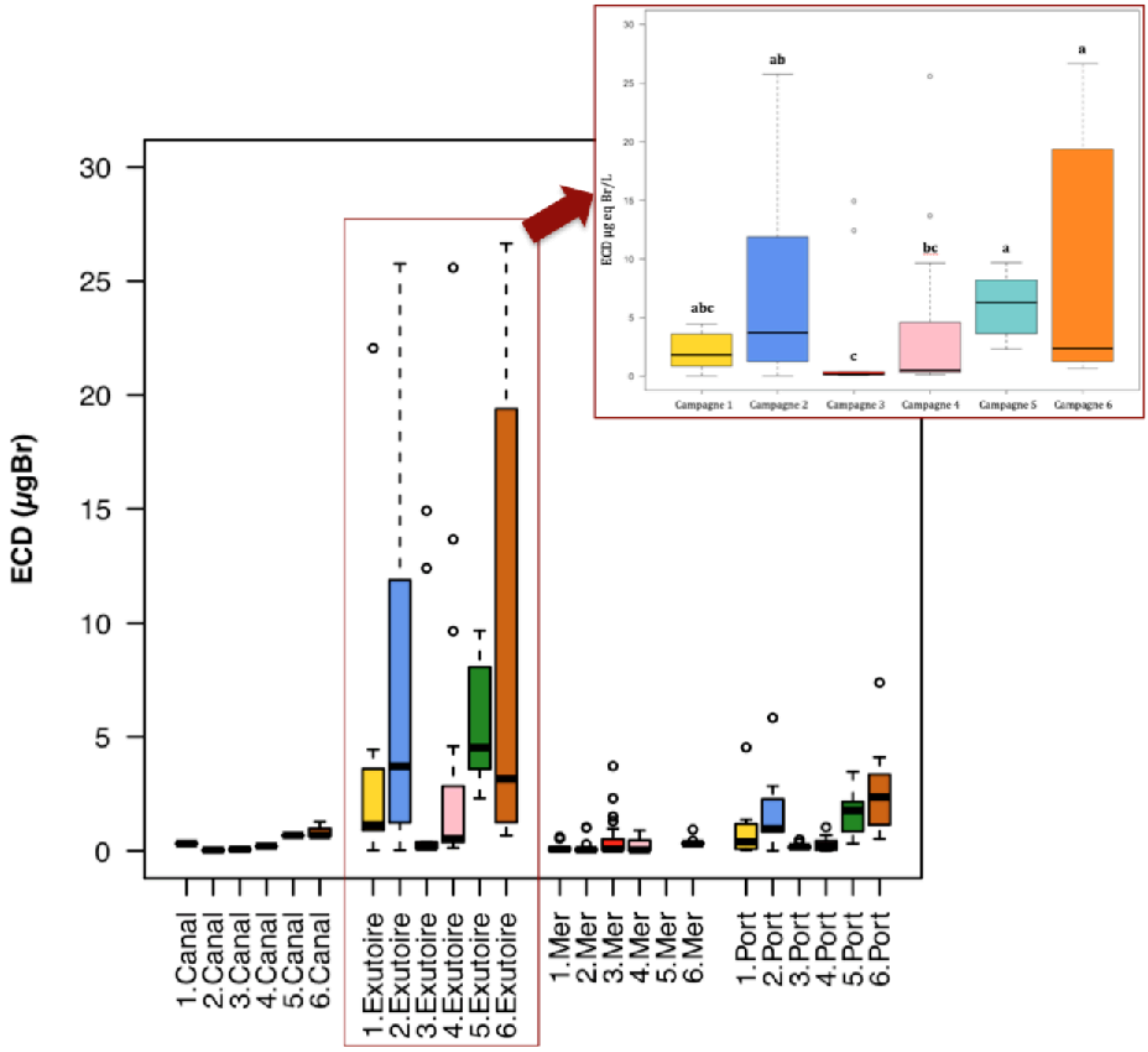


Figure 23 : Concentrations en SPC trouvées selon les sites et les campagnes

De plus, si on effectue un zoom sur les résultats des prélèvements aux exutoires Figure 23 on s'aperçoit que le niveau de pollution selon les campagnes n'est que très légèrement différent, sauf pour la campagne 3 qui est statistiquement plus faible (p = 0,003). Il en ressort donc que malgré des conditions météorologiques variables, la pollution en sous-produits de chloration ne dépasse pas les nanogrammes par litre en sortie du golfe. Les concentrations en SPC dépendent prioritairement de l'activité industrielle, puisque la seule saison qui se détache nettement est l'hiver où l'eau est suffisamment froide pour limiter les développements bactériens, la chloration est moindre. La pollution du golfe est interpolée (krigeage) en Figure 24.

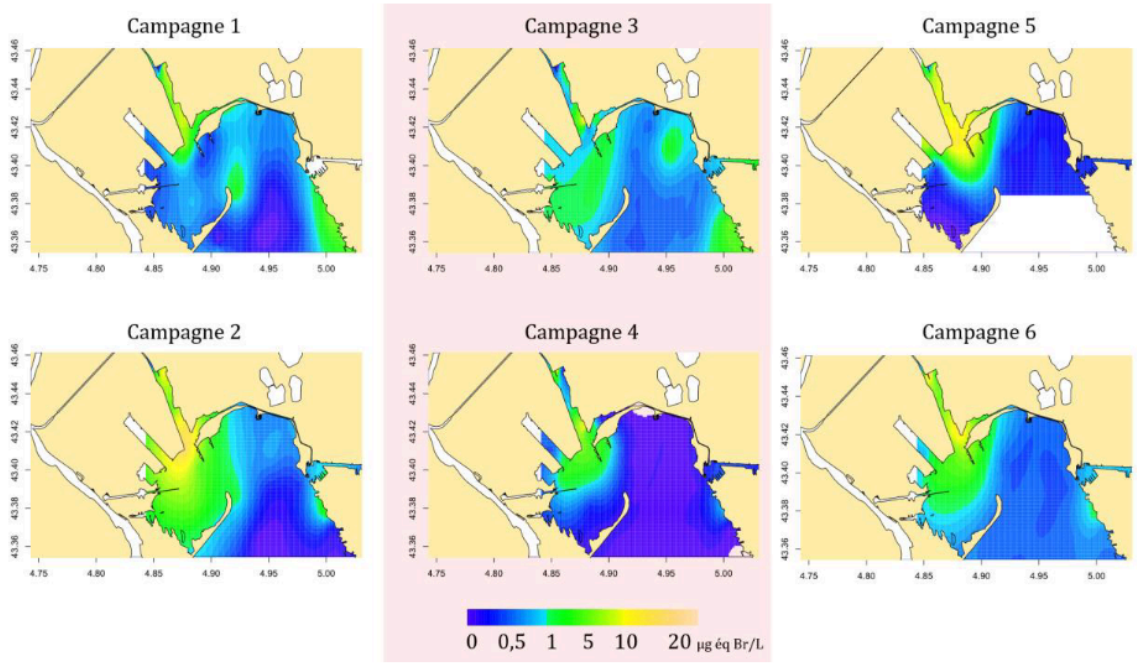


Figure 24: Interpolation spatiale de la distribution de la pollution en SPC à la surface du golfe lors des 6 campagnes

Pour finir sur l'occurrence des SPC dans la colonne d'eau, même si les concentrations en mer sont semblables campagnes après campagnes (Figure 24), lors de la seconde, sous un vent de mistral important qui a induit un courant marqué du nord au sud, la pollution rentre largement dans l'anse de Carteau, qui abrite le parc à moules du golfe. Il semblerait donc que pour les volumes d'eau chlorée équivalents, le facteur important à prendre en compte serait les conditions météorologiques, qui en fonction des courants peut concentrer la pollution dans les zones non désirées du golfe. Cela a également été montré par Ulses *et al.* (2005) qui ont étudié la courantologie du golfe de Fos.

Pour résumer cette partie occurrence dans la colonne d'eau, nous avons montré que la pollution aux sous-produits de chloration ne dépassait pas la dizaine de ng/L en sortie du golfe. Le maximum de diversité en composés a été retrouvé au niveau des exutoires et atteint 15 SPC différents. Pour finir, nous n'avons pas mis en avant d'influence abiotique sur la pollution tant elle dépend des flux d'eaux chlorées rejetés. Cependant lorsque de grandes quantités d'eau de mer chlorée sont rejetées un jour de fort mistral la pollution va être poussée dans le parc à moules du golfe.

3.2. Niveau de pollution dans les sédiments du golfe

Les halophénols sont les composés issus de la chloration de l'eau de mer les plus lipophiles (Kow = 4,13). C'est d'ailleurs cette famille de composés qui est recherchée dans les matrices solides. En effet, sur les 10 stations échantillonnées pour l'analyse des sédiments, deux halophénols ont été quantifiés, pour les stations 22m et 13x. À la station d'échantillonnage 22m, du 2-chloro-4-bromophénol et du 2,4,6-tribromophénol ont été détectés à 1,8 et 2,1 ng/g poids sec, respectivement. Et pour la station d'échantillonnage 13x, les deux HP ont été détectés à 0,3 et 1,5 ng/g de poids sec, respectivement. Les données sur les concentrations d'halophénols dans les sédiments marins des zones exposées aux effluents chlorés sont très rares. Sim *et al.* (2009) ont étudié la présence et la distribution de phénols halogénés dans les sédiments obtenus dans un environnement marin près d'une centrale nucléaire en Corée du Sud. Selon les résultats de cette dernière étude, les bromophénols ont été trouvés à des concentrations plus élevées que les chlorophénols. La concentration moyenne décrite de 2,4,6 tribromophénol a atteint 3,78 ng/g de poids sec au printemps.

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

3.3. Niveau de pollution des oursins du golfe

Les concentrations en 2,4,6-tribromophénol mesurées dans les gonades d'oursins sont comprises entre 36,98 et 205,31 µg/kg de poids sec. Ces valeurs sont nettement supérieures à celles retrouvées dans la littérature, et notamment dans une étude précédente sur le golfe de Fos où les concentrations dans des muscles de congres étaient comprises entre 2,8 et 10,4 µg/kg (Boudjellaba *et al.* 2016). Les gonades d'oursin sont riches en matière grasse, +15% par rapport aux muscles de congres, ce qui favorise l'accumulation des polluants organiques. Aucune étude à ce jour n'a décrit un niveau de pollution en SPC dans les gonades d'oursin. Chung *et al.* (2003), a étudié le niveau du tribromophénol dans des fruits de mer tels que des moules, des crevettes, des crabes et Whitfield *et al.* (1998), dans les muscles de mérous. Ces données sont résumées par Koch et Sures (2018) et à l'exception des crabes où des concentrations en TBP peuvent atteindre 2 360 µg/kg de poids sec, toutes les autres espèces sont nettement moins contaminées que les oursins. Toutefois, de grandes variations existent au sein d'une même espèce et entre individu prélevés dans un même site géographique. Il est donc peu pertinent de comparer les niveaux retrouvés avec des études antérieures datant des années 2000.

Concernant les niveaux de contamination mesurés dans les oursins en fonction de la zone de pêche (Figure 25), il n'existe pas de corrélation liée à la zone géographique. En effet, les sites avec les niveaux de pollution les plus élevés sont Gloria suivi de Port de Bouc et Ponteau. Ce sont des sites latéralement opposés et à l'exception de Ponteau, ce ne sont pas des sites où des rejets chlorés sont observés.

À Ponteau, qui correspond au point de prélèvement 13x, des concentrations très faibles en SPC ont été mesurées lors des 6 campagnes, en revanche du tribromophénol a déjà été trouvé dans les sédiments.

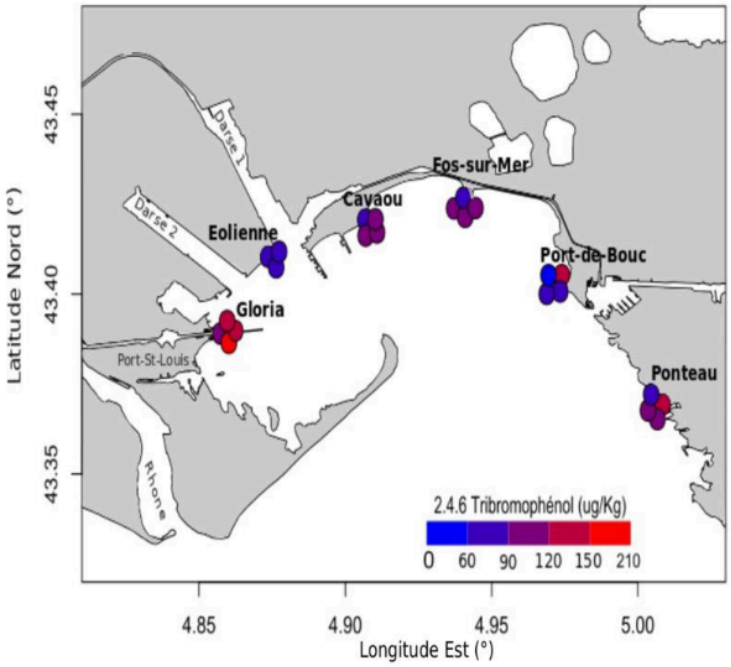


Figure 25 : Concentrations (µg/kg de poids sec) dans les oursins selon leur localisation dans le Golfe de Fos

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

4. Conclusion

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

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

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

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

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

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

CHAPITRE 3 : Impact des sous-produits de chloration

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

1. Introduction

Une fois l'occurrence dans le golfe connue, cette partie se consacre à la caractérisation de l'impact des principaux sous-produits de chloration. Le bromoforme (trihalométhane) et l'acide tribromoacétique (acide haloacétique) sont parmi les molécules les plus répandues dans le golfe ; le 2,4,6 tribromophénol (halophénol) est quant à lui la seule molécule retrouvée dans les sédiments et les organismes marins. La plupart des SPC testés jusqu'à présent se sont révélés toxiques et génotoxiques pour divers organismes modèles, comme des bactéries, des cellules de mammifères ou les embryons de poissons zèbres (Antonelli *et al.* 2009; Wagner et Plewa 2017; Hanigan *et al.* 2017; Domínguez Henao *et al.* 2018).

De plus, les SPC bromés sont plus toxiques que leurs analogues chlorés (Richardson *et al.* 2007, 2010; Yang et Zhang 2013; Hanigan *et al.* 2017). Il est à noter que les effets néfastes visibles ont toujours été observés après une exposition (jusqu'à 3 jours) à des concentrations élevées de SPC (mg/L), ce qui suggère que les risques toxiques et génotoxiques sont limités dans l'environnement (Teixidó *et al.* 2015).

Néanmoins, des recherches épidémiologiques récentes ont suggéré que l'exposition à vie aux SPC, principalement par ingestion, augmenterait considérablement le risque de cancer de la vessie chez l'Homme (Villanueva *et al.* 2004, 2006).

Les études qui évaluent cette toxicité chez les animaux aquatiques demeurent rares et, à notre connaissance, seulement deux études ont été réalisées ces dernières années à l'aide du modèle embryonnaire de poisson zèbre (Teixidó *et al.* 2015; Hanigan *et al.* 2017). Ces deux études ont porté sur un total de 11 SPC bromés, dont le bromoforme (BMF) et l'acide tribromoacétique (TBAA). La plupart des SPC bromés se sont révélés toxiques pour le développement larvaire, mais seulement à des concentrations élevées (c.-à-d. > mg/L). De plus, l'exposition à court terme aux eaux usées chlorées n'a pas eu d'effet toxique significatif. Enfin, un effet génotoxique n'a été détecté qu'avec le chlorodibromométhane et le borate de sodium à leurs niveaux CE_{50}, 33 mg/L et 18 µg/L, respectivement, basés sur des anomalies de croissance.

Dans cette partie, nous voulions mieux comprendre l'impact toxique des SPC sur les organismes marins côtiers en utilisant la diversité planctonique du golfe et les premiers stades larvaires de l'oursin *Paracentrotus lividus*. L'oursin est un organisme modèle pertinent pour évaluer l'effet de molécules potentiellement nocives en laboratoire. La

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

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

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

2. Mise en pratique

2.1. Prélèvement et quantification des communautés planctoniques

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

La cytométrie est une technique incontournable datant des années 80 permettant de différencier et de dénombrer les organismes en suspension dans un liquide en fonction de la taille et la complexité de leur cellule ainsi que de leur fluorescence (Yentsch et al. 1983; Sieracki et al. 2019). La diffusion aux grands angles (ou Side Scatter, SSC) et aux petits angles (ou Forward Scatter, FSC) est respectivement proportionnelle à la complexité des particules et à leur taille. Le laser standard pour la mesure de ces paramètres est de longueur d'onde bleue (488 nm). Des capteurs de fluorescence verte, orange et rouge sont ensuite utilisés pour différencier et regrouper les cellules sur la base de leur fluorescence naturelle ou induite par ajout d'un fluorochrome.

Dans le picoplancton on retrouve principalement des procaryotes hétérotrophes, des picoeucaryotes photosynthétiques et des cyanobactéries, ils représentent à eux seuls 80 à 90% de la biomasse marine. *Synechococcus* est le genre de cyanobactérie dominant en zone côtière et a été identifié grâce à sa fluorescence forte en orange et faible en rouge ainsi que par sa petite taille et sa faible complexité. Les picoeucaryotes ont été caractérisés grâce à leur forte fluorescence en rouge et faible en orange, ainsi qu'à leur plus grande taille et complexité. Pour l'analyse des procaryotes hétérotrophes, qui sont des organismes non fluorescents naturellement, les échantillons ont été dilués au demi ou au tiers (selon la concentration en microorganismes dans les échantillons) avec une solution autoclavée et filtrée sur 0,2 µm de NaCl 38 g/L. Ils ont ensuite été incubés 10 min à l'obscurité avec du Sybergreen 1X (concentration finale), puis un volume de 50 µL a été analysé. Ils ont été identifiés grâce à leur fluorescence verte, leur petite taille et leur faible complexité.

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

2.2. Production de larves d'oursin

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

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

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

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

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

2.3. Produits chimiques

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

2.4. Évaluations toxicologiques

Dans des microplaques de 24 puits, des suspensions d'environ 500 œufs fécondés dans 2 mL d'eau de mer filtrée ont été exposées pendant 48 heures à 7 concentrations de chaque produit chimique. A la fin du temps d'exposition, les larves ont été fixées par addition d'éthanol à 15% en concentration finale et maintenues à 4 °C jusqu'à ce que des observations microscopiques soient effectuées.

Les larves *Pluteus* ont été dénombrées selon deux critères : « normales » et « anormales » (c.-à-d. croissance retardée, anomalies du développement, mort). Nous avons ensuite déterminé les courbes dose-réponse à l'aide du module « drc » du logiciel R et déduit la concentration induisant 50 % d'effet, CE_{50}, considérée ici comme la concentration de la substance chimique à laquelle nous ne pouvions observer que 50 %

de larves normales et viables. Les concentrations efficaces les plus faibles et nulles observées (respectivement DMSENO = dose maximale sans effet nocif observé et DMENO = dose minimale avec effet nocif observé) ont été déduites des concentrations chimiques utilisées dans les expériences. Nous avons ensuite évalué la toxicité de nos trois molécules ensemble. Les mélanges contenaient chaque produit chimique soit à leur DMSENO respective, soit à leur DMENO respective.

2.5. Détermination du stress oxydant

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

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

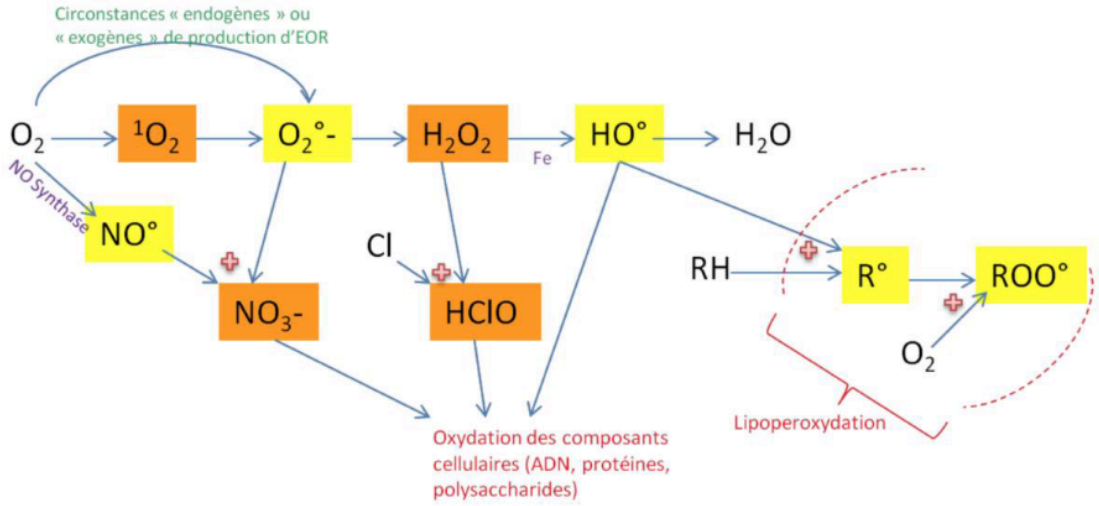


Figure 26 : Cascade de production des principales espèces réactives de l'oxygène, selon Favier (1997)

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

- L'oxyde nitrique (NO)

L'oxyde nitrique est un gaz qui, par conséquent, diffuse à travers les membranes biologiques. Il est synthétisé par l'oxyde nitrique synthase (NOS), à partir de l'oxygène et d'un acide aminé, la L-Arginine. Mandelker (2008), assure qu'il n'est néfaste pour l'organisme qu'à de fortes concentrations car il génère alors trop de peroxynitrite NO_3^- (Figure 26). L'oxyde nitrique notamment intervient comme médiateur dans les événements apoptotiques. À de plus faibles concentrations, l'oxyde nitrique contribue à l'activation de l'expression du gène hsp70, protégeant ainsi les embryons contre les effets toxiques de cet aldéhyde (Romano *et al.* 2011).

Les niveaux endogènes de NO ont été mesurés en surveillant la formation de nitrites par réaction de Griess (Migliaccio *et al.* 2014). Le système de réactifs Griess est basé sur la réaction chimique illustrée à la Figure 27, qui utilise de la sulfanilamide et du chlorhydrate de N-1-naphtyléthylènediamine (NED) sous conditions acides (acide phosphorique).

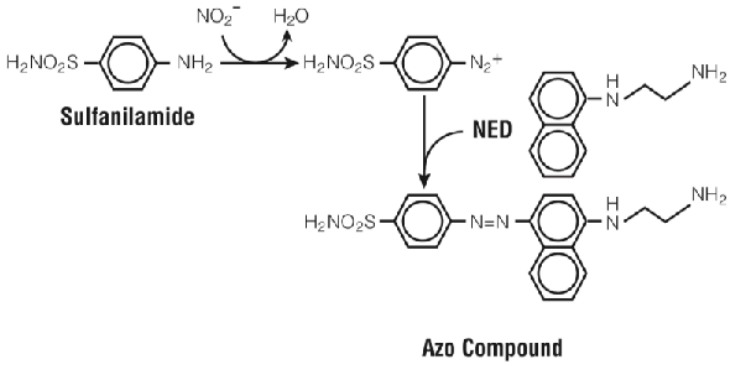


Figure 27 : Réactions chimiques impliquées dans la mesure du NO_2^- à l'aide du système de réactifs de Griess

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

- Péroxydation lipidique

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

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

Environ 15 000 embryons d'oursin en développement ont été collectés au stade *Pluteus* après 48 heures d'exposition aux différentes DMENOs, par centrifugation à 1800g pendant 10 minutes à 4°C. Les culots ont été homogénéisés dans du Tris-HCl contenant 0,1 mM d'EDTA et 0,2 % de triton X-100 (1:2 W/ V) et centrifugés (à 14 000g pendant

30 minutes, 4 °C). Le surnageant (200 µl) a été ajouté à 1 mL du tampon de réaction contenant 15% d'acide trichloroacétique (TCA), 0,375% de TBA et 0,1% de butylhydroxytoluène (BHT). Le tampon a été préparé en ajoutant du TBA (préalablement dissous dans 1-2 ml de HCl 12 M) à la solution de TCA en agitant sur une plaque chauffante. Après incubation à 95 °C pendant 15 minutes, le mélange réactionnel a été centrifugé et son absorbance a été mesurée. Une courbe standard pour le MDA a été préparée à l'aide de 1,3-tétraéthoxypropane tel que rapporté par (Esterbauer *et al.* 1991). Deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA) se combinent, en milieu trichloroacétique et à chaud (100°C) au MDA, pour former un complexe dissous coloré rose. L'intensité du complexe coloré est mesurée au spectrophotomètre à 532 nm (Ohkawa *et al.* 1979).

- Les antioxydants

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

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

2.6. Test de génotoxicité

La génotoxicité du mélange de molécules a été évaluée avec le test des comètes, selon la méthode de Tice *et al.* (2000b). Environ 5 000 larves âgées de 48 heures ont été exposées comme décrit ci-dessus (page 65), pendant 1 heure. Après exposition, les larves ont été collectées par centrifugation à 1 500 g pendant 10 minutes, à 4°C. Le culot a été remis en suspension dans 1 mL d'eau de mer filtrée, puis mélangé délicatement avec 1 mL de glycine 1M et incubé sur la glace pendant 5 minutes, pour permettre la dissociation complète des cellules. Environ 50 000 cellules ont ensuite été collectées et placées dans 1mL de PBS 1X et centrifugées à 3 000g pendant 5 minutes, à 4 °C. Les cellules ont ensuite été prélevées et délicatement mélangées à 50 µL d'agarose liquide à bas point de fusion (37 °C), puis étalées sur une lame de microscope (Tice *et al.* 2000).

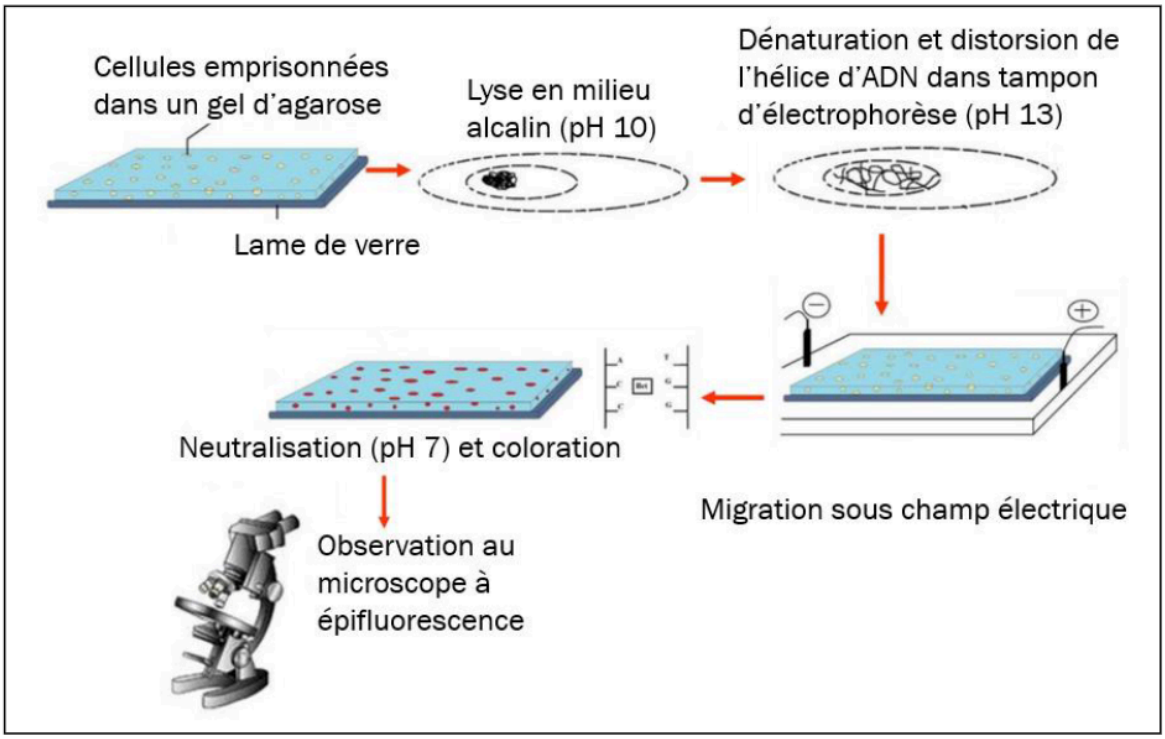


Figure 28: Principe du traitement des lames pour le test des comètes

Une fois préparées, les lames ont été immergées dans un tampon de lyse (2,5M NaCl, 100 mM $Na_2EDTA,2H_2O$, 10 mM Tris pH10, 10g N-Lauroylsarcosine, 10 % DMSO et 1 % Triton X100) pendant 90 minutes à 4 °C. Les lames ont ensuite été placées dans une cuve d'électrophorèse contenant une solution alcaline (200 mM Na_2EDTA $2H_2O$, 10N NaOH) pendant 20 minutes à température ambiante, pour permettre la dénaturation de l'ADN, puis l'électrophorèse a été réalisée pendant 20 minutes à 25V et 350 mA.

Par la suite, les lames ont été plongées dans un tampon de neutralisation (0,4M Tris-HCl pH 7,5) pendant 20 minutes (Figure 28). Enfin, les lames ont été fixées avec du méthanol à 100 % et séchées à température ambiante pendant la nuit. L'ADN a été coloré avec une solution de SyberGreen (Sigma-Aldrich) déposée sur chaque lame et laissé au repos pendant 20 minutes dans le noir. Les lames ont ensuite été lues à l'aide d'un microscope à épifluorescence équipé d'une caméra numérique et d'un logiciel d'acquisition d'images. Une centaine de cellules entières et des comètes observées dans plusieurs champs microscopiques choisis au hasard ont été capturées, indépendamment de la longueur et de la forme de la comète (Gyori *et al.* 2014). Les images ont ensuite été analysées à l'aide de l'application Open Comet v1.3.1 (cometbio.org) implémenté dans le programme ImageJ (SciJava) (Gyori *et al.* 2014).

Les dommages à l'ADN ont été évalués par la détermination du moment de la queue (Tail moment) décrit par Olive *et al.* 1993 (OTM), qui tient compte à la fois de la longueur et de la distribution de l'ADN dans la queue de la comète (Olive *et al.* 1991)(Figure 29) ainsi que par le % d'ADN dans la queue.

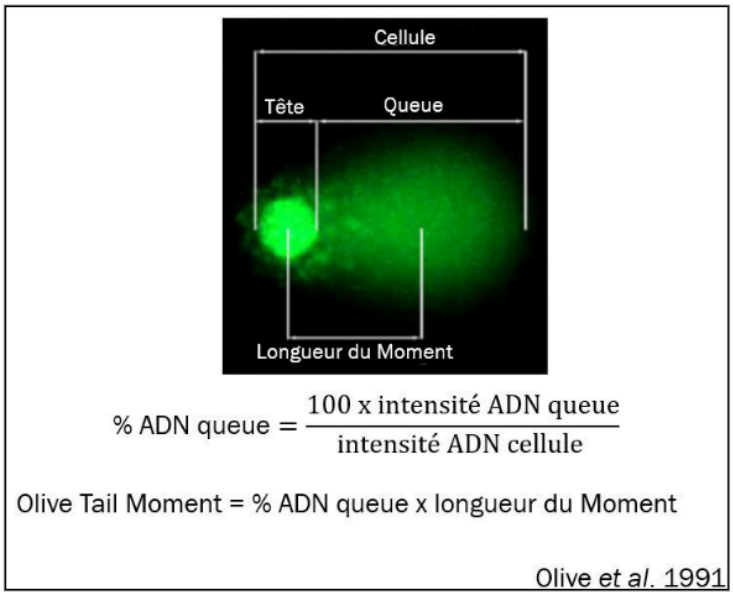


Figure 29: Principe d'évaluation de la comète

L'expérience témoin positif consistait à exposer des larves de 48h à de l'eau oxygénée (700µM). Cette concentration a été choisie après une expérience préliminaire au cours de laquelle nous avons testé la génotoxicité de H_2O_2 pour une gamme de concentrations (R = 0,9983), comme décrit précédemment (Nahon *et al.* 2008).

2.7. Analyses statistiques

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

Des courbes dose-réponse ont été produites à l'aide de modèles de régression. Les concentrations efficaces (c.-à-d. CE_{10}, CE_{50} et CE_{90}) ont été générées à l'aide de « l'estimation des doses efficaces » (ED.drc) du package R. Avant le test Kruskal-Wallis, qui permet la comparaison d'échantillons indépendants, les données écotoxicologiques et les données d'essai des comètes ont été testées pour vérifier leur normalité. Le test de Mann-Whitney a été réalisé pour comparer les données du site non pollué (SNP) au site pollué (le golfe de Fos). Les différences entre chaque condition étaient considérées comme significatives lorsque la valeur $p < 0,05$. Les données sont exprimées en moyenne ± S.E.M.

3. Résultats

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

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

- Les « nutriments » : azote total, nitrate, phosphate, ammonium et carbone organique dissous (COD)
- Les paramètres « physico-chimiques » de la sonde CTD : salinité, température, pH et oxygène dissous
- Les « SPC » : composés organohalogénés totaux mesurés par chromatographie en phase gazeuse.

Pour chaque groupe, une ou plusieurs variables représentatives ont été choisies afin d'éliminer les colinéarités et augmenter la significativité du modèle. Ainsi 5 variables ont été retenues, la salinité (SAL), la température (TEMP), le carbone organique dissous

(COD), le phosphate (PO_4) et les composés organohalogénés (somme des concentrations mesurées en GC-ECD ramenées en µg/L équivalent Br, appelés « Halogènes »).

Les résultats issus de l'analyse de redondance ont été représentés graphiquement (Figure 30). Sur cette figure, l'axe 1 explique 46,9% des variations biologiques et est majoritairement représenté par les paramètres physico-chimiques. Le carbone organique dissous représente la plus forte contribution à l'axe 2 et explique 34,9% des variations biologiques. Aucun axe n'est expliqué significativement par les composés organohalogénés. En moyenne, avec tous les paramètres pris en compte, la RDA explique 50% de la variation biologique.

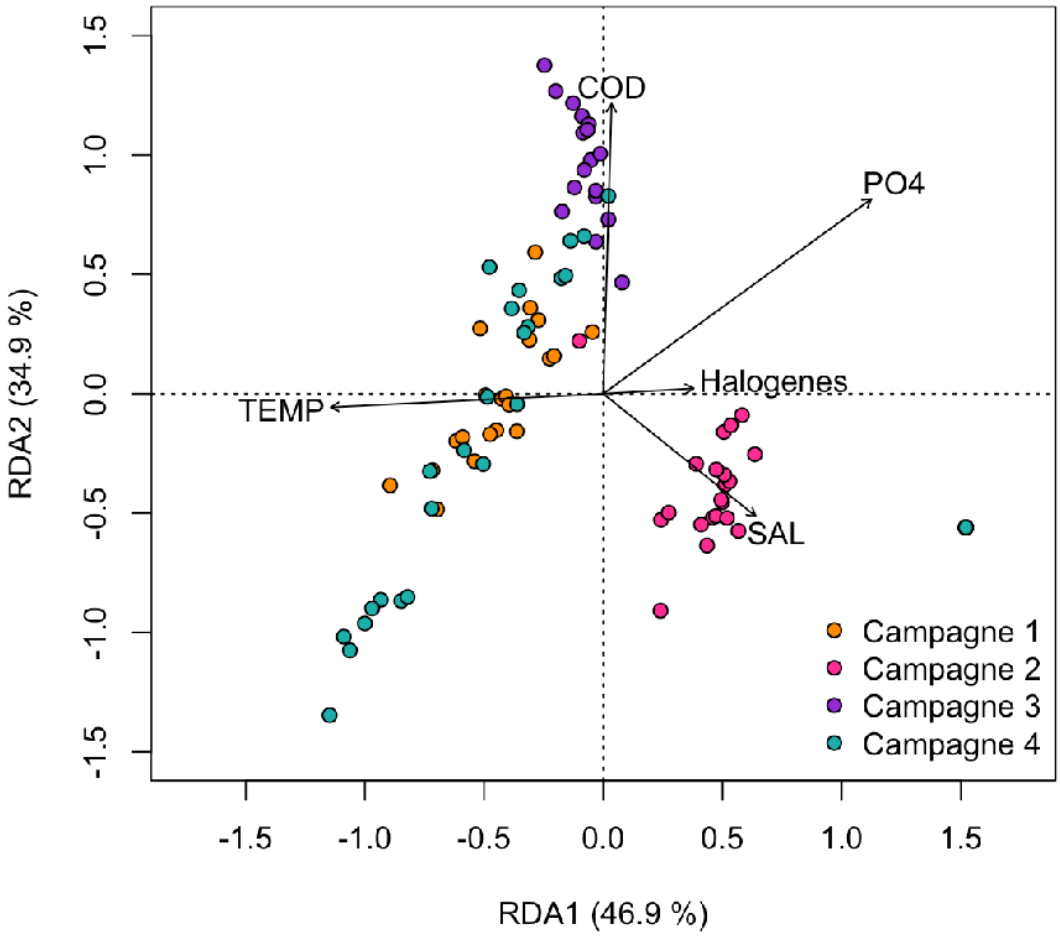


Figure 30: Représentation graphique de l'analyse de redondance des variables abiotiques expliquant la distribution des données biologiques.
Les campagnes sont différenciées par couleur et les variables les plus significatives pour le modèle sont représentées (pvalue < 0,05 ***).

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

Le diagramme de Venn représenté sur la Figure 31, permet de voir la contribution de chaque groupe. Les paramètres mesurés par la CTD expliquent principalement les variations inter-campagnes.

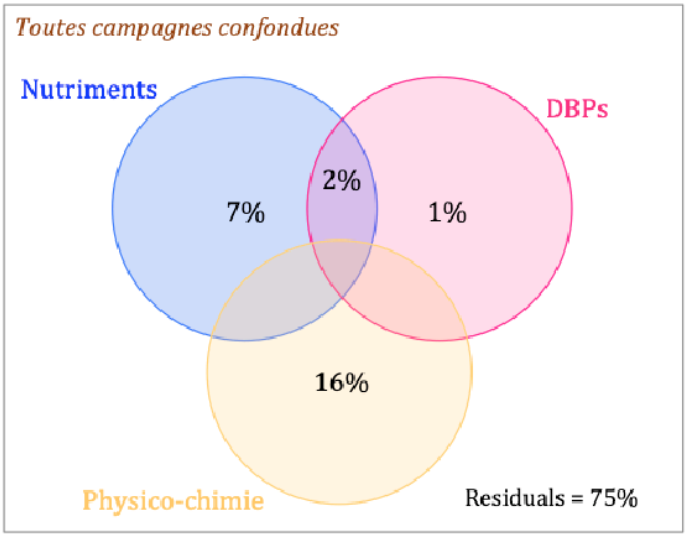


Figure 31 : Contribution de chaque groupe à la variabilité biologique, toutes campagnes confondues.

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

La Figure 32 détaille les analyses de redondances (RDA) obtenues pour chaque campagne individuellement. Brièvement, lors des campagnes 1, 3 et 4 il n'apparait pas de réponse différente selon les sites, en effet tous les points sont mélangés. Il n'y a que lors de la deuxième campagne qu'on voit une sensible distinction. Les points en rouge, représentant les points proches des exutoires sont davantage corrélés aux SPC mais aussi aux variations physico-chimiques. Si on se rapporte au diagramme de Venn de cette campagne, 35% des variations sont expliqués par la sonde CTD, et moins de 10%

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

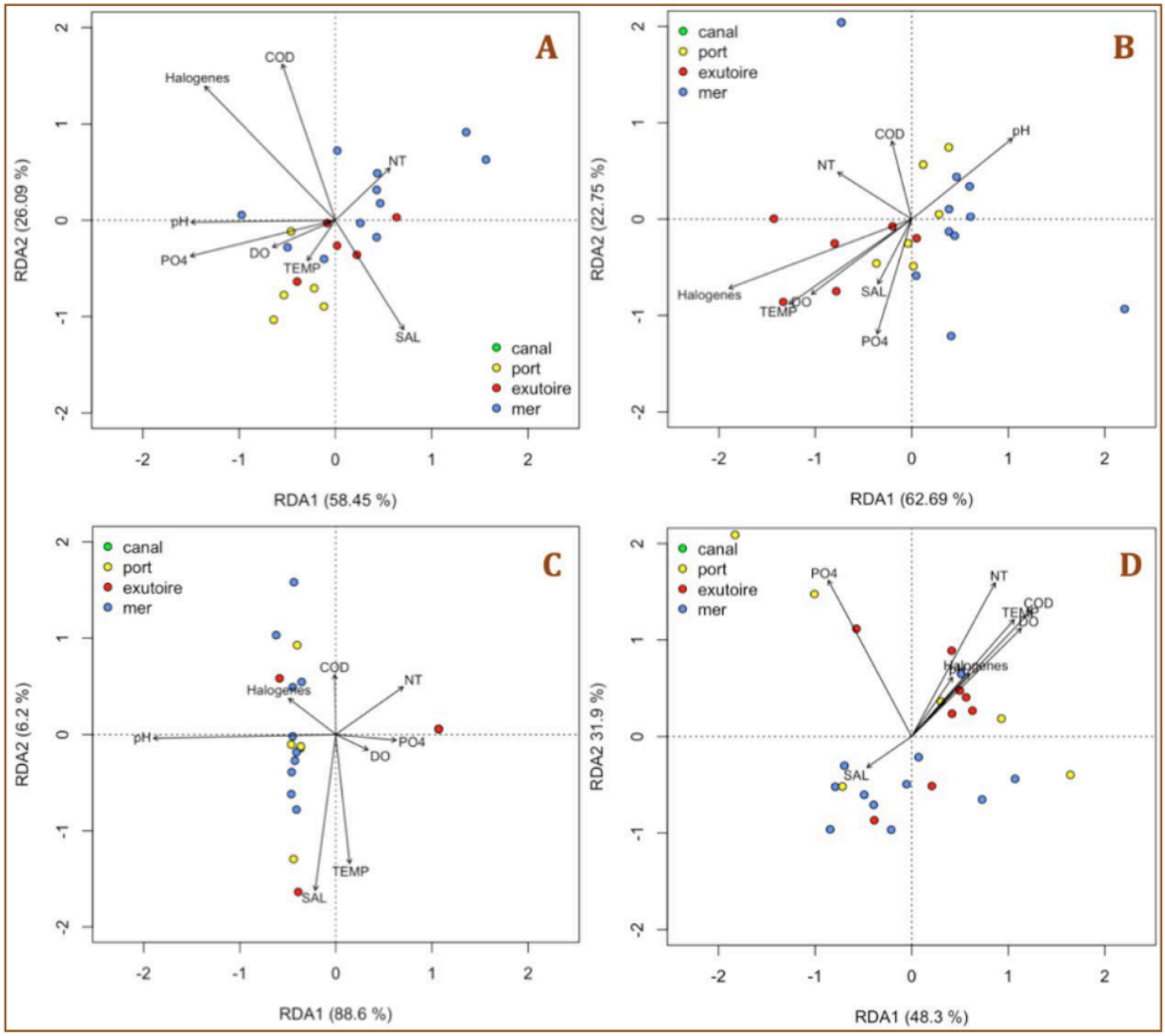


Figure 32 : Représentation des analyses de redondance pour chaque campagne, différenciant les sites de prélèvement.
A : campagne n°1 ; B : campagne n°2 ; C : campagne n°3 ; D : campagne n°4.

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

En effet, les industries peuvent rejeter de l'eau de mer préalablement chlorée avec un delta de température par rapport à l'eau initialement pompée de ±5°C. C'est très certainement ce delta qui influence prioritairement l'équilibre des communautés planctoniques.

Pour toutes les autres campagnes, les SPC ont très peu d'influence sur la variabilité biologique. On voit bien lors de la campagne 3, en hiver que les paramètres principaux sont le pH, la salinité et la température. Lors des campagnes 1 et 4, les nutriments s'ajoutent aux paramètres physico-chimiques.

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

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

L'analyse de redondance et des corrélations permettent de mettre en évidence ces liens forts entre les données biologiques et ces variables. Ainsi, la distribution des communautés planctoniques est largement plus influencée par l'apport d'eau douce du Rhône dans le Golfe de Fos que par la pollution des exutoires. Cependant, ces résultats ne permettent pas non plus d'affirmer l'absence d'effet des sous-produits de chloration

sur la structure des communautés picoplanctoniques présentes dans le Golfe de Fos. En effet, l'influence des autres variables abiotiques et le contexte de multi pollution du golfe pourraient masquer leur l'impact lors des analyses *in vivo*.

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

Dans cette étude, les embryons ont été exposés à une gamme de concentrations de bromoforme (BMF), d'acide tribromoacétique (TBAA) et de tribromophénol (TBP) pendant 48 heures, de la fertilisation au stade *Pluteus* (48 hpf). Le contrôle avec 0,1 % de DMSO n'était pas toxique pour les larves et nous avons trouvé des courbes dose-réponse typiques, à partir desquelles les CE_{50} et CE_{90} ont été extrapolées (Figure 33, Tableau X)(Lebaron *et al.* 2019).

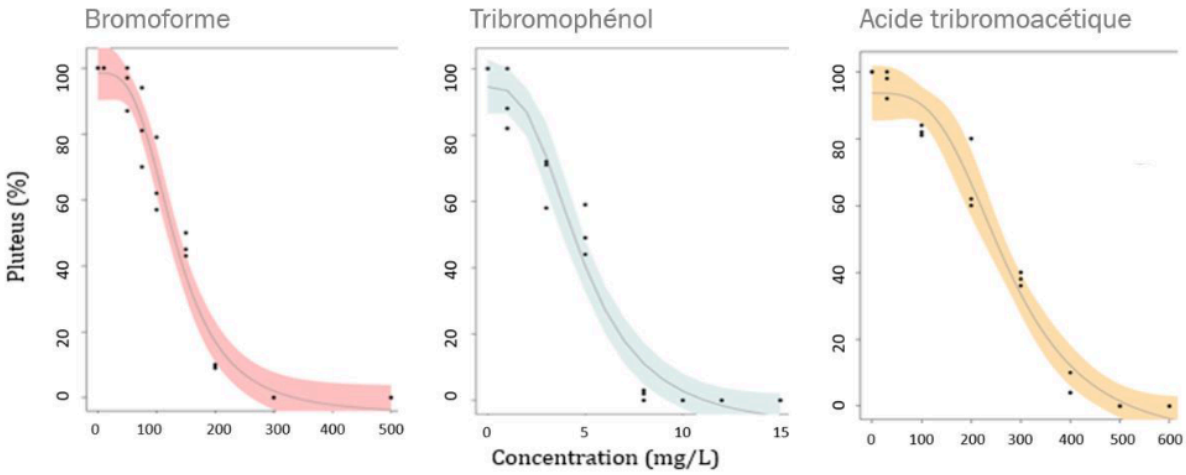


Figure 33 : Courbe dose-réponse pour les trois molécules testées

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

Comme d'autres organismes aquatiques (Yoshioka *et al.* 1985; Delacroix *et al.* 2013; Liu et Zhang 2014; Teixidó *et al.* 2015; Hanigan *et al.* 2017), les embryons de *P. lividus* étaient sensibles aux concentrations relativement élevées des molécules testées. La CE_{50}

était de 5 mg/L pour le TBP, de 133 mg/L pour le BMF et de 274 mg/L pour le TBAA, et la DMENO la plus faible était de 3 mg/L avec le TBP (Tableau X). Mis à part pour le bromoforme, *P. lividus* est plus sensible au TBP et au TBAA que les embryons du polychète marin *Platynereis dumerilii* (Yang et Zhang 2013) ou les algues vertes phytoplanctoniques *Tetraselmis marina* (Liu et Zhang 2014). En effet, selon 3 études précédentes, la CE_{50} du bromoforme pour *P. lividus* est comprise entre la CE_{50} chez le poisson zèbre (50 mg/L, (Teixidó *et al.* 2015)) et la CE_{50} chez les embryons polychètes (184 mg/L, (Yang et Zhang 2013)). En ce qui concerne le TBP et le TBAA, notre modèle semble 4 à 14 fois plus sensible au TBP et 4 à 6 fois plus sensible au TBAA que les autres systèmes biologiques (Yang et Zhang 2013; Liu et Zhang 2014; Teixidó *et al.* 2015).

Tableau X : Les différentes valeurs de toxicité pour les trois SPC étudiés

	Bromoforme	**Tribromophénol**	**Acide tribromoacétique**
DMSENO mg/L	10	1	30
DMENO mg/L	50	3	100
CE_{50} mg/L	133	5	274

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

L'exposition, pendant 48 heures, à un mélange des trois molécules a réduit de façon critique la proportion de larves *Pluteus* normales, à 63 % ± 2 et 18 % ± 1 pour la

DMSENO et la DMENO respectivement, alors qu'aucune n'a survécu à l'exposition à la CE_{50}, ce qui démontre l'effet combiné de l'exposition à ces molécules.

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

Nous avons également testé l'impact de l'exposition contrôlée de polluants sur des embryons issus d'adultes chroniquement exposés au golfe de Fos. Ces embryons du golfe ont été exposés au TBP, au BMF et au TBAA à des concentrations proches des DMENO, CE_{50} et CE_{90} respectives, et au mélange de DMENOs. Ils se sont révélés aussi sensibles au TBP et au TBAA que les embryons du site non pollué, tout en étant très résistants au BMF, qui est la molécule la plus répandue dans le golfe (Figure 34)(Manasfi *et al.* 2018).

De plus, l'exposition au mélange des 3 molécules, chacune à la concentration DMENO, a réduit la proportion de larves *Pluteus* normales de 40 % au lieu de 80 % pour les embryons du site non pollué. Cette résistance accrue des embryons du golfe pourrait s'expliquer par une sélection larvaire naturelle, avec une meilleure adaptation au site pollué, ou par une influence génétique (Ross *et al.* 2016).

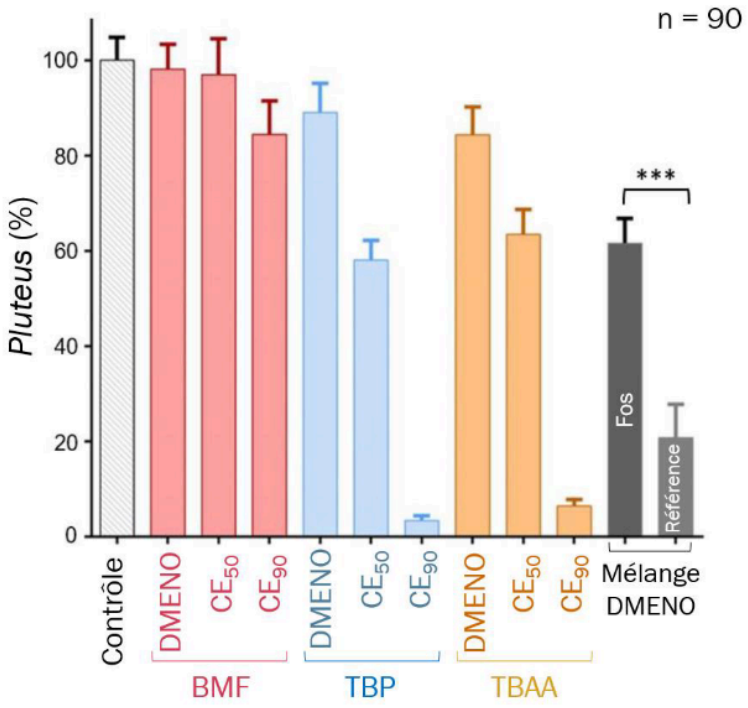


Figure 34 : Effet du bromoforme (rose), tribromophénol (bleu) et de l'acide tribromoacétique (orange) seul et en mélange de DMENO (gris), sur le pourcentage de larves *Pluteus* bien développées issus d'adultes pêchés dans le golfe de Fos (site pollué, PS) et d'un site non pollué (référence), après 48 heures d'exposition

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

3.3. Evaluation du stress oxydant associé aux SPC

Les résultats des dosages antioxydants-oxydants sont résumés sur la Figure 35. Nos lots de larves contiennent entre 5 000 et 15 000 larves en fonction des dosages, afin de normaliser les résultats entre chaque condition, tous les résultats sont exprimés en fonction de la concentration en protéines totale mesurée par lot.

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

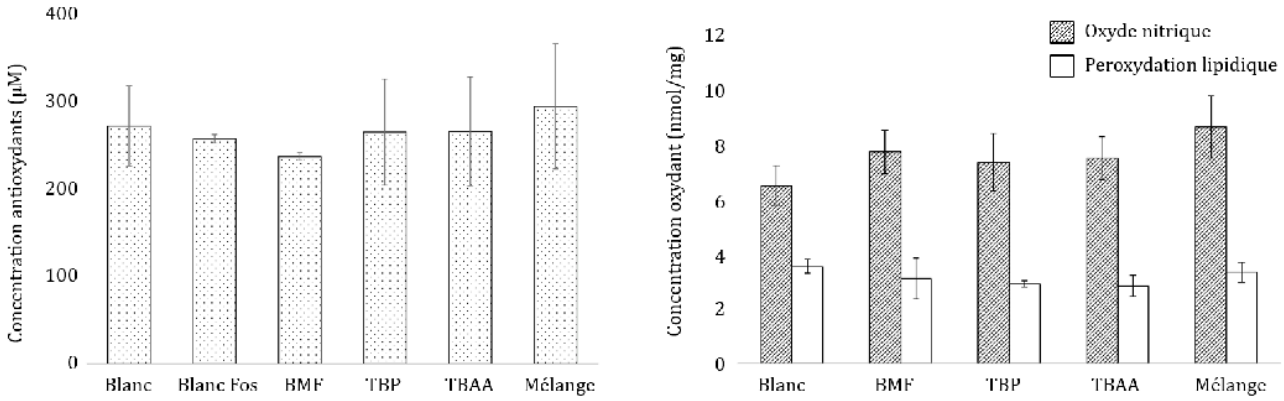


Figure 35 : Evolution des espèces antioxydantes des larves *Pluteus* à la suite d'une exposition de 48 heures aux DMENOs des différents SPC (à gauche) et l'évolution de deux oxydants (à droite).

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

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

3.4. Évaluation de la génotoxicité du mélange

Le test des comètes a été largement utilisé pour tester les effets génotoxiques potentiels des polluants environnementaux, dans plusieurs organismes modèles (Yıldız *et al.* 2009; Liman *et al.* 2011). Les résultats obtenus à partir de l'analyse des comètes sont résumés par la Figure 36.

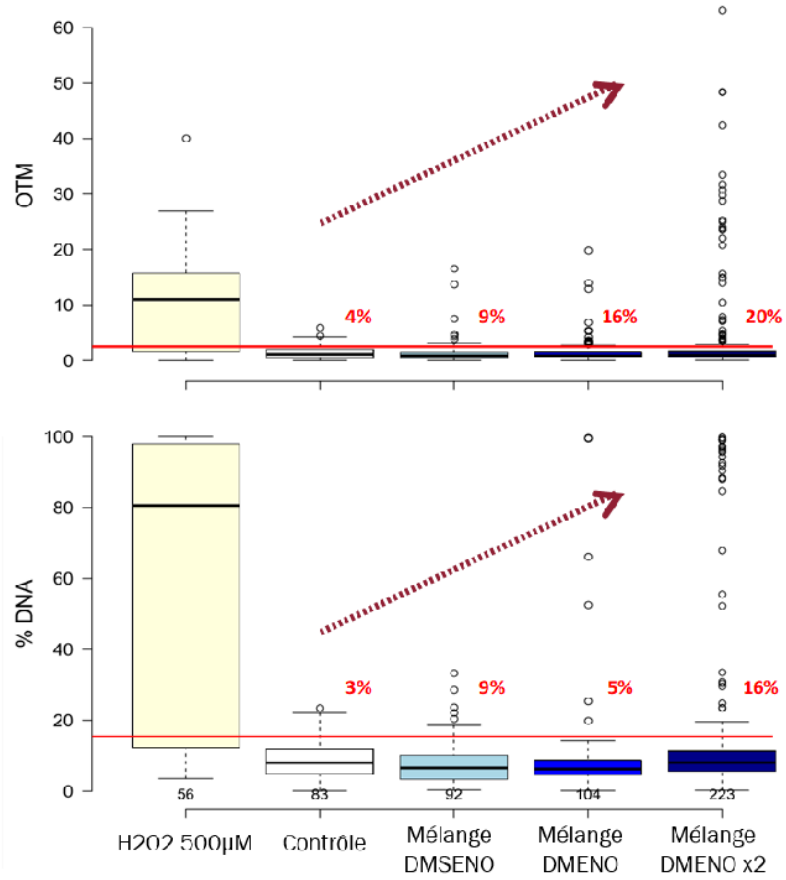


Figure 36 : Distribution de l'OTM et du % d'ADN dans la queue de la comète en fonction du niveau d'exposition des larves de *Pluteus* au mélange chimique.

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

Nous avons testé si une exposition d'une heure à des mélanges de TBP, BMF et TBAA, à leurs DMSENO, DMENO et deux fois leur DMENO respective, pouvait induire une rupture des brins d'ADN chez les larves *Pluteus*. Il est probable qu'étant donné l'exposition à

court terme, nous ayons observé le potentiel de nos mélanges d'induire des ruptures de brins d'ADN, avant toute activation des mécanismes de réparation. Le niveau de génotoxicité a été évalué chez les témoins positifs et négatifs et les groupes exposés en fonction de l'OTM et du pourcentage d'ADN (% ADN) mesuré dans la queue de la comète.

De plus, nous avons évalué la proportion de cellules au sein de chaque groupe ayant dépassé une valeur seuil, correspondant au 95e percentile du groupe témoin pour l'OTM et le % d'ADN. Dans des conditions contrôlées, les 95e percentiles pour l'OTM et le % d'ADN étaient de 2,6 % et 16,5 %, respectivement. Pour les deux paramètres considérés, nous avons trouvé des distributions de données normales dans le groupe témoin négatif (Shapiro-Wilk, $p=0,1$) mais pas dans les groupes testés ni dans le groupe témoin positif (Shapiro-Wilk, $p<0,0001$).

Le test n'a pas révélé d'influence significative du niveau d'exposition basé sur l'OTM mais a démontré que le groupe exposé au mélange à deux fois la DMENO (DMENO_x2), avait significativement plus d'ADN dans la queue de la comète, comparé à tous les autres groupes (Kruskal-Wallis, $p<0.033$). Ce résultat suggère qu'uniquement cette dernière condition a eu un effet génotoxique.

Cependant, l'écart entre les résultats des groupes témoins et ceux des groupes testés quant à la normalité de la distribution des données indique que l'exposition a eu une influence sur une fraction des cellules de chaque groupe, tel que rapporté précédemment (Taban *et al.* 2004). En effet, la proportion de cellules avec un OTM supérieur à 2,6 augmente régulièrement avec la concentration et donne des valeurs OTM plus élevées que celles observées dans le groupe témoin négatif (Figure 36). Cette augmentation de la proportion de cellules a également été observée pour le paramètre % d'ADN, bien qu'elle soit clairement perceptible à l'état DMENO_x2 (Figure 36).

Par conséquent, dans l'ensemble, nos résultats suggèrent une relation dose-effet lorsqu'on tient compte à la fois de l'effet sur l'ADN et de l'occurrence des cellules qui répondent. Des résultats similaires ont déjà été décrits dans des expériences d'exposition à court terme, telles que celles réalisées sur des cellules CHO (ovaires de hamster chinois) exposées au TBA pendant 4 h (Plewa *et al.* 2008).

Il est intéressant de noter qu'à la condition DMENO_x2, nous avons constaté que 7 % des cellules étaient réparties avec plus de 90 % de leur ADN dans la queue de la comète. Parmi celles-ci, quelques cellules affichaient également une valeur OTM élevée, qui se rapporte à la longueur de la comète. Un résultat similaire a également été obtenu avec certaines cellules du groupe témoin positif (Figure 36). Cela pourrait indiquer un début d'apoptose (Ríos *et al.* 2003). D'autres études en ont déjà apporté la preuve (Xiang *et al.* 2016). Une étude récente a également suggéré que les SPC pourraient déclencher l'apoptose à des concentrations élevées (Ríos *et al.* 2003). Ainsi, dans notre étude, le mélange de SPC pourrait avoir le potentiel de déclencher également l'apoptose dans une fraction des cellules larvaires.

4. Conclusion

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1. Introduction

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

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

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

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

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

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

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

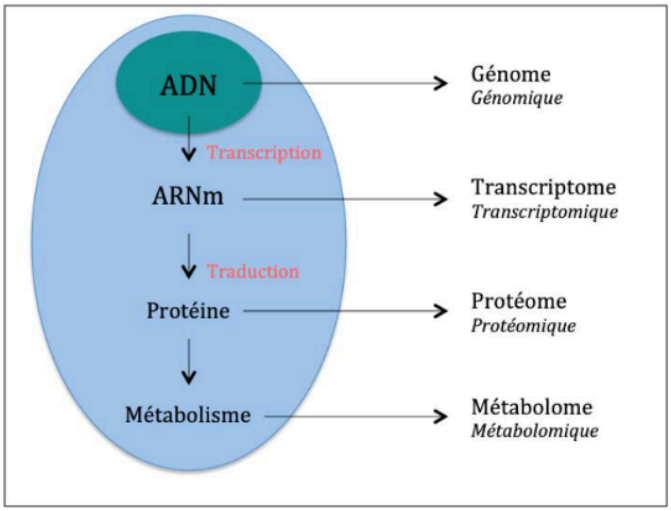


Figure 37 : Les différentes approches « -omics »

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

- L'analyse transcriptomique permet d'évaluer une différence de profil d'expression (Figure 37). La cellule adapte sa physiologie en modulant l'expression de son génome. Des différences de réponses transcriptomiques en fonction de la population d'origine, pour un même stress, seront interprétées comme la signature probable d'une adaptation locale.

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

2. Plan d'expérience

2.1. Protocole opératoire

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

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

Dix couples indépendants ont été utilisés pour la production des larves. Les œufs fécondés de chaque couple ont été mélangés dans un bac de 80L de telle sorte que chaque couple a contribué équitablement au pool de larves (Figure 38). La densité par bac est de 5 larves par mL. Les bassins sont alimentés en eau de mer naturelle, pompée au large de la Corse et filtrée sur filtre à sable. Quarante pour cent de l'eau sont renouvelés chaque jour. A partir de 72 heures après la fécondation, les larves sont nourries *ad libitum* avec du phytoplancton.

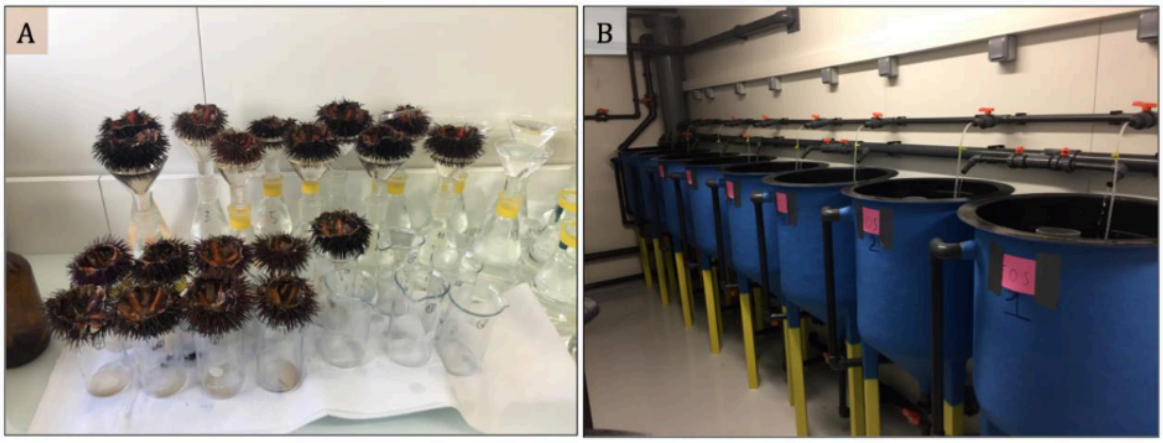


Figure 38 : Photos des conditions d'aquaculture. A : ponte des oursins ; B : bassins de 80L

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

Pour chaque population, un des deux bassins a accueilli des larves non imprégnées, l'autre des larves imprégnées (Figure 39). En effet, nous avons exposé pendant 48h un lot d'œufs fécondés, aux concentrations environnementales de nos 3 SPC (i.e. 20 µg/L pour le bromoforme, 3 µg/L pour le tribromophénol, et 50 µg/L pour l'acide tribromoacétique) afin de tester un effet « mémoire » de l'exposition précoce. Nous appelons ce lot « larves imprégnées ».

La Figure 39 résume les modalités expérimentales de l'exposition des larves. Pour chaque exposition, environ 20 000 larves sont prélevées des bacs de 80L, puis exposées, pendant 48 heures, à différents polluants ou à l'eau de mer propre (Témoin négatif), dans une bouteille ambrée de 1L.

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

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

Figure 39 : Résumé du plan expérimental suivi. 3 expositions différentes ont été entreprises pour chaque site géographique étudié.

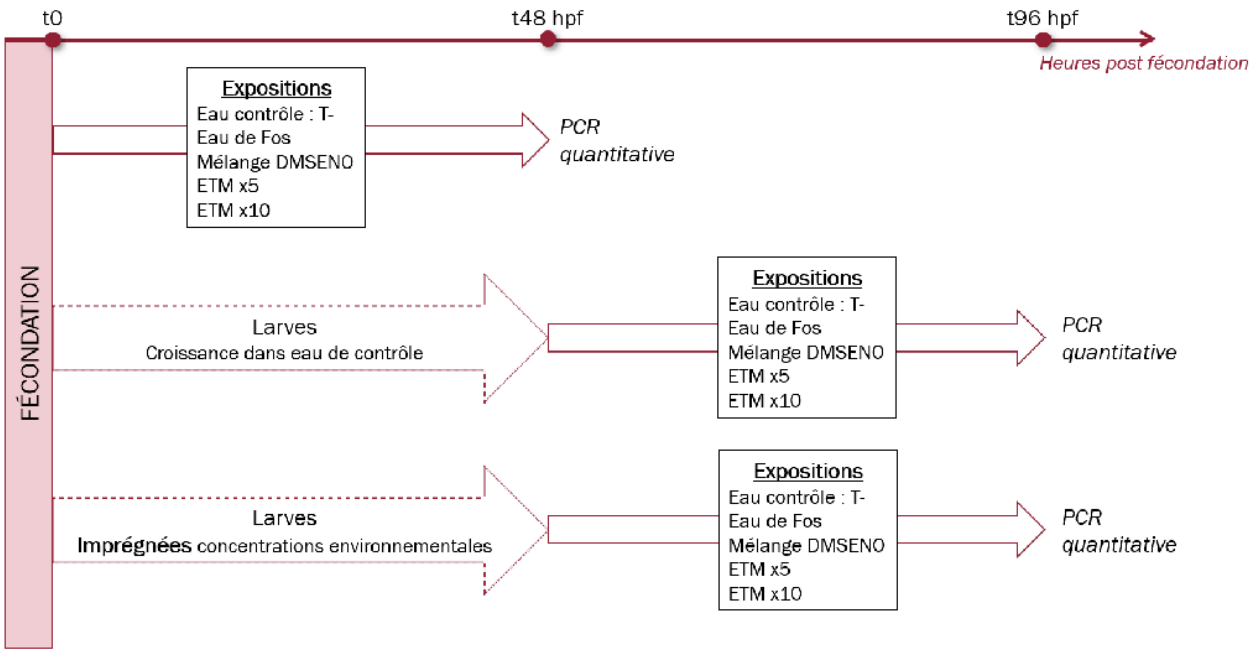


Tableau XI : Concentrations des différents ETM utilisées pour les expositions des témoins positifs

Chaque ETM ont été ajouté à partir d'une solution mère à 1 g/L dans HNO_3

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

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

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

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

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

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

Tableau XII : Programme du LightCycler 480

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

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

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

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

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

2.3. Les gènes étudiés

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

Tableau XIII : Liste des gènes étudiés et leur fonction

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

2.4. Statistiques

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

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

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

3. Résultats et discussion

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

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

3.1. Le cas des témoins négatifs

Les évolutions des abondances des transcrits au cours du temps diffèrent d'une population à l'autre (Tableau XIV). L'abondance des transcrits reste globalement constante entre 48 h et 96 h chez les larves de Fos. Seuls bcl2, bax et la pompe Na/K ATPase diminuent de l'ordre d'un facteur deux à quatre.

Au contraire, 10 des 17 gènes analysés sont moins abondants à 96h qu'à 48h, de l'ordre d'un facteur 3 à 7, chez les larves de Calvi. Cependant, cette diminution d'abondance ne concerne pas les métallothionéines, bcl2, les gènes de stress hsf1 et hsp60 et gst.

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

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

La comparaison des abondances de chacun des transcrits dans les témoins de Fos et de Calvi, montre des profils d'abondances similaires à 48h. A ce stade de développement, seules les métallothionéines 1, 4 et 7 et gst sont plus abondantes chez les larves de Fos, d'un facteur 4 à 21 (Tableau XV).

Dans les conditions témoins, les larves de Fos possèdent donc des messagers qui leur confèreraient probablement une aptitude à répondre de façon plus efficace que les larves de Calvi à un stress chimique, notamment métallique. Cette différence d'abondances pourrait s'expliquer par une surproduction d'ARN messagers d'origine maternelle, suffisamment stables pour ne pas être dégradés depuis la fécondation jusqu'au moment de nos analyses. Cette hypothèse devra être vérifiée.

Cependant, l'influence maternelle sur le transcriptome larvaire s'estompe significativement à la fin du stade *blastula*. Juste avant le stade *Pluteus*, soit 48 heures post fécondation, les transcrits détectés sont principalement issus de la transcription du génome du zygote et à 96 h post fécondation, ils dérivent intégralement du génome zygotique (Wong *et al.* 2019). Nos mesures, étant réalisées à 48 h et 96 h, sont ainsi très probablement le reflet de l'expression du génome des larves. Il serait tout à fait envisageable que des facteurs de transcription spécifique des éléments régulateurs des

métallothionéines et gst, d'origine maternelle, soient également présents et promeuvent l'expression des gènes zygotiques.

À 96h, les abondances de transcrits restent inchangées chez les larves de Fos et celles de Calvi diminuent sensiblement. Il apparaît donc que les larves de Fos possèdent globalement plus de transcrits que celles de Calvi, d'un facteur 3 à 18. Les transcrits codants pour les métallothionéines sont, ici encore, plus abondants chez les larves de Fos.

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

Tableau XV : Profil d'expression pour les larves témoins âgées de 48h et de 96h.
Le rapport entre Calvi et Fos permet de mettre en évidence les différences de taux de transcrit. Les rapports identiques en bleus indiquent un taux de transcrit similaire et en rouge des taux de transcrit de Fos au moins 3 fois supérieurs à ceux de Calvi.

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

3.2. Zoom sur l'abondance des métallothionéines

Les métallothionéines sont des protéines non enzymatiques de faible masses moléculaires (12-15 kDa), riches en cystéine. Les groupes thiol (-SH) des résidus cystéines sont responsables de leur forte affinité pour les métaux lourds (Margoshes et

Vallee 1957). Les MTs ont été caractérisées dans de nombreux invertébrés aquatiques (Amiard *et al.* 2006) y compris les mollusques (Bebianno et Langston 1998; Amiard-Triquand *et al.* 1998; (Ng *et al.* 2008) et leurs larves (Damiens *et al.* 2006). Leur synthèse est principalement induite par les métaux tels que Cu, Zn, Cd, Hg et Ag, mais aussi dans un moindre degré par des composés organiques tels que certains pesticides ou des antibiotiques. Elles sont impliquées dans l'homéostasie des métaux lourds essentiels tels que le cuivre et le zinc, la détoxification des cations métalliques toxiques tels que le cadmium et le mercure (Amiard *et al.* 2006) et la protection contre le stress oxydatif (Ruttkay-Nedecky *et al.* 2013; Rios *et al.* 2018). Selon Bebianno et Machado (1997); Linde *et al.* (2001); Baudrimont *et al.* (2003), la concentration en MTs chez les organismes marins peut être utilisée comme un biomarqueur d'exposition aux métaux lourds.

Les transcrits codants pour les métallothionéines (1, 5 et 7) sont significativement sur-représentés (p = 0,005) chez les larves de Fos par rapport à celle de Calvi (Figure 40). Cette observation suggère que les larves de Fos ont une meilleure aptitude à prendre en charge les contaminations métalliques, précocement au cours du développement. Outre les SPC, le golfe de Fos est aussi contaminé en éléments traces métalliques (Augier *et al.* 1994). La surabondance de transcrits MT peut ainsi être interprétée également comme une adaptation au stress métallique.

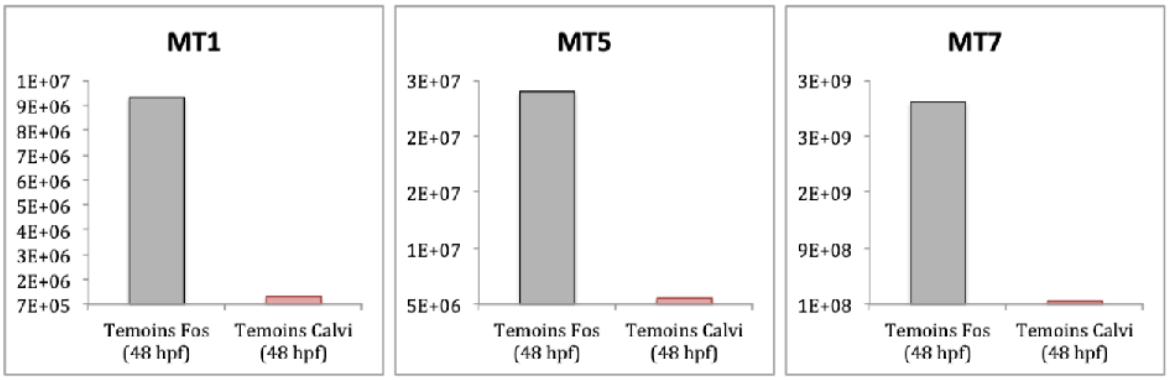


Figure 40 : Zoom sur le taux de transcrit de 3 métallothionéines retrouvé dans les larves de Fos (gris) et les larves de Calvi (rouge).

3.3. Le cas des larves exposées à différents niveaux de pollution

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

Pour les larves de 48 heures, les deux axes de l'ACP permettent d'expliquer environ 95 % de la variation des profils d'expression (Figure 41). L'axe 1 qui en explique 58,8 % est construit par la moitié des gènes étudiés (Cos^2>0,7) (Tableau XVI), ceux principalement impliqués dans la prolifération cellulaire et la régulation de l'apoptose (bcl2, tl, nrd1, p53, p38), et dans la protection cellulaire (hsp40, hsf1). L'axe 2, qui explique 35,1 % de la variation, regroupe les gènes impliqués dans la production d'énergie, la régulation pro-apoptotique et la détoxification de xénobiotique (atp synthetase, dnmt3A, bax, gst…).

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

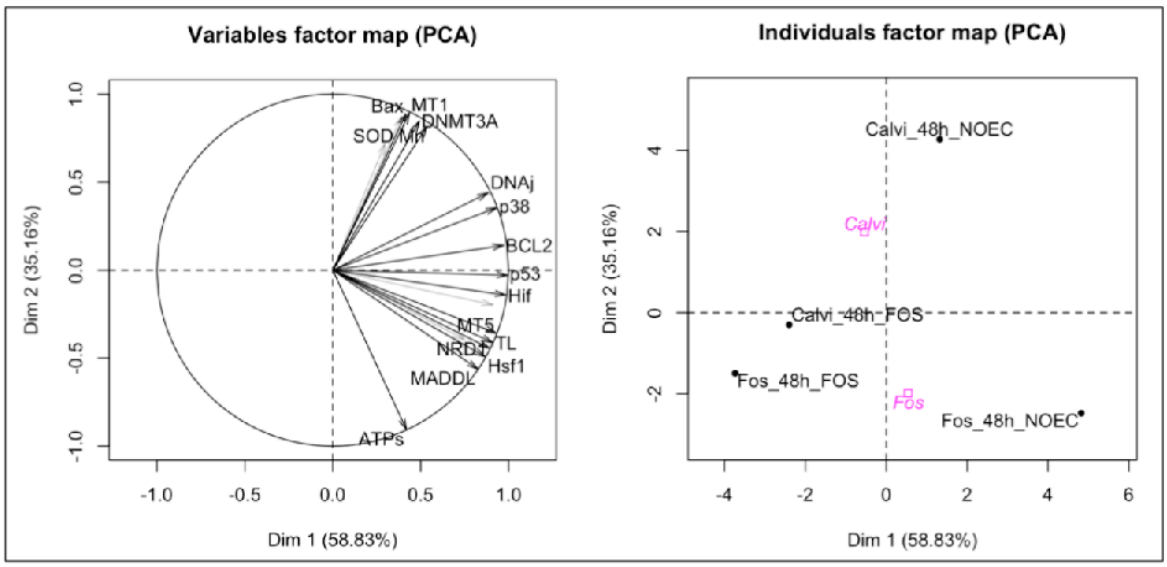


Figure 41 : Analyse en composantes principales du taux de transcrits des différents gènes (variables) et la répartition des individus en fonction de leur site géographique, après 48 heures d'exposition à l'eau réelle de Fos et au mélange de SPC.

Lorsque les larves sont exposées au mélange de SPC (i.e. DMSENO, 10 mg/L 1 mg/L et 30 mg/L pour le bromoforme, le tribromophénol et l'acide tribromoacétique respectivement), l'ACP montre que les populations de larves de Fos et Calvi ont des profils d'expression sensiblement différents (Figure 41, Tableau XVI). Les larves de Calvi sont situées haut sur l'axe 2 et sont peu différentes du témoin sur l'axe 1 (Tableau XVI). Cette position dans l'ACP indique une demande en énergie accrue par rapport au témoin, et la mise en place des systèmes de détoxification. Les larves de Calvi surexpriment aussi dnmt3A, qui code pour une méthyltransférase. La surexpression de méthyltransférase est souvent associée à l'expérience d'un stress. L'une des fonctions de dnmt est en effet de contenir la réactivation d'éléments mobiles « dormant » du génome, qui peuvent agir comme agents mutagènes, le plus souvent délétères (Campos *et al.* 2012; Takayama *et al.* 2014; Dorts *et al.* 2016). Enfin, bax est sensiblement surexprimé, alors que bcl2 ne l'est pas, ce qui indique une augmentation du nombre de cellules qui s'engagent dans l'apoptose. Cette réponse est cohérente avec les profils de comètes qui laissaient penser que l'exposition aux SPC pouvaient déclencher l'apoptose (Boumela *et al.* 2011; Bonaventura *et al.* 2011; Galasso *et al.* 2019).

Les larves de Fos exposées au mélange de SPC sont principalement positionnées à droite de l'ACP, indiquant une réponse orientée vers la survie cellulaire et le déclenchement d'une réponse globale au stress, comme l'indique par exemple la surexpression des

facteurs de transcription hif1 et hsf1. Ces facteurs de transcription sont activés en réponse à un large éventail de stress chimiques et contrôlent à eux deux l'expression de centaines de gènes dont les protéines de choc thermique (Silva *et al.* 2017; Steurer *et al.* 2018).

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

Variables	Dim 1	cos2	ctr	Dim 2	ctr	cos2
MT1	0.453	0.190	1,69	0.892	11,9	0.796
MT5	0.931	0.867	7,75	-0.359	1,93	0.129
MT7	0.909	0.826	7,38	-0.198	0,58	0.039
ATPs	0.419	0.176	1,57	-0.908	12,32	0.824
MADDL	0.826	0.682	6,10	-0.563	4,73	0.317
TL	0.911	0.830	7,42	-0.412	2,54	0.170
NRD1	0.892	0.795	7,11	-0.445	2,96	0.198
BCl2	0.971	0.944	8,44	0.140	0,29	0.020
NaK	0.297	0.088	0,79	0.718	7,72	0.516
Hsf1	0.868	0.754	6,74	-0.493	3,64	0.243
HSP60	0.748	0.559	5,00	-0.394	2,32	0.156
DNMT3A	0.493	0.243	2,17	0.848	10,76	0.719
Bax	0.415	0.172	1,54	0.887	11,78	0.787
p53	0.995	0.989	8,85	-0.028	0,01	0.001
Hif	0.985	0.970	8,67	-0.142	0,30	0.020
p38	0.933	0.871	7,79	0.355	1,88	0.126
DNAj	0.884	0.782	6,99	0.439	2,88	0.193
GST	0.392	0.153	1,37	0.873	11,40	0.762
SOD Mn	0.536	0.287	2,57	0.816	9,97	0.666

Individus	Dim1	cos2	ctr	Dim2	cos2	ctr
Fos _ Eau de Fos	-3.738	0.784	31,25	-1.495	0.125	8,36
Fos _ NOEC	4.821	0.791	51,97	-2.478	0.209	22,97
Calvi _ Eau de Fos	-2.400	0.665	12,88	-0.300	0.010	0,337
Calvi_ NOEC	1.318	0.086	3,88	4.273	0.907	68,32

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

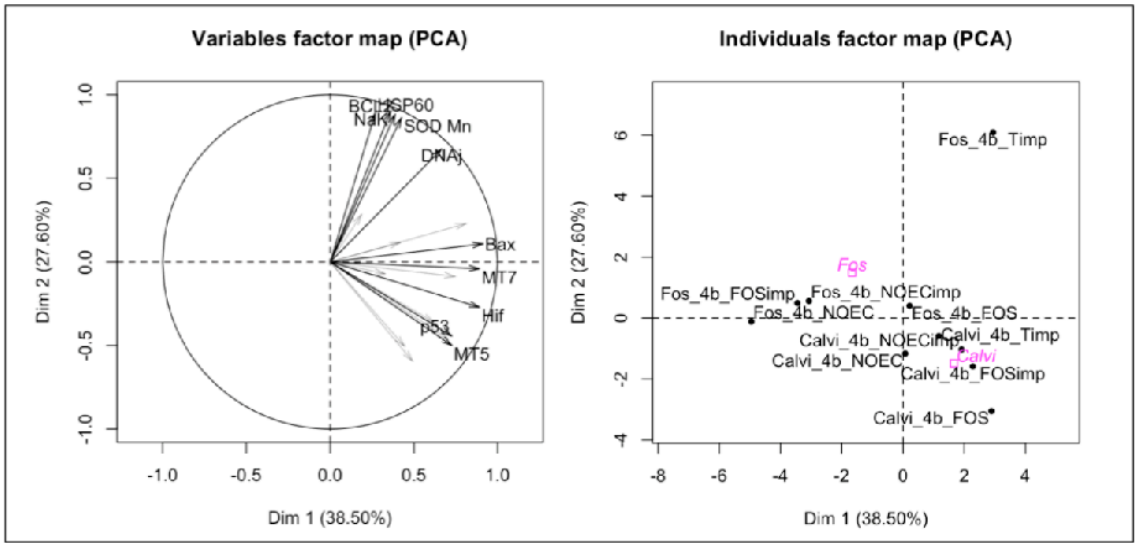


Figure 42 : Analyse en composantes principales du taux de transcrits des différents gènes (variables) et la répartition des individus en fonction de leur site géographique, après 96 hpf d'exposition à l'eau réelle de Fos et au mélange de SPC

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

Ainsi, comparativement aux résultats obtenus pour le stade *Pluteus* (48 heures), la moitié seulement des gènes testés contribuent à expliquer la variabilité des réponses aux expositions chimiques. De plus, ces gènes séparent peu les différentes conditions d'exposition de leurs témoins (Figure 42). Les profils d'abondances des transcrits sont donc peu différents entre les différentes conditions, ce qui peut être interprété comme une moindre sensibilité des différentes populations, vis à vis des stress chimiques testés, à ce stade de développement. Cependant, lorsque les populations sont considérées indépendantes de l'intensité du stress, les profils de transcriptions apparaissent toutefois globalement opposés entre les deux populations, comme l'indiquent les deux barycentres (Figure 42).

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

Variables	Dim 1	cos2	ctr	Dim 2	cos2	ctr
MT1	0.704	0.496	6,77	-0.461	0.212	4,04
MT5	0.728	0.529	7,23	-0.500	0.250	4,77
MT7	0.893	0.797	10,8	-0.041	0.002	0,03
ATPs	0.618	0.382	5,21	-0.360	0.130	2,47
MADDL	0.419	0.175	2,39	0.117	0.014	0,26
TL	0.443	0.196	2,68	-0.504	0.254	4,85
NRD1	0.327	0.107	1,46	-0.071	0.005	0,09
BCl2	0.387	0.150	2,05	0.885	0.783	14,9
NaK	0.361	0.130	1,77	0.903	0.815	15,5
Hsf1	0.813	0.661	9,03	0.230	0.053	1,00
HSP60	0.270	0.073	0,99	0.893	0.798	15,2
DNMT3A	0.491	0.241	3,29	-0.594	0.353	6,73
Bax	0.913	0.834	11,3	0.109	0.012	0,22
p53	0.727	0.528	7,22	-0.443	0.196	3,74
Hif	0.893	0.798	10,9	-0.271	0.074	1,40
p38	0.747	0.557	7,61	-0.087	0.008	0,14
DNAj	0.666	0.443	6,06	0.676	0.457	8,72
GST	0.187	0.035	0,47	0.284	0.081	1,53
SOD Mn	0.426	0.181	2,48	0.864	0.747	14,2

Individus	Dim1	cos2	ctr	Dim2	cos2	ctr
Fos _ Eau de Fos	0.214	0.002	0,06	0.400	0.008	0,30
Fos _ NOEC	-4.954	0.908	33,5	-0.119	0.001	0,02
Fos _ Témoin imp	2.942	0.182	11,8	6.092	0.781	70,7
Fos _ Eau de Fos imp	-3.448	0.842	16,2	0.495	0.017	0,49
Fos _ NOECimp	-3.073	0.669	12,9	0.559	0.022	0,59
Calvi _ Eau de Fos	2.887	0.281	11,3	-3.052	0.314	17,7
Calvi _ NOEC	0.071	0.001	0,007	-1.166	0.245	2,59
Calvi _ Témoin imp	1.168	0.180	1,86	-0.590	0.046	0,66
Calvi _ Eau de Fos imp	2.282	0.437	7,11	-1.585	0.211	4,79
Calvi _ NOECimp	1.912	0.312	4,99	-1.034	0.091	2,03

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

3.4. Influence de la nature de la pollution

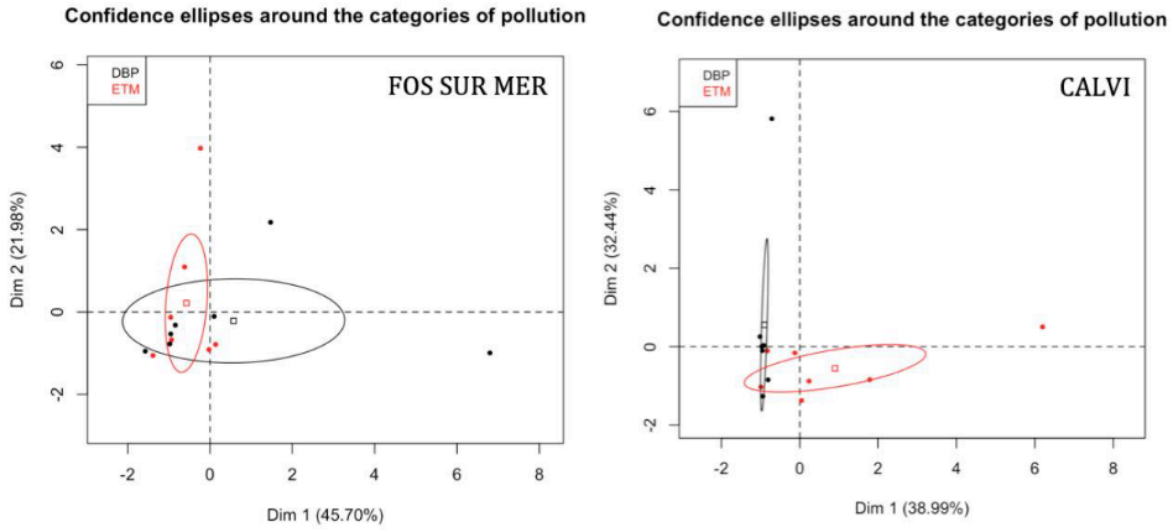
Afin d'évaluer, en marge de notre étude sur les SPC, la réponse aux stress métallique. Les larves des deux populations ont été exposées à des mélanges d'ETM dont la concentration était 5 et 10 fois plus importantes que les concentrations méditerranéennes moyennes (Tableau XI) (Richir 2012). Les résultats d'expression sont analysés par provenance des larves, avec les résultats obtenus pour les SPC, de manière à révéler les différences de réponses vis à vis de la nature du stress (Figure 43). Chacune des deux ACP réalisées permet d'expliquer environ 70% de la variabilité d'expression

observée, les gènes qui contribuent principalement à la constitution des axes sont présentés dans le tableau de la Figure 43.

L'ACP relative aux larves de Fos montre que les modalités de réponses transcriptomiques différent peu selon la nature du stress, pour les concentrations les plus faibles, mises en évidence par la zone de chevauchement des ellipses. Des différences de réponses s'observent seulement lorsque le stress est de forte intensité (Figure 43). Ce résultat suggère que la régulation de l'expression des gènes étudiés n'est que peu affectée par la nature du stress, une réponse n'apparaissant qu'à la suite d'une exposition à un stress intense.

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

Si la différence de profil d'expression est une conséquence de l'adaptation au golfe de Fos, cela ne semble pas s'appliquer exclusivement aux SPC. Dans l'ensemble, les différences observées ont fourni une indication supplémentaire de l'existence de réactions d'adaptation locale chez les oursins de Fos. Pour les deux sites, on distingue une dispersion des niveaux d'expression importante, ce qui est en cohérence avec la forte plasticité phénotypique rapportée pour l'espèce (Ebert 1996).



	FOS SUR MER				CALVI			
Variables	**Dim1**	**cos2**	**Dim2**	**cos2**	**Dim1**	**cos2**	**Dim2**	**cos2**
MT1	-0,015	0,000	0,785	0,616	0,911	0,830	0,075	0,006
MT5	0,873	0,793	-0,028	0,001	0,921	0,849	0,066	0,004
MT7	0,187	0,035	0,086	0,007	0,484	0,234	-0,180	0,032
HSP60	0,098	0,010	0,923	0,851	0,914	0,836	-0,135	0,018
BCl2	0,352	0,124	0,371	0,138	0,712	0,508	0,687	0,472
Bax	0,707	0,500	0,480	0,230	-0,073	0,005	0,966	0,933
HIF	0,969	0,938	-0,069	0,005	0,315	0,100	-0,024	0,001
DNMT3A	0,928	0,862	-0,225	0,051	-0,049	0,002	0,946	0,896
p53	0,939	0,881	-0,282	0,080	-0,380	0,145	0,747	0,558

Figure 43 : Analyse en composante principale pour chaque site géographique en fonction de la pollution, ainsi que la contribution aux axes des variables

4. Conclusion

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

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

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

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

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

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

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

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

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

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

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

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

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

faudrait donc en consommer 10 kg pour atteindre cette valeur. Sachant que les gonades d'oursins représentent environ 10% du poids total, que les oursins comestibles pèsent environ 60g, 6g sont consommables pour un individu. Il faudrait donc consommer environ 1 600 oursins par jour pour atteindre un seuil à la limite du danger. Bien sûr, ces calculs sont indicatifs, étant donné qu'ils ne prennent en compte qu'une seule source et uniquement le tribromophénol et non le mélange de polluants présents dans le golfe, mais ils permettent de relativiser les concentrations retrouvées en SPC, pour la consommation humaine de fruits de mer.

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

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

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

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

D'autre part, les résultats d'écotoxicologie et de biologie moléculaire devront être poursuivis pour mieux caractériser les modalités de réponses au stress, en particulier à l'eau réelle du golfe versus une eau d'un site non pollué. Dans cette optique la comparaison de la réponse à l'échelle populationnelle a permis d'obtenir des résultats intéressants, et il s'agira d'augmenter le panel de gènes candidats, notamment des gènes impliqués dans la « prise en charge » des SPC par les larves.

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

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

Dans le cadre de cette thèse, nous avons envisagé une approche génomique globale (RADseq), pour tenter d'identifier d'éventuelles régions génomiques sous sélections, qui pourraient valider l'hypothèse d'adaptation locale (Manel *et al.* 2016). Dans cette optique, 30 individus adultes de Fos, et 60 individus provenant d'autres sites non pollués ont été séquencés. Les données brutes ont été récemment reçues. A ce jour les

fragments RAD ont été alignés sur un génome de référence (mis à disposition par le laboratoire de biologie du développement de l'Observatoire Océanologique de Villefranche-sur-mer). L'analyse de ces marqueurs est actuellement en cours. Bien que cette approche soit prometteuse (Laporte *et al.* 2016; Catchen *et al.* 2017), la détection des régions sous sélection n'est pas toujours possible (Pratlong *et al.* 2018).

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

BIBLIOGRAPHIE

Abarnou A, Miossec L (1992) Chlorinated waters discharged to the marine environment chemistry and environmental impact. An overview. Science of The Total Environment 126:173–197. https://doi.org/10.1016/0048-9697(92)90490-J

Abdel-Naim AB, Nagy AA, Mohamadin AM, et al (2009) Chloroacetonitrile induces oxidative stress and apoptosis in mouse fetal liver. Toxicology Letters 190:123–127. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.06.867

Abdullah MI, Royle LG, Morris AW (1972) Heavy Metal Concentration in Coastal Waters. Nature 235:158–160. https://doi.org/10.1038/235158a0

Adb el baky H, El-Baz F, El baroty G (2009) Production of phenolic compounds from Spirulina maxima microalgae and its protective effects in vitro toward hepatotoxicity model. African Journal of Pharmacy and Pharmacology 3:133–139

Agus E, Sedlak D (2009) Formation and fate of chlorination by-products in reverse osmosis desalination systems. Water research 44:1616–26. https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.11.015

Akcha F, Vincent-hubert F, Leszkowicz A (2003) Potential value of the comet assay and DNA adduct measurement in dab (Limanda limanda) for assessment of in situ exposure to genotoxic compounds. Mutation research 534:21–32. https://doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00244-9

Allonier A-S, Khalanski M, Camel V, Bermond A (1999) Determination of dihaloacetonitriles and halophenols in chlorinated sea water. Talanta 50:227–236. https://doi.org/10.1016/S0039-9140(99)00123-X

Almqvist U (2011) Persistence and bioaccumulation of high vulume chemicals in articles in sweden. Departement of Materials and Environmental Chemistry 1:7–47

Alquezar R, Glendenning L, Costanzo S (2013) The use of the brown macroalgae, Sargassum flavicans, as a potential bioindicator of industrial nutrient enrichment. Marine Pollution Bulletin 77:140–146. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.10.013

Amiard J, Amiardtriquet C, Barka S, et al (2006) Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. Aquatic Toxicology 76:160–202. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.08.015

Amiard-Triquet C, Rainglet F, Larroux C, et al (1998) Metallothioneins in Arctic Bivalves. Ecotoxicology and Environmental Safety 41:96–102. https://doi.org/10.1006/eesa.1998.1673

Ammar KB (2018) Etude des réponses de la moule Mytilus spp exposée à des stress métallique et thermique durant les stades embryo-larvaires. Milieux et Changements globaux., Université de Bordeaux

Amri S, Samar M-F, Sellem F, Ouali K (2017) Seasonal antioxidant responses in the sea urchin Paracentrotus lividus (Lamarck 1816) used as a bioindicator of the environmental contamination in the South-East Mediterranean. Marine Pollution Bulletin 122:392–402. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.06.079

Andersen AT, Dommasnes A, Hesthagen IH (1973) Some heavy metals in sprat (Sprattus sprattus) and herring (Clupea harengus) from the inner Oslofjord. Aquaculture 2:17–22. https://doi.org/10.1016/0044-8486(73)90121-X

Arfi R (1984) Gulf of fos (France): Main hydrological features (1976–1978). Hydrobiologia 118:187–197. https://doi.org/10.1007/BF00021042

ARS, DGS (2017) La qualité de l'eau du robinet en France. Environnement et santé 2

Asimov I, Pohl F (1991) Our Angry Earth, New York: Tor

Augier H, Desmerger R, Egèa M, et al (1994) Etude de la pollution par les métaux lourds de la zone industrialo-portuaire du golfe de Fos-sur-Mer (Méditarranée, France), à l'aide de bio-indicateurs (moules et oursins). Marine Life 4:59–67

Ávila SP, Cordeiro R, Madeira P, et al (2018) Global change impacts on large-scale biogeographic patterns of marine organisms on Atlantic oceanic islands. Marine Pollution Bulletin 126:101–112. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.10.087

Barton BA (2002) Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. Integr Comp Biol 42:517–525. https://doi.org/10.1093/icb/42.3.517

Barton BA, Iwama GK (1991) Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. Annual Review of Fish Diseases 1:3–26. https://doi.org/10.1016/0959-8030(91)90019-G

Baudrimont M, Andres S, Durrieu G, Boudou A (2003) The key role of metallothioneins in the bivalve Corbicula fluminea during the depuration phase, after in situ exposure to Cd and Zn. Aquatic Toxicology 63:89–102. https://doi.org/10.1016/S0166-445X(02)00134-0

Bebianno MJ, Langston WJ (1998) Cadmium and metallothionein turnover in different tissues of the gastropod Littorina littorea. Talanta 46:301–313. https://doi.org/10.1016/S0039-9140(97)00344-5

Bebianno MJ, Machado LM (1997) Concentrations of metals and metallothioneins in Mytilus galloprovincialis along the south coast of Portugal. Marine Pollution Bulletin 34:666–671. https://doi.org/10.1016/S0025-326X(97)00036-2

Beddowes EJ, Faux SP, Chipman JK (2003) Chloroform, carbon tetrachloride and glutathione depletion induce secondary genotoxicity in liver cells via oxidative

stress. Toxicology 187:101–115. https://doi.org/10.1016/S0300-483X(03)00058-1

Behrenfeld MJ, O'Malley RT, Siegel DA, et al (2006) Climate-driven trends in contemporary ocean productivity. Nature 444:752–755. https://doi.org/10.1038/nature05317

Bellar TA, Lichtenberg JJ, Kroner RC (1974) The Occurrence of Organohalides in Chlorinated Drinking Waters. Journal - AWWA 66:703–706. https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.1974.tb02129.x

Bennett A (2013) 50th Anniversary: Desalination: 50 years of progress. Filtration + Separation 50:32–34, 36–39. https://doi.org/10.1016/S0015-1882(13)70128-9

Benon P, Blanc F, Bourgade B, et al (1978) Distribution of some heavy metals in the Gulf of Fos. Marine Pollution Bulletin 9:71–75. https://doi.org/10.1016/0025-326X(78)90452-6

Bernatchez L (2016) On the maintenance of genetic variation and adaptation to environmental change: considerations from population genomics in fishes: genetic variation and adaptive potential in fishes. J Fish Biol 89:2519–2556. https://doi.org/10.1111/jfb.13145

Bird A (2007) Perceptions of epigenetics. Nature 447:396–398. https://doi.org/10.1038/nature05913

Bonanno G, Orlando-Bonaca M (2018) Perspectives on using marine species as bioindicators of plastic pollution. Marine Pollution Bulletin 137:209–221. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.10.018

Bonanno G, Pavone P (2015) Leaves of Phragmites australis as potential atmospheric biomonitors of Platinum Group Elements. Ecotoxicology and Environmental Safety 114:31–37. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.01.005

Bonanno G, Raccuia SA (2018) Comparative assessment of trace element accumulation and bioindication in seagrasses Posidonia oceanica, Cymodocea nodosa and Halophila stipulacea. Marine Pollution Bulletin 131:260–266. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.04.039

Bonato S, Breton E, Didry M, et al (2016) Spatio-temporal patterns in phytoplankton assemblages in inshore–offshore gradients using flow cytometry: A case study in the eastern English Channel. Journal of Marine Systems 156:76–85. https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2015.11.009

Bonato S, Christaki U, Lefebvre A, et al (2015) High spatial variability of phytoplankton assessed by flow cytometry, in a dynamic productive coastal area, in spring:the eastern English Channel. Estuarine Coastal And Shelf Science 154:214–223. https://doi.org/10.1016/j.ecss.2014.12.037

Bonaventura R, Zito F, Chiaramonte M, et al (2018) Nickel toxicity in P. lividus embryos: Dose dependent effects and gene expression analysis. Marine Environmental Research 139:113–121. https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.05.002

Bonaventura R, Zito F, Costa C, et al (2011) Stress response gene activation protects sea urchin embryos exposed to X-rays. Cell Stress Chaperones 16:681–687. https://doi.org/10.1007/s12192-011-0277-3

Bonsignore M, Salvagio Manta D, Mirto S, et al (2018) Bioaccumulation of heavy metals in fish, crustaceans, molluscs and echinoderms from the Tuscany coast. Ecotoxicology and Environmental Safety 162:554–562. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.044

Boudjellaba D, Dron J, Revenko G, et al (2016) Chlorination by-product concentration levels in seawater and fish of an industrialised bay (Gulf of Fos, France) exposed to multiple chlorinated effluents. Science of The Total Environment 541:391–399. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.046

Boudouresque C, Verlaque M (2007) Chapter 13 Ecology of Paracentrotus lividus. Developments in Aquaculture and Fisheries Science 37:243–285. https://doi.org/10.1016/S0167-9309(07)80077-9

Boughriet R (2011) Pollutions en mer Méditerranée : " un point de non-retour à l'échéance 2030." Actu environnement

Boumela I, Assou S, Aouacheria A, et al (2011) Involvement of BCL2 family members in the regulation of human oocyte and early embryo survival and death: gene expression and beyond. Reproduction 141:549–561. https://doi.org/10.1530/REP-10-0504

Boyer S (2006) Résistance Métabolique des Larves de Moustiques aux Insecticides : Conséquences Environnementales. Sciences du Vivant, Université Joseph-Fourier - Grenoble I

Boyle JL, Lindsay RC, Stuiber D (2006) Bromophenol Distribution in Salmon and Selected Seafoods of Fresh- and Saltwater Origin. Journal of Food Science 57:918–922. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1992.tb14323.x

Boyle JL (University of W-M, Lindsay RC, Stuiber DA (1992) Contributions of bromophenols to marine-associated flavors of fish and seafoods. Journal of aquatic food product technology 1:3-4:43–63. https://doi.org/10.1300/J030v01n03_05

Bozinovic F, Orellana MJM, Martel SI, Bogdanovich JM (2014) Testing the heat-invariant and cold-variability tolerance hypotheses across geographic gradients. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology 178:46–50. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.08.009

Bozinovic G, Oleksiak MF (2011) Genomic approaches with natural fish populations from polluted environments. Environmental Toxicology and Chemistry 30:283–289. https://doi.org/10.1002/etc.403

Brennan RS, Hwang R, Tse M, et al (2016) Local adaptation to osmotic environment in killifish, Fundulus heteroclitus, is supported by divergence in swimming performance but not by differences in excess post-exercise oxygen consumption

or aerobic scope. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology 196:11–19. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.02.006

Buitenhuis ET, Li WKW, Vaulot D, et al (2012) Picophytoplankton biomass distribution in the global ocean. Earth System Science Data 4:37–46. https://doi.org/10.5194/essd-4-37-2012

Butler JH, King DB, Lobert JM, et al (2007) Oceanic distributions and emissions of short-lived halocarbons. Global Biogeochemical Cycles 21:. https://doi.org/10.1029/2006GB002732

Byrne M (2011) Impact of ocean warming and ocean acidification on marine invertebrate life history stages: vulnerabilities and potential for persistence in a changing ocean. In: In Oceanography and Marine Biology: An Annual Review. Boca, pp 1–42

Cabrita MT, Vale C, Rauter A (2010) Halogenated Compounds from Marine Algae. Marine drugs 8:2301–17. https://doi.org/10.3390/md8082301

Caçador I, Costa JL, Duarte B, et al (2012) Macroinvertebrates and fishes as biomonitors of heavy metal concentration in the Seixal Bay (Tagus estuary): Which species perform better? Ecological Indicators 19:184–190. https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2011.09.007

Calza P, Massolino C, Pelizzetti E, Minero C (2008) Solar driven production of toxic halogenated and nitroaromatic compounds in natural seawater. Science of The Total Environment 398:196–202. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.03.023

Calza P, Maurino V, Minero C, et al (2005) Photoinduced halophenol formation in the presence of iron(III) species or cadmium sulfide. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry 170:61–67. https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2004.07.003

Campos C, Valente LMP, Fernandes JMO (2012) Molecular evolution of zebrafish dnmt3 genes and thermal plasticity of their expression during embryonic development. Gene 500:93–100. https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.03.041

Carballeira C, De Orte MR, Viana IG, et al (2012) Assessing the toxicity of chemical compounds associated with land-based marine fish farms: the sea urchin embryo bioassay with Paracentrotus lividus and Arbacia lixula. Arch Environ Contam Toxicol 63:249–261. https://doi.org/10.1007/s00244-012-9769-0

Carignan V, Villard M-A (2002) Selecting Indicator Species to Monitor Ecological Integrity: A Review. Environ Monit Assess 78:45–61. https://doi.org/10.1023/A:1016136723584

Caroppo C, Stabili L, Aresta M, et al (2006) Impact of heavy metals and PCBs on marine picoplankton. Environmental toxicology 21:541–51. https://doi.org/10.1002/tox.20215

Carpenter L, Liss P (2000) On temperate sources of bromoform and other reactive organic bromine gases. Journal of Geophysical Research 105:20539–20548. https://doi.org/10.1029/2000JD900242

Catchen J, Hohenlohe P, Bernatchez L, et al (2017) Unbroken: RADseq remains a powerful tool for understanding the genetics of adaptation in natural populations. Molecular Ecology Resources 17:362–365. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12669

Cemeli E, Wagner ED, Anderson D, et al (2006) Modulation of the cytotoxicity and genotoxicity of the drinking water disinfection byproduct lodoacetic acid by suppressors of oxidative stress. Environ Sci Technol 40:1878–1883. https://doi.org/10.1021/es051602r

Chan JP, Cheung MT, Li FP (1974) Trace metals in Hong Kong waters. Marine Pollution Bulletin 5:171–174. https://doi.org/10.1016/0025-326X(74)90131-3

Chauveau L (2017) Les eaux de ballast des navires seront enfin dépolluées. Sciences et avenir

Chester R, Stoner JH (1974) The distribution of zinc, nickel, manganese, cadmium, copper, and iron in some surface waters from the world ocean. Marine Chemistry 2:17–32. https://doi.org/10.1016/0304-4203(74)90003-6

Chinn R, Lee T, Krasner S, et al (2007) Solid-Phase Extraction of 35 DBPs with Analysis by GC/ECD and GC/MS. American Water Works Association - Water Quality Technology Conference and Exposition 2007: Fast Tracks to Water Quality 1–20

Chung HY, Joyce Ma WC, Kim J-S (2003) Seasonal Distribution of Bromophenols in Selected Hong Kong Seafood. J Agric Food Chem 51:6752–6760. https://doi.org/10.1021/jf034632r

Cillard J, Cillard P (2006) Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. Oilseeds and fats, Crops and Lipids 13:24–29. https://doi.org/10.1051/ocl.2006.6666

Cimetiere N, Dossier-Berne F, De Laat J (2010) Effect of some parameters on the formation of chloroform during chloramination of aqueous solutions of resorcinol. Water Research 44:4497–4504. https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.06.010

Coclet C, Garnier C, Delpy F, et al (2018) Trace metal contamination as a toxic and structuring factor impacting ultraphytoplankton communities in a multicontaminated Mediterranean coastal area. Progress in Oceanography 163:196–213. https://doi.org/10.1016/j.pocean.2017.06.006

Coillie R van, Couture P, Visser SA (1983) Use of Algae in aquatic ecotoxicology. Advances in environmental science and technology 13:487–502

Copete ML, Zalacain A, Lorenzo C, et al (2011) Occurence oh haloanisole and halophenol contamination in aged red wines. Food Additives & Contaminants 26:32–38. https://doi.org/10.1080/02652030802273130

Costet-Deiber N (2013) Effets sanitaires de l'exposition aux sous-produits de chloration de l'eau. Médecine humaine et pathologie, Université Rennes 1

Couvray S (2015) Étude de la dynamique de populations d'oursins comestibles Paracentrotus lividus (Lamarck, 1816) en zone pêchée et anthropisée. : Évaluation de l'efficacité et de l'impact d'opérations de lâchers de juvéniles pour le repeuplement.

Covaci A, Harrad S, Abdallah MA-E, et al (2011) Novel brominated flame retardants: A review of their analysis, environmental fate and behaviour. Environment International 37:532–556. https://doi.org/10.1016/j.envint.2010.11.007

Cunha SC, Pena A, Fernandes JO (2017) Mussels as bioindicators of diclofenac contamination in coastal environments. Environmental Pollution 225:354–360. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.02.061

Damiens G, Mouneyrac C, Quiniou F, et al (2006) Metal bioaccumulation and metallothionein concentrations in larvae of Crassostrea gigas. Environmental Pollution 140:492–499. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.08.006

Debrincat R (2017) Les navires tenus de traiter leurs eaux de ballast. Actu-Environnement

Delacroix S, Vogelsang C, Tobiesen A, Liltved H (2013) Disinfection by-products and ecotoxicity of ballast water after oxidative treatment – Results and experiences from seven years of full-scale testing of ballast water management systems. Marine Pollution Bulletin 73:24–36. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.06.014

Delunardo FAC, Carvalho LR de, Silva BF da, et al (2015) Seahorse (Hippocampus reidi) as a bioindicator of crude oil exposure. Ecotoxicology and Environmental Safety 117:28–33. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.03.016

Deng J, Liu C, Yu L, Zhou B (2010) Chronic exposure to environmental levels of tribromophenol impairs zebrafish reproduction. Toxicology and Applied Pharmacology 243:87–95. https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.11.016

Depledge MH, Aagaard A, Györkös P (1995) Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioural biomarkers. Marine Pollution Bulletin 31:19–27. https://doi.org/10.1016/0025-326X(95)00006-9

Devaux A, Pesonen M, Monod G (1997) Alkaline comet assay in rainbow trout hepatocytes. Toxicol In Vitro 11:71–79. https://doi.org/10.1016/s0887-2333(97)00004-0

Dinnel PA, Link JM, Stober QJ (1987) Improved methodology for a sea urchin sperm cell bioassay for marine waters. Arch Environ Contam Toxicol 16:23–32. https://doi.org/10.1007/BF01055356

Dirrigl FJ, Badaoui Z, Tamez C, et al (2018) Use of the sea hare (Aplysia fasciata) in marine pollution biomonitoring of harbors and bays. Marine Pollution Bulletin 129:681–688. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.10.056

Domino MM, Pepich BV, Munch DJ, Fair PS (2004) Optimizing the determination of haloacetic acids in drinking waters. Journal of Chromatography A 1035:9–16. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.02.034

Dorts J, Falisse E, Schoofs E, et al (2016) DNA methyltransferases and stress-related genes expression in zebrafish larvae after exposure to heat and copper during reprogramming of DNA methylation. Sci Rep 6:1–10. https://doi.org/10.1038/srep34254

Dupont S, Thorndyke MC (2009) Impact of CO_2-driven ocean acidification on invertebrates early life-history – What we know, what we need to know and what we can do. Biogeosciences Discuss 6:3109–3131. https://doi.org/10.5194/bgd-6-3109-2009

Ebert TA (1996) Adaptive aspects of phenotypic plasticity in echinoderms. Oceanologica Acta 19:347–355

Eppley RW (1972) Temperature and phytoplankton growth in the sea. Fisheries Bulletin 70:1063–1085

Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. Free Radic Biol Med 11:81–128. https://doi.org/10.1016/0891-5849(91)90192-6

Evans TG, Watson-Wynn P (2014) Effects of Seawater Acidification on Gene Expression: Resolving Broader-Scale Trends in Sea Urchins. The Biological Bulletin 226:237–254. https://doi.org/10.1086/BBLv226n3p237

Field CB, Behrenfeld MJ, Randerson JT, Falkowski P (1998) Primary Production of the Biosphere: Integrating Terrestrial and Oceanic Components. Science 281:237–240. https://doi.org/10.1126/science.281.5374.237

Fisher T, Crane M, Callaghan A (2003) Induction of cytochrome P-450 activity in individual Chironomus riparius Meigen larvae exposed to xenobiotics. Ecotoxicol Environ Saf 54:1–6. https://doi.org/10.1016/s0147-6513(02)00031-3

Fisk PR, Girling AE, Wildey RJ (2010) Prioritisation of flame retardants for environmental risk assessment. Environment Agency Science Report Series 123

Fox-Kemper B, Adcroft A, Böning CW, et al (2019) Challenges and Prospects in Ocean Circulation Models. Front Mar Sci 6:65. https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00065

Freile-Pelegrin Y, Robledo D (2014) Bioactive phenolic compounds from algae. Bioactive Compounds from Marine Foods: Plant and Animal Sources 113–129

Frenzilli G, Nigro M, Lyons BP (2009) The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. Mutation Research/Reviews in Mutation Research 681:80–92. https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.03.001

Fukai R, Huynh-Ngoc L (1976) Copper, zinc and cadmium in coastal waters of the N.W. Mediterranean. Marine Pollution Bulletin 7:9–13. https://doi.org/10.1016/0025-326X(76)90281-2

Galasso C, D'Aniello S, Sansone C, et al (2019) Identification of Cell Death Genes in Sea Urchin *Paracentrotus lividus* and Their Expression Patterns during Embryonic Development. Genome Biology and Evolution 11:586–596. https://doi.org/10.1093/gbe/evz020

García-Seoane R, Fernández JA, Villares R, Aboal JR (2018) Use of macroalgae to biomonitor pollutants in coastal waters: Optimization of the methodology. Ecological Indicators 84:710–726. https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.09.015

GESAMP-BWWG (2018) Harmful aquatic organisms in ballast water. Marine environment protection commitee

Gharred T, Jebali J, Belgacem M, et al (2016) Assessment of the individual and mixture toxicity of cadmium, copper and oxytetracycline, on the embryo-larval development of the sea urchin Paracentrotus lividus. Environmental Science and Pollution Research 23:18064–18072. https://doi.org/10.1007/s11356-016-6988-3

Gibson C, Tone F, Wilkinso P, Blaylock JW (2008) Toxicity And Effects Of Bromoform On Five Marine Species. Ozone-science & Engineering - OZONE-SCI ENG 1:47–54. https://doi.org/10.1080/01919517908550831

Golder Expertise (2009) Suivi environnemental di milieu marin - Etat zéro

Goldstone JV, Hamdoun A, Cole BJ, et al (2006) The chemical defensome: Environmental sensing and response genes in the Strongylocentrotus purpuratus genome. Developmental Biology 300:366–384. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.08.066

González J, Figueiras FG, Aranguren-Gassis M, et al (2009) Effect of a simulated oil spill on natural assemblages of marine phytoplankton enclosed in microcosms. Estuarine, Coastal and Shelf Science 83:265–276. https://doi.org/10.1016/j.ecss.2009.04.001

Gosselin L, Qian P-Y (1997) Juvenile mortality in benthic marine invertebrates. Marine Ecology Progress Series 146:265–282. https://doi.org/10.3354/meps146265

Gribble GW (2010) Naturally Occurring Organohalogen Compounds - A Comprehensive Update. 91:613. https://doi.org/10.1007/978-3-211-99323-1

Grossman AR, Mackey KRM, Bailey S (2010) A Perspective on Photosynthesis in the Oligotrophic Oceans: Hypotheses Concerning Alternate Routes of Electron Flow1. Journal of Phycology 46:629–634. https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2010.00852.x

Gude VG (2016) Desalination and sustainability – An appraisal and current perspective. Water Research 89:87–106. https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.11.012

Gyori BM, Venkatachalam G, Thiagarajan PS, et al (2014) OpenComet: An automated tool for comet assay image analysis. Redox Biology 2:457–465. https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.020

Hagger JA, Atienzar FA, Jha AN (2005) Genotoxic, cytotoxic, developmental and survival effects of tritiated water in the early life stages of the marine mollusc, Mytilus edulis. Aquatic Toxicology 74:205–217. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.05.013

Haleng J, Pincemail J, Defraigne JO, et al (2007) Le stress oxydant. Revue Médicale de Liège 62:628–638

Hanasaki N, Yoshikawa S, Kakinuma K, Kanae S (2016) A seawater desalination scheme for global hydrological models. Hydrology and Earth System Sciences 20:4143–4157. https://doi.org/10.5194/hess-20-4143-2016

Hanigan D, Truong L, Simonich M, et al (2017) Zebrafish embryo toxicity of 15 chlorinated, brominated, and iodinated disinfection by-products. Journal of Environmental Sciences 58:302–310. https://doi.org/10.1016/j.jes.2017.05.008

Hansen KMS, Willach S, Antoniou MG, et al (2012) Effect of pH on the formation of disinfection byproducts in swimming pool water--is less THM better? Water Res 46:6399–6409. https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.09.008

Harju M, Heimstad ES, Herzke D, et al (2009) Emerging "new" Brominated flame retardants in flame retarded products and the environment. Brominated Flame Retardants 16:241–286. https://doi.org/10.1007/698_2010_73

Hartmann P, Bordet F, Chevalier C, et al (2011) Centrales nucléaires et environnement - Prélèvements d'eau et rejets. EDP Science 1–256. https://doi.org/10.26530/OAPEN_519657

Hellawell JM (ed) (1986) Biological Indicators of Freshwater Pollution and Environmental Management. Pollution Monitoring Series 546 p

Heller-Grossman L, Manka J, Limoni-Relis B, Rebhun M (2001) THM, haloacetic acids and other organic DBPs formation in disinfection of bromide rich Sea of Galilee (Lake Kinneret) water. Water Science and Technology: Water Supply 1:259–266. https://doi.org/10.2166/ws.2001.0046

Hernandez MR, Ismail N, Drouillard KG, MacIsaac HJ (2017) Ships' Ballast Water Treatment by Chlorination Can Generate Toxic Trihalomethanes. Bull Environ Contam Toxicol 99:194–199. https://doi.org/10.1007/s00128-017-2125-3

Hess-Erga O-K, Moreno-Andrés J, Enger Ø, Vadstein O (2019) Microorganisms in ballast water: Disinfection, community dynamics, and implications for management. Science of The Total Environment 657:704–716. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.004

Hladik ML, Focazio MJ, Engle M (2014) Discharges of produced waters from oil and gas extraction via wastewater treatment plants are sources of disinfection by-

products to receiving streams. Science of The Total Environment 466–467:1085–1093. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.08.008

Hodgeson JW, Cohen AL, Munch DJ (1990) Determination of chlorination disinfection byproducts, chlorinated solvents, and halogenated pesticides/herbicides in drinking water by liquid-liquid extraction and gas chromatography with electron capture detection. Environmental Science and Pollution Research 26:7305–7314

Holt E, Miller S (2010) Bioindicators: Using Organisms to Measure Environmental Impacts | Learn Science at Scitable. Nature Education

Hornsey IS, Hide D (1985) The production of antimicrobial compounds by British marine algae. IV. Variation of antimicrobial activity with algal generation. British Phycological Journal 20:21–25. https://doi.org/10.1080/00071618500650041

Hose JE (1985) Potential uses of sea urchin embryos for identifying toxic chemicals: Description of a bioassay incorporating cytologic, cytogenetic and embryologic endpoints. Journal of Applied Toxicology 5:245–254. https://doi.org/10.1002/jat.2550050406

Hwang J, Park SY, Lee S, Lee T-K (2018) High diversity and potential translocation of DNA viruses in ballast water. Marine Pollution Bulletin 137:449–455. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.10.053

INERIS (2001) Systèmes de refroidissment industriels

Jacangelo JG, Trussell RR (2002) International report: water and wastewater disinfection - trends, issues and practices. Water Science and Technology: Water Supply 2:147–157. https://doi.org/10.2166/ws.2002.0097

Jangoux M, Lawrence JM (1982) Echinoderm Nutrition. CRC Press

Jenner H, Whitehouse J, Taylor C, Khalanski M (1998) Cooling Water Management in European Power Stations: Biology and Control. http://dx.doi.org/101051/hydro:1989101 1–2:. https://doi.org/10.1051/hydro:1989101

Jenner HA, Taylor CJL, van Donk M, Khalanski M (1996) Chlorination By-Products in Chlorinated Cooling Water of some European Coastal Power Stations. 15

Jenner HA, Taylor CJL, van Donk M, Khalanski M (1997) Chlorination by-products in chlorinated cooling water of some European coastal power stations. Marine Environmental Research 43:279–293. https://doi.org/10.1016/S0141-1136(96)00091-8

Jha A (1998) Use of aquatic invertebrates in genotoxicological studies. Mutation research 399:1–2. https://doi.org/10.1016/S0027-5107(97)00261-3

Jimeno-Romero A, Bilbao E, Valsami-Jones E, et al (2019) Bioaccumulation, tissue and cell distribution, biomarkers and toxicopathic effects of CdS quantum dots in mussels, Mytilus galloprovincialis. Ecotoxicology and Environmental Safety 167:288–300. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.10.035

Johnson MW, Heck KL, Fourqurean JW (2006) Nutrient content of seagrasses and epiphytes in the northern Gulf of Mexico: Evidence of phosphorus and nitrogen limitation. Aquatic Botany 85:103–111. https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2006.02.003

Kargalioglu Y, McMillan BJ, Minear RA, Plewa MJ (2002) Analysis of the cytotoxicity and mutagenicity of drinking water disinfection by-products in Salmonella typhimurium. Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis 22:113–128. https://doi.org/10.1002/tcm.10010

Kawecki TJ, Ebert D (2004) Conceptual issues in local adaptation. Ecology Letters 7:1225–1241. https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00684.x

Keckes S, Ozretić B, Lucu C (1966) About a possible mechanism involved in the shedding of sea urchins. Experientia 22:146–147. https://doi.org/10.1007/bf01897697

Khalanski M, Jenner HA (2012) Chlorination Chemistry and Ecotoxicology of the Marine Cooling Water Systems. Operational and Environmental Consequences of Large Industrial Cooling Water Systems 183–226. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1698-2_9

Khatri N, Tyagi S (2015) Influences of natural and anthropogenic factors on surface and groundwater quality in rural and urban areas. Frontiers in Life Science 8:23–39. https://doi.org/10.1080/21553769.2014.933716

Kilemade MF, Hartl MGJ, Sheehan D, et al (2004) Genotoxicity of field-collected inter-tidal sediments from Cork Harbor, Ireland, to juvenile turbot (Scophthalmus maximus L.) as measured by the Comet assay. Environ Mol Mutagen 44:56–64. https://doi.org/10.1002/em.20028

Kim D, Amy GL, Karanfil T (2015) Disinfection by-product formation during seawater desalination: A review. Water Research 81:343–355. https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.05.040

Kirchman DL, Keil RG, Wheeler PA (1989) The effect of amino acids on ammonium utilization and regeneration by heterotrophic bacteria in the subarctic Pacific. Deep Sea Research Part A Oceanographic Research Papers 36:1763–1776. https://doi.org/10.1016/0198-0149(89)90071-X

Kobayashi N, Nogami H, DOl K (1972) MARINE POLLUTION BIOASSAY BY USING SEA URCHIN EGGS IN THE INLAND SEA OF JAPAN (THE SETO-NAIKAI)l). 24

Koch C, Sures B (2018) Environmental concentrations and toxicology of 2,4,6-tribromophenol (TBP). Environmental Pollution 233:706–713. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.10.127

Korkina L, Deeva I, Biase A, et al (2000) Redox-dependent toxicity of diepoxybutane and mitomycin C in sea urchin embryogenesis. Carcinogenesis 21:213–20

Kottuparambil S, Agusti S (2018) PAHs sensitivity of picophytoplankton populations in the Red Sea. Environmental Pollution 239:607–616. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.04.079

Krasner SW, Weinberg HS, Richardson SD, et al (2006) Occurrence of a new generation of disinfection byproducts. Environ Sci Technol 40:7175–7185. https://doi.org/10.1021/es060353j

Krasner SW, Westerhoff P, Chen B, et al (2009) Occurrence of Disinfection Byproducts in United States Wastewater Treatment Plant Effluents. Environ Sci Technol 43:8320–8325. https://doi.org/10.1021/es901611m

Kreja L, Schochat T, Finking G (2003) Development of an in vitro model to study oxidative DNA damage in human coronary artery endothelial cells. ALTEX 20:71–76

Kristensen T, Ketola T, Kronholm I (2018) Adaptation to environmental stress at different timescales: Adaptation to environmental stress. Annals of the New York Academy of Sciences. https://doi.org/10.1111/nyas.13974

Kundu B, Richardson S, Swartz P, et al (2004) Mutagenicity in Salmonella of halonitromethanes: A recently recognized class of disinfection by-products in drinking water. Mutation research 562:39–65. https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2004.05.007

Kurihara H (2008) Effects of CO2-driven ocean acidification on the early developmental stages of invertebrates. Marine Ecology Progress Series 373:275–284. https://doi.org/10.3354/meps07802

Lagaria A, Mandalakis M, Mara P, et al (2017) Phytoplankton Response to Saharan Dust Depositions in the Eastern Mediterranean Sea: A Mesocosm Study. Front Mar Sci 3:. https://doi.org/10.3389/fmars.2016.00287

Lagiere J, El Najjar N, Dubourg K, et al (2017) La chimie du brome appliquée à la désinfection des eaux de piscines : étude bibliographique. rseau 30:227–245. https://doi.org/10.7202/1044249ar

Lampi P, Tolonen K, Vartiainen T, Tuomisto J (1992) Chlorophenols in lake bottom sediments: A retrospective study of drinking water contamination. Chemosphere 24:1805–1824. https://doi.org/10.1016/0045-6535(92)90235-J

Laporte M, Pavey SA, Rougeux C, et al (2016) RAD sequencing reveals within-generation polygenic selection in response to anthropogenic organic and metal contamination in North Atlantic Eels. Mol Ecol 25:219–237. https://doi.org/10.1111/mec.13466

Latteman S (2010) Development of an Environmental Impact Assessment and Decision Support System for Seawater Desalination Plants. CRC Press

Lazo-de-la-Vega-Monroy M-L, Fernndez-Mej C (2013) Oxidative Stress in Diabetes Mellitus and the Role Of Vitamins with Antioxidant Actions. In: Morales-Gonzalez JA (ed) Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants. InTech

Leal MCF, Vasconcelos MT, Sousa-pinto I, Cabral JPS (1997) Biomonitoring with benthic macroalgae and direct assay of heavy metals in seawater of the Oporto coast

(northwest Portugal). Marine Pollution Bulletin 34:1006–1015. https://doi.org/10.1016/S0025-326X(97)00112-4

Lebaron K, Mechiri L, Richard S, et al (2019) Assessment of individual and mixed toxicity of bromoform, tribromoacetic-acid and 2,4,6 tribromophenol, on the embryo-larval development of Paracentrotus lividus sea urchin. Environ Sci Pollut Res 26:20573–20580. https://doi.org/10.1007/s11356-019-05279-8

Lee HJ, Kim GB, Lee RF (2012) Genotoxicity and development effects of brominated flame retardant PBDEs and UV-exposed PBDEs on grass shrimp (Palaemonetes pugio) embryo. Marine Pollution Bulletin 64:2892–2895. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.08.010

Liang Q, Stolarski RS, Kawa SR, et al (2010) Finding the missing stratospheric Bry: a global modeling study of CHBr3 and CH2Br2. Atmos Chem Phys 18

Liang Y, Zhang Y, Wang N, et al (2017) Estimating Primary Production of Picophytoplankton Using the Carbon-Based Ocean Productivity Model: A Preliminary Study. Front Microbiol 8:. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01926

Liew D, Linge KL, Joll CA, et al (2012) Determination of halonitromethanes and haloacetamides: An evaluation of sample preservation and analyte stability in drinking water. Journal of Chromatography A 1241:117–122. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.04.037

Liman R, Ciğerci İH, Akyıl D, et al (2011) Determination of genotoxicity of Fenaminosulf by Allium and Comet tests. Pesticide Biochemistry and Physiology 99:61–64. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2010.10.006

Lincoln DE, Fielman KT, Marinelli RL, Woodin SA (2005) Bromophenol accumulation and sediment contamination by the marine annelids Notomastus lobatus and Thelepus crispus. Biochemical Systematics and Ecology 33:559–570. https://doi.org/10.1016/j.bse.2004.12.006

Linde AR, Sánchez-Galán S, Vallés-Mota P, García-Vázquez E (2001) Metallothionein as Bioindicator of Freshwater Metal Pollution: European Eel and Brown Trout. Ecotoxicology and Environmental Safety 49:60–63. https://doi.org/10.1006/eesa.2001.2042

Liu J, Zhang X (2014) Comparative toxicity of new halophenolic DBPs in chlorinated saline wastewater effluents against a marine alga: Halophenolic DBPs are generally more toxic than haloaliphatic ones. Water Research 65:64–72. https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.07.024

Liu M, Hansen PE, Lin X (2011) Bromophenols in Marine Algae and Their Bioactivities. Mar Drugs 9:1273–1292. https://doi.org/10.3390/md9071273

Liyan Z, Ying H, Guangxing L (2005) Using DNA damage to monitor water environment. Chin J Ocean Limnol 23:340–348. https://doi.org/10.1007/BF02847158

Llana-Belloch S, Priego Quesada JI, Pérez-Soriano P, et al (2016) Disinfection by-products effect on swimmers oxidative stress and respiratory damage. European Journal of Sport Science 16:609–617. https://doi.org/10.1080/17461391.2015.1080306

Lopez M, Choin J, Sikora M, et al (2019) Genomic Evidence for Local Adaptation of Hunter-Gatherers to the African Rainforest. Current Biology 29:2926-2935.e4. https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.07.013

Lüchmann KH, Clark MS, Bainy ACD, et al (2015) Key metabolic pathways involved in xenobiotic biotransformation and stress responses revealed by transcriptomics of the mangrove oyster Crassostrea brasiliana. Aquatic Toxicology 166:10–20. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.06.012

Ludwig W, Bouwman A, Dumont E, Lespinas F (2010) Water and nutrient fluxes from major Mediterranean and Black Sea rivers: Past and future trends and their implications for the basin-scale budgets. Global Biogeochemical Cycles - GLOBAL BIOGEOCHEM CYCLE 24:. https://doi.org/10.1029/2009GB003594

Ludwig W, Dumont E, Meybeck M, Heussner S (2009) River discharges of water and nutrients to the Mediterranean and Black Sea: Major drivers for ecosystem changes during past and future decades? Progress in Oceanography 80:199–217. https://doi.org/10.1016/j.pocean.2009.02.001

Manasfi T (2016) Contribution of organic UV filters to the formation of disinfection byproducts in chlorinated seawater swimming pools : occurrence, formation and genotoxicity. Thesis, Aix-Marseille

Manasfi T, Lebaron K, Verlande M, et al (2018) Occurrence and speciation of chlorination byproducts in marine waters and sediments of a semi-enclosed bay exposed to industrial chlorinated effluents. International Journal of Hygiene and Environmental Health 222:1–8. https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2018.06.008

Mandelker L (2008) Introduction to Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice 38:1–30. https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2007.10.005

Manel S, Perrier C, Pratlong M, et al (2016) Genomic resources and their influence on the detection of the signal of positive selection in genome scans. Mol Ecol 25:170–184. https://doi.org/10.1111/mec.13468

Margoshes M, Vallee BL (1957) A CADMIUM PROTEIN FROM EQUINE KIDNEY CORTEX. J Am Chem Soc 79:4813–4814. https://doi.org/10.1021/ja01574a064

Mathes R, Pfetsch B (1991) The Role of the Alternative Press in the Agenda-Building Process: Spill-over Effects and Media Opinion Leadership. European Journal of Communication 6:33–62. https://doi.org/10.1177/0267323191006001003

McConnell O, Fenical W (1977) Halogen chemistry of the red alga Asparagopsis. Phytochemistry 16:367–374. https://doi.org/10.1016/0031-9422(77)80067-8

McGibbon S, Moldan AGS (1986) Routine toxicity testing of toxicants using a sea urchin gamete bioassay. Marine Pollution Bulletin 17:68–72. https://doi.org/10.1016/0025-326X(86)90294-8

McMichael MA (2007) Oxidative stress, antioxidants, and assessment of oxidative stress in dogs and cats. J Am Vet Med Assoc 231:714–720. https://doi.org/10.2460/javma.231.5.714

Migdal C, Serres M (2011) Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. Med Sci (Paris) 27:405–412. https://doi.org/10.1051/medsci/2011274017

Migliaccio O, Castellano I, Cirino P, et al (2015) Maternal Exposure to Cadmium and Manganese Impairs Reproduction and Progeny Fitness in the Sea Urchin Paracentrotus lividus. PLOS ONE 10:e0131815. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131815

Migliaccio O, Castellano I, Romano G, Palumbo A (2014) Stress response to cadmium and manganese in Paracentrotus lividus developing embryos is mediated by nitric oxide. Aquatic Toxicology 156:125–134. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.08.007

Mille G, Asia L, Guiliano M, et al (2007) Hydrocarbons in coastal sediments from the Mediterranean sea (Gulf of Fos area, France). Mar Pollut Bull 54:566–575. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.12.009

Miller S, Wooster D, Li J (2007) Resistance and resilience of macroinvertebrates to irrigation water withdrawals. Freshwater Biology 52:2494–2510. https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2007.01850.x

Monarca S, Feretti D, Collivignarelli C, et al (2000) The influence of different disinfectants on mutagenicity and toxicity of urban wastewater. Water Research - WATER RES 34:4261–4269. https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00192-5

Moore RM, Webb MJ, Tokarczyk R, Wever R (1996) Bromoperoxidase and iodoperoxidase enzymes and production of halogenated methanes in marine diatom cultures. https://doi.org/10.1029/96jc01248

Morgan TH (1894) Experimental studies on echinoderm eggs

Morroni L, Pinsino A, Pellegrini D, et al (2016) Development of a new integrative toxicity index based on an improvement of the sea urchin embryo toxicity test. Ecotoxicology and Environmental Safety 123:2–7. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.09.026

Mouly D, Joulin E, Rosin C, et al (2009) Les sous-produits de chloration dans l'eau destinée à la consommation humaine en France. 76

Munch DJ, Munch JW, Pawlecki AM (1995) EPA Method 552.2 - Determination of haloacetic acids and dalapon in drinking water by liquid-liquid extraction, derivatization and gas chromatography with electron capture detection, Revision 1

Muse JO, Stripeikis JD, Fernández FM, et al (1999) Seaweeds in the assessment of heavy metal pollution in the Gulf San Jorge, Argentina. Environmental Pollution 104:315–322. https://doi.org/10.1016/S0269-7491(98)00096-7

Nagarajan A, Nathan S, Sridharan M (2018) Heavy metal assessment in surface sediments off Coromandel Coast of India: Implication on marine pollution. Marine Pollution Bulletin 131:712–726. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.04.074

Nahon S, Charles F, Pruski AM (2008) Improved Comet assay for the assessment of UV genotoxicity in Mediterranean sea urchin eggs. Environmental and Molecular Mutagenesis 49:351–359. https://doi.org/10.1002/em.20391

Neidleman SL, Geigert J (1986) Biohalogenation — Principles, Basic Roles and Application. Ellis Horwood Series in Organic Chemistry

Newsome L, Pacey N, Beadle I, Heaton A (2011) Chemical discharges from nuclear power stations: historical releases and implications for Best Available Technology

Ng TY-T, Rainbow PS, Amiard-Triquet C, et al (2008) Decoupling of cadmium biokinetics and metallothionein turnover in a marine polychaete after metal exposure. Aquatic Toxicology 89:47–54. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.06.001

Nomiyama K, Eguchi A, Mizukawa H, et al (2011) Anthropogenic and naturally occurring polybrominated phenolic compounds in the blood of cetaceans stranded along Japanese coastal waters. Environmental Pollution 159:3364–3373. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.08.035

Norwegian Environment Agency (2012) SUBSTANCE EVALUATION CONCLUSION as required by REACH Article 48 and EVALUATION REPORT for 2,4,6-tribromophenol

Ochi M, Kataoka K, Ariki S, et al (1998) Antioxidative bromoindole derivatives from the mid-intestinal gland of the muricid gastropod Drupella fragum. J Nat Prod 61:1043–1045. https://doi.org/10.1021/np980097r

Ofiara D, Seneca J (2006) Biological effects and subsequent economic effects and losses from marine pollution and degradations in marine environments: Implications from the literature. Marine pollution bulletin 52:844–64. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.02.022

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem 95:351–358. https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3

Olive PL, Wlodek D, Banath JP (1991) DNA Double-Strand Breaks Measured in Individual Cells Subjected to Gel Electrophoresis. Cancer Research 7

OMI (2018) Ballast Water Management. International maritime organization:

OMI (2019) BWM Convention and Guidelines. International maritime organization

OMS (2005) 2,4,6 tribromphenol and other simple brominated phenols

Ostapczuk P, Burow M, May K, et al (1997) Mussels and algae as bioindicators for long-term tendencies of element pollution in marine ecosystems. Chemosphere 34:2049–2058. https://doi.org/10.1016/S0045-6535(97)00067-2

Ovenden null, Capon null (1999) Echinosulfonic acids A-C and echinosulfone A: novel bromoindole sulfonic acids and a sulfone from a southern australian marine sponge, echinodictyum. J Nat Prod 62:1246–1249. https://doi.org/10.1021/np9901027

Padhi R, Subramanian S, Mohanty A, et al (2012) Trihalomethanes in the Cooling Discharge of a Power Plant on Chlorination of Intake Seawater. Environmental Engineering Research 17:57–62. https://doi.org/10.4491/eer.2012.17.S1.S57

Pagano G, de Biase A, Deeva IB, et al (2001) The role of oxidative stress in developmental and reproductive toxicity of tamoxifen. Life Sci 68:1735–1749. https://doi.org/10.1016/s0024-3205(01)00969-9

Pagano G, Guida M, Trifuoggi M, et al (2017) Sea Urchin Bioassays in Toxicity Testing: I. Inorganics, Organics, Complex Mixtures and Natural Products. Expert Opinion on Environmental Biology 06: https://doi.org/10.4172/2325-9655.1000142

Palmer CJ, Reason CJ (2009) Relationships of surface bromoform concentrations with mixed layer depth and salinity in the tropical oceans. Global Biogeochemical Cycles 23:. https://doi.org/10.1029/2008GB003338

Paul C, Pohnert G (2011) Production and role of volatile halogenated compounds from marine algae. Nat Prod Rep 28:186–195. https://doi.org/10.1039/C0NP00043D

Pearse JS (2006) Ecological Role of Purple Sea Urchins. Science 314:940–941. https://doi.org/10.1126/science.1131888

Pedersen M, Collen J, Abrahamsson K, Ekdahl A (1996) Production of halocarbons from seaweeds: An oxidative stress reaction? SCIENTIA MARINA 60:257–263

Pedler BE, Aluwihare LI, Azam F (2014) Single bacterial strain capable of significant contribution to carbon cycling in the surface ocean. Proceedings of the National Academy of Sciences 111:7202–7207. https://doi.org/10.1073/pnas.1401887111

Pereira S, Bourrachot S, Cavalie I, et al (2011) Genotoxicity of acute and chronic gamma-irradiation on zebrafish cells and consequences for embryo development. Environmental Toxicology and Chemistry 30:2831–2837. https://doi.org/10.1002/etc.695

Perrichon P (2014) Développement de tests embryonnaires prédictifs d'effets toxiques précoces et tardifs pour des molécules hydrophobes

Pespeni MH, Garfield DA, Manier MK, Palumbi SR (2012) Genome-wide polymorphisms show unexpected targets of natural selection. Proc Biol Sci 279:1412–1420. https://doi.org/10.1098/rspb.2011.1823

Picard DJ, Schulte PM (2004) Variation in gene expression in response to stress in two populations of Fundulus heteroclitus. Comp Biochem Physiol, Part A Mol Integr Physiol 137:205–216

Pinsino A, Torre CD, Sammarini V, et al (2008) Sea urchin coelomocytes as a novel cellular biosensor of environmental stress: a field study in the Tremiti Island Marine Protected Area, Southern Adriatic Sea, Italy. Cell Biol Toxicol 24:541–552. https://doi.org/10.1007/s10565-008-9055-0

Pizarro C, Sáenz-González C, Perez-del-Notario N, González-Sáiz JM (2010) Optimisation of a dispersive liquid–liquid microextraction method for the simultaneous determination of halophenols and haloanisoles in wines. Journal of Chromatography A 1217:7630–7637. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.10.032

Plewa MJ, Kargalioglu Y, Vankerk D, et al (2000) Development of quantitative comparative cytotoxicity and genotoxicity assays for environmental hazardous chemicals. Water Sci Technol 42:109–116. https://doi.org/10.2166/wst.2000.0558

Plewa MJ, Kargalioglu Y, Vankerk D, et al (2002) Mammalian cell cytotoxicity and genotoxicity analysis of drinking water disinfection by-products. Environmental and Molecular Mutagenesis 40:134–142. https://doi.org/10.1002/em.10092

Plewa MJ, Muellner MG, Richardson SD, et al (2008) Occurrence, Synthesis, and Mammalian Cell Cytotoxicity and Genotoxicity of Haloacetamides: An Emerging Class of Nitrogenous Drinking Water Disinfection Byproducts. Environmental Science & Technology 42:955–961. https://doi.org/10.1021/es071754h

Plewa MJ, Simmons JE, Richardson SD, Wagner ED (2010) Mammalian cell cytotoxicity and genotoxicity of the haloacetic acids, a major class of drinking water disinfection by-products. Environ Mol Mutagen 51:871–878. https://doi.org/10.1002/em.20585

Plewa MJ, Wagner ED, Jazwierska P, et al (2004) Halonitromethane Drinking Water Disinfection Byproducts: Chemical Characterization and Mammalian Cell Cytotoxicity and Genotoxicity. Environmental Science & Technology 38:62–68. https://doi.org/10.1021/es030477l

Powers SK, Jackson MJ (2008) Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. Physiol Rev 88:1243–1276. https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2007

Pratlong M, Haguenauer A, Brener K, et al (2018) Separate the wheat from the chaff: genomic scan for local adaptation in the red coral Corallium rubrum. bioRxiv 306456. https://doi.org/10.1101/306456

Prior RL, Cao G (1999) In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. Free Radic Biol Med 27:1173–1181. https://doi.org/10.1016/s0891-5849(99)00203-8

Pujo-Pay M, Conan P, Joux F, et al (2006) Impact of phytoplankton and bacterial production on nutrient and DOM uptake in the Rhône River plume (NW Mediterranean). Marine Ecology Progress Series 315:43–54. https://doi.org/10.3354/meps315043

Quack B, Atlas E, Petrick G, et al (2004) Oceanic bromoform sources for the tropical atmosphere. Geophysical Research Letters 31:. https://doi.org/10.1029/2004GL020597

Quack B, Wallace DWR (2003) Air-sea flux of bromoform: Controls, rates, and implications. Global Biogeochemical Cycles 17:. https://doi.org/10.1029/2002GB001890

Rainbow PS (1995) Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. Marine Pollution Bulletin 31:183–192. https://doi.org/10.1016/0025-326X(95)00116-5

Rajagopal S, Jenner HA, Venugopalan VP (eds) (2012) Operational and Environmental Consequences of Large Industrial Cooling Water Systems. Springer US

Raven JA, Geider RJ (1988) Temperature and algal growth. New Phytologist 110:441–461. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1988.tb00282.x

Reichelt JL, Borowitzka MA (1984) Antimicrobial activity from marine algae: Results of a large-scale screening programme. Eleventh International Seaweed Symposium 158–168

Reineke N, Biselli S, Franke S, et al (2006) Brominated Indoles and Phenols in Marine Sediment and Water Extracts from the North and Baltic Seas–Concentrations and Effects. Arch Environ Contam Toxicol 51:186–196. https://doi.org/10.1007/s00244-005-0135-3

Richardson S, Plewa M, Wagner E, et al (2007) Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: A review and roadmap for research. Mutation Research/Reviews in Mutation Research 636:178–242. https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2007.09.001

Richardson SD, DeMarini DM, Kogevinas M, et al (2010) What's in the Pool? A Comprehensive Identification of Disinfection By-products and Assessment of Mutagenicity of Chlorinated and Brominated Swimming Pool Water. Environmental Health Perspectives 118:1523–1530. https://doi.org/10.1289/ehp.1001965

Richir J (2012) PhD J. Richir - Coastal pollution of the Mediterranean and extension of its biomonitoring to trace elements of emerging concern

Rios C, Santander I, Méndez-Armenta M, et al (2018) Metallothionein-I. In: Oxidative Medicine and Cellular Longevity. https://www.hindawi.com/journals/omcl/2018/3265918/. Accessed 27 Sep 2019

Ríos JC, Repetto G, Jos A, et al (2003) Tribromophenol induces the differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells in vitro. Toxicology in Vitro 17:635–641. https://doi.org/10.1016/S0887-2333(03)00110-3

Rocha AC, Camacho C, Eljarrat E, et al (2018) Bioaccumulation of persistent and emerging pollutants in wild sea urchin Paracentrotus lividus. Environmental Research 161:354–363. https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.11.029

Romano G, Costantini M, Buttino I, et al (2011) Nitric Oxide Mediates the Stress Response Induced by Diatom Aldehydes in the Sea Urchin Paracentrotus lividus. PLoS ONE 6:e25980. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025980

Rook JJ, Rook JJ, Rook J, et al (1974) Formation of haloforms during chlorination of naturals waters

Ross PM, Parker L, Byrne M (2016) Transgenerational responses of molluscs and echinoderms to changing ocean conditions. ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil 73:537–549. https://doi.org/10.1093/icesjms/fsv254

Ruttkay-Nedecky B, Nejdl L, Gumulec J, et al (2013) The role of metallothionein in oxidative stress. Int J Mol Sci 14:6044–6066. https://doi.org/10.3390/ijms14036044

Sapone A, Gustavino B, Monfrinotti M, et al (2007) Perturbation of cytochrome P450, generation of oxidative stress and induction of DNA damage in Cyprinus carpio exposed in situ to potable surface water. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 626:143–154. https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.09.010

Sarmiento JL, Slater R, Barber R, et al (2004) Response of ocean ecosystems to climate warming. Global Biogeochemical Cycles 18:. https://doi.org/10.1029/2003GB002134

Savriama Y, Stige LC, Gerber S, et al (2015) Impact of sewage pollution on two species of sea urchins in the Mediterranean Sea (Cortiou, France): Radial asymmetry as a bioindicator of stress. Ecological Indicators 54:39–47. https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.02.004

Scott JG (1996) Inhibitors of CYP6D1 in house fly microsomes. Insect Biochemistry and Molecular Biology 26:645–649. https://doi.org/10.1016/S0965-1748(96)00008-2

Siddig AAH, Ellison AM, Ochs A, et al (2016) How do ecologists select and use indicator species to monitor ecological change? Insights from 14 years of publication in Ecological Indicators. Ecological Indicators 60:223–230. https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.06.036

Sieracki ME, Poulton NJ, Jaillon O, et al (2019) Single cell genomics yields a wide diversity of small planktonic protists across major ocean ecosystems. Sci Rep 9:1–11. https://doi.org/10.1038/s41598-019-42487-1

Silva GS da, Fé LML, Silva M de NP da, Val VMF de AE (2017) Ras oncogene and Hypoxia-inducible factor-1 alpha (hif-1α) expression in the Amazon fish Colossoma macropomum (Cuvier, 1818) exposed to benzo[a]pyrene. Genet Mol Biol 40:491–501. https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0066

Sim W-J, Lee S-H, Lee I, et al (2009) Distribution and formation of chlorophenols and phenolic BFRs in marine and river environments. Chemosphere 77:552–558. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.07.006

Siron R, Giusti G (1990) Hydrocarbon pollution in particle-rich waters (Gulf of Fos-sur-mer): comparative study of extraction procedures. Marine Chemistry 30:379–388. https://doi.org/10.1016/0304-4203(90)90082-N

Smalling K, Deshpande A, Blazer V, et al (2016) Young of the year bluefish (Pomatomus saltatrix) as a bioindicator of estuarine health: Establishing a new baseline for persistent organic pollutants after Hurricane Sandy for selected estuaries in New Jersey and New York. Marine Pollution Bulletin 107:. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.03.019

Somero GN (2010) The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine 'winners' and 'losers.' Journal of Experimental Biology 213:912–920. https://doi.org/10.1242/jeb.037473

Somero GN (2002) Thermal physiology and vertical zonation of intertidal animals: optima, limits, and costs of living. Integr Comp Biol 42:780–789. https://doi.org/10.1093/icb/42.4.780

Stemmler I, Hense I, Quack B (2015) Marine sources of bromoform in the global open ocean – global patterns and emissions. Biogeosciences 12:1967–1981. https://doi.org/10.5194/bg-12-1967-2015

Steurer C, Eder N, Kerschbaum S, et al (2018) HSF1 mediated stress response of heavy metals. PLOS ONE 13:e0209077. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209077

Stevens JL, Snyder MJ, Koener JF, Feyereisen R (2000) Inducible P450s of the CYP9 family from larval Manduca sexta midgut. Insect Biochem Mol Biol 30:559–568

Stumpp M, Dupont S, Thorndyke MC, Melzner F (2011) CO2 induced seawater acidification impacts sea urchin larval development II: Gene expression patterns in pluteus larvae. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology 160:320–330. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.06.023

Taban IC, Bechmann RK, Torgrimsen S, et al (2004) Detection of DNA damage in mussels and sea urchins exposed to crude oil using comet assay. Marine Environmental Research 58:701–705. https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2004.03.018

Takayama S, Dhahbi J, Roberts A, et al (2014) Genome methylation in D. melanogaster is found at specific short motifs and is independent of DNMT2 activity. Genome Res 24:821–830. https://doi.org/10.1101/gr.162412.113

Taylor CJL (2006) The effects of biological fouling control at coastal and estuarine power stations. Marine Pollution Bulletin 53:30–48. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.01.004

Teixidó E, Piqué E, Gonzalez-Linares J, et al (2015) Developmental effects and genotoxicity of 10 water disinfection by-products in zebrafish. J Water Health 13:54–66. https://doi.org/10.2166/wh.2014.006

Tice RR, Agurell E, Anderson D, et al (2000a) Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. 16

Tice RR, Agurell E, Anderson D, et al (2000b) Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. Environmental and Molecular Mutagenesis 35:206–221. https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J

Tomanek null, Somero null (1999) Evolutionary and acclimation-induced variation in the heat-shock responses of congeneric marine snails (genus Tegula) from different thermal habitats: implications for limits of thermotolerance and biogeography. J Exp Biol 202:2925–2936

Tomasi A, Albano E, Biasi F, et al (1985) Activation of chloroform and related trihalomethanes to free radical intermediates in isolated hepatocytes and in the rat in vivo as detected by the ESR-spin trapping technique. Chemico-Biological Interactions 55:303–316. https://doi.org/10.1016/S0009-2797(85)80137-X

Tominaga MY, Mídio AF (2003) Comparison of two validated gas-chromatographic methods for the determination of trihalomethanes in drinking water. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas 39:195–202. https://doi.org/10.1590/S1516-93322003000200010

Ulses C, Grenz C, Marsaleix P, et al (2005) Circulation in a semi-enclosed bay under influence of strong freshwater input. Journal of Marine Systems 56:113–132. https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2005.02.001

Urban-Malinga B, Wodzinowski T, Witalis B, et al (2018) Marine litter on the seafloor of the southern Baltic. Marine Pollution Bulletin 127:612–617. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.12.052

Urbansky ET, Freeman DM, Javier Rubio F (2000) Ascorbic acid reduction of residual active chlorine in potable water prior to halocarboxylate determination. J Environ Monitor 2:253–256. https://doi.org/10.1039/b001046o

Urso ML, Clarkson PM (2003) Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. Toxicology 189:41–54. https://doi.org/10.1016/s0300-483x(03)00151-3

Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullos M (2006) Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. Ecotoxicol Environ Saf 64:178–189. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.03.013

Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environ Toxicol Pharmacol 13:57–149

Vasseur P, Cossu-Leguille C (2003) Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. Environment International 28:711–717. https://doi.org/10.1016/S0160-4120(02)00116-2

Villanueva CM, Cantor KP, Cordier S, et al (2004) Disinfection Byproducts and Bladder Cancer: A Pooled Analysis. Epidemiology 15:357–367

Villanueva CM, Cantor KP, Grimalt JO, et al (2006) Bladder Cancer and Exposure to Water Disinfection By-Products through Ingestion, Bathing, Showering, and Swimming in Pools. American Journal of Epidemiology 165:148–156. https://doi.org/10.1093/aje/kwj364

Villemereuil PD (2016) Méthodes pour l'étude de l'adaptation locale et application au contexte de l'adaptation aux conditions d'altitude chez la plante alpine Arabis alpina. 203

Viñas L, Pérez-Fernández B, Soriano JA, et al (2018) Limpet (Patella sp) as a biomonitor for organic pollutants. A proxy for mussel? Marine Pollution Bulletin 133:271–280. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.05.046

Von Gunten U, Bruchet A, Costentin E (1996) Bromate formation in advanced oxidation processes. Journal - American Water Works Association 88:53–65. https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.1996.tb06571.x

Wagner ED, Plewa MJ (2017) CHO cell cytotoxicity and genotoxicity analyses of disinfection by-products: An updated review. Journal of Environmental Sciences 58:64–76. https://doi.org/10.1016/j.jes.2017.04.021

Walther G-R, Post E, Convey P, et al (2002) Ecological Responses to Recent Climate Change. Nature 416:389–95. https://doi.org/10.1038/416389a

Warwick NJ, Pyle JA, Carver GD, et al (2006) Global modeling of biogenic bromocarbons. Journal of Geophysical Research: Atmospheres 111:. https://doi.org/10.1029/2006JD007264

Whitehead A, Galvez F, Zhang S, et al (2011) Functional Genomics of Physiological Plasticity and Local Adaptation in Killifish. Journal of Heredity 102:499–511. https://doi.org/10.1093/jhered/esq077

Whitfield FB, Helidoniotis F, Shaw KJ, Svoronos D (1999) Distribution of Bromophenols in Species of Marine Algae from Eastern Australia. J Agric Food Chem 47:2367–2373. https://doi.org/10.1021/jf981080h

Whitfield FB, Helidoniotis F, Shaw KJ, Svoronos D (1998) Distribution of Bromophenols in Species of Ocean Fish from Eastern Australia. J Agric Food Chem 46:3750–3757. https://doi.org/10.1021/jf980274u

WHO (1996) Chlorophenols in drinking water. Guidelines for Drinking-water Quality

Wong JM, Gaitán-Espitia JD, Hofmann GE (2019) Transcriptional profiles of early stage red sea urchins (Mesocentrotus franciscanus) reveal differential regulation of gene expression across development. Marine Genomics S1874778719301059. https://doi.org/10.1016/j.margen.2019.05.007

Wu X, Jia Y, Zhu H (2012) Bioaccumulation of cadmium bound to ferric hydroxide and particulate organic matter by the bivalve M. meretrix. Environmental Pollution 165:133–139. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.02.023

Würgler FE, Kramers PG (1992) Environmental effects of genotoxins (eco-genotoxicology). Mutagenesis 7:321–327. https://doi.org/10.1093/mutage/7.5.321

Xiang J, Wan C, Guo R, Guo D (2016) Is Hydrogen Peroxide a Suitable Apoptosis Inducer for All Cell Types? BioMed Research International 2016:1–6. https://doi.org/10.1155/2016/7343965

Xu X, Song F, Fan X, et al (2009) A novel bromophenol from marine red alga Symphyocladia latiuscula. Chemistry of Natural Compounds - CHEM NAT COMPD 45:811–813. https://doi.org/10.1007/s10600-010-9501-0

Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1994) A novel cis-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. The Plant Cell 6:251–264. https://doi.org/10.1105/tpc.6.2.251

Yamamuro M, Kayanne H, Yamano H (2003) δ15N of seagrass leaves for monitoring anthropogenic nutrient increases in coral reef ecosystems. Marine pollution bulletin 46:452–8. https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00463-0

Yang JS (2001) Bromoform in the effluents of a nuclear power plant: a potential tracer of coastal water masses. 7

Yang M, Zhang X (2013) Comparative Developmental Toxicity of New Aromatic Halogenated DBPs in a Chlorinated Saline Sewage Effluent to the Marine Polychaete *Platynereis dumerilii*. Environmental Science & Technology 47:10868–10876. https://doi.org/10.1021/es401841t

Yentsch CM, Horan PK, Muirhead K, et al (1983) Flow cytometry and cell sorting: A technique for analysis and sorting of aquatic particles1. Limnology and Oceanography 28:1275–1280. https://doi.org/10.4319/lo.1983.28.6.1275

Yıldız M, Ciğerci İH, Konuk M, et al (2009) Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in Allium cepa root cells by chromosome aberration and comet assays. Chemosphere 75:934–938. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.01.023

Yokouchi Y, Hasebe F, Fujiwara M, et al (2005) Correlations and emission ratios among bromoform, dibromochloromethane, and dibromomethane in the atmosphere. Journal of Geophysical Research-Atmospheres 110:. https://doi.org/10.1029/2005jd006303

Yoshioka Y, Ose Y, Sato T (1985) Testing for the toxicity of chemicals with Tetrahymena pyriformis. Science of The Total Environment 43:149–157. https://doi.org/10.1016/0048-9697(85)90037-3

Yousef MK (1985) Stress physiology in livestock. Volume I. Basic principles. Stress physiology in livestock Volume I Basic principles

Yuan J, Liu H, Zhou L-H, et al (2006) Oxidative stress and DNA damage induced by a drinking-water chlorination disinfection byproduct 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX) in mice. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 609:129–136. https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.05.011

Zinser E, Johnson Z, Coe A, et al (2007) Influence of Light and Temperature on Prochlorococcus Ecotype Distributions in the Atlantic Ocean. Limnology and Oceanography 52:2205–2220. https://doi.org/10.2307/4502370

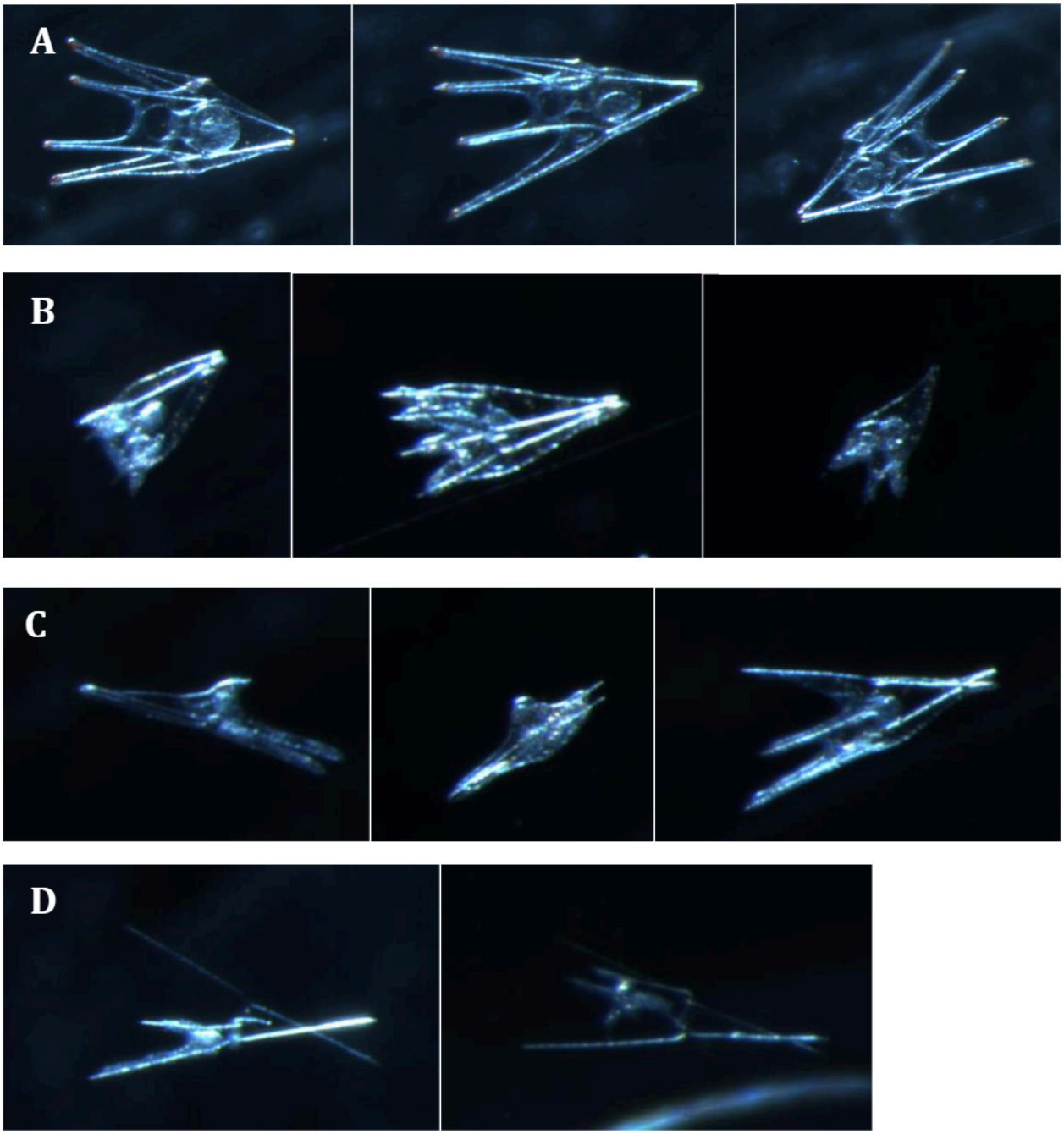
ANNEXES

Annexe 1 : Photos de larves d'oursin Paracentrotus lividus_____ I

Annexe 2 : Publication, campagne 1_____II

Annexe 3 : Publication, écotoxicologie _____ X

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



Photos de larves *Pluteus*

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

Annexe 2 : Publication, campagne 1

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

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Hygiene and Environmental Health

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

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

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

[a] Aix Marseille Univ, CNRS, LCE UMR7376, 13331, Marseille, France
[b] Institut Ecocitoyen Pour la Connaissance des Pollutions, Centre de vie la Fossette RD 268, 13270, Fos-sur-Mer, France

ARTICLE INFO

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

ABSTRACT

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

1. Introduction

The use of seawater in industrial cooling or heating is a common practice in many parts of the world. One of the primary operational problems of using seawater in such processes is biofouling, which results from the growth of microorganisms (biofilms) and macro-organisms (e.g., clams) on the surface or inside industrial equipment. Biofilms tend to stick to heat-exchange surfaces, thereby significantly reducing heat-transfer coefficients, while excessive development of macro-organisms can plug heat exchangers. There are several techniques for preventing both types of biofouling. Chlorination of seawater is among the most commonly used antibiofouling treatments (Khalanski and Jenner, 2012). Chlorine is added into seawater either in the gaseous form or in the aqueous form of sodium hypochlorite solution, typically at doses of 0.5–1.5 mg/L (expressed as Cl_2) (Allonier et al., 1999a,b; Ma et al., 2011; Khalanski and Jenner, 2012). In seawater, chlorine reacts with organic and inorganic compounds leading to the formation of chlorination byproducts (CBPs) (or disinfection byproducts, DBPs) (Heeb et al., 2014). Several factors including initial chlorine dose, temperature, pH, constitution of seawater and presence of contaminants (natural or anthropogenic) can influence these reactions, leading to differences in the nature and levels of the formed CBPs (Allonier et al., 1999b; Heeb et al., 2014).

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

* Corresponding author. Aix Marseille Université, 3 Place Victor Hugo, Case 29, 13331, Marseille, France.
E-mail addresses: tarek.manasfi@univ-amu.fr (T. Manasfi), karine.lebaron@univ-amu.fr (K. Lebaron), maxime.verlande@univ-amu.fr (M. Verlande), julien.dron@institut-ecocitoyen.fr (J. Dron), carine.demelas@univ-amu.fr (C. Demelas), laurent.vassalo@univ-amu.fr (L. Vassalo), gautier.revenko@institut-ecocitoyen.fr (G. Revenko), etienne.quivet@univ-amu.fr (E. Quivet), jean-luc.boudenne@univ-amu.fr (J.-L. Boudenne).

https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2018.06.008
Received 29 January 2018; Received in revised form 1 June 2018; Accepted 28 June 2018
1438-4639/ © 2018 Elsevier GmbH. All rights reserved.

as corrosives on marine fauna and flora, the generated mixtures of CBPs present far more complex toxicological challenges, to both natural biota and human health (Werschkun et al., 2014). Although data on the ecotoxicity of CBPs are very limited, existing data show that persistent CBPs may induce adverse effects on marine organisms, when present above certain concentrations (Taylor, 2006; Deng et al., 2010; Pignata et al., 2012; Khalanski and Jenner, 2012). CBPs have been found to induce developmental toxicity to marine Polychaete *Platynereis dumerilii* (Yang and Zhang, 2013) and oysters *Crassostrea virginica* (Stewart et al., 1979). Data about the toxicity (with endpoints relevant to human health) of CBPs in chlorinated drinking water and swimming pool waters are much more extensive than ecotoxicity data (endpoints relevant for environmental health). Extensive studies have shown that CBPs can induce a range of adverse effects including mutagenicity, genotoxicity, and carcinogenicity (Richardson et al., 2007; Manasfi et al., 2017b). Concerns about potential human exposure to CBPs in the context of seawater chlorination are not only related to the exposure of workers in the vicinity of industrial seawater chlorination sites (Banerji et al., 2012), but also to the general population as certain persistent CBPs may potentially bioaccumulate in exposed marine organisms which are consumed as food products (e.g., fish and mussels) (Khalanski and Jenner, 2012; Boudjellaba et al., 2016). The bioaccumulation potential of an organic compound depends on its ability to accumulate in fats of marine organisms. Hence, CBPs having a high octanol/water partition coefficient (Log K_{ow}) such as 2,4,6-tribromophenol (Log K_{ow} = 3.92–4.02) are susceptible to bioaccumulation and have been previously detected in marine organisms (Khalanski and Jenner, 2012; Boudjellaba et al., 2016).

The identification of dominant CBPs discharged into the receiving marine waters and their concentrations is key for performing environmental and human health risk assessment. To date, there have been few studies documenting CBPs concentrations in chlorinated industrial effluents and receiving marine waters. Most of the previous studies focused on measuring a limited number of CBPs in cooling effluents of nuclear and thermal power plants and in a few discharge points in the open coast (Jenner et al., 1997; Allonier et al., 1999a,b; Khalanski and Jenner, 2012). Data about the dissemination of CBP contamination of seawater and marine sediments exposed to multiple industrial chlorinated effluents remain very scarce. Boudjellaba et al. (2016) previously explored the occurrence of CBPs in seawater and fish in the Gulf of Fos in Southeastern France, based on sampling campaigns in winter and summer 2014. The Gulf of Fos is a semi-enclosed bay that favors water confinement in some of its back-ends and receives the plumes of the second greatest Mediterranean river, namely the Rhône river, among other freshwater inputs (Ulses et al., 2005). This gulf hosts the largest port of trade in France (Marseille-Fos Port) and a major industrial zone that includes steel, petrochemical, waste incineration, and cement industries, along with gas and electricity power plants. Despite these industrial activities, amateur and professional fishing are practiced in the bay, and recreational swimming areas are also available at some coastal areas around the bay. In the study of Boudjellaba et al. (2016), CBP classes which have been previously detected in cooling water effluents were analyzed. The present study aims at conducting a more comprehensive survey about the contamination of the Gulf of Fos, by analyzing a broader array of CBPs and by sampling a more extended geographical zone to further evaluate the CBP contamination of seawater throughout the Gulf. Additionally, marine sediments were sampled to evaluate their contamination by CBPs, for the first time to our knowledge. Here, the sampling campaign was carried out during the spring season, unlike the previous survey of Boudjellaba et al. (2016). Measuring CBP concentrations in seawater during different seasons contributes to documenting their levels under different meteorological conditions (especially temperature) and potentially different chlorination practices performed by the industries in different meteorological conditions. For example, when water temperature is low some industries decrease chlorination as the risk of biofouling decreases at lower temperatures.

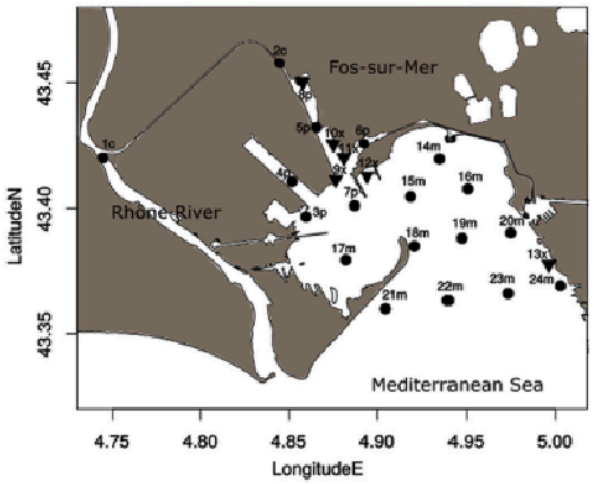


Fig. 1. Overview of the Gulf of Fos and the different sampling stations (from 1c to 24m). Triangles represent industrial effluent discharge points.

Documenting sufficient data about the contamination of seawater by CBPs based on multiple surveys performed during different periods of the year would contribute to a better monitoring of the contamination and to defining trends, which are of high utility for risk assessment studies.

To this end, the present study investigated the contamination of seawater and sediments by CBPs in the Gulf of Fos. Several classes of halogenated CBPs including trihalomethanes (THMs), haloacetic acids (HAAs), haloacetonitriles (HANs), trihaloacetaldehydes (THA), and halophenols (HPs) were analyzed in seawater and marine sediments obtained from the vicinity of the industrial effluents and at other sites throughout the bay. Global physicochemical parameters such as temperature, pH, salinity, bromide concentration, total organic carbon (TOC), total nitrogen (TN), total oxidant residual, and free oxidant residual were also determined.

2. Materials and methods

2.1. Study site

The study investigated the Gulf of Fos (Fig. 1), which hosts numerous industrial sites. The Gulf is located in Southeastern France on the Mediterranean at about 50 km from the city of Marseille. Average water depth in the Gulf is about 20 m. The Gulf receives several freshwater inputs including a main input from the Rhône River, and minor inputs from the Berre Lagoon, irrigation and navigation canals. The region is characterized by frequent and strong north or northwest winds (around 40% per year) and southeast winds (10–20% per year). The north or northwest wind is most common in winter and spring, although it occurs in all seasons (MeteoFrance). A wind rose showing wind distributions based on normalized data from 2002 to 2011 is presented in SI (Fig. S2). Various heavy industrial activities are established around the Gulf including two large liquefied natural gas (LNG) terminals (Fos-Cavaou and Fos-Tonkin designated by sampling stations 12x and 8p, respectively). These two LNG terminals discharge chlorinated waters at a flow of 30,000 m^3/h and 15,000 m^3/h following electrochlorination or addition of sodium hypochlorite, respectively. In addition, there are other power plants which are irregularly active (designated by sampling stations 9x and 11x) which discharge chlorinated water (by electrochlorination). Metal industry (sampling station 10x) and oil refineries (sampling station 13x) also discharge chlorinated seawater at flows exceeding 10,000 m^3/h. The outlets of the different

industrial sites in the Gulf of Fos are shown in Fig. 1 (sampling station names end with x and are represented in triangles). Maps of the study site were produced using R (R Core Team, 2015) and Inkscape (2015) software.

2.2. Sample collection

The sampling campaign was performed during spring (24, 25, and 26 April 2017). The different sampling stations were disseminated throughout the Gulf of Fos and included the main industrial outlets (Fig. 1). Water samples were collected at all the 24 sampling stations at the surface (depth between 0 and 50 cm) and at 7 m depth (or the bottom at the stations where the bottom is at depth < 7 m) using a 5-L Niskin bottle (General Oceanics, USA). For the analysis of CBPs, sample aliquots (1 L) were placed in amber glass bottles, ascorbic acid was rapidly added, and bottles were sealed with PTFE-lined screw caps. These CBP samples were filled without headspace to avoid any loss due to volatilization. For the analysis of global physicochemical parameters including bromide ion concentration, TOC, TN, and determination of free and total chlorine, sample aliquots (1 L) were placed in amber glass bottles with PTFE-lined screw caps to which no ascorbic acid was added. Samples were stored at 4 °C away from sunlight and extracted within 24 h from collection. Physicochemical parameters including pH, temperature, and salinity were determined on-site using a CTD-type multi-parameter probe (MS5, OTT Hydrolab, Germany). For quality control, field blanks, laboratory blanks, and laboratory-fortified blanks were sampled. Procedural standard calibration was performed using spiked seawater calibration standards, which were treated exactly in the same manner as samples. Internal standards were added to samples and used as surrogates to monitor the reliability of complete analytical procedures. A set of at least seven laboratory spiked standard solutions were analyzed to calculate the mean recovery (R) and the relative standard deviation (RSD) (Table S1). The detection limits (DL) and the quantification limits (QL) for the analyzed chemicals and parameters and their estimation procedures are presented in supplementary information (Table S1).

Sediments were collected using an Ekman grab sampler at 10 sampling stations (8p, 11x, 12x, 13x, 14m, 15m, 17m, 19m, 22m, 24m) at depths indicated in supplementary information (Table S4). The collected sediments were stored at 4 °C away from sunlight.

2.3. Chemical standards

Analytical standards including THM calibration mix, halogenated volatile mix (containing HANs), and HAA esters calibration mix, 2,3-dibromopropionic acid solution, and the THA chloral hydrate were purchased from Supelco (USA). The brominated THA tribromoacetaldehyde (97%) was purchased from Aldrich (United Kingdom) and was used to generate its hydrated form bromal hydrate (BH) in ultrapure water (Millipore, resistivity > 18 MΩcm). HPs 2-bromo-4-chlorophenol (98%) and 2,6-dibromophenol (99%) were purchased from Alfa Aesar (Germany), and 2,4-dibromophenol (95%) and 2,4,6-tribromophenol (99%) were purchased from Sigma-Aldrich (USA). A standard stock solution of each compound was prepared in methyl *tert*-butyl ether (MTBE, purity 99.8%) which was purchased from Merck (Germany). L-ascorbic acid, crystalline, reagent grade was purchased from Sigma (China). Sulfuric acid, analytical grade reagent, was purchased from Fisher Scientific (UK). For plotting the calibration curve, artificial seawater was spiked with the mother solutions at different concentrations and the resulting solutions were treated according to the methods described hereby for samples. Artificial seawater (ASW) was prepared according to ASTM D1141-98 (2013).

2.4. Seawater sample preparation

For the analysis of THMs, HANs, THAs sample aliquots (50 mL) were first adjusted to a pH value ranging between 4.5 and 5.5 by adding sulfuric acid according to U.S. EPA Method 551 .1 with slight modifications (Munch and Hautman, 1995). Internal standards were added as surrogates to monitor the efficiency of sample treatment, and Na_2SO_4 (16 g) was then added. 1,2,3-trichloropropane was added as surrogate for the analysis of THMs, HANs and BH. Samples were extracted by liquid-liquid extraction (LLE) by adding MTBE (5 mL) and shaking manually for 3 min. Then, the organic phase was collected for analysis. For the analysis of HAAs, U.S. EPA Method 552.3 was used with slight modifications (Domino et al., 2003). In brief, sample aliquots (40 mL) were acidified to a pH < 1 by adding concentrated sulfuric acid and extracted with MTBE (4 mL). 2,3-dibromopropionic acid was added to the extracts as a surrogate. After LLE, the organic phase containing the HAAs was collected and transferred into 15 mL vials to which acidified methanol was added and placed in a water bath at 50 °C for 2 h for derivation (methylation). The vials were then cooled, and 4 mL of saturated sodium bicarbonate solution were added before collecting the organic phase containing the HAA esters in chromatographic vials. For the analysis of HPs, derivation (acetylation) and extraction by LLE were conducted as described previously by Allonier et al. (1999a) with some modifications. In brief, 50 mL samples were mixed manually during 4 min with 10 g of sodium carbonate and 5 mL of acetic anhydride to derivatize the HPs. Samples were then extracted with 2.5 mL of MTBE containing the internal standard 2,4,6 trichlorophenol. The organic phases were then collected and dried with sodium sulfate before analysis.

2.5. Analytical methods

Free residual oxidants and total residual oxidants were measured by the colorimetric DPD method using a portable spectrophotometer (AQUALYTIC-AL 800, Germany). Bromide levels in water were measured by an ICS-3000 Dionex ion chromatography system using a 30 mM NaOH eluent with a flow rate of 1.5 mL/min at 30 °C. Total Organic Carbon (TOC) and Total Nitrogen (TN) were measured using high temperature catalytic oxidation technique (Multi N/C 2100, Analytik Jena, Germany). Pre-treated samples were injected (50 µl) into the furnace filled with a Pt preconditioned catalyst. Combustion was realized at 800 °C and combustion products were carried by high purity oxygen (Linde Gas) allowing detection of CO_2 by non-dispersive infrared (NDIR) and detection of NO by chemiluminescence (CLD).

Organic extracts containing CBPs were analyzed using a gas chromatograph coupled to a ^{63}Ni electron-capture detector (GC-ECD model Clarus 580, Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA). An Elite 5MS capillary column was used for the separation. Helium 5.0 was used as a carrier gas at 1 mL/min. Nitrogen was used as a make-up gas at 30 mL/min. For the analysis of THMs, HANs, HPs and BH the temperature program was as follows: initially 35 °C increasing to 145 °C at a rate of 10 °C/min, then at a rate of 20 °C/min up to 225 °C and finally at 10 °C/min to 260 °C, held for 2 min. For the analysis of HAAs, the temperature was initially set to 40 °C, then increased to 75 °C at a rate of 15 °C/min, then increased to 100 °C at 5 °C/min, and finally temperature reached 135 °C at 10 °C/min which and held 2 min. Analytes were qualified using procedural standard calibration. Calibrations were performed at concentrations starting from as low as 10 ng/L up to 20 µg/L, depending on the analytes (Table S1). At each concentration order, external calibrations were performed using a set of 7 standard solutions. The solutions were prepared by adding aliquots of the standard stock solution in artificial seawater, which was then treated exactly as a sample. Seawater and purified water reagent blanks were included with each sequence All analytical method validation parameters are presented in Table S1.

2.6. Sediment sample preparation

Sediments were brought to room temperature. Extraneous material was removed prior to homogenization. Sediment samples were

homogenized in pre-cleaned collection jars by stirring vigorously with stainless steel spatulas. Dry weights were determined by placing sample aliquots in an oven at 105 °C and weighed at intervals of 24 h until successive weight differences became less than 4%. For the analysis of HPs in sediments, the method was inspired from Lampi et al. (1992) with modifications. An aliquot (20 g) of wet sediments was weighed, and 50 mL of 1M NaOH solution and internal standard (50 µL) of 2,4,6-trichlorophenol solution (1 mg/L) were added. Then, 50 mL of hexane were added to the sample and the whole kept in an ultrasonic bath for 10 min. The hexane phase was then discarded, and the aqueous phase was collected and introduced into 65-mL glass vials with PTFE-lined screw caps which were centrifuged at 2000 rpm for 10 min. 40 mL of the resulting supernatant was then collected and was treated according to protocols used for the analysis of HPs in water samples described above.

3. Results and discussion

3.1. Physicochemical parameters

Water quality parameters can influence the formation and decay of CBPs (Cimetiere et al., 2010; Hansen et al., 2012; Zhang et al., 2013). At the different sampling stations, physicochemical parameters including water temperature, pH, salinity, bromide concentration, TOC, TN, free residual oxidant, and total residual oxidant were determined in surface and bottom (or 7 m deep) seawater (Table S2).

Very little pH variation was observed among the different sampling points located throughout the Gulf, with pH ranging between 8.13 and 8.25 (Table S2). Water temperatures at the sampling stations close to the shore were slightly higher than at offshore stations (Fig. 2), which is likely related to the discharge of heated seawater effluents by the industrial sites. Additionally, at sampling stations near the outlets (9x, 10x, 11x), water temperatures were slightly higher at the surface than at the bottom (up to 18.9 °C and 19.8 °C, respectively) (Table S2). At offshore stations away from industrial outlets, water temperatures were globally homogeneous at the bottom and surface (around 14.5 °C), which is compatible with the agitated conditions that favor the mixing and homogenization of water bodies.

With regard to salinity, very minor variations were observed among the sampling stations located away from the shore (Fig. 1S). In contrast, near the shore, a marked influence of the Rhone River freshwater

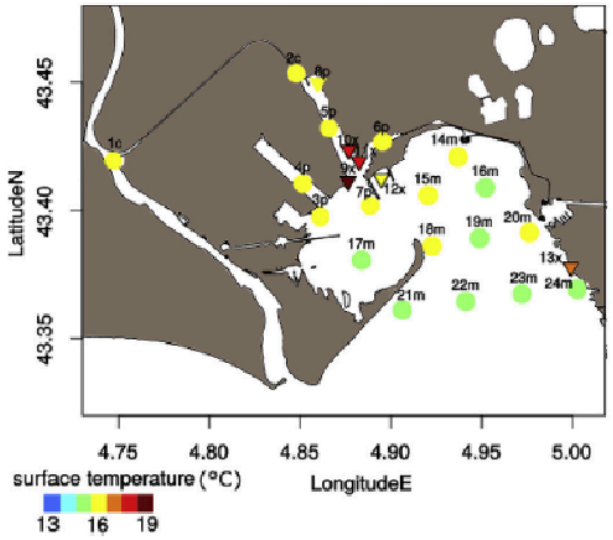


Fig. 2. Variation of surface water temperature (in °C) at the different sampling stations.

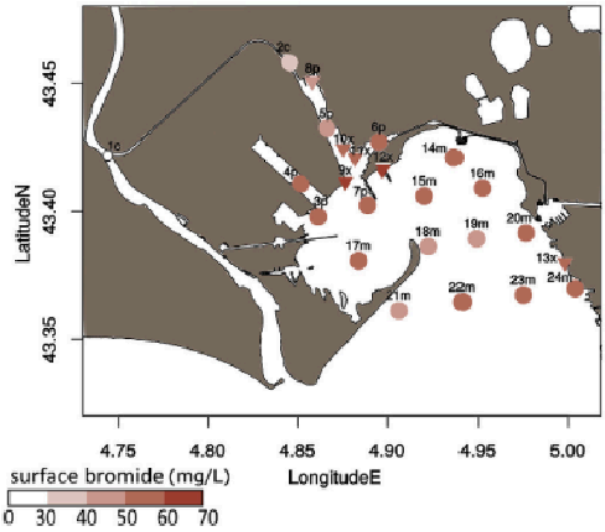


Fig. 3. Variation of surface bromide concentrations (in mg/L) at the different sampling stations. Triangles represent industrial effluent discharge points.

intrusion appeared at nearby stations 2c, 8p and 5p, which had lower salinities than the sampling stations located offshore. The sampling station 2c located on the canal receiving water of the Rhône River, had unusually high salinities (24.2 and 34.2 g/L on the surface and bottom, respectively). This salinity likely resulted from the vigorous mixing of the Rhône River freshwater with seawater entrained from the Gulf of Fos by the moderate to strong southeast winds registered on the day of sampling. During the sampling campaign, sustained southeast wind (35–40 km/h on average) with gusts were reported (MétéoFrance, Istres). Like salinity, bromide concentrations varied very little amongst most of the sampling stations (Fig. 3) and were generally high at the all of the sampling stations located in the Gulf (Table S2).

Total residual oxidant and free residual oxidant were not detected at any of the sampling stations. A number of factors could be at the origin of this finding including low initial chlorination level, high organic matter concentrations and temperatures (Brown et al., 2011). However, since the organic content in water (measured by TOC) and temperature were not unusually high (Table S2), the main factor is likely related to low chlorination practiced by the industries during the sampling period.

3.2. Occurrence of chlorination byproducts (CBPs) in seawater

The levels of the CBPs measured at all the sampling stations are presented in Table S3. Fig. 4 summarizes the sampling stations at which CBPs were measured (whether on the surface or in the bottom) at levels higher than QL. These CBPs were all brominated including bromoform, dibromoacetic acid (DBAA), dibromoacetonitrile (DBAN), tribromoacetic acid (TBAA), and BH. Low concentrations of bromochloroacetonitrile (BCAN) were also detected near some outlets (sampling stations 8p, 9x, and 10x) (Table S3). In previous studies of chlorinated cooling waters, CBPs including THMs, HAAs, HANs, and HPs have been detected (Khalanski and Jenner, 2012), but to our knowledge, this is the first study to report the occurrence of BH (hydrated form of tribromoacetaldehyde), in the context of industrial seawater chlorination. Nevertheless, BH has been previously detected in chlorinated seawater pools and in bromide-rich drinking waters (Krasner et al., 2006; Manasfi et al., 2017c).

The occurrence of predominantly brominated CBPs in chlorinated seawater is in agreement with previous studies that explored the formation of CBPs in chlorinated seawater (Jenner et al., 1997; Allonier et al., 1999b; Boudjellaba et al., 2016). This speciation can be explained

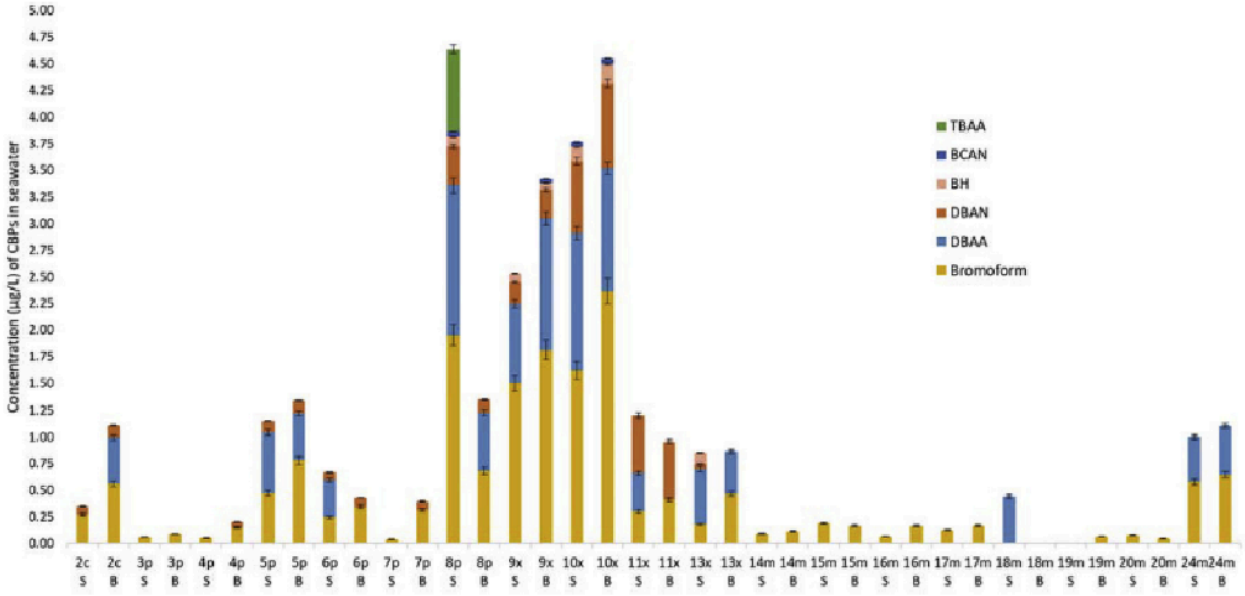


Fig. 4. Concentrations of CBPs at sampling station where CBPs > QL were detected. B represent Bottom samples and S represents Surface samples. TBAA: tribromoacetic acid; BCAN: bromochloroacetonitrile; BH: bromal hydrate; DBAN: dibromoacetonitrile; DBAA: dibromoacetic acid. Errors bars are based on RSD% of CBPs.

by the formation of bromine upon the addition of chlorine to seawater, which contains elevated bromide concentrations known to enhance the formation of brominated CBPs (Hua et al., 2006). In the presence of appreciable amounts of bromide ions, chlorine oxidizes bromide ions and forms hypobromous acid and hypobromite ions (Singer, 1999). As an oxidant, bromine is stronger than chlorine and reacts 10 times faster with organic matter (Westerhoff et al., 2004). The reactions leading to the formation of bromine in bromide-rich water such as seawater are as follows (Heeb et al., 2014):

$$HOCl + Br^- \rightarrow HOBr + Cl^- \; k_1 = (1.55\text{–}6.84).10^3\,M^{-1}s^{-1} \quad (1)$$

$$ClO^- + Br^- \rightarrow BrO^- + Cl^- \; k_2 = 9.10^{-4}\,M^{-1}s^{-1} \quad (2)$$

Although HOBr and OBr^- are the most abundant species involved in these reactions, several bromine species can react with organic compounds present in seawater (Heeb et al., 2014; Manasfi et al., 2017a,b). Bromine species such as Br_2, Br_2O, BrOCl, and BrCl are less abundant but more reactive than HOBr and OBr^- and have been shown to contribute to the bromination of some organic compounds (Sivey et al., 2013). Table 1 shows the equilibrium concentrations of bromine species when seawater containing 58 mg/L bromide, at pH 8.2, is chlorinated at 1 mg/L active chlorine. These concentrations were estimated using PHREEQC (Parkhurst and Appelo, 2013).

Table 1
Molar concentrations of bromine species at equilibrium in seawater (Bromide 58 mg/L; 20 g/L chloride, pH 8.2; chlorinated with 1 mg/L active chlorine), calculated using PHREEQC (Parkhurst and Appelo, 2013).

Bromine Species	Concentration (M)
HOBr	1.70×10^{-5}
OBr^-	1.04×10^{-5}
Br_2	7.62×10^{-9}
Br_2Cl^-	5.10×10^{-9}
Br_2O	2.10×10^{-9}
BrCl	2.38×10^{-10}
Br_3^-	8.18×10^{-11}
$BrCl_2^-$	7.98×10^{-11}
BrOCl	5.33×10^{-13}

The levels of CBPs were highest at the sampling stations located near the outlets where chlorinated industrial effluents are released (stations 8p, 9x, 10x, 11x, and 13x) (Fig. 4). At these outlets, the concentration of bromoform reached 1.95 µg/L at the surface and 2.36 µg/L at the bottom (Table S3). The slightly higher concentrations of bromoform at the bottom compared to the surface may result from accelerated volatilization on the surface because of wind and the slightly higher temperatures. For the other CBPs, such distinctive discrepancies between bottom and surface levels were not observed. DBAA, which was the second most abundant CBP, reached 1.40 µg/L at station 8p (surface). DBAN had a maximal concentration of 0.79 µg/L at station 10x. At the sampling station 12x (in the vicinity of the outlet of LNG Fos-Cavaou terminal), concentrations of CBPs were unexpectedly low compared to the other stations near effluent discharges. This aberration is probably due to the dislocation of the sampling Niskin bottle under the effect of wind during sampling. Strong southeast winds and currents made sampling very difficult at this station, located at about 150 m from the shore. At sampling stations distant from the outlets of industrial effluents such as 14m, 15m, 16m, 17m, only bromoform was still detected at levels above the QL (Fig. 5). For example, at stations 14m, 15m, 16m, bromoform concentration was 0.16 µg/L. However, these bromoform concentrations at the offshore stations are still superior to typical background levels of bromoform found in seawater (emitted by marine algae) unexposed to chlorinated effluents. Bromoform background levels have been estimated at 0.025 µg/L, and rarely exceed 0.1 µg/L unless when extensive beds of macro-algae are present, which is not the case in the Gulf of Fos (Quack and Wallace, 2003). Thus, these above-background concentrations can be attributed to the release of CBPs from industrial sites into the gulf.

In a previous survey, Jenner et al. (1997) investigated the occurrence of CBPs in cooling water of several coastal power stations located in the UK, France, and the Netherlands. The analyzed CBPs included THMs, HANs, and HPs. Among these CBPs, bromoform and dibromoacetonitrile (DBAN) were the main detected compounds in power stations effluents at concentration that ranged from 0.72 to 29.20 µg/L, and from < 0.1 to 3.15 µg/L, respectively (Jenner et al., 1997). Moreover, Allonier et al. (1999b) measured THMs, HANs, HPs and HAAs in

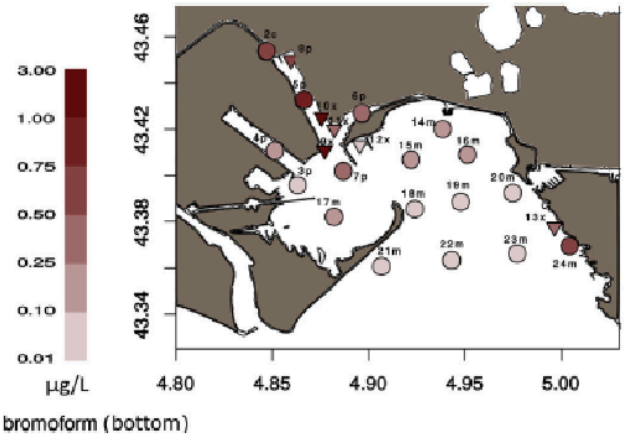


Fig. 5. Bromoform concentration (in µg/L) in bottom seawater at the sampling stations. Triangles represent industrial effluent discharge points.

effluents of three French nuclear power stations after on-site chlorination. The major compound formed in all power stations was bromoform at concentrations that ranged from 1.66 to 26.80 µg/L. DBAA and DBAN were also detected at levels ranging from 1.96 to 10.19 µg/L and from 0.94 to 3.61 µg/L, respectively. Accordingly, the levels of CBPs reported in these previous investigations of power station cooling water effluents were higher than levels reported in the present study. However, it should be noted that the maximal concentrations reported in those previous studies of power station effluents were detected in the chlorinated effluents themselves, unlike in the current study where the contamination of the receiving seawater at sampling stations dispersed inside the Gulf is explored, by measuring CBPs in the Gulf seawater instead of the effluents themselves. Furthermore, in these previous studies total residual oxidant ranged from 0.3 to 1.5 mg/L (Jenner et al., 1997) and from 0.2 to 0.77 (Allonier et al., 1999b), suggesting stronger chlorination than what was practiced in the Gulf of Fos where total residual oxidant levels were below QL (Table S2). A correlation between residual oxidant levels and CBP concentrations has been previously suggested in previous studies of power station cooling effluents, with lowest CBP concentrations being detected at lowest total residual oxidant levels.

By comparing the findings of the present study conducted in spring season with the findings of the previous survey of Boudjellaba et al. (2016) conducted in the Gulf of Fos in winter and summer seasons, a discrepancy appears between CBP levels in summer compared to those in spring or winter which were quite similar. In the previous survey of Boudjellaba et al. (2016), the used analytical methods had higher DLs and QLs resulting in undocumented levels for many of the analyzed CBPs at most of the sampling stations, as reported by authors. Therefore, the description of variation of CBP contamination among different seasons can be chiefly performed by comparing the concentrations of bromoform as it represented the most detected CBP in the past and present surveys. In Boudjellaba et al. (2016), bromoform concentrations in surface seawater reached 2.51 µg/L and 7.55 µg/L in winter and summer, respectively, with highest concentrations detected near outlets. Other CBPs such as HAAs were only detected in summer with DBAA reaching 2.20 µg/L at the surface. In the present study, bromoform concentration in surface seawater reached 1.95 µg/L, and DBAA concentration reached 1.40 µg/L. Hence, it appears that the contamination of the Gulf of Fos by CBPs was highest in summer. This finding is likely related to variations of industrial chlorination treatments as a function of water quality parameters especially temperature, which differ from one season to another. In summer, high water temperature (22–23 °C) would favor bacterial and algal development which leads industries to increase chlorination to face the elevated biofouling risks as compared to lower risks in colder seasons. In spring and winter, differences in bromoform concentration appear to be very minor. It should be noted that the water temperatures were also very similar: 14.5 °C in spring campaign reported here, and 13 °C in winter campaign reported in Boudjellaba et al. (2016), which could result in similar chlorination practices performed by the industrial sites in these similar conditions.

Overall, the levels of CBPs measured in the Gulf were relatively low. Yet, although these low concentrations are not expected to constitute a threat to human health via direct exposure, concerns regarding potential ecotoxic effects and the accumulation of CBPs in seafood (thus indirect human exposure) cannot be dismissed, especially that CBPs are discharged into seawater in a chronic manner. Additionally, the brominated speciation of the detected CBPs contributes to these concerns, since brominated CBPs are known to be far more toxic than their chlorinated analogues (Richardson et al., 2007). Furthermore, the existence of a potential cocktail effect where the overall toxicity of CBPs is accentuated due to additive or synergistic interactions among different contaminants could also be an aggravating factor (Banerji et al., 2012).

3.3. Distribution of CBPs in seawater

Among the detected CBPs, bromoform was the most abundant species at most of the sampling stations (Fig. 6). This finding is in agreement with previous studies that investigated the occurrence of CBPs in seawaters exposed to chlorinated industrial effluents (Jenner et al., 1997; Allonier et al., 1999b; Boudjellaba et al., 2016). DBAA was the second most abundant CBP at all the sampling sites except station 11x where DBAN constituted the second most abundant species. This discrepancy can be attributed to the presence of nitrogen-containing organic compounds near the industrial outlet 11x. Unlike DBAA, the tribrominated HAA, TBAA, was detected only at the sampling station 8p. This finding may be explained by the lower stability of TBAA in comparison to DBAA (Zhang and Mineara, 2002; Manasfi et al., 2016). It has been reported that TBAA may decompose to form bromoform in aqueous solutions (Zhang and Mineara, 2002). HPs were not detected in seawater samples.

The distribution of CBPs observed here (THM most dominant followed by HAAs) is similar to the distribution observed in chlorinated drinking water but distinct from that found in chlorinated swimming pools, where HAAs represent the most dominant DBPs followed by THMs (Chowdhury et al., 2014). The discrepancy between these distributions is related to the nature of precursors leading to the formation of CBPs. In seawater and drinking water, NOM represent the main organic precursors, while in swimming pools anthropogenic inputs are the main precursors. In a previous investigation (Kanan and Karanfil, 2011), NOM were found to contribute mostly to the formation of THMs, while anthropogenic precursors (body fluids) contributed mostly to the formation of HAAs. Although this highlights the role of NOM in the formation of CBPs detected in the Gulf of Fos, the contribution of other types of precursors (e.g. synthetic organic compounds from industrial sites) can't be dismissed based on this observation.

3.4. Occurrence of brominated halophenols in sediments

Marine sediments were collected at the sampling stations (8p, 11x, 12x, 13x, 14m, 15m, 17m, 19m, 22m, 24m). Two bromine-containing HPs were detected at the sampling stations 22m and 13x at concentrations in the order of ng/g dry weight. At sampling station 22m, 2-chloro-4-bromophenol and 2,4,6-tribromophenol were detected at 1.8 and 2.1 ng/g dry weight, respectively. At sampling station 13x, the two HPs were detected at 0.3 and 1.5 ng/g dry weight, respectively.

Data about concentrations of halophenols in marine sediments in areas exposed to chlorinated effluents are very scarce. In a previous study, Sim et al. (2009) investigated the occurrence and distribution of halogenated phenols in sediments obtained from a marine environment

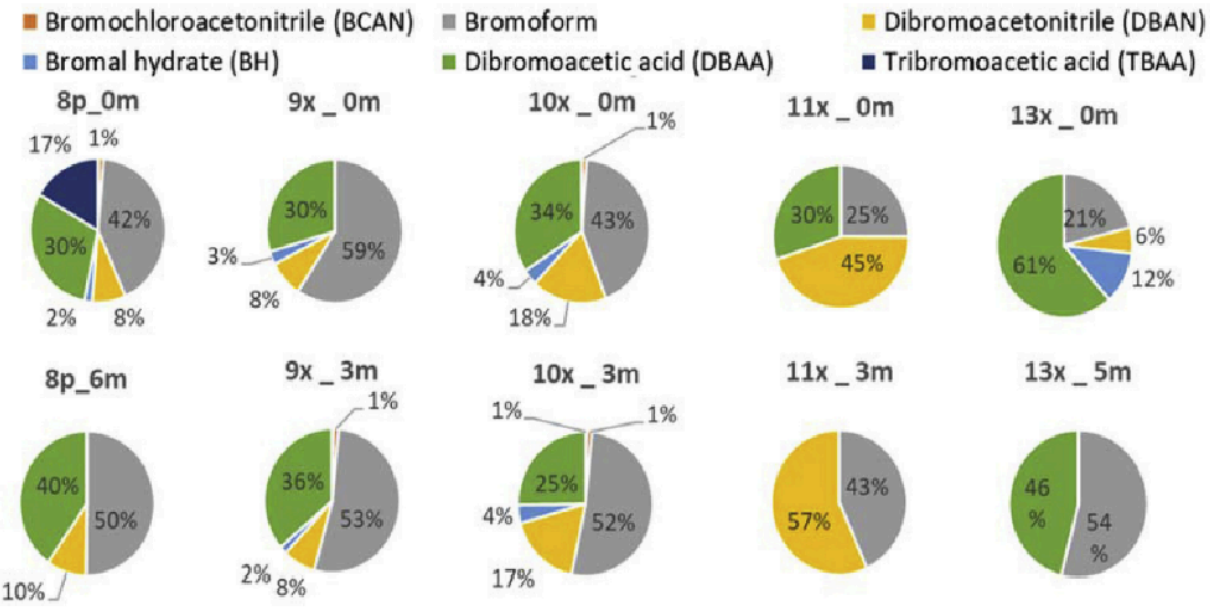


Fig. 6. Percentage distribution of the major CBPs in seawater near the chlorinated industrial outlets at the surface (upper figures) and at the bottom/depth (lower figures).

near a nuclear power plant in South Korea. According to the findings of the latter study, bromophenols were found at higher concentrations than chlorophenols. The reported mean concentration of 2,4,6-tribromophenol reached 3.78 ng/g dry weight in spring. Furthermore, 2,4,6-tribromophenol was previously detected at concentrations ranging from 2.80 to 10.39 μg/kg wet weight in the muscles of conger eel fish obtained from the Gulf of Fos (Boudjellaba et al., 2016). Based on the geographical distribution of contaminated conger eel fish near chlorination outlets in the latter study, authors suggested that the contamination of fish by 2,4,6-tribromophenol resulted – at least partially – from chlorination water discharges. In the present study, the sampling stations where contaminated sediments were detected, were not the ones located nearest to the chlorination outlets. Bromophenols can be produced from both natural and anthropogenic sources (WHO, 2005). Natural sources include marine organisms such as algae and benthic animals, while anthropogenic sources include chlorination of seawater and synthesis for use as intermediates in the production of flame retardants. In the analysis of HPs in seawater, all levels were below DL. However, very low levels below DL cannot be ruled out. With the effect of chronic presence, and a potential to sorb and accumulate in sediments, this would lead to detectable and quantifiable levels in sediments. Further investigations are necessary to discriminate whether the halophenols detected in sediments originate from the chlorination of seawater or are produced naturally. Nevertheless, the occurrence of 2,4,6-tribromophenol in the marine environment remains an issue of concern, since this compound has been reported to induce several significant adverse effects on fish populations (Deng et al., 2010).

4. Conclusions

This study measured the concentrations of CBPs in a semi-enclosed bay receiving industrial chlorinated seawater effluents. The highest levels of CBPs including bromoform, DBAA, DBAN, and BH were detected near industrial outlets. To our knowledge, BH was reported here for the first time in the context of industrial seawater chlorination. Other CBPs including TBAA and BCAN were detected at some sampling stations. At distant offshore sampling stations, only bromoform was detected at low levels. Furthermore, analysis of CBPs in sediments showed the presence of two HPs (2-chloro-4-bromophenol and 2,4,6-tribromophenol) which were not detected in seawater samples. Although CBPs at these low concentrations aren't expected to constitute a threat to human health via direct exposure, concerns regarding ecotoxicity and indirect human exposure (via seafood) need to be addressed. Despite low levels, a potential adverse effect to biota or accumulation in seafood (thus indirect human exposure) can't be ruled out, especially that CBPs are being discharged into water in a chronic manner. Therefore, to address these remaining concerns, suitable ecotoxicological assays of CBPs using adequate bioassays at environmentally relevant concentrations and risk assessment studies are warranted to assess the potential impact of the detected CBPs on environmental health. It's also recommended to conduct an extensive evaluation of contamination of marine organisms by CBPs in seawater exposed to chlorinated effluents in future studies.

Conflicts of interest

Authors declare no conflicts of interests.

Acknowledgement

This work was funded by the French National Research Agency (ANR) within the project FOSSEA (ANR-16-CE34-0009). Authors acknowledge Météo-France for meteorological data through the agreement N° DIRSE/REC/16/02/0 and reviewers for helpful comments.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2018.06.008.

References

Allonier, A.S., Khalanski, M., Camel, V., Bermond, A., 1999a. Determination of dihaloacetonitriles and halophenols in chlorinated sea water. Talanta 50 (1), 227–236.
Allonier, A., Khalanski, M., Camel, V., Bermond, A., 1999b. Characterization of chlorination by-products in cooling effluents of coastal nuclear power stations. Mar. Pollut. Bull. 38, 1232–1241.

ASTM D1141-98, 2013. Standard Practice for the Preparation of Substitute Ocean Water. ASTM International.

Banerji, S., Werschkun, B., Höfer, T., 2012. Assessing the risk of ballast water treatment to human health. Regul. Toxicol. Pharmacol. 62 (3), 513–522.

Boudjellaba, D., Dron, J., Revenko, G., Demelas, C., Boudenne, J.L., 2016. Chlorination by-product concentration levels in seawater and fish of an industrialised bay (Gulf of Fos, France) exposed to multiple chlorinated effluents. Sci. Total Environ. 541, 391–399. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.046.

Brown, D., Bridgeman, J., West, J.R., 2011. Predicting chlorine decay and THM formation in water supply systems. Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 10 (1), 79–99.

Chowdhury, S., Alhooshani, K., Karanfil, T., 2014. Disinfection byproducts in swimming pool: occurrences, implications and future needs. Water Res. 53, 68–109.

Cimetiere, N., Dossier-Berne, F., De Laat, J., 2010. Effect of some parameters on the formation of chloroform during chloramination of aqueous solutions of resorcinol. Water Res. 44, 4497–4504. https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2010.06.010.

Deng, J., Liu, C., Yu, L., Zhou, B., 2010. Chronic exposure to environmental levels of tribromophenol impairs zebrafish reproduction. Toxicol. Appl. Pharmacol. 243 (1), 87–95.

Domino, M.M., Pepich, B.V., Munch, D.J., Fair, P.S., Xie, Y., 2003. Method 552.3 Determination of Haloacetic Acid and Dalapon in Drinking Water by Liquid-liquid Microextraction, Derivatization, and Gas Chromatography with Electron Capture Detection. Environ. Prot. Agency, Cincinnati, OH.

Hansen, K.M.S., Willach, S., Antoniou, M.G., Mosbæk, H., Albrechtsen, H.-J., Andersen, H.R., 2012. Effect of pH on the formation of disinfection byproducts in swimming pool water – is less THM better? Water Res. 46, 6399–6409. https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.09.008.

Heeb, M.B., Criquet, J., Zimmermann-Steffens, S.G., Von Gunten, U., 2014. Oxidative treatment of bromide-containing waters: formation of bromine and its reactions with inorganic and organic compounds - a critical review. Water Res. 48, 15–42. https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.08.030.

Hua, G., Reckhow, D.A., Kim, J., 2006. Effect of bromide and iodide ions on the formation and speciation of disinfection byproducts during chlorination. Environ. Sci. Technol. 40 (9), 3050–3056.

Inkscape, 2015. http://www.inkscape.org.

Jenner, H.A., Taylor, C.J.L., Van Donk, M., Khalanski, M., 1997. Chlorination by-products in chlorinated cooling water of some European coastal power stations. Mar. Environ. Res. 43, 279–293.

Kanan, A., Karanfil, T., 2011. Formation of disinfection by-products in indoor swimming pool water: the contribution from filling water natural organic matter and swimmer body fluids. Water Res. 45 (2), 926–932.

Khalanski, M., Jenner, H.A., 2012. Chlorination chemistry and ecotoxicology of the marine cooling water systems. In: Rajagopal, S., Jenner, H.A., Venugopalan, V.P. (Eds.), Operational and Environmental Consequences of Large Industrial Cooling Water Systems. Springer Science Publisher, pp. 183–226.

Krasner, S.W., Weinberg, H.S., Richardson, S.D., Pastor, S.J., Chinn, R., Sclimenti, M.J., Onstad, G.D., Thruston, A.D., 2006. Occurrence of a new generation of disinfection byproducts. Environ. Sci. Technol. 40 (23), 7175–7185.

Lampi, P., Tolonen, K., Vartialnen, T., Tuomisto, J., 1992. Chlorophenols in lake bottom sediments: a retrospective study of drinking water contamination. Chemosphere 24, 1805–1824.

Ma, Z., Gao, K., Li, W., Xu, Z., Lin, H., Zheng, Y., 2011. Impacts of chlorination and heat shocks on growth, pigments and photosynthesis of Phaeodactylum tricornutum (Bacillariophyceae). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 397 (2), 214–219.

Manasfi, T., De Méo, M., Coulomb, B., Di Giorgio, C., Boudenne, J.L., 2016. Identification of disinfection by-products in freshwater and seawater swimming pools and evaluation of genotoxicity. Environ. Int. 88, 94–102. https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.12.028.

Manasfi, T., Coulomb, B., Ravier, S., Boudenne, J.-L., 2017a. Degradation of organic UV filters in chlorinated seawater swimming pools: transformation pathways and bromoform formation. Environ. Sci. Technol. 51 (23), 13580–13591. https://doi.org/10.1021/acs.est.7b02624.

Manasfi, T., De Méo, M., Di Giorgio, C., Coulomb, B., Boudenne, J.L., 2017b. Assessing the genotoxicity of two commonly occurring byproducts of water disinfection : chloral hydrate and bromal hydrate. Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen 813, 37–44. https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2016.11.009.

Manasfi, T., Temime-Roussel, B., Coulomb, B., Vassalo, L., Boudenne, J.L., 2017c. Occurrence of brominated disinfection byproducts in the air and water of chlorinated seawater swimming pools. Int. J. Hyg Environ. Health 220 (3), 583–590.

MeteoFrance. http://www.meteofrance.fr/publications/glossaire/152770-mistral.

Munch, D.J., Hautman, D.P., 1995. Method 551.1. Determination of Chlorination Disinfection by Products, Chlorinated Solvents, and Halogenated Pesticides/Herbicides in Drinking Water by Liquid-liquid Extraction and Gas Chromatography with Electron Capture Detection. Methods for the Determination of Organic Compounds in Drinking Water, Supplement III, EPA-600/R-95/131. Cincinnati, OH. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH.

Parkhurst, D.L., Appelo, C.A.J., 2013. Description of Input and Examples for PHREEQC Version 3: a Computer Program for Speciation, Batch-reaction, One-dimensional Transport, and Inverse Geochemical Calculations (No. 6–A43). US Geological Survey.

Pignata, C., Fea, E., Rovere, R., Degan, R., Lorenzi, E., de Ceglia, M., Schilirò, T., Gilli, G., 2012. Chlorination in a wastewater treatment plant: acute toxicity effects of the effluent and of the recipient water body. Environ. Monit. Assess. 184 (4), 2091–2103.

Quack, B., Wallace, D.W.R., 2003. Air-sea flux of bromoform: controls, rates, and implications. Global Biogeochem. Cycles 17 (1), 1023.

R Core Team, 2015. R: a Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. http://www.R-project.org/.

Richardson, S.D., Plewa, M.J., Wagner, E.D., Schoeny, R., DeMarini, D.M., 2007. Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: a review and roadmap for research. Mutat. Res. Rev. Mutat. Res. 636 (1), 178–242.

Sim, W.J., Lee, S.H., Lee, I.S., Choi, S.D., Oh, J.E., 2009. Distribution and formation of chlorophenols and bromophenols in marine and riverine environments. Chemosphere 77 (4), 552–558.

Singer, P.C., 1999. Humic substances as precursors for potentially harmful disinfection by- products. Water Sci. Technol. 40, 25–30. https://doi.org/10.1016/S0273-1223(99)00636-8.

Sivey, J.D., Arey, J.S., Tentscher, P.R., Roberts, A.L., 2013. Reactivity of BrCl, Br2, BrOCl, Br2O, and HOBr toward dimethenamid in solutions of bromide + aqueous free chlorine. Environ. Sci. Technol. 47, 1330–1338. https://doi.org/10.1021/es302730h.

Stewart, M.E., Blogoslawski, W.J., Hsu, R.Y., Helz, G.R., 1979. By-products of oxidative biocides: toxicity to oyster larvae. Mar. Pollut. Bull. 10 (6), 166–169.

Taylor, C.J.L., 2006. The effects of biological fouling control at coastal and estuarine power stations. Mar. Pollut. Bull. 53 (1–4), 30–48.

Ulses, C., Grenz, C., Marsaleix, P., Schaaff, E., Estournel, C., Meulé, S., Pinazo, C., 2005. Circulation in a semienclosed bay under influence of strong freshwater input. J. Mar. Syst. 56 (1–2), 113–132.

Werschkun, B., Banerji, S., Basurko, O.C., David, M., Fuhr, F., Gollasch, S., Grummt, T., Haarich, M., Jha, A.N., Kacan, S., Kehrer, A., 2014. Emerging risks from ballast water treatment: the run-up to the international ballast water management convention. Chemosphere 112, 256–266.

Westerhoff, P., Chao, P., Mash, H., 2004. Reactivity of natural organic matter with aqueous chlorine and bromine. Water Res. 38, 1502–1513. https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.12.014.

World Health Organization (WHO), 2005. 2,4,6-Tribromophenol and Other Simple Brominated Phenols. Concise International Chemical Assessment Document (CICAD) 66. World Health Organization, Geneva.

Yang, M., Zhang, X., 2013. Comparative developmental toxicity of new aromatic halogenated DBPs in a chlorinated saline sewage effluent to the marine polychaete *Platynereis dumerilii*. Environ. Sci. Technol. 47 (19), 10868–10876.

Zhang, X., Minear, R. a., 2002. Decomposition of trihaloacetic acids and formation of the corresponding trihalomethanes in drinking water. Water Res. 36, 3665–3673. https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00072-6.

Zhang, X.L., Yang, H.W., Wang, X.M., Fu, J., Xie, Y.F., 2013. Formation of disinfection by-products: effect of temperature and kinetic modeling. Chemosphere 90 (2), 634–639.

Annexe 3 : Publication, écotoxicologie

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

RESEARCH ARTICLE

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

Karine Lebaron[1,2] · Lilia Mechiri[1] · Simone Richard[1] · Annabelle Austruy[3] · Jean-Luc Boudenne[2] · Stéphane Coupé[1]

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

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

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

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

Responsible editor: Philippe Garrigues

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

Lilia Mechiri
lilia.mechiri@gmail.com

Simone Richard
simone.richard@univ-tln.fr

Annabelle Austruy
annabelle.austruy@institut-ecocitoyen.fr

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

Stéphane Coupé
stephane.coupe@univ-tln.fr

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

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

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

Introduction

Chlorination has been used worldwide, for decades, and is one of the most effective treatments for water disinfection in treatment plants for the production of tap water. Chlorination is also employed in the management and upkeep of industrial installations, where water is often used for cooling or heating purposes, as well as to prevent and control biofouling and corrosion of pipelines. Hence, in some industrialized embayment areas, huge volumes of coastal seawater are continuously being pumped and chlorinated before being re-released into the original embayment (Allonier et al. 1999; Boudjellaba et al. 2016; Manasfi et al. 2018). As chlorine is very reactive in the presence of natural organic matter, seawater chlorination generates a complex set of brominated and chlorobrominated disinfection by-products (DBPs). Finally, benthic organisms, resident in the embayment, are exposed to these DBPs (Singer 1999; Westerhoff et al. 2004; Halpern et al. 2008). Although the diversity and occurrence of brominated DBPs in contaminated coastal seawater is relatively undocumented (Richardson et al. 2007; Manasfi et al. 2017), bromoform (halomethane), tribromoacetic acid (haloacetic acid) and tribromophenol (halophenol) are among the most prevalent molecules, often measured at relatively high concentrations (i.e. μg/L) (Manasfi et al. 2018).

Most of the DBPs so far tested have been found to be toxic and genotoxic in diverse model systems, such as bacteria, mammalian cells or zebrafish embryos. Furthermore, brominated DBPs have generally been shown to be more toxic than their chlorinated analogues (Richardson et al. 2007, 2010; Yang and Zhang 2013; Hanigan et al. 2017). It is worth noting that at the single molecule level, visible effects have always been observed following exposure to high concentrations of DBPs, suggesting that toxic and genotoxic risks are limited (Teixidó et al. 2015). Nevertheless, recent epidemiological research has suggested that lifetime exposure to DBPs, mainly through ingestion, would significantly increase the risk of bladder cancer in humans (2004; Villanueva et al. 2004, 2006). Hence, there are great concerns about the level of human exposure, causing health and sanitary surveillance agencies to enact maximum concentration limits (MCL). For instance, the US EPA recommends MCLs for total halomethane and haloacetic acid of 80 μM and 60 μM, respectively, in safe drinking water. It is notable that these values are relatively consistent with the maximum concentrations measured in the effluents of water treatment plants from the USA, Canada or France (CAREX Canada 2009; Mouly et al. 2009).

There are currently no MCLs for environmental waters that harbor functional ecosystems, and which are potentially chronically exposed to DBPs. Studies that assess the toxicity of DBPs in aquatic animals remain scarce and to our knowledge, only two have tested brominated DBPs in recent years, using a zebrafish embryo model (Teixidó et al. 2015; Hanigan et al. 2017). These two studies tested a total of 11 brominated DBPs, including bromoform (BMF) and tribromoacetic acid (TBAA). Most of the brominated DBPs that were compared, proved toxic for larval development, though only at high concentrations (i.e. > 100 μM). Moreover, short-term exposure to chlorinated wastewater did not have any significant toxic effect. Finally, a genotoxic effect was only detected with chlorodibromomethane and sodium borate at their EC_{50} levels, 160 μM and 0.049 μM, respectively.

In this study, we were interested in broadening the understanding of the toxicological impact of DBPs on coastal marine organisms, using the sea urchin, *Paracentrotus lividus*, as a proxy for the echinoderm class. *Paracentrotus lividus* lives in the first few meters of coastal areas. The species is widely distributed along the north-eastern Atlantic coast and on all Mediterranean coasts. Furthermore, they can be encountered in numerous contrasted habitats that include differences in temperature, salinity and chemical contamination (Bellas et al. 2008). While adults are benthic and relatively sedentary, the larvae produced at each reproductive event are pelagic for up to 4 weeks, thus ensuring species dispersion. The sea urchin is a relevant model organism to assess the effect of potentially harmful molecules. It is more closely related to humans than the mussel (Tu et al. 2006), with two species having been fully sequenced. Reproduction is easily performed in vitro, resulting in high numbers of translucid larvae. Sea urchin larvae have been extensively used to assess the embryo toxicity and embryo genotoxicity of molecules (Hose 1985; McGibbon and Moldan 1986; Morroni et al. 2016; Gharred et al. 2016; Trifuoggi et al. 2017; Neves et al. 2018; Messinetti et al. 2018; Pereira et al. 2018; Dorey et al. 2018).

In this study, our objective was to generate additional data in a model marine organism, of the toxic influence of three major brominated contaminants found in coastal seawater that is subjected to massive anthropogenic disturbance. With this aim in mind, we used sea urchin embryos to assess the toxicity and genotoxic potential of bromoform (halomethane), tribromoacetic acid (haloacetic acid) and tribromophenol (halophenol), tested either alone or in combination, on two populations of *P. lividus*, either chronically exposed or unexposed.

Material and methods

Sea urchins

Adult *Paracentrotus lividus* sea urchins were harvested by scuba diving, on the morning of each experiment, at a non-polluted site (NPS) near the Toulon (Var, France) embayment (Garonne Bay: 43.098503–6.018430) and at a polluted site (PS) where seawater is chronically chlorinated (Manasfi

et al. 2018). *P. lividus* were induced to spawn by gentle shaking.

Sperm and eggs were individually collected, respectively dried with a micropipette and kept on ice and in 100 mL of filtered seawater (FSW). Eggs were microscopically observed to verify maturity before adding dry sperm.

Ten independent (i.e. unrelated) larval populations were produced by arbitrarily mixing one sperm with one egg suspension, in 50 mL of FSW at 20 °C at a concentration of 500 eggs/mL, under agitation for 45 min, then the fertilization rates were assessed.

Observed fertilization rates were 100% in every experiment.

Chemicals

Bromoform (CAS 75-25-2), tribromoacetic acid (CAS 75-96-7) and tribromophenol (CAS 118-79-16) were purchased from Sigma-Aldrich. Stock solutions of bromoform and tribromoacetic acid were prepared by direct dissolution in filtered sea water (FSW). Tribromophenol was first dissolved in dimethylsulfoxide solvent (DMSO) to compensate for its very low water solubility, then it was dissolved in FSW, with a final DMSO concentration of 0.1%.

Experimental design

Toxicological assessments

Ten unrelated larval population were used and tested in triplicate, as follows: in 24-well microplates, suspensions of 500 fertilized eggs in 2 mL FSW were exposed for 48 h to 7 concentrations of each chemical (Table 1). At the end of the exposure time, larvae were fixed by adding ethanol at 15% final concentration and kept at 4 °C until microscopic observations were carried out. Normal and abnormal (i.e. delayed growth, developmental anomalies) Pluteus larvae were recorded.

Percentages of normal Pluteus larvae were plotted against chemical concentrations. We then determined the dose-response curves using R software and deduced the half maximal effective concentrations, EC_{50}, here considered as the concentration of chemical at which we could observe only 50% of normal and viable larvae among the pool. The no and lowest observed effective concentrations (respectively NOEC and LOEC) were deduced from the chemical concentrations used in the experiments.

Table 1 Concentrations (μM) of tribromophenol, bromoform and tribromoacetic acid tested for toxicological assessment

Tribromophenol	Bromoform	Tribromoacetic acid
1.51E+00	3.96E+01	1.01E+02
3.02E+00	1.19E+02	1.69E+02
9.07E+00	1. 98E+02	3.37E+02
1.51E+01	3.96E+02	6.74E+02
2.42E+01	7.91E+02	1.35E+03
3.02E+01	1.19E+03	1.69E+03
3.63E+01	1.98E+03	2.36E+03

We then assessed the toxicity of the chemicals combined in ten other independent experiments. Specifically, we tested three mixtures named mix NOECs, mix LOECS and mix EC_{50}, that is each chemical within a mixture is at its specific endpoints (NOEC, LOEC or EC50). Depending on the chemical tested, controls were either exposed to FSW alone or FSW containing 0.1% DMSO.

Genotoxicity test

The genotoxicity of the mix NOECs, mix LOECs and twice mix LOECs was assessed using the comet assays, based on the Tice et al. (2000) procedure.

Five thousand, 48-h, Pluteus were exposed as described above for 1 h to the mixtures. After exposure, larvae were collected by centrifugation at 1500g for 10 min at 4 °C. The pellet was resuspended in 1 mL of FSW, then gently mixed with 1 mL of glycine 1 M and incubated on ice for 5 min to allow for complete dissociation of the cells. Fifty thousand cells were then collected and placed in 1 mL of phosphate buffer saline (PBS) 1× and centrifuged at 3000g for 5 min at 4 °C. Pelleted cells were then collected and gently mixed with 50 μL of low melting point agarose at 37 °C, then plated onto a pre-coated laboratory microscope slide (Tice et al. 2000).

Once prepared, slides were immersed in a lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM $Na_2EDTA,2H_2O$, 10 mM Tris pH 10, 10 g N-Lauroylsarcosine, 10% DMSO and 1% Triton X100) for 90 min at 4 °C. Slides were then placed in an electrophoresis tank containing an alkaline solution (200 mM Na_2EDTA $2H_2O$, 10 N NaOH) for 20 min at room temperature, to allow DNA to denature. This was followed by electrophoresis which was conducted for 20 min at 25 V and 350 mA. Thereafter, slides were plunged in a neutralization buffer (0.4 M Tris-HCl pH 7.5) for 20 min. Finally, slides were fixed with 100% methanol and dried at room temperature overnight.

DNA was stained with a solution of SyberGreen (Sigma-Aldrich) deposited onto each slide and left to stand for 20 min in the dark. Slides were then read using an epifluorescence microscope equipped with a digital camera and dedicated software. Whole cells and comets observed within several randomly selected microscope fields were captured, irrespective of the length and the shape of the comet (Gyori et al. 2014). Pictures were then analysed using Open Comet v1.3.1 (cometbio.org) implemented in the ImageJ (SciJava) program (Gyori et al. 2014).

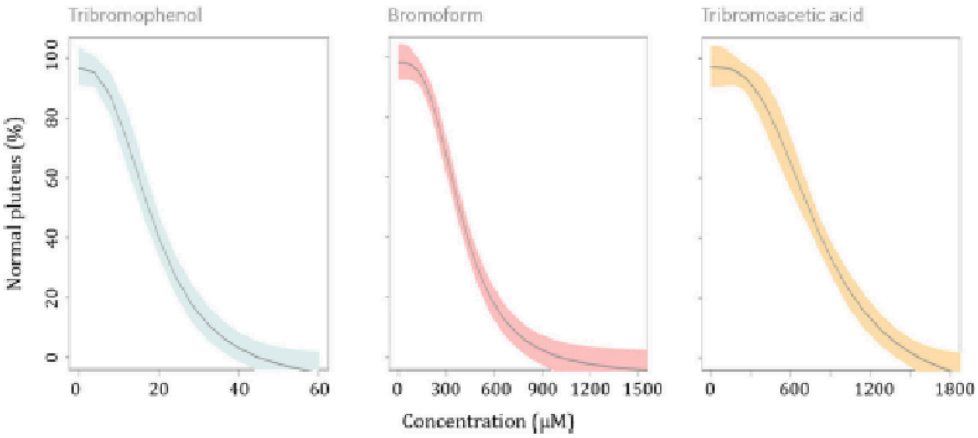


Fig. 1 Effect of tribromophenol, bromoform and tribromoacetic acid alone on the percentage of normal Pluteus growth after 48-h exposure

DNA damage was assessed via the olive tail moment (OTM), which takes into consideration both the length and the distribution of DNA within the comet's tail (Olive et al. 1991).

The positive control experiment consisted of larval suspensions exposed to FSW containing 500 µM of H_2O_2. This concentration was chosen after a preliminary experiment in which we tested the genotoxicity of H_2O_2 for a range of concentrations ($R = 0.9983$), as previously performed (Nahon et al. 2008).

Statistical analysis

Statistics were performed with Rstudio (version 1.1.442) and XLSTAT (Addinsoft, 2017). Dose-response curves were produced using regression models. Effective concentrations (i.e. EC_{10}, EC_{50} and EC_{90}) values were generated with the "estimating effective doses" (ED.drc) from the R package. Prior to the Kruskal-Wallis test, ecotoxicological and comet assay data were tested for normality. The Mann-Whitney *U* test was proceeded to compare data from non-polluted site (NPS) to polluted site (PS). Differences between each condition were considered significant when p value < 0.05, data were expressed as mean ± S.E.M (standard error of the mean).

Results and discussion

Assessment of BMF, TBAA and TBP toxicity on early embryo development

In this study, embryos were exposed to a range of bromoform (BMF), tribromoacetic acid (TBAA) and tribromophenol (TBP) concentrations for 48 h (Table 1), from fertilization to the Pluteus stage. The control with 0.1% DMSO was not toxic for larvae, and we found typical dose-response curves, from which EC_{50} and EC_{90} were extrapolated (Fig. 1 and Table 2). TBP (halophenol) was by far the more toxic molecule compared to BMF (halomethane) and TBAA (haloacetic acid) (Table 2). BMF was found to be more toxic than TBAA. This order of toxicity has regularly been reported in several aquatic organisms living in fresh or marine water (Yoshioka et al. 1985; Yang and Zhang 2013; Liu and Zhang 2014; Teixidó et al. 2015; Hanigan et al. 2017).

Like other aquatic organisms (Yoshioka et al. 1985; Delacroix et al. 2013; Liu and Zhang 2014; Teixidó et al. 2015; Hanigan et al. 2017), *P. lividus* embryos were sensitive to relatively high concentrations of the tested molecules. The EC_{50} was 14.5 µM for TBP, 526.31 µM for BMF and 923.5 µM for TBAA, and the lowest LOEC was 3 µM with TBP (Table 2). Except for bromoform, *P. lividus* appears to be more sensitive to TBP and TBAA, than the embryos of the marine polychaete, *Platynereis dumerilii* (Yang and Zhang 2013), or the phytoplanktonic green algae, *Tetraselmis marina* (Liu and Zhang 2014). Indeed, according to three previous studies, the EC_{50} for bromoform in *P. lividus* is situated between the EC_{50} in zebrafish (200 µM (Teixidó et al. 2015)) and the EC_{50} in polychaete embryos (730 µM, Yang and Zhang (2013)). With regard to TBP and TBAA, our model seems 4 to 14 times more sensitive to TBP and 4 to 6 times more sensitive to TBAA, when compared with other, different, biological systems (Yang and Zhang 2013; Liu and Zhang 2014; Teixidó et al. 2015).

Table 2 Different endpoints (µM) for tribromophenol, bromoform and tribromoacetic acid after 48 h of exposure

	Tribromophenol	Bromoform	Tribromoacetic acid
NOEC µM	1.51E+00	3.96E+01	1.69E+02
LOEC µM	3.02E+00	1.98E+02	3.37E+02
EC_{50} µM	1.45E+01	5.26E+02	9.23E+02
EC_{90} µM	3.14E+01	1.05E+03	1.78E+03

The first observable effect (LOEC) of the three chemicals in our model was the abnormal development of a fraction of Plutei. At higher concentrations, we observed both abnormal and delayed development, mostly between the morula and gastrula stages, although in different relative proportion, depending upon the molecule and the concentration. Of the developmental anomalies triggered by all three chemicals, we mainly observed crossed spicules, which are among the most regularly reported malformations in sea urchin larvae (Gharred et al. 2016). Interestingly, TBAA-induced mortality was detected early, since we observed a majority of black-coloured dead eggs (*unpublished data*).

Exposure for 48 h to mix NOECs and mix LOECs critically reduced the proportion of normal Pluteus, to 63% ± 2 and 18% ± 1 respectively, while none survived exposure to mix EC_{50} condition, demonstrating the combined effect of these chemicals (Table 2). The results obtained with a mixture of chemicals were entirely expected. However, in zebrafish embryos, the influence of chlorinated water had no detectable phenotypic impact after 5 days of exposure, suggesting that a complex water environment, containing a wide diversity of DBPs at much lower concentrations than those tested, may not be deleterious for the population (Hanigan et al. 2017). Nevertheless, chronic exposure of adult fish to 0.9 nM of TBP could potentially have a significant effect over a number of generations, on survival, larval development and the malformation rate (Deng et al. 2010).

We further tested the impact of embryo exposure at polluted sites (PS), with embryos generated by *P. lividus* adults chronically exposed to chlorinated sea water. These PS embryos were exposed to TBP, BMF and TBAA at their respective LOEC, EC_{50} and EC_{90}, and to mix LOECs condition. They were found to be slightly less sensitive to TBP and TBAA than NPS embryos, while very resistant to BMF, which is the most prevalent molecule found in sea water where genitors were harvested (Fig. 2) (Manasfi et al. 2018). Moreover, exposure to mix LOECs reduced the proportion of normal Pluteus by 40% instead of 80% for the NPS embryos. This increased PS embryo resistance could be explained by either natural larval selection, with higher fitness for the polluted site, or a parental effect (Ross et al. 2016).

Evaluation of mixture genotoxicity

The alkaline comet assay has been widely used to test potential genotoxic effects of environmental pollutants, in several model organisms such as animal embryos and plant roots, as it is an efficient method for detecting single- and double-strand DNA breaks (Yıldız et al. 2009; Liman et al. 2011). The results obtained from the comet assay are summarized in Fig. 3. Here we tested whether 1 h exposure to mixtures of TBP, BMF and TBAA, at their respective NOEC, LOEC and twice their LOEC concentrations, could induce DNA strand breakages in Pluteus larvae. It is likely that given the short-term exposure to the mixtures, we observed the obvious potential of our mixtures to induce DNA strand breakages, prior to any activation of DNA repair mechanisms that would counteract the induced DNA damage. The level of genotoxicity was assessed in positive and negative controls and exposed groups according to the OTM and the percentage of DNA (%DNA) measured in the comet tail. Furthermore, we only assessed the proportion of cells within each group that exceeded a

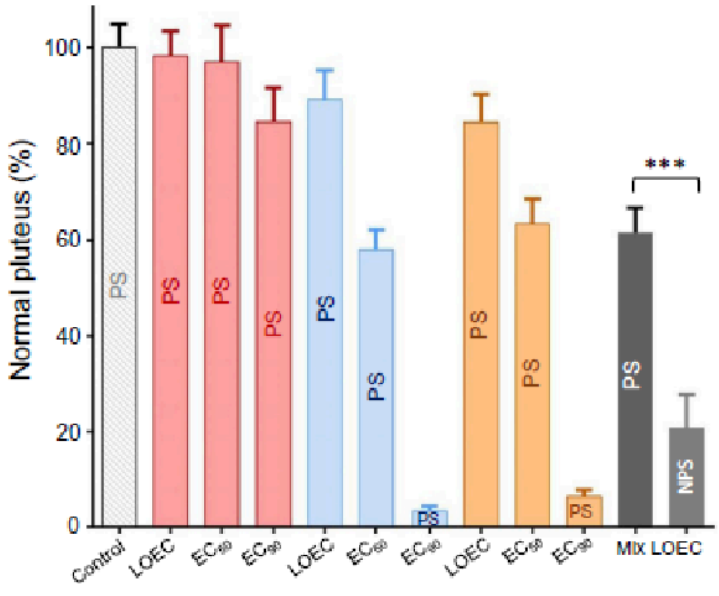


Fig. 2 Effect of bromoform (pink), tribromophenol (blue) and tribromoacetic acid (orange), alone and mix LOECs (grey), on the percentage of normal Pluteus generated by adults harvested from polluted site (PS) or non-polluted site (NPS), after 48-h exposure.*** $p < 0.05$ (Dunnet's test)

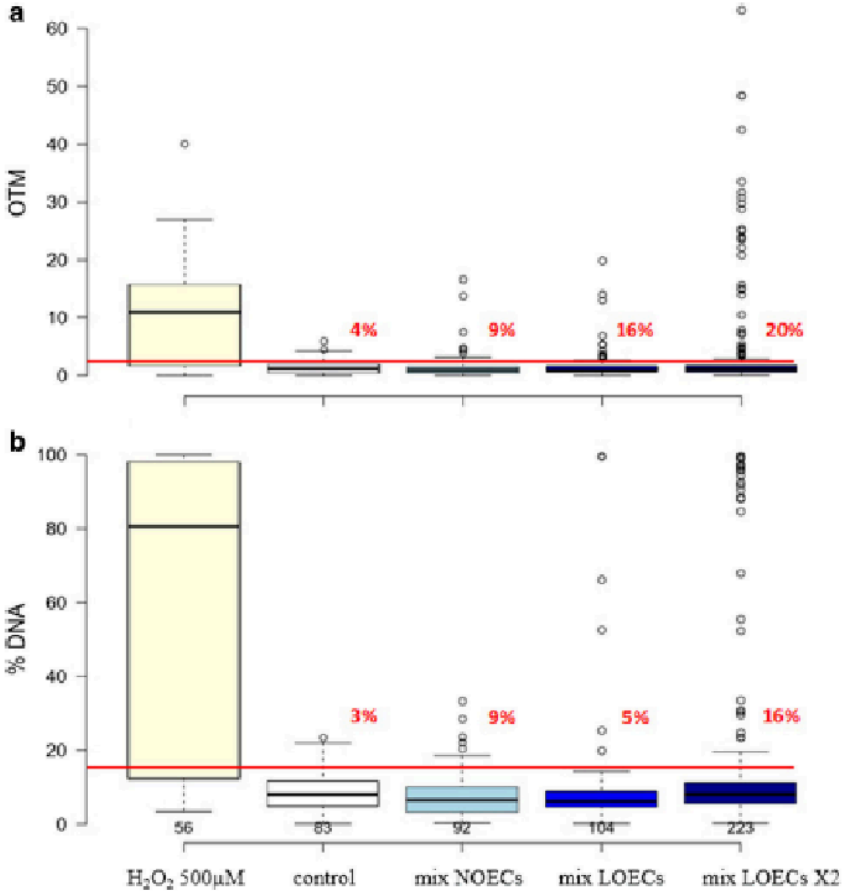


Fig. 3 Distribution of OTM (a) and % of DNA within the comet tail (b) according to the level of exposure of Pluteus larvae to the chemical mixture. Boxplots encompass the 1st and the 3rd quartiles. The black line within the boxplot represents the median. Tukey's whisker extents are presented (defined as 1.5 times the 1st and 3rd quartiles). The red horizontal line indicates the 95% percentile of the control condition used as a reference, and the numbers in red indicate the proportion of comets presenting a higher value than the reference

threshold value, corresponding to the 95th percentile of the control group for the OTM and %DNA. Under controlled conditions, the 95th percentiles for OTM and %DNA were 2.6% and 16.5%, respectively.

For the two parameters considered, we found normal data distributions within the negative control group (Shapiro-Wilk, $p = 0.1$) but not in the tested groups or in the positive control (Shapiro-Wilk, $p < 0.0001$). The non-parametric test did not reveal any influence of exposure level based on the OTM but demonstrated that the group exposed to the mixture at twice the LOEC concentration (mix LOEC_X2), had significantly more DNA within the comet tail, compared to all other groups (Kruskal-Wallis, $p < 0.033$). This result would suggest that this last condition only had a genotoxic effect. However, the discrepancy in the results between controls and tested groups for normality of data distribution indicates that exposure had an influence on a fraction of the whole cells within each group, as previously reported (Taban et al. 2004). Indeed, the proportion of cells with an OTM higher than 2.6 regularly increases with the concentration and gives higher OTM values than observed in the negative control group (Fig. 3a). This increase in the proportion of cells has also been observed for the %DNA parameter, although it is clearly noticeable at the mix LOEC_X2 condition (Fig. 3b). Hence, overall, our results suggest a dose response when taking into consideration both the effect on DNA and the occurrence of responding cells. Similar results have already been reported in short-term exposure experiments, such as those performed on CHO (Chinese hamster ovary) cells exposed to TBA for 4 h (Plewa et al. 2008) and occurrence (Taban et al. 2004).

It is interesting to note that at the mix LOEC_X2 condition, we found that 7% of the cells were distributed with more than 90% of their DNA within the comet tail. Among these, a few cells also displayed a high OTM value, which relates to the length of the comet. A similar result was also obtained with some cells from the positive control group (Fig. 3b). This could be indicative of ongoing apoptosis (Ríos et al. 2003; Collins 2004). Evidence for this has already been demonstrated in other studies. It has been shown that hydrogen peroxide can induce apoptosis, causing cell death in less than 2 h in

293T cells exposed to more than 400 μM of H_2O_2 (Xiang et al. 2016). A recent study has also suggested that halogenated DBPs might trigger apoptosis at high concentrations (Ríos et al. 2003; Collins 2004). Thus, in our study, the mixtures might have the potential to also trigger apoptosis in a fraction of the larval cells.

This distribution pattern is difficult to explain at this stage, and it would be interesting to assess whether a certain cell type would be more sensitive to mixtures than others, or if the external cells are more impacted than those embedded within the larval body, for instance. This has already been reported in zebrafish exposed for a much longer time (i.e. 72 h) to BMF (Teixidó et al. 2015).

Finally, we have highlighted with our experimental conditions that a significant genotoxic effect, observed with high doses of a cocktail of DBPs, are generally consistent with previous findings (Teixidó et al. 2015; Hanigan et al. 2017).

Conclusion

This study has furthered our knowledge of the impact of bromoform, tribromophenol and tribromoacetic acid, tested alone and in combination, on sea urchin, *Paracentrotus lividus*, development. We have revealed that all three molecules could impair embryo development with the order of toxicity TBP > BMF > TBAA. TBP is 10 to 30 times more toxic compared to the other two molecules. The mixture of the three DBPs also significantly impaired development and were proved weakly genotoxic at low doses (i.e. mix NOECs). Increasing the concentration of the mixture to mix LOECs significantly increases cytotoxicity, as well as increasing the level of DNA damage and the proportion of cells affected.

In this study, we have highlighted a potential genome by environment interaction, particularly regarding BMF. Further experiments will be required, however, in order to assess the relative influence of a potential parental effect, as well as local genetic adaptation in the observed resistance.

Acknowledgements This work was co-funded by the French National Research Agency (ANR) within the project FOSSEA (ANR-16-CE34-0009) and by Conseil Régional Provence Alpes Côte d'Azur (Regional Council SUD).

References

(2004) Some drinking-water disinfectants and contaminants, including arsenic. IARC, Lyon

Allonier A-S, Khalanski M, Camel V, Bermond A (1999) Determination of dihaloacetonitriles and halophenols in chlorinated sea water. Talanta 50:227–236

Bellas J, Fernández N, Lorenzo I, Beiras R (2008) Integrative assessment of coastal pollution in a Ría coastal system (Galicia, NW Spain): correspondence between sediment chemistry and toxicity. Chemosphere 72:826–835. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.02.039

Boudjellaba D, Dron J, Revenko G, Démelas C, Boudenne JL (2016) Chlorination by-product concentration levels in seawater and fish of an industrialised bay (gulf of Fos, France) exposed to multiple chlorinated effluents. Sci Total Environ 541:391–399. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.046

CAREX Canada (2009) Les sous-produits de chloration. School of Environmental Health University of British Columbia

Collins AR (2004) The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. Mol Biotechnol 26:249–261. https://doi.org/10.1385/MB:26:3:249

Delacroix S, Vogelsang C, Tobiesen A, Liltved H (2013) Disinfection by-products and ecotoxicity of ballast water after oxidative treatment – results and experiences from seven years of full-scale testing of ballast water management systems. Mar Pollut Bull 73:24–36. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.06.014

Deng J, Liu C, Yu L, Zhou B (2010) Chronic exposure to environmental levels of tribromophenol impairs zebrafish reproduction. Toxicol Appl Pharmacol 243:87–95. https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.11.016

Dorey N, Maboloc E, Chan KYK (2018) Development of the sea urchin Heliocidaris crassispina from Hong Kong is robust to ocean acidification and copper contamination. Aquat Toxicol 205:1–10. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.09.006

Gharred T, Jebali J, Belgacem M, Mannai R, Achour S (2016) Assessment of the individual and mixture toxicity of cadmium, copper and oxytetracycline, on the embryo-larval development of the sea urchin Paracentrotus lividus. Environ Sci Pollut Res 23:18064–18072. https://doi.org/10.1007/s11356-016-6988-3

Gyori BM, Venkatachalam G, Thiagarajan PS, Hsu D, Clement MV (2014) OpenComet: an automated tool for comet assay image analysis. Redox Biol 2:457–465. https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.020

Halpern B, Walbridge S, Watson R (2008) A global map of human impact on marine ecosystems. Science 319:948–952. https://doi.org/10.1126/science.1149345

Hanigan D, Truong L, Simonich M, Tanguay R, Westerhoff P (2017) Zebrafish embryo toxicity of 15 chlorinated, brominated, and iodinated disinfection by-products. J Environ Sci 58:302–310. https://doi.org/10.1016/j.jes.2017.05.008

Hose JE (1985) Potential uses of sea urchin embryos for identifying toxic chemicals: description of a bioassay incorporating cytologic, cytogenetic and embryologic endpoints. J Appl Toxicol 5:245–254. https://doi.org/10.1002/jat.2550050406

Liman R, Cigerci IH, Akyil D, Eren Y, Konuk M (2011) Determination of genotoxicity of Fenaminosulf by Allium and comet tests. Pestic Biochem Physiol 99:61–64. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2010.10.006

Liu J, Zhang X (2014) Comparative toxicity of new halophenolic DBPs in chlorinated saline wastewater effluents against a marine alga: Halophenolic DBPs are generally more toxic than haloaliphatic ones. Water Res 65:64–72. https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.07.024

Manasfi T, De Méo M, Di Giorgio C et al (2017) Assessing the genotoxicity of two commonly occurring byproducts of water disinfection: chloral hydrate and bromal hydrate. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen 813:37–44. https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2016.11.009

Manasfi T, Lebaron K, Boudenne J-L (2018) Characterization of chlorination byproducts in marine waters and sediments in a semi-enclosed bay exposed to multiple industrial chlorinated effluents

McGibbon S, Moldan AGS (1986) Routine toxicity testing of toxicants using a sea urchin gamete bioassay. Mar Pollut Bull 17:68–72. https://doi.org/10.1016/0025-326X(86)90294-8

Messinetti S, Mercurio S, Parolini M, Sugni M, Pennati R (2018) Effects of polystyrene microplastics on early stages of two marine invertebrates with different feeding strategies. Environ Pollut 237:1080–1087. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.11.030

Morroni L, Pinsino A, Pellegrini D, Regoli F, Matranga V (2016) Development of a new integrative toxicity index based on an improvement of the sea urchin embryo toxicity test. Ecotoxicol Environ Saf 123:2–7. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.09.026

Mouly D, Joulin E, Rosin C et al (2009) Les sous-produits de chloration dans l'eau destinée à la consommation humaine en France 76

Nahon S, Charles F, Pruski AM (2008) Improved comet assay for the assessment of UV genotoxicity in Mediterranean sea urchin eggs. Environ Mol Mutagen 49:351–359. https://doi.org/10.1002/em.20391

Neves RAF, Contins M, Nascimento SM (2018) Effects of the toxic benthic dinoflagellate Ostreopsis cf. ovata on fertilization and early development of the sea urchin Lytechinus variegatus. Mar Environ Res 135:11–17. https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.01.014

Olive PL, Wlodek D, Banáth JP (1991) DNA Double-Strand Breaks Measured in Individual CellsSubjected to Gel Electrophoresis. Cancer Res 51:4671–4676

Pereira TM, Merçon J, Passos LS, Coppo GC, Lopes TOM, Cabral DS, Scherer R, Chippari-Gomes AR (2018) Effects of the water-soluble fraction of diesel oil (WSD) on the fertilization and development of a sea urchin (Echinometra lucunter). Ecotoxicol Environ Saf 162:59–62. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.06.040

Plewa MJ, Wagner ED, Muellner MG, Hsu KM, Richardson SD (2008) Comparative mammalian cell toxicity of N-DBPs and C-DBPs. In: Karanfil T, Krasner SW, Westerhoff P, Xie Y (eds) Disinfection by-products in drinking water. American Chemical Society, Washington, DC, pp 36–50

Richardson S, Plewa M, Wagner E et al (2007) Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: a review and roadmap for research. Mutat Res Rev Mutat Res 636:178–242. https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2007.09.001

Richardson SD, DeMarini DM, Kogevinas M et al (2010) What's in the Pool? A comprehensive identification of disinfection by-products and assessment of mutagenicity of chlorinated and brominated swimming pool water. Environ Health Perspect 118:1523–1530. https://doi.org/10.1289/ehp.1001965

Ríos JC, Repetto G, Jos A et al (2003) Tribromophenol induces the differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells in vitro. Toxicol in Vitro 17:635–641. https://doi.org/10.1016/S0887-2333(03)00110-3

Ross PM, Parker L, Byrne M (2016) Transgenerational responses of molluscs and echinoderms to changing ocean conditions. ICES Journal of Marine Science 73:537–549. https://doi.org/10.1093/icesjms/fsv254

Singer P (1999) Humic substances as precursors for potentially harmful disinfection by-products. Water Sci Technol 40. https://doi.org/10.1016/S0273-1223(99)00636-8

Taban IC, Beehmann RK, Torgrimsen S, Baussant T, Sanni S (2004) Detection of DNA damage in mussels and sea urchins exposed to crude oil using comet assay. Mar Environ Res 58:701–705. https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2004.03.018

Teixidó E, Piqué E, Gonzalez-Linares J, Llobet JM, Gómez-Catalán J (2015) Developmental effects and genotoxicity of 10 water disinfection by-products in zebrafish. J Water Health 13:54–66. https://doi.org/10.2166/wh.2014.006

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. Environ Mol Mutagen 35:206–221. https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J

Trifuoggi M, Pagano G, Guida M, Palumbo A, Siciliano A, Gravina M, Lyons DM, Burić P, Levak M, Thomas PJ, Giarra A, Oral R (2017) Comparative toxicity of seven rare earth elements in sea urchin early life stages. Environ Sci Pollut Res 24:20803–20810. https://doi.org/10.1007/s11356-017-9658-1

Tu Q, Brown CT, Davidson EH, Oliveri P (2006) Sea urchin Forkhead gene family: phylogeny and embryonic expression. Dev Biol 300:49–62. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.09.031

Villanueva CM, Cantor KP, Cordier S, Jaakkola JJK, King WD, Lynch CF, Porru S, Kogevinas M (2004) Disinfection byproducts and bladder cancer: a pooled analysis. Epidemiology 15:357–367

Villanueva CM, Cantor KP, Grimalt JO, Malats N, Silverman D, Tardon A, Garcia-Closas R, Serra C, Carrato A, Castano-Vinyals G, Marcos R, Rothman N, Real FX, Dosemeci M, Kogevinas M (2006) Bladder cancer and exposure to water disinfection by-products through ingestion, bathing, showering, and swimming in pools. Am J Epidemiol 165:148–156. https://doi.org/10.1093/aje/kwj364

Westerhoff P, Chao P, Mash H (2004) Reactivity of natural organic matter with aqueous chlorine and bromine. Water Res 38:1502–1513. https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.12.014

Xiang J, Wan C, Guo R, Guo D (2016) Is hydrogen peroxide a suitable apoptosis inducer for all cell types? Biomed Res Int 2016:1–6. https://doi.org/10.1155/2016/7343965

Yang M, Zhang X (2013) Comparative developmental toxicity of new aromatic halogenated DBPs in a chlorinated saline sewage effluent to the marine Polychaete *Platynereis dumerilii*. Environ Sci Technol 47:10868–10876. https://doi.org/10.1021/es401841t

Yıldız M, Ciğerci İH, Konuk M, Fatih Fidan A, Terzi H (2009) Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in Allium cepa root cells by chromosome aberration and comet assays. Chemosphere 75:934–938. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.01.023

Yoshioka Y, Ose Y, Sato T (1985) Testing for the toxicity of chemicals with Tetrahymena pyriformis. Sci Total Environ 43:149–157. https://doi.org/10.1016/0048-9697(85)90037-3

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

RESUME

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

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

ABSTRACT

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

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