

THESE DE DOCTORAT
présentée à
L'UNIVERSITE DE LILLE 1
Ecole Doctorale Régionale Sciences Pour l'Ingénieur Lille Nord de France



pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN SCIENCES POUR L'INGENIEUR
Dans la spécialité:
Micro- et Nanotechnologies, Acoustique et Télécommunications

par

 **Stefka STANCHEVA**

ETUDE DE L'INTERACTION ENTRE NANOPARTICULES ET LES COPEPODES

Sous la direction du Prof. Sami Souissi et du Dr. Rabah Boukherroub

Rapporteurs :

Mme Catherine MOUNEYRAC, *Professeur*, l'Université Catholique de l'Ouest
Mme Chantal PICHON, *Professeur*, Université d'Orléans

Examineurs :

Mme. Michèle TACKX, *Professeur*, Université Paul Sabatier, Toulouse
M. Tuami LASRI, *Professeur*, Université Lille 1

Soutenance le 13 JANVIER 2016



Table des matières

Remerciements.....	9
Introduction générale	11
Chapitre 1 Utilisation des nanoparticules comme vecteur de produits lipophiles pour les copépodes	12
Introduction bibliographique	12
1. Nanomédecine	12
2. Copépodes.....	13
2.1 Morphologie	13
2.2 L'alimentation	15
2.3 Reproduction	16
2.4 Développement.....	17
3. Choix de l'espèce de copépode	18
3.1 <i>Acartia tonsa</i> - Introduction générale.....	19
3.2 Raisons pour le choix d' <i>Acartia tonsa</i>	19
4. Les Hydrocarbure aromatiques polycycliques (HAPs).....	22
4.1 Présentation générale des HAPs	22
4.2 Toxicité des HAPs	22
5. Les PolyChloroBiphényles (PCBs).....	23
5.1 Présentation générale des PCBs	23
5.2 Effets toxiques des PCBs	24
6. Bisphénol A et 4-nonylphénol	25
7. Ecotoxicologie des molécules hydrophobes dans les milieux aquatiques, modes d'introduction	26
7.1 Ecotoxicologie – présentation générale	26
7.2 Introduction des polluants dans l'eau dans des solvants organiques	27
7.3 Introduction des polluants dans l'eau avec des sédiments	33
7.4 Les HAPs et <i>Acartia tonsa</i>	35
7.5 Bisphénol A et <i>Acartia tonsa</i>	37
8. Les liposomes comme vecteur de molécules pour le copépode.....	38
8.1 Introduction générale, utilisation dans la médecine	38
8.2 Interaction des liposomes avec les copépodes	39
Objectifs de mon travail de thèse	41
1. Nanocapsules lipidiques.....	42
1.1 Introduction.....	42

1.2 Synthèse des nanocapsules lipidiques	43
1.3 Encapsulation de molécules dans les nanocapsules lipidiques	45
2. Caractérisation des nanocapsules lipidiques	45
2.1 Diffusion dynamique de la lumière (DDL)	45
2.2 Stabilité des nanocapsules lipidiques	46
Partie expérimentale	50
1. Matériels	50
2. Formulation de nanocapsules lipidiques et encapsulation des HAPs et PCBs.....	50
3. Caractérisation par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)	51
3.1 Estimation du taux d'encapsulation	52
4. Taille des nanocapsules et potentiel zêta	54
5. Fuites des molécules toxiques des nanocapsules et leur stabilité dans l'eau de mer.....	55
5.1 Stabilité des LNCs chargées en HAPs dans l'eau de mer	55
5.2 Stabilité des nanocapsules chargées en 4-nonylphénol et bisphénol A dans l'eau de mer	57
6. Marquage des nanocapsules lipidiques	58
6.1 Imagerie par microscopie confocale et analyse	59
7. Etudes de la toxicité des nanocapsules lipidiques sur les copépodes	61
7.1 Tests de survie chez les copépodes	61
7.2 Etude des effets des nanocapsules vides sur les copépodes	61
7.3 Toxicité des LNCs chargées en pyrène sur les copépodes	63
7.4 Toxicité des trois HAPs	64
7.5 Comparaison avec les tests standards de toxicité des polluants hydrophobes utilisant l'acétone	65
7.6 Etude de la toxicité du bisphénol A et de 4-nonylphénol encapsulés dans des LNCs sur les copépodes <i>Acartia tonsa</i> et comparaison avec le test standard dans l'acétone.....	67
7.7 Etude de la reproduction sous exposition aux HAPs encapsulés dans des LNCs.....	69
Conclusion	71
Chapitre 2 Utilisation de nanoparticules comme vecteurs de produits nutritifs pour les copépodes.....	73
Introduction bibliographique	73
1. Aquaculture	73
1.1 Inconvénients de l'aquaculture	73

1.2 Avantages de l'aquaculture et comment réduire son impact sur l'environnement	75
1.3 Utilisation des copépodes dans l'aquaculture.....	76
1.4 Mise en culture des copépodes	79
2. Composition des micro-algues	83
2.1 Les acides gras	83
2.2 Pigments	84
2.3 Glucanes	84
3. Besoins nutritionnels des larves de poissons et propriétés nutritionnelles des copépodes, rotifères et Artémia	85
3.1 Acides aminés	85
3.2 Lipides	85
Objectifs de mon travail de thèse	87
Partie expérimentale	88
1. Synthèse des nanoparticules	88
1.1 Broyage des nanoparticules de polysaccharide	88
1.2 Principe du broyage planétaire	88
1.3 Les règles à suivre pour garantir le succès du broyage	90
2. Nanoparticules de polysaccharides.....	90
2.1 Les polysaccharides	90
2.2 Matériaux et méthodes	91
2.3 Choix des polysaccharides les mieux adaptés pour les études sur le copépode <i>Acartia tonsa</i>	91
2.4 Survie des copépodes et choix de vecteur.....	92
3. Caractérisation des nanoparticules d'amidon	93
3.1 Optimisation du broyage pour les nanoparticules d'amidon	94
3.2 Microscopie électronique à balayage (MEB)	95
3.3 Microscopie électronique en transmission (MET)	96
3.4 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)	98
3.5 Analyse thermogravimétrique (ATG).....	101
3.6 La spectroscopie de photoélectrons X (XPS)	102
3.7 Stabilité des nanoparticules d'amidon de 200 et de 80 nm dans l'eau de mer à salinité 35.....	103
4. Choix de la molécule d'intérêt.....	104
4.1 Vitamine C.....	104
4.2 Glutathion	107
4.3 La vitamine B12.....	109

4.4 Bétaïne.....	113
5. Effets des différents paramètres sur le taux de reproduction	117
5.1 Effets de la taille des nanoparticules d'amidon sur la reproduction des copépodes.....	117
5.2 Taux de reproduction en variant la concentration de la molécule d'intérêt	119
5.3 Taux de reproduction pour les mélanges de molécules d'intérêt (vitamine C, bétaïne et vitamine B12)	121
5.4 Ajout de molécules sensibles après le broyage des nanoparticules d'amidon	123
5.5 Estimation de la stabilité des nanoparticules d'amidon fonctionnalisées.....	125
5.6 Estimation de la ponte et l'éclosion pour des grands volumes	126
6. Imagerie confocale des copépodes incubés avec des nanoparticules d'amidon fonctionnalisées avec la rhodamine 123.....	127
7. Enrichissement d'Artémia avec des nanoparticules d'amidon fonctionnalisées	129
8. Les acides gras et les copépodes : utilisation dans l'aquaculture	131
8.1 Copépodes riches en acides gras.....	131
8.2 Nanocapsules lipidiques des acides gras.....	132
8.3 Objectifs de mon travail	133
8.4 Matériels et méthodes	133
Conclusion.....	136
Conclusion générale.....	137
Perspectives	139
ANNEXE 1.....	149
ANNEXE 2.....	151
ANNEXE 3.....	153
ANNEXE 4.....	155
ANNEXE 5.....	157
ANNEXE 6.....	158
ANNEXE 7.....	160

Remerciements

En préambule à ce mémoire, je tiens tout d'abord à rappeler que ces travaux de thèse ont été réalisés à l'Institut d'électronique, de microélectronique et de nanotechnologie (IEMN, UMR CNRS 8520) de Villeneuve d'Ascq dans le groupe Nanobiointerfaces et au Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences (UMR CNRS 8187) de la Station Marine de Wimereux. Cette thèse a été financée par la Plateforme d'Innovation Nouvelles Vagues présidée par Philippe Droin.

J'adresse mes remerciements à Madame Catherine Mouneyrac et Madame Chantal Pichon de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail de thèse en tant que rapporteurs. Mes remerciements sont également adressés à Monsieur Tuami Lasri et Madame Michèle Tackx qui ont accepté d'être membres du jury.

Je tiens à remercier Sami Souissi pour m'avoir accordé sa confiance et donné une grande liberté dans la réalisation de cette thèse. Je le remercie pour son suivi constant et pour avoir contribué à enrichir ma culture scientifique. J'exprime ma sincère gratitude à Rabah Boukherroub pour son suivi tout au long de cette thèse et pour les encouragements.

Je voudrais également exprimer ma reconnaissance à Alexandre Barras pour m'avoir formée à la plupart des techniques de synthèse et de caractérisation, pour son soutien ainsi que pour sa sympathie. Il a toujours trouvé une solution à chaque problème technique ou scientifique. Je le remercie pour sa gentillesse et sa bonne humeur.

Je tiens également à remercier Anissa Souissi qui m'a formée sur la vie et le maintien de copépodes, en me fournissant notamment des informations introuvables dans la littérature scientifique.

Je souhaite par ailleurs remercier à Olivier Poline qui a cru dans notre projet et qui m'a accordée cette bourse ainsi que à Jean-Michel Facqueur pour son accompagnement après le départ de M. Poline.

Je tiens à remercier Corentin Spriet pour ses conseils sur la microscopie confocale. Je tiens également à remercier Ali Ibrahim pour les bons moments passés en essayant de trouver la meilleure position du copépode pour l'imagerie et ses nombreuses discussions sur la recherche et l'avenir.

Je voudrais également remercier Christian Slomianny pour ces conseils et Loïc Brunet pour les caractérisations de microscopie électronique en transmission. De même, je

remercie Yannick Coffinier pour ses conseils et sa disponibilité lors des caractérisations par microscopie électronique en balayage.

J'adresse des remerciements privilégiés à Nadia Skandrani et Manakamana Khanal (Manu) pour les bons moments passés. Je les remercie pour toutes les longues discussions que nous avons partagées, mais surtout pour notre forte complicité ainsi que pour les innombrables fous rires.

Mes remerciements vont évidemment à tous mes collègues doctorants, ex-doctorants et post-doctorants qui m'ont accompagné durant cette thèse : Amer, Wang Qi, Wang Qian, Florina, Roxana, Houcem, Aleksandra, Faouzia, Quentin, Aderrahmane, Corina, Ioana, Ahmed, Mélanie, Monaam, Vishwa, Adam et tous les autres. Je tiens à remercier Camille Ferrant et Marion Roussin, deux stagiaires qui ont participé à l'étude de ce projet de thèse.

Ces remerciements ne s'achèvent pas sans une pensée pour mon cher époux (correcteur des fautes d'orthographe de cette thèse !) et son soutien moral quotidien aussi bien dans mon travail que dans ma vie privée. Il m'a toujours encouragée à aller de l'avant, malgré la distance avec mes proches.

Pour finir, je remercie les personnes sans qui je n'en serais pas arrivée là, mes parents. Je les remercie infiniment d'avoir contribué à l'accomplissement de ce doctorat.

A mes parents, je dédie cette thèse...

Introduction générale

Le présent travail de thèse concerne l'utilisation de nanoparticules pour la vectorisation de différentes molécules dans les copépodes. Les copépodes sont des petits crustacés qui font partie du zooplancton, ce qui en fait la nourriture naturelle de beaucoup de larves de poissons marins. Dans les écloseries marines, l'utilisation des copépodes comme nourriture pour les larves de poisson est très limitée. La raison est liée à la difficulté de mise en culture industrielle des copépodes.

L'objectif de cette étude est d'utiliser des nanoparticules pour vectoriser des molécules à effets bénéfiques ou toxiques dans les copépodes.

Ce travail de thèse est donc divisé en deux parties. Le premier chapitre traite de l'utilisation des nanoparticules pour la vectorisation de molécules lipophiles dans les copépodes. Nous proposons des nanocapsules lipidiques connues en nanomédecine pour la vectorisation de médicaments. Nous allons utiliser ces nanocapsules lipidiques pour encapsuler des produits toxiques et les incuber en présence de copépodes. Il est important que ces nanoparticules soient stables dans l'eau à salinité élevée, c'est pourquoi nous allons étudier leur stabilité avant de les tester sur les copépodes.

La deuxième partie de ce travail concerne les nanoparticules pour la vectorisation de molécules ayant des effets bénéfiques pour les copépodes. Très souvent, ce sont des vitamines hydrophiles, il est donc délicat d'utiliser des nanocapsules lipidiques pour leur encapsulation. Nous proposons une méthode de synthèse en grande quantité de nanoparticules de polysaccharides. Ces nanoparticules sont ensuite fonctionnalisées avec les molécules bénéfiques pour augmenter la fécondité des copépodes. Le but étant ici d'augmenter les performances des copépodes en utilisant ces nanoparticules fonctionnalisées.

Chapitre 1 Utilisation des nanoparticules comme vecteur de produits lipophiles pour les copépodes

Introduction bibliographique

1. Nanomédecine

La nanomédecine est un domaine scientifique relativement récent. En interagissant avec des molécules biologiques à l'échelle nanométrique, les nanotechnologies ouvrent un vaste champ d'applications et de recherches. Les nanomatériaux ont des propriétés physiques différentes des matériaux microscopiques car le ratio surface/volume n'est pas le même.

La nanomédecine possède un énorme potentiel en termes de développement de nouvelles méthodes curatives, préventives et de diagnostic, mais reste un secteur très restreint car elle comporte des risques. En effet, les nanoproduits utilisés possèdent des propriétés particulières dus à leur taille nanométrique ou à la reconfiguration de leurs atomes. Certaines nanoparticules peuvent s'accumuler dans les organes sans que leur élimination soit possible. Une mesure méticuleuse des risques et des composants doit donc être prise avant tout traitement.

La nanomédecine peut être divisée en trois domaines.¹

Le premier domaine implique le diagnostic qui peut être *in vivo* et *in vitro*. En effet, les nanoparticules synthétisées ou les dispositifs permettent une reconnaissance des différents biomolécules. D'autre coté, il existe des nanoparticules, des assemblages moléculaires synthétiques qui sont conçus comme des agents de contraste en imagerie.

Le second domaine d'application implique la nanotechnologie destinée au support ou au remplacement de certains organes dans le corps (nanomatériaux biocompatibles).

Le troisième domaine implique le développement des « nanomédicaments ». Ce sont des nanoparticules conçues pour la vectorisation et la délivrance des principes actifs. Cela permet de mieux cibler les sites à traiter dans le corps.

C'est ce dernier domaine que nous avons choisi de développer dans notre étude mais en utilisant des organismes marins comme les copépodes.

2. Copépodes

Le plancton représente tous les organismes vivants dans les eaux douces, saumâtres et salées et souvent de petites tailles et qui sont incapables de lutter contre un fort hydrodynamisme.

Il existe deux types de plancton : le plancton animal (zooplancton) et le plancton végétal (phytoplancton). Les copépodes sont des petits crustacés pouvant se trouver sous formes libres et parasites, vivant dans l'eau de mer et l'eau douce. Il existe des milliers d'espèces de copépodes qui peuvent se développer dans tous les milieux aquatiques, de l'océan jusqu'aux petits étangs², aux températures différentes.

Les copépodes jouent un rôle essentiel dans les réseaux trophiques pélagiques et dans le fonctionnement des écosystèmes aquatiques en général.³ Ils sont la plus importante source de protéines et de biomasse dans les océans. Ils sont la source majeure de nourriture pour la plupart des poissons économiquement importants. Ils sont très largement répandus et considérés comme les organismes pluricellulaires les plus abondants de la planète. Il existe plus de 21 000 espèces de copépodes.⁴

2.1 Morphologie

Le mot « copépode » vient du grec : *kope* qui signifie rame et *podos* qui signifie pied. Les copépodes sont des petits crustacés. A l'âge adulte, ils mesurent entre un et deux millimètres mais il existe des espèces dont la taille varie entre 0.2 mm et 10 mm.

La structure morphologique des copépodes varie énormément selon les espèces, mais celles qui vivent librement (hormis les parasites) ont de nombreuses caractéristiques communes (**Figure 1.1**). Le corps est souvent court et cylindrique constitué d'une tête, d'un thorax et d'un abdomen. Il est divisé en 16 segments : les 6 premiers segments forment la tête. Les 5 segments qui suivent forment le thorax. Enfin les 5 derniers segments composent l'abdomen.

La tête et le thorax forment ensemble une partie appelée céphalothorax ou corps antérieur et l'abdomen forme le corps postérieur. Chez certaines espèces, il arrive parfois que le dernier segment thoracique fasse partie de l'abdomen.

Chaque segment du céphalothorax porte une paire d'appendices. Le premier segment porte deux antennules. Le second segment porte deux grandes antennes.

Au niveau du céphalosome - une sorte de « bouclier » sur la tête - on trouve 4 paires d'appendices entourant la bouche et servant à capturer de la nourriture. Chaque segment thoracique est associé à une paire de pattes.

La cinquième et dernière paire de pattes (celle qui se trouve à l'arrière), qui se distingue des autres morphologiquement selon le sexe considéré, est souvent plus développée chez le mâle. Les segments abdominaux sont dépourvus d'appendices. Le premier segment abdominal porte les orifices génitaux. Le dernier segment porte l'anus ainsi que deux extensions plus ou moins développées formant la furca.

La furca doit être considérée comme un ultime segment abdominal plutôt que comme une paire d'appendices.

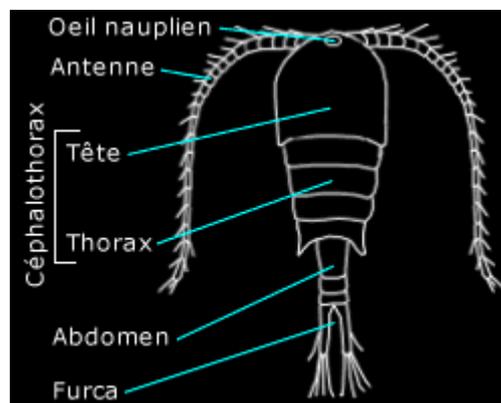


Figure 1.1 – La morphologie des copépodes (schéma Stéphane Gasparini (Observatoire Océanologique de Villefranche-sur-Mer))

2.2 L'alimentation

Le type d'alimentation des copépodes dépend de l'espèce, de l'âge, des saisons et du milieu dans lequel ils vivent.

Les copépodes herbivores se nourrissent avec du phytoplancton : ils mangent les microalgues en faisant des petits sauts dans l'eau. Ils utilisent leurs micro-appendices buccaux comme un tamis pour ingérer la nourriture. Les principales proies sont des petites algues unicellulaires (de 5 à 50 μm) appelées microalgues. Dans notre étude nous avons utilisé 3 espèces de microalgues cultivées au laboratoire— *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri* et *Rhodomonas baltica*.

Ces microalgues sont dotées de flagelles qui les aident à se déplacer par propulsion (**Figure 1.2**). Leur reproduction s'effectue souvent par division des cellules. Nous avons choisi de travailler avec les algues *Isochrysis galbana* et *Pavlova lutheri* – dont les souches mères proviennent du laboratoire LOG – Station Marine de Wimereux - car il est possible de les garder en culture dans l'eau de mer artificielle. De plus, elles peuvent servir de nourriture suffisante pour l'espèce de copépode *Acartia tonsa*. Nous avons également utilisé l'algue *Rhodomonas baltica*, mais celle-ci est difficile à manipuler surtout dans de l'eau de mer synthétique.

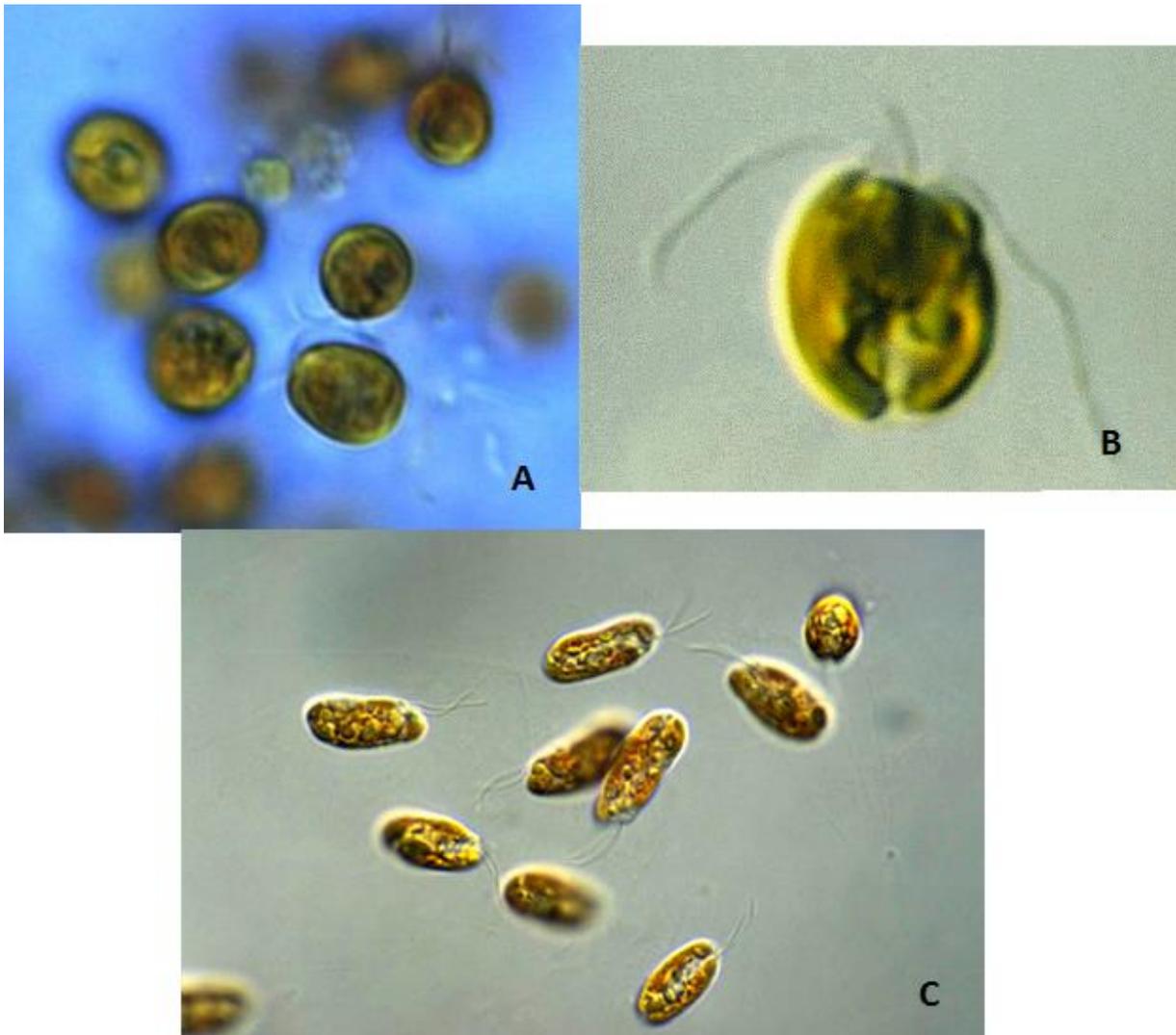


Figure 1.2 – Image microscopique de A – *Isocrysis galabana* ; B – *Pavlova lutheri* ; C -*Rhodomonas* spp. (Algae database, web)

Il existe des copépodes carnivores qui ne filtrent pas l'eau, mais qui utilisent un mécanisme spécial pour détecter leurs proies par leurs mouvements ou leurs effluves chimiques. Un autre type de copépodes est représenté par des organismes omnivores qui peuvent être carnivores ou herbivores selon leur environnement.

2.3 Reproduction

Toutes les espèces de copépodes ont des sexes séparés et leur reproduction nécessite un accouplement. La reproduction dépend fortement du rythme et de l'abondance des ressources nutritives et de la température.

Le mâle est attiré par les phéromones émises par la femelle. Grâce à ces phéromones, il peut repérer une femelle à plus de 10 cm, soit plus de 100 fois sa propre taille. Dès qu'il repère la femelle, il s'en approche et tente de l'attraper en utilisant sa cinquième paire de pattes (crochets), ainsi que son antenne géniculée (son organe génital). Il dépose ensuite une poche de liquide séminal (dit spermatophore), puis relâche la femelle. L'accouplement peut durer un moment en fonction des espèces.

2.4 Développement

Le développement des copépodes passe par 12 stades distincts répartis en 6 stades naupliens (classés de N1 à N6, ces premiers stades de la vie qui représentent la phase larvaire), 6 stades copépodites (classés de C1 à C5, ils représentent la phase juvénile pendant laquelle se fait la séparation des deux sexes), puis le stade adulte noté souvent C6 (**Figure 1.3**). Pour passer d'un stade à l'autre, le copépode doit muer en enlevant son ancienne carapace et en la remplaçant par une nouvelle.

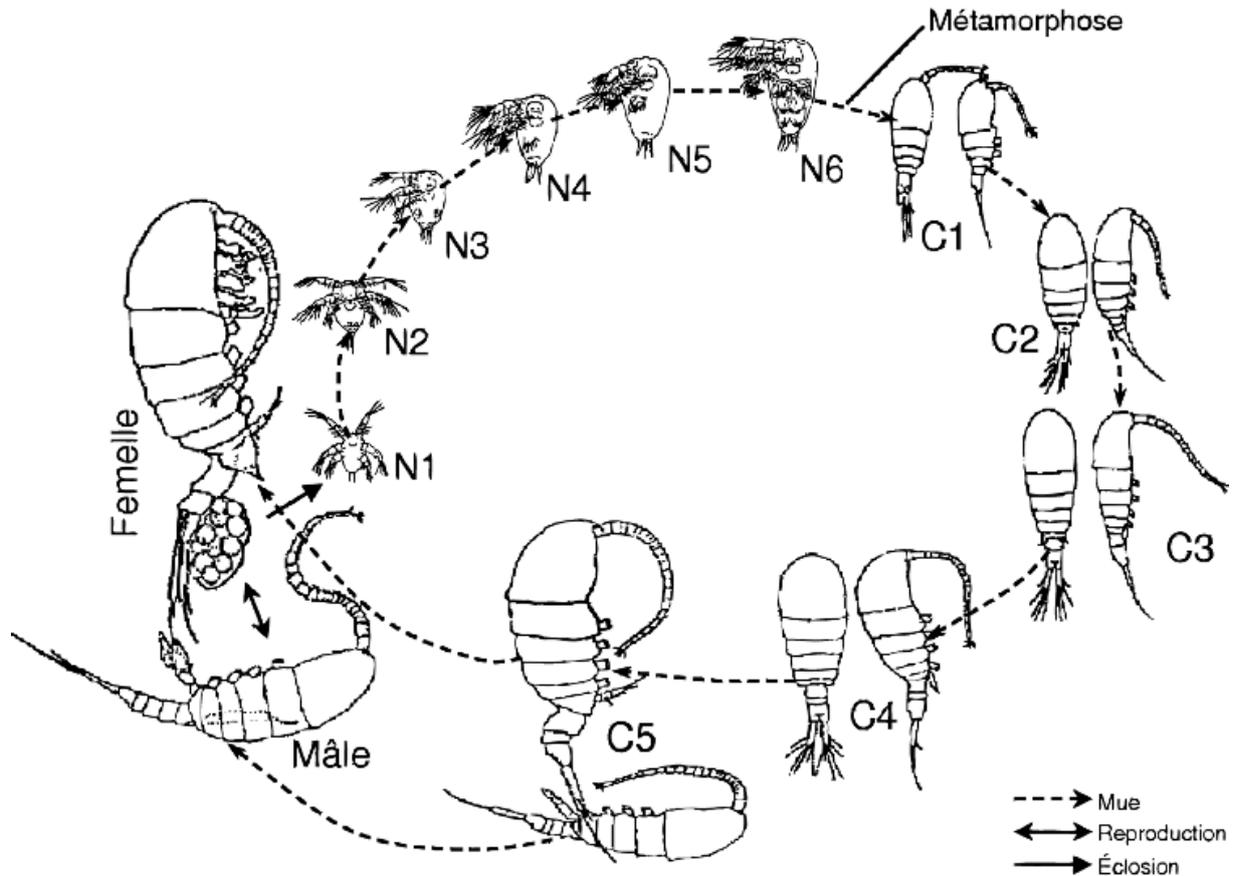


Figure 1.3 – Développement du copéptide *Eurytemora affinis* de l'œuf à l'âge adulte.⁵

La durée de développement des copépodes (du stade nauplien au stade adulte) est fortement influencée par la température, par l'abondance et la qualité de la nourriture. Par exemple pour les petites espèces qui occupent les zones tropicales, le passage de l'œuf à l'âge adulte peut prendre quelques jours, alors que celui des espèces vivant dans les zones arctiques ou antarctique peut prendre jusqu'à quelques mois.

3. Choix de l'espèce de copéptide

Dans mon travail de thèse on s'était intéressé particulièrement au copéptide *Acartia tonsa* (Figure 1.4)

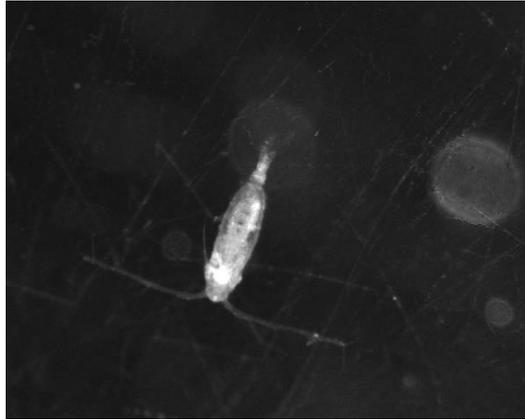


Figure 1.4 – Copépode *Acartia tonsa* (image en microscopie optique)

3.1 *Acartia tonsa* - Introduction générale

Pour comprendre pourquoi nous avons sélectionné *Acartia tonsa*, il est important d'en expliquer les caractéristiques. Les *Acartia tonsa* sont de petits crustacés dont la taille varie de 0,5 à 1,5 mm de long. Ils sont translucides à symétrie bilatérale et peuvent être différenciés des autres espèces de copépodes par leurs longues antennes (au moins la moitié de la longueur de leur corps) ainsi que par la présence d'un joint entre le cinquième et le sixième segments du corps.⁶ Le corps d'*Acartia tonsa* a une carapace de protection comprenant trois segments : le prosome (tête et les organes sensoriels), le métasome (les jambes et les pattes natatoires) et l'urosome (où sont situés leurs organes sexuels). Le cycle de vie et le développement de ce copépode est typique. Les œufs fécondés sont sphériques, d'environ 70-80 μm de diamètre et couverts de courtes épines.

3.2 Raisons pour le choix d'*Acartia tonsa*

Nous avons donc choisi le copépode *Acartia tonsa* pour plusieurs raisons. La première raison est que c'est un copépode calanoïde qui nage librement dans l'eau et qui est répandu partout dans le monde.

La seconde raison est que cette espèce peut tolérer une large gamme de températures et de salinités. Elle peut survivre à des changements soudains. Cependant, ces

copépodes sont le plus souvent trouvés jusqu'à 50 mètres de profondeur et par des températures variant entre 17 à 25°C.⁷

La troisième raison est que les deux sexes sont facilement différenciables. Les femelles sont souvent plus grandes que les mâles (**Figure 1.5**) et leurs antennes sont plus longues et droites. Les antennes des mâles sont courbées : ils les utilisent pour saisir la femelle pendant l'accouplement. Les mâles et femelles peuvent également être différenciés en fonction de la morphologie de leurs urosomes. Les urosomes des mâles ont cinq somites, celles des femelles en ont quatre.⁸



Figure 1.5 – Copépode *Acartia tonsa*; A- male B- Femelle (Photo IMPAQ (Université de Roskilde))

La quatrième raison est que les œufs, pondus directement dans l'eau, sont relativement faciles à différencier et à manipuler. Ils se développent et éclosent en nauplii en près de 48 heures à 18°C. Si l'eau est très froide, les œufs se déposent au fond et stoppent leur développement embryonnaires et deviennent des œufs 'quiescents' (une sorte de dormance). L'éclosion arrive lorsque la température de l'eau dépasse 10°C. Le développement de ces copépodes passe par six stades nauplii avant d'atteindre la phase copépodite. Ensuite, les copépodes se métamorphosent à travers six étapes supplémentaires pour enfin devenir adultes.⁹

La reproduction de cette espèce dépend de la quantité de lumière, de la température, de la salinité et de la concentration de l'oxygène. Il y a souvent un pic de reproduction au début du printemps si les conditions sont optimales, mais ces copépodes peuvent se reproduire toute l'année. Plusieurs générations sont produites par saison de reproduction. Les femelles vivent entre 70 et 80 jours, alors que les males vivent seulement 15 jours.¹⁰

Les individus de cette espèce passent la plupart de la journée dans des eaux profondes (environ 50 mètres voire plus) afin d'éviter les prédateurs. Dans la nuit ils montent vers des eaux moins profondes. La présence de poissons prédateurs peut perturber leurs habitudes de déplacement. Cette espèce utilise un ensemble d'antennes sensorielles pour connaître leur environnement. Ces antennes détectent les vibrations, les particules alimentaires, les produits chimiques ou des compagnons à proximité. Le copépode *Acartia tonsa* a des yeux simples incapables de voir des images complètes, mais très photosensibles.

La cinquième raison du choix de ce copépode réside dans son rôle important dans le réseau trophique océanique. Il se nourrit d'algues mais ils peut également se nourrir de nauplii d'autres espèces comme la *Canuella perplexa*.¹¹ Il peut aussi manger ses propres œufs s'ils deviennent trop nombreux.¹² *Acartia tonsa* est une source de nourriture pour les poissons et les grands mammifères. Ces copépodes pélagiques peuvent par endroit représenter entre 55 et 95% des populations de copépodes. Ils jouent un rôle important dans le cycle des nutriments et de l'énergie dans les écosystèmes marins.⁸

Acartia tonsa est la nourriture principale de nombreuses espèces de poissons dont la culture représente une part considérable de l'économie de nombreux pays. Ils peuvent être cultivés dans des étangs pour fournir la nourriture aux larves de poissons. Ces copépodes peuvent aussi limiter la prolifération d'algues sur les zones côtières, comme les marées rouges qui peuvent présenter une menace pour l'homme.¹³ En revanche, si ces copépodes se suralimentent par certaines algues produisant des toxines, ils peuvent nuire à l'alimentation et à la croissance de nombreuses espèces mollusques et de poissons marins dont les industries dépendent.¹³

L'*Acartia tonsa* est sujet de certaines menaces. Par exemple, il a été prouvé que qu'il sert d'hôte intermédiaire pour l'ectoparasite, *Probopyrus pandalicola*, dont l'hôte

définitif est la crevette d'eau douce. Il existe aussi un virus typique pour cette espèce : l'AtCopCV qui peut diminuer les populations de façon significative.¹⁴

Acartia tonsa rassemble donc toutes les conditions nécessaires pour être un modèle d'étude de toxicologie¹⁵ et d'aquaculture¹⁶ chez les copépodes. De plus, il est adaptable aux conditions de vie dans l'eau de mer synthétique.

4. Les Hydrocarbure aromatiques polycycliques (HAPs)

4.1 Présentation générale des HAPs

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) sont des produits chimiques hautement toxiques qui contiennent du carbone et de l'hydrogène. Ils sont composés de multiples cycles aromatiques (**Figure 1.6**). Les HAPs sont neutres, non polaires et peuvent être produits lors de la combustion des carburants. Il existe deux sources de contamination par les HAPs : naturelle ou anthropogénique (provenant de l'activité humaine). Parmi les sources naturelles de contamination, on peut citer les éruptions volcaniques ou la combustion incomplète de la biomasse lors d'incendies de forêts. Cependant, la plupart des contaminations par HAPs sont de source anthropogénique comme la production industrielle (aluminium, ciment, pétrochimie), le chauffage, le transport, le traitement des déchets et l'agriculture.¹⁷

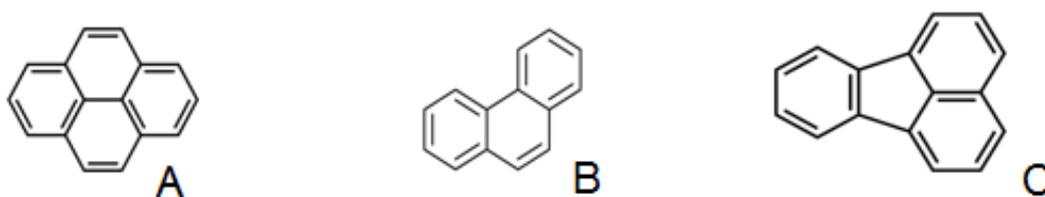


Figure 1.6– Formule chimique de quelques HAPs : A – pyrène, B – phénanthrène, C – fluoranthène (utilisés dans notre étude).

4.2 Toxicité des HAPs

La plupart des HAPs sont peu, voire pas solubles dans l'eau. Leur solubilité diminue quand leur masse moléculaire augmente. Ainsi, les HAPs sont résistants à la biodégradation et donc persistent dans les environnements aquatiques et s'accumulent

chez plusieurs organismes de la chaîne alimentaire. Par conséquent, ces produits représentent une menace à long terme pour la santé humaine. Ils peuvent être des facteurs de risques élevés de cancers,¹⁸ de perturbations du système endocrinien ou de problèmes dans le développement prénatal.^{19, 20} La toxicité des HAPs dépend de leur structure. Il est démontré aussi que leur toxicité augmente avec leur nombre de cycles aromatiques.²¹

L'exposition aux HAPs induit des dommages cytogénétiques. Une étude a montré que des personnes exposées aux polluants environnementaux comme les HAPs ont été associées à des changements d'ADN comportant des aberrations chromosomiques¹⁹ et des lésions de l'ADN.²²

De nombreux HAPs ont des propriétés immunotoxiques. Les mécanismes cellulaires et biochimiques qui se produisent pendant l'immunosuppression ne sont pas établis, mais il est démontré que les HAPs peuvent modifier le système immunitaire des mammifères.²³

5. Les PolyChloroBiphényles (PCBs)

5.1 Présentation générale des PCBs

Les PCBs sont des produits chimiques organiques chlorés autrefois largement utilisés pour leur grande stabilité thermique et leurs caractéristiques électriques, notamment comme isolants électriques pour transformateurs et condensateurs.

Ils contiennent deux cycles de six atomes de carbone liés par une seule liaison carbone-carbone. La molécule comprend donc 12 atomes de carbone, et des atomes de chlore qui se substituent aux atomes d'hydrogène sur une ou plusieurs des dix positions possibles (**Figure 1.7**). C'est un groupe de 209 composés aromatiques dérivés du biphényle. Leur utilisation est interdite en France.

Après leur apparition dans les années 1950s, ces produits se sont rapidement avérés nocifs pour l'environnement et pour l'homme. Comme les HAPs, ces produits sont insolubles dans l'eau,²⁴ mais solubles dans la plupart des solvants organiques, et dans les huiles végétales. Ils sont stables, pratiquement pas biodégradables (ils sont

classés dangereux pour l'environnement) et cumulables dans la chaîne alimentaire (concentration dans les tissus vivants).

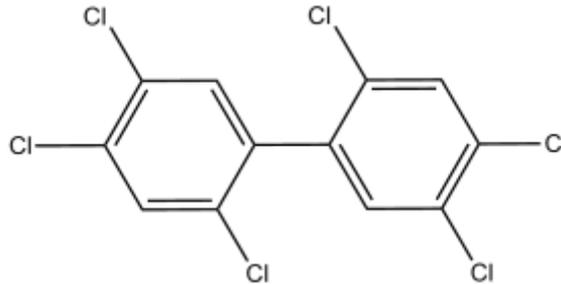


Figure 1.7– Structure chimique de PCB 153.

5.2 Effets toxiques des PCBs

Les effets toxiques des PCBs sont multiples. Ce sont indirectement des substances cancérogènes²⁵ : elles agissent comme promoteurs généraux du cancer. En effet, les PCBs agissent pour amplifier les effets d'autres substances cancérogènes par génération d'espèces réactives d'oxygène. Cela peut induire un changement des gènes et causer un cancer.

L'exposition aux PCBs peut supprimer à la fois l'anticorps (immunoglobulines) et la réponse immunitaire cellulaire. Cela peut provoquer des infections fréquentes. Ces effets peuvent être observés même après exposition à des doses très faibles. Les personnes exposées aux PCBs souffrent plus souvent de maladies infectieuses.²⁶

Une exposition prénatale aux PCBs engendre des effets néfastes sur la fonction intellectuelle chez les nourrissons et les jeunes enfants.²⁷ On a observé des effets sur le développement cognitif d'enfants nés de mères qui avaient consommé de l'huile de riz contaminée à Taiwan en 1976.²⁸

Les hormones thyroïdiennes ont une structure similaire à celle des PCBs, à la différence qu'à la place du chlore, il y a de l'iode sur les deux cycles phényles. Il a été démontré que les PCBs peuvent interférer avec l'hormone thyroïdienne sur plusieurs sites.²⁹

Aujourd'hui, l'utilisation de ces produits est contrôlée et réduite dans beaucoup de pays en raison des risques pour l'environnement. Ce sont des substances très persistantes qui restent dans l'environnement et dans l'organisme humain.

6. Bisphénol A et 4-nonylphénol

Le bisphénol et le nonylphénol sont des polluants des polluants dangereux pour les populations marines.³⁰ Ces deux molécules sont des perturbateurs endocriniens. En effet, leur structure ressemble beaucoup (**Figure 1.8**) à celle de l'hormone estradiol et ils sont capables de faire une liaison chimique et d'activer le récepteur d'estrogène sans que cette molécule soit présente.³¹ Le nonylphénol est un composé qui apparaît dans la nature après la dégradation de surfactants nonioniques.³² Le bisphénol A est utilisé pour la production des produits à base de plastique. Leur utilisation est aujourd'hui interdite en Europe.³³

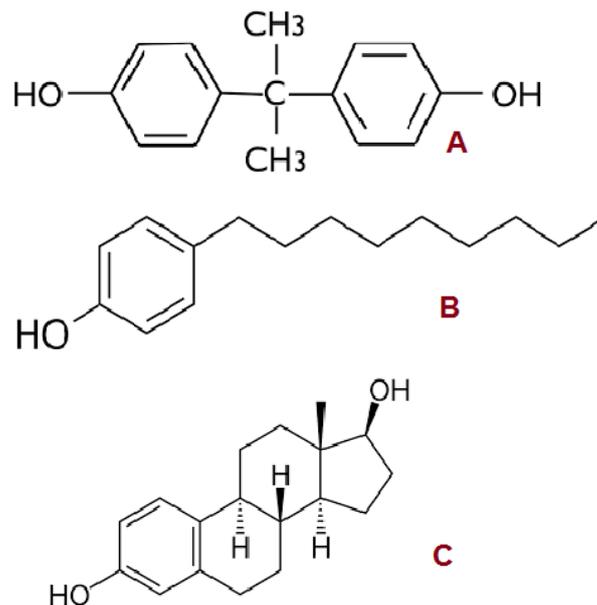


Figure 1.8 - Structures chimiques de **A** – bisphénol A ; **B** – 4-nonylphénol ; **C** – estradiol

Depuis près de 30 ans, de nouveaux polluants aussi appelés « polluants émergents » inquiètent et soulèvent de nouvelles questions quant à leurs conséquences et leur devenir à long terme. Les activités anthropiques sont largement en cause de cette

croissance exponentielle du rejet de contaminants dans la nature et, plus précisément, dans les eaux usées et donc, dans les eaux courantes. D'ailleurs, l'utilisation de certains d'entre eux est même aujourd'hui soumise à des lois restrictives. La population humaine est potentiellement en contact permanent avec des composés chimiques présents dans les objets du quotidien. Parmi ces composés, on peut citer le bisphénol A ou des alkylphénols.³⁴ Le bisphénol A est connu pour être utilisé dans la fabrication de résines époxy ou de plastiques polycarbonés.

En outre, la présence de nonylphénol est prouvée dans des produits comme le produit vaisselle ou la lessive.³⁵ Les études le montrent principalement nocif pour les femmes enceintes et les jeunes enfants en raison de son rôle de perturbateur endocrinien.³⁶

7. Ecotoxicologie des molécules hydrophobes dans les milieux aquatiques, modes d'introduction

7.1 Ecotoxicologie – présentation générale

L'écotoxicologie, est l'étude des effets des produits chimiques toxiques sur les organismes biologiques, les populations et l'écosystème. C'est un domaine interdisciplinaire qui intègre la toxicologie et l'écologie.

Il existe deux types d'effets négatifs sur les organismes. Ils dépendent de la manière dont ils sont exposés :

- Toxicité aiguë : elle s'exprime avec les effets néfastes résultants d'une seule exposition à une substance ou d'une exposition limitée à 24 heures (ou une période courte en général).
- Toxicité chronique – apparition d'effets indésirables suite à une exposition à long terme à un produit toxique ou à des facteurs de stress. Elle peut se manifester par des maladies mortelles à terme, mais aussi par des handicaps comme la diminution de la performance de nage, des problèmes liés à la croissance, ou à la reproduction.

7.2 Introduction des polluants dans l'eau dans des solvants organiques

Plusieurs études ont été effectuées sur les effets des différents HAPs sur les copépodes et d'autres zooplanctons. Le problème principal de ces produits pour les études dans les milieux aquatiques est qu'ils ne sont pas solubles dans l'eau. Ainsi, pour les introduire dans l'eau, les chercheurs utilisent généralement de l'acétone ou d'autres solvants organiques qui peuvent être également toxiques. Ces polluants peuvent également être introduits par des sédiments.

a. Les HAPs et les études écotoxicologiques sur le zooplancton

Les chercheurs de Aarhus University³⁷ ont étudié les effets des HAPs sur le copépode planctonique et arctique *Calanus hyperboreus* en les introduisant à l'aide de l'acétone. En effet, cette espèce de copépode a un métabolisme très lent et une nutrition riche en lipides. C'est une espèce clé dans les régions de l'Arctique en raison de son abondance et de son rôle dans la chaîne alimentaire de l'Arctique. C'est pour cela que le risque de bioaccumulation de composés issus de pétrole est plus élevé.

Les effets des HAPs ont été étudiés sur la reproduction et la mortalité des femelles de *Calanus hyperboreus*. Le phénanthrène, le pyrène et le benzo(a)pyrène ont été dissous dans l'acétone et les solutions ont été conservées à 5°C. Par la suite, les femelles ont été incubées en présence de phénanthrène (111, 50 et 10 nM), pyrène (57, 28 et 6 nM) et le benzo(a)pyrène (10, 5 et 1 nM) pendant trois jours avec et sans huile de maïs. Les copépodes issus de chaque traitement ont été analysés afin de déterminer la concentration de HAPs accumulés. Les extractions et les analyses HPLC ont été réalisées en ajoutant 1 mL de méthanol par copépode. Les résultats ont montré que pour les concentrations les plus élevées testées, il a été observé une faible bioaccumulation de HAPs chez les femelles. Il a donc été démontré qu'en présence d'huile dans l'eau, l'accumulation de HAPs diminue. En effet, les HAPs ont tendance à se mettre dans la phase huileuse et deviennent ainsi moins accessibles pour les copépodes.

Les copépodes ensuite été transférés dans de l'eau propre. Après 77 jours, des HAPs étaient encore présents dans leur corps [nous ne pouvons cependant pas tirer de conclusions hâtives sur les effets des HAPs sur d'autres espèces, car elles ont chacune un métabolisme qui leur est propre].

Une étude sur le développement de nauplii de deux autres espèces arctiques a été entreprise sur le *Calanus finmarchicus* et *Calanus glacialis*.³⁸ Le taux de croissance a été réduit et la mortalité au stade nauplius a augmenté. La population de ces copépodes a donc diminué.

Une autre étude démontre des effets négatifs sur le comportement natatoire des copépodes exposés aux HAPs.³⁹ Ces travaux montrent des résultats portant sur les effets immédiats de l'exposition du copépode calanoïde *Eurytemora affinis* aux HAPs à une concentration sublétales, notamment leur comportement natatoire en trois dimensions. Les concentrations de ces contaminants 40ng/L pour un mélange de HAPs de poids moléculaire moyen. Les expériences ont été faites en enregistrant la nage des copépodes en utilisant des caméras spéciales dans des aquariums de 1L. Ces expériences ont été menées de nuit et sans nourriture pour que cela corresponde à l'activité de l'espèce. Puis, le comportement natatoire a été étudié : la vitesse de nage, la trajectoire, la fréquence et le degré d'occupation. Pour une concentration de HAPs de 40ng/L, le comportement de nage des adultes montre une augmentation à la fois de la vitesse et de l'activité. Dans la plupart des cas, les effets étaient observables dans les 30 minutes d'exposition et ont persisté après une période de dépuración dans l'eau non contaminée de durée similaire. Sachant que le comportement natatoire des copépodes représente un élément fondamental pour leur écologie, car il leur sert de moyen de détection de la nourriture ou d'un congénère mais également pour échapper à un prédateur. Par conséquent la perturbation du comportement natatoire 'normal' d'un copépode par la présence d'un polluant pourrait avoir un impact négatif sur la population.

Il existe de nombreuses études sur les effets des HAPs sur différentes espèces de copépodes. Dans tous les cas, une toxicité élevée et des effets souvent négatifs sur la reproduction ont été observés. Par exemple, des effets négatifs considérables sur la reproduction des *Eurytemora affinis* exposés à 1mg/L de naphthalène pendant 24 heures ont été observés.⁴⁰ De nombreuses études portent sur l'influence de la lumière UV sur la toxicité des HAPs.^{41 42} Il est essentiel de prendre en compte ces conditions dans l'analyse de la toxicité d'un composé pour les copépodes ou d'autres espèces marines.

De plus, ces composés toxiques sont très souvent introduits dans l'eau à l'aide d'acétone. Ce produit étant déjà toxique, il complique les études d'écotoxicologie des

molécules lipophiles en milieu aquatique. Il est donc nécessaire d'utiliser une autre méthode d'introduction.

b. La toxicité des PCBs sur les copépodes

Feng et al. ont décrit la toxicité chronique et aiguë du PCB 126 sur le copépode *Tigriopus japonicus*.⁴³ Une CL₅₀ de 2.83 mg/L est obtenue pour les nauplii après 96 heures d'exposition au PCB 126 introduit avec de l'acétone (**Figure 1.9**). La concentration maximale qui n'induit aucun effet négatif sur les individus est de 0.6 mg/L. Les auteurs ont aussi comparé la mortalité chez les nauplii et ont conclu qu'ils étaient plus sensibles au PCB 126 que les adultes.

Dans la même étude, les copépodes ont été exposés à des concentrations moins élevées que les NOEC (No Observed Effect Concentration) (0-100 µg/L) et ont observé les effets sur 10 générations. Après chaque génération, les auteurs ont comparé la taille des adultes, le ratio des 2 sexes et le temps nécessaire pour la reproduction. Ils ont conclu qu'après chaque génération, le nombre de femelles augmentait par rapport aux mâles, que les tailles des adultes diminuaient, ainsi que le temps nécessaire à la reproduction. Le nombre d'individus dans les populations diminuait quand la concentration augmentait. Et cet effet s'amplifiait après chaque génération.

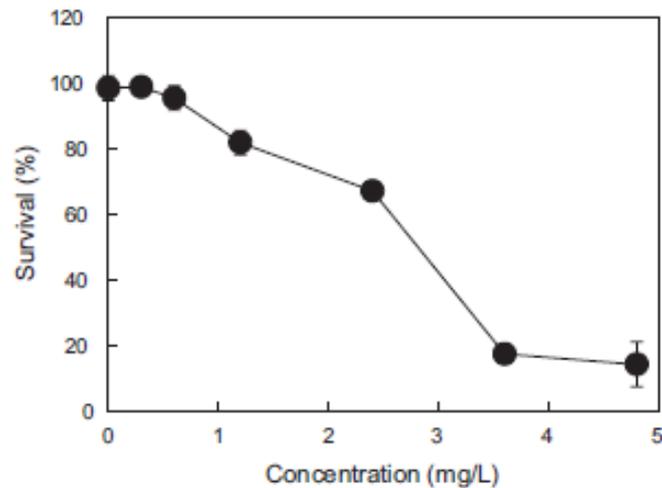


Figure 1.9 – Taux de survivants de nauplii de *Tigriopus japonicus* exposés au PCB 126 (3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl) pendant 96h.⁴³

c. Bioaccumulation des HAPs et PCBs dans les copépodes

Pour l'ensemble de ces études, l'acétone a été utilisée comme moyen d'introduction des molécules hydrophobes.

Tiano *et al.*⁴⁴ ont démontré que différentes espèces planctoniques pouvaient accumuler des PCBs dans leurs tissus. L'étude a été effectuée sur les côtes de Marseille et les planctons ont été séparés par taille (60–200, 200–500 et 500–1000 μm). Les auteurs ont analysé le plancton pour vérifier le niveau de ce PCB dans leurs tissus. Aucune différence n'a été observée selon les différentes tailles des planctons. Les concentrations obtenues variaient entre 14.2 et 88.1 ng/g de masse sèche pour les trois tailles. Cela démontre que les PCBs peuvent être bioaccumulables dans les tissus et pourraient éventuellement être présents dans la chaîne alimentaire.

Cailleaud *et al.*⁴⁵ ont mesuré les concentrations de PCBs et HAPs durant des saisons différentes sur des échantillons d'*Eurytemora affinis* collectés dans l'estuaire de la Seine entre novembre 2002 et février 2005. Les analyses HPLC montrent une concentration plus élevée en PCBs en hiver qu'en été variant de 58 à 463 ng/L dans l'eau. Les PCBs les plus abondants étaient CB 101, 118, 153 et 138. Cette espèce

montre une capacité de bioaccumulation de PCBs et HAPs très élevée qui peut atteindre jusqu'à quelques 1 à 5 µg/g masse sèche.

d. Toxicité de bisphénol A et 4-nonylphénol

En raison de leur utilisation dans la vie de tous les jours et de leur évacuation *via* les eaux usées, ces polluants se retrouvent dans les eaux courantes, aussi bien dans les eaux souterraines que de surface. Ces molécules présentent donc un risque pour la vie aquatique. Même si leur concentration reste faible dans les eaux marines de surface, leur bioaccumulation *via* la chaîne trophique ou leur interaction avec d'autres substances présentes dans l'eau peuvent avoir des conséquences dramatiques, qui restent peu documentées.

Comme les HAPs et les PCBs, le nonylphénol peut avoir des effets négatifs sur le comportement natatoire des copépodes.⁴⁶ Le comportement natatoire peut être un indicateur très sensible de la présence des polluants à des concentrations sublétales. Une étude faite encore une fois sur le copépode estuarien *Eurytemora affinis* dans l'estuaire de la Seine avec une concentration sublétale de 2 µg/L a montré une augmentation de la vitesse et de l'activité des copépodes sous l'influence de nonylphénol. L'augmentation de l'activité de nage s'accompagne souvent par une consommation plus forte des réserves énergétiques des copépodes au détriment de leur fitness. De même la vulnérabilité des copépodes hyperactifs vis-à-vis des prédateurs augmente considérablement.

Pour vérifier la bioaccumulation du 4-nonylphénol dans les tissus des copépodes, des individus d'*Eurytemora affinis* ont été exposés à un mélange de 4-nonylphénol à 480 ng/L pendant 142 heures.⁴⁷ Les copépodes ont ensuite été récupérés et la concentration de cet alkylphénol dans leurs tissus a été mesurée. Les résultats ont démontré une accumulation pouvant atteindre 3,020 ng/g poids sec de copépodes. Après cette exposition, les analyses ont été répétées sur une partie des individus, cette fois dans de l'eau propre. Après 3 jours, les copépodes avaient éliminé 54% de nonylphénol accumulé.

Marcial *et al.* ont souhaité comprendre les effets directs du 4-nonylphénol et du bisphénol A sur le copépode *Tigriopus japonicus*.⁴⁸ Leur objectif était donc d'évaluer

les effets des perturbateurs endocriniens et de les comparer avec une vraie hormone (20-hydroxyecdysone). Les tests ont été réalisés sur deux générations successives. Au début, les LC_{50} de ces composés ont été estimées. Les résultats prouvent que le 20-hydroxyecdysone (0,46 mg/L) était le plus toxique avec une valeur de LC_{50} pour 48h moins élevée comparée à celle du bisphénol A (4.32 mg/L) et 4-nonylphenol (0.51 mg/L). Pour introduire les produits, les auteurs ont utilisé du diméthylsulfoxyde (DMSO). Les contrôles n'ont démontré aucun effet négatif du DMSO sur les individus. Par la suite, des nauplii de moins de 24 h ont été exposés à 4 concentrations (0.01, 0.1, 1 et 10 $\mu\text{g/L}$) sublétales de ces composés durant 21 jours pour deux générations. Les pourcentages des survivants étaient de 88,1% pour la génération parentale et 81,6% pour la génération suivante. Ainsi les durées moyennes pour lesquelles les nauplii atteignent l'âge de copépodite et adulte ont été estimées. Une différence significative a été observée pour toutes les concentrations testées de bisphénol A et de 4-nonylphénol (sauf 0,01 $\mu\text{g/L}$). La maturité est également atteinte bien plus tard pour des concentrations de 1 et 10 $\mu\text{g/L}$. L'effet du 20-hydroxyecdysone ne diffère pas des contrôles. Aucune différence significative sur le taux de ponte et le ratio mâle/femelle n'a été observée. Ainsi, des concentrations très faibles de bisphénol A et de 4-nonylphénol ont des effets négatifs sur le développement des copépodes. Ces effets deviennent plus importants pour les générations suivantes.

Enfin, Bechmann a étudié les effets du nonylphénol sur le copépode *Tisbe battagliai* (**Figure 1.10**).⁴⁹ Les individus ont été exposés au perturbateur endocrinien et leur développement a été suivi pendant deux générations. La reproduction et le temps pour atteindre la maturité ont été estimés. Les concentrations testées se situent entre 31 et 500 $\mu\text{g/L}$ (introduit avec de l'acétone). Le contrôle (acétone) n'a pas été effectué. Pour les concentrations supérieures à 125 $\mu\text{g/L}$, certains nauplii n'ont pas pu atteindre la phase adulte. Pour 62 $\mu\text{g/L}$, seulement 6% des nauplii ont survécu et atteint la phase adulte. Ils ont pu produire des œufs et des nauplii par la suite. Quand ils ont atteint la phase adulte, leur taille d'adulte était bien inférieure à celle de leurs parents. Cependant, il n'y a eu aucune différence notable entre les ratios des deux sexes. Pour 31 $\mu\text{g/L}$, l'auteur a observé un taux de ponte de 95 œufs pour 39 jours comparé au contrôle qui était de 65 œufs. Tout cela prouve que le nonylphénol est effectivement un perturbateur endocrinien qui provoque une ponte supérieure, mais qui gêne le développement des nauplii par la suite.

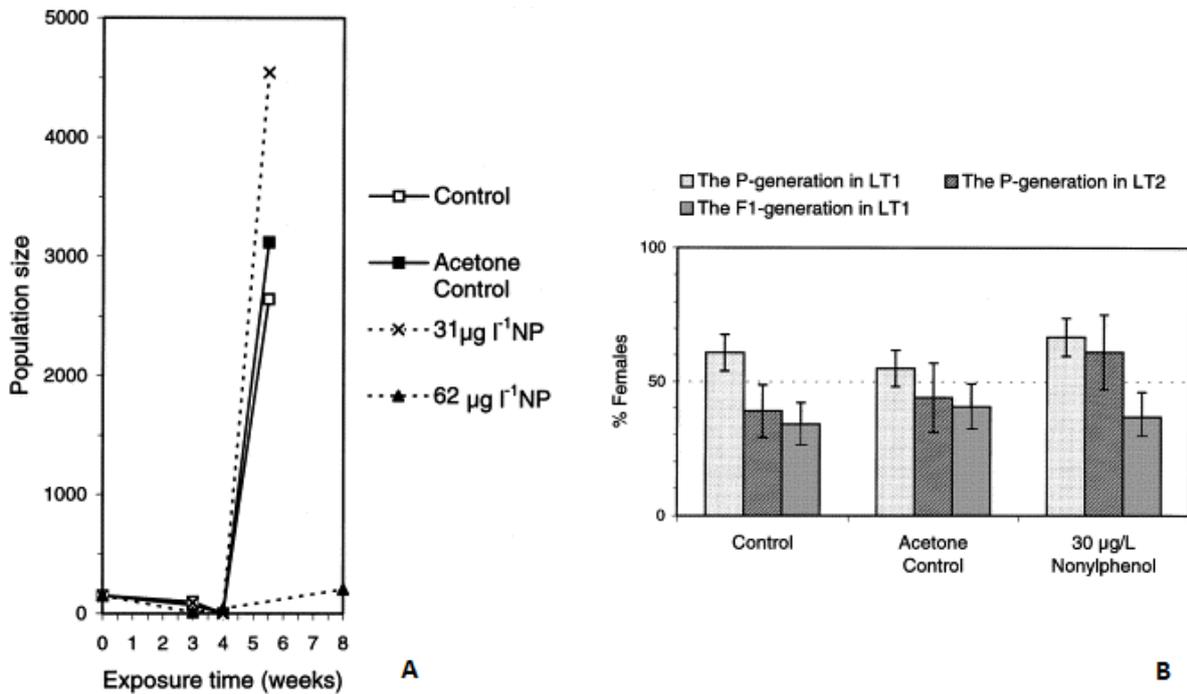


Figure 1.10. A – Taux de croissance de la population des copépodes de *Tisbe battagliai* au cours des semaines avec les deux concentrations sublétales de 31 et 62 µg/L testées. **B** – Pourcentage de femelles pour la suite des deux générations. LT1 et LT2 représentent 2 réplicas séparés de la même expérience.⁴⁹

7.3 Introduction des polluants dans l'eau avec des sédiments

Les sédiments sont l'ensemble des particules en suspension dans l'eau qui se sont déposées au fond des bassins sous l'effet de la gravité ou de la turbulence. Ils proviennent de l'érosion des sols et de la décomposition des plantes et des animaux. Le vent, l'eau et la glace peuvent souvent être porteurs de ces particules sur de longues distances. Les sédiments peuvent être de différentes natures (composition chimique), de granulés de taille variable (du grain de sable au rocher).

Une partie des sédiments au fond des océans a été contaminée par des polluants. Certains de ces polluants ont été libérés dans l'environnement il y a plusieurs dizaines voire des centaines d'années et d'autres découlent de nos jours directement de l'évacuation des déchets industriels et urbains. Les sédiments peuvent servir de réservoir de contamination (EPA, United states environmental protection agency).

L'utilisation de sédiments constitue donc une méthode alternative d'introduction de molécules hydrophobes en milieu aquatique. Cette méthode est plus proche des situations de pollution réelles de l'environnement marin.

Une étude sur l'influence des HAPs sur les copépodes a été réalisée par Lotufo *et al.*⁵⁰ Elle compare la toxicité du phénanthrène, du fluoranthène et du carburant diesel sur le copépode estuarien benthique *Schizopera knabeni*. Les polluants sont introduits dans l'eau à l'aide de sédiments, après une préparation spécifique. En effet, les sédiments ont été broyés et homogénéisés. Ils ont ensuite été mélangés avec un polluant et introduits directement dans l'eau. Les CL₅₀ (concentrations létales pour 50% d'individus) ont été calculées pour une exposition de 4 jours. La plus élevée CL₅₀ correspond au diesel (194 µg/g de poids sec de sédiment). La mortalité est plus élevée car le diesel contient des HAPs de poids moléculaire plus élevé, donc plus toxiques.⁵¹ En effet, comme ces polluants sont hydrophobes, ils sont en partie adsorbés sur les sédiments.⁵² Les espèces estuariennes, qui vivent dans des écosystèmes turbulents, sont particulièrement exposées à ce mode de contamination. Lesueur *et al.* ont étudié les effets des polluants sur les nauplii du copépode estuarien *Eurytemora affinis* par exposition directe en utilisant des sédiments pollués et non-pollués. Cette méthode a été développée pour le benzo[a]pyrène, le diméthylbenzo[a]anthracène, le phénanthrène, le PCB 126, le PCB 153 et le 4-nonylphénol. Tous ces composés ont induit des effets toxiques chez les individus testés.

Cette méthode d'introduction grâce aux sédiments peut également être appliquée aux copépodes vivant en zones arctiques. L'exploitation des réserves de pétrole « off shore » à l'ouest du Groenland est prévue dans un avenir proche.⁵³ Il est alors important d'évaluer les effets toxiques des HAPs présents dans le pétrole sur l'écosystème. Dans cette étude,⁵⁴ des copépodes femelles ont été exposées à des concentrations de 0, 0.1, 1, 10 et 100 nM de pyrène. Les auteurs ont effectué une quantification quotidienne des œufs et de la production fécale. Les pelotes fécales ont diminué de manière significative mais il n'y a pas eu de changement par rapport au taux de ponte. Le taux d'éclosion n'a pas été affecté, mais la reproduction totale a été réduite avec l'augmentation des concentrations. Les auteurs ont effectué une comparaison des effets lorsque les copépodes ont été nourris et non-nourris. Les analyses chimiques ont montré une accumulation de pyrène dans les copépodes plus élevée quand les individus ont été nourris et le seul métabolite trouvé était de 1-hydroxypyrene. Tous ces résultats suggèrent qu'une éventuelle contamination avec

du pétrole pourrait constituer un risque pour le *Calanus hyperboreus* par le transfert du pyrène à des niveaux trophiques supérieurs.

7.4 Les HAPs et *Acartia tonsa*

Bellas et Thor ont étudié les effets des HAPs sur la reproduction et la survie de l'espèce *Acartia tonsa*.⁵⁵ Les solutions de phénanthrène, fluoranthène et pyrène (**Figure 1.6, page 14**) ont été introduites dans l'eau à l'aide d'acétone. Après des tests préliminaires avec de l'acétone, les auteurs ont démontré que cette dernière n'était pas toxique pour des concentrations de moins de 200 µL/L. Toutes les expériences effectuées ne dépassaient pas cette concentration.

Les concentrations utilisées ont été sélectionnées en se basant sur les tests préliminaires. Elles étaient alors de 10, 50, 250 et 1250 nM pour le fluoranthène, de 2, 4, 24, 240 et 2400 nM pour le phénanthrène et de 40, 80, 160, 320 et 640 nM pour le pyrène. Les études sur la mortalité et le taux de production d'œufs ont été effectuées en quatre réplicas avec 5 femelles ovigères acclimatées pendant 48 heures avec les males en vue d'être fécondées. Pour chaque réplica, les chercheurs ont enregistré le nombre d'œufs et les survivants après 24 et 48 heures d'exposition. Les résultats sont représentés sur la **Figure 1.11** ci-dessous :

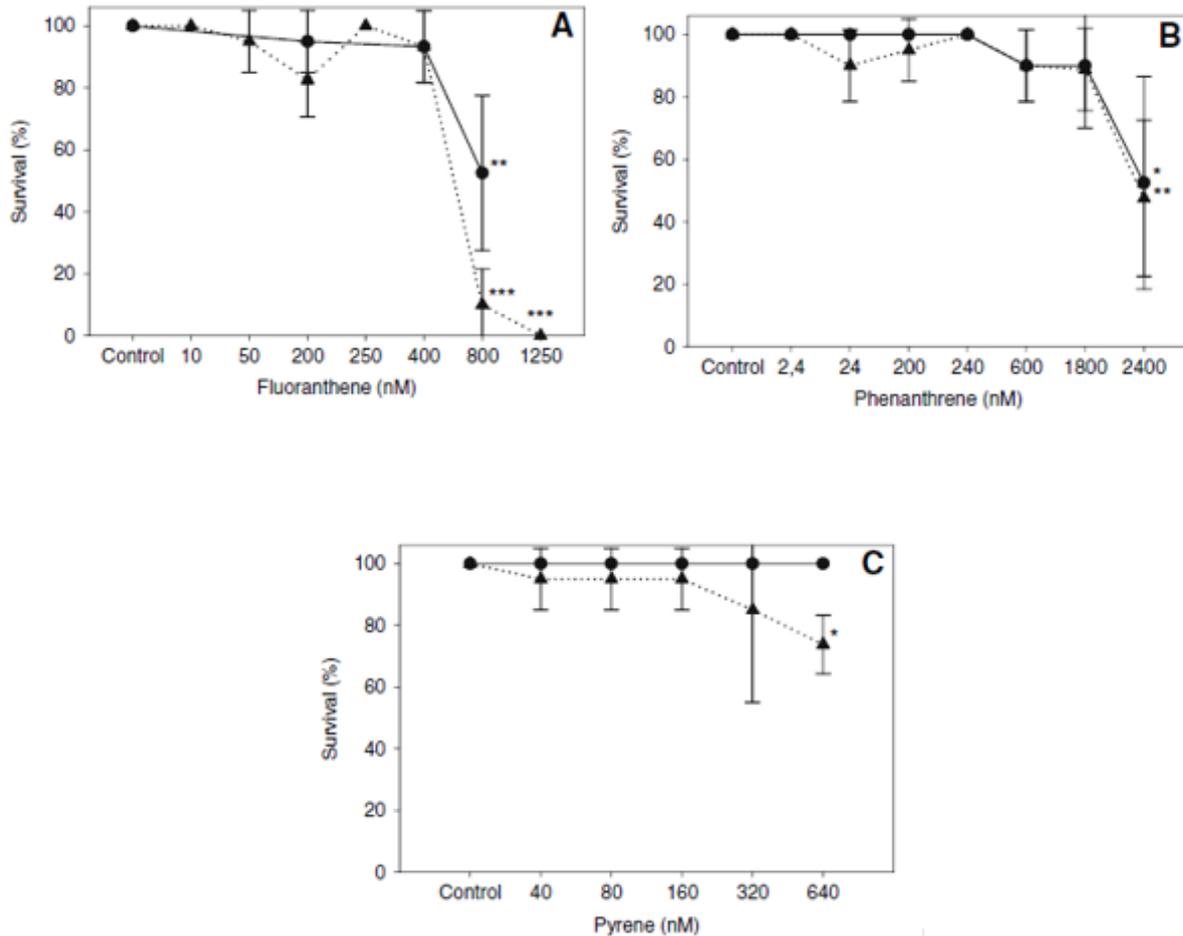


Figure 1.11– Taux de survie des copépodes *Acartia tonsa*⁵⁵ exposés au fluoranthène (A), au phénanthrène (B) et au pyrène (C). Les cercles représentent les résultats après 24 heures d'exposition, les triangles après 48 heures (n=4). * Différence significative à $p < 0,05$; ** Différence significative à $p < 0,01$; *** Différence significative à $p < 0,001$;

Les auteurs ont également démontré que la toxicité du pyrène sous la lumière UV était 2 fois supérieure que sans irradiation. Ils ont aussi étudié les effets des HAPs sur la reproduction. Pour cela, 5 femelles fécondées ont été triées par réplica. Elles ont montré un taux de ponte beaucoup plus faible que celles des contrôles après 48 h d'exposition. Le fluoranthène a provoqué une réduction de 25% d'œufs pondus par rapport au témoin pour une concentration de 800 nM. Le pyrène et le phénanthrène ont été testés à 1800 nM et le taux de production des œufs passe de 25 (témoin) à 5 œufs par femelle par jour. Ici, les auteurs n'ont pas observé d'effet significatif sur la reproduction lié à l'exposition à la lumière UV.

Après les calculs de CL_{50} , le pyène était 1 à 2 fois plus toxique que le fluoranthène et 3 à 8 fois plus toxique que le phénanthrène. Il a été démontré qu'il existe des risques supplémentaires de phototoxicité des HAPs en fonction de la lumière UV. Il est donc nécessaire de les prendre en compte dans l'évaluation de la toxicité. Il est aussi prouvé que les substances toxiques influent davantage sur le taux de ponte que sur le taux de mortalité. Lorsqu'on incube un polluant dans l'environnement des copépodes, on constate que le taux de ponte baisse plus sensiblement que la mortalité. C'est donc le taux de ponte que nous devons observer pour estimer la toxicité d'un polluant en premier.

7.5 Bisphénol A et *Acartia tonsa*

Le bisphénol A est un composé qui peut imiter l'œstrogène, ce qui peut impliquer une maturité sexuelle précoce chez les femelles.⁵⁶ Les solutions mères ont été préparées directement dans de l'eau déminéralisée sans acétone ou autre solvant organique. Les tests de toxicité ont été réalisés sur 100 à 200 individus d'*Acartia tonsa* en 3 répliques, sachant que la solubilité du bisphénol A est de 38mg/L (21.5 °C).⁵⁷

Les auteurs ont observé une immobilisation à 0.96mg/L après 72 heures d'exposition. La CL_{50} est de 0.57 à 1.7 mg/L. Après 9 jours d'exposition, le taux de ponte a été estimé à des concentrations de 0.2, 2 et 20 μ g/L. Les résultats sont représentés sur la **figure 1.12**.

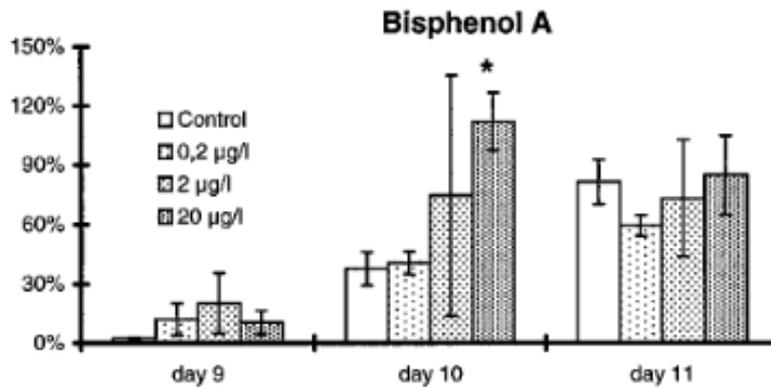


Figure 1.12– Taux de ponte au jour 11 après exposition au bisphénol A. *différence significative $p < 0.05$ (test de Student). Les colonnes représentent les moyennes de six répliques de 10 copépodes.

Les résultats de cette expérience montrent une augmentation du taux de ponte des femelles lorsque la concentration est plus élevée (jusqu'à 20 µg/L). Cette augmentation est plus importante quand le temps d'exposition est plus lent. L'exposition au bisphénol A à 20 µg/L accélère la maturation des ovaires et peut ainsi augmenter la ponte.

8. Les liposomes comme vecteur de molécules pour le copépode

8.1 Introduction générale, utilisation dans la médecine

Les liposomes ont été introduits en 1965 et représentent l'une des premières plateformes utilisée en nano-médecine.⁵⁸ Actuellement, il existe plus de 11 formulations approuvées pour une utilisation comme vecteur de médicaments.

Les liposomes sont des vésicules sphériques avec une phase aqueuse qui est entourée par un noyau de phospholipides. Ils contiennent une ou plusieurs bicouches composées de lipides naturels ou synthétiques.⁵⁹

Leur taille peut varier de quelques dizaines de nanomètres à quelques micromètres. Ils sont biocompatibles et biodégradables. Il est possible d'encapsuler des agents hydrophiles dans leurs noyaux aqueux, ainsi que des agents hydrophobes dans leurs bicouches lipidiques. Les liposomes sont donc un excellent vecteur thérapeutique (**Figure 1.13**). Pour améliorer leur stabilité et faciliter leur circulation dans le sang, les

liposomes peuvent aussi être enrobés de polymères comme le polyéthylène glycol (PEG).⁵⁹

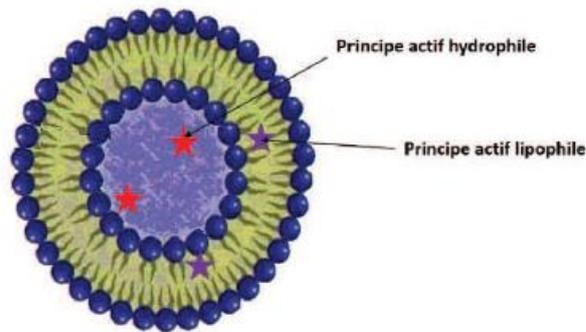


Figure 1.13 – Représentation schématique d'un liposome multifonctionnel.⁶⁰

Il existe de nombreux exemples de formulations de liposomes avec différents agents tels que les anti-cancéreux⁶¹, les neurotransmetteurs⁶², ou les antibiotiques⁶³...

8.2 Interaction des liposomes avec les copépodes

Il est possible d'utiliser des liposomes comme vecteur de molécules pour les copépodes. Pour le démontrer, Buttino *et al.*⁶⁴ ont utilisé des liposomes géants de diamètre moyen de 7 μm comme vecteur potentiel pour les femelle du copépode *Temora stylifera*. Les liposomes restaient stables pendant 15 jours dans de l'eau distillée. Après 15 jours, la ponte était très faible (moins d'œufs produits par femelle) par rapport au témoin (en moyenne 34 œufs par femelle). Les liposomes seuls n'apportent donc pas une valeur nutritionnelle suffisante aux copépodes. Pour obtenir le même résultat que celui du témoin, il faut utiliser un mélange de liposomes et d'algues.

Le copépode *Temora stylifera* (**Figure 1.14**) a été observé par imagerie confocale (Confocal laser scanning microscopy - CLSM). Les liposomes ont été chargés en

fluorescéine. Les copépodes ont ensuite été incubés pour 48h, puis observés par CLSM pour détecter la fluorescence du tube digestif. Des copépodes maintenus à jeun ont également été observés. Le laser était fixé à 488 nm pour exciter la fluorescéine, et à 543 nm exciter la chlorophylle.

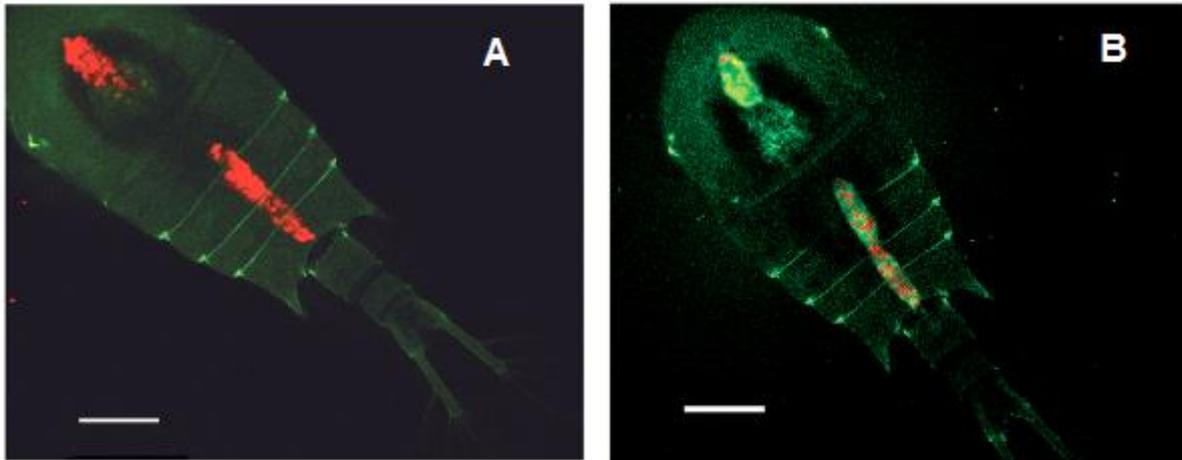


Figure 1.14– Image confocale du copépode femelle *Temora stylifera* nourri normalement reconstituée en trois dimensions obtenue en utilisant des lasers fixés à 488 nm pour exciter la fluorescéine, et à 543 nm exciter la chlorophylle.

Nous pouvons voir l'émission A – de la chlorophylle représentée en rouge dans le tube digestif ; B – de la fluorescéine représentée en vert et l'émission de la chlorophylle provenant des algues représentée en rouge. Légende - 0.2 mm.

Les résultats démontrent clairement que les liposomes ont été ingérés par les copépodes. Les auteurs suggèrent alors l'utilisation de ces liposomes comme vecteur de principes actifs pour les copépodes.

Bien que les liposomes soient un système approprié pour la délivrance de principes actifs, ils présentent tout de même quelques inconvénients. En effet, les molécules contenues à l'intérieur peuvent échapper facilement avant leur transmission aux copépodes. Par ailleurs, certains liposomes ne sont pas stables dans les environnements à salinité élevée comme l'eau de mer.⁶⁵

Nous proposons donc un autre système de délivrance de molécules chez les copépodes qui peut avoir plusieurs avantages par rapport aux liposomes.

Objectifs de mon travail de thèse

Ce travail consiste notamment à proposer une méthode de délivrance de molécules hydrophobes pour les copépodes ne présentant pas les inconvénients des liposomes cités précédemment. Les polluants étant bien souvent hydrophobes et donc difficiles à introduire directement dans l'eau.

Notre travail a aussi pour objectif de trouver une méthode alternative de délivrance de composés lyophiles aux copépodes sans utiliser de solvants organiques comme l'acétone.

L'utilisation des nanoparticules est une méthode de plus en plus utilisée pour la délivrance de principes actifs en nano-médecine. Nous allons donc développer des nano-systèmes non toxiques, stables dans l'eau de mer pour les utiliser comme vecteurs pour les copépodes.

Bien que les liposomes soient les premiers systèmes à être utilisés en nano-médecine, la littérature foisonne en termes de systèmes nanoparticulaires pour la délivrance de principes actifs *in vitro* et *in vivo*.^{66, 67} Par exemple, des nano-systèmes à base de lipides comme les nanocapsules lipidiques capables de véctoriser des médicaments ont été développés par le groupe du Professeur Jean-Pierre Benoît à Angers. Dans ce contexte, nous avons décidé de tester ces nanocapsules comme vecteur de composés lipophiles chez les copépodes.

1. Nanocapsules lipidiques

1.1 Introduction

Les nanocapsules lipidiques (LNCs) sont composées d'un cœur huileux entouré d'une mono-couche de tensioactifs hydrophiles et de tensioactifs lipophiles (**Figure 1.15**). Le cœur huileux est composé d'un mélange de triglycérides (Labrafac Lipophile WL 1349) et d'acides gras de chaînes moyennes (caprylique et caprique). Le tensioactif lipophile (Phospholipon 90G) est la lécithine (phosphatidylcholine) et le tensioactif hydrophile (Solutol HS 15) est le 2-hydroxystéarate polyéthylène glycol (HS-PEG). (**Figure 1.16**) Il s'agit d'un mélange de PEG 660 libres (30%) et de PEG 660 hydroxystéarates (70%).

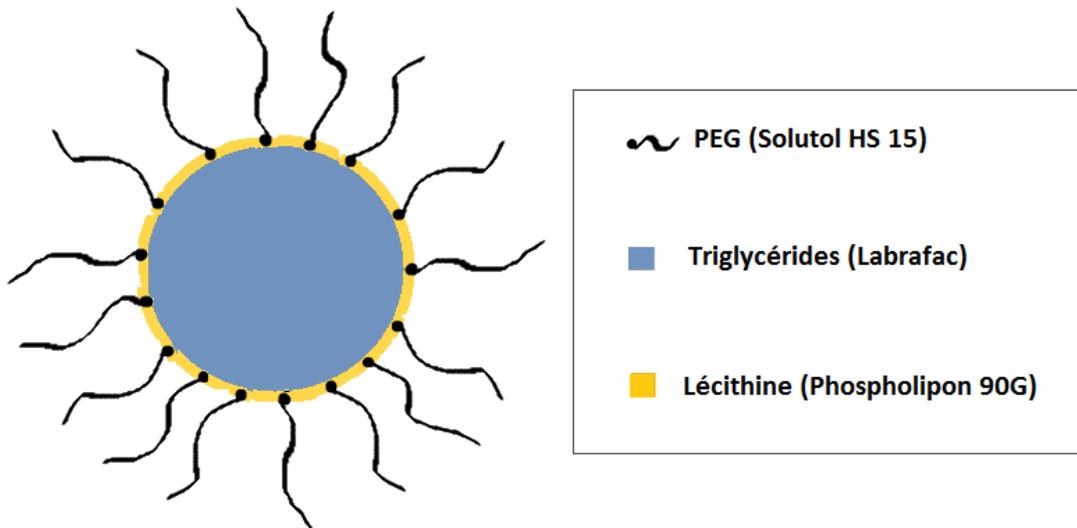


Figure 1.15 - Représentation schématique d'une nanocapsule lipidique

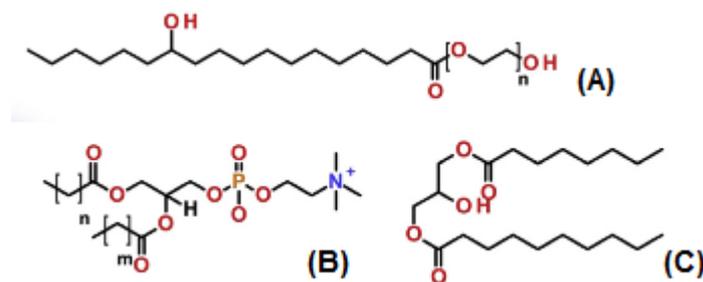


Figure 1.16 – Structure chimique de A – Solutol HS 15 ; B – lécithine (*m*-acide palmitique ; *n* – acide héptadécanoïde); C – Labrafac Lipophile WL 1349 (triglycéride caprique et caprylique);

Ces nanoparticules ont été synthétisées pour la première fois par *Heurtault et al.*^{68, 69} Elles sont introduites comme système de délivrance de principes actifs. Ces particules sont dotées des propriétés suivantes :

- Leur stabilité est supérieure à 18 mois car elle dispose d'une couche externe formée de PEG qui leur donne un effet « nuage ».
- Elles disposent d'un cœur huileux qui permet d'encapsuler des molécules hydrophobes.
- Leur formulation est simple et ne nécessite pas l'utilisation de solvants organiques.
- Elles sont biocompatibles, donc non-toxiques. Elles n'interfèrent pas et ne dégradent pas l'environnement dans lequel elles se trouvent.
- Il est possible de contrôler leurs tailles (de 20 à 150 nm) en modifiant le ratio des principaux composants.

Leur stabilité dans les milieux à salinité élevée comme l'eau de mer n'a jamais été étudiée.

1.2 Synthèse des nanocapsules lipidiques

Pour la formulation de ces nanocapsules, il faut utiliser la méthode d'inversion de phase présentée dans la **Figure 1.17** (huile/eau – eau/huile). Les différents constituants sont mélangés en proportions définies afin d'obtenir des formulations stables de différentes tailles (**Tableau 1.1**). Le mélange (émulsion) est ensuite chauffé sous agitation, puis refroidi en trois cycles de températures de 90°C à 60°C. La zone d'inversion est observée autour de 75 °C pour une concentration en NaCl de 1,7%.

Quand la température est plus proche de 90°C, nous obtenons une émulsion d'eau et d'huile trouble caractérisée par une couleur blanche. En dessous de la zone de transition (près de 75 °C), nous obtenons une émulsion d'huile et d'eau également trouble. La zone de transition se caractérise par une solution transparente métastable (c'est-à-dire stable sur une courte durée). Il est nécessaire d'atteindre le minimum absolu d'énergie pour stabiliser le système (état d'équilibre). Pour cela, il faut lui fournir de l'énergie appelée énergie d'activation.

Cette énergie d'activation se manifeste par l'ajout d'une grande quantité d'eau à 1°C à la fin des trois cycles. Cette étape s'appelle la « trempe ». Ensuite, la solution reste sous agitation magnétique pendant 30 minutes à température ambiante jusqu'au refroidissement complet de la formulation.

Tableau 1.1 – Composés principaux pour la formulation des LNC de tailles différentes.⁷⁰

	LNC 25	LNC 50	LNC 100
Phospholipon 90G (%)	3	3	3
Labrafac (%)	20	33.3	40
Solutol (%)	32.3	19	12.3
NaCl (%)	1.7	1.7	1.7
Eau distillée (%)	43	43	43

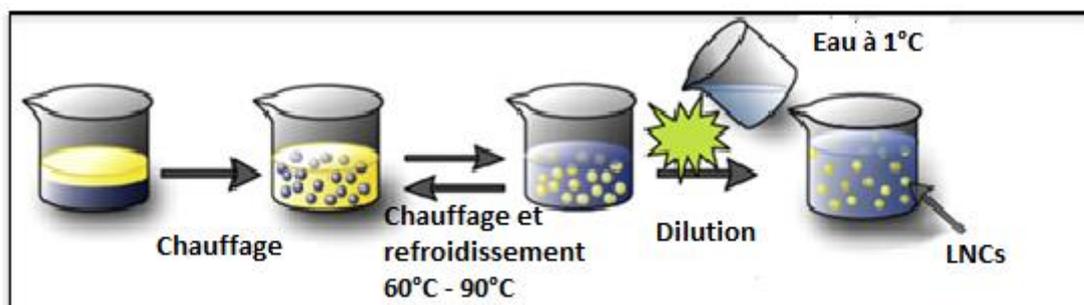


Figure 1.17 – Schéma de formulation de LNCs.⁷⁰

Les caractéristiques physico-chimiques des nanocapsules lipidiques présentent de nombreux avantages pour la vectorisation de principes actifs en nano-médecine. En effet, le cœur hydrophobe est un atout intéressant pour l'encapsulation de molécules lipophiles, sachant que de nombreux médicaments sont peu solubles dans l'eau. D'autre part, les chaînes PEG en surface ajoutent à ces nanoparticules des propriétés

de furtivité leur permettant d'échapper à l'élimination rapide de la circulation sanguine.⁷¹

1.3 Encapsulation de molécules dans les nanocapsules lipidiques

La méthode avec laquelle les nanocapsules sont synthétisées et leurs caractéristiques physico-chimiques nous permettent de les définir comme un système idéal d'encapsulation de molécules hydrophobes. L'encapsulation de ces molécules nous permet de solubiliser les molécules lipophiles en milieu aqueux, tout en gardant leurs caractéristiques physico-chimiques intactes. L'objectif est donc d'utiliser le potentiel des nanocapsules lipidiques comme nano-vecteur de molécules hydrophobes pour les copépodes.

2. Caractérisation des nanocapsules lipidiques

2.1 Diffusion dynamique de la lumière (DDL)

La description de cette méthode se trouve en annexe 1.

Après plusieurs études, la formulation de ces nanoparticules a été optimisée en variant le ratio (Labrafac, Solutol, Phospholipon, NaCl et eau) pour synthétiser des nanocapsules de taille de 25, 50 et 100 nm.⁷² Il existe une zone de faisabilité où les proportions de Solutol et de Labrafac ont une influence sur la taille (**Figure 1.18**). Le rôle de chaînes de PEG dans ce système est de stabiliser l'interface triglycérides/eau.⁷² Le Solutol augmente la stabilité et l'augmentation du ratio solutol/labrafac favorise la formation nanoparticules plus petites. Ce tensioactif a des propriétés amphiphiles. C'est dû aux chaînes PEG hydrophiles et aux chaînes stéarates hydrophobes. Ainsi, le diamètre des nanocapsules augmente si on ajoute du Labrafac et que l'on ajoute moins de Solutol. A l'inverse, le diamètre des nanocapsules diminue si on ajoute moins de Labrafac et plus de Solutol.⁷³

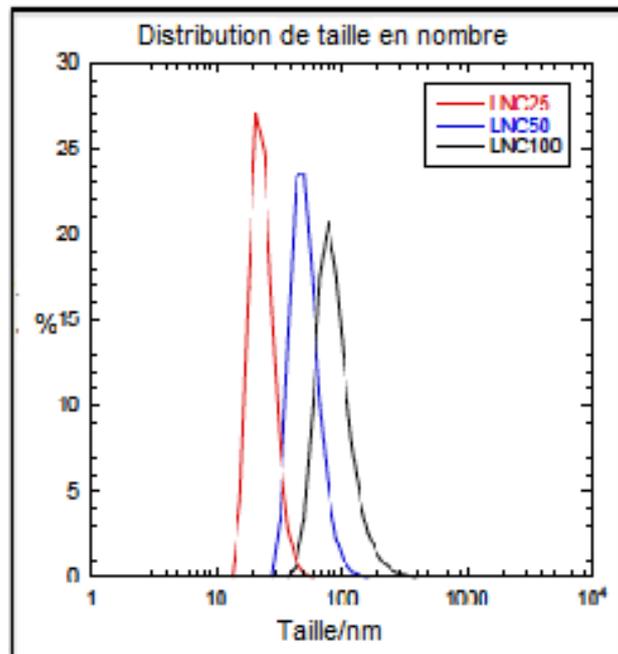


Figure 1.18 – Distribution de la taille pour les trois formulations de LNCs de tailles différentes de Tableau 1.1

Le deuxième paramètre utilisé pour caractériser les nanoparticules est le potentiel zêta. On obtient ce paramètre par le mode électrophorétique de diffusion dynamique de la lumière. Il représente le potentiel électrique sur la surface des particules. Ce paramètre est essentiel pour prédire le comportement des particules dans différents milieux (stabilité). Pour les nanocapsules lipidiques, le potentiel zêta est légèrement négatif en raison de la présence de molécules de phospholipides et des chaînes PEG sur la surface.⁷⁴

2.2 Stabilité des nanocapsules lipidiques

a. Evolution des caractéristiques physico-chimiques des NCL à différents pH

La stabilité physico-chimique à différents pH est un paramètre à prendre en compte lorsqu'il s'agit de développer des nano-vecteurs de principes actifs. Le pH de l'eau de mer est généralement entre 7.5 et 8.4.⁷⁵ L'eau de mer artificielle que nous avons utilisée pour notre étude est de pH 8.2.

L'effet du pH sur les caractéristiques physiques des nanocapsules a été évalué⁶⁰ en mesurant la taille et le potentiel zêta d'un lot de nanocapsules lipidiques de 25 nm. Celles-ci ont été incubées à différents pH pendant 30 minutes. La gamme du pH testée se situe entre 3 et 10. (**Figure 1.19**)

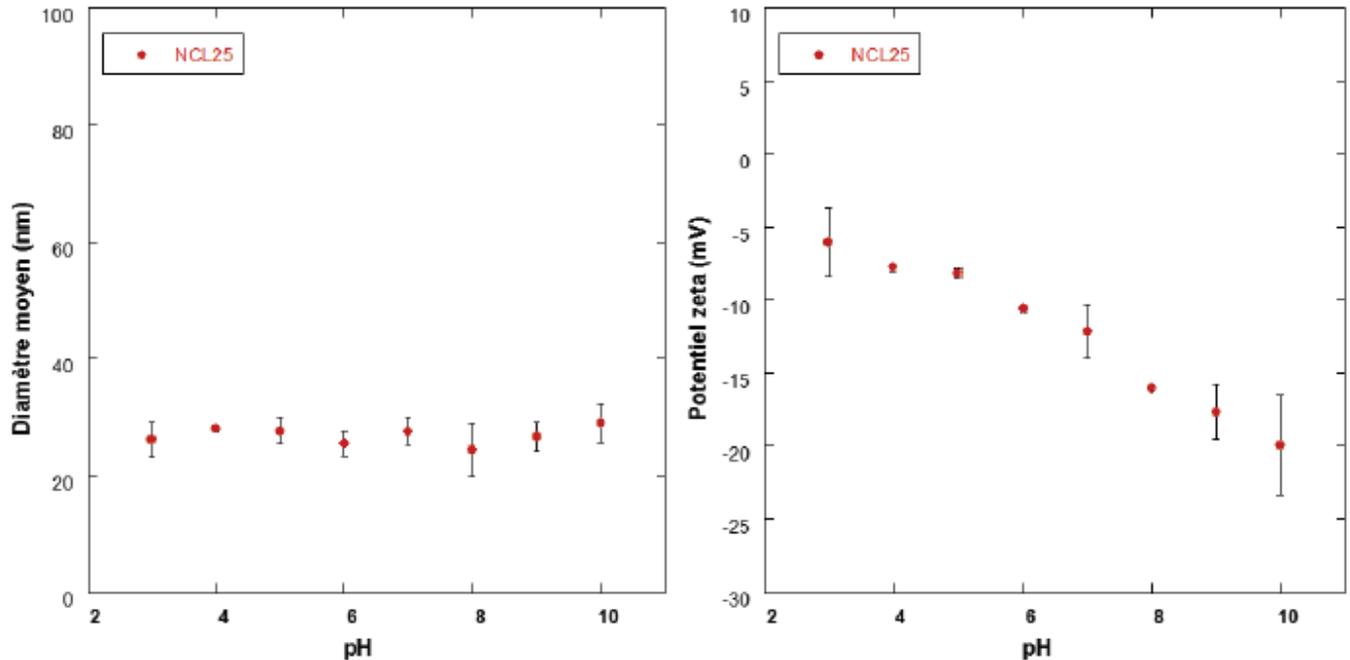


Figure 1.19- Evolution de la taille et du potentiel zêta des NCL25 en fonction du pH.

Le pH ne provoque pas de changement de taille ou de stabilité des nanocapsules dans les conditions expérimentales testées. Probablement en cause, l'effet de la charge négative du groupe phosphate des PEG permettant la stabilité stérique par répulsion électrostatique entre les nanocapsules. Cette stabilité les rend aptes à une utilisation dans des milieux au pH élevé comme l'eau de mer.

Les valeurs du potentiel zêta dépendent du potentiel électrique au niveau du plan de cisaillement. En effet, elles sont affectées par la composition de la surface des nanocapsules et par les conditions de salinité et de pH de leur milieu.⁷⁶

b. Stabilité au cours du stockage dans l'eau distillée et l'eau de mer

Des nanocapsules lipidiques de taille moyenne 50 nm (LNC 50) ont été formulées et par la suite stockées dans de l'eau distillée à 4°C. Un lot de nanocapsules a été stocké dans l'eau de mer à salinité de 30. La stabilité de ces nanocapsules a été étudiée grâce à la mesure du diamètre moyen par diffusion dynamique de la lumière (DDL).

Le diamètre moyen en fonction du temps stocké dans l'eau distillée et dans l'eau de mer est représenté dans la **figure 1.20**. Ces résultats montrent que les nanocapsules lipidiques sont stables pendant 4 semaines dans l'eau distillée mais seulement une semaine dans l'eau de mer à une température de stockage de 4°C. Les nanocapsules lipidiques de diamètre moyen initial de $55,6 \pm 1,2$ nm reste à $55,8 \pm 2,9$ nm après 4 semaines dans l'eau distillée. Par contre la taille des LNC 50 est de $59,1 \pm 0,6$ nm dans l'eau de mer et reste relativement inchangé jusqu'à une semaine ($62,9 \pm 2,1$ nm). Cette taille augmente jusqu'à $94,3 \pm 12,2$ nm au bout de 4 semaines. Une concentration importante en sels pourrait agir sur le rayon hydrodynamique et la surface de chaînes de PEG de nanocapsules lipidiques, et ainsi produire leur coalescence.

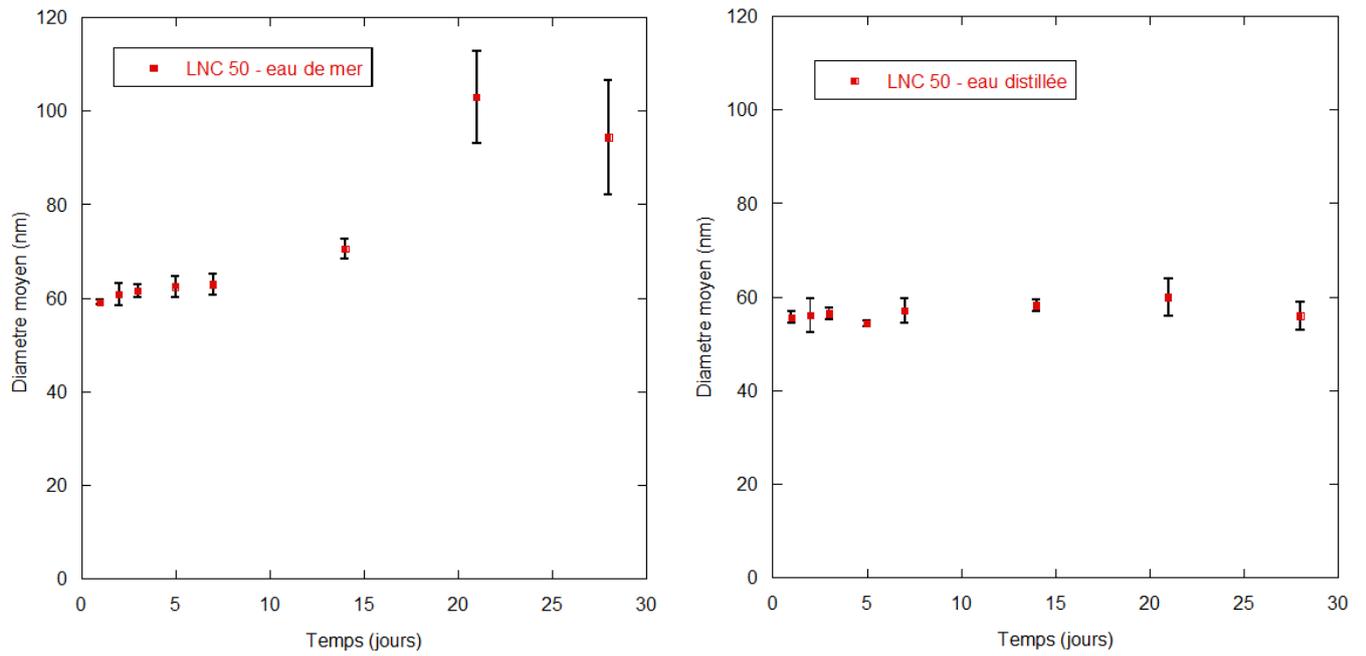


Figure 1.20 – Evolution de la taille des LNC 50 dans l'eau distillé et dans l'eau de mer au cours du temps.

Partie expérimentale

1. Matériels

Les nanocapsules lipidiques sont constituées de Labrafac lipophile WL 1349 (triglycérides capryliques et capriques) fournis par Gattefossé S.A (Saint-Priest, France), de phospholipon 90G (lécithine de soja à 97,1 % en phosphatidylcholine) fournis par Phospholipid GmbH (Cologne, Allemagne), de Solutol HS15 (un mélange de polyéthylène glycol 660 libre et de polyéthylène glycol 660 hydroxystéarate) fourni par Laserson (Etampes, France), de chlorure de sodium (NaCl).

Selon les tests de toxicité, nous y avons ajouté des polluants obtenus chez Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) tels que du pyrène (Pyr, 99%), du phénanthrène (Phen, 98%), du fluoranthène (Flt, 98%), du bisphénol A et du 4-nonylphenol.

Pour l'imagerie par fluorescence, nous avons utilisé du 1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetraméthylindocarbocyanine perchlorate (Dil, 97%) acheté chez Sigma-Aldrich.

2. Formulation de nanocapsules lipidiques et encapsulation des HAPs et PCBs

Les nanocapsules lipidiques ont été formulées à une taille nominale de 50 nm par la méthode de synthèse décrite précédemment. Les HAPs pyrène, phénanthrène et fluoranthrène ont été encapsulés (**Figure 1.6, page 14**). Le produit lipophile représente un pourcentage de la phase huileuse. Il y est introduit avant le cycle de chauffage et de refroidissement. Cette méthode offre un contrôle sur la taille des nanocapsules (50 nm) avec une taille monodisperse ($PI < 0,1$). Les nanocapsules obtenues ont été caractérisées en termes de taille, de potentiel zêta et de taux d'encapsulation des HAPs ou des PCBs.

Tableau 1.2 - Composants des nanocapsules lipidiques pour une masse totale de 1.26g

	Labrafac (%)	Solutol (%)	Phospholipon 90G (%)	NaCl (%)	Water (%)
LNC50	33.3	19.1	3.0	1.7	42.9

3. Caractérisation par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)

Cette méthode est décrite en annexe 2.

L'appareil de HPLC que nous avons utilisé est Shimadzu LC2010-HT (Shimadzu, Tokyo, Japon) avec une colonne C4 de 5 μm QS Uptisphere[®] 300 Å, 250 x 4,6 mm (Interchim, Montluçon, France). Nous avons utilisé un détecteur UV. La phase mobile est composée d'un mélange d'éluant A (acide trifluoroacétique à 0,1% dans de l'eau distillée) et d'éluant B (acide trifluoroacétique à 0,1% dans du CH₃CN) à un débit de 1 mL/min. La colonne est chauffée à 40°C. L'éluion des composés s'effectue selon un gradient linéaire de 0 à 80 % en 30 minutes. L'échantillon à analyser est injecté à un volume de 40 μL . Ensuite, pour analyser les échantillons, nous avons effectué une régression linéaire des HAPs en utilisant plusieurs concentrations de 10-200 μM (**Tableau 1.3**).

Tableau 1.3 - Courbe d'étalonnage pour les HAPs et les PCBs.

Produit	Temps de rétention	Equation de régression	K_{PAH}	Zone linéaire	$r^2, ^b$
Py	21.059 min	$Y = 33916 X$	33916	10 – 200 μ M	0.996
Ph	19.199 min	$Y = 60266 X$	60266	10 – 200 μ M	0.999
Fl	20.217 min	$Y = 98709 X$	98709	10 – 200 μ M	0.994
4-NP	13.827 min	$Y = 14614 X$	14614	10 - 200 μ M	0.998
BpA	21.307 min	$Y = 8467 X$	8467	10 – 200 μ M	0.996

^aEquation, dans laquelle Y c'est le pic et X c'est la concentration des composant.

^bCoefficient de corrélation (n = 7)

3.1 Estimation du taux d'encapsulation

Pour estimer le taux d'encapsulation, nous avons utilisé la technique HPLC. Pour cela, les nanocapsules ont été séparées du surnageant en utilisant des colonnes PD - 10 spécialement conçues pour le gel de filtration de marque Sephadex® G-25 (Amersham Biosciences). Avant d'appliquer le gel de filtration, nous avons nettoyé une colonne en forme de seringue avec 25 ml d'eau distillée. Puis 2 ml de la suspension de nanoparticules a été déposée sur la colonne. Ensuite, 0,5 ml d'eau ont été ajoutés pour combler le volume mort de la colonne. Pour finir, les LNCs ont été récupérées en ajoutant 4 ml d'eau distillée utilisée comme éluant. Le mécanisme de filtration est le suivant : le gel attire les molécules à plus faible masse moléculaire, et laisse passer celles de masse moléculaire plus élevée (en l'occurrence les LNCs). Ainsi, les particules à plus forte densité sont attirées vers le fond de la colonne. C'est de cette manière qu'elles sont extraites du gel (**Figure 1.21**).

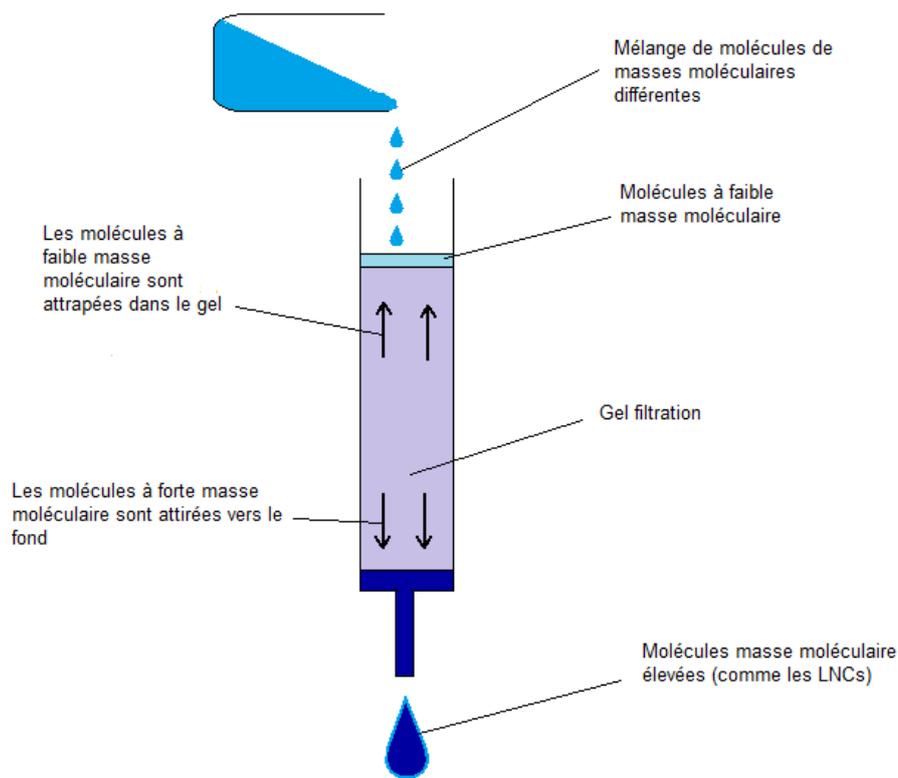


Figure 1.21 - Schéma de la colonne de filtration

Nous avons mesuré les concentrations des HAPs par HPLC avant et après la filtration afin de déterminer le taux d'encapsulation (EE) en utilisant l'équation :

$$EE(\%) = \frac{[PAH]_{LNC}}{[PAH]_{TOTAL}} \times 2 \times 100\%$$

$[PAH]_{LNC}$ désigne la quantité d'HAPs encapsulée dans les nanocapsules ;

$[PAH]_{TOTAL}$ désigne la quantité théorique d'HAPs dans la suspension de nanocapsules ;

Le facteur de dilution du gel de filtration est de 2.

4. Taille des nanocapsules et potentiel zêta

Les LNCs ont été caractérisées en termes de taille et de charge. Le diamètre moyen et l'indice de polydispersité (PI) est déterminé par diffusion dynamique de la lumière en utilisant un Zetasizer® Nano ZS (Malvern Instruments SA, Worcestershire, Royaume-Uni). Le potentiel zêta est mesuré par électrophorèse avec le Zetasizer®. Tous les lots ont été dilués à 1/100 (v/v) dans de l'eau distillée ; les expériences ont été réalisées en triple. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 1.4**.

Tableau 1.4 – Caractérisation des nanocapsules lipidiques avant et après encapsulation des polluants.

	LNCs (%)	Diamètre moyen (nm)	PI ^a	Potentiel zêta	EE (%)
Vides	0	52.4 ± 0.20	0.058 ± 0.008	-5.36±0.28	-
Dil-LNC50	0.1	50.1 ± 2.3	0.096 ± 0.008	+5.12±1.68	99.4
Py-LNC50	3	46.78 ± 1.8	0.096 ± 0.012	-5.92 ± 1.25	100
Ph-LNC50	3	50.78 ± 1.40	0.076 ± 0.008	-5.70 ± 0.68	95.5
FI-LNC50	3	52.89 ± 0.81	0.043 ± 0.012	-1.4 ± 0.1	95.5
4-NP	1	53.27 ± 0.061	0.051 ± 0.008	-3.63 ± 0.96	98.3
BpA	1	53.36 ± 1.23	0.096 ± 0.012	-3.39 ± 0.87	97.7

^aIndex de polydispersité (PI)

Mean ± SD (standard deviation), n = 3

5. Fuites des molécules toxiques des nanocapsules et leur stabilité dans l'eau de mer

5.1 Stabilité des LNCs chargées en HAPs dans l'eau de mer

La stabilité des HAPs dans les nanocapsules lipidiques dans l'eau de mer est un paramètre important. Pour s'en assurer, nous avons réalisé les manipulations suivantes. Nous avons placé des LNCs (0,4 mg/ml) filtrées dans l'eau de mer à 20°C de salinité 32-35 psu. La caractérisation a été réalisée 2 jours après la synthèse de LNCs. Le taux d'encapsulation en HAPs de chaque échantillon a été évalué, et nous avons vérifié les changements d'apparence des solutions. Après l'extraction des HAPs grâce au gel de filtration, leur concentration a été mesurée par HPLC. Le protocole suivi est similaire au protocole de détermination du taux d'encapsulation décrit précédemment (voir page 37). Toutes les mesures ont été réalisées en 3 réplicas.

La fuite des HAPs n'est pas souhaitable pour la conception de systèmes de livraison de composés efficaces. Nous avons préparé 2 solutions de LNCs (0,4 mg / ml) contenant les trois HAPs (pyrène, fluoranthène ou phénanthrène) dans l'eau de mer. Avant l'analyse en HPLC, 2 ml de chaque solution a été purifiée grâce au gel de filtration afin de retirer toutes les molécules qui ne sont pas encapsulées dans les nanoparticules lipidiques. La concentration a été mesurée à $t = 0h$, après 6h, puis toutes les 24 heures pendant 7 jours (**Figure 1.22**).

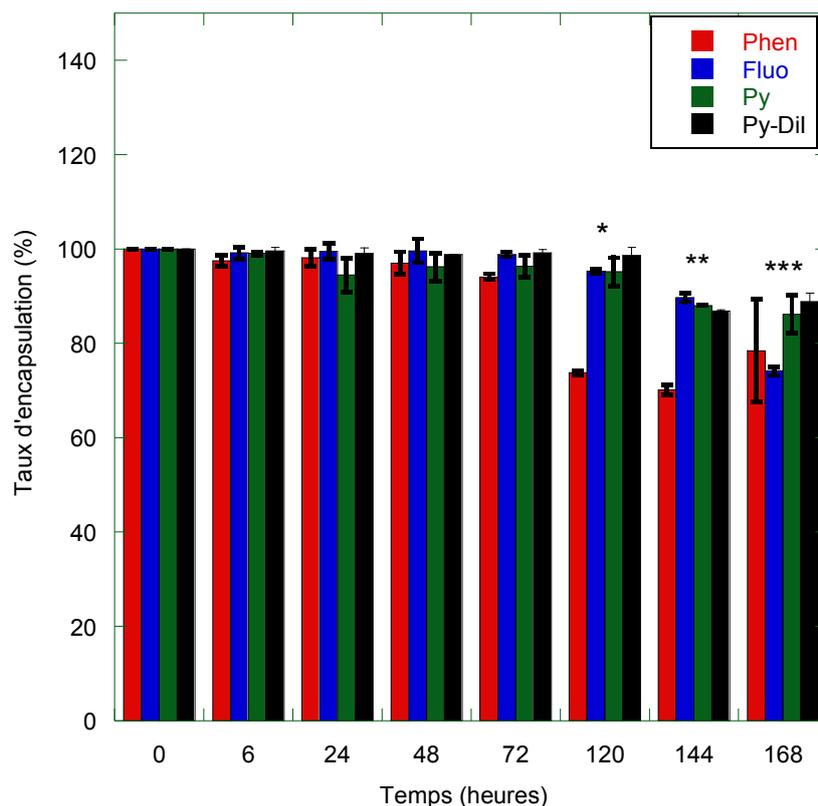


Figure 1.22- Evolution du taux d'encapsulation des HAPs encapsulés à 3%. Les barres d'erreur représentent l'écart type pour chaque traitement ($n = 2$). *Des différences significatives à $p < 0,05$. **Différence significative à $p < 0,01$. ***Différence significative à $p < 0,001$.

L'histogramme nous montre que les LNCs chargées en HAPs sont stables pendant 72h.

Avec une perte de produit inférieure à 20 % après 168h, les LNCs contenant le pyrène représentent la formulation la plus stable dans l'eau de mer. Les LNCs chargées en fluoranthène ont perdu près de 30% de produit après 168h, et les LNCs chargées en phénanthrène ont perdu 30% de produit après 120h seulement.

Les tests d'écotoxicologie durent 3 jours. C'est exactement la durée de stabilité des LNCs (72h) pour ces trois formulations (pyrène, fluoranthène et phénanthrène). Nous pouvons donc sans problème les utiliser dans nos tests écotoxicologiques sur les copépodes.

5.2 Stabilité des nanocapsules chargées en 4-nonylphénol et bisphénol A dans l'eau de mer

Nous avons effectué les mêmes analyses pour les nanocapsules lipidiques chargées de 4-nonylphénol (4-NP) et de bisphénol A (BpA), **Figure 1.23**.

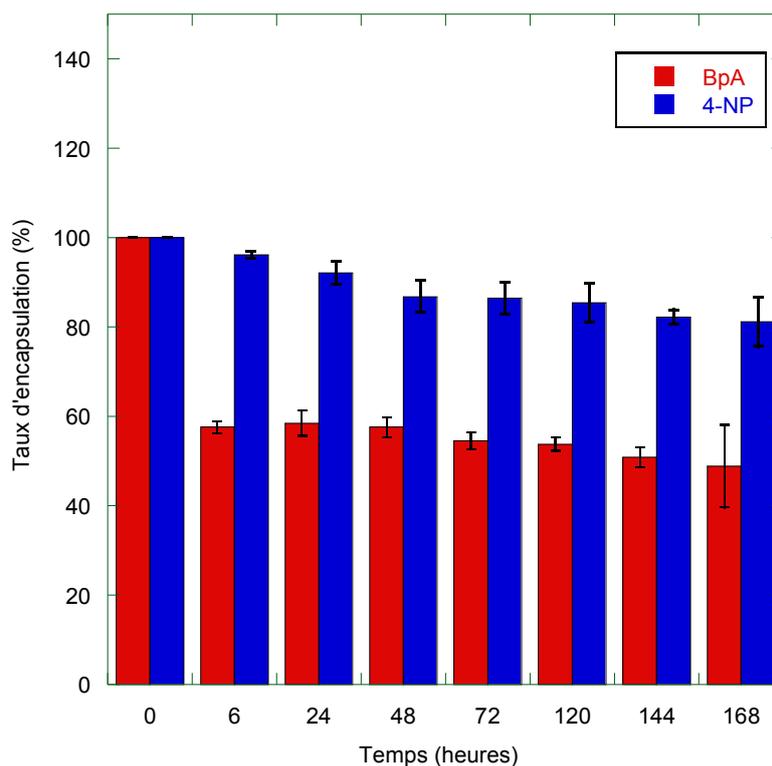


Figure 1.23 - Evolution du taux d'encapsulation de BpA et de 4-NP pour les LNCs chargées à 1%. Les barres d'erreur représentent l'écart type pour chaque traitement ($n = 2$).

Comme les HAPs, l'histogramme montre que les LNCs chargées en BpA et en 4-NP ne sont pas stables dans l'eau de mer. Le 4-NP encapsulé dans les LNCs reste stable (supérieur à 90%) pour les premières 24 heures dans l'eau de mer. Cependant, le taux d'encapsulation diminue à 81,2% après 168 heures. Le BpA est encore moins stable dans les nanocapsules placées dans l'eau de mer. Le taux d'encapsulation passe à 57.6% après les 6 premières heures et diminue à 48,8% après 168 heures. Il est possible que la stabilité de certaines molécules encapsulées (y compris les molécules hydrophobes) ne soit pas longue dans l'eau de mer. Cela peut s'expliquer par une

participent probablement au processus de formulation des nanocapsules et leur libération indiquerait la destruction des LNCs.

6.1 Imagerie par microscopie confocale et analyse

Les copépodes *Acartia tonsa* utilisés dans la présente étude ont été obtenus (sous forme d'œufs) à l'Université de Roskilde au Danemark (code de souche DFH-ATI),⁷⁸ puis cultivées à la Station Marine de Wimereux, France à différents volumes (de 2 à 20 L) en utilisant les techniques standard de culture de copépodes.⁷⁹ Des souches de copépodes ont été maintenues dans des béciers de 2 L dans un incubateur (SANYO, MLR-351H) avec une température constante de 18°C et une photopériode 12:12. La culture du stock a été maintenue dans des bouteilles de 20 L avec une faible aération continue. L'eau de mer utilisée a été préparée artificiellement en utilisant du sel "Instant Ocean" d'Aquarium Systems, ref. 05120815 dans de l'eau osmosée. L'eau a ainsi été filtrée avec un filtre de 22 µm avant son utilisation. La salinité de l'eau était d'environ $33 \pm 0,5$ psu. Les copépodes ont été nourris avec la microalgue *Isochrysis galbana* fournie par le groupe de recherche du Prof. Sami Souissi à la Station Marine de Wimereux (UMR 8187 LOG).

Il est très important de comprendre la capacité des copépodes à digérer les nanocapsules afin de définir un système approprié de relargage de principes actifs. Après avoir ingéré les nanocapsules chargées en Dil, nous avons observé les copépodes grâce à la microscopie par imagerie confocale à balayage laser (CLSM). Nous avons comparé les images de copépodes avant et après ingestion des LNCs fluorescentes (**Figure 1.25**).

Après 24h d'incubation, les copépodes ont été lavés abondamment avec de l'éthanol et de l'eau, fixés, puis observés au microscope confocal A1 Nikon avec un objectif 20X (NA = 0,75). L'auto-fluorescence a été observée dans le canal bleu avec λ_{ex} : 404 nm et λ_{em} : 425-475 nm. Le Dil a été détecté dans le canal rouge avec λ_{ex} : 561 nm et λ_{em} : 570-620 nm.

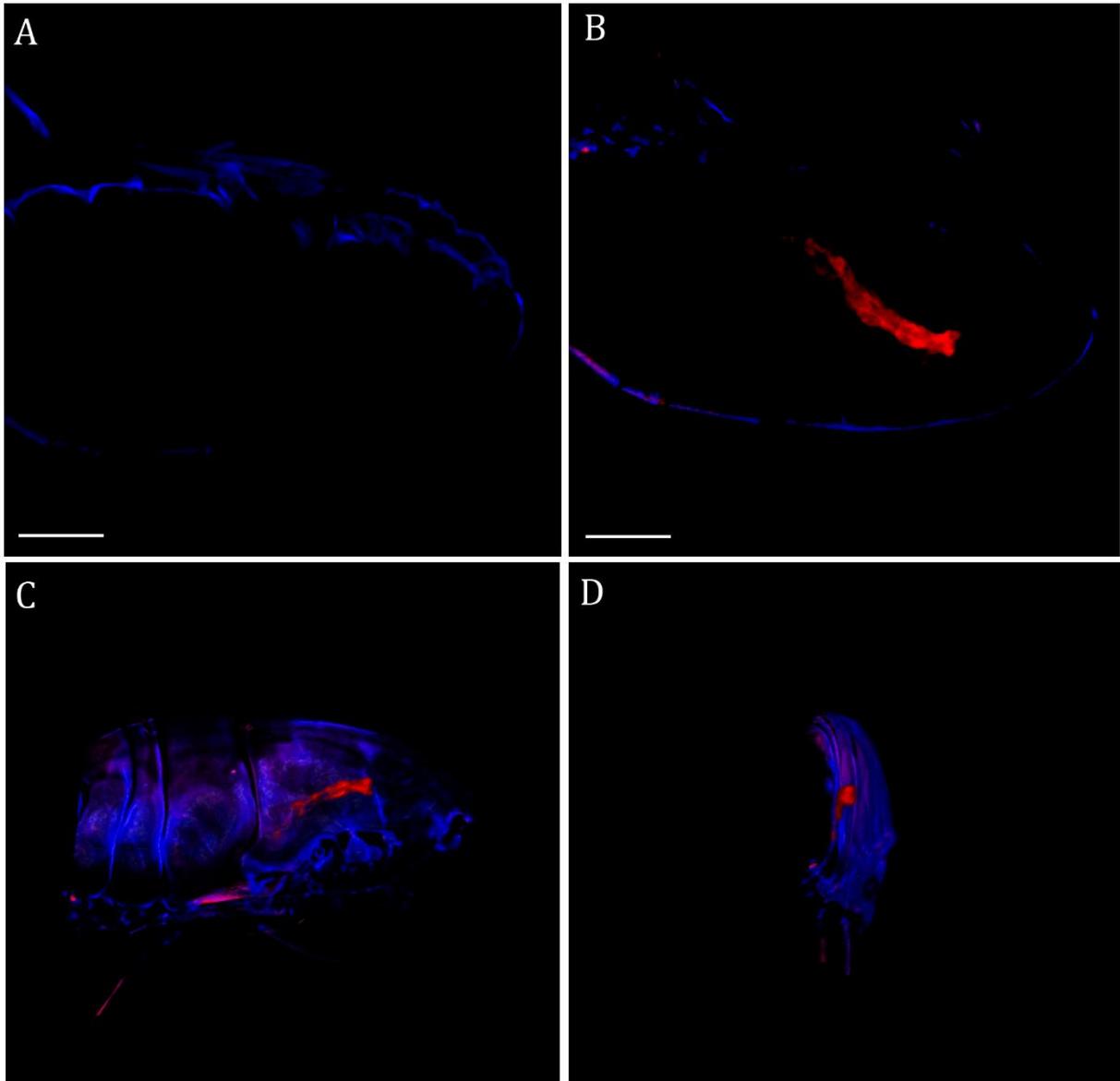


Figure 1.25 - Images confocales représentatives de l'*Acartia tonsa* avant (a) et après une exposition de 24h aux LNC fluorescentes (b, c et d). Le canal bleu correspond à l'auto-fluorescence tandis que le canal rouge correspond aux nanoparticules chargées en Dil. A et B sont des acquisitions 3D. C et D sont des reconstitutions en 3D de l'état de B en vue latérale et arrière. La barre d'échelle est de 100 μ m. Les dimensions pour C et D sont 0.81x0.81x10.5 μ m.

Les images confocales d'*Acartia tonsa* avant exposition aux LNCs représentent l'auto-fluorescence, principalement dans le canal bleu. La partie interne du copépode montre une faible auto-fluorescence dans le canal rouge (intensité = 135 ± 49 niveaux de gris) (**Figure 1.24a**). Après incubation des copépodes avec des LNC fluorescentes pendant

24h, les nanoparticules sont visibles dans l'ensemble du système digestif du copépode (**Figure 1.24b-d**). Cela confirme que les LNCs sont ingérées par les copépodes.

7. Etudes de la toxicité des nanocapsules lipidiques sur les copépodes

7.1 Tests de survie chez les copépodes

Avant chaque expérience, les copépodes adultes (femelles et mâles) ont été acclimatés pendant 48 h dans l'incubateur à 18°C sous un éclairage fluorescent blanc froid (12 h lumière et 12 h obscurité), les paramètres d'éclairage ont été réglés à 5000Lx luminance. Juste avant l'expérience, les nauplii ont été séparés des adultes. Chaque traitement correspond à 3 réplicas de 100 copépodes. Les copépodes ont été observés matin et soir et leur taux de survie a été enregistré. Nous avons utilisé des LNCs chargés en HAPs à 3%. Nous avons mis en place deux types de témoins : l'un avec des nanocapsules lipidiques vides (concentration 2,1 mg/ml) et l'autre sans LNCs (uniquement en présence d'algues). Les copépodes n'ayant pas survécu ont été comptés toutes les 24 h, puis retirés au fur et à mesure. Les copépodes restants ont été nourris une fois par jour avec en moyenne $2,5 \cdot 10^6$ cellules/L d'algues.

Enfin, une dernière série d'expériences a été réalisée afin de comparer la survie des copépodes lorsque les HAPs ont été introduits soit en utilisant les LNCs comme vecteurs soit en les solubilisant dans de l'acétone.

7.2 Etude des effets des nanocapsules vides sur les copépodes

Dans un premier temps, nous avons souhaité estimer les effets des vecteurs seuls sur les copépodes. Nous avons donc examiné l'impact direct des LNCs sur la survie des copépodes. Ainsi, ceux-ci ont été exposés à des nanocapsules vides (de concentrations de 10 à 100 mg/L) pendant 72 heures dans l'eau de mer (**Figure 1.26**).

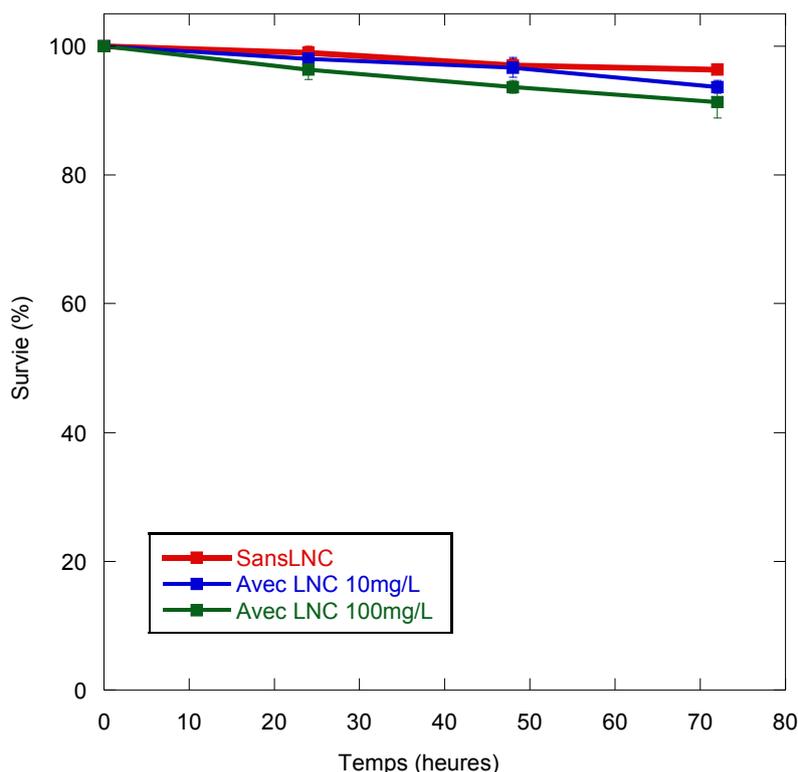


Figure 1.26 – Evolution du taux de survie d'*Acartia tonsa* suite à une exposition à des LNCs vides. Les barres d'erreur sont représentées par l'écart type pour chaque traitement (n=3). Aucune différence significative à $p < 0,05$.

Les résultats démontrent qu'après 72 heures, près de 90% des copépodes étaient encore vivants pour les deux concentrations de LNCs. Des résultats similaires ont été obtenus dans une expérience témoin (en l'absence de LNCs). La mortalité était inférieure à 10 % pour les 3 essais après 48h ; ceci valide les exigences des tests de daphnies OECD de toxicité aiguë. Au cours des 24 premières heures, la différence de taux de survie des copépodes entre le contrôle sans LNCs et le contrôle à la concentration plus élevée ne dépassaient pas 3 %, ce qui est très peu. Les résultats indiquent clairement que LNCs vides ne provoquent pas d'effets toxiques sur l'*Acartia tonsa*. Cela suggère que les LNCs sont un bon support inerte et bon vecteur de molécules hydrophobes d'intérêt.

7.3 Toxicité des LNCs chargées en pyrène sur les copépodes

Nous avons ensuite examiné la toxicité des LNCs chargés à 3% en pyrène à des concentrations différentes. Les résultats sont montrés dans la **Figure 1.27**.

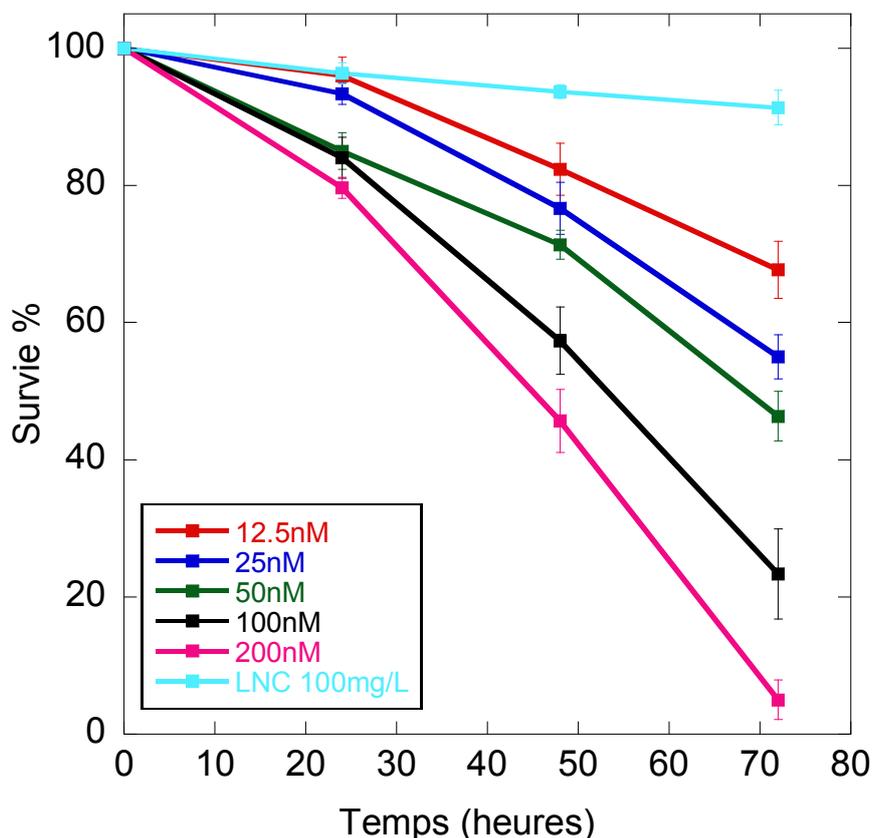


Figure 1.27 – Evolution de la survie du copépode *Acartia tonsa* suite à une exposition aux LNCs chargées en pyrène. Les barres d'erreur sont représentées par l'écart type pour chaque traitement ($n=3$).

Après 72 heures d'exposition aux LNCs, les résultats ont montré une diminution significative de la survie des copépodes. La mortalité est alors de $95 \pm 3\%$ après 72h d'exposition aux LNCs chargées en Py à une concentration de 200 nM. La plus faible concentration de pyrène testée (12,5 nM) a entraîné une mortalité de $4 \pm 2\%$ après 24 h d'exposition, et a augmenté à $32 \pm 4\%$ après 72h. Ces valeurs sont beaucoup plus élevées que le taux de mortalité $9 \pm 1\%$ enregistré pour les LNCs vides, suggérant une forte ingestion des LNCs-Py par les copépodes.

Les valeurs CL_{50} aux limites de confiance de 95% après 72 h sont de $66,25 \pm 3,03$ nM ($491,38 \pm 17,74$ nM après 24 h et $159,92 \pm 5,15$ nM après 48 h). Les chercheurs Bellas et Thor ⁵⁵ ont obtenu une CL_{50} de 530 nM après 48 h. C'est trois fois plus que nos résultats. Cela démontre une ingestion importante de LNCs chargée en pyrène par les copépodes.

7.4 Toxicité des trois HAPs

Nous avons ainsi comparé la toxicité des 3 HAPs encapsulés dans les LNCs à concentration égale (50 nM) (**Figure 1.28**)

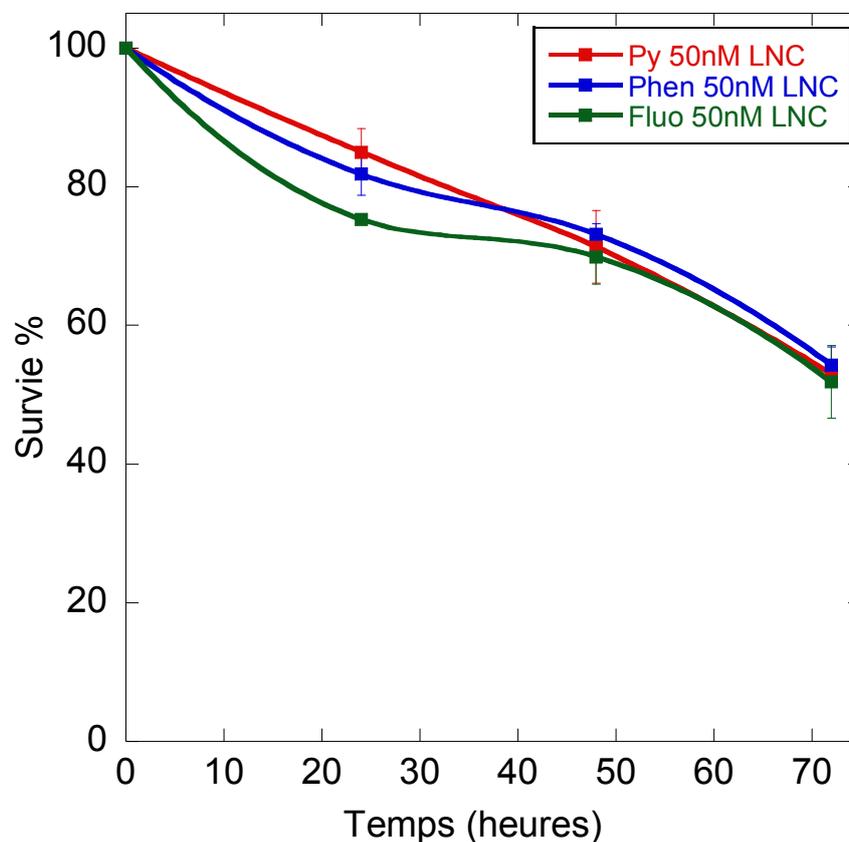


Figure 1.28 – Evolution de la survie d'*Acartia tonsa* suite à une exposition aux LNCs chargées en pyrène, phénanthrène et fluoranthène à une concentration de 50 nM. Les barres d'erreur représentent l'écart type pour chaque traitement ($n = 3$). Aucune différence significative à $p < 0,05$

Les résultats montrent que la mortalité est de $53 \pm 3\%$ après 72 h d'exposition aux nanocapsules chargées en HAPs à 50 nM. Il est important de noter que la mortalité

enregistrée est plus importante pour notre étude, par rapport aux résultats rapportés par Bellas et Thor utilisant HAPs libres dans l'acétone.⁵⁵ Le taux de survie est >90% pour les trois HAPs à 50 nM.

7.5 Comparaison avec les tests standards de toxicité des polluants hydrophobes utilisant l'acétone

Pour attester de la forte toxicité des HAPs encapsulés dans des nanocapsules lipidiques sur les copépodes, nous avons effectué les tests de toxicité utilisant du pyrène libre dissous dans l'acétone (0,1 ml/L d'acétone : concentration en solvant autorisée dans les tests de toxicité OECD 202). Un contrôle sans et un contrôle contenant de l'acétone ont été exécutés pour chaque série d'expériences. Nous avons effectué quatre essais en tout.

Le premier essai comportait des copépodes non nourris incubés avec des LNCs chargées en pyrène (Py-LNCs). Le second comportait des copépodes nourris incubés avec des LNCs chargées en pyrène (Py-LNCs algae). Le troisième comportait des copépodes non nourris incubés avec du pyrène introduit dans l'acétone (Py acétone). Le quatrième comportait des copépodes nourris incubés avec du pyrène introduit dans l'acétone (Py acétone/algae) (**Figure 1.29**).

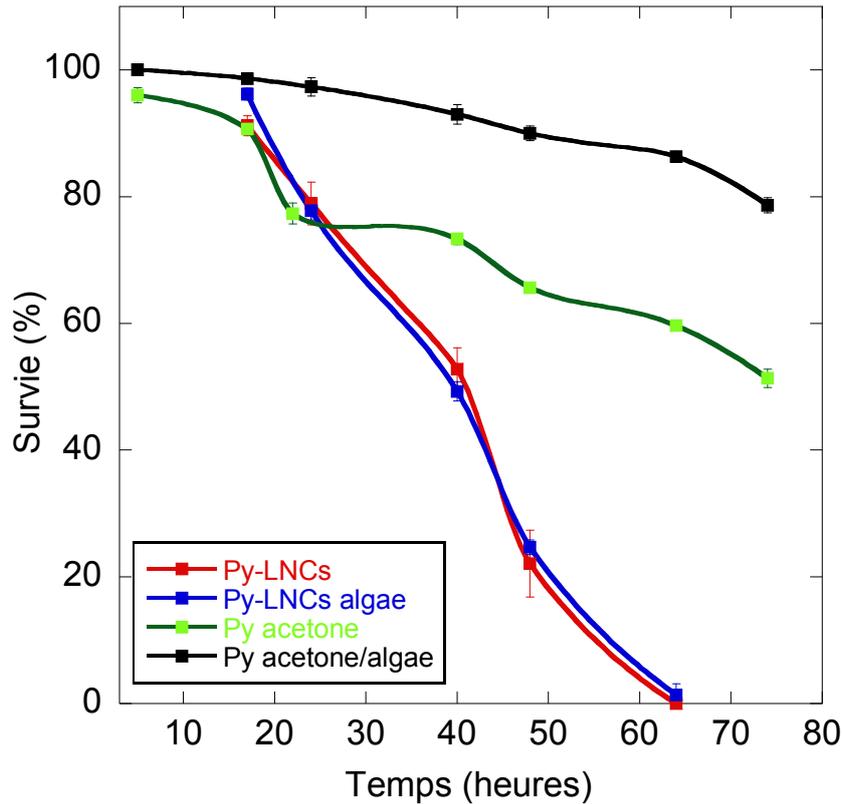


Figure 1.29 – Evolution de la survie de l'*Acartia tonsa* après exposition aux LNCs chargées en pyrène et au pyrène libre dissous dans l'acétone à une concentration en pyrène de 50 nM. Evolution des effets sur les copépodes nourris avec des algues et les copépodes non nourris. Les barres d'erreur représentent l'écart type pour chaque traitement ($n = 3$).

Nous pouvons tirer deux conclusions majeures de ces résultats :

- 1) Pour une même concentration, le pyrène encapsulé dans les LNCs entraîne une mort de 100% des copépodes incubés après 72 h d'exposition, qu'ils soient nourris ou non.
- 2) Alimenter les copépodes avant et pendant l'expérience a retardé la mortalité des copépodes incubés avec du pyrène libre dissous dans l'acétone. Parmi ces derniers, les copépodes nourris sont plus nombreux à avoir survécu.

Ces observations indiquent clairement que les HAPs encapsulés dans LNCs sont ingérés beaucoup plus facilement par rapport aux HAPs libres. Cela nous indique que

les LNCs sont des systèmes appropriés pour l'encapsulation et la livraison de molécules hydrophobes aux copépodes.

7.6 Etude de la toxicité du bisphénol A et de 4-nonylphénol encapsulés dans des LNCs sur les copépodes *Acartia tonsa* et comparaison avec le test standard dans l'acétone

Nous avons évalué la toxicité des LNCs chargées avec 1% de bisphénol (BpA) (**Figure 1.30**) et 1% de 4-nonylphénol (4-NP) (**Figure 1.31**). Nous avons sélectionné les concentrations utilisées lors de tests de toxicité en se basant sur des expériences dont les résultats ont été publiés.⁸⁰ Les concentrations utilisées sont 100 nM et 1000 nM pour le BpA et de 2 nM et 10 nM pour le 4-NP. Le BpA et 4-NP a été introduits avec l'acétone ou encapsulés dans des LNCs.

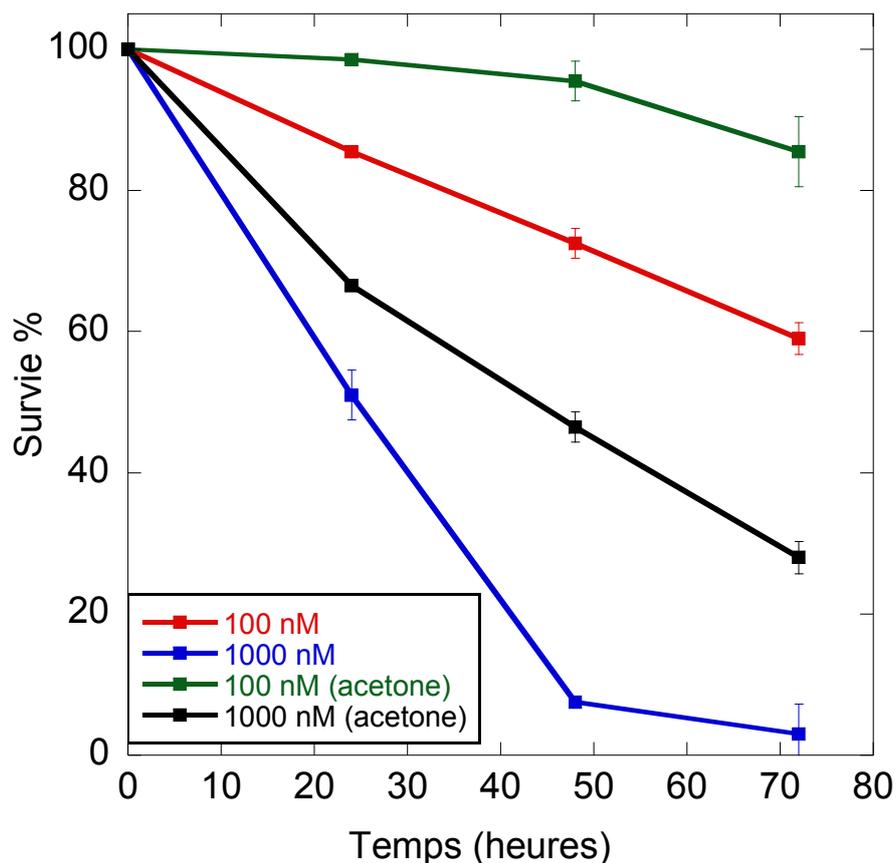


Figure 1.30 – Evolution de la survie de l'*Acartia tonsa* après exposition au BpA encapsulé dans des LNCs ou dissout dans l'acétone. Les barres d'erreur représentent l'écart type pour chaque traitement (n = 2).

Nous observons une toxicité supérieure du BpA encapsulé dans les nanoparticules lipidiques par rapport au BpA introduit avec l'acétone. Après 72 heures, le taux d'encapsulation du BpA est de 58%, alors que 42% a fui dans l'eau de mer. Cela prouve que le BpA encapsulé est plus accessible pour les copépodes et donc plus toxique que le BpA libre.

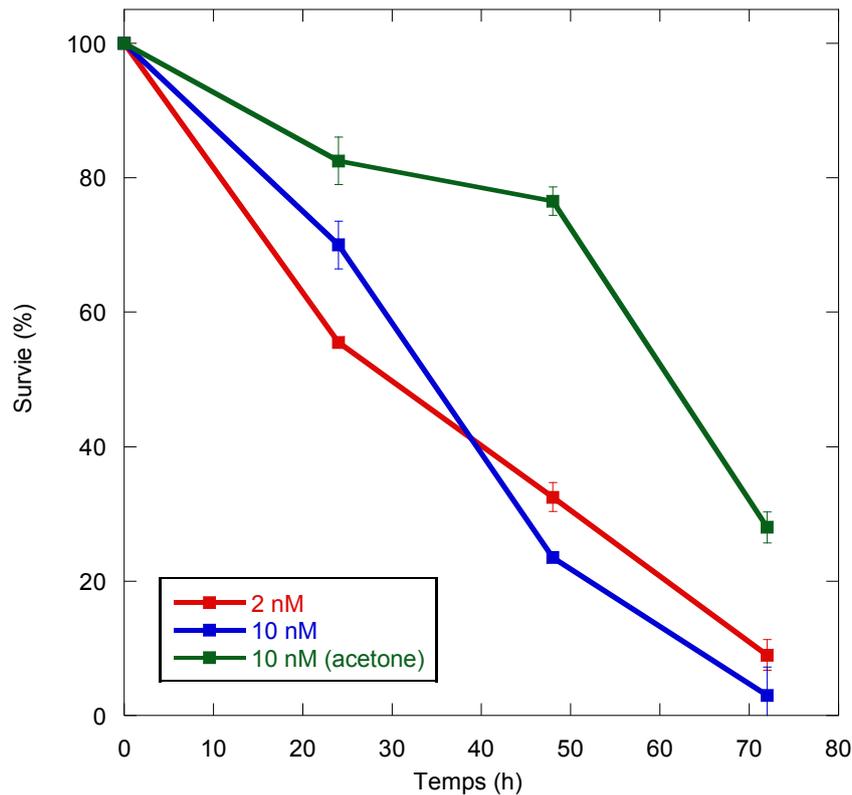


Figure 1.31 – Evolution de la survie de l'*Acartia tonsa* après exposition au 4-NP encapsulé dans des LNCs ou dissout dans l'acétone. Les barres d'erreur représentent l'écart type pour chaque traitement ($n = 2$).

Nous observons également une toxicité plus élevée du 4-NP encapsulé dans les nanoparticules lipidiques par rapport au 4-NP introduit avec de l'acétone. Après 72 heures, le taux d'encapsulation du 4-NP est de 86%, alors que 16% a fui dans l'eau de mer. Le taux de survie après 72 heures est de 3% pour 10 nM de LNCs chargées en 4-NP alors qu'elle est de 28% lorsque les LNCs sont chargées en 4-NP libre. Les LNCs chargées en 4-NP libre ont donc une toxicité 9 fois plus élevée.

7.7 Etude de la reproduction sous exposition aux HAPs encapsulés dans des LNCs

Un autre facteur à prendre en compte pour le suivi des effets des HAPs sur les copépodes est le taux de ponte car il affecte directement les effectifs des populations.⁸¹ C'est un paramètre essentiel car il garantit le bon fonctionnement d'un grand nombre de processus métaboliques.⁸² Pour ces expériences, nous avons mis en place 3 réplicas de 10 femelles exposées aux LNCs à une concentration de 10 nM HAPs pendant 24h (**Figure 1.32**).

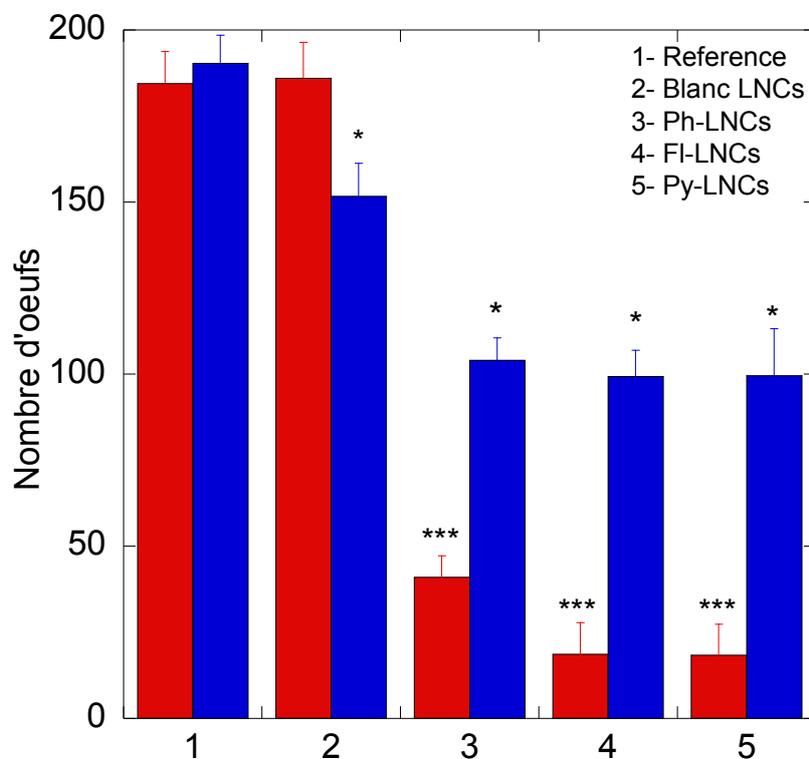


Figure 1.32 - Taux de ponte chez le copépode *Acartia tonsa* suite à une exposition à des LNCs vides, à des LNCs chargées en phénanthrène, fluoranthène et pyrène à une concentration de 10 nM pendant 24 h. Les barres d'erreur représentent l'écart type pour chaque traitement ($n = 3$). *Différence significative à $p < 0,05$. ***Différence significative à $p < 0,001$ par rapport aux deux contrôles (rouge – LNCs vides, bleu - acétone).

Les effets négatifs sur la ponte d'*Acartia tonsa* sont moins importants lorsque le polluant est introduit à l'aide d'acétone que lorsqu'il est encapsulé dans des

nanocapsules lipidiques. Le taux de ponte des copépodes incubés pour 24h avec du phénanthrène libre introduit dans l'eau avec de l'acétone était de 10.4 œufs par femelles. Il était de 4.1 œufs par femelles par jour pour les copépodes incubés avec du phénanthrène introduit via les nanocapsules lipidiques à concentration égale. Le taux de ponte des copépodes incubés avec des LNCs chargées en pyrène et en fluoranthène était de 1.8 œufs par femelles par jour. Il était de 10 œufs par femelle et par jour lorsque ces molécules ont été introduites dans l'eau à l'aide d'acétone. Ces résultats confirment que les nanocapsules chargées sont ingérées par les copépodes et peuvent être métabolisées très rapidement. Elles peuvent ainsi avoir des effets toxiques immédiats sur la reproduction.

Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons démontré que les nanocapsules lipidiques pouvaient être utilisées comme vecteur de molécules hydrophobes dans les copépodes, et qu'elles se montraient même plus avantageuses en ce sens que les solvants organiques (comme l'acétone), les sédiments ou les liposomes. Les LNCs sont simples à synthétiser en utilisant la méthode d'inversion de phase. Ces LNCs sont stables dans l'eau de mer pendant plusieurs jours sans aucune dégradation apparente et ne sont pas toxiques pour les copépodes.

L'ingestion de LNCs par l'*Acartia tonsa* a été mise en évidence par la microscopie confocale. La mortalité des copépodes est très élevée lorsqu'ils sont exposés aux LNCs chargées en HAPs ou en bisphénol A. Cela nous indique que ces molécules sont libérées à l'intérieur des copépodes. Les résultats présentés ici ouvrent la voie à des études auparavant encombrées par la faible solubilité des molécules dans l'eau. Nous pouvons désormais faire ingérer d'autres types de molécules aux copépodes comme des médicaments. La faible toxicité des LNCs rend ces systèmes de distribution appropriés pour des tests nutritionnels et écotoxicologiques sur les copépodes. Les résultats ont été publiés dans les articles que vous pouvez trouver dans l'annexe 7.

Chapitre 2 Utilisation de nanoparticules comme vecteurs de produits nutritifs pour les copépodes

Introduction bibliographique

1. Aquaculture

L'aquaculture, c'est la culture d'organismes aquatiques comme les poissons, les crustacés, les mollusques ou les plantes aquatiques. Elle peut être pratiquée dans l'eau douce ou l'eau salée dans des conditions contrôlées. Le poisson le plus exploité en aquaculture est le carpe d'eau douce. Nous pouvons comparer l'aquaculture à la pêche commerciale, qui consiste à récolter des poissons et d'autres organismes aquatiques depuis leur milieu naturel (sauvage).

L'aquaculture est une solution alternative à la surpêche et à la disparition de certains organismes aquatiques recherchés en raison des besoins croissants en produits de la mer. En 2008, elle fournissait 76.4 % des poissons d'eau douce consommés dans le monde, 64.1 % des mollusques, 46.4 % des crustacés et seulement 2.6 % des poissons d'eau de mer.⁸³ L'aquaculture est aussi une solution pour repeupler les rivières ou les étangs dont les animaux ont disparu, notamment à cause de la surexploitation.

1.1 Inconvénients de l'aquaculture :

- Au niveau local, l'aquaculture traditionnelle (ou les poissons sont cultivés en cages ou en bassins sur le littoral) peut dans certains cas causer plus de dégâts sur l'environnement que la pêche sauvage. En revanche, son impact sur l'environnement est minime au niveau mondial.⁸⁴ Les problèmes locaux sont souvent relatifs au traitement des déchets et aux effets secondaires des antibiotiques utilisés. Ils peuvent aussi être liés à la concurrence entre l'élevage et la pêche d'espèces sauvages, ainsi qu'à l'utilisation de petits poissons pour nourrir les poissons carnivores commercialisables.

- L'aquaculture peut contribuer à la prolifération d'espèces envahissantes susceptibles d'endommager la faune, comme c'est le cas pour la perche du Nil.
- Les déchets produits par les poissons sont organiques et composés d'éléments nutritifs nécessaires à toutes les composantes de la chaîne alimentaire aquatique. Les déchets rejetés au fond de l'océan peuvent endommager, voire éliminer la vie benthique. Ils peuvent aussi diminuer les niveaux d'oxygène dissous dans l'eau et affecter la faune sauvage.⁸⁵
- L'élevage du saumon demande une grande quantité de poisson sauvage utilisé pour le fourrage (c'est-à-dire la nourriture pour poissons d'élevage). En principe, les poissons ne peuvent ni produire les omega-3 ni les acides gras dont leur corps a besoin. Ils les accumulent soit en consommant des micro-algues (c'est le cas des harengs et des sardines), soit en consommant des poissons-proies (c'est le cas des saumons). Pour satisfaire cette exigence, plus de 50% de la production d'huile de poisson dans le monde provient du saumon d'élevage.⁸⁶
- Les poissons carnivores comme le saumon ont besoin d'importants apports nutritionnels en protéines provenant du poisson de fourrage. Le problème, c'est que pour produire 1 kg de saumon d'élevage, plusieurs kilogrammes de poisson de fourrage sont nécessaires. Alors que la demande en saumon continue d'augmenter, le besoin en poisson de fourrage grandit davantage. Ainsi, 75% de la pêche dans le monde a dépassé ou est en passe de dépasser son rendement maximal durable.⁸⁷
- Certains poissons d'élevage parviennent parfois à s'échapper, puis à se croiser avec leurs congénères sauvages. Les poissons croisés peuvent ainsi devenir envahissants sur les espèces sauvages.⁸⁸ En effet, ils sont plus résistants aux maladies que les poissons sauvages, s'adaptent plus facilement à leur environnement et se nourrissent des mêmes ressources.
- L'aquaculture pratiquée d'une façon non durable est une menace grandissante pour les écosystèmes côtiers. En effet, près de 20% des forêts de mangroves ont été détruites depuis 1980, en partie à cause de l'élevage intensif de crevettes.⁸⁹ Plus de 269.000 hectares de mangroves philippines ont été converties en fermes à crevettes. La plupart de ces fermes ont été abandonnées en une décennie en raison de l'accumulation de toxines et la

perte de nutriments. De plus, l'analyse des coûts a démontré que ces fermes n'étaient pas viables économiquement.

- Les fermes de saumon polluent les écosystèmes des littoraux ou elles sont installées. En effet, une ferme de 200 000 tonnes de saumon produit autant de déchets fécaux qu'une ville de 60.000 habitants. Ces déchets sont jetés directement dans la mer et ne sont pas traités.⁸³ Il existe aussi une accumulation de métaux lourds (en particulier du cuivre et du zinc) sur le benthos (le fond marin) à proximité des élevages de saumon.
- La pêche sauvage est en déclin au niveau mondial, car l'habitat des poissons en particulier dans les estuaires est dans un état critique.⁹⁰ L'élevage de poissons, comme le saumon, ne résout pas le problème, car ils ont besoin de consommer des produits provenant d'autres poissons, comme la farine et l'huile de poisson. Des études ont montré que la salmoniculture a des impacts négatifs majeurs sur le saumon sauvage.

1.2 Avantages de l'aquaculture et comment réduire son impact sur l'environnement

L'aquaculture peut cependant avoir des effets bénins voire réparateurs pour l'environnement : c'est le cas de la culture d'algues, de mollusques bivalves filtreurs (par exemple, les huîtres), de palourdes et de moules.⁹¹ En effet, les bivalves filtrent les polluants ainsi que des nutriments présents dans l'eau, ce qui améliore sa qualité.⁹¹ Les algues extraient les nutriments comme l'azote inorganique et le phosphore directement dans l'eau.⁹²

Il existe également de nouvelles méthodes, comme la mise en jachère des enclos, qui diminuent les risques de pollutions biologiques et chimiques en minimisant le stress des poissons.

Les vaccins sont aussi de plus en plus pratiqués pour réduire l'utilisation d'antibiotiques pour le contrôle des maladies.⁹³

La polyculture permet de pallier aux effets négatifs sur l'environnement. En effet, elle consiste à cultiver plusieurs espèces dans un même environnement et à les nourrir avec les mêmes ressources. Plutôt que d'être déversée dans le milieu naturel, la matière fécale peut servir d'engrais naturel pour l'agriculture.

Pour préserver l'environnement, il est également possible de créer des systèmes de recyclage de l'eau. Cela consisterait à la faire circuler à travers des filtres pour éliminer les déchets émis par les poissons et de nourriture non consommée. L'eau peut être économisée grâce à un système de recirculation dans les réservoirs. Les déchets recueillis pour faire du compost. Pour cela, plusieurs projets émergents se basent sur le principe de la ferme aquacole 100% RAS (Recirculating Aquaculture System). Son fonctionnement est le suivant : l'eau des bassins est filtrée de façon à ce qu'elle puisse être réutilisée dans les réservoirs (**Figure 2.1**). Cela réduit considérablement la quantité d'eau et d'espace nécessaire à la production intensive. Les étapes de RAS comprennent l'oxygénation de l'eau, et l'élimination des solides, de l'ammoniac, du CO₂.⁹⁴



Figure 2.1 – Photo de “Recirclating aquaculture” réservoirs à Freshwater Institute, Virginie, Etats-Unis.⁹⁴

1.3 Utilisation des copépodes dans l'aquaculture

Si la phase juvénile et adulte est très bien maîtrisée en aquaculture en utilisant une alimentation artificielle (granulés), l'élevage larvaire reste une problématique même pour une éclosérie performante ne travaillant que sur une seule espèce. En effet, une forte mortalité au cours du cycle de vie du poisson est observée au cours du développement larvaire. Traditionnellement, les Artémia et Rotifères servent nourriture

vivante (proies vivantes) pour les poissons d'élevage en phase larvaire. Ces espèces ne couvrent pas tous les besoins nutritionnels des poissons ; elles sont donc souvent enrichies de produits industriels artificiels parfois onéreux. De plus, les stocks naturels d'Artémia ne peuvent suffire à la demande actuelle de plus en plus croissante de l'aquaculture.

Pour mieux comprendre les expériences qui vont suivre, nous commençons d'abord par une brève présentation de ces proies vivantes classiques.

a. Rotifères

Les rotifères sont des zooplanctons d'eau douce ou marins d'environ 0.5 mm. Ils sont pluricellulaires mais leur organisme est simplifié.

Ces organismes jouent un rôle important dans le processus de purification de l'eau naturelle, car ils se nourrissent en grande partie de particules organiques ou d'algues en suspension dans l'eau.⁹⁵ Ils sont largement utilisés dans l'aquaculture car ils sont capables de survivre durant de longues périodes dans un état séché ou congelé.⁹⁶ Ils peuvent ensuite reprendre un comportement normal une fois réhydratés ou décongelés. L'espèce *Brachionus plicatilis* (**Figure 2.2**) est un rotifère capable de tolérer différentes salinités ; c'est pourquoi il est largement utilisé dans l'aquaculture. Souvent c'est la première nourriture distribuée aux larves de poissons avant l'Artémia.⁹⁷



Figure 2.2 – Rotifère *Brachionus plicatilis* (Photo A. Tamrin, Université Hasanuddin, Indonésie)

b. Artémia

L'*Artemia salina* est un crustacé vivant dans des lacs salés ou des marais salants (souvent en Amérique latine et en Californie).⁹⁸ Une caractéristique spécifique des Artémia est qu'ils nagent sur le dos. Ils peuvent vivre dans l'eau à la salinité très élevée (jusqu'à saturation à environ 300g /L), mais aussi dans l'eau faiblement sale.

Leur taille adulte est en moyenne de 8 à 10 mm (**Figure 2.3**) mais elle peut atteindre 15 mm en fonction de son environnement. Leur corps de forme allongée se divise en 20 segments et comporte 20 paires « pattes », des appendices en forme de feuilles et qui oscillent à un rythme régulier.⁹⁹

Quand l'environnement des Artemia n'est pas favorable à leur développement, les femelles peuvent produire des œufs séchés appelés cystes. Ces cystes peuvent être conservés longtemps sans accès à l'eau. Ils peuvent ensuite être réhydratés pour donner naissance aux nauplii d'Artémia.¹⁰⁰

Les nauplii atteignent l'âge adulte après 2 semaines dans une température de 25°C.



Figure 2.3 - Photo d'*Artemia salina*. Source : www.aquaportail.com

C'est pourquoi, les industriels recherchent le copépode idéal pouvant servir de nourriture alternative pour les larves de poissons. Les copépodes répondent à leurs besoins nutritionnels et constituent une grande part de leur alimentation dans leur environnement naturel.¹⁰¹ Comparés aux rotifères et aux nauplii d'*Artémia*, les copépodes peuvent améliorer la croissance des larves, leur survie et leur chance d'atteindre leur stade juvénile.^{102, 103} Il est donc important de pouvoir produire des copépodes en quantité suffisante pour une production à grande échelle.

Ils existent plus de 20 000 espèces¹⁰⁴ de copépodes classées.¹⁰⁵ Cependant, le nombre d'espèces cultivées à grande échelle pour la nutrition de larves de poissons d'élevage est très faible et concerne principalement les classes Calanoida, Harpacticoida et Cyclopoida. Les copépodes calanoïdes sont abondants le plus souvent dans les zones pélagiques des zones côtières. Ce sont donc les espèces les plus à même d'être produites en masse au profit de l'aquaculture.¹⁰⁶

1.4 Mise en culture des copépodes

Pour obtenir des copépodes afin de les utiliser en aquaculture, deux solutions s'offrent à nous, soit les collecter en milieu naturel ou bien les cultiver.

Très abondants sur les zones côtières, ils peuvent être collectés et triés par taille à l'aide de tamis. Ces derniers permettent de trier les nauplii (80-250 μ m), les copépodites (80-350 μ m) et les adultes (250-650 μ m). Il est aussi possible d'utiliser des pièges lumineux pendant la nuit pour les attirer.¹⁰⁷ Les copépodes sont ensuite expulsés vers les tamis à l'aide d'un flux d'air avant d'être triés par taille.

Pour démarrer une culture de copépodes, il faut commencer par les adultes.¹⁰⁸ Pour cela, il faut au minimum en moyenne 150 adultes de chaque sexe selon les espèces dans une colonne contenant au minimum 150 litres d'eau.¹⁰⁹ Il est préférable d'utiliser des volumes d'eau de mer moins importants et les augmenter progressivement, suivant la croissance de la population.

Les copépodes se nourrissent principalement d'algues : des micro-algues (<5 μ m) comme le *Isochrysis galbana* ou des algues de taille supérieure à 10 μ m comme le *Rhodomonas salina*.¹¹⁰ Le fait que les copépodes aient besoin d'algues pour se nourrir peut être perçu comme un inconvénient car les cultures d'algues (**Figure 2.4**) n'ont pas été introduites dans la plupart des unités d'aquaculture. De plus, il faut bien sélectionner les espèces d'algues car leurs propriétés en acides gras, en acides aminés et leur valeur nutritionnelle sont variables.^{111, 112} Les algues doivent également être maintenues dans des milieux spécifiques et leurs conditions de vie doivent être respectées pour garantir une qualité suffisante de leurs cellules.



Figure 2.4 – Installation d'une culture de *Rhodomonas salina* (photo J. Støttrup)

En raison de leur mode de nutrition, il est difficile d'obtenir une culture dense de copépodes calanoïdes. La densité maximale obtenue varie de 100 à 2000 individus par litre. Pour l'espèce *Eurytemora affinis*, la densité peut même atteindre 3000 individus par litre.¹¹³ Même si au début de la culture des copépodes, la densité peut être élevée, elle diminue au bout de quelques jours.

Selon les espèces, les copépodes calanoïdes pondent leurs œufs de deux manières. Dans la première, les œufs sont contenus dans un sac porté par la femelle, alors que dans la seconde les œufs sont pondus directement dans l'eau. En moyenne, les calanoïdes pondent entre 11 et 50 œufs par jour.



Figure 2.5 - Image de copépodes femelle de l'espèce *Acartia tonsa* avec le spermatophore.¹¹⁴

Il a été démontré que la reproduction des calanoïdes nourris d'un mélange des algues *Chaetoceros* et *Isochrysis* est inférieure à celle de copépodes soumis à un régime contenant une seule algue.¹¹⁵ Une ponte encore plus importante (31 œufs par femelle par jour) a été observée sur les copépodes *Paracalanus crassirostris* nourris avec les dinoflagellés *Heterocapsa niei*.¹¹⁶ La composition des algues influe donc sur la reproduction et la densité des copépodes.

Les taux de ponte et d'éclosion peuvent être améliorés si les copépodes sont nourris avec des algues de meilleure qualité. Toledo et al. ont utilisé une combinaison de *Tetraselmis sp.*, *Chaetoceros sp.*, et *Nannochloropsis sp.*¹¹⁷ Toutes ces algues ont une faible concentration d'acide docosahexaénoïque (DHA, 22:6n-3) et une concentration élevée d'acide eicosapentaénoïque (EPA, 20:5n-3).¹¹⁰ Mais les copépodes calanoïdes

n'ont pas les enzymes nécessaires pour convertir les EPA en DHA, or ils en ont besoin pour se développer et se reproduire.¹¹⁸ En remplaçant une ou deux de ces algues par une algue contenant une concentration élevée de DHA, nous pourrions améliorer la reproduction de ces copépodes.

Le taux de rencontre avec les larves de poissons dépend des densités de copépodes et des autres prédateurs présents dans les réservoirs de la culture. Il dépend également de la turbulence à l'intérieur du réservoir, de l'éclairage et des couleurs des proies. L'alimentation des larves de poissons au tout début de leur vie peut être relativement inefficace. C'est seulement au bout de quelques jours qu'ils deviennent capables de capturer leurs proies efficacement.¹¹³ Les nauplii de copépodes sont transparents pendant les premières étapes de leur développement. Il est donc plus difficile pour les poissons de les détecter (**Figure 2.6**).



Figure 2.6 - A gauche : image de nauplii *Acartia tonsa* sans nourriture - à droite image de nauplii nourris avec *Rhodomonas* sp (apparente dans le tube digestif) (Photo S.R. Sørensen).

Si de nombreuses études existent concernant la culture des copépodes calanoïdes, il reste des progrès à faire. L'accent peut être mis sur la stabilisation des cultures pour atteindre une densité optimale. Pour ce faire, les copépodes ont besoin d'un régime alimentaire de qualité (notamment concernant la taille des nutriments) et de quantité optimale. Il est également nécessaire de maintenir une excellente hygiène de la cuve de la culture, et de récolter les œufs et les nauplii régulièrement. L'enjeu est donc de trouver une méthode répondant à ces exigences de manière efficace et facilement

réalisable. Nous trouverons ainsi un moyen d'augmenter la production de copépodes et ainsi de répondre aux besoins alimentaires des larves de poissons.

Les œufs qui n'ont pas encore éclos peuvent être collectés et stockés pour une utilisation ultérieure. Bien que la période de stockage soit limitée, les œufs stockés peuvent servir de supplément en cas de baisse de ponte ou en cas de besoin de créer un élevage de plus grande quantité. Il faut alors améliorer la qualité des œufs stockés pour optimiser le taux d'éclosion.

La photopériode (la durée des périodes éclairées et des périodes sans lumière) et le taux de ponte sont des paramètres à prendre en compte dans le développement de la culture.¹¹⁹ La plupart des espèces tolèrent une légère aération, ce qui est un avantage pour les espèces de copépodes se nourrissant de phytoplancton. En effet, l'aération permet de garder le phytoplancton en suspension.

2. Composition des micro-algues

Les micro-algues sont des micro-organismes végétaux qui produisent des substances organiques à partir de substances minérales, de gaz carbonique et d'eau. Leur composition diffère selon le type, le groupe et l'espèce, mais elles ont toutes des points communs.

2.1 Les acides gras

La présence d'acides gras dans les algues est très importante pour le développement des copépodes (surtout en oméga 3). Une étude¹²⁰ a démontré que le développement des copépodes est accéléré s'ils sont nourris avec des algues contenant une quantité importante d'oméga 3. Leur développement est perturbé (le temps pour passer des étapes de développement de naupii à copépodite est ralenti) s'ils sont nourris avec des cyanobactéries contenant davantage d'omégas 6 et d'oméga 9. Certaines études définissent également la composition du copépode harpacticoïde *Nitokra lacustris* pour son utilisation comme nourriture des larves de poissons dans l'aquaculture. Ils ont été nourris avec l'algue *Tetraselmis suecica*, qui est une algue verte.¹²¹

Tableau 2.1 - Contenance en acides gras dans le copépode *Nitokra lacustris* et dans l'algue utilisée pour les nourrir.¹²⁰

Catégorie d'acide gras	<i>T. suecica</i> (% d'acides gras total)	Copépodes (% d'acides gras total)
Acides gras saturés	22.9	25.3
Acides gras mono-insaturés	19.0	21.9
Acides gras bi-insaturés	15.6	25.2
Acides gras polyinsaturé	31.6	21.1

2.2 Pigments

Selon leur type, les algues ont différents pigments. Le rôle physiologique des molécules des pigments est de capter l'énergie lumineuse. Les algues marines sont caractérisées par la présence de différents pigments comme la fucoxanthine, la diadinoxanthine, la diatoxanthine et la chlorophylle.¹²² La chlorophylle est responsable de la couleur verte des chloroplastes. Si la chlorophylle a est commune à toutes les algues, la chlorophylle b existe uniquement chez les algues vertes et les embryophytes (plantes terrestres).¹²³ Les formules chimiques des chlorophylles a et b sont très proches : ce qui les différencie est la présence d'un groupement aldéhyde chez la chlorophylle b à la place d'un groupement méthyle chez la chlorophylle a. L'algue rouge *Rhodomonas sp* qui contient le pigment phycoxanthine est souvent utilisée pour nourrir le copépode *Acartia tonsa*. Les pigments ingérés par les copépodes sont ensuite stockés dans des gouttelettes lipidiques à l'intérieur de leur corps.¹²⁴

2.3 Glucanes

Les glucanes font partie des polysaccharides des algues, leur réserve d'énergie. Ces polymères (comme les alginates l'amidon ou le cellulose) sont composés de D-glucose.¹²⁵ Les algues contiennent également des protéines, des vitamines et des minéraux qui diffèrent selon les espèces.

3. Besoins nutritionnels des larves de poissons et propriétés nutritionnelles des copépodes, rotifères et Artémia

Les copépodes constituent l'alimentation principale des larves de poissons sauvages dans les océans. On suppose donc qu'ils couvrent l'ensemble de leurs besoins nutritionnels. En effet, les copépodes sont très riches en protéines, en omega-3, en acides gras, en lipides polaires, en vitamines et en micro-minéraux (**Tableau 2.2**). Les concentrations de nutriments dans les copépodes peuvent varier selon l'espèce, l'approvisionnement alimentaire et l'environnement. Les copépodes cultivés dans un étang salé bénéficiant d'un grand approvisionnement alimentaire sont plus riches en micronutriments que les copépodes récoltés en mer. Des variations liées à la latitude peuvent aussi exister entre les copépodes de différentes zones géographiques.¹²⁶

3.1 Acides aminés

Van der Meeren et al.,¹²⁷ ont analysé la somme des acides aminés libres constituant les protéines des copépodes rotifères et Artémia. Les résultats en masse sèche de protéines étaient en moyenne de 450 à 500 mg/g pour les rotifères, de 260 mg/g pour les copépodes et de 320 à 350 mg/g pour les Artémia. Perumal et al.¹²⁸ ont analysé deux espèces de copépodes - *Acartia spinicauda* et *Oithona similis*, à partir de trois stations le long de la côte sud-est de l'Inde. Les niveaux de protéines analysées étaient supérieurs à ceux de Van der Meeren : entre 590 et 700mg/g masse sèche.

3.2 Lipides

Les lipides dans les copépodes se caractérisent par un niveau élevé d'omega-3 : ils représentent entre 20 et 56% des acides gras totaux.¹²⁷

Le **tableau 2.2** montre que plusieurs micronutriments sont présents dans les copépodes à des concentrations beaucoup plus élevées que les gammes de prescriptions indiquées pour les poissons. Les copépodes ne contiennent pas de vitamine A,¹²⁹ mais les larves de poissons marins peuvent probablement convertir l'astaxanthine présente à des niveaux élevés dans les copépodes, en vitamine A.

Tableau 2.2 – Valeurs nutritionnelles pour les principales sources de nourriture pour les larves de poissons et les besoins estimés des larves de poissons. ¹²⁶

	Rotifers†	Artemia‡	Ongrown Artemia‡	Copepods§	NRC (2011)
Macronutrients (g kg⁻¹ DM)					
Total amino acids (TAA)	396 ± 12	471–503	596 ± 59	634 ± 89	–
Nitrogen	89 ± 2	85–102	101 ± 10	119 ± 5	–
Protein/nitrogen factor	4.46	4.95–5.57	5.79 ± 0.85	5.30 ± 0.44	–
Soluble AA (% of TAA)	44–61¶	54 ± 4¶	na	na	–
FAA (% of TAA)	5–7	9–10	na	12–13	–
Lipid (TL)	95–110	102	178 ± 34	156 ± 31	–
PL (% TL)	34	31	33 ± 2	50 ± 12	–
NL (% TL)	66	69	67 ± 2	50 ± 12	–
Total fatty acids	90 ± 21	119	84 ± 8	na	–
Glycogen	na	74–96	21 ± 1	5 ± 2	–
Ash	96	90	197 ± 12	95–104	–
Vitamins (mg kg⁻¹ DM)					
Vitamin C	117–190	798	400–1000	500	50
Riboflavin	22–44	37	27–60	14–27	4–7
Thiamine (B1)	2.0–57	4.2	3–12	13–23	1
Folic acid	4.0–57	14	6–11	3–5	1
Pyridoxine (B6)	20–25	28	2–33	2–6	3–6
Biotin	1.6–1.8	4.5	2–5	0.6–0.9	0.15–1
Cobalamin (B12)	23–43	0.00	2–5	1–2	0.02
Niacin	191–249	159	160–250	100–150	10–28
Vitamin E	85–294	70	64–500	110	50
Carotenoids	24	630–750	650–750	630–750	–
Vitamin A	0.00	0.00	0.00	0	0.75
Minerals (g kg⁻¹ DM)					
Phosphorus	9.4 ± 0.7	12–19	na	12.4–15.0	3–8
Calcium	1.9 ± 0.2	1.9–2.0	na	1.1–2.4	nd
Magnesium	4.8 ± 0.5	2.0–5.0	na	2.4–3.1	0.4–0.6
Minerals (mg kg⁻¹ DM)					
Iodine	3.2–7.9	0.5–4.6	2.2 ± 0.4	50–350	0.6–1.1
Manganese	3.9–5.1	4–30	na	8–25	2–12
Copper	2.7–3.1	7–40	na	12–38	3–5
Zinc	62–64	120–310	na	340–570	15–37
Selenium	0.08–0.09	2.2	na	3–5	0.15–0.25
Iron	84–114	63–130	na	85–371	30–150

Objectifs de mon travail de thèse

L'objectif de ce travail est de trouver une méthode simple de vectorisation de certaines molécules ayant un intérêt pour les copépodes. Ce vecteur peut être représenté par des nanoparticules, à condition qu'elles soient faciles à synthétiser en grande quantité. Les nanocapsules lipidiques présentées dans le chapitre 1 sont un vecteur prometteur, mais il est impossible de les synthétiser en grande quantité rapidement. Nous avons donc pris en compte la composition principale des algues et avons amélioré leurs valeurs nutritionnelles avec des principes actifs.

Comme mentionné dans la partie bibliographique de ce chapitre, les polysaccharides (entre autres polysaccharides d'amidon, de cellulose, d'alginate, de gomme arabique et de chitosan) représentent une partie importante des cellules de micro-algues.

Partie expérimentale

1. Synthèse des nanoparticules

1.1 Broyage des nanoparticules de polysaccharide

Pour la synthèse de ces nanoparticules, nous avons utilisé une méthode de broyage à billes. En effet, les nanoparticules doivent être synthétisées à la taille voulue avant leur utilisation. Il est nécessaire de les caractériser en termes de taille et polydispersité pour l'application visée. Le principe de la méthode « top down » implique la réduction de la taille des plus grosses particules. La plupart des broyeurs mécaniques utilisent une partie fixe et une partie en mouvement pour compresser ou casser les grosses particules en particules plus petites jusqu'à un certain point.¹³⁰ La technique que nous avons utilisée pour préparer des particules de taille relativement petite est le broyage de type planétaire avec des billes.

1.2 Principe du broyage planétaire

Le processus est effectué dans un récipient appelé « bol de broyage » dans lequel on ajoute le produit à broyer (généralement un polymère) et les billes. Le bol et les billes sont constitués du même matériau. Dans notre cas, il s'agit d'oxyde de zirconium. Suite à l'interaction entre les billes, le polymère et les parois du bol de broyage pendant la rotation, le polymère est transformé en petites particules. Cette technique fonctionne aussi bien sur les matériaux mous, mi-durs et même les matériaux extrêmement durs ou fibreux.

Contrairement aux moulins à rotor, où l'élément mobile est fixé sur le broyeur, les billes sont libres de se déplacer au cours du broyage, ce qui permet de produire des particules beaucoup plus fines. D'une manière générale, plus les billes sont petites et plus le temps de broyage est long, plus les particules produites sont petites.

C'est une version relativement simple d'un broyeur à billes - un pot tourne à une vitesse contrôlée autour d'un point d'axe central. Le modèle peut fonctionner avec un ou plusieurs pots de broyage, et chaque pot occupe une station ou « planète » montée sur une plate-forme circulaire appelée roue de soleil. Quand la roue de soleil tourne, chacune des « planètes » (ou bols de broyages) tourne également sur son propre axe

mais en sens inverse. Cette action accélère la rotation des bols de broyage par les deux forces centrifuges et de Coriolis¹³¹ (**Figure 2.7B**). Par conséquent, l'énergie de broyage est considérablement augmentée, ce qui permet de former des particules encore plus petites.

L'accélération des particules d'une paroi à l'autre du bol de broyage produit un impact des forces de frottements entre les billes et le matériau à broyer. Il est également possible d'effectuer le broyage en présence d'une phase liquide.

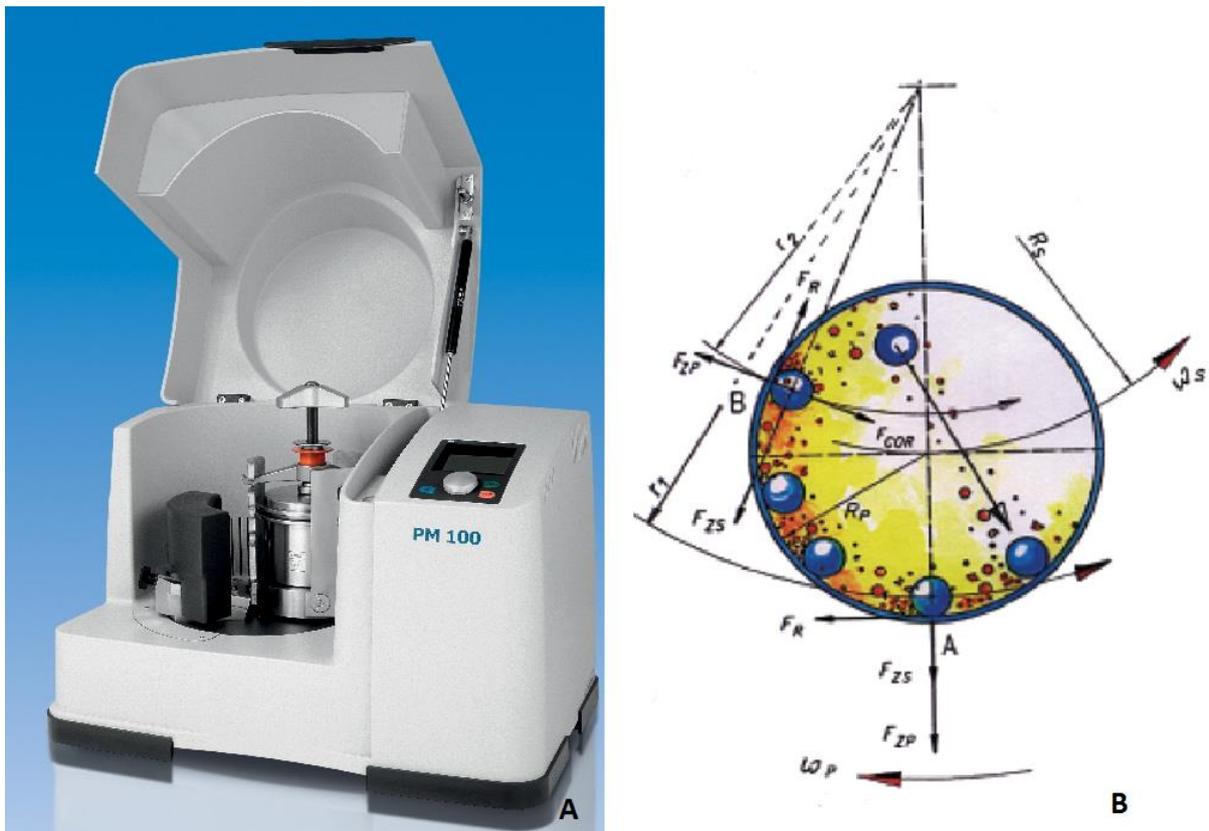


Figure 2.7 – **A**- Photo de broyeur PM 100 ; **B** - Schéma des effets combiné des forces centrifuges et de Coriolis. (Image Retsch, Inc.)

Le broyage planétaire non-colloïdal est réalisé à sec, ce qui permet de récupérer facilement la matière broyée. Dans certains cas, quelques gouttes de méthanol sont ajoutées pour empêcher le broyat de coller aux billes et aux parois du pot. Cependant, pour produire des particules de taille inférieure au $1\mu\text{m}$ ou de tailles colloïdales, le broyage doit être effectué dans un milieu liquide.¹³² Il s'agit généralement d'un alcool (isopropanol ou du méthanol), bien que d'autres solvants, ou même de l'eau puissent parfois être utilisés.

Des billes de tailles différentes sont donc ajoutées dans le bol. Il est possible d'utiliser dans un premier temps des billes de taille supérieure (entre 1 et 3 cm de diamètre) pour diminuer la taille des particules. Nous pouvons ensuite les remplacer par des billes de petite taille (3 mm de diamètre). C'est principalement la force des frottements qui est responsable de la réduction de la taille des particules. Plus les tailles des particules diminuent, plus ces dernières deviennent difficile à briser. Un temps de broyage plus long est donc recommandé.

Les bols de broyage et les billes peuvent être conçues en matières diverses, comme l'acier, l'agate, ou le carbure de tungstène¹³³. L'oxyde de zirconium (ZrO₂) donne généralement de meilleurs résultats, car il garantit une contamination minimum des échantillons : il n'est pas corrosif, très peu réactif et a d'excellentes caractéristiques de la surface.

1.3 Les règles à suivre pour garantir le succès du broyage

Les résultats du broyage dépendent de plusieurs paramètres : la taille des billes de broyage, le ratio entre les billes et le matériau à broyer, le temps de broyage et la vitesse de rotation.¹³¹ Pendant le broyage, la température augmente à l'intérieur du bol, ce qui peut être un facteur à prendre en compte pour les temps de broyages plus longs.

2. Nanoparticules de polysaccharides

2.1 Les polysaccharides

Les polysaccharides sont des polymères constitués de plusieurs monosaccharides. Les plus répandus sont la cellulose et l'amidon qui sont des polymères du glucose. Ce sont des molécules qui représentent la source principale d'énergie de tous les êtres vivants. Ils ont également une fonction structurale : pour les végétaux, la cellulose est un tissu de soutien ; c'est également le cas de la chitine pour certains animaux comme la crevette ou les copépodes. Leur formule chimique brute est $[C_x(H_2O)_y]_n$. Ces molécules ne sont pas solubles dans l'eau.

Nous avons effectué plusieurs essais de broyage de ces polysaccharides pour obtenir des nanoparticules de la plus petite taille possible. Nous avons étudié de façon

systematique l'influence des différents paramètres : la vitesse de rotation, le nombre de billes ou la taille des billes par rapport à la taille des nanoparticules obtenues. La taille des particules obtenues est évaluée dans l'eau de mer.

2.2 Matériaux et méthodes

Le broyage a été effectué avec un broyeur PM100 de Retsch Inc. Les polysaccharides utilisés sont : l'amidon, la gomme arabique et l'alginate de sodium. Ils sont tous disponibles chez Sigma Aldrich. L'amidon est issu de pommes de terre et sa formule brute est $(C_6H_{10}O_5)_n$. La gomme arabique est issue de l'arbre d'acacia et correspond à un polysaccharide ramifié. L'alginate de sodium est issu d'algues brunes.

2.3 Choix des polysaccharides les mieux adaptés pour les études sur le copépode *Acartia tonsa*

Les nanoparticules sont préparées par broyage avec le broyeur planétaire. Nous avons utilisé 10 billes de 10 mm de diamètre et 3 grammes de produit. Le broyage est effectué à 400 rotations par minutes (rpm) pendant 1 heure. Toutes les deux minutes, le broyeur fait une pause d'une minute, avant de repartir dans un autre sens. Cela permet de ne pas trop chauffer et de limiter l'agglomération des particules. Chaque broyage dure 3 cycles d'une heure, avec entre 30 minutes et une heure de pause entre chaque cycle (cela permet aussi au système de se refroidir).

Grâce à cette méthode, nous avons obtenu des particules d'amidon, d'alginate et de la gomme arabique. L'objectif de cette étude est de sélectionner les particules les mieux adaptées pour le transport de différents composés pour les copépodes. Pour cela, il faut identifier les particules les moins toxiques. Après obtention de la poudre de nanoparticules, nous avons préparé une solution 1 mg/mL dans l'eau de mer et nous avons mesuré la taille en diffusion dynamique de la lumière (DLS). La taille des nanoparticules obtenues pour les différents matériaux broyés est donnée dans le tableau ci-dessous (**tableau 2.3**).

Tableau 2.3 – Diamètre des nanoparticules de polysaccharides broyées. Les mesures de taille sont réalisées dans l'eau de mer à une concentration de 1mg/mL

Type de polysaccharide	Amidon	Gomme arabique	Alginate
Taille de particules (nm)	202.5 ± 25	320 ± 58	97 ± 51

2.4 Survie des copépodes et choix de vecteur

Pour sélectionner les nanoparticules les mieux adaptées, nous avons effectué des tests de toxicité sur le copépode *Acartia tonsa*. L'évolution du taux de survie a été suivie pendant 7 jours. Chaque réplica a été réalisé avec 100 copépodes adultes des deux sexes placés dans des béchers dans 100mL d'eau de mer à salinité 30psu. Puis, 40mg de poudre broyée a été ajoutée dans l'eau, après avoir été dissoute dans 2 mL d'eau pour faciliter la dispersion dans le grand volume. Les copépodes ont été nourris une fois par jour avec l'algue *Pavlova lutheri* provenant des souches et des cultures du Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences de Wimereux.

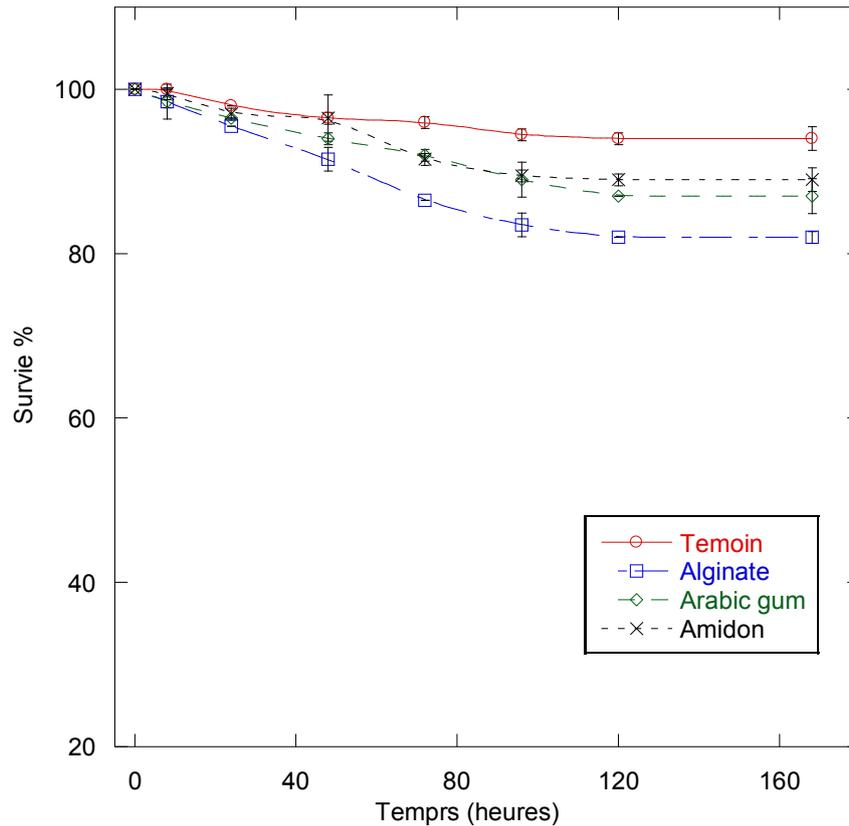


Figure 2.8 – Evolution du taux de survie du copépode *Acartia tonsa* en présence des nanoparticules de polysaccharides.

Les résultats présentés dans la **Figure 2.8** montrent que l'amidon est le composé qui présente la meilleure survie. Nous pouvons voir que l'alginate peut être broyé jusqu'à atteindre la taille de 97nm mais qu'il est plus toxique pour les copépodes que l'amidon. C'est pourquoi nous avons sélectionné les nanoparticules d'amidon comme vecteur pour les molécules d'intérêt pour les copépodes.

3. Caractérisation des nanoparticules d'amidon

Avant d'utiliser les nanoparticules d'amidon, nous les avons caractérisées pour définir leur stabilité et leur taille. Il s'agit des nanoparticules d'une taille moyenne de 200nm mesurées par diffusion dynamique de la lumière dans l'eau de mer.

3.1 Optimisation du broyage pour les nanoparticules d'amidon

Après chaque module de broyage, nous avons mesuré la taille des particules synthétisées. Nous avons varié différents paramètres dans le module de broyage. Nous avons fixé le nombre à 10 billes de 10 mm et nous avons varié la vitesse de rotation. Pour chaque broyage nous avons fixé un temps de 3 heures (hors pauses) divisé en 3 cycles d'une heure chacun. Chaque cycle d'une heure se déroule de la manière suivante : après une période de rotation de 10 minutes, le module s'arrête pour une pause de 2 minutes, avant de recommencer en sens inverse pour à nouveau dix minutes. L'opération continue ainsi pendant tout le cycle. Une pause de 30 minutes est effectuée entre chaque cycle. Pour le broyage, nous avons utilisé 3g d'amidon.

Tableau 2.4 – Taille (en nm) des nanoparticules d'amidon après une variation de la vitesse de rotation.

Vitesse de rotation en rpm	Taille des particules mesurées par DLS (en nm)
200	456 ± 59
400	231 ± 12
500	Il était impossible d'obtenir des nanoparticules car la poudre s'agrège sur les parois du bol à cause de la température élevée dans le système.

Pour la suite des expériences, nous avons fixé la vitesse de rotation à 400 rpm. Cette fois, nous avons varié le nombre de billes dans le système. Chaque broyage comprenait 3 cycles d'une heure (hors pauses), avec une pause de 30 minutes entre chaque cycle pour permettre au système de refroidir. Pour cela, nous avons également effectué un broyage de 2 minutes, une pause d'une minute avant la reprise de la rotation en sens inverse. Même si le temps de broyage pour chaque cycle diminue, nous avons observé une diminution de la taille des particules. En effet, le système a plus de temps pour refroidir ; les particules ne collent pas sur les billes ou sur la paroi du bol. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 2.5 – Taille (en nm) des nanoparticules d'amidon après une variation de nombre de billes pour chaque broyage de 3 cycles.

Nombre de billes de 10mm	Taille des particules obtenues (nm)
10	198.4 ± 14.5
12	148.9 ± 3 9.1
14	193.4 ± 8.6
16	80 ± 2.3
18	96.54 ± 12.3

Nous avons pu préparer des nanoparticules de 80nm en utilisant 16 billes de 10 mm. En effet, nous pouvons remarquer qu'il n'y pas de lien logique entre le nombre de billes utilisées et la taille des particules obtenues.

Pour une dernière expérience, nous avons utilisé des billes d'1 mm de diamètre de façon à ce que leur poids corresponde à celui de 16 ou 18 billes de 10 mm, soit 50g et 56.3g respectivement. Le diamètre des particules obtenues était respectivement de 145nm et 104nm.

Pour la suite des expériences, nous avons utilisé la méthode de broyage avec 16 billes de 10 mm et nous avons obtenu des nanoparticules de 80nm.

3.2 Microscopie électronique à balayage (MEB)

Les détails de cette technique sont expliqués en annexe 3.

- La préparation des échantillons

Nous avons utilisé un substrat de silicium nettoyé avec du piranha (mélange de H₂SO₄/H₂O₂ : 3/1 en volume) pour enlever toutes les contaminations organiques. Nous y avons déposé ensuite une goutte de la solution de nanoparticules d'amidon de concentration 0.01mg/mL. Nous avons laissé la solution sécher à l'air libre avant d'effectuer l'imagerie par MEB (**Figure 2.9**).

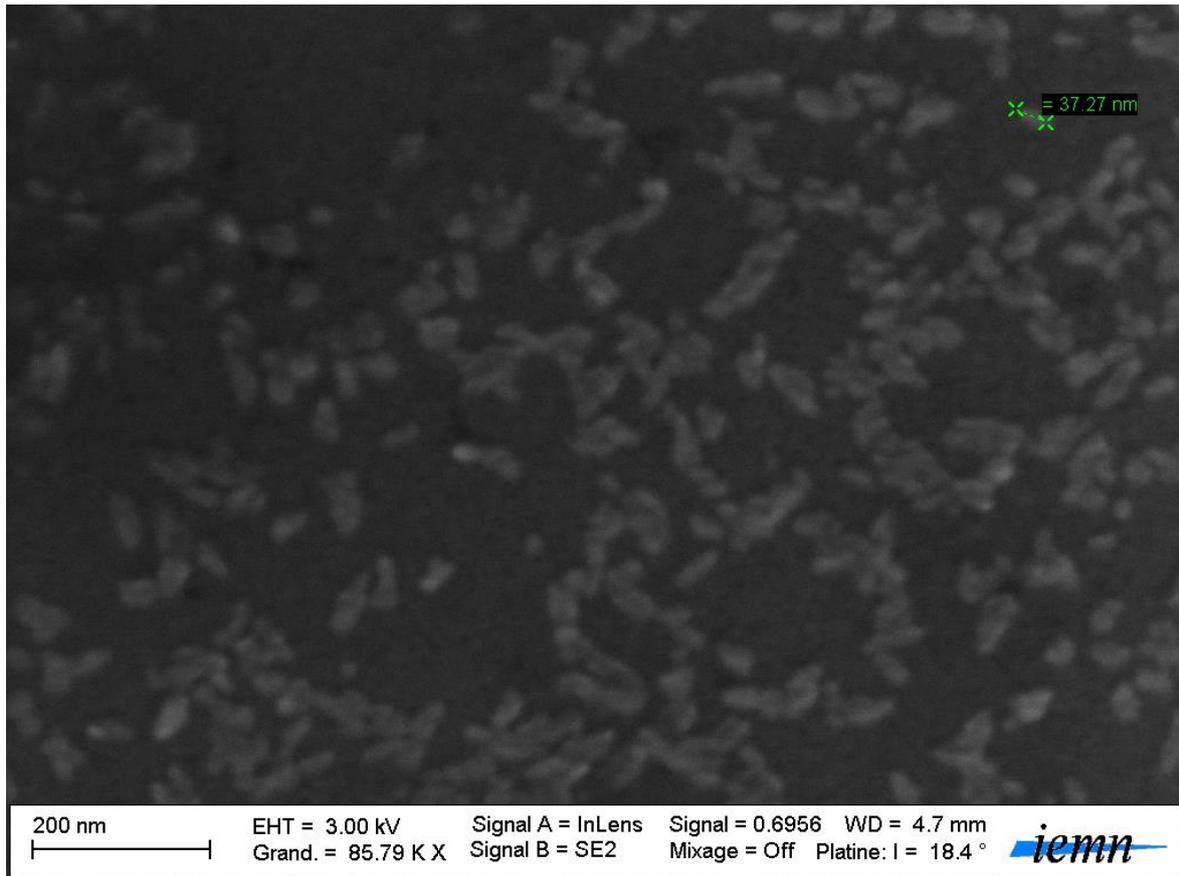


Figure 2.9 – Image MEB de nanoparticules d’amidon de concentration 0.01mg/mL.

En effet, l’image montre que les nanoparticules mesurent autour de 40nm. Cependant, celles-ci ne sont pas mono-dispersées et forment des agrégats. Nous ne pouvons pas discerner la forme des nanoparticules ni faire d’analyses statistiques.

Nous avons donc effectué également la microscopie électronique en transmission.

3.3 Microscopie électronique en transmission (MET)

Le principe consiste à condenser des électrons sur une partie de l’échantillon. Un faisceau d’électrons est transmis sur un échantillon très mince (de 10 à 100nm). Comme les électrons interagissent avec l’échantillon, ils sont repris par un ensemble de lentilles qui forment une image agrandie de l’objet en très haute résolution (jusqu’à 0.08nm).

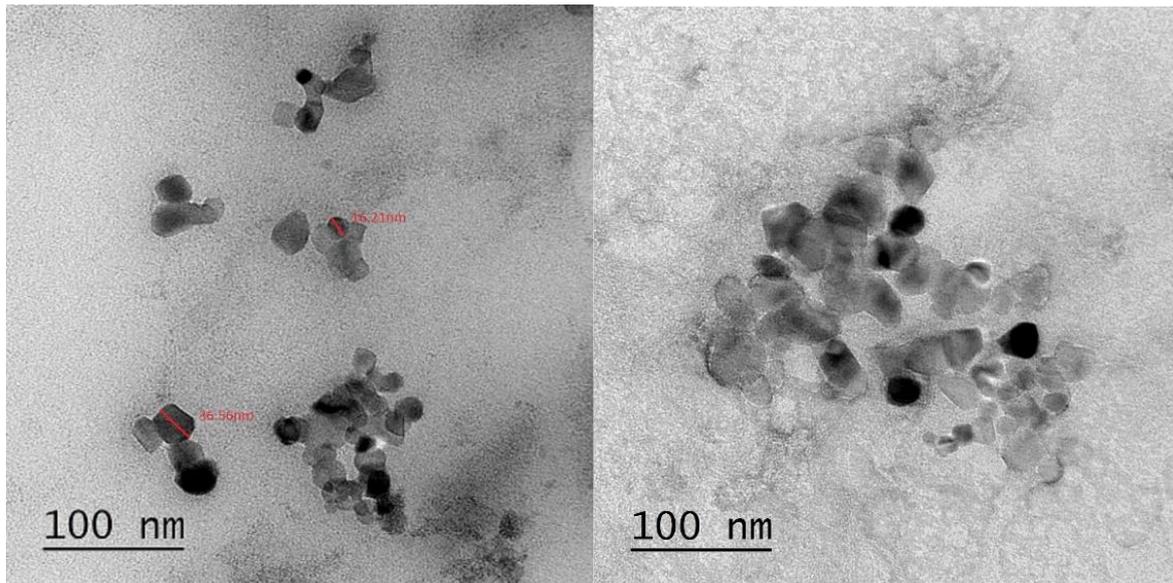


Figure 2.10 – Images MET des nanoparticules d'amidon.

Pour la préparation des échantillons, nous avons utilisé des solutions dans l'eau distillée à une concentration de 0.01mg/mL après coloration négative à l'acétate d'uranyle sur une grille de cuivre. Ensuite, l'imagerie a été réalisée (**Figure 2.10**) sur plusieurs endroits de la grille pour pouvoir réaliser des statistiques sur la taille des nanoparticules.

Nous avons mesuré la taille des particules en utilisant le logiciel ImageJ sur 100 particules. Les résultats sur la distribution de taille des nanoparticules sont présentés ci-dessous. Les particules sont de taille polydisperse et forment des agrégats. La taille moyenne de ces particules est de 41.45nm. L'histogramme (**Figure 2.11**) nous montre qu'il y a deux types de taille : une autour de 25-30nm et autre autour de 50nm. Ces résultats diffèrent des mesures en diffusion dynamique de lumière. Cela s'explique par le fait que la diffusion dynamique de lumière soit une technique qui prend en compte le diamètre hydrodynamique. Comme ces nanoparticules forment des agrégats, la technique mesure la taille des agrégats et pas la taille des particules elles-mêmes.

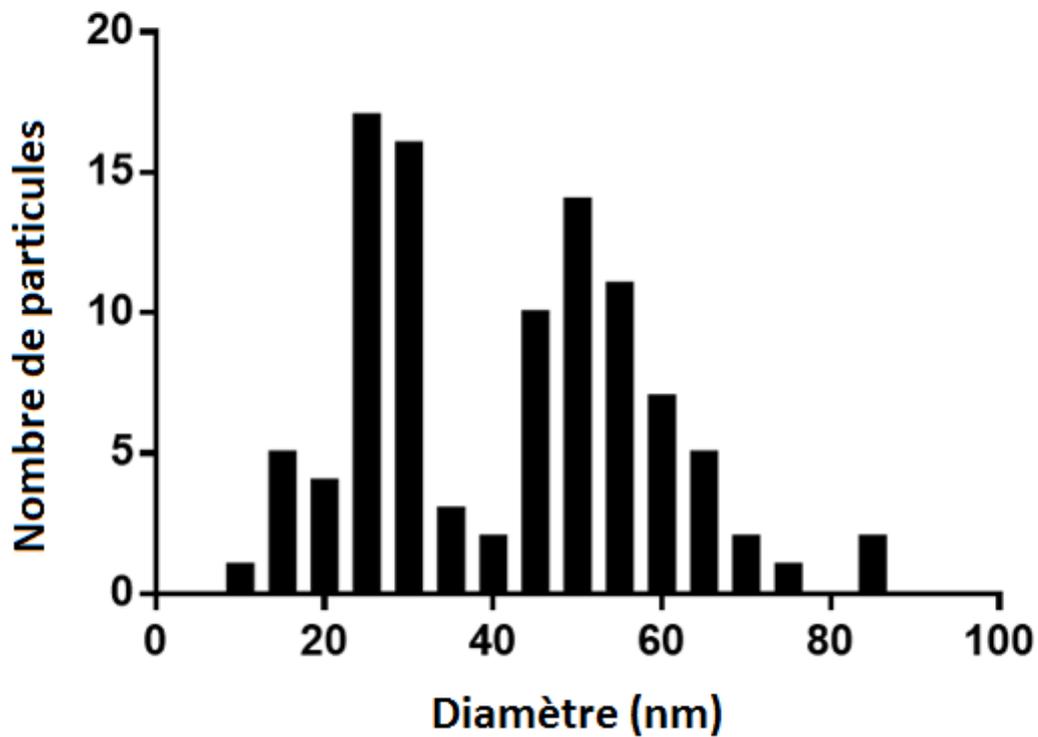


Figure 2.11 – Histogramme de la distribution de la taille des nanoparticules d'amidon. La taille moyenne est de 41.45nm.

3.4 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

Les détails de cette technique sont expliqués en annexe 4.

- Préparation des échantillons

Pour la caractérisation des nanoparticules d'amidon, nous avons utilisé le mode ATR (Attenuated Total Reflexion) de la technique FTIR. En effet, cette technique n'exige pas de préparation des échantillons spécifique. L'échantillon est déposé sur une surface très réfractive de germanium.

Nous avons comparé trois échantillons : de l'amidon brut de pommes de terre (l'amidon de départ que nous utilisons pour le broyage), de l'amidon broyé (nanoparticules d'amidon de taille de 80nm), et de l'amidon broyé chargé en vitamine

B12 pour 0.1% de sa masse. La structure chimique de l'amidon est présentée ci-dessous (**Figure 2.12**):

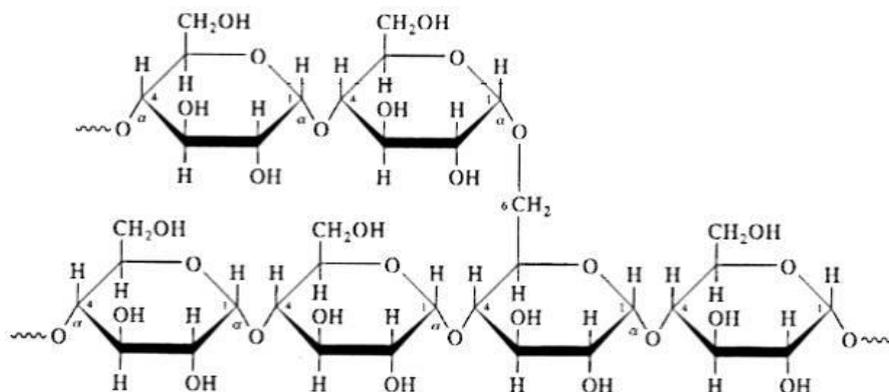


Figure 2.12 - Structure chimique de la molécule d'amidon.

La structure chimique de l'amidon nous permet de comprendre les spectres ATR-FTIR obtenus (**Figure 2.12**).

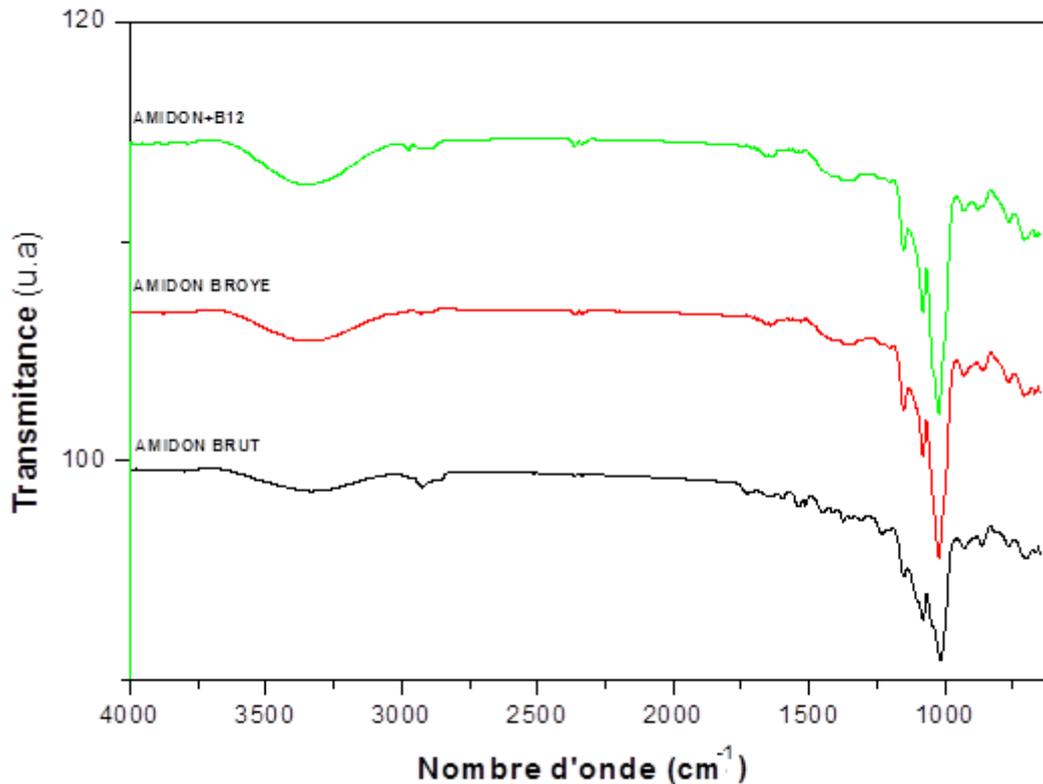


Figure 2.13 – Spectre ATR-FTIR d'amidon, nanoparticules d'amidon et nanoparticules d'amidon chargées en vitamine B12 à 0.1%.

Le spectre infrarouge montre des vibrations de valence caractéristiques des liaisons dans les molécules. La présence des liaisons –OH provenant des molécules d'amidons ou de l'eau adsorbée par l'amidon sont visibles grâce à une large bande qui apparaît entre 3500 et 3000 cm^{-1} . Les bandes de valences des groupements aliphatiques apparaissent entre 3000 et 2850 cm^{-1} . Les doubles liaisons C=O se caractérisent par une valence entre 1830 et 1650 cm^{-1} que nous pouvons observer sur les trois molécules analysées. Les vibrations de valence pour C-O se caractérisent par une présence de plusieurs pics entre 1250 et 900 cm^{-1} . La présence de molécule de cobalamine (vitamine B12) n'apparaît pas en raison de sa faible concentration.

3.5 Analyse thermogravimétrique (ATG)

L'analyse thermogravimétrique mesure les variations de poids dans un matériau en fonction de la température (ou du temps) en atmosphère contrôlée. Ses utilisations principales comprennent la mesure de la stabilité thermique et la composition d'un matériau.

Nous avons effectué l'analyse ATG de l'amidon brut de pommes de terre (l'amidon de départ que nous utilisons pour le broyage) et l'amidon broyé (nanoparticules de taille 80 nm). Les résultats sont montrés sur la **figure 2.14**.

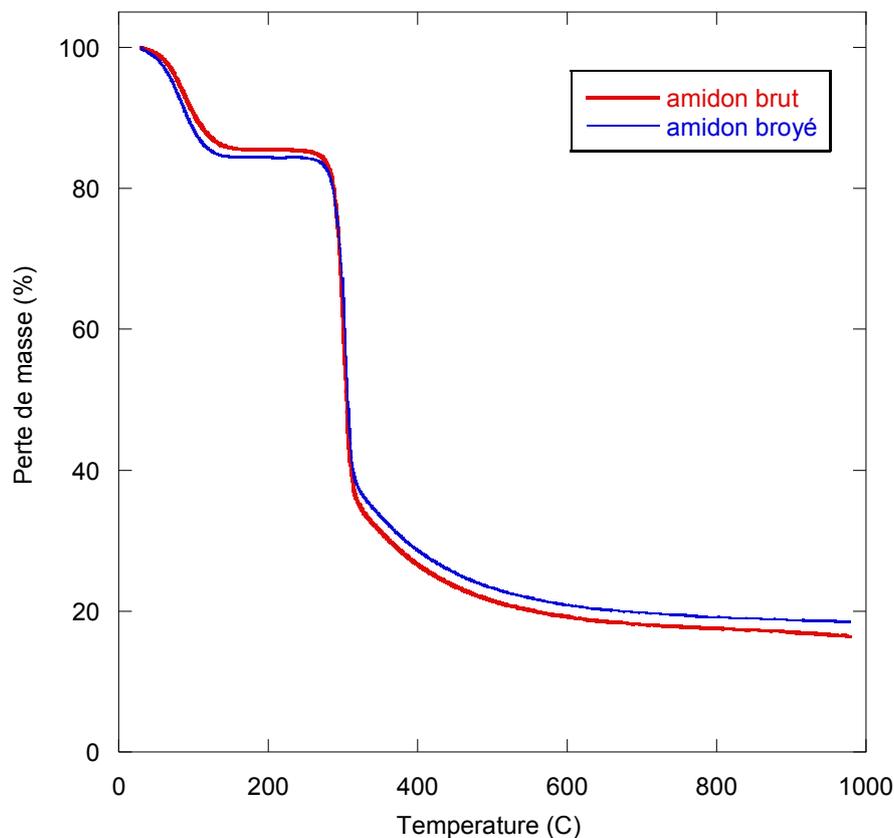


Figure 2.14 – Analyse thermogravimétrique d'amidon brut et des nanoparticules d'amidon.

L'analyse TGA des amidons utilisés montre la perte de masse de chaque échantillon. La perte de masse se produit en trois étapes. Premièrement, l'échantillon d'amidon brut perd 15,56% de sa masse et l'échantillon d'amidon broyé en perd 14,29% alors que la température atteint 100°C. Cette perte est liée à l'évaporation de l'eau contenue

dans l'amidon. Une deuxième perte de masse, plus importante cette fois, arrive alors que la température atteint 260 à 350°C : l'amidon brut perd alors 50,93% de sa masse et l'amidon broyé en perd 54,39%. Cette perte est liée à la décomposition des chaînes polymériques. La troisième perte de masse est très lente commence à 360°C et continue progressivement jusqu'à environ 600°C.

3.6 La spectroscopie de photoélectrons X (XPS)

La spectroscopie de photoélectrons X (XPS) est une technique qui est utilisée pour une analyse de la surface (composition chimique) des matériaux. Les détails sur cette technique sont expliqués en annexe 5.

Nous avons analysé l'amidon brut et l'amidon broyé en préparant deux pastilles. Les spectres sont présentés ci-dessous. Les spectres ont été traités avec le logiciel CasaXPS.

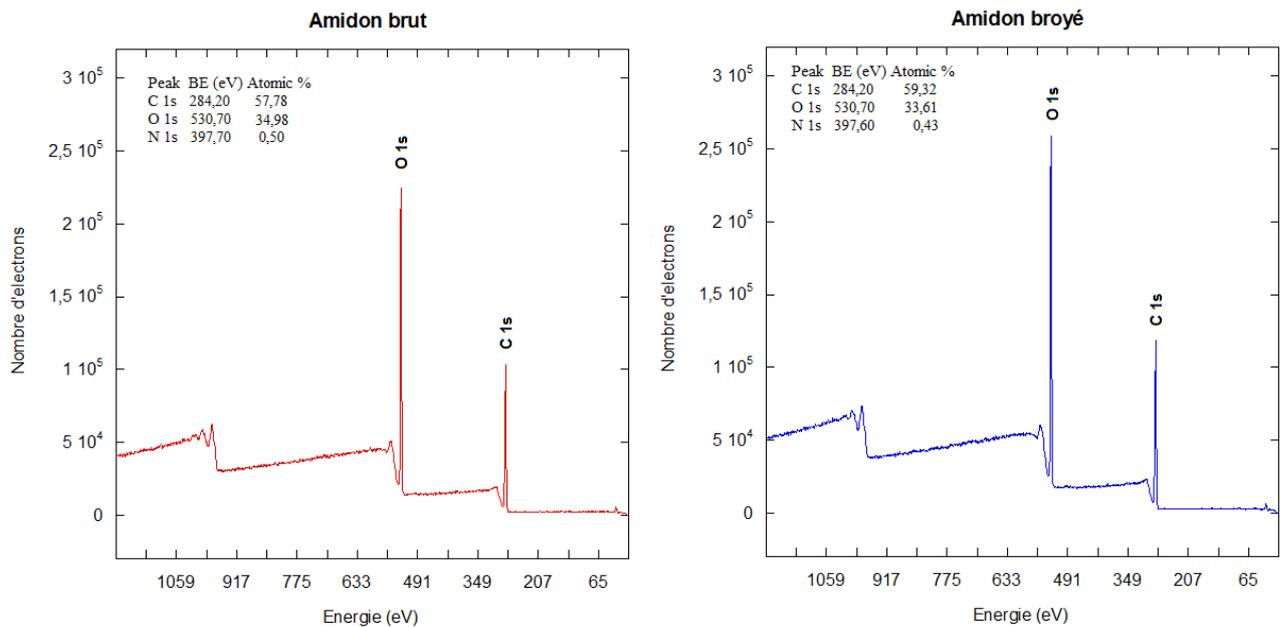


Figure 2.15 – Analyse XPS d'amidon brut et des nanoparticules d'amidon.

Nous avons analysé la quantité de carbone et d'oxygène dans les deux échantillons. Le pourcentage atomique de carbone pour l'amidon brut est de 57,78%, ceci est de 59,32% pour l'amidon broyé. La différence entre les deux n'est pas significative.

3.7 Stabilité des nanoparticules d'amidon de 200 et de 80 nm dans l'eau de mer à salinité 35

Nous avons préparé une solution de nanoparticules d'amidon (1mg/mL) dans l'eau de mer. Nous avons ensuite mesuré la taille des particules matins et soirs pendant 4 jours. Les résultats sont présentés dans la **figure 2.16**.

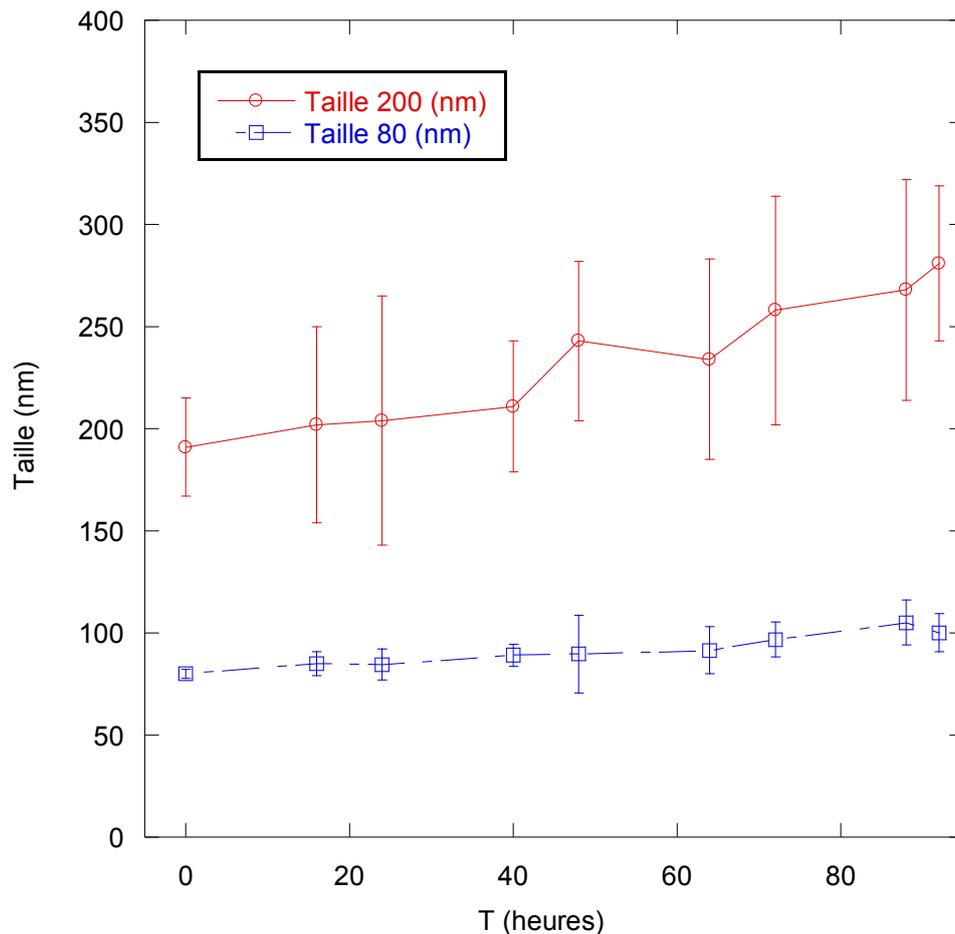


Figure 2.16 – Stabilité des nanoparticules d'amidon de taille 200 nm et 80 nm dans l'eau de mer pendant 4 jours.

Puisqu'il s'agit d'un biopolymère et que le broyage est une méthode mécanique, il est normal que la barre d'erreur soit aussi grande. De plus, les résultats de l'histogramme de MET (**Figure 2.11, page 93**) nous montrent la forte dispersion de la taille des particules. Nous pouvons également considérer que les particules sont suffisamment stables pour que l'on puisse les utiliser pour nourrir les copépodes.

4. Choix de la molécule d'intérêt

Nous avons sélectionné les molécules d'intérêt en se basant sur les besoins nutritionnels des larves de poissons.

4.1 Vitamine C

Dans l'aquaculture, la vitamine C (**Figure 2.17**) est largement utilisée pour l'enrichissement de la nourriture des poissons d'élevage. En effet, il existe plusieurs études sur cette vitamine comme composante du mélange nutritionnel des larves de poissons.

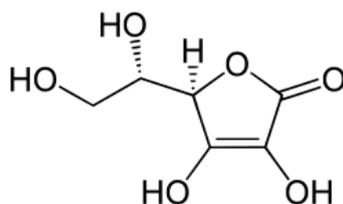


Figure 2.17 – Structure de l'acide L-ascorbique ou vitamine C

Une estimation de la contenance de la vitamine C a été faite sur les principales proies utilisées : les algues,¹³⁴ les rotifères¹³⁵ et les Artémia.¹³⁶ Cette information est nécessaire pour réaliser une estimation des besoins nutritionnels des larves de poissons en vitamine C. Pour cela, plusieurs techniques utilisent l'ascorbyl palmitate pour enrichir les rotifères ou les Artemia.¹³⁷ Cela a permis d'augmenter la concentration de l'acide ascorbique chez les individus jusqu'à 2500µg/g masse sèche. Plusieurs larves de poissons ont été enrichies par la suite *via* leur nourriture.¹³⁸ L'acide ascorbique est une molécule qui augmente la résistance au stress. Il a été démontré que les besoins minimaux en vitamine C des espèces comme le bar (*Dicentrarchus labrax*), et le turbot (*Scophthalmus maximus*) pour leur développement sont estimés entre 20 à 130 mg/kg.¹³⁹

Montero et al.¹⁴⁰ ont montré que l'acide ascorbique et vitamine E peuvent aider les larves de dorade (*Sparus aurata*) à développer une résistance plus élevée aux maladies infectieuses. Ibrahim et al.¹⁴¹ ont mené une étude sur les effets de la vitamine C sur les larves de tilapia (*Oreochromis niloticus*). Ils ont démontré que les

larves nourries avec une nourriture enrichie en vitamine C grandissaient plus rapidement et avaient une mortalité moins élevée au cours des 2 premiers mois de leur vie. Après des tests sanguins, ils ont remarqué que le niveau de lysozyme avait augmenté. Cette enzyme rend donc l'organisme des larves plus résistant aux bactéries à gram positif.

Une étude de l'enrichissement d'*Artemia* a été réalisée en utilisant des liposomes pour encapsuler les vitamines.¹⁴² Les auteurs ont utilisé plusieurs types de liposomes pour enrichir les nauplii d'*Artemia* en vitamine A, en vitamine C et en méthionine libre. Au cours d'une première expérience, des liposomes unilamellaires formulés avec des phospholipides et du palmitate de rétinol ont démontré leur capacité à améliorer le contenu de rétinol des nauplii d'*Artemia*. Ces résultats démontrent la possibilité d'utiliser ces vésicules pour encapsuler simultanément la vitamine A et les acides gras essentiels. Un deuxième enrichissement a été réalisé avec des liposomes unilamellaires composés de phosphatidylcholine de soja chargés en ascorbate de sodium comme source de vitamine C. Les résultats ne montrent pas d'augmentation de la teneur en vitamine C des nauplii en utilisant ces liposomes. C'est probablement dû à la dégradation de la vitamine C au cours de l'enrichissement, ainsi qu'à la fuite de l'ascorbate.

L'enrichissement des rotifères en vitamine C a aussi été investiguée. Mais il n'était pas suffisamment efficace pour atteindre les niveaux de 500 mg/kg nécessaires pour les larves de poisson.¹⁴³

C'est pour cette raison que nous avons décidé d'enrichir les copépodes en vitamine C en utilisant des nanoparticules d'amidon comme vecteur, même si le niveau de cette vitamine dans le corps des copépodes est plus élevé que dans celui des rotifères ou des artémias. Il a été démontré que la présence de vitamine C dans la nourriture des rotifères conduit à une densité plus élevée des individus.¹⁴⁴ Mais des études sur les copépodes n'ont pas encore été effectuées. En ce qui concerne les nanoparticules, une étude récente a montré que des nanoparticules de chitosan peuvent être utilisées comme vecteur de l'acide ascorbique pour les poissons zébrés.¹⁴⁵ Les particules de chitosan de moins de 300nm ont été synthétisées par gélation ionique.¹⁴⁶ Le taux d'encapsulation est supérieur à 90%. Ces nanoparticules sont entrées dans les organes de l'espèce et ont augmenté l'activité antioxydante.

a. Objectif de mon travail

Nous allons montrer les effets de l'acide ascorbique sur les copépodes en utilisant les nanoparticules d'amidon comme vecteur.

b. Matériels et méthodes

L'acide L-ascorbique (BioXtra, $\geq 99.0\%$, cristalline) a été obtenu chez Sigma-Aldrich. Le broyage a été effectué en présence de cette vitamine dans le bol de broyage. La vitamine représente 1% de la masse totale d'amidon dans le bol.

Après broyage, nous avons mené une étude de la reproduction des copépodes *Acartia tonsa*. 40mg de poudre ainsi synthétisée a été dissoute dans 100 mL d'eau de mer contenant 10 femelles. Les femelles ont été nourries avec l'algue *Pavlova lutheri* nourries en excès. Après 24 heures, les œufs ont été comptés et séparés. 48 heures après la séparation des œufs, les nauplii ont été fixés avec de l'éthanol et comptés. Nous avons effectué deux répliques et deux témoins : l'un était nourri uniquement avec des algues et l'autre avec des algues et 40mg d'amidon broyé. Les résultats sont présentés dans l'histogramme ci-dessous (**Figure 2.18**) :

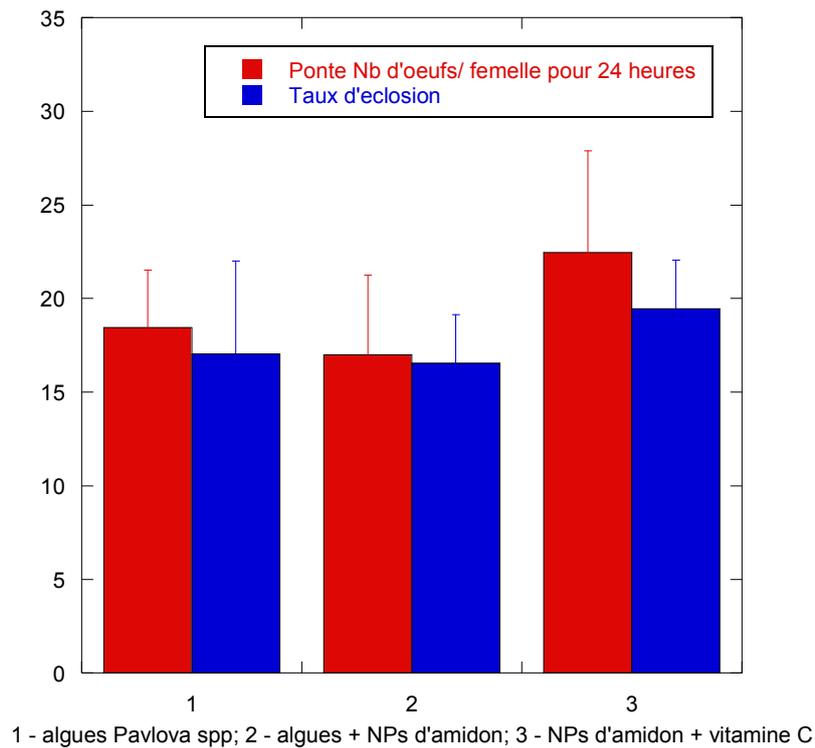


Figure 2.18 – Taux de ponte et éclosion(en nombre d'œufs) pour les femelles *Acartia tonsa* exposées aux nanoparticules d'amidon chargées en vitamine C.

En 24h, nous avons obtenu 22.45 œufs par femelle nourries avec particules chargées en vitamine C. Les résultats montrent une amélioration de la ponte de 21,7% par rapport aux témoins nourris uniquement avec des algues. Le taux d'éclosion est à chaque fois supérieure à 90%. Les particules que nous avons utilisées sont de 200 nm (taille déterminée par DLS).

4.2 Glutathion

Le glutathion (**Figure 2.19**) est un peptide qui joue un rôle d'antioxydant.

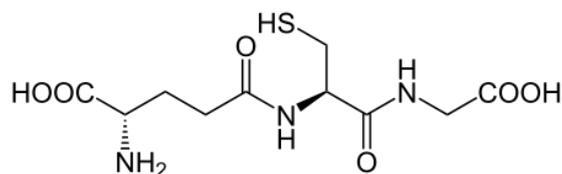


Figure 2.19 – Structure chimique du glutathion.

Nous l'avons utilisé pour l'enrichissement des copépodes en azote. En effet, il a été prouvé que le manque de glutathion chez les saumon juvéniles peut réduire leur vitesse de développement.¹⁴⁷ Le glutathion est utilisé comme source alternative de protéine qui aide à combattre le stress d'oxydation chez les larves de certains poissons (y compris dans des enzymes spécifiques).¹⁴⁸

a. Matériels et méthodes

Le glutathion (γ -L-Glutamyl-L-cysteinyl-glycine) est obtenu chez Sigma-Aldrich. Nous avons effectué le broyage en ajoutant le glutathion qui représente 1% de la masse totale de l'amidon (3g d'amidon pour 0.03g de glutathion).

b. Résultats

Après broyage, nous avons effectué la même étude de reproduction en dissolvant 40mg de nanoparticules d'amidon fonctionnalisées avec le glutathion dans 100 mL d'eau de mer. Nous avons ensuite incubé 10 femelles avec l'algue *Pavlova lutheri* une fois par jour. L'estimation des taux de ponte et d'éclosion a été faite de la même façon que l'expérience avec la vitamine C décrite précédemment. Les résultats sont présentés dans l'histogramme ci-dessous (**Figure 2.20**) :

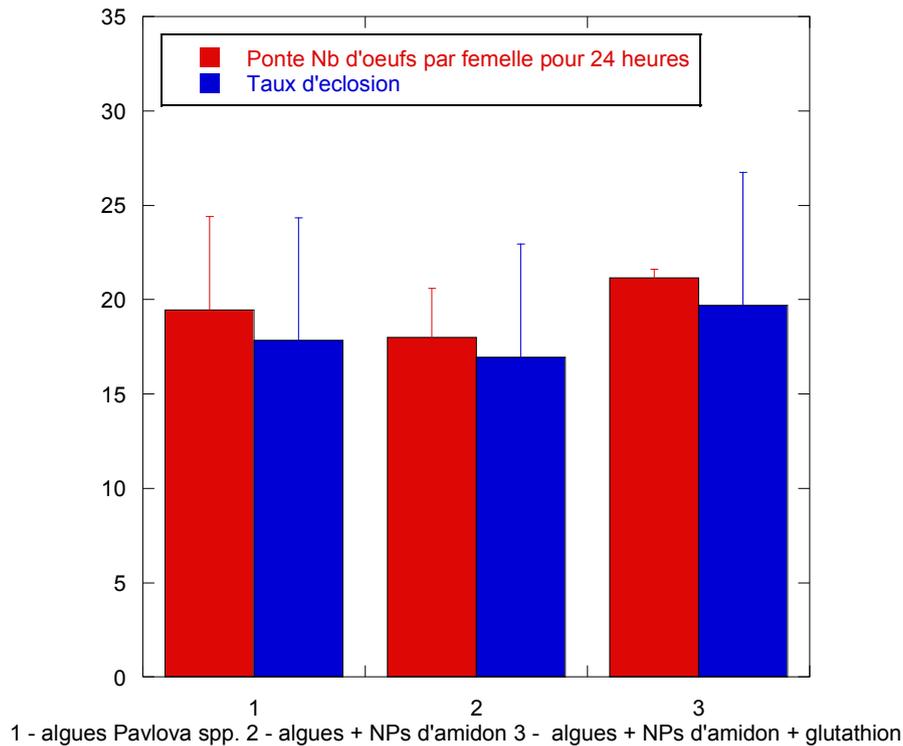


Figure 2.20 – Taux de ponte et éclosion (en nombre d'œufs) des femelles *Acartia tonsa* nourries avec des nanoparticules d'amidon chargées en glutathion.

Le taux d'éclosion est élevé et se trouve supérieur à 90%. La présence de ces composés ne gêne pas l'éclosion des œufs. Le témoin nourri uniquement avec des algues a pondu 18 œufs/femelle en 24 heures alors que les femelles nourries en nanoparticules d'amidon de 200nm chargées en glutathion ont pondu 21 œufs/femelle en 24 heures. L'amélioration du taux de ponte n'est pas aussi importante que celle des copépodes nourris avec la vitamine C (8.7%), même si la différence n'est pas significative selon le test de Student ($p < 0.05$).

4.3 La vitamine B12

La vitamine B12 (cyanocobalamine) (**Figure 2.20**) est une vitamine hydrosoluble essentielle. Les effets de cette vitamine ont été étudiés pour une application dans l'aquaculture. En effet, c'est une vitamine importante pour le développement des algues : elle fait partie du milieu Conway – un milieu contenant des vitamines et des minéraux pour assurer les conditions optimales à la culture d'algues - avec la vitamine

B6 (thiamine). Les concentrations du milieu Conway (**ANNEXE 6**) sont de 200mg pour la vitamine B6 pour 100 mL et 10 mg de vitamine B12. C'est pour cette raison que nous avons ajouté que 0.1% de la masse de l'amidon dans le bol de broyage.

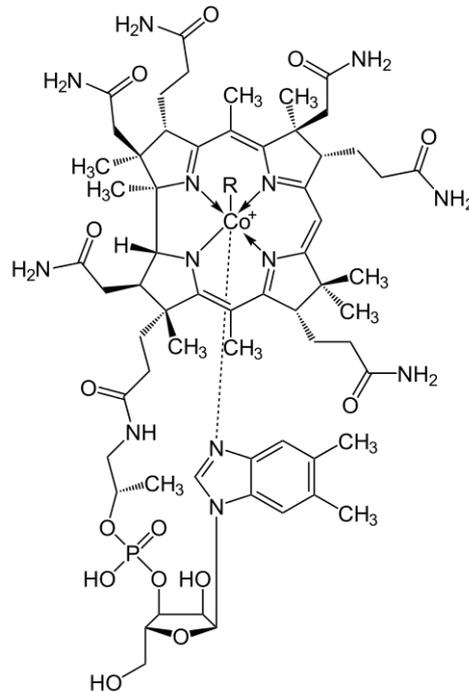


Figure 2.21 - Structure chimique de la vitamine B12 (cyanocobalamine).

Il a été démontré que si l'on augmente la vitamine B12 via des *Labyrinthulomycetes* (champignons pouvant absorber les éléments nutritifs d'une surface) chez les rotifères et l'artémia, cela améliore leur valeur nutritionnelle pour les larves de poissons.¹⁴⁹

La micro-algue verte *Chlorella* est reconnue pour être l'une des plus appropriés pour la nutrition de rotifères.¹⁵⁰ Un enrichissement des cellules de *Chlorella* en vitamine B12 augmente leur valeur nutritionnelle en vue de la croissance d'une population. Cela améliore le profil de leurs acides gras pour une utilisation dans l'aquaculture. Sur la **figure 2.22**, il a été démontré que la population des rotifères augmente quand leur nourriture est enrichie en vitamine B12.

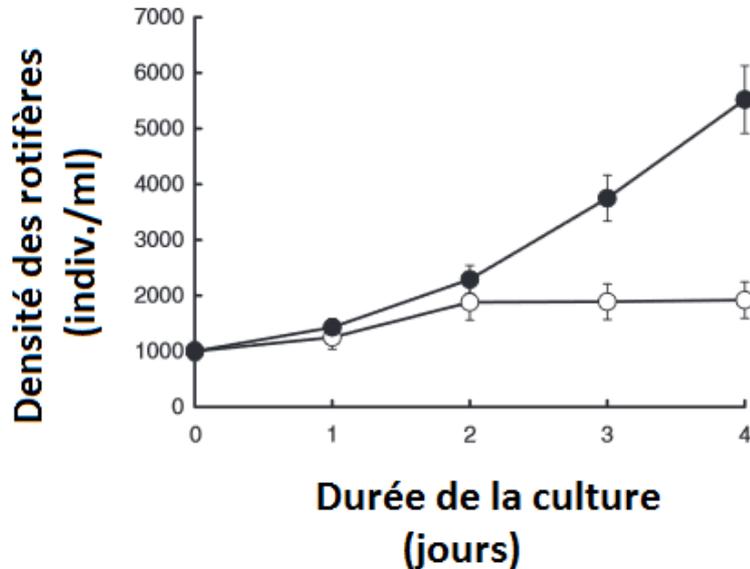


Figure 2.22 - Augmentation de la population nourrie avec des cellules enrichies en vitamine B12.

○ rotifères nourris avec des cellules non enrichies

● rotifères nourris avec des cellules enrichies en vitamine B12.¹⁵¹

Ce graphique représente l'évolution et le développement sur plusieurs jours des cultures de rotifères. Dans cette étude, la souche mh0186, qui a une teneur en cyanocobalamine élevée, a été donnée aux rotifères comme aliment unique. De l'autre côté, les cellules Mh0186 cultivées sans vitamine B12 ont donné une faible croissance de la population des rotifères après 4 jours.

Les rotifères enrichis en vitamine B12 ont une assez grande quantité d'acides gras. Cela montre qu'ils peuvent être utilisés comme un aliment approprié pour la croissance des larves de poissons marins. En général, les rotifères sont directement enrichis en acides gras en utilisant un aliment industriel pendant quelques heures avant de les utiliser dans l'alimentation des poissons. Ces résultats indiquent que les *Labyrinthulomycetes* enrichis représentent une nouvelle procédure pour la production de larves de poissons marins en utilisant des rotifères.¹⁵²

Une autre étude a été réalisée sur les daphnies – un type de zooplancton d'eau douce - nourries avec des algues enrichies en vitamines B.¹⁵³ L'objectif est de produire des daphnies rapidement et en grandes quantités pour en faire un aliment à haute valeur nutritionnelle. L'espèce *Daphnia magna* a été alimentée avec des espèces d'algues

vertes d'eau douce : *Chlorella* et *Scenedesmus obliquus*, enrichies avec des doses différentes de vitamines B (0, 0.5, 1 et 2 mL/L). Puis les auteurs ont comparé les deux étapes (au début de la culture et à la fin de la phase de croissance). Les résultats ont montré que l'augmentation des niveaux de vitamines du groupe B donnaient une augmentation du taux de croissance et de fécondité de la population de *Daphnia magna*. Le taux le plus élevé de fécondité et de croissance des daphnies a été observé alors qu'elles étaient nourries avec des algues enrichies de 2mL/L de mélange de vitamines B.

Une autre étude a montré les effets de la vitamine B12 sur *Artemia*, puis sur le mysidacé *Mysidopsis juniae*.¹⁵⁴ En effet, il s'agissait d'utiliser de l'huile de foie de morue pour enrichir les nauplii d'Artémia. Cette huile est utilisée en conjonction avec les vitamines B1 et B12. Les résultats ont démontré une survie plus longue, un développement plus rapide, et une reproduction plus efficace des mysidacés nourris avec ces *Artemia*.

Il n'existe pas d'étude sur l'enrichissement de copépodes en cyanocobalamine. Nous proposons donc une étude sur les effets des nanoparticules d'amidon enrichies en vitamine B12 sur la reproduction des copépodes *Acartia tonsa*.

a. Matériels et méthodes

La vitamine B12 $\geq 98\%$ a été obtenue chez Sigma-Aldrich. Nous avons fonctionnalisé les nanoparticules d'amidon lors du dernier cycle de broyage avec 0.1% de vitamine B12. Puis nous avons incubé 40 mg de poudre ainsi synthétisée avec 10 femelles. Nous avons mené cette expérience en trois répliques. Au bout de 24 heures, nous avons compté les œufs, et après 48 heures, nous avons fixé les nauplii.

b. Résultats

Les résultats sont montrés dans la **figure 2.23** ci-dessous.

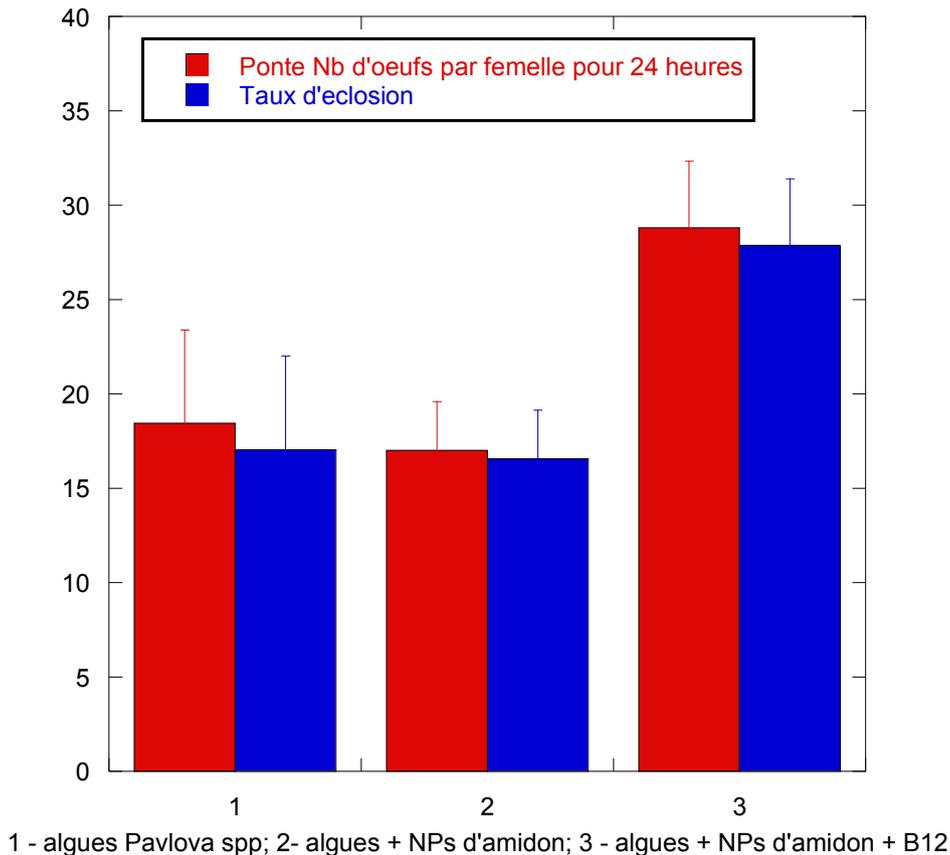


Figure 2.23– Taux de ponte et d'éclosion(en nombre d'œufs) des femelles *Acartia tonsa* nourries avec des nanoparticules d'amidon chargées en vitamine B12.

En effet, nous observons ici une augmentation importante de la ponte comparée aux témoins. Le nombre d'œufs pondus est de 28.8 par femelle en 24 heures. Cela représente une amélioration de 56.1% en présence de nanoparticules fonctionnalisées avec la vitamine B12. Le taux d'éclosion est de 96.7%.

4.4 Bétaïne

Les bêtaïnes (**Figure 2.24**) sont des composés zwitterioniques. Ce sont des dérivés des acides aminés. Chez le plancton, la glycine bêtaïne joue un rôle important contre les chocs osmotiques (choc lié au changement brutal de salinité).¹⁵⁵ Elle pourrait jouer un rôle de soluté compatible lorsque l'azote manque dans le milieu.

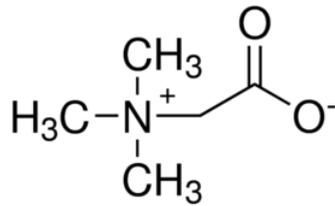


Figure 2.24 – Structure chimique de la bétaïne.

L'enrichissement des Artémia et rotifères en acides aminés et des analyses la contenance ont été effectués par Naz.¹⁵⁶ Les changements de composition biochimique et des activités enzymatiques ont été déterminées. Dans cette étude, les rotifères et larves d'artémia ont catabolisé une grande proportion d'acides aminés pendant la période d'enrichissement de 16 heures. En effet, ces organismes ont été enrichis en acides aminés, mais ils ont catabolisé ces produits en acides gras. Ils ont mesuré la quantité des acides gras saturés et insaturés dans les rotifères et artémia. La teneur en lipides des deux proies vivantes a augmenté pendant la période d'enrichissement, mais a diminué chez les rotifères dès qu'elle s'est terminée. Les rotifères doivent donc être proposés aux larves de poissons immédiatement après la période d'enrichissement, alors que les nauplii d'Artemia peuvent rester sevrés pour être utilisé plus tard puisqu'ils conservent les lipides plus longtemps.

La concentration des acides polyinsaturés a augmenté chez les artémia par rapport aux acides mono-insaturés et saturés. La concentration des enzymes digestives a augmenté également.

Oie et al. ont étudié les valeurs nutritionnelles des rotifères par rapport à leurs composition en acides aminés et en acides gras comparées à celles des copépodes.¹⁵⁷ Ils ont cultivé des rotifères (*Brachionus plicatilis*) à un taux de croissance différent et ont analysé leur teneur en protéines, en lipides, en acides gras, et en acides aminés. Ils ont démontré que leur taux de croissance dépendait fortement de leur nourriture. Quand la croissance des individus est rapide, le taux de lipides diminue, alors qu'il augmente si la croissance des individus est lente. Ces expériences montrent que la quantité de protéines est variable chez les rotifères, et que leur alimentation et leur croissance sont des facteurs déterminants de leur valeur nutritionnelle. Dans tous les cas, les valeurs de lipides et d'acides gras ne correspondent pas les valeurs obtenues pour les copépodes.

Poulet et al. ont prouvé que la concentration élevée d'acides aminés libres dans l'eau joue un rôle important pour le développement des copépodes.¹⁵⁸ En effet, ils ont suivi les copépodes, les acides aminés et la distribution verticale de chlorophylle en mer Celtique et en mer d'Irlande centrale. Dans chaque région, ils ont comparé les deux stations caractérisées par des conditions d'eau mixtes et stratifiées. La distribution verticale d'acides aminés coïncidait avec la répartition des copépodes. Ils ont déterminé une corrélation positive significative entre l'abondance des copépodes et la concentration d'acides aminés dissous dans l'eau de mer. L'accumulation d'acides aminés constitue également une source potentielle supplémentaire d'azote organique pour les bactéries et le phytoplancton. Les copépodes ont donc besoin d'azote organique pour se développer.

Pour l'utilisation des copépodes dans l'aquaculture, il est important de connaître leur concentration en acides aminés car elle est indispensable au développement des larves de poissons par la suite.¹⁵⁹ Les nauplii de copépodes sont plus riches en acides aminés libres que de nombreux aliments traditionnels donnés aux larves de poissons marins. Les nauplii de copépodes peuvent cependant être difficiles à produire en grande quantité dans l'écloserie et sont plus faciles à obtenir en les capturant à l'état sauvage. Le processus de capture et de l'acclimatation peut influencer sur la qualité nutritive de ces nauplii. Les auteurs ont incubé de l'isoleucine, la leucine, la lysine et la valine avec les nauplii pendant 3h d'acclimatation, ce qui a augmenté leurs concentrations. En revanche, quand les nauplii ont été capturés et acclimatés sans enrichissement, la concentration d'azote organique a diminué.

Il est donc préférable de cultiver directement les copépodes pour les utiliser dans les écloseries par la suite. Une solution alternative est de stocker les œufs de copépodes dans l'eau à 4°C. En effet, les œufs ne peuvent pas éclore à cette température et peuvent être conservés durant 10 mois. Les œufs d'*Acartia tonsa* stockés pour une période plus longue ont un profil nutritionnel beaucoup moins intéressant (en cause la faible quantité d'acides aminés libres).¹⁶⁰ Ainsi, les nauplii peuvent être utilisés pour nourrir les larves dès que le besoin d'en fait sentir.

a. Objectif de travail

Nous avons cherché à faire ingérer de la bétaine aux copépodes *Acartia tonsa* comme source d'azote organique. L'avantage de la bétaine est qu'elle est bon marché et facile

à obtenir en grande quantité. Nous avons donc utilisé des nanoparticules d'amidon comme vecteur pour la bétaine. Nous avons ensuite effectué des tests de reproduction chez les femelles que nous avons comparés avec les témoins nourris seulement avec des algues.

b. Matériels et méthodes

La bétaine a été obtenue chez Sigma-Aldrich - Bétaine $\geq 98\%$ (perchloric acid titration). Nous avons broyé la bétaine à 1% de la masse totale d'amidon dans le bol de broyage. Nous avons ensuite effectué les tests de la même manière en 3 réplicas.

c. Résultats

Les résultats sont montrés dans l'histogramme de la **figure 2.25** ci-dessous.

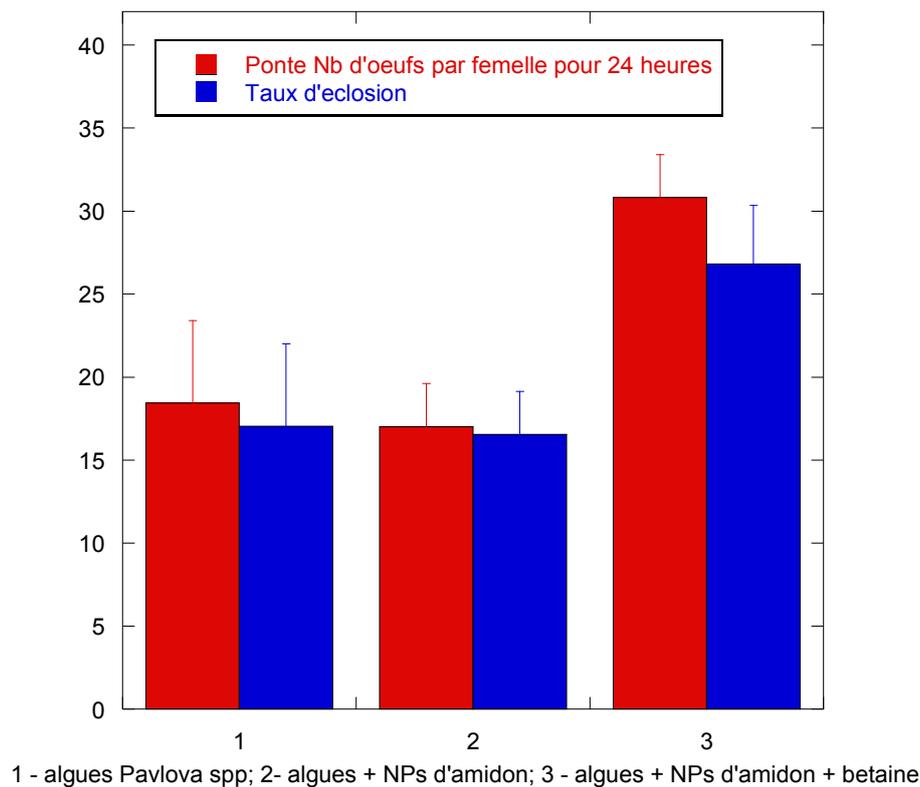


Figure 2.25 – Taux de ponte et d'éclosion(en nombre d'œufs) des femelles *Acartia tonsa* exposées aux nanoparticules d'amidon chargées en bétaine.

Les résultats prouvent ici une réelle augmentation de la ponte en présence de nanoparticules d'amidon chargées en bétaine avec en moyenne 30.8 œufs par femelle après 24 heures. Pour le témoin nourri avec l'algue *Pavlova lutheri*, la ponte a été en moyenne de 18,45 œufs par femelle après 24 heures. Il s'agit d'une augmentation de 66,9% de la ponte. Le taux d'éclosion est ici supérieur à 94,8%.

5. Effets des différents paramètres sur le taux de reproduction

5.1 Effets de la taille des nanoparticules d'amidon sur la reproduction des copépodes

Nous avons synthétisé des nanoparticules d'amidon de deux tailles différentes : 80nm et 200nm mesurées par DLS. Nous avons introduit la vitamine B12 lors du dernier cycle de broyage à 0.1% de la masse totale de l'amidon utilisé dans le bol. Nous avons ensuite utilisé 40 mg pour 100 mL d'eau de cette poudre pour des tests de reproduction avec 10 femelles d'*Acartia tonsa*. Chaque expérience a été réalisée en 3 réplicas. Le nombre d'œufs a été compté après 24 heures. Les résultats sont rassemblés dans la **figure 2.26** ci-dessous.

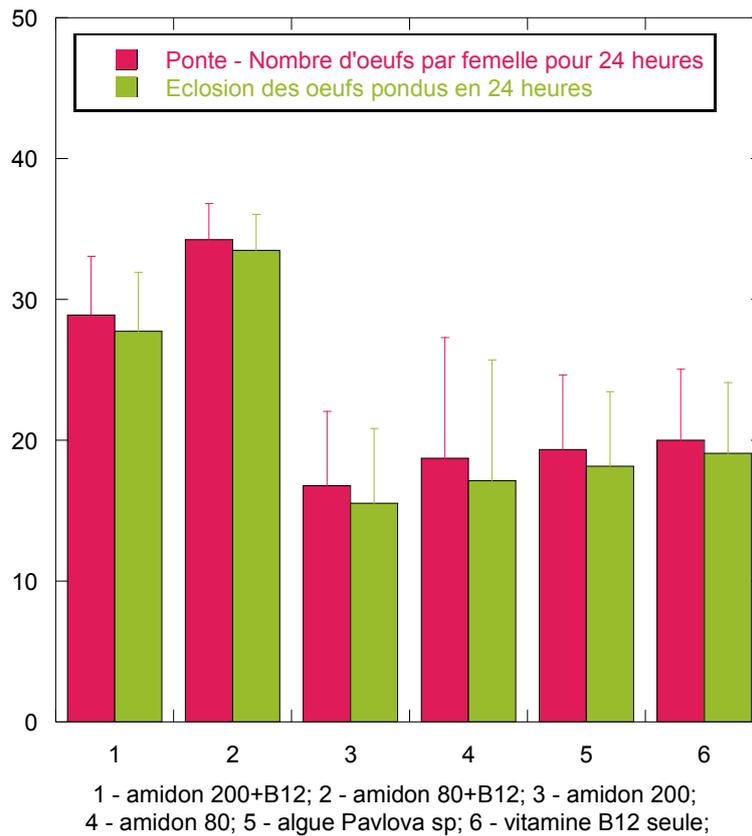


Figure 2.26 - Taux de ponte et d'éclosion de femelles *Acartia tonsa* incubées avec des nanoparticules d'amidon de taille 80nm et 200nm chargées en vitamine B12.

Nous avons effectué quatre témoins : le premier témoin a été exposé aux nanoparticules d'amidon de 200 nm. Le second témoin a été exposé aux nanoparticules d'amidon de 80 nm et 200 nm. Le troisième témoin a été nourri avec les algues uniquement. Le quatrième témoin correspond aux copépodes nourris de vitamine B12 seule à la même concentration que celle utilisée avec les nanoparticules d'amidon (4.10^{-4} M). Les femelles ont été nourries une fois avec l'algue *Pavlova lutheri*.

Le résultat montre une différence significative entre le taux de ponte des copépodes nourris avec des nanoparticules d'amidon de 80 nm chargées en vitamine B12 et les nanoparticules d'amidon de taille 200 nm chargées avec la même quantité de vitamine B12. En effet, lors de la première expérience, les femelles avaient en moyenne pondu de 28.9 œufs chacune après 24 heures. Lors de la deuxième expérience, après la même période, les femelles avaient pondu chacune en moyenne 34.2 œufs. La

différence entre les 4 témoins n'est pas significative, ce qui montre que les nanoparticules seules n'ont pas de valeur nutritionnelle. La vitamine B12 seule dans l'eau à la même concentration que sur les nanoparticules n'a pas d'effet sur le taux de ponte.

C'est probablement dû à la grande surface spécifique des nanoparticules de plus petite taille. En effet, quand la particule est plus petite, la surface disponible pour accrocher les molécules est plus grande comparée à celle des nanoparticules de même masse mais de plus grande taille. Il est possible que la vitamine B12 soit présente en plus grande quantité sur les particules de 80 nm que celles de 200 nm.

5.2 Taux de reproduction en variant la concentration de la molécule d'intérêt

Puisque les molécules de bétaïne et la vitamine B12 ont donné des résultats très satisfaisants sur la reproduction, nous avons voulu examiner les effets de l'augmentation de la concentration de ces molécules. Pour cela, nous avons varié la quantité de ces molécules et avons estimé le taux de ponte par femelle après 24 heures.

a. Matériels et méthodes

Nous avons testé trois concentrations de vitamine B12 (cyanocobalamine) : 0.1%, 0.5% et 1% de la masse totale d'amidon. La vitamine B12 a été ajoutée lors des 20 dernières minutes de broyage au cours du dernier cycle.

Nous avons également testé deux concentrations de bétaïne : 1% et 3% de la masse totale d'amidon. Il est impossible d'en ajouter davantage car le système chauffe et provoque une agglomération d'amidon et de bétaïne, ce qui empêche la fonctionnalisation puisque la poudre d'amidon colle sur les parois du bol de broyage ou sur les billes.

Les tests de ponte ont été effectués de la même façon. Nous avons ajouté 40 mg d'amidon fonctionnalisée pour 10 femelles dans 100 mL d'eau de mer. Chaque test a été effectué en trois répliques. Le nombre d'œufs a été déterminé après 24 heures et les femelles ont été nourries avec l'algue *Pavlova lutheri* une fois pendant ces 24 heures.

b. Résultats

Les résultats sont présentés sur la **figure 2.27**.

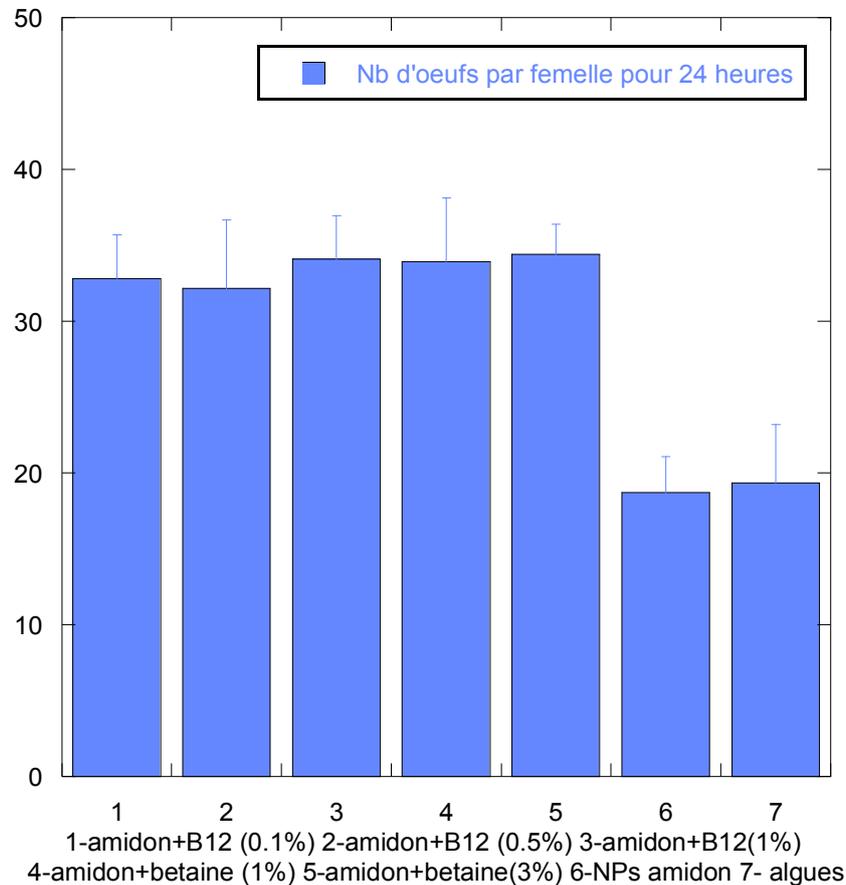


Figure 2.27 – Taux de ponte des femelles *Acartia tonsa* en fonction de la concentration de la molécule active (la bétaïne et la vitamine B12)

Les résultats ne montrent pas de différence significative entre les trois concentrations de cyanocobalamine testées. Après 24h, le taux de ponte était de 32.8 œufs/femelle à une concentration de 0.1%, de 32.1 œufs/femelle à une concentration de 0.5%, et de 34.1 œufs par femelle à une concentration de 1%.

Les résultats pour la bétaïne sont comparables : nous n'observons pas de différence significative entre les deux concentrations : après 24h, le taux de ponte était de 33.9 œufs/femelle à une concentration de 1%, et de 34.4 œufs/femelle pour une concentration de 3%.

Une concentration plus élevée en bétaïne ou vitamine B12 ne conduit donc pas à une augmentation du taux de reproduction. C'est peut-être dû à la saturation de la surface des nanoparticules aux faibles concentrations. A concentration élevée, l'excès de molécules n'est pas accroché aux nanoparticules et relâché dans l'eau de mer.

Il est aussi possible que le taux de ponte atteint soit le maximum que cette espèce puisse produire. La physiologie de la femelle *Acartia tonsa* n'autorise pas une ponte supérieure aux résultats déjà démontrés. La littérature scientifique concernant cette espèce décrit rarement un taux de ponte supérieur à 35 œufs/femelle après 24 heures.

5.3 Taux de reproduction pour les mélanges de molécules d'intérêt (vitamine C, bétaïne et vitamine B12)

Il est également important d'étudier l'influence d'un mélange de plusieurs molécules sur le taux de ponte. Pour cela nous avons effectué une expérience dans laquelle nous avons introduit deux molécules à la fois lors des dernières 20 minutes du dernier cycle de broyage. Les concentrations utilisées sont les mêmes que pour les molécules seules. Les tests ont été effectués en trois réplicas avec 10 femelles incubées avec 40 mg de nanoparticules d'amidon fonctionnalisées avec les molécules d'intérêt. Nous avons compté le nombre d'œufs pondus après 24 heures d'incubation. Les résultats sont montrés sur la **figure 2.28** ci-dessous.

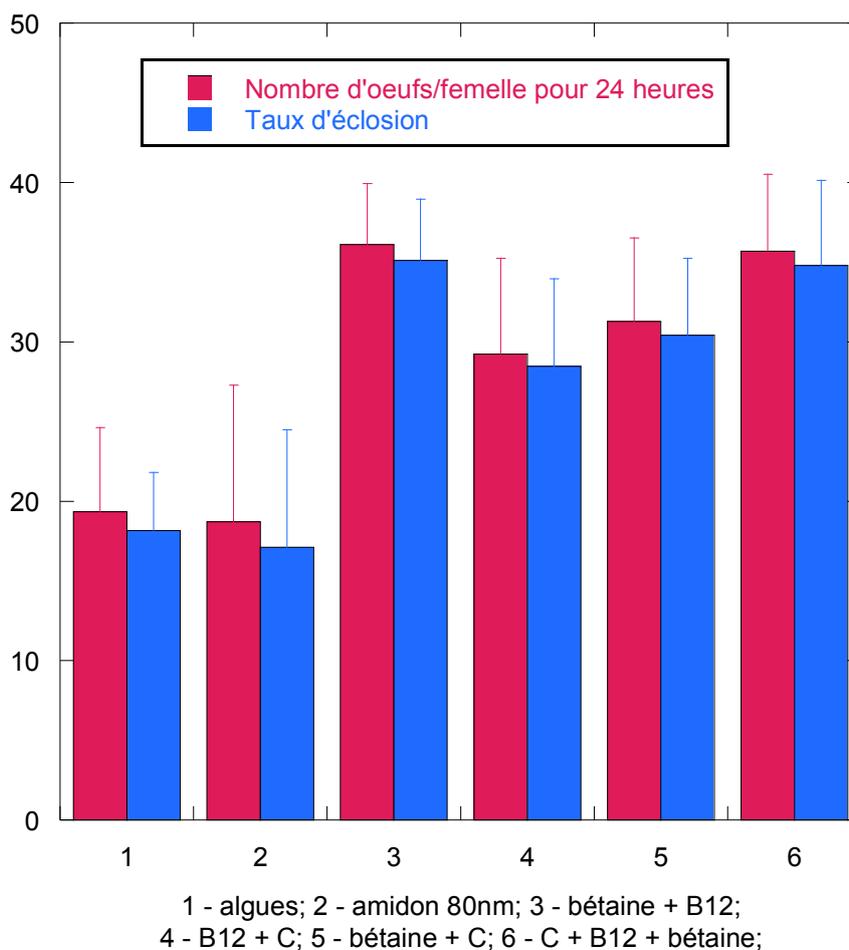


Figure 2.28 – Taux de ponte et éclosion des femelles *Acartia tonsa* incubées avec les molécules d'intérêt.

Les résultats ne montrent pas une réelle amélioration de la ponte par rapport aux molécules de cyanocobalamine et de bétaine seules. Par exemple, le mélange de vitamine B12 et de bétaine donne un taux de ponte de 36.1 œufs/femelle après 24 heures. A même concentration, après la même période, le taux de ponte des femelles incubées avec de la bétaine seule était de 33.9 œufs/femelle. Incubées avec la vitamine B12 seule, le taux de ponte était de 32.8 œufs/femelle. L'ajout de la vitamine C n'induit pas une différence importante par rapport au mélange cyanocobalamine et bétaine : la ponte est de 35.7 œufs par femelle après 24 heures. Le taux d'éclosion pour toutes les expériences est supérieur à 95%, les conditions pour le développement d'une culture d'*Acartia tonsa* sont donc suffisantes.

5.4 Ajout de molécules sensibles après le broyage des nanoparticules d'amidon

Il est possible d'introduire des molécules sensibles comme la vitamine B12 après le broyage. Pour cela, nous devons estimer la possibilité de reproduction des copépodes. Nous avons donc vérifié les propriétés de ces particules en menant l'expérience suivante.

Selon la **figure 2.29** ci-dessous, nous avons préparé des nanoparticules d'amidon en utilisant trois techniques différentes.

Première technique : la molécule sensible (vitamine B12) a été introduite lors des 20 dernières minutes du dernier cycle de broyage. Les tests de ponte ont ensuite été réalisés de la même façon que les tests décrits auparavant.

Seconde technique : nous avons mélangé une concentration de 0.1% de vitamine B12 à la fin du broyage d'amidon.

Troisième technique : nous avons directement ajouté la vitamine B12 dans l'eau, séparément des nanoparticules d'amidon.

Dans tous les cas, le taux de ponte est supérieur à 90%.

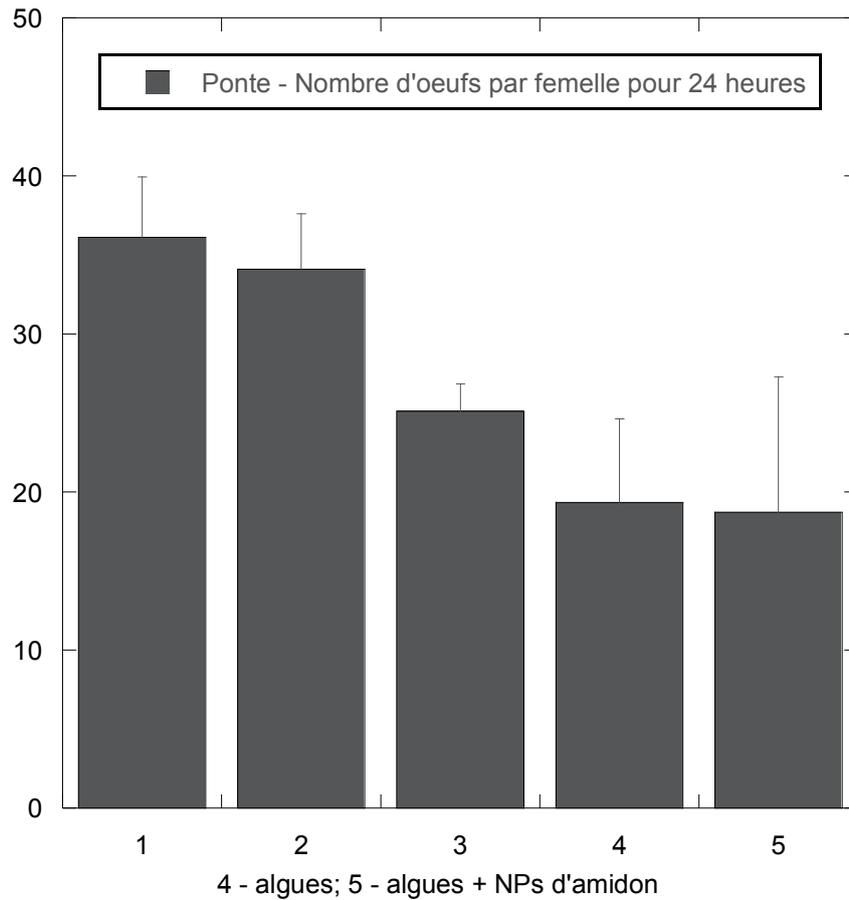


Figure 2.29 - Taux de ponte des femelles *Acartia tonsa* en utilisant les nanoparticules d'amidon et la vitamine B12 préparées de différentes façons.

Ces résultats montrent qu'il est possible d'introduire des molécules sensibles après la synthèse des nanoparticules d'amidon. Après 24h, le taux de ponte des *Acartia tonsa* incubés avec la vitamine B12 introduite lors du dernier cycle de broyage est de 36.1 œufs/ femelle et de 34.1 œufs/femelle lorsque la vitamine B12 a été mélangée avec les nanoparticules après le broyage. En revanche, le taux de ponte chute considérablement si la vitamine B12 et les nanoparticules d'amidons sont ajoutés séparément.

5.5 Estimation de la stabilité des nanoparticules d'amidon fonctionnalisées

Pour l'utilisation industrielle d'un produit, il est important de pouvoir le stocker de façon à ce que ses propriétés ne changent pas avec le temps. Nous avons donc stocké des nanoparticules d'amidon fonctionnalisées en deux fois dans des conditions différentes. La méthode de stockage était la suivante : nous avons stocké les nanoparticules dans un réfrigérateur à 4°C pendant deux mois.

Pour la seconde méthode de stockage, nous avons laissé les nanoparticules à température ambiante pendant une semaine.

Nous avons ensuite évalué la ponte des copépodes exposées à ces nanoparticules, et nous l'avons comparé à celle des copépodes exposés aux nanoparticules fraîchement synthétisées.

Les résultats sont présentés ci-dessous dans la **figure 2.30**.

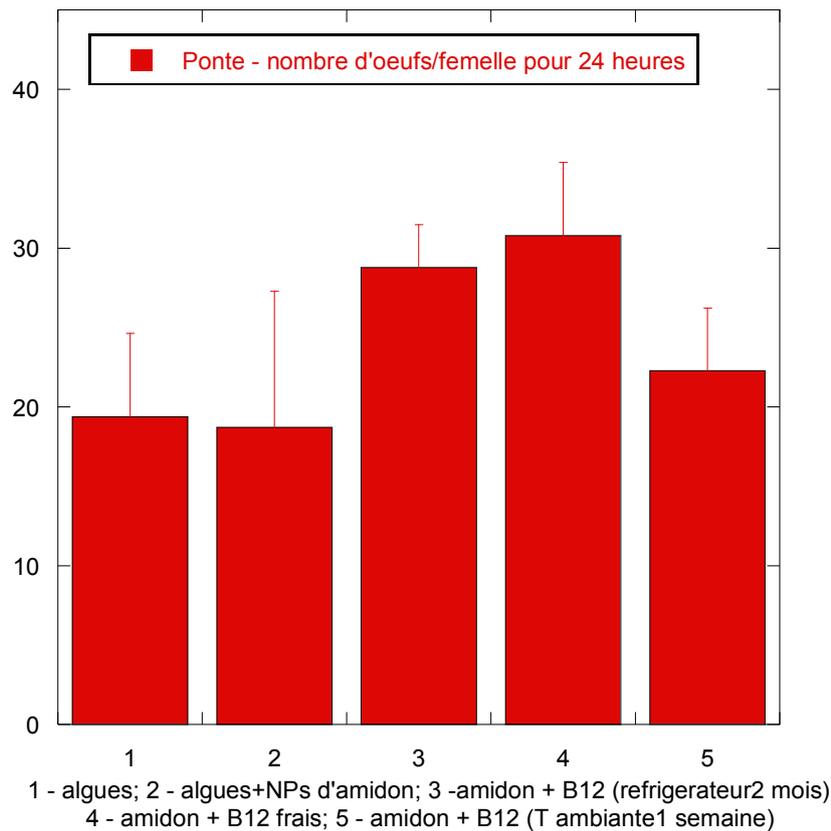


Figure 2.30 Taux de ponte des femelles *Acartia tonsa* exposées aux nanoparticules stockées dans différentes conditions.

Les résultats montrent qu'il est important de stocker les particules synthétisées dans le froid et le noir car leur activité est réduite lorsqu'elles sont stockées à température ambiante. Après un stockage de deux mois dans ces conditions, les nanoparticules ont été incubées avec les copépodes *Acartia tonsa* pendant 24 heures. Le taux de ponte observé était ensuite de 28,8 œufs/femelle. Les taux de ponte d'*Acartia tonsa* après avoir été incubées avec des nanoparticules fraîchement synthétisées durant la même période était de 30,8 œufs/femelle. La différence entre ces deux expériences n'est pas significative. On peut donc en conclure que les nanoparticules chargées en produits actifs peuvent être conservées à 4°C pendant deux mois sans perdre leurs propriétés. En revanche, leurs propriétés diminuent fortement (22.3 œufs/femelle après 24 heures) après 7 jours de stockage à température ambiante.

5.6 Estimation de la ponte et l'éclosion pour des grands volumes

Enfin, il est nécessaire d'effectuer les tests à moyenne et grande échelle. Pour cela nous avons effectué des expériences dans des béciers de 5 litres. Au début, les copépodes ont été placés dans des béciers avec de l'eau de mer naturelle, dans l'incubateur programmé à 18°C et cycle de lumière 12 :12h. Ils ont été nourris normalement avec l'algue *Rhodomonas*. La ponte a été suivie pendant 3 jours et les nanoparticules d'amidon fonctionnalisées avec 0.1% de vitamine B12 et 1% de bétaine ont été ajoutées le troisième jour. Nous avons dans un premier temps rajouter que la moitié de la quantité estimée : 1 g le troisième jour et 1 g le quatrième jour. Les œufs ont été prélevés en siphonnant le fond des béciers. Nous avons réalisé l'expérience en deux répliques. Nous avons effectué un sous-échantillonnage de 1/15ème de tous les œufs chaque jour et nous avons fait ceci en 2 répliques de chaque bécier donc 4 répliques en tous. Les résultats sont présentés ci-dessous (**Figure 2.31**).

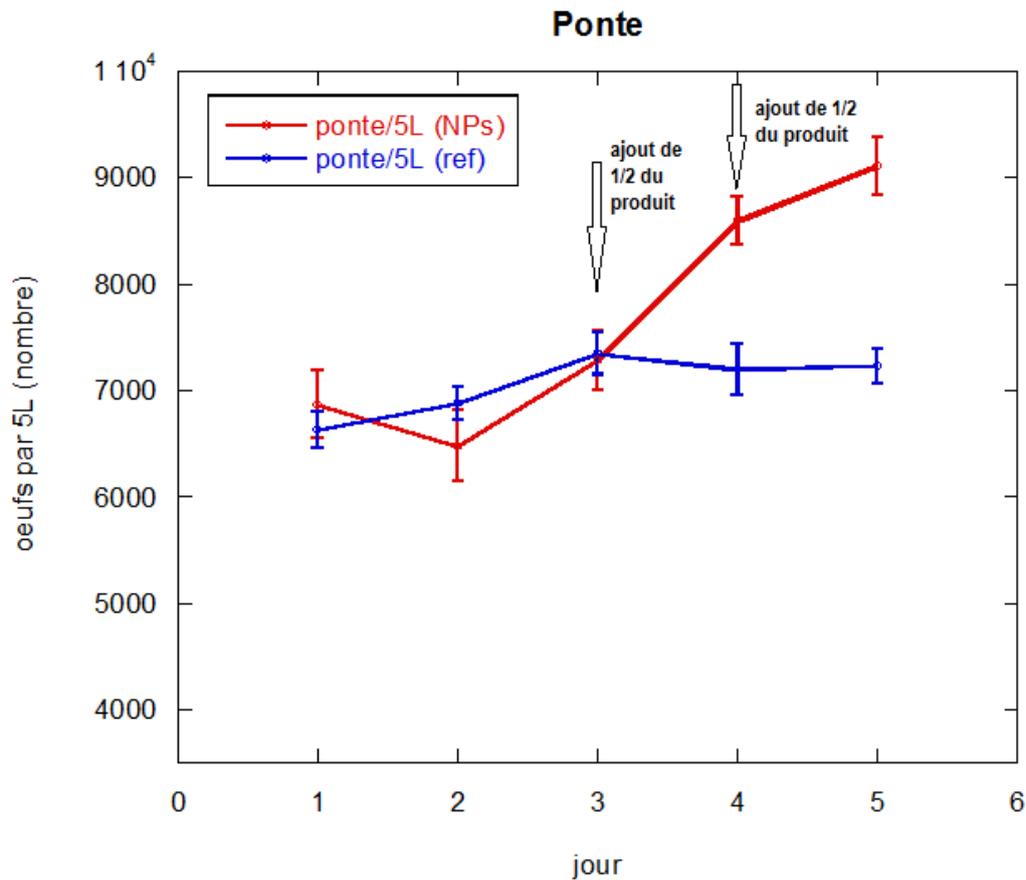


Figure 2.31 - Nombre d'œufs pour les individus placés dans des bâteaux de 5 litres exposés aux nanoparticules d'amidon fonctionnalisées.

Les résultats de cette expérience montrent que ces nanoparticules ont des effets positifs à une échelle moyenne. Dès le premier jour, on constate une augmentation de 19.5% de la ponte par rapport au témoin, même si nous avons ajouté seulement la moitié du produit prévu. Le deuxième jour, après l'ajout de l'autre moitié, la ponte a augmenté de 23.1% comparé au témoin au même moment. Nous avons estimé que le taux l'éclosion était supérieur à 92% après le 5^{ème} jour pour tous les réplicas.

6. Imagerie confocale des copépodes incubés avec des nanoparticules d'amidon fonctionnalisées avec la rhodamine 123

Il est important de démontrer que les nanoparticules d'amidon entrent dans le corps des copépodes. Nous avons donc fonctionnalisé les nanoparticules avec une molécule fluorescente : la rhodamine 123. L'introduction de cette molécule a été effectuée lors

du dernier cycle du broyage. Les caractéristiques de la molécule sont $\lambda_{ex}=511\text{nm}$ et $\lambda_{em}=534\text{nm}$. (**Figure 2.32**)

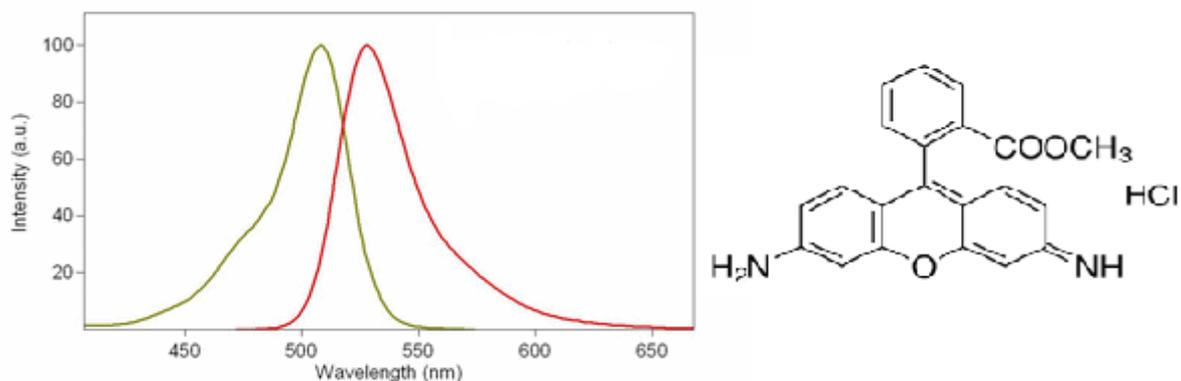


Figure 2.32 – Spectre d'absorption et d'émission de la rhodamine 123 (à gauche) ; Structure chimique de la rhodamine 123 (à droite).

Nous avons incubé les copépodes pendant 24 heures, puis fixés avec de l'éthanol et lavés plusieurs fois pour enlever les restes éventuels sur leur carapace. Grâce à la microscopie confocale nous avons observé l'émission de rhodamine 123 dans le tube digestif des copépodes. Elle apparaît de couleur verte sur la **figure 2.33**, et l'autofluorescence de la carapace apparaît en bleu.

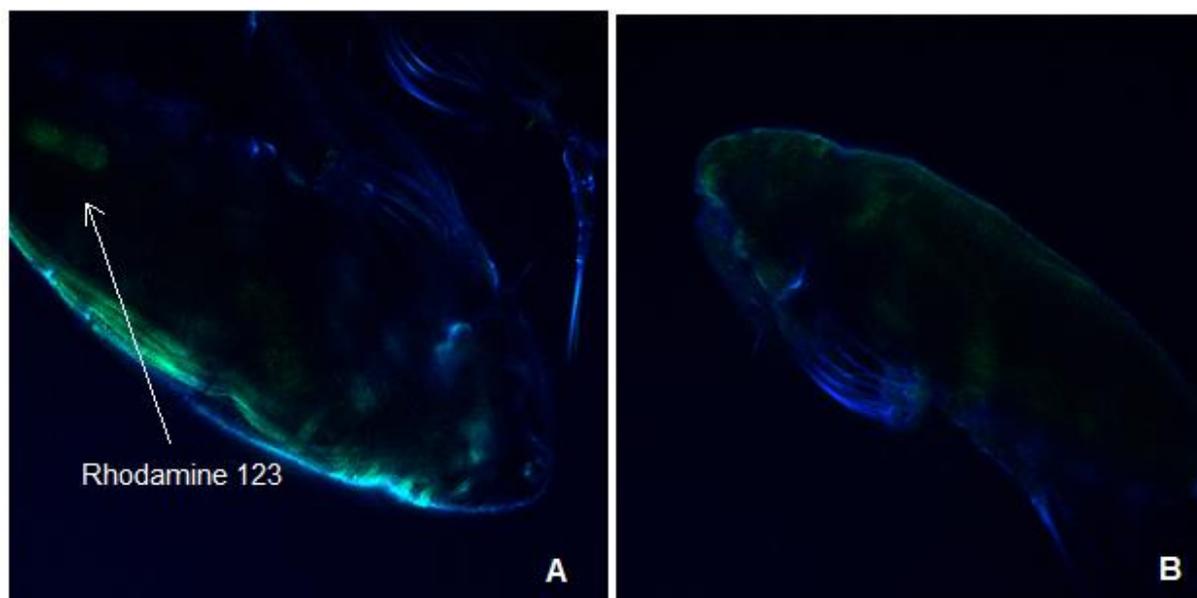


Figure 2.33 – Imagerie confocale des copépodes : **A** – Copépode incubé avec des nanoparticules d'amidon fonctionnalisées avec la Rhodamine 123. **B** - Copépode témoin.

Sur la **figure 2.33A**, nous pouvons voir les nanoparticules d'amidon à l'intérieur de copépode au niveau de son tube digestif. Sur le copépode témoin (**figure 2.33B**), nous pouvons voir que la partie verte n'apparaît pas à l'intérieur du copépode ; seule l'auto-fluorescence apparaît au niveau de sa carapace.

7. Enrichissement d'Artémia avec des nanoparticules d'amidon fonctionnalisées

Pour confirmer les effets positifs des nanoparticules d'amidon fonctionnalisées en aquaculture, nous avons suivi l'augmentation de la taille des nauplii d'Artémia salina, une espèce très utilisée dans le secteur.

Pour mener à bien cette expérience, nous avons placé des cystes d'Artémia dans l'eau de mer artificielle à salinité 35. Après 4 jours, nous avons ajouté 400mg de poudre de nanoparticules dans 1 litre d'eau contenant des Artémias. Ensuite, nous avons suivi la taille des nauplii en les nourrissant en même temps 1 fois par jour avec l'algue *Pavlova lutheri*. La taille a été ensuite déterminée tous les deux jours en prenant des images avec une caméra placée sur un microscope optique. Les images ont été traitées avec le logiciel imageJ. Le nombre d'Artémia par traitement est autour de 25.

Les résultats sont présentés ci-dessous.

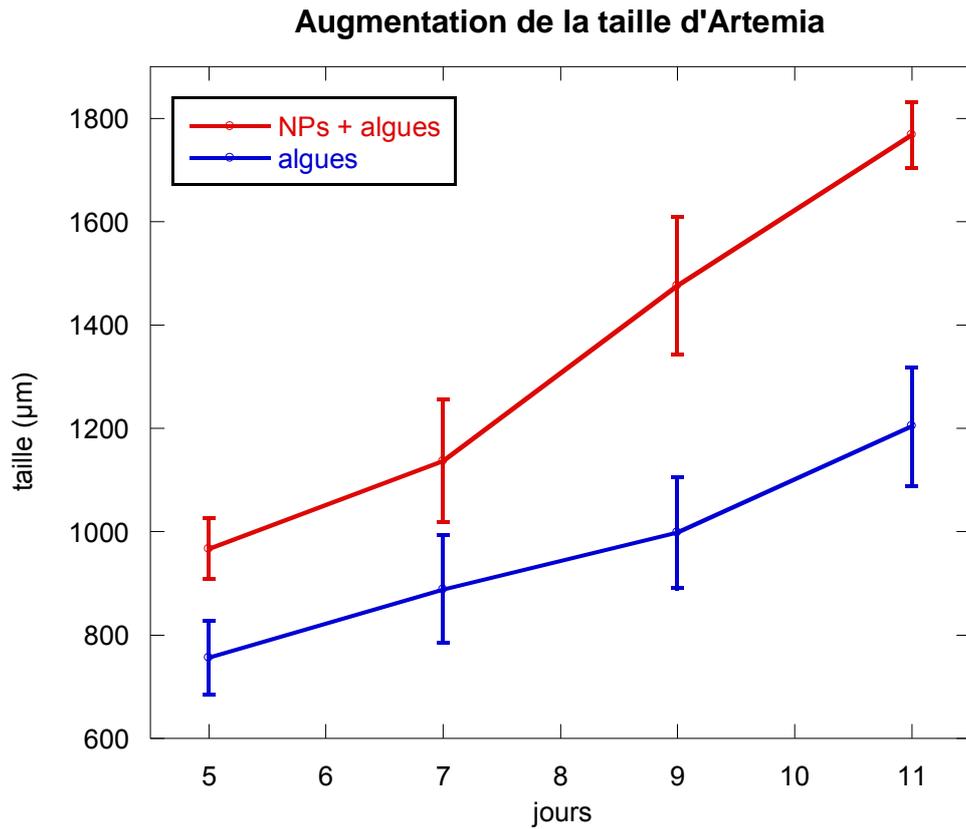


Figure 2.34 – Augmentation de la taille d'Artémia après une exposition à des nanoparticules d'amidon fonctionnalisées avec la vitamine B12 et la bétaïne. Les barres d'erreur représentent l'écart type pour chaque traitement ($n = 25$).

La taille des nauplii d'Artémia augmente plus rapidement lorsqu'ils sont exposés aux nanoparticules. Au onzième jour après leur naissance, la taille des nauplii est en moyenne de 1768 µm pour ceux qui ont été exposés aux nanoparticules et de 1204 µm pour le témoin, soit une différence de 46.8%. Pour illustrer cette différence, nous avons sélectionné deux photos de nauplii au jour 5 dont les résultats apparaissent sur la **Figure 2.34**.



Figure 2.35 – Nauplii d'*Artemia salina* au jour 5 après l'éclosion (A) nourris avec des nanoparticules d'amidon fonctionnalisées avec la vitamine B12 et la bétaïne et (B) témoins nourris avec des algues. L'échelle est de 1mm.

8. Les acides gras et les copépodes : utilisation dans l'aquaculture

8.1 Copépodes riches en acides gras

Les acides gras sont des acides carboxyliques qui ont une longue chaîne aliphatique. Certains acides gras sont une part essentielle de la nutrition des poissons car ils ne peuvent pas les synthétiser. Il en existe deux types: les acides gras saturés et les acides gras insaturés.

Les acides gras saturés ont des liaisons simples (de type C-C), alors que les acides gras insaturés ont au moins une liaison double (C=C) dans leur chaîne aliphatique. Les acides gras qui contiennent plus de liaisons doubles sont dits polyinsaturés. Il en existe plusieurs types, mais les plus importants sont les omégas 3. Ces derniers sont des acides gras polyinsaturés avec une liaison double à la troisième place de la chaîne. Deux types d'omega 3 sont impliqués dans l'aquaculture : l'acide eicosapentaénoïque

(EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA) (tous deux couramment utilisés dans les produits de la mer).

Les copépodes sont les proies vivantes les plus riches en acides gras de type oméga 3.¹⁶¹ En effet, les larves de poissons sont nourries principalement avec des rotifères pendant les premières étapes de leur vie. Chen et al. ont comparé les rotifères avec deux espèces de copépodes (*Acartia tonsa* et *Tisbe holothuriae*) nourries avec les mêmes types d'algues (*Rhodomonas salina*). Les rotifères contenaient une proportion plus élevée d'acides aminés essentiels (43 % masse sèche) que les copépodes (30-32 % masse sèche). Cependant, les rotifères ont des niveaux d'acides gras essentiels comme le DHA de 7%, alors que les copépodes atteignent des niveaux compris entre 23 et 32%. De plus, le rapport DHA/EPA des rotifères est inférieur à celui des copépodes.

Les copépodes *Acartia erythraea* ont été nourris avec quatre types d'algues¹⁶² :

- *Dunaliella* sp. (qui ne contiennent pas d'acides gras polyinsaturés),
- *Thalassiosira* sp. (qui contient des niveaux élevés en acide EPA),
- *Prorocentrum* sp. (des niveaux élevés en acide DHA)
- *Rhodomonas* sp. (niveaux d'EPA et de DHA modérés).

Les résultats ont montré que le taux de ponte et d'éclosion augmente si les copépodes sont nourris avec des algues riches en EPA et DHA.

8.2 Nanocapsules lipidiques des acides gras

Rigo et al. ont démontré qu'il était possible de synthétiser des nanocapsules lipidiques à base d'huile de riz, de soja ou de tournesol¹⁶³. Toutes les particules étaient chargées négativement, avec une taille de 220-230 nm et un Pdl (indice de polydispersité) inférieur à 0.20. Ces huiles naturelles contiennent des triacylglycérols (principalement de l'acide linoléique). Ces molécules ont une activité antioxydante et peuvent être utilisées en nanomédecine ou en nanocosmétique. Les auteurs ont conclu que ces nanoparticules avaient de bonnes propriétés physico-chimiques et de potentielles applications biomédicales. Les différentes huiles végétales ne changent pas les caractéristiques physico-chimiques des LNCs. Les formulations restent stables sans sédimentation ou floculation physico-chimiques (processus au cours duquel les petites

particules en suspension d'agglomèrent pour en former des plus grosses) pendant 3 mois de stockage.

Une autre étude nous présente des nanocapsules lipidiques dans lesquelles la phase d'huile est représentée par l'huile d'olive⁷⁶, et les particules sont stabilisées avec des phospholipons. Ces systèmes ont également des propriétés intéressantes pour une utilisation en nanomédecine. Des nanocapsules lipidiques à base d'huiles végétales peuvent avoir une application dans la nutrition parentérale.¹⁶⁴ En effet, l'émulsion pour ce type de nutrition est préparée juste avant ou pendant l'administration en raison de la stabilité limitée du mélange. Les LNCs pourront permettre une intégration facile des huiles dans la phase aqueuse.

8.3 Objectifs de mon travail

Nous avons eu l'idée de synthétiser des nanocapsules lipidiques à base d'huile de poisson pour une utilisation dans la nutrition des copépodes. Ces nanoparticules vont être riches en acide gras DHA et EPA, et vont présenter des effets positifs sur les individus mélangés avec les algues. Pour suivre les effets positifs, nous avons effectué des tests de reproduction sur des copépodes.

8.4 Matériels et méthodes

L'huile de poisson a été achetée chez Sigma-Aldrich – «Fish oil from menhaden». Les nanocapsules ont été préparées en suivant la méthode décrite dans le chapitre 1 - 2.1 : Synthèse de nano capsules lipidiques.

Nous avons testé 3 différentes proportions des constituants principaux dans le système. Ils sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 2.6 – Composés principaux pour la formulation de LNCs d'huile de poisson.

	LNC (1)	LNC (2)	LNC (3)
Phospholipon 90G (%)	3	3	3
Huile de poisson (%)	20	33.3	40
Solutol (%)	32.3	19	12.3
NaCl (%)	1.7	1.7	1.7
Eau distillée (%)	43	43	43

Après la synthèse, la taille et le potentiel zêta ont été mesurés dans l'eau distillée. Les résultats sont :

- LNC(1) – diamètre = 338.9 ± 23.36 nm ; zêta = -16.6 ± 0.666 mV
- LNC(2) - diamètre = 296.3 ± 2.02 nm ; zêta = -5.10 ± 0.122 mV
- LNC(3) - diamètre = 368.4 ± 11.57 nm ; zêta = $-16,6 \pm 0.666$ mV

En effet, la taille de ces particules est supérieure à la taille des nanocapsules de Labrafac. En effet, chaque nouvelle huile se comporte différemment. Il est donc nécessaire d'établir les ratios pour chaque composé. Mais ces nanocapsules nous ont permis d'effectuer un test sur la reproduction des copépodes.

Pour cela, nous avons préparé une solution à concentration de 1.5mg/mL de nanocapsules d'huile de poisson dans l'eau de mer. Nous avons trié 10 femelles ovigères dans 100mL. Les femelles ont été incubées pendant 24 heures, puis les œufs ont été comptés. Un témoin nourri uniquement avec les algues a été testé également. Les copépodes sont nourris avec l'algue *Rhodomonas salina*. Les résultats sont présentés ci-dessous (**Figure 2.32**). Nous avons effectué des replicas.

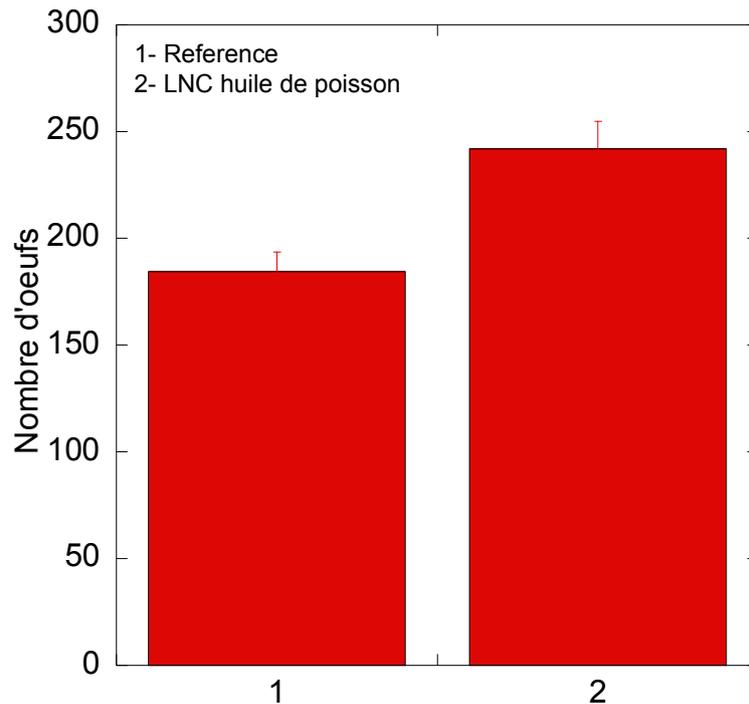


Figure 2.32 - Taux de ponte chez le copépode *Acartia tonsa* après une exposition à des LNCs, à l'huile de poisson et aux algues. Les barres d'erreur représentent l'écart type pour chaque traitement ($n = 2$). Nous observons une différence significative à $p < 0,05$.

Le taux de ponte des copépodes nourris avec des nanocapsules lipidiques d'huile de poisson et des algues est supérieur de 31% de ceux qui étaient nourris seulement avec des algues. Cela prouve que l'enrichissement en acides gras EPA et DHA (présents dans l'huile de poisson) a des effets positifs sur la reproduction des copépodes *Acartia tonsa*. Mais cette expérience nécessite une meilleure analyse des nanocapsules en vue de l'obtention des particules stables de plus petite taille. Il est également nécessaire de tester plusieurs concentrations de nanocapsules et de suivre la reproduction des copépodes *Acartia tonsa*.

Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons démontré l'utilisation de deux types de nanoparticules comme vecteurs de produits bénéfiques pour les copépodes. D'une part, nous avons utilisé des nanoparticules d'amidon synthétisées en grande quantité par la méthode de broyage de modèle planétaire. Ensuite, nous avons envisagé d'enrichir et de suivre les performances des copépodes avec quatre molécules : le glutathion, la vitamine C, la vitamine B12 et la bêtaïne. Nous avons utilisé les nanoparticules d'amidon comme vecteur pour ces molécules hydrophiles. Pour introduire ces molécules dans les nanoparticules d'amidon, nous avons testé plusieurs façons en vue de garder leurs propriétés. Voici les conclusions que nous tirons de ces expériences :

- Les nanoparticules d'amidon sont les mieux adaptées comme vecteur pour les tests avec les copépodes *Acartia tonsa* en se basant sur les tests de toxicité effectués en parallèle avec d'autres polysaccharides.
- Les nanoparticules d'amidon chargées en vitamine B12 et la bêtaïne donnent un taux de ponte élevé, plus de 50% comparé à la référence.
- Les nanoparticules d'amidon de 80 nm de diamètre donnent une ponte plus importante que les particules de 200 nm dû à la surface spécifique élevée des petites particules qui permet d'accrocher une plus grande quantité de molécules.
- Les nanoparticules fonctionnalisées (sous forme de poudre) restent stables pendant plusieurs mois quand elles sont stockées dans un réfrigérateur à 4°C.
- Il est possible d'introduire des molécules sensibles juste en mélangeant l'amidon broyé avec la molécule d'intérêt.
- Ces nanoparticules d'amidon entrent dans le tube digestif des copépodes.

D'autre part, nous avons utilisé des nanocapsules lipidiques comme vecteur de produits bénéfiques pour les copépodes. Dans ce cas, nous avons chargé ces nanoparticules avec de l'huile de poisson riche en acides gras de type omega-3. Ces nanocapsules ont permis d'augmenter le taux de reproduction des copépodes. L'inconvénient de ces nanoparticules est qu'il est impossible de les produire rapidement en grande quantité. Cela limite leur utilisation dans l'aquaculture. Il est également nécessaire d'optimiser la taille de ces nanoparticules.

Conclusion générale

Dans mon travail de thèse nous avons utilisé deux types de nanoparticules pour délivrer des molécules dans les copépodes.

En premier lieu, nous avons synthétisé des nanocapsules lipidiques qui sont utilisées actuellement en nanomédecine humaine. Nous avons démontré que ces nanocapsules sont stables dans l'eau de mer pendant plusieurs jours et ne sont pas toxiques pour les copépodes. Il est, en effet, important de travailler avec des nanoparticules qui n'agglomèrent pas dans le milieu dans lequel nous allons effectuer des expériences. Ensuite, nous avons comparé ces nanocapsules aux liposomes pour démontrer leurs avantages. En effet, les LNCs sont beaucoup plus petites que les liposomes, ce qui les rend plus facile à ingérer par les copépodes. De plus, leurs taille est facilement contrôlable, contrairement à celles des liposomes.

Nous avons ensuite encapsulé des molécules lipophiles toxiques dans les LNCs, puis observé leurs effets sur les copépodes. Les résultats ont montré que la toxicité est beaucoup plus élevée lorsque ces molécules se trouvent dans les nanocapsules. Les LNCs s'avèrent donc être un modèle pertinent par rapport aux méthodes traditionnelles utilisées pour introduire des molécules lipophiles (comme les solvants organiques) qui peuvent contribuer à la toxicité observée. Cela nous ouvre des nouvelles perspectives pour l'utilisation de ces nanoparticules comme vecteur de médicaments lipophiles pour les copépodes ou même d'autres organismes aquatiques.

Nous avons ensuite synthétisé des nanocapsules lipidiques à base de l'huile de poisson riche en acides gras, oméga 3 et prouvé que ces capsules pouvaient avoir des effets positifs sur la reproduction du copépode *Acartia tonsa*.

En parallèle, nous avons développé des nanoparticules d'amidon pouvant être synthétisées facilement en grandes quantités. Pour cela, nous avons utilisé la méthode de broyage planétaire. Ainsi, nous avons optimisé la taille des nanoparticules en variant la vitesse de broyage, le nombre et la taille des billes. Nous avons ensuite testé la stabilité de ces nanoparticules dans l'eau de mer et caractérisé la physicochimie de ces particules. Une toxicité inférieure à 10% a été observée sur les copépodes adultes, ce qui nous a permis de continuer à développer ce système comme un vecteur de molécules d'intérêt. Pour cela, nous avons étudié les besoins primaires des copépodes et des larves de poissons afin de choisir quatre molécules : la vitamine C, le glutathion,

la vitamine B12 et la bétaine. Nous avons introduit ces molécules lors du dernier cycle de broyage, puis nous avons suivi le taux de ponte et d'éclosion chez le copépode *Acartia tonsa*. Nous avons montré qu'il était possible d'ajouter des molécules sensibles en mélangeant les deux produits après le broyage sans influencer significativement les effets positifs. Ces nanoparticules fonctionnalisées restent stables pendant 2 mois une fois stockées dans un réfrigérateur. Nous avons aussi démontré que ces nanoparticules avaient des effets positifs à petite et à moyenne échelle. Enfin, nous avons démontré qu'elles avaient des effets positifs sur l'augmentation de la taille des Artémias nourris avec ces nanoparticules.

Perspectives

Nous avons démontré que les nanocapsules lipidiques pouvaient être utilisées dans des études d'écotoxicologie des polluants hydrophobes en milieu marin. Elles représentent, en effet, un vecteur de molécules lipophiles pour le copépode car ce dernier les ingère avec son alimentation. Les effets toxiques sur les copépodes des molécules encapsulées peuvent être observés à des concentrations très faibles.

Pour donner suite à ce travail, il serait intéressant d'étudier les effets bénéfiques de certaines molécules encapsulées dans les nanocapsules lipidiques sur les copépodes et/ou indirectement sur les larves de poisson. Ces études pourraient être effectuées à l'aide de certains médicaments comme par exemple des antibiotiques.

En seconde partie, nous avons étudié le taux de ponte des copépodes nourris avec des nanoparticules fonctionnalisées avec des molécules d'intérêt comme les vitamines. Nous avons obtenu des résultats positifs sur la ponte des *Acartia tonsa*, sur des petits volumes : 100 mL d'eau de mer contenant seulement 10 femelles ovigaires et des volumes moyens : 5 litres d'eau de mer contenant une grande quantité de copépodes *Acartia tonsa* de tous âges et genres dans des conditions naturelles. Puisque nous avons observé des effets positifs de ces poudres synthétisées en plus grand volume (5 litres), nous devons envisager des tests industriels dans de très gros volumes (250 litres). Les effets positifs ont été observés sur *Artemia salina* mais il est intéressant de comparer les résultats avec un produit industriel.

Nous pourrions également fonctionnaliser ces nanoparticules avec d'autres molécules bénéfiques, ou effectuer des mélanges avec des lipides de types acides gras polyinsaturés ou des protéines. Chaque molécule doit être étudiée seule avant d'envisager des études des mélanges.

Parallèlement, il serait intéressant d'examiner les effets des nanoparticules d'amidon fonctionnalisées sur les nauplii et leur développement. Nous pourrions aussi étudier la vitesse d'augmentation de la taille des nauplii et leurs différents stades de développement. Enfin, pour étendre la portée de cette approche et sa généralisation, il sera également judicieux d'expérimenter ces produits sur des rotifères et/ou d'autres espèces zooplanctoniques.

Plus tard encore, il serait envisageable de tester les effets des larves de copépodes ou d'*Artemia* nourris de cette manière directement sur les poissons et de suivre leur développement.

Références bibliographiques

1. Boisseau, P., and Loubaton, B. (2011) Nanomedicine, nanotechnology in medicine, *Comptes Rendus Physique* 12, 620-636.
2. Lee, C. E. (1999) Rapid and repeated invasions of fresh water by the copepod *Eurytemora affinis*, *Evolution* 53, 1423-1434.
3. Bouley, P., and Kimmerer, W. J. (2006) Ecology of a highly abundant, introduced cyclopoid copepod in a temperate estuary, *Marine Ecology Progress Series*, 219-228.
4. Desbruyeres D., Biscoito, M., Caprais, J.-C., Colac, A., Comtet, T., Crassous, P., Fouquet, Y., Khripouno, A., Le Bris, N., Olu, K., Riso, R., Sarradin, P.-M., Segonzac, M., and Vangriesheim, A. (2001) Variations in deep-sea hydrothermal vent communities on the Mid-Atlantic Ridge near the Azores plateau, *Deep-Sea Research* 1, 1325-1346.
5. Souissi, S., Devreker, D., Seuront, L., and Dauvin, J.-C. (2002) Dynamique de population du copépode *Eurytemora affinis* dans l'estuaire aval : couplage entre les processus physiques et biologiques. , (Seine-Aval, P. s., Ed.), 49.
6. Tartarotti, B., and Torres, J. J. (2009) Sublethal stress: Impact of solar UV radiation on protein synthesis in the copepod *Acartia tonsa*, *Journal of Experimental Biology and Ecology* 375, 106-113.
7. Hubareva, E., Svetlichny, L., Kideys, A., and Isinibilir, M. (2008) Fate of the Black Sea *Acartia clausi* and *Acartia tonsa* (Copepoda) penetrating into the Marmara Sea through the Bosphorus, *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 76, 131-140.
8. Mauchline, J., Blaxter, J. H. S., Southward, A. J., and Tyler, P. A. (1998) Advances in marine biology - The biology of calanoid copepods In *Advances in Marine Biology, Vol 33: The Biology of Calanoid Copepods*, pp 1, Academic Press Ltd-Elsevier Science Ltd, London.
9. Suchman, C. L., and Sullivan, B. K. (1998) Vulnerability of the copepod *Acartia tonsa* to predation by scyphomedusa *Chrysaora quinquecirrha*/ effect of prey size and behavior, *Marine Biology* 132, 237-245.
10. Caudill, C., and Bucklin, A. (2004) Molecular Phylogeography and Evolutionary History of the Estuarine Copepod, *Acartia Tonsa*, on the Northwest Atlantic Coast, *Hydrobiologia* 511, 91-102.
11. Tackx, M., and Polk, P. (1982) Feeding of *Acartia tonsa* dana (Copepoda, Calanoida) - predation on nauplii of *Canuella perplexa* Scott, T et Scott, A. (Copepoda, Herpacticoida) in the Sluice Dock at Ostend *Hydrobiologia* 94, 131-133.
12. Drillet, G., Maguet, R., Mahjoub, M. S., Roullier, F., and Fielding, M. J. (2014) Egg cannibalism in *Acartia tonsa*: effects of stocking density, algal concentration, and egg availability, *Aquaculture International* 22, 1295-1306.
13. Teixeira, P. F., Kaminski, S. M., Avila, T. R., Cardozo, A. P., Bersano, J. G. F., and Bianchini, A. (2010) Diet influence on egg production of the copepod *Acartia tonsa* (Dana, 1896), *Anais da Academia Brasileira Ciencias* 82, 333-339.
14. Dunlap, D. S., Rosario, K., Barbosa, J. G., Greco, A. M., Breitbart, M., and Hewson, I. (2013) Molecular and microscopic evidence of viruses in marine copepods, *Proceeding of the National Academy of Science U. S. A.* 110, 1375-1380.
15. Gorbi, G., Invidia, M., Savorelli, F., Faraponova, O., Giacco, E., Cigar, M., Buttino, I., Leoni, T., Prato, E., Lacchetti, I., and Sei, S. (2012) Standardized methods for acute and semichronic toxicity tests with the copepod *Acartia tonsa*, *Environmental Toxicology and Chemistry* 31, 2023-2028.
16. Abate, T. G., Nielsen, R., Nielsen, M., Drillet, G., Jepsen, P. M., and Hansen, B. W. (2015) Economic feasibility of copepod production for commercial use: Result from a prototype production facility, *Aquaculture* 436, 72-79.

17. Mininni, G., Sbrilli, A., Braguglia, C. M., Guerriero, E., Marani, D., and Rotatori, M. (2007) Dioxins, furans and polycyclic aromatic hydrocarbons emissions from a hospital and cemetery waste incinerator, *Atmospheric Environment* 41, 8527-8536.
18. Mastrangelo, G., Fadda, E., and Marzia, V. (1996) Polycyclic aromatic hydrocarbons and cancer in man, *Environmental Health Perspectives* 104, 1166-1170.
19. Perera, F. P., Whyatt, R. M., Jedrychowski, W., Rauh, V., Manchester, D., Santella, R. M., and Ottman, R. (1998) Recent developments in molecular epidemiology - Study of the effects of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons on birth outcomes in Poland, *American Journal of Epidemiology* 147, 309-314.
20. Sanyal, M. K., and Li, Y. L. (2007) Deleterious effects of polynuclear aromatic hydrocarbon on blood vascular system of the rat fetus, *Birth Defects Research Part B-Developmental and Reproductive Toxicology* 80, 367-373.
21. Vassilev, Z. P., Robson, M. G., and Klotz, J. B. (2001) Associations of polycyclic organic matter in outdoor air with decreased birth weight: A pilot cross-sectional analysis, *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A* 64, 595-605.
22. Biro, A., Pallinger, E., Major, J., Jakab, M. G., Klupp, T., Falus, A., and Tompa, A. (2002) Lymphocyte phenotype analysis and chromosome aberration frequency of workers occupationally exposed to styrene, benzene, polycyclic aromatic hydrocarbon or mixed solvents, *Immunology Letters* 81, 133-140.
23. van Grevenynghe, J., Rion, S., Le Ferrec, E., Le Vee, M., Amiot, L., Fauchet, R., and Fardel, O. (2003) Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit differentiation of human monocytes into macrophages, *The Journal of Immunology*. 170, 2374-2381.
24. Oconnor, J. M. (1984) PCBs - human and environmental hazards, *American Scientist* 72, 403-403.
25. Tharappel, J. C., Lee, E. Y., Robertson, L. W., Spear, B. T., and Glauert, H. P. (2002) Regulation of cell proliferation, apoptosis, and transcription factor activities during the promotion of liver carcinogenesis by polychlorinated biphenyls, *Toxicology and Applied Pharmacology* 179, 172-184.
26. Lu, Y. C., and Wu, Y. C. (1985) Clinical findings and immunological abnormalities in Yu-Cheng patients, *Environmental Health Perspectives* 59, 17-29.
27. Jacobson, J. L., and Jacobson, S. W. (1996) Intellectual impairment in children exposed to polychlorinated biphenyls in utero, *The New England Journal of Medicine* 335, 783-789.
28. Chen, Y. C. J., Guo, Y. L., Hsu, C. C., and Rogan, W. J. (1992) Cognitive development of Yu-Cheng (Oil disease) children prenatally exposed to heat-degraded PCBs., *JAMA-Journal of American Medical Association* 268, 3213-3218.
29. Porterfield, S. P. (2000) Thyroidal dysfunction and environmental chemicals - Potential impact on brain development, *Environmental Health Perspectives* 108, 433-438.
30. Moore, C. J. (2008) Synthetic polymers in the marine environment: A rapidly increasing, long-term threat, *Environmental Research* 108, 131-139.
31. Rubin, B. S. (2011) Bisphenol A: An endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects, *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 127, 27-34.
32. Ferguson, P. L., Bopp, R. F., Chillrud, S. N., Aller, R. C., and Brownawell, B. J. (2003) Biogeochemistry of Nonylphenol Ethoxylates in Urban Estuarine Sediments, *Environmental Science & Technology* 37, 3499-3506.
33. Administration U. S. F. a. D. (2010) Bisphenol A (BPA): Use in Food Contact Application.
34. Flint, S., Markle, T., Thompson, S., and Wallace, E. (2012) Bisphenol A exposure, effects, and policy: A wildlife perspective, *Journal of Environmental Management* 104, 19-34.
35. Dodson, R. E., Nishioka, M., Standley, L. J., Perovich, L. J., Brody, J. G., and Rudel, R. A. (2012) Endocrine Disruptors and Asthma-Associated Chemicals in Consumer Products, *Environmental Health Perspectives* 120, 935-943.

36. Nanjappa, M. K., Ahuja, M., Dhanasekaran, M., Coleman, E. S., Braden, T. D., Bartol, F. F., Bird, R. C., Wanders, D., Judd, R. L., and Akingbemi, B. T. (2014) Bisphenol A regulation of testicular endocrine function in male rats is affected by diet, *Toxicology Letters* 225, 479-487.
37. Nørregaard, R. D., Gustavson, K., Møller, E. F., Strand, J., Tairova, Z., and Mosbech, A. (2015) Ecotoxicological investigation of the effect of accumulation of PAH and possible impact of dispersant in resting high arctic copepod *Calanus hyperboreus*, *Aquatic Toxicology* 167, 1-11.
38. Grenvald, J. C., Nielsen, T. G., and Hjorth, M. (2013) Effects of pyrene exposure and temperature on early development of two co-existing Arctic copepods, *Ecotoxicology* 22, 184-198.
39. Michalec, F.-G., Holzner, M., Menu, D., Hwang, J.-S., and Souissi, S. (2013) Behavioral responses of the estuarine calanoid copepod *Eurytemora affinis* to sub-lethal concentrations of waterborne pollutants, *Aquatic Toxicology* 138–139, 129-138.
40. Berdugo, V., Harris, R. P., and O'Hara, S. C. M. (1977) The effect of petroleum hydrocarbons on reproduction of an estuarine planktonic copepod in laboratory cultures., *Marine Pollution Bulletin* 8, 138-143.
41. Barata, C., Baird, D. J., Medina, M., Albalat, A., and Soares, A. M. V. M. (2002) Determining the ecotoxicological mode of action of toxic chemicals in meiobenthic marine organisms: stage-specific short tests with *Tisbe battagliai*, *Marine Ecology Progress Series* 230, 183-194.
42. Spehar, R. L., Poucher, S., Brooke, L. T., Hansen, D. J., Champlin, D., and Cox, D. A. (1999) Comparative toxicity of fluoranthene to freshwater and saltwater species under fluorescent and ultraviolet light., *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 37, 496-502.
43. Feng, G., Lei, W., and Wen-Xiong, W. (2012) Acute and chronic toxicity of Polychlorinated biphenyl 126 to *Tigropus japonicus* : effects on survival, growth, reproduction and intrinsic rate of population growth, *Environmental Toxicology and Chemistry* 31, 639-645.
44. Tiano, M., Tronczyński, J., Harmelin-Vivien, M., Tixier, C., and Carlotti, F. (2014) PCB concentrations in plankton size classes, a temporal study in Marseille Bay, Western Mediterranean Sea, *Marine Pollution Bulletin* 89, 331-339.
45. Cailleaud, K., Forget-Leray, J., Souissi, S., Hilde, D., LeMenach, K., and Budzinski, H. (2007) Seasonal variations of hydrophobic organic contaminant concentrations in the water-column of the Seine Estuary and their transfer to a planktonic species *Eurytemora affinis* (Calanoida, copepoda). Part 1: PCBs and PAHs, *Chemosphere* 70, 270-280.
46. Cailleaud, K., Michalec, F.-G., Forget-Leray, J., Budzinski, H., Hwang, J.-S., Schmitt, F. G., and Souissi, S. (2011) Changes in the swimming behavior of *Eurytemora affinis* (Copepoda, Calanoida) in response to a sub-lethal exposure to nonylphenols, *Aquatic Toxicology* 102, 228-231.
47. Cailleaud, K., Budzinski, H., Lardy, S., Augagneur, S., Barka, S., Souissi, S., and Forget-Leray, J. (2011) Uptake and elimination, and effect of estrogen-like contaminants in estuarine copepods: an experimental study, *Environmental Science and Pollution Research* 18, 226-236.
48. Marcial, H. S., Hagiwara, A., and Snell, T. W. (2003) Estrogenic compounds affect development of Harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus*, *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 3025-3030.
49. Bechmann, R. K. (1999) Effect of the endocrine disrupter nonylphenol on the marine copepod *Tisbe battagliai*, *Science of The Total Environment* 233, 33-46.
50. Lotufo, and R., G. (1997) Toxicity of sediment-associated PAHs to an estuarine copepod: Effects on survival, feeding, reproduction and behavior, *Marine Environmental Research* 44, 149-166.
51. Rossoff, I. S. (1974) *Handbook of Veterinary Drugs*.
52. Lesueur, T., Boulange-Lecomte, C., Xuereb, B., Budzinski, H., Cachot, J., Vicquelin, L., Giusti-Petrucciani, N., Marie, S., Petit, F., and Forget-Leray, J. (2013) Development of a larval bioassay using the calanoid copepod, *Eurytemora affinis* to assess the toxicity of sediment-bound pollutants, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 94, 60-66.

53. Hydrocarbonstrategy. (2009) Exploration and exploitation of hydrocarbons in Greenland., (Bureau of minerals and petroleum, Ed.), Nuuk.
54. Norregaard, R. D., Nielsen, T. G., Moller, E. F., Strand, J., Espersen, L., and Mohl, M. (2014) Evaluating pyrene toxicity on Arctic key copepod species *Calanus hyperboreus*, *Ecotoxicology* 23, 163-174.
55. Juan, B., and Peter, T. (2007) Effects of selected PAHs on reproduction and survival of the calanoid copepod *Acartia tonsa*, *Ecotoxicology* 16, 465-474.
56. Andersen, H. R., Halling-Sørensen, B., and Kusk, K. O. (1999) A Parameter for Detecting Estrogenic Exposure in the Copepod *Acartia tonsa*, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 44, 56-61.
57. Li, J. H., Zhou, B. X., and Cai, W. M. (2007) The solubility behavior of bisphenol A in the presence of surfactants, *Journal of Chemical Engineering Data* 52, 2511-2513.
58. Wang, A. Z., Langer, R., and Farokhzad, O. C. (2012) Nanoparticle Delivery of Cancer Drugs, In *Annual Review of Medicine, Vol 63* (Caskey, C. T., Austin, C. P., and Hoxie, J. A., Eds.), pp 185-198, Annual Reviews, Palo Alto.
59. Torchilin, V. P. (2005) Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers, *Nature Reviews Drug Discovery*. 4, 145-160.
60. Skandarani, N. (2014) Développement de nanocapsules lipidiques pour la vectorisation de principes actifs, Université de Franche-Comté.
61. Shaikh, I. M., Tan, K. B., Chaudhury, A., Liu, Y. J., Tan, B. J., Tan, B. M. J., and Chiu, G. N. C. (2013) Liposome co-encapsulation of synergistic combination of irinotecan and doxorubicin for the treatment of intraperitoneally grown ovarian tumor xenograft, *Journal of Controlled Release* 172, 852-861.
62. Afergan, E., Epstein, H., Dahan, R., Koroukhov, N., Rohekar, K., Danenberg, H. D., and Golomb, G. (2008) Delivery of serotonin to the brain by monocytes following phagocytosis of liposomes, *Journal of Controlled Release* 132, 84-90.
63. Wong, J. P., Yang, H. M., Blasetti, K. L., Schnell, G., Conley, J., and Schofield, L. N. (2003) Liposome delivery of ciprofloxacin against intracellular *Francisella tularensis* infection, *Journal of Controlled Release* 92, 265-273.
64. Buttino, I., Rosa, G. D., Carotenuto, Y., Ianora, A., Fontana, A., Quaglia, F., and Rotonda, M. I. L. (2005) Giant liposomes as delivery system for ecophysiological studies in copepods, *The Journal of Experimental Biology* 209, 801-809.
65. Sułkowski, W. W., Pentak, D., Nowak, K., and Sułkowska, A. (2005) The influence of temperature, cholesterol content and pH on liposome stability, *Journal of Molecular Structure* 744-747, 737-747.
66. Wang, A. Z., Langer, R., and Farokhzad, O. C. (2012) Nanoparticle delivery of cancer drugs, *Annual review of medicine* 63, 185-198.
67. Hoarau, D., Delmas, P., David, S., Roux, E., and Leroux, J. C. (2004) Novel long-circulating lipid nanocapsules, *Pharmaceutical Research* 21, 1783-1789.
68. Heurtault B., e. a. (2001) Nanocapsules lipidiques, procédé de préparation et utilisation comme médicament.
69. Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J.-E., and Benoit, J.-P. (2002) A Novel Phase Inversion-Based Process for the Preparation of Lipid Nanocarriers, *Pharmaceutical Research* 19, 875-880.
70. Paillard, A., Hindré, F., Vignes-Colombeix, C., Benoit, J.-P., and Garcion, E. (2010) The importance of endo-lysosomal escape with lipid nanocapsules for drug subcellular bioavailability, *Biomaterials* 31, 7542-7554.
71. Beduneau, A., Saulnier, P., Anton, N., Hindre, F., Passirani, C., Rajerison, H., Noiret, N., and Benoit, J. P. (2006) Pegylated nanocapsules produced by an organic solvent-free method: Evaluation of their stealth properties, *Pharmaceutical Research* 23, 2190-2199.

72. Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Venier-Julienne, M.-C., Proust, J.-E., Phan-Tan-Luu, R., and Benoît, J.-P. (2003) The influence of lipid nanocapsule composition on their size distribution, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 18, 55-61.
73. Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J. E., and Benoît, J. P. (2002) Properties of polyethylene glycol 660 12-hydroxy stearate at a triglyceride/water interface, *International Journal of Pharmaceutics* 242, 167-170.
74. Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J.-E., and Benoit, J.-P. (2003) Physico-chemical stability of colloidal lipid particles, *Biomaterials* 24, 4283-4300.
75. Marion, G. M., Millero, F. J., Camões, M. F., Spitzer, P., Feistel, R., and Chen, C. T. A. (2011) pH of seawater, *Marine Chemistry* 126, 89-96.
76. Sanchez-Moreno, P., Ortega-Vinuesa, J. L., Martin-Rodriguez, A., Boulaiz, H., Marchal-Corrales, J. A., and Peula-Garcia, J. M. (2012) Characterization of different functionalized lipidic nanocapsules as potential drug carriers, *International journal of molecular sciences* 13, 2405-2424.
77. Bastiat, G. (2013) A new tool to ensure the fluorescent dye labeling stability of nanocarriers: a real challenge for fluorescence imaging., *Journal of Controlled Release* 170, 334-342.
78. Støttrup, J. G., Richardson, K., Kirkegaard, E., and Pihl, N. J. (1986) *Aquaculture* 52.
79. Bellas, J., Thor, P. (2007) Effects of selected PAHs on reproduction and survival of the calanoid copepod *Acartia tonsa*, *Ecotoxicology* 16, 465.
80. Marcial, H. S., Hagiwara, A., and Snell, T. W. (2003) Estrogenic compounds affect development of harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus*, *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 3025-3030.
81. Poulet S.A., I. A., Laabir M., Klein Breteler W.C.M. (1995) Towards the measurement of secondary production and recruitment in copepods *ICES Journal of Marine Science* 52, 359-368.
82. Berdugo, V., Harris, R.P., O'Hara, S.C.M. . (1977) Accumulation of 14C-1-naphthalene by an oceanic and an estuarine copepod during long-term exposure to low-level concentrations, *Marine Biology* 42, 187-195.
83. Pulvenis de Séligny J-F., Grainger R., and Gummy A. (2010) La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture, Food and Agriculture Organization of the United Nations.
84. Diamond, J. (2005) *Collapse: How societies choose to fail or succeed*. Ed. Penguin Books
85. Thacker, P. (2008) Fish Farms Harm Local Food Supply, *Environmental Science and Technology* V 40.
86. FAO. (2008) World Review of Fisheries and Aquaculture - Highlights of special studies, Rome.
87. Alliance, S. C. (2005) It's all about salmon, (Spring, Ed.).
88. Valter Monteiro de Azevedo-Santosl, Odila Rigolin-Sál, and Pelicice, F. M. (2011) Growing, losing or introducing? Cage aquaculture as a vector for the introduction of non-native fish in Furnas Reservoir, Minas Gerais, Brazil, *Neotropical Ichthyology* 9.
89. Nickerson, J. D. (1999) Trade-offs of mangrove area development in the Philippines¹, *Ecological Economics* 28, 279-298.
90. Tietenberg, T. H. (2006) *Environmental and Natural Resource Economics: A Contemporaru Approach*, Pearson/Addison Wesley.
91. Marziali, C. (2009) The Case for Fish and Oyster Farming, *University of Southern California Trojan Family Magazine*.
92. Chopin, T., Buschmann, A. H., Halling, C., Troell, M., Kautsky, N., Neori, A., Kraemer, G. P., Zertuche-González, J. A., Yarish, C., and Neefus, C. (2001) Integrating Seaweeds into marine aquaculture systems: a key toward sustainability, *Journal of Phycology* 37, 975-986.
93. Goldberg, R. J., Elliott, M. S., and Naylor, R. L. (2001) Marine Aquaculture in the United States, (Comission, P. O., Ed.).
94. Simonelli, A., and Hankins, J. (2013) Seafood Solutions Of The Future: Growing By Sea And By Land, (Fund, T. C., Ed.), Arlington, Virginia, USA.

95. Cavalin, F. G., and Weirich, C. R. (2009) Larval performance of aquacultured Florida pompano (*Trachinotus carolinus*) fed rotifers (*Brachionus plicatilis*) enriched with selected commercial diets, *Aquaculture* 292, 67-73.
96. Kirk, K. L., Ellis, J., and Taylor, J. (1999) Physiological responses to variable environments: storage and respiration in starving rotifers, *Freshwater Biology* 42, 637-644.
97. Alver, M. O., Tennoy, T., Alfredsen, J. A., and Oie, G. (2007) Automatic measurement of rotifer *Brachionus plicatilis* densities in first feeding tanks, *Aquacultural Engineering* 36, 115-121.
98. Barata, C., Hontoria, F., and Amat, F. (1996) Estimation of the biomass production of *Artemia* with regard to its use in aquaculture: Temperature and strain effects, *Aquaculture* 142, 171-189.
99. Nunes, B. S., Carvalho, F. D., Guilhermino, L. M., and Van Stappen, G. (2006) Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing, *Environmental Pollution* 144, 453-462.
100. Lim, L. C., Dhert, P., and Sorgeloos, P. (2003) Recent developments in the application of live feeds in the freshwater ornamental fish culture, *Aquaculture* 227, 319-331.
101. Sargent J.R., H. D. (1986) *The Biological Chemistry of Marine Copepods*, Clarendon Press, Oxford.
102. McEvoy, L. A., Naess, T., Bell, J. G., and Lie, Ø. (1998) Lipid and fatty acid composition of normal and malpigmented Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) fed enriched *Artemia*: a comparison with fry fed wild copepods, *Aquaculture* 163, 237-250.
103. Nanton, D. A., and Castell, J. D. (1998) The effects of dietary fatty acids on the fatty acid composition of the harpacticoid copepod, *Tisbe* sp., for use as a live food for marine fish larvae, *Aquaculture* 163, 251-261.
104. Huys, R., and Boxshall, G. A. (1993) Copepod evolution, *Limnology and Oceanography* 38, 478-478.
105. Humes, A. (1994) How many copepods?, *Hydrobiologia* 292-293, 1-7.
106. Barbara, E. C. (2015) *Advances in Marine Biology*, Academic Press.
107. Uye, S. (2005) *A brief review of mass culture of copepods used for fish food in Japanese mariculture and a proposed plan to use high biomass natural population of brackish-water copepods*, Oxford UK.
108. Doi, M., Toledo, J., Golez, M., de los Santos, M., and Ohno, A. (1997) Preliminary investigation of feeding performance of larvae of early red-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, reared with mixed zooplankton, *Hydrobiologia* 358, 259-263.
109. Berggreen, U., Hansen, B., Kiørboe, T. (1988) Food size spectra, ingestion and growth of the copepod *Acartia tonsa* during development: Implications for determination of copepod production, *Marine Biology* 99, 341-352.
110. Muller-Fuega (2003) *Live Feeds in Marine Aquaculture*, Blackwell Science, Oxford UK.
111. Jónasdóttir, S. H. (1994) Effects of food quality on the reproductive success of *Acartia tonsa* and *Acartia hudsonica*: laboratory observations, *Marine Biology* 121, 67-81.
112. Kleppel, G. S., Burkart, C. A., Houchin, L., and Tomas, C. (1998) Egg Production of the Copepod *Acartia tonsa* in Florida Bay during Summer. 1. The Roles of Food Environment and Diet, *Estuaries* 21, 328-339.
113. Chesney, E. J., and Sargent, J. R. (1989) Estimating the food requirements of striped bass larvae *Morone saxatilis*: effects of light, turbidity and turbulence *Marine Ecology Progress Series* 53, 191-200.
114. Støttrup, J. G. (2000) The elusive copepods: their production and suitability in marine aquaculture, *Aquaculture Research* 31, 703-711.
115. Shields, R. J., Kotani, T., Molnar, A., Marion, K., Kobashigawa, J., and Tang, L. (2007) Intensive Cultivation of A Subtropical Paracalanid Copepod, *Parvocalanus* sp., as Prey for Small Marine Fish Larvae, In *Copepods in Aquaculture*, 209-224, Blackwell Publishing Professional.
116. McKinnon, A. D., Duggan, S., Nichols, P. D., Rimmer, M. A., Semmens, G., and Robino, B. (2003) The potential of tropical paracalanid copepods as live feeds in aquaculture, *Aquaculture* 223, 89-106.

117. Toledo, J. D., Salvacion Golez, M., and Ohno, A. (2007) Studies on the Use of Copepods in the Semi-Intensive Seed Production of Grouper *Epinephelus Coioides*, In *Copepods in Aquaculture*, 169-182, Blackwell Publishing Professional.
118. Sargent, J. R., Falk-Petersen S. (1988) The lipid biochemistry of calanoid copepods, *Hydrobiologia* 167-168, 101-114.
119. Peck, M. A., and Holste, L. (2006) Effects of salinity, photoperiod and adult stocking density on egg production and egg hatching success in *Acartia tonsa* (Calanoida: Copepoda): Optimizing intensive cultures, *Aquaculture* 255, 341-350.
120. Caramujo, M.-J., Boschker, H. T. S., and Admiraal, W. I. M. (2008) Fatty acid profiles of algae mark the development and composition of harpacticoid copepods, *Freshwater Biology* 53, 77-90.
121. Cheng-Sheng Lee, O'Bryen, P. J., and Marcus, N. H. (2005) *Copepods in aquaculture*.
122. Jeffrey, W. (1987) Fucoxanthin pigment markers of marine phytoplankton analysed by HPLC and HPTLC, *Marine Ecology Progress* 38.
123. Reinsberg, D., Ottmann, K., Booth, P. J., and Paulsen, H. (2001) Effects of chlorophyll a, chlorophyll b, and xanthophylls on the in vitro assembly kinetics of the major light-harvesting chlorophyll a/b complex, LHCIIb1, *Journal of Molecular Biology* 308, 59-67.
124. Lee, R. F., Hagen, W., and Kattner, G. (2006) Lipid storage in marine zooplankton, *Marine Ecology Progress Series* 307, 273-306.
125. Reviers, B. d. (2002) *Biologie et phylogénie des algues*, (Belin, Ed.).
126. Hamre, K., Yúfera, M., Rønnestad, I., Boglione, C., Conceição, L. E. C., and Izquierdo, M. (2013) Fish larval nutrition and feed formulation: knowledge gaps and bottlenecks for advances in larval rearing, *Reviews in Aquaculture* 5, S26-S58.
127. van der Meer, Olsen, T., Hamre, R. E., Fyhn, K., and Jørgen, H. (2008) Biochemical composition of copepods for evaluation of feed quality in production of juvenile marine fish, *Aquaculture* 274, 375-397.
128. Perumal P, R. M., Santhanam P. (2009) Biochemical composition of wild copepods, *Acartia spinicauda* and *Oithona similis*, from Parangipettai coastal waters in relation to environmental parameters, *Journal of Environmental Biology* 30, 995-1005.
129. Moren, M., Opstad, I., and Hamre, K. (2004) A comparison of retinol, retinal and retinyl ester concentrations in larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) fed *Artemia* or zooplankton, *Aquaculture Nutrition* 10, 253-259.
130. Mio, H., Kano, J., and Saito, F. (2004) Scale-up method of planetary ball mill, *Chemical Engineering Science* 59, 5909-5916.
131. Gotor, F. J., Achimovicova, M., Real, C., and Balaz, P. (2013) Influence of the milling parameters on the mechanical work intensity in planetary mills, *Powder Technology* 233, 1-7.
132. Wall, Clemens Pohl, Alexander Knapp, Michael Hahn, Horst Fichtner, and Maximilian. (2014) Production of nanocrystalline lithium fluoride by planetary ball-milling, *Powder Technology* 264, 409-417.
133. Zhang, F. L., Zhu, M., and Wang, C. Y. (2008) Parameters optimization in the planetary ball milling of nanostructured tungsten carbide/cobalt powder, *International Journal of Refractory Metals and Hard Materials* 26, 329-333.
134. Brown, and Miller. (1992) The ascorbic acid content of eleven species of microalgae used in mariculture, *Journal of Applied Phycology* 4, 205-215.
135. Plañas. (1995) Enrichment in ascorbic acid of the rotifer *Brachionus plicatilis* O.F. Müller for the rearing of marine fish larvae, In *Proceedings of the Fifth Spanish Aquaculture Congress*, Barcelona.
136. Merchie, G. (1995) Evaluation of vitamin C-enriched *Artemia* nauplii for larvae of the giant freshwater prawn, *Aquaculture International* 3, 355-363.
137. Albreksten, Lie, and Sandnes. (1988) Ascorbyl palmitate as a dietary vitamin C source for rainbow trout (*Salmo gairdneri*), *Aquaculture* 71, 359-368.

138. Merchie, G., Lavens, P., Sorgeloos, P. (1997) Optimization of dietary vitamin C in fish and crustacean larvae: a review, *Aquaculture* 155, 165-181.
139. Merchie, G., Lavens, P., Storch, V., Übel, U., Nelis, H., De Leenheer, A., and Sorgeloos, P. (1996) Influence of dietary vitamin C dosage on turbot (*Scophthalmus maximus*) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) nursery stages, *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 114, 123-133.
140. Montero, D., Marrero, M., Izquierdo, M. S., Robaina, L., Vergara, J. M., and Tort, L. (1999) Effect of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles subjected to crowding stress, *Aquaculture* 171, 269-278.
141. Ibrahim, M. D., Fathi, M., Mesalhy, S., and Abd El-Aty, A. M. (2010) Effect of dietary supplementation of inulin and vitamin C on the growth, hematology, innate immunity, and resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), *Fish & Shellfish Immunology* 29, 241-246.
142. Monroig, O., Navarro, J. C., Amat, F., and Hontoria, F. (2007) Enrichment of *Artemia* nauplii in vitamin A, vitamin C and methionine using liposomes, *Aquaculture* 269, 504-513.
143. Srivastava, A., Stoss, J., and Hamre, K. (2011) A study on enrichment of the rotifer *Brachionus* "Cayman" with iodine and selected vitamins, *Aquaculture* 319, 430-438.
144. Srivastava, A., Stoss, J., and Hamre, K. (2011) A study on enrichment of the rotifer *Brachionus* "Cayman" with iodine and selected vitamins, *Aquaculture* 319, 430-438.
145. Jiménez-Fernández, E., Ruyra, A., Roher, N., Zuasti, E., Infante, C., and Fernández-Díaz, C. (2014) Nanoparticles as a novel delivery system for vitamin C administration in aquaculture, *Aquaculture* 432, 426-433.
146. Teijeiro-Osorio, D., Remuñán-López, C., and Alonso, M. J. (2009) Chitosan/cyclodextrin nanoparticles can efficiently transfect the airway epithelium in vitro, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 71, 257-263.
147. Jobling, and Malcolm. (2001) Nutrient Requirements and Feeding of Finfish for Aquaculture. C.D. Webster and C.E. Lim (editors), *Aquaculture International* 9, 367-368.
148. Gatlin, D. M., Barrows, F. T., Brown, P., Dabrowski, K., Gaylord, T. G., Hardy, R. W., Herman, E., Hu, G., Kroghdahl, Å., Nelson, R., Overturf, K., Rust, M., Sealey, W., Skonberg, D., J Souza, E., Stone, D., Wilson, R., and Wurtele, E. (2007) Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review, *Aquaculture Research* 38, 551-579.
149. Scott, J. M. (1981) The vitamin B12 requirement of the marine rotifer *Brachionus plicatilis*, *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 61, 983-994.
150. Maruyama, I., Nakamura, T., Matsubayashi, T., Ando, Y., and Maeda, T. (1988) Fatty acid composition of rotifers fed with *Chlorella* and yeast *Suisanzoshoku (in Japanese)* 36, 259-263.
151. Hayashi, M., Matsumoto, R., Yoshimatsu, T., Tanaka, S., and Shimizu, S. (2002) Isolation of highly DHA-accumulated *Labyrinthulales* and their utilization for nutritional enrichment of rotifers and *Artemia*, *Nippon Suisan Gakkaishi (in Japanese)* 68, 674-678.
152. Hayashi, M., Yukino, T., Watanabe, F., Miyamoto, E., and Nakano, Y. (2007) Effect of Vitamin B12-Enriched *Thraustochytrids* on the Population Growth of Rotifers, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 71, 222-225.
153. Mehdipour, N., Fallahi, M., Takami, G. A., Vossoughi, G., and Mashinchian, A. (2011) Freshwater green algae *Chlorella* sp. and *Scenedesmus obliquus* enriched with B group of vitamins can enhance fecundity of *Daphnia magna*, *Iranian Journal of Science and Technology Transaction a-Science* 35, 157-163.
154. Alves Ferreira, T., and Resgalla, C. (2014) Influence of diet on the cultivation of *Mysidopsis juniae* (Silva, 1979) (Crustacea: Misida) in laboratory, *Boletim do Instituto de Pesca* 40, 441-450.
155. Kirst, H. A., Mynderse, J. S., Martin, J. W., Baker, P. J., Paschal, J. W., Steiner, J. L. R., Lobkovsky, E., and Clardy, J. (1996) Structure of the spiroketal-macrolide ossamycin, *Journal of Antibiotics* 49, 162-167.

156. Naz, M. (2008) The changes in the biochemical compositions and enzymatic activities of rotifer (*Brachionus plicatilis*, Muller) and *Artemia* during the enrichment and starvation periods, *Fish Physiology Biochemistry* 34, 391-404.
157. Oie, G., and Olsen, Y. (1997) Protein and lipid content of the rotifer *Brachionus plicatilis* during variable growth and feeding condition, *Hydrobiologia* 358, 251-258.
158. Poulet S. A., W. R., Conway D. V. P., Videau C. (1991) Cooccurrence of copepods and dissolved free amino-acids in shelf sea waters, *Marine Biology* 108, 373-385.
159. Lindley, L. C., Phelps, R. P., Davis, D. A., and Cummins, K. A. (2011) Salinity acclimation and free amino acid enrichment of copepod nauplii for first-feeding of larval marine fish, *Aquaculture* 318, 402-406.
160. Drillet, G., Iversen, M. H., Sorensen, T. F., Ramlov, H., Lund, T., and Hansen, B. W. (2006) Effect of cold storage upon eggs of a calanoid copepod, *Acartia tonsa* (Dana) and their offspring, *Aquaculture* 254, 714-729.
161. Drillet, G., Jorgensen, N. O. G., Sorensen, T. F., Ramlov, H., and Hansen, B. W. (2006) Biochemical and technical observations supporting the use of copepods as live feed organisms in marine larviculture, *Aquaculture Research* 37, 756-772.
162. Chen, M. R., Liu, H. B., and Chen, B. Z. (2012) Effects of dietary essential fatty acids on reproduction rates of a subtropical calanoid copepod, *Acartia erythraea*, *Marine Ecology Progress Series* 455, 95-110.
163. Rigo, L. A., Frescura, V., Fiel, L., Coradini, K., Ourique, A. F., Emanuelli, T., Quatrin, A., Tedesco, S., Silva, C. B., Guterres, S. S., Pohlmann, A. R., and Beck, R. C. (2014) Influence of the type of vegetable oil on the drug release profile from lipid-core nanocapsules and in vivo genotoxicity study, *Pharmaceutical development and technology* 19, 789-798.
164. Rahali, Y., Saulnier, P., Benoit, J. P., and Bensouda, Y. (2010) Incorporating vegetal oils in parenteral nutrition using lipid nanocapsules, *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 20, 425-429.
165. Conley, R. T. (1966) *Infrared Spectroscopy*, Boston: Allyn and Bacon

ANNEXE 1

Diffusion dynamique de la lumière

Les nanocapsules lipidiques sont caractérisées après chaque synthèse en termes de taille (diamètre hydrodynamique moyen) et de charge de la surface (potentiel zêta). Pour ces mesures, la technique utilisée est la diffusion dynamique de la lumière. C'est une méthode spectroscopique non destructive permettant la mesure de la taille de particules en suspension. Le principe de la méthode est la diffusion de la lumière (laser) par les particules de l'échantillon. Le faisceau laser incident va les éclairer. Deux faisceaux principaux en seront issus : le faisceau transmis et le faisceau diffusé. Celui qui sera considéré par le détecteur sera le diffusé. Deux phénomènes peuvent être observés : i) Si le diamètre de la particule est supérieur à $\lambda/10$ (λ : longueur d'onde de faisceau) alors la lumière diffusée aura une intensité différente en fonction de la direction. On parle de diffusion anisotrope. ii) Si le diamètre de la particule est inférieur à $\lambda/10$, alors la lumière diffusée aura une intensité identique dans toutes les directions. On parle alors de diffusion isotrope. Cette condition correspond aux approximations de Raleigh-Debye et permet de simplifier la déduction des tailles. Puis, l'angle et l'intensité de la lumière diffusée sont mesurés dans le temps (les particules sont soumises au mouvement Brownien). La mesure obtenue en granulométrie laser correspond à la valeur du diamètre hydrodynamique. Celui-ci comprend à la fois la taille de la particule mais aussi l'épaisseur de la couche de solvatation. La relation de Stokes-Einstein entre la taille des particules et leurs mouvements dans une solution est :

$$D_h = \frac{k_B T}{3\pi\eta D_t}$$

Ici, D_h représente le diamètre hydrodynamique, k_B représente la constante de Boltzmann, T représente la température, et η représente la viscosité, D_t est le coefficient de diffusion transversal (qui est mesuré par diffusion dynamique de la lumière) ;

Le potentiel zêta représente la charge électrique que les particules acquièrent grâce aux ions qui l'entourent en solutions (charge de surface). C'est la mesure de l'intensité de la répulsion ou de l'attraction électrostatique ou électrique entre les particules. C'est l'un des paramètres fondamentaux connus pour affecter la stabilité.

ANNEXE 2

HPLC (Chromatographie en phase liquide à haute performance)

La chromatographie en phase liquide à haute performance est une technique qui permet la séparation ou la purification d'un ou de plusieurs composés d'un mélange en vue de leur identification et de leur quantification. Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). L'analyse s'effectue en injectant l'échantillon qui est poussé par un liquide (phase mobile) dans une colonne (phase stationnaire). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique.

La colonne est un tube construit dans un matériau inerte aux produits chimiques, souvent en inox ou en verre. Sa section est constante, de diamètre compris entre 4 et 20 mm. La colonne utilisée dans notre étude est de type C4 composé de silice greffée avec quatre atomes de carbone qui permet la séparation en interagissant avec la phase mobile.

La colonne ou phase normale est constituée de gel de silice. Ce matériau est très polaire. Il faut donc utiliser un éluant apolaire. Ainsi lors de l'injection d'une solution, les produits polaires sont retenus dans la colonne, contrairement aux produits apolaires qui sortent en tête. L'inconvénient d'une telle phase, c'est une détérioration rapide au cours du temps du gel de silice, ce qui entraîne un manque de reproductibilité des séparations.

Dans notre cas nous avons une phase inverse. La phase inverse est majoritairement composée de silice greffée par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbone (C8 et C18). Cette phase est apolaire et nécessite donc un éluant polaire (ACN, MeOH, H₂O). Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en premier. Contrairement à une phase normale, il n'y a pas d'évolution de la phase stationnaire au cours du temps, et la qualité de la séparation est donc maintenue constante.

Les silices greffées conduisent en général à une perte importante de polarité. Avec une phase greffée, l'ordre d'éluion est opposé à celui auquel on est habitué avec les phases normales. Ainsi avec un éluant polaire, un composé polaire migre plus vite

qu'un composé apolaire. Dans ces conditions les hydrocarbures sont fortement retenus. On réalise des gradients d'élution en diminuant au cours de la séparation la polarité de l'éluant (ex : mélange eau/acétonitrile dont la concentration en acétonitrile va en croissant au cours de l'élution).

A la sortie de la colonne une détection appropriée est effectuée et par la suite la caractérisation s'effectue en analysant les pics correspondants (chromatogramme).

Deux types de détecteurs sont classiquement utilisés :

*Détecteur UV-visible (celui que nous utilisons) : il mesure l'absorption de la lumière par le produit à la sortie de la colonne. La longueur d'onde est constante, ayant été fixée par l'opérateur. Une lampe Deutérium est utilisée pour des longueurs d'ondes variant de 190-350 nm et la lampe à vapeur de mercure est utilisée à la longueur d'onde non variable de 254 nm. Pour que ce type de détecteur soit utilisable, il faut que :

- le produit à détecter absorbe la lumière à une longueur d'onde accessible à l'appareil, et que son coefficient d'absorption ϵ soit suffisamment grand ;

- la phase mobile n'absorbe pas la lumière à la longueur d'onde choisie par l'opérateur.

* réfractomètre : il mesure la variation de l'indice de réfraction du liquide à la sortie de la colonne. Cette mesure, extrêmement précise, dépend néanmoins de la température du liquide. On compare cet indice avec celui de la phase mobile pure : il y a donc une référence d'où le terme de variation de l'indice. Ce détecteur exclut les variations de la composition de la phase mobile ; il n'est donc possible de travailler qu'en mode isocratique avec ce détecteur. Les données sont collectées par l'intermédiaire soit d'un intégrateur ou d'une station d'acquisition.

ANNEXE 3

Microscopie électronique en balayage (MEB)

Cette technique de microscopie électronique peut reproduire des images en haute résolution en utilisant les principes d'interactions électron-matière.

Le principe de la microscopie électronique en transmission a été proposé pour la première fois en Allemagne en 1935, par Knoll et von Ardenne. L'image MEB est une image reconstituée : une sonde, le faisceau d'électrons, balaye la surface de l'échantillon, un détecteur récupère de manière synchrone un signal induit par cette sonde pour en former une image, cartographie de l'intensité de ce signal. Le MEB est constitué d'une source d'électrons qu'un jeu de lentilles "condenseur" focalise sur un diaphragme. Une deuxième lentille "objectif" refocalise ce faisceau sur l'échantillon en un spot très fin (15 à 200 Å). Un jeu de bobines de déflexion permet de déplacer le faisceau et donc de balayer l'échantillon. Sous l'impact du faisceau d'électrons, il y a essentiellement :

- rétrodiffusion d'électrons du faisceau incident avec plus ou moins de perte d'énergie;
- émission d'électrons secondaires de faible énergie, provenant des couches externes des atomes de l'échantillon.
- émission de rayons X, concurrentiellement avec les électrons Auger;
- émission de photons UV-visible, - écoulement d'un courant vers la masse.

Tout ces signaux peuvent servir à former une image. Le détecteur de base du MEB (E.T. : Everhart-Thornley) récupère un mélange en proportion variable d'électrons secondaires et d'électrons rétrodiffusés, proportion dépendant de l'énergie primaire, de la distance échantillon- objectif, de l'angle d'incidence du faisceau primaire, du matériau observé. D'autres détecteurs permettent de discriminer les électrons secondaires des électrons rétrodiffusés. Le contraste (i.e. la variation locale de l'émission électronique) de l'image provient d'effets topographiques, chimiques et structuraux, régissant la rétrodiffusion et l'émission secondaire. Les aspects topographiques sont en général l'élément pris en compte en premier :

Le grandissement est déterminé par le rapport entre la surface balayée sur l'échantillon (un rectangle de dimension variant entre quelques mm et une fraction de micromètres de côté), et la dimension du document final sur l'écran d'observation. Plutôt que de

parler de grandissement, il peut être judicieux de parler de la taille du champs observé. L'image en électrons secondaires se caractérise par une très bonne définition, jusqu'à des grandissements compris entre $\times 20.000$ et $\times 50.000$ en conventionnel, jusqu'à >500.000 en haute résolution, avec des résolutions latérales limites de 10 à 200 Å, suivant l'échantillon, l'appareil et les paramètres d'observation. Un montage du détecteur dans la lentille objectif (dit "In Lens" ou "TTL") permet d'éliminer la plus grande part des rétrodiffusés, et d'obtenir une image mieux définie de la surface, particulièrement à basse énergie primaire. L'image en électrons rétrodiffusés a une résolution latérale au mieux de l'ordre de 0.1 μm . L'utilisation d'un détecteur spécialisé (à semi-conducteur ou à scintillateur) permet de faire ressortir un contraste qui est fonction du numéro atomique des éléments présents. Un élément lourd donnera un signal intense et donc une zone claire; un élément léger donnera un signal faible et donc une zone sombre, en quelque sorte une cartographie de numéro atomique. Ce mode de fonctionnement nécessite une surface plane pour minimiser le contraste dû au relief. Il est alors riche de possibilités, en particulier comme base pour une analyse d'image d'un échantillon de composition hétérogène. En revanche, l'identification des éléments présents nécessite l'utilisation d'une autre méthode, typiquement la microanalyse X.

ANNEXE 4

FTIR

La spectroscopie infrarouge (IR) utilise un faisceau de lumière infrarouge pour analyser la structure des composés organiques ou inorganiques. C'est une méthode d'analyse de matériaux qui nous permet d'obtenir un spectre comprenant des vibrations moléculaires.¹⁶⁵

La spectroscopie infrarouge exploite le fait que les molécules possèdent des fréquences spécifiques pour lesquelles elles tournent ou vibrent en correspondance avec des niveaux d'énergie discrets (modes vibratoires). Ces fréquences de résonance sont déterminées par la forme des surfaces d'énergie potentielle, les masses atomiques et par le couplage vibronique associé. Afin qu'un mode vibrationnel dans une molécule soit actif dans l'infrarouge, il doit être associé à des modifications du dipôle permanent.

Les molécules diatomiques n'ont qu'une seule liaison, qui peut être étirée. Les molécules les plus complexes ont beaucoup de liaisons, et les vibrations peuvent être conjuguées, ce qui conduit à des absorptions infrarouges à des fréquences caractéristiques qui peuvent être liées à des groupes chimiques. Ainsi par exemple, les atomes d'un groupe CH₂, que l'on trouve communément dans les composés organiques peut vibrer de six manières différentes : étirements (*stretching*) symétriques et antisymétriques, cisaillement (*scissoring*), bascule (*rocking*), agitation hors du plan (*wagging*) et torsion (*twisting*).

Le spectre infrarouge d'un échantillon est établi en faisant passer un faisceau de lumière infrarouge au travers de cet échantillon. L'examen de la lumière transmise indique la quantité d'énergie absorbée à chaque longueur d'onde. On peut le faire avec un faisceau monochromatique, avec une modification de la longueur d'onde dans le temps, ou en utilisant un instrument à transformée de Fourier afin de mesurer toutes les mesures d'onde simultanément. On peut alors produire les spectres en absorbance ou en transmittance, et indiquer les longueurs d'ondes d'absorption. L'analyse de ces caractéristiques indique des détails de la structure moléculaire de l'échantillon. Cette technique fonctionne quasiment exclusivement sur les échantillons présentant

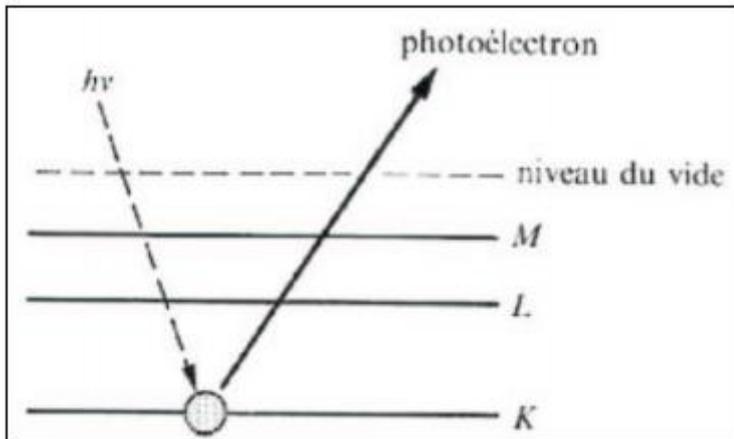
des liaisons covalentes. Des spectres simples sont obtenus à partir d'échantillons avec peu de liaisons actives dans l'infrarouge et avec de hauts degrés de pureté. Les structures moléculaires plus complexes conduisent à plus de bandes d'absorption et donc à des spectres plus complexes. Cette technique a cependant été utilisée pour la caractérisation de mélanges très complexes.

Lorsque la longueur d'onde (l'énergie) apportée par le faisceau lumineux est voisine de l'énergie de vibration de la molécule, cette dernière va absorber le rayonnement et on enregistrera une diminution de l'intensité réfléchié ou transmise. Le domaine infrarouge entre 4000 cm^{-1} et 400 cm^{-1} ($2.5 - 25\ \mu\text{m}$) correspond au domaine d'énergie de vibration des molécules. Toutes les vibrations ne donnent pas lieu à une absorption, cela va dépendre aussi de la géométrie de la molécule et en particulier de sa symétrie. Pour une géométrie donnée on peut déterminer les modes de vibration actifs en infrarouge grâce à la Théorie des Groupes. La position de ces bandes d'absorption va dépendre en particulier de la différence d'électronégativité des atomes et de leur masse. Par conséquent à un matériau de composition chimique et de structure donnée va correspondre un ensemble de bandes d'absorption caractéristiques permettant d'identifier le matériau. L'analyse s'effectue à l'aide d'un spectromètre à transformée de Fourier qui envoie sur l'échantillon un rayonnement infrarouge et mesure les longueurs d'onde auxquelles le matériau absorbe et les intensités de l'absorption.

ANNEXE 5

XPS

La spectroscopie des photoélectrons XPS (X-ray Photoélectron Spectroscopy) ou ESCA (Electron Spectroscopy for Chemical Analysis), exploite l'effet photoélectrique découvert par Einstein.



En absorbant un photon, un atome reçoit une quantité d'énergie $h\nu$. Il émet alors un électron, afin de retrouver son état de stabilité initial. L'électron ainsi éjecté a pris la totalité de l'énergie du photon incident, pour se libérer de l'atome et acquérir une énergie cinétique. En XPS, les photons incidents possèdent généralement une énergie de 1 à 2 keV. Source fréquemment utilisée, le magnésium émet, par exemple, un rayonnement $K\alpha$ de 1253.6 eV. L'énergie relativement élevée du rayonnement incident provoque l'émission d'un électron appartenant à couche intérieure de l'atome. La figure montre un photoélectron éjecté d'une couche K d'un atome isolé.

Avec XPS nous pouvons :

- Mesure des niveaux d'énergie
- Analyse de tous les éléments à partir du lithium
- Mesure du déplacement chimique de façon directe. Exemple de l'oxydation d'un métal: dédoublement de la raie du métal: métal élément + métal lié à l'oxygène + oxygène lié.

ANNEXE 6

Milieu CONWAY pour le maintien des algues

Solution Principale:

Quantité pour 10 litres (dans de l'eau distillée):

NaNO ₃	1000 g
NaH ₂ PO ₄	200 g
Na ₂ EDTA	450 g
H ₃ BO ₃	336 g
MnCl ₂	3.6 g
FeCl ₃	13 g
Solution aux sels	10mL

Solution aux sels:

Quantité pour 1 litre (dans de l'eau distillée):

ZnCl ₂	21 g
CoCl ₂ .6H ₂ O	20 g
CuSO ₄ , 5H ₂ O	20 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ , 4H ₂ O	9 g

Solution de vitamine :

Quantité pour 1 litre (dans de l'eau distillée autoclavée) :

thiamine HCl (vitamine B₁) 2 g

cyanocobalamin (vitamine B₁₂) 0,1 g

La solution se conserve dans le congélateur.

Préparation du milieu :

Le milieu doit être préparé de l'eau de mer autoclavée.

Quantité pour 1 litre d'eau de mer:

Solution Principale 1 mL

Solution 0.1 mL

ANNEXE 7



Lipid nanocapsules as a new delivery system in copepods: Toxicity studies and optical imaging



Stefka Stancheva^{a,b,c}, Anissa Souissi^b, Ali Ibrahim^{a,b}, Alexandre Barras^a, Corentin Spriet^d, Sami Souissi^{b,**}, Rabah Boukherroub^{a,*}

^a Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologie (IEMN), UMR CNRS 8520, Université Lille 1, Avenue Poincaré – BP 60069, 59652 Villeneuve d'Ascq, France

^b Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences, UMR CNRS 8187 LOG, Université Lille 1 Sciences et Technologies, Station Marine de Wimereux, 28 Avenue Foch, 62930 Wimereux, France

^c Plate-Forme d'Innovation Nouvelles Vagues, 15/17 Rue Magenta, 62200 Boulogne sur Mer, France

^d Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UGSF), Université Lille 1, CNRS UMR 8576, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 April 2015

Received in revised form 18 June 2015

Accepted 30 July 2015

Available online 3 August 2015

Keywords:

Lipid nanocapsules (LNCs)

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)

Encapsulation

Copepods

Acartia tonsa

Imaging

Toxicity

ABSTRACT

In this paper, we investigated the potential of lipid nanocapsules (LNCs) as a delivery system of small hydrophobic molecules, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) – pyrene, fluoranthene, phenanthrene, in the copepod *Acartia tonsa*. The LNCs were produced by a phase inversion process with a nominal size of 50 nm. These nanocapsules were obtained without organic solvent and with pharmaceutically acceptable excipients. The PAHs–LNCs displayed a stable monodisperse size distribution and a good stability in sea water for 7 days. By using fluorescent LNCs, it was possible to evidence LNCs ingestion by the copepods using confocal laser scanning microscopy. While blank LNCs are not toxic to copepods at tested concentrations, PAH–loaded LNCs were found to be very toxic on *A. tonsa* with a high mortality rate reaching 95% after 72 h exposure to 200 nM pyrene-loaded LNCs. On the other hand, when acetone is used to dissolve an equivalent concentration of PAHs in sea water, the copepod mortality is 10 times lower than using LNCs as nano-delivery system. This confirms the efficiency of using LNCs to deliver molecules directly in the gut or copepod carapace. The small size and non toxicity of these delivery nano-systems make them suitable for drug delivery to copepods.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1 Introduction

Copepods are dominant group of zooplankton species in aquatic ecosystems and they usually comprise between 30 and 80% of the organisms in the zooplankton population [1]. They are the main food for many different fish larvae and the changes of their population can affect the abundance of other species in the marine environment [2].

In the last decades, there has been a huge focus on the nutritional composition of copepod diet mainly composed by microalgae and its implication on egg production and hatching success [3–5]. These experiments were mostly focusing on the use of a single or a combination of microalgae species having different fatty acids com-

positions [6]. While these methods allowed to assess how nutrients affect the copepod population growth [7], these approaches are not straightforward compared to microparticulate diets. Consequently, it is important to explore new pathways of macromolecules delivery into the copepod gut and test their efficiency. This will improve our understanding of the effects of different molecules and their interaction with copepods. Moreover, copepods have great potential as live feed in aquaculture [8] and the emerging research programs in this field can use the same approach to improve copepod performances in intensive culturing systems.

Aquaculture has employed several methods from the manufacturing or pharmaceutical industries (i.e. nutrients or drug carriers) in order to enrich live prey items such as nutrient-enriched brine shrimp and rotifers. For example “*Artemia* enrichment” has been recognized, for the last decades, as an efficient strategy to improve their dietary value for their use as live prey for marine larvae [9]. Several systems using artificial particles have been investigated for delivery of molecular weight, water soluble nutrients, such as amino acids and vitamins. Among these systems, liposomes

* Corresponding author. Fax: +33 3 62 53 17 01.

** Corresponding author.

E-mail addresses: sami.souissi@univ-lille1.fr (S. Souissi), rabah.boukherroub@iemn.univ-lille1.fr (R. Boukherroub).

[10–13], lipid-emulsion-based formulations [14,15] and wax spray beads [16–20] have been successfully applied to improve the nutritional value of *Artemia*. Hontoria et al. demonstrated that extruded unilamellar liposomes with a good stability in sea water can be used as carriers of nutrients [21]. It was found that *Artemia* nauplii showed maximum ingestion and accumulation inside the digestive tract of the radioactive and fluorescent markers after 30 h incubation in the liposome suspension [21]. Tonheim et al. showed that *Artemia* nauplii can successfully be enriched with free methionine through encapsulation in liposomes, made from pure egg yolk phosphatidylcholine (PC) (>99% PC) and cholesterol [10].

While there has been a huge focus in developing delivery systems of different molecules to *Artemia* and rotifers, there has been only one example using liposomes as delivery system of bioactive molecules or toxicants in marine copepods [22]. Buttino et al. used giant liposomes (7 μm in diameter) to encapsulate a hydrophilic and high molecular mass fluorescent compound, fluorescein isothiocyanate-dextran. The fluorescence properties of the encapsulated molecule were used to provide an evidence of copepod ingestion of the liposomes. Furthermore, they found that liposomes alone did not add any nutrient value to the diet, and did not decrease uptake of nutrients by displacement, making these delivery systems suitable for studying several aspects related to nutritional and ecotoxicological aspects of the copepods [22].

The aim of the present work is to assess the potential use of lipid nanocapsules (LNCs) as a nano-delivery system of small hydrophobic molecules into copepods. LNCs belong to the generation of stealth colloidal carriers [23]. These nanocapsules are obtained without organic solvents and with pharmaceutically acceptable excipients. Such nanocapsules present a stable monodisperse size distribution and their mean diameter can be well-controlled in the range of 20–95 nm [24]. They are made up of an oily liquid triglyceride core surrounded by a hydrophilic surfactant, solutol[®] HS15, which exposes a medium PEG chain containing an average of 15 ethyleneglycol units conferring long-circulating properties and inhibiting the P-glycoprotein efflux pump (P-gp) [25,26]. The LNCs investigated in this work were produced by a phase inversion process with a nominal size of 50 nm. Such nanocapsules present a stable monodisperse size distribution and are very stable in sea water. In a proof of principle, we investigated the effect of toxic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) encapsulated in the LNCs on the copepods' survival. PAHs are persistent planar molecules of two or more aromatic rings and common in aquatic ecosystems [27]. The main sources of PAHs are the industry, petroleum spillage and refining, and combustion of fossil fuels [28]. PAHs formulation was achieved by mixing with excipients at optimized concentrations using the phase inversion method as described above [23].

We selected the calanoid copepod *Acartia tonsa* a recognized organism model for the evaluation of acute lethal toxicity of marine contaminants [29], and an emerging model in aquaculture [8]. While LNCs alone were not toxic to copepods, LNCs loaded with PAHs were toxic to copepods in a concentration-dependent way. Furthermore, by using fluorescent LNCs, it was possible to image directly the LNCs inside the copepods, as a direct proof of LNCs ingestion by the copepods. This approach holds promise for potential use of LNCs as a delivery system of various bioactive molecules.

2. Experimental

2.1. Materials

Acetone, sodium chloride (NaCl), pyrene (Pyr, 99%), phenanthrene (Phen, 98%), fluoranthene (Flt, 98%) and 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI, 97%) were purchased from Sigma–Aldrich. Labrafac[™] Lipophile WL 1349

(caprylic/capric triglyceride), Phospholipon[®] 90G (soybean lecithin at 97.1% of phosphatidylcholine), and Solutol[®] HS15 (a mixture of free polyethylene glycol 660 and polyethylene glycol 660 hydroxystearate) were generously provided by Gattefosse S.A.S. (Saint-Priest, France), Phospholipid GmbH (Köln, Germany), and Laserson (Etampes, France), respectively. Deionized water was obtained from a Milli-Q plus system (Millipore, Paris, France).

2.2. Preparation of lipid nanocapsules (LNCs) and PAH-loaded LNCs

LNCs were formulated at a nominal size of 50 nm using a phase inversion method of an oil/water system, as described by Heurtault et al. [23]. Briefly, the oil phase was mixed with solutol, phospholipon, NaCl and distilled water using the ratio shown in Table S1 (see multimedia component 1), and heated under magnetic stirring up to 85 °C. The mixture was subjected to 3 temperature cycles, cooling and warming the system from 60 to 90 °C under magnetic stirring. Then it was cooled to 78 °C and 3.3 mL of distilled cold water (0 °C) were added. The resulting suspension was stirred at room temperature for another 10 min before further use. This method offered a good control over the nanocapsules' size (50 nm) with monodisperse size characteristics (PI < 0.1). The resulting nanocapsules were characterized in terms of size, charge and PAH loading (see Supplementary information, Table S3).

For the formulation of PAH-loaded LNCs, the organic pollutant (pyrene, phenanthrene or fluoranthene) was first solubilized in labrafac. Solutol, phospholipon, NaCl and water were then added to this solution, and the LNCs were produced as described above. The concentration of PAHs was 3% of the total mass of the oily core (labrafac + phospholipon).

For optical imaging, a fluorescent dye (DiI) was mixed with labrafac at a concentration of 0.1 wt.% and the formulation was achieved as described above.

2.3. PAH loading and encapsulation efficiency

The PAH loading was directly determined by reversed phase-high performance liquid chromatography (RP-HPLC). RP-HPLC analysis was realized on a Shimadzu LC2010-HT (Shimadzu, Tokyo, Japan). A 5 μm C₄ QS Uptisphere[®] 300 Å, 250 × 4.6 mm column (Interchim, Montluçon, France) was used as the analytical column. The column was heated to 40 °C. The mobile phase was a mixture of eluent A (trifluoroacetic acid 0.05% in H₂O) and eluent B (trifluoroacetic acid 0.05% in CH₃CN) at a flow rate of 1 mL/min. The linear gradient was 0–80% of eluent B in 30 min and detection was performed at 254 nm for pyrene and 215 nm for phenanthrene and fluoranthene. A 0.01 M stock solution of PAH was prepared in acetonitrile for the calibration curve. Concentrations of 10–200 μM of PAH in acetonitrile were prepared from this stock. Each sample was injected (40 μL) into the RP-HPLC column. Calibration curves were obtained by linear regression of PAH concentration (μM) versus the peak area (see Supplementary information, Table S2).

For the determination of PAHs encapsulation rates, the LNCs were separated from supernatant using disposable PD-10 desalting columns (Sephadex[®] G-25 for gel filtration as stationary phase, Amersham Biosciences). The column was stabilized with 25 mL of distilled water. Then 1 mL of the LNCs suspension was deposited on the column and 1.5 mL of water were added to fill in the dead volume of the column. Finally, the LNCs were collected with 4 mL of distilled water as eluent. We measured PAHs concentrations by RP-HPLC before and after filtration to determine the encapsulation efficiency (EE) using the Eq. (1).

$$EE(\%) = \frac{[PAH]_{LNC}}{[PAH]_{TOTAL}} \times 4 \times 100\% \quad (1)$$

where $[\text{PAH}]_{\text{LNC}}$: amount of PAH loaded in the LNC; $[\text{PAH}]_{\text{TOTAL}}$: total theoretical PAH amount in LNC suspension; dilution factor of gel filtration = 4.

2.4. Particle size and zeta potential

LNCs were characterized in terms of size and charge. The average diameter and polydispersity index (PI) were determined by dynamic light scattering using a Zetasizer[®] Nano ZS (Malvern Instruments S.A., Worcestershire, UK). The zeta potential was measured using the electrophoretic mode with the Zetasizer[®]. All the batches were diluted at 1/100 (*v/v*) in distilled water (filtered over 0.22 μm) prior to the analysis and the experiments were performed in triplicate.

2.5. PAH leakage and stability in sea water

The PAH leakage and stability experiments were performed by placing filtered LNCs (0.4 mg/mL) in sea water at 20 °C, salinity 32–35. The characterization was performed 2 days after the synthesis of LNCs. All the samples have been evaluated for their content of PAHs and also for changes in physical appearance. After gel filtration, the amount of PAHs was determined by RP-HPLC similar to the encapsulation efficiency as described above. For the physical stability, we measured the mean diameter and polydispersity index by dynamic light scattering (DLS). All measurements were performed in triplicate.

2.6. Copepods and toxicity tests

The *A. tonsa* used in the present study was obtained (as eggs) from Roskilde University (strain code DFH-ATI) [30] and then cultured continuously in the Marine Station of Wimereux, France in different volumes (2–20 L) using the standard techniques of copepod culture [31]. In addition to the copepod strains maintained in 2 L beakers in an incubator (SANYO, MLR-351H) with constant temperature of 18 °C and a photoperiod of 12:12, a stock culture was realised in 20 L Nalgene bottle with continuous low aeration. The sea water used was prepared artificially using salt “Instant Ocean” of Aquarium Systems, ref. 05120815 and osmose water, and was filtered with 22 μm filter. The salinity of the water was around 33. Copepods were fed daily with the microalgae *Isochrysis galbana* provided from the strain maintained in the Marine Station of Wimereux [32]. Prior to all experiments, female and male adult copepods obtained from the stock culture were acclimated for 48 h in an incubator at 18 °C under cool white fluorescent lighting (12 h light: 12 h dark), the illuminance settings were set on 3, which corresponds to 5000 Lx luminance. Just before the experiment, nauplii were removed. Each treatment consisted of 3 replicates of 100 copepods. Copepod survival was recorded daily during 3 days. PAH concentrations investigated in this work were chosen from ref. [31]. We have utilized 3% PAHs-loaded LNCs as this is the highest stable concentration that can be achieved using LNC formulation. We have performed two different controls: one with empty lipid nanocapsules (blank LNCs, concentration 10 mg/L and 100 mg/L) and the other without LNCs. The number of dead copepods was counted every 24 h and the dead copepods were removed. All the copepods were fed once per day, with $\sim 2.5 \times 10^6$ cells L^{-1} of the algae.

Finally, a last set of experiments was realized in order to compare the patterns of copepod survival rate when PAHs were either introduced through LNCs or by using acetone as dissolvent. The experiments used the same protocol explained above and were performed without and with food, the exposure lasted 72 h.

2.7. Copepod egg production

The tests of reproduction were made by placing 3 replicates of 10 copepods per treatment in 100 mL per beaker. Then they were placed in the incubator for 24 h and the number of eggs was counted. All the copepods were fed once with $\sim 2.5 \times 10^6$ cells L^{-1} of algae. Similarly, we have performed the hatching tests using free PAHs dissolved in acetone (0.1 mL/L).

2.8. Confocal microscopy imaging and analysis

LNCs formulation containing lipophilic tracer DiI (λ_{ex} : 540–580 nm; λ_{em} : 560–603 nm) and pyrene were used for optical imaging. The copepods were fixed by adding ethanol, washed copiously with ethanol and observed under A1 Nikon confocal microscope with 20X objective (NA=0.75). Auto fluorescence was acquired in the blue channel with λ_{ex} : 404 nm and λ_{em} : 425–475 nm. DiI was acquired in the red channel with λ_{ex} : 561 nm and λ_{em} : 570–620 nm. For the second channel, PMT gain and offset, and laser power were adjusted on copepods without nanoparticles to record the autofluorescence background close to zero. The exact same setting was applied on all acquisitions to ensure that the red signal inside the copepod corresponds to nanoparticles. 3D reconstructions were obtained using the NIS software while intensity measurements were performed using imageJ [33].

2.9. Statistical analyses

Statistical analyses were conducted using KaleidaGraph. Differences in egg production rates and survival were tested by one-factor analysis of variance (ANOVA). The LC 50 values with 95% confidence limits were calculated using the method of Probits [34].

3. Results and discussion

The lipid nanocapsules (LNCs) investigated in this work were prepared at the nominal size of 50 nm by a phase inversion process using pharmaceutically acceptable excipients (Table S3, Supplementary information) [35–38]. This method offers a good control over the nanocapsules' size (46–53 nm) with monodisperse size characteristics (PI < 0.1). Dynamic light scattering (DLS) measurements indicate that the empty LNCs are highly stable in water and buffered solutions (for at least 18 months at 4 °C) [23] and display a negative zeta potential of -5.36 mV (Table S3, Supplementary information). PAHs were entrapped in the LNCs with high encapsulation efficiency (>95%), favored by the poor solubility of PAHs in water. Moreover, PAH stability was confirmed through the heat cycles required to produce PAHs-loaded LNCs with 95% remaining intact at the end of the cycling process. The physicochemical properties of PAH-loaded LNCs are comparable to those of the blank LNCs, and the presence of the PAH did not have a significant effect on the mean diameter and polydispersity index. Similarly, the zeta potential values of PAHs-loaded LNCs are comparable to those of blank LNCs, except for the LNCs loaded with fluoranthrene which showed a slight decrease of the zeta potential to -1.4 mV.

To assess the potential of LNCs as a delivery system in copepods, the carrier has to fulfill the following requirements: (i) stability in sea water, (ii) low toxicity to copepods over a wide range of concentrations, and (iii) easily digested by the copepods.

The stability of the nanocapsules was investigated in sea water (salinity = 33) as a function of time. DLS measurements indicated that the PAH-loaded LNCs had a good stability for more than 5 days at room temperature without any apparent change in the particle's size (data not shown).

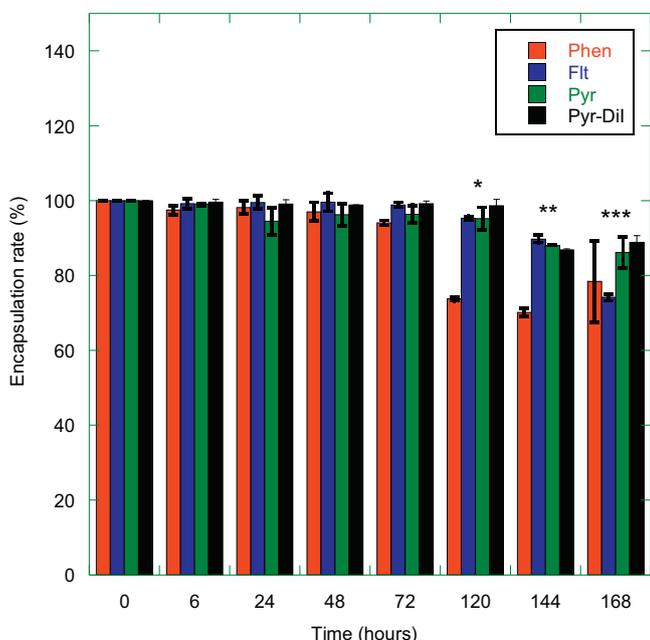


Fig. 1. PAHs leakage rates of 3% PAHs-loaded LNCs (0.4 mg/mL) as a function of time in sea water. Error bars represent the standard deviation for each treatment ($n = 3$). *Significant differences at $p < 0.05$. **Significant difference at $p < 0.01$. ***Significant difference at $p < 0.001$.

We have next investigated the stability of the PAHs-LNCs in sea water. Indeed, PAH leakage or leaching in the sea water is not desired for designing efficient delivery systems. We have prepared 2 stock solutions of LNCs (0.4 mg/mL) with the three PAHs (pyrene, fluoranthene and phenanthrene) in sea water. Before injection in HPLC, 2 mL of each solution was purified by gel filtration so that all the molecules outside of the particles are removed. The concentration was measured at $t = 0$ h, after 6 h and then every 24 h for a period of 7 days. Fig. 1 depicts PAH leakage from PAHs-LNCs over a period of 7 days in sea water at room temperature. PAH-loaded LNCs are stable up to 72 h without any apparent PAH leakage. The LNCs loaded with pyrene is the most stable formulation in sea water with a leakage rate lower than 20% after 168 h, while LNCs loaded with fluoranthene and phenanthrene showed a leakage rate of about 30% after 168 h and 120 h, respectively.

Furthermore, the direct impact of LNCs on the copepod survival was examined through exposure to blank nanocapsules (10 and 100 mg/L) for 72 h in sea water (Fig. 2). After this period, copepods survival was estimated to be more than 90% for both LNC concentrations. Similar results were obtained in a control experiment (in the absence of LNCs). The mortality was less than 10% for the 3 tests for 48 h which validate the requirements of the OECD acute Daphnia tests. During the first 24 h, the differences between treatments are below 3% which is very low (Fig. 2). The results clearly indicate that blank LNCs do not induce any acute toxic effects on *A. tonsa*, suggesting that LNCs represent a good candidate as inert carrier or delivery system.

Another important and relevant aspect to be considered to design effective nanoparticulate delivery systems is the ability of the copepods to digest the particles. We have used confocal laser scanning microscopy (CLSM) and fluorescent LNCs to image the copepods before and after exposure to LNCs (Fig. 3). CLSM image of *A. tonsa* before exposure to LNCs shows mainly auto-fluorescence due to the chitinous cuticle, mainly in the blue channel. The internal part of the copepod shows a really low autofluorescence background in the red channel (intensity = 135 ± 49 gray levels) (Fig. 3a). The same settings were used after incubation of *A. tonsa* with fluo-

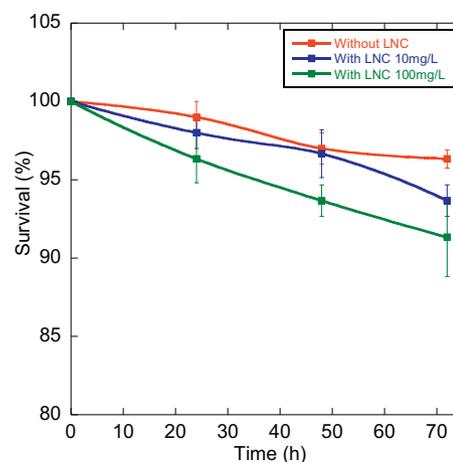


Fig. 2. *Acartia tonsa* survival following exposure to blank LNCs as a function of time. Error bars represent the standard deviation for each treatment ($n = 3$). No significant differences at $p < 0.05$.

rescent LNCs for 24 h; the nanoparticles are clearly visible (intensity 1480 ± 550 gray levels) in the whole gut of the copepod (Fig. 3b–d), confirming that the LNCs are ingested by the copepods. There was no evidence for the presence of LNCs on copepod cuticle under our experimental conditions.

Following the encouraging results obtained from the stability tests and ingestion experiments, the challenge is now to demonstrate the ability of the LNCs loaded with hydrophobic molecules to deliver these molecules into the copepods. To fulfill this goal, we have encapsulated three different polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): pyrene (Pyr), phenanthrene (Phen) [24] and fluoranthene (Flt) in the nanocapsules at a nominal size of 50 nm (Fig. 4). We have tested the toxicity of the PAHs-loaded LNCs on *A. tonsa*. PAH concentrations investigated in this work were chosen on the basis of the results reported in Ref. [31]. Fig. 4 depicts *A. tonsa* survival following exposure to LNCs loaded with pyrene at different concentrations as a function of time. The results showed a significant decrease of copepod survival over time with $95 \pm 3\%$ mortality after 72 h exposure to Pyr-loaded LNCs at a pyrene concentration of 200 nM. The lowest concentration of pyrene tested (12.5 nM) caused $4 \pm 2\%$ mortality after 24 h exposure, which increased to $32 \pm 4\%$ after 72 h. These values are much higher than the $9 \pm 1\%$ mortality recorded for blank LNCs, suggesting a high uptake of Pyr-loaded LNCs by the copepods.

The calculated values for LC50 with 95% confidence limits for 72 h is 66.25 ± 3.03 nM (491.38 ± 17.74 nM for 24 h and 159.92 ± 5.15 nM for 48 h).

Similarly, phenanthrene- and fluoranthene-loaded LNCs at a concentration of 50 nM (concentration lower than LC50 for 72 h) caused $53 \pm 3\%$ mortality after 72 h exposure to the nanocapsules (Fig. 5). Since the copepod survival after 72 h is comparable for the investigated PAHs, we did not examine systematically the concentration dependence for phenanthrene- and fluoranthene-loaded LNCs. It has to be noted that the mortality is more important for the PAHs investigated, as compared to the results reported by Bellas et Thor using free PAHs [31].

To evidence the high toxicity of PAHs encapsulated in lipid nanocapsules on the copepods, we have performed toxicity tests using free pyrene dissolved in 0.1 mL/L acetone – solvent concentration allowed in an OECD 202 toxicity test. Control and acetone control were run for each set of experiments. In these tests, the copepods were either fed or not before and during the experiments (Fig. 6). From these results, two important conclusions can be drawn: (i) at a same concentration, pyrene encapsulated in LNCs was more toxic to copepods causing 100% mortality after 72 h expo-

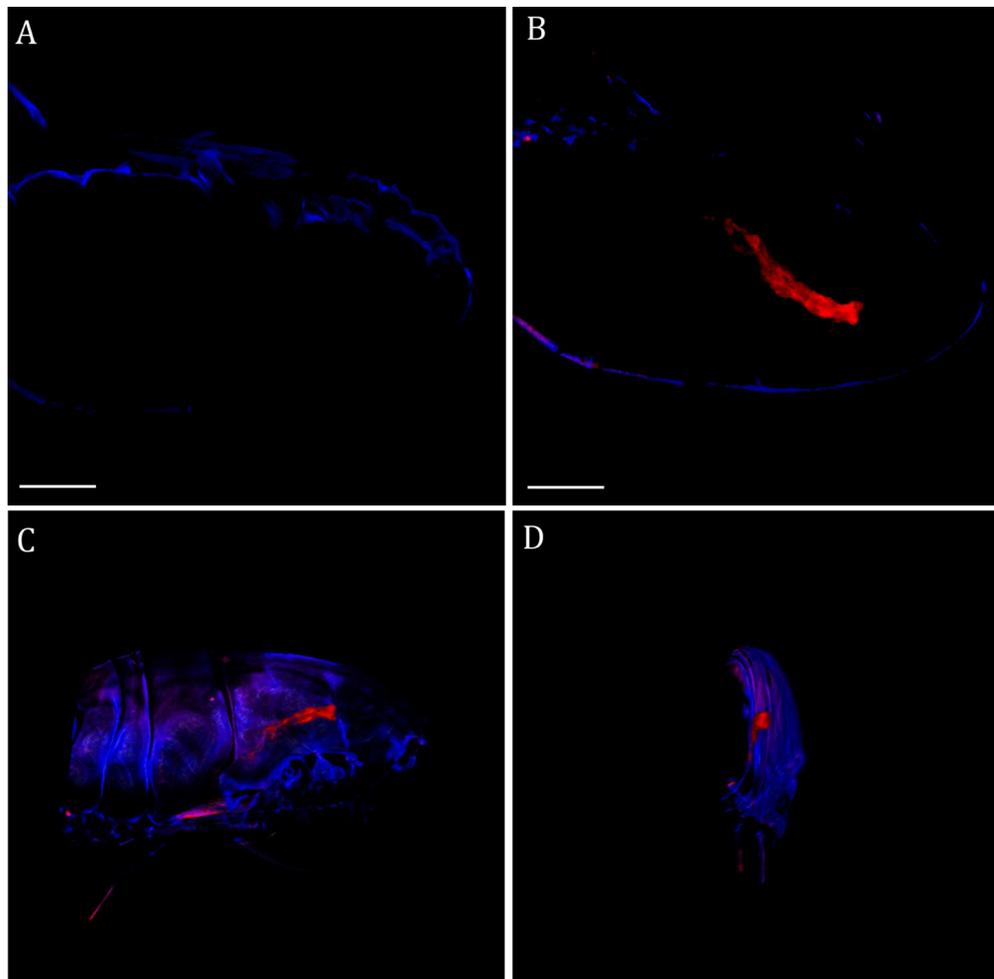


Fig. 3. Representative CLSM images of *Acartia tonsa* before (A) and after exposure to fluorescent LNCs for 24 h (B–D); the blue channel corresponds to autofluorescence, while the red channel corresponds to tagged nanoparticles. A and B are representative planes of 3D acquisitions, while C and D are 3D reconstructions of B condition in lateral and front views (see Supplementary video for complete reconstruction). A, B: Scale bar 100 μm ; C, D voxel size $0.81 \times 0.81 \times 1.5 \mu\text{m}$. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

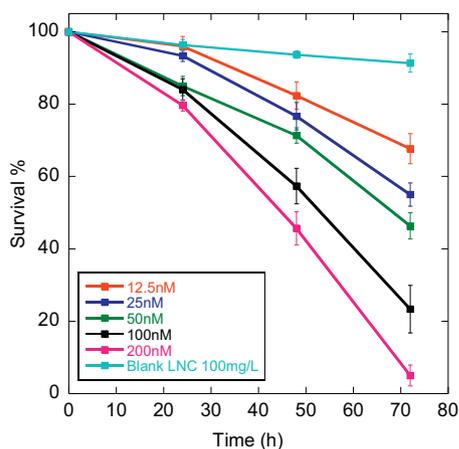


Fig. 4. *Acartia tonsa* survival following exposure to Pyr-LNCs at different concentrations as a function of time. Error bars represent the standard deviation for each treatment ($n = 3$).

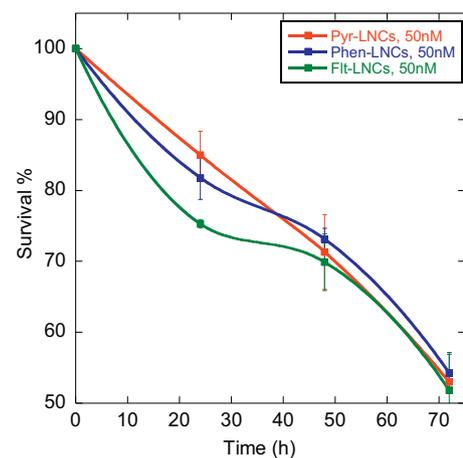


Fig. 5. *Acartia tonsa* survival as a function of time following exposure to pyrene-, phenanthrene- and fluoranthene-loaded LNCs at a PAH concentration of 50 nM. Error bars represent the standard deviation for each treatment ($n = 3$). No significant differences at $p < 0.05$.

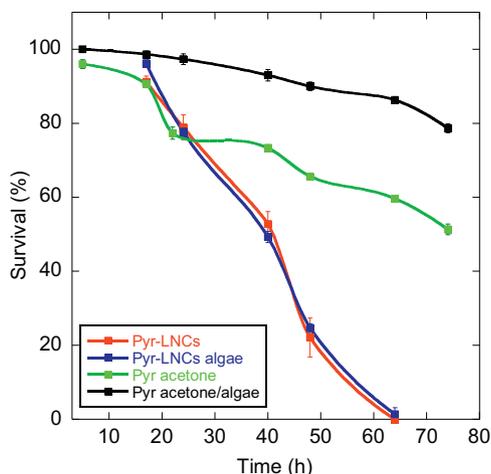


Fig. 6. *Acartia tonsa* survival as a function of time following exposure to pyrene-loaded LNCs and free pyrene dissolved in acetone at pyrene concentration of 50 nM. The copepods were either daily fed with algae (black and blue curves) or not (green and red curves). Error bars represent the standard deviation for each treatment ($n=3$). No significant differences at $p < 0.05$. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

sure, as compared to 50% mortality for free pyrene, (ii) feeding the copepods before and during the experiment retarded their mortality for free pyrene (11% mortality), while no effect was observed for Pyr-LNCs. These observations clearly indicate that PAHs encapsulated in LNCs are ingested much easily as compared to free PAHs, in accordance with the optical imaging results. This is a good indication that LNCs are suitable systems for encapsulation/delivery of hydrophobic molecules to copepods.

In addition to mortality rate, the most often used end-point in ecotoxicology, egg production rate can be also considered as another sensitive end-point that could significantly affect the recruitment rate of copepods in the field [39]. The egg production rate has high relevance because it represents a number of metabolic processes [40]. The experiments were conducted using 3 replicates of 10 females exposed to PAH-loaded LNCs at PAH concentration of 10 nM for 24 h (Fig. 7A). We have performed 2 controls – a reference where only copepods in sea water were

used and a control where copepods exposed to blank LNCs were used. *A. tonsa* females exposed to PAH-loaded LNCs showed significantly lower egg production rates than controls after 24 h exposure. PAH-loaded LNCs caused a reduction in egg production rates from 18.5 to 2.6 eggs/female/day on average.

Furthermore, we have examined the effects of free PAHs on the egg production rate at a PAH concentration of 10 nM (Fig. 7B). In these experiments, the PAH was dissolved in acetone. The results revealed that exposure of *A. tonsa* females to free PAHs induced a decrease of egg production rate from 15.2 (acetone control) to 9.9 eggs/female/day for the different PAHs. The results clearly showed the efficiency of PAH encapsulation in lipid nanocapsules as compared to free PAH molecules.

In summary, we have demonstrated that lipid nanocapsules can successfully be used as delivery systems of various hydrophobic molecules to copepods. The LNCs are easily prepared using a phase inversion process. They are made up of an oily liquid triglyceride core surrounded by a hydrophilic surfactant, soluto[®] HS15. These LNCs are stable in sea water for several days without any apparent degradation and are not toxic to copepods. LNCs ingestion by *A. tonsa* was evidenced by confocal laser scanning microscopy imaging. In a proof of principle, we have encapsulated PAHs molecules in the LNCs and examined their toxicity on *A. tonsa* copepods. The high mortality of copepods upon exposure the LNCs loaded with pyrene, fluoranthene and phenanthrene is a good indication of PAH release inside the copepods. The results reported here pave the way for studies that have been hindered previously by the low solubility of molecules in water such as drugs. Furthermore, the low toxicity of LNCs makes these delivery systems suitable for studying several aspects related to nutritional and ecotoxicological aspects of the copepods.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge financial support from PFI Nouvelles Vagues, Boulogne-sur-Mer, the Centre National de Recherche Scientifique (CNRS), the Université Lille1 and the Nord Pas de Calais region. We thank B.W. Hansen (Roskilde University, Denmark) for providing the initial starter of copepod culture. We are grateful to all past and present members of Sami Souissi's team for their contribution to maintain and improve the collection of copepod cultures during more than 10 years in the Marine Station of Wimereux, France.

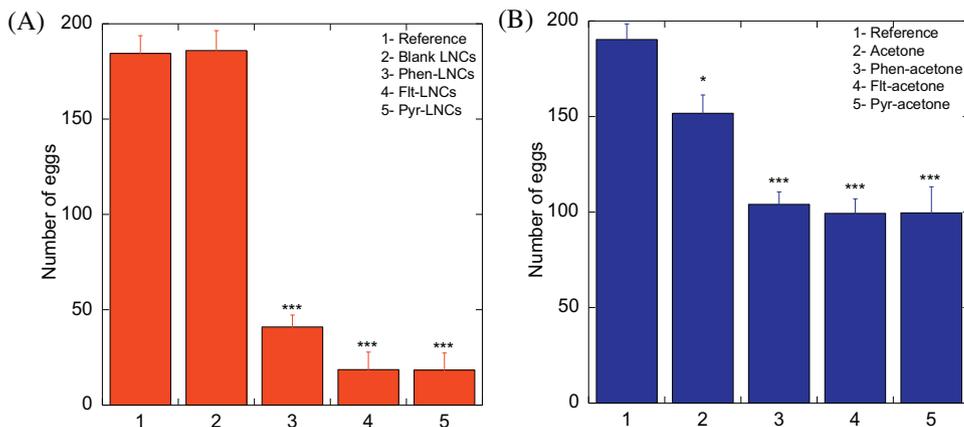


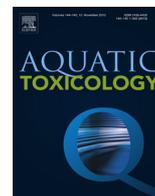
Fig. 7. (A) *Acartia tonsa* egg production rate following exposure to blank LNCs (100 mg/L) and phenanthrene-, fluoranthene- and pyrene-loaded LNCs at PAH concentration of 10 nM for 24 h. Error bars represent the standard deviation for each treatment ($n=3$). (B) *Acartia tonsa* egg production rate following exposure to acetone (0.1 mg/mL) and phenanthrene, fluoranthene and pyrene dissolved in acetone at PAH concentration of 10 nM for 24 h. Error bars represent the standard deviation for each treatment ($n=3$). *Significant difference at $p < 0.05$. ***Significant difference at $p < 0.001$.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.07.082>

References

- [1] A.R. Longhurst, *Prog. Oceanogr.* 15 (1985) 1.
- [2] G. Beaugrand, K.M. Brander, J.A. Lindley, S. Souissi, P.C. Reid, *Nature* 426 (2003) 661.
- [3] G.S. Kleppel, C.A. Burkart, L. Houchin, *Limnol. Oceanogr.* 43 (1998) 1000.
- [4] S.H. Jonasdottir, T. Kiorboe, *Mar. Biol.* 125 (1996) 743.
- [5] K. Hamre, M. Yufera, I. Rønnestad, C. Boglione, L.E.C. Conceicao, M. Izquierdo, *Rev. Aquacult.* 5 (2013) S26.
- [6] S.H. Jonasdottir, A.W. Visser, C. Jespersen, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 382 (2009) 139.
- [7] S. Pan, A. Souissi, C.-H. Wu, S.-H. Cheng, J.-S. Hwang, *Aquacult. Res.* 45 (2014) 1659, <http://dx.doi.org/10.1111/are.12113>
- [8] G. Drillet, S. Frouël, M.H. Sichlau, P.M. Jepsen, J.K. Højgaard, A.K. Joarder, B.W. Hansen, *Aquaculture* 315 (2011) 155.
- [9] T. Watanabe, T. Ohta, C. Kitajima, S. Fujita, *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish* 48 (1982) 1775.
- [10] S.K. Tonheim, W. Koven, I. Rønnestad, *Aquaculture* 190 (2000) 223.
- [11] O. Monroig, J.C. Navarro, F. Amat, P. Gonzalez, A. Bermejo, F. Hontoria, *Aquaculture* 251 (2006) 491.
- [12] O. Monroig, J.C. Navarro, F. Amat, P. Gonzalez, A. Bermejo, F. Hontoria, *Aquaculture* 266 (2007) 200.
- [13] O. Monroig, J.C. Navarro, F. Amat, F. Hontoria, *Aquaculture* 269 (2007) 504.
- [14] L.A. McEvoy, J.C. Navarro, F. Hontoria, F. Amat, J.R. Sargent, *Aquaculture* 144 (1996) 339.
- [15] Ø. Lie, H. Haaland, G.-I. Hemre, A. Maage, E. Lied, G. Rosenlund, K. Sandnes, Y. Olsen, *Aquacult. Int.* 5 (1997) 427.
- [16] M.A. Buchal, C.J. Langdon, *Aquacult. Nutr.* 4 (1998) 263.
- [17] U. Onal, C. Langdon, *Aquaculture* 233 (2004) 477.
- [18] U. Onal, C. Langdon, *Aquaculture* 233 (2004) 495.
- [19] A. Nordgreen, K. Hamre, C. Langdon, *Aquaculture* 273 (2007) 614.
- [20] C. Langdon, A. Nordgreen, M. Hawkyard, K. Hamre, *Aquaculture* 284 (2008) 151.
- [21] F. Hontoria, J.H. Crowe, L.M. Crowe, F. Amata, *Aquaculture* 127 (1994) 255.
- [22] I. Buttino, G. De Rosa, Y. Carotenuto, A. Ianora, A. Fontana, F. Quaglia, M. Immacolata La Rotonda, A. Miralto, *J. Exp. Biol.* 209 (2006) 801.
- [23] B. Heurtault, P. Saulnier, B. Pech, J.E. Proust, J.-P. Benoit, *Pharm. Res.* 19 (2002) 875.
- [24] B. Heurtault, P. Saulnier, B. Pech, M.C. Venier-Julienne, J.E. Proust, R. Phan-Tan-Luu, J.-P. Benoit, *Eur. J. Pharm. Sci.* 18 (2003) 55.
- [25] E. Garcion, A. Lamprecht, B. Heurtault, A. Paillard, A. Aubert-Pouessel, B. Denizot, P. Menei, J.-P. Benoit, *Mol. Cancer Ther.* 5 (2006) 1710.
- [26] A. Lamprecht, J.-P. Benoit, *J. Control. Release* 112 (2006) 208.
- [27] M.J. Kennish, *Ecology of : Anthropogenic Effects Estuaries*, CRC, Boca Raton, 1992.
- [28] C.H. Walker, S.P. Hopkin, R.M. Sibly, D.B. Peakall, *Principles of Ecotoxicology*, 2nd ed., Taylor & Francis, London, 2001.
- [29] G. Gorbi, M. Invidia, F. Savorelli, O. Faraponova, E. Giacco, M. Cigar, I. Buttino, T. Leoni, E. Prato, I. Lacchetti, S. Sei, *Environ. Toxicol. Chem.* 31 (2012) 2023.
- [30] J.G. Støttrup, K. Richardson, E. Kirkegaard, N.J. Pihl, *Aquaculture* 52 (1986) 87.
- [31] J. Bellas, P. Thor, *Ecotoxicology* 16 (2007) 465.
- [32] I. Sadovskaya, A. Souissi, S. Souissi, T. Grard, P. Lencel, C.M. Greene, S. Duin, P.S. Dmitrenok, A.O. Chizhov, A.S. Shashkov, A.I. Usov, *Carbohydr. Polym.* 111 (2014) 139.
- [33] C.A. Schneider, W.S. Rasband, K.W. Eliceiri, *Nat. Methods* 9 (2012) 671.
- [34] C.I. Bliss, *Science* 79 (1934) 38.
- [35] A. Barras, L. Boussekey, E. Courtade, R. Boukherroub, *Nanoscale* 5 (2013) 10562.
- [36] N. Skandrani, A. Barras, D. Legrand, T. Gharbi, H. Boulahdour, R. Boukherroub, *Nanoscale* 6 (2014) 7379.
- [37] G.-H. Pan, A. Barras, L. Boussekey, X. Qu, A. Addad, R. Boukherroub, *Langmuir* 29 (2013) 12688.
- [38] A. Sivery, A. Barras, R. Boukherroub, C. Pierlot, J.M. Aubry, F. Anquez, E. Courtade, *J. Phys. Chem. C* 118 (2014) 2885.
- [39] S.A. Poulet, A. Ianora, M. Laabir, W.C.M. Klein Breteler, *ICES J. Mar. Sci.* 52 (1995) 359.
- [40] V. Berdug, R.P. Harris, S.C.M. O'Hara, *Mar. Pollut. Bull.* 8 (1977) 138.



Lipid nanocapsules for behavioural testing in aquatic toxicology: Time–response of *Eurytemora affinis* to environmental concentrations of PAHs and PCB



François-Gaël Michalec^{a,*}, Markus Holzner^a, Anissa Souissi^b, Stefka Stancheva^c, Alexandre Barras^c, Rabah Boukherroub^c, Sami Souissi^b

^a Institute of Environmental Engineering, ETH Zurich, Stefano-Franscini-Platz 5, 8093 Zurich, Switzerland

^b Univ. Lille, CNRS, UMR 8187, LOG, Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences, F 59 000 Lille, France

^c Univ. Lille, CNRS, UMR 8520, IEMN, Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologie, F 59 000 Lille, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 June 2015

Received in revised form 20 August 2015

Accepted 21 August 2015

Available online 24 August 2015

Keywords:

Calanoid copepod

Swimming behaviour

Eurytemora affinis

Waterborne pollution

Lipid nanocapsule

Particle tracking velocimetry

ABSTRACT

The increasing interest for behavioural investigations in aquatic toxicology has heightened the need for developing tools that allow realistic exposure conditions and provide robust quantitative data. Calanoid copepods dominate the zooplankton community in marine and brackish environments. These small organisms have emerged as attractive models because of the sensitivity of their behaviour to important environmental parameters and the significance of self-induced motion in their ecology. Estuarine copepods are particularly relevant in this context because of their incessant exposure to high levels of pollution. We used lipid nanocapsules to deliver sub-lethal concentrations of PAHs (pyrene, phenanthrene and fluoranthene) and PCB 153 into the digestive track of males and females *Eurytemora affinis*. This novel approach enabled us to achieve both contact and trophic exposure without using phytoplankton, and to expose copepods to small hydrophobic molecules without using organic solvent. We reconstructed the motion of many copepods swimming simultaneously by means of three-dimensional particle tracking velocimetry. We quantified the combined effects of contact and trophic toxicity by comparing the kinematic and diffusive properties of their motion immediately and after 3 h and 24 h of exposure. Despite the lack of toxicity of their excipients, both empty and loaded capsules increased swimming activity and velocity immediately after exposure. Laser microscopy imaging shows adhesion of nanocapsules on the exoskeleton of the animals, suggesting contact toxicity. The behavioural response resembles an escape reaction allowing copepods to escape stressful conditions. The contact toxicity of empty capsules and pollutants appeared to be additive and nanocapsules loaded with PCB caused the greatest effects. We observed a progressive accumulation of capsules in the digestive track of the animals after 3 h and 24 h of exposure, which suggests an increasing contribution of systemic toxicity. Nanocapsules filled with PAHs caused a smaller response compared to empty capsules, which we attribute to the narcotic properties of these toxicants. The sharp decrease in velocity after 24 h of exposure to capsules loaded with PCB suggests physiological incapacitation following systemic toxicity. Clear differences are visible between genders in their response to empty and loaded capsules, for all exposure durations. Females appear to be less sensitive than males, suggesting different tolerance to stress conditions. Our results confirm the feasibility of using lipid nanocapsules to identify pollutant-induced behavioural alteration in the plankton. They also add new insights into the contact and systemic toxicity of common pollutants. We expect that our results will assist and evoke further research to develop suitable nanocarrier systems for behavioural testing.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Copepods form the largest part of the zooplankton in marine and brackish environments. They are considered as promising model organisms because of their short generation time, ease of culturing in the laboratory and major ecological importance. Using copepods

* Corresponding author.

E-mail address: michalec@ifu.baug.ethz.ch (F.-G. Michalec).

as test models, considerable effort has been directed in identifying appropriate molecular and cellular biomarkers and in understanding the mechanisms of toxic action at these two levels of biological organization (Raisuddin et al., 2007; Xuereb et al., 2012). Together with conventional mortality assays and assessment of reproductive and developmental impairments (Guo et al., 2012; Lesueur et al., 2015), these tests provide comparative and standardized results that directly relate to the health and fitness of an organism. On the other hand, they provide little information on the impairment of behavioural processes that often occur at extremely low concentrations of pollutants (Ward et al., 2008; Henry et al., 2012). Individual behaviour underlines almost all aspects of ecological interactions and links sub-organism levels to higher ecological levels such as population organization. Because behavioural studies are relatively fast and behavioural endpoints are generally more sensitive than those assessing development or reproduction (Melvin and Wilson, 2013), examining changes in behaviour has been in recent years an increasingly popular approach to appreciate anthropogenic disturbances in aquatic organisms (Clotfelter et al., 2004; Zala and Penn, 2004). However, in the field of zooplankton toxicology, behavioural studies remain disproportionately biased toward studying freshwater cladoceran (Duquesne and Küster, 2010; Chevalier et al., 2015; Zein et al., 2015). Despite the increasing demand for using ecologically relevant species for pollution monitoring, little is known about copepods from marine or brackish environments.

The interest of using calanoid copepods as model organisms in behavioural assays takes on full significance when considering the importance of swimming behaviour in their ecology. These small organisms rely on behaviour to explore their environment and to interact with other zooplankters. Small-scale motion on the order of a few centimetres contributes greatly to their fitness (Visser, 2007; Kjørboe, 2008; Bianco et al., 2014). The kinematic and geometrical properties of their trajectories are sensitive to a variety of natural parameters (Michalec et al., 2012; Moison et al., 2012; Sabia et al., 2014) and the feasibility and ecological significance of using copepod behaviour in environmental monitoring have been recognized in recent publications (Michalec et al., 2013a,b). These studies motivate further research to expand our knowledge on the behavioural toxicity of various classes of pollutants, and to develop innovative procedures for behavioural analysis.

Two recurrent problems in behavioural toxicology are the use of carrier solvents and the route of exposure. Carrier solvents are needed to assess substances that are sparingly soluble and there is often no other practical alternative for the testing of relatively hydrophobic substances (Hutchinson et al., 2006). However, they can have confounding effects that have been recognized both in chronic (Hutchinson et al., 2006) and in behavioural assessment of toxicity (Michalec et al., 2013b). Because copepods have a relatively impermeable chitinous exoskeleton, internal concentrations of toxicants after direct uptake are generally considerably less than background concentrations (Chang and Reinfelder, 2002; Magnusson et al., 2007). Toxicants from the dissolved phase deposit primarily on external surfaces and in calanoid copepods as in other planktonic crustaceans, they often result in typical escape reactions that are believed to result from damage or irritation of chemoreceptor cells (Lopes et al., 2004; Blinova and Cherkashin, 2012). In the environment, however, copepods are exposed to pollutants not only through direct contact but also via trophic exposure. Toxicants can be taken up through the cuticle and through the digestive tract after ingestion of contaminated phytoplankton. Trophic transfer generally leads to greater effects (Fisher and Hook, 2002; Rozon-Ramilo et al., 2011) because toxicants deposit in internal tissues and strongly perturb physiological functions (Escher and Hermens, 2002). Consequently, there is a call for biologists to consider not only contact toxicity, but also the trophic transfer of pollutants in

order to better understand the relative importance of water and diet as routes of exposure causing behavioural impairments.

Because phytoplankton is the primary diet for calanoid copepods, unicellular algae seem to be the most suitable choice to deliver toxicants systemically (Jarvis et al., 2013; Almeda et al., 2014b). However, in behavioural assays, using contaminated phytoplankton is considered impractical. Both the internal concentration of toxicants in the algae and their assimilation efficiency in copepods have been found to vary with the pollutant and species of algae considered (Xu et al., 2001; Wang and Wang, 2005; Magnusson et al., 2007). They also depend on the concentration of nutrients (Wang and Dei, 2001; Lynn et al., 2007) and on non-trivial kinetics of uptake and desorption (Koelmans, 2014). Moreover, the swimming behaviour of copepods is affected by the presence of phytoplankton with species-dependent effects (Saiz, 1994; van Duren and Videler, 1995; Sabia et al., 2014) and both the grazing rate of copepods and their grazing selectivity depend on the species of copepods and algae considered (Garrido et al., 2013). In this context, objectives must be geared toward the development of a carrier system that delivers hydrophobic toxicants to the digestive track without reliance on phytoplankton or solvent. This carrier system must target the digestive system independently of the grazing selectivity of the copepod and remain stable in brackish or sea water over the duration of the experiment. One strategy relies on the association of toxicants with nanocarriers that protect the encapsulated substance and transport it across the epithelial surface of the digestive track. The use of nano-sized particles as delivery systems for poorly water-soluble drugs has recently attracted considerable pharmaceutical interest (Bunjes, 2010) but has never been implemented in aquatic toxicology. We have recently demonstrated that lipid nanocapsules fulfill these requirements: they are not toxic to copepods, stable in seawater and very efficient at encapsulating hydrophobic toxicants (Stancheva et al., 2015).

We focus in this study on polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs), two widespread organic pollutants that tend to remain in the environment for extended periods of time. Polycyclic aromatic hydrocarbons accumulate in copepods (Lotufo, 1998; Carls et al., 2006; Cailleaud et al., 2007a; Berrojalbiz et al., 2009) and affect their development, survival and reproduction (Barata et al., 2005; Bellas and Thor, 2007; Saiz et al., 2009). Because copepods ingest dispersed oil droplets, renewed attention has been focused on the ingestion and toxic effects of PAHs on the zooplankton community (Almeda et al., 2014a). Polychlorinated biphenyls are highly lipophilic compounds that accumulate in aquatic organisms including copepods (Cailleaud et al., 2007a) where they exhibit a broad range of toxicological effects on physiological functions (McFarland and Clarke, 1989). We selected the estuarine calanoid copepod *Eurytemora affinis* (Poppe 1880) as a model species because of its large distribution area which includes most temperate estuaries and its high importance in the trophic food web (Devreker et al., 2008). This species is associated to the maximum turbidity zone where it finds abundant food (Tackx et al., 2003) but encounters high levels of pollution due to the trapping of particulate contaminants and sediment re-suspension (Cailleaud et al., 2009b; Lesueur et al., 2015). It accumulates environmental contaminants (Cailleaud et al., 2007b, 2009a, 2011a) and has over the years become a relevant ecological and ecotoxicological bioindicator (Forget-Leray et al., 2005; Lesueur et al., 2013; Kwok et al., 2015).

Automated tracking of the collective behaviour of small organisms in three dimensions allows the reconstruction of a large number of trajectories and ensures a reliable database for the analysis of their motion. Recent developments in tracking procedures have provided biologists with unprecedented quantities of trajectories and have allowed the description and understanding of behaviour at scales previously not possible (Ardekani

et al., 2013; Attanasi et al., 2015). Despite the growing interest in using zooplankton behaviour as an integrated measure of aquatic contamination, quantitative characterization of their three-dimensional trajectories remains uncommon. This is primarily because there is no standard technique to recover the position information of a large number of animals moving simultaneously. Three-dimensional particle tracking velocimetry is a flow measurement technique originally developed to study turbulent flows and recently applied to study swarming midges (Kelley and Ouellette, 2013) and copepods swimming in turbulence (Michalec et al., 2015). It allows the automatic processing of long sequences of stereoscopic images and the reconstruction of the three-dimensional positions and trajectories of a large number of particles.

This research was conducted to test for the feasibility of using lipid nanocapsules as carrier of hydrophobic molecules in behavioural toxicology, and to test for the extent of behavioural effects induced by both contact and trophic-like exposure. We reconstructed the motion of adult *E. affinis* swimming freely in clean water, in the presence of empty nanocapsules and during exposure to nanocapsules filled with PCB 153 and with a mixture of PAHs. We hypothesized that (i) copepods would not react to the presence of empty nanocapsules, (ii) copepods would react to the initial stage of the exposure by displaying hyperactivity due to contact toxicity and (iii) longer exposure would result in lower swimming activity that may indicate systemic toxicity. The first hypothesis is based on the non-toxicity of lipid nanocapsules to the copepod *Acartia tonsa* (Stancheva et al., 2015). The second hypothesis is supported by recent observations of zooplankton hyperactivity following short-term exposure to pollutants, regardless of their mode of action (Cailleaud et al., 2011b; Michalec et al., 2013a; Chevalier et al., 2015). The third hypothesis derives from dose–response relations in ecotoxicology and from the time-dependent, systemic uptake of nanocapsules by copepods (Stancheva et al., 2015).

2. Methods

2.1. Copepod and algae cultures

Copepods were sampled from the oligohaline zone of the Scheldt Estuary (Belgium) in July 2012 using a WP2 plankton net drifting in sub-surface water. They were maintained for several generations in the laboratory in aerated 5 L aquariums under optimal conditions for reproduction and development i.e. at salinity of 15 (filtered and sterilized sea water from the English channel adjusted to salinity with deionized water) and at 18 °C (Devreker et al., 2009). Copepods were fed in excess on a mixed diet of *Rhodomonas baltica* and *Isochrysis galbana* from the laboratory culture, harvested during the exponential growth phase and centrifuged. Algae were grown in aerated 6 L flasks in sterilized sea water, under a fluorescent light:dark cycle of 12L:12D and in Conway medium.

2.2. Preparation of nanocapsules

Lipid nanocapsules were formulated at a nominal size of 50 nm using the phase inversion method of an oil/water system described in Heurtault et al. (2002). Pollutants were first solubilized in Labrafac™ Lipophile WL 1349. The oil phase was mixed with Solutol® HS 15 at 19.1%, Phospholipon® 90 G at 3.0%, NaCl at 1.7% and distilled water at 42.9%. The final concentration of Labrafac was 33%. Labrafac, Phospholipon and Solutol were generously provided by Gattefossé (Saint-Priest, France), Phospholipid GmbH (Cologne, Germany) and Laserson (Etampes, France). The mixture was heated

and cooled for three cycles from 60 °C to 90 °C under magnetic stirring. The suspension was cooled to 78 °C and 3.3 mL of distilled water were added. The concentration of pollutants was 1% of the total mass of the oily core (Labrafac and Phospholipon). The mean diameter of the lipid nanocapsules was determined by dynamic light scattering (Zetasizer® Nano ZS) before and after encapsulation and ranges from 46 to 53 nm. Pollutant loading was determined by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC, Shimadzu LC2010-HT) on a 5 µm C₄ QS Uptisphere® 300 Å 250 mm × 4.6 mm column (Interchim, Montluçon, France) heated at 40 °C. The mobile phase was a mixture of trifluoroacetic acid at 0.05% in H₂O and CH₃CN at a flow rate of 1 mL min⁻¹. The analysis shows that pollutants are entrapped in the lipid nanocapsules with high efficiency (above 95%) (Stancheva et al., 2015). Leakage and stability measurements were performed 2 days after synthesis by placing lipid nanocapsules (0.4 mg mL⁻¹) containing either PAHs or PCB in brackish water (salinity 15) and at 20 °C. The amount of pollutants leaking from the nanocapsules was determined after gel filtration by RP-HPLC following the procedure described above. Physical stability was estimated by measuring the mean diameter via dynamic light scattering. Nanocapsules loaded with pollutants showed good stability over the duration of our measurements (i.e. 24 h) without any apparent leakage of pollutants or change in diameter (Fig. S1). Nanocapsules were purified by gel filtration on PD-10 columns before analysis and measurements.

2.3. Preparation of test solutions

The first test solution consisted of lipid nanocapsules loaded with pyrene (CAS No. 129-00-0), phenanthrene (CAS No. 85-01-8) and fluoranthene (CAS No. 206-44-0) (analytical standard; Fisher Scientific France). We selected pyrene, phenanthrene and fluoranthene because of their widespread occurrence in the aquatic environment and their preferential accumulation in calanoid copepods (Almeda et al., 2014b). The final concentration of each PAH in the experimental aquarium was 0.2 nM and the total concentration was 116 ng L⁻¹. The second solution consisted of capsules loaded with PCB 153 (CAS No. 35065-27-1). We selected this congener because of its major occurrence in estuarine sediments and its transfer to *E. affinis* (Cailleaud et al., 2007a). The final concentration of PCB 153 in the aquarium was 216 ng L⁻¹. These concentrations are within the upper range observed in several major European estuaries (Fernandes et al., 1997; Cailleaud et al., 2007a, 2009b). They are below the 96-h non-observed effect concentration (NOEC) of PCBs in *Tigriopus japonicus*, which was estimated at 0.5 mg L⁻¹ and 0.6 mg L⁻¹ (Lee et al., 2007; Guo et al., 2012), and below the 10-day NOEC survival of benzo[a]pyrene in *E. affinis*, estimated at 12 µg L⁻¹ (Forget-Leray et al., 2005). We also conducted identical measurements using empty capsules. The concentration of empty capsules was similar to that of loaded capsules (15 µg L⁻¹).

2.4. Experimental setup and recording conditions

We recorded the motion of copepods using three synchronized CCD cameras (AVT GE 1050), fitted with 25 mm lenses and controlled via an instance of the StreamPix5 (Norpix) acquisition software. A three-camera system facilitates the establishment of stereoscopic correspondences as it resolves most matching ambiguities (Dracos, 1996). The cameras were positioned at different viewing angles in front of a 10 cm × 10 cm × 11 cm acrylic glass aquarium filled with 1 L of filtered water at salinity 15 and at 18 °C. The recording frequency was 60 frames per second at one megapixel resolution. All but one of the inner faces of the aquarium were coated to prevent reflection of light. We conducted all measurements in the absence of food to prevent synergistic effects (Souissi et al., 2010) and in a dark room, using two arrays of infrared

(850 nm) light-emitting diodes as the light source to prevent phototaxis. We limited our observation volume to a 9 cm × 9 cm × 9 cm cube centred in the middle of the aquarium. We calibrated the cameras using images of a calibration block with target dots of known coordinates, and we performed an additional dynamic calibration based on the images of moving particles (Liberzon et al., 2012). The calibration object consisted of a machined block on which 135 reference points were evenly distributed along the three directions. We checked copepods for integrity under a microscope and selected healthy individuals only. Because *E. affinis* males and females have different detoxification abilities (Boulangé-Lecomte et al., 2014) that translate into different behavioural responses to toxicants (Michalec et al., 2013a), we investigated separately males and females. We transferred groups of 60 copepods (mean total body length: 1 mm for females and 0.9 mm for males) into the experimental aquarium and allowed them to acclimate for 5 min in the dark. We recorded their swimming behaviour for 25 min. We conducted measurements under a constant ambient temperature of 15 °C to compensate from the increase in temperature caused by the diode arrays. Water temperature in the experimental aquarium remained constant at 18 °C. We conducted all measurements at the same time of day and with new copepods from the stock culture.

2.5. Reconstruction of three-dimensional trajectories

Knowing the camera intrinsic and extrinsic parameters from the calibration procedure, we established correspondences between particle image coordinates and derived the three-dimensional positions of the moving organisms by forward intersection, introducing their coordinates as unknowns in the augmented projection model (Maas et al., 1993; Malik et al., 1993). We processed the image sequences and tracked copepods using an algorithm based on image and object space information (Willneff and Gruen, 2002). We glued segments belonging to the same trajectory using a spatio-temporal matching assignment (Saha et al., 2014) and we smoothed trajectories with a Savitzky-Golay filter to improve the measurement of velocity (Wolf et al., 2012). We filtered out artefacts originating from the tracking and gluing procedures and rejected trajectories lying outside the observation volume to avoid boundary effects.

2.6. Trajectory analysis

We first considered the kinematic properties of the motion. *Eurytemora affinis* males and females show a continuous slow swimming pattern interrupted by frequent relocation jumps (Movie S1) (Michalec et al., 2015). The slow forward motion derives from the creation of feeding currents accomplished by the high-frequency vibration of the cephalic appendages (Kiørboe et al., 2014). Relocation jumps have been commonly observed in calanoid copepods and result in a sequence of small velocity bursts leading to an unsteady motion (Jiang and Kiørboe, 2011). As a first metric, we measured the magnitude of the instantaneous velocity as $u = (u_x^2 + u_y^2 + u_z^2)^{0.5}$ where the indices x , y and z refer to the three Cartesian axes of the reference frame. We estimated the probability density functions of u to quantify the effects of exposure on the swimming velocity. To better assess how pollutants affect jump behaviour, an important component of copepod motion, we extracted relocation jumps from the velocity time series and we quantified variations in their amplitude and duration. To identify relocation jumps, we first filtered out the high-frequency modes of the velocity signal which are associated with individual leg strokes during the same relocation jump and which also result from inaccuracies in the determination of particle positions.

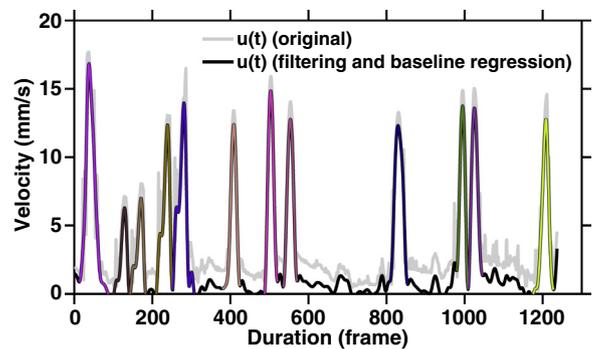


Fig. 1. Illustration of the jump detection procedure. The original velocity time series (grey) is filtered to remove high frequency fluctuations caused by inaccuracies in the reconstruction of coordinates. After baseline regression, jumps are detected using a wavelet-based peak detection method. The transformed velocity time series is shown in black, and jumps are shown in different colours. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

We used a fourth-order lowpass Butterworth filter with a cut-off frequency set at 10 Hz. This filter attenuated high frequencies while preserving the sharpness of individual jumps. Because cruising copepods show low frequency fluctuations (i.e. over several seconds) in their swimming speed, we adjusted for the variable baseline of their velocity time series. We estimated this baseline within multiple shifted windows and regressed it to the window points using a spline approximation. We identified all jumps using a wavelet-based peak detection method. Change in body orientation during cruising often resulted in small bursts in velocity that were discarded from the analysis by setting a 5 mm s⁻¹ threshold for the jump amplitude. The effects of filtering, baseline subtraction and peak detection procedures are illustrated for a typical example velocity time series in Fig. 1.

We computed the root mean square displacement, defined as $rmsd = \langle \delta X_t^2 \rangle^{0.5}$ where δX_t is the displacement of a copepod at time t relative to its initial position. We estimated the geometrical complexity of the motion by computing the box-counting dimension of the trajectories. The box-counting dimension is commonly employed to characterize the degree of space occupation of zooplankton trajectories (Cianelli et al., 2009; Michalec et al., 2013a). We created a three-dimensional bounding box around each trajectory. The origin of this bounding box lay at the intersection of the planes defined by the minimal coordinates of the trajectory and its height, length and depth were equal to the maximal displacement of the copepod along each dimension. We superimposed a three-dimensional grid of varying mesh size on the trajectory and we counted the number of occupied boxes versus the mesh size. This number increases with decreasing mesh size, leading to the power-law relationship $N(l) \sim l^{-D}$ where l is the mesh size, $N(l)$ is the number of occupied boxes and D is the box-counting dimension. The mesh size followed a geometric sequence with a maximal and minimal cut-off values set to half the embedding volume and 0.5 mm, respectively. Because copepods jump while swimming, relatively large separation distances between consecutive positions may result in lacunarity during the box-counting procedure. Consequently, we characterized each swimming track using a cubic spline interpolation and built a new trajectory by extrapolating new positions at equal separation distance along the original curve. This separation distance was always shorter than the minimal mesh size. The box-counting dimension was given by the slope of the power fit of the log–log plot of the number of occupied boxes versus mesh size.

Table 1
Number of three-dimensional coordinates for the different experimental conditions.

	CON	EMP	PAH	PCB
Males				
00	336,818	1,147,973	934,586	1,153,375
03	372,017	1,004,043	1,429,550	1,227,026
24	353,263	718,945	843,514	1,092,686
Females				
00	413,621	245,792	712,148	728,261
03	394,814	545,898	628,653	900,174
24	392,764	362,832	618,653	648,177

3. Results

3.1. Ingestion of nanocapsules

Nanocapsules filled with DiI at 0.1% and PCB 153 at 1% are observed on the cuticle after 30 min of exposure and both on the cuticle and inside the digestive track at $t=3$ h and $t=24$ h (Fig. 2) (Stancheva et al., 2015). This suggests that any changes in swimming activity observed at $t=0$ h result from contact toxicity, and that any variation in behaviour observed at $t=3$ h and $t=24$ h result from a combination of contact and systemic toxicity. The concentration of capsules inside the gut of the animals increases substantially from $t=3$ h to $t=24$ h, suggesting a higher systemic toxicity at the maximal exposure duration. Similarly, the adhesion of capsules on the surface of the organisms, both on the cuticle and on the appendages, increases drastically with exposure duration.

3.2. Swimming activity

During the measurements, copepods spent time in swimming actively and sometimes resting on the walls or at the bottom of the aquarium. Immobile animals were not tracked because they were outside the investigation volume. Consequently, the number of three-dimensional coordinates provides a general assessment of copepod swimming activity, because it reflects directly the number of organisms actively swimming in the aquarium. In males, exposure to empty nanocapsules causes a more than threefold increase in the number of coordinates at $t=0$ h compared to clean water (Table 1). Compared to $t=0$ h, swimming activity decreases at $t=3$ h and $t=24$ h but remains higher than in clean water. A marked increase in activity is also observed during exposure to nanocapsules filled with PAHs and with PCB. For these two conditions, activity is the highest at $t=3$ h. At $t=24$ h, the number of coordinates decreases substantially but remains above that observed with empty capsules. The increase in swimming activity is also visible in females, but is much less pronounced than in males. In the presence of empty nanocapsules, the number of coordinates decreases at $t=0$ h, increases substantially at $t=3$ h and reduces again below control values at $t=24$ h. Swimming activity increases strongly during exposure to PAHs and PCB, above that observed with the empty capsules. The strongest effect is observed with nanocapsules filled with PCB, which causes at $t=3$ h a more than twofold increase in the number of coordinates. Activity slows down substantially at $t=24$ h.

3.3. Swimming velocity

Over time, velocity remains relatively similar in males and females swimming in clean water, as evidenced by the overlap of the probability density functions at $t=0$ h, $t=3$ h and $t=24$ h (Fig. 3). In males, velocity averages are 3.4 mm s^{-1} for the three exposure durations (Table 2). In females, velocity averages are 2.9 mm s^{-1} at $t=0$ h and $t=3$ h and 2.8 mm s^{-1} at $t=24$ h. In both genders,

Table 2
Mean swimming velocity of *E. affinis* males and females for the different experimental conditions. The mean velocity was obtained by averaging instantaneous velocity magnitudes $u = (u_x^2 + u_y^2 + u_z^2)^{0.5}$.

	CON	EMP	PAH	PCB
Males				
00	3.4	3.7	4.0	4.8
03	3.4	4.5	4.0	4.7
24	3.4	4.1	3.4	3.8
Females				
00	2.9	3.0	3.0	4.2
03	2.9	3.7	3.2	4.3
24	2.8	3.6	3.2	3.6

exposure to empty nanocapsules results in an increase in swimming velocity that reaches its maximum at $t=3$ h. In males, this increase is evidenced by a shift of the peak of the probability density function toward higher cruising velocities (from 2 mm s^{-1} in control condition to 4 mm s^{-1} with unloaded carriers) and by a higher proportion of medium velocity values (from 5 to 10 mm s^{-1}) whereas in females, both medium and large velocity values (from 5 to 30 mm s^{-1}) increases in proportion. In both genders, the presence of PAHs reduces the effects caused by the empty capsules; in males, the mean velocity returns to control value at $t=24$ h. Exposure to nanocapsules filled with PCB causes the strongest effects. Velocity increases immediately to 4.8 mm s^{-1} in males and to 4.2 mm s^{-1} in females; this increase is much larger than that observed for empty capsules. Large differences are also visible in the probability density functions, which show in both genders a significantly higher proportion of medium and large velocity values (above 4 mm s^{-1}) and a lower proportions of low velocity values (below 4 mm s^{-1}). In males, for empty nanocapsules and nanocapsules filled with pollutants, the proportion of large velocity values (above 10 mm s^{-1}) decreases strongly (for empty capsules and capsules loaded with PCB) or moderately (for carriers loaded with PAHs) at $t=24$ h, below the control curves. In females, velocity probability density functions remain always above the control curves at moderate to strong magnitudes.

3.4. Amplitude and duration of jumps

We illustrate the effects of exposure on the jump behaviour of males, because they show a more complex and pronounced response than females. Results show that *E. affinis* swimming in clean water displays two types of relocation jumps that differ in their amplitude and duration (as evidenced by the bi-modal probability density functions in Fig. 4). The ecological significance of these two types of jumps is unclear; short jumps of limited amplitude may be associated with weak repositioning events that have been previously observed in calanoid copepods (Kjørboe et al., 2010). The distribution of both the magnitude and duration of jumps differs strongly between conditions. Exposure to empty nanocapsules results at $t=3$ h and $t=24$ h in a progressive decrease in the magnitude of jumps that agrees well with the trend observed in the probability density functions. It also causes a marked, time-dependent increase in the proportion of short jumps. Exposure to PAHs cancels the effects of the empty capsules on jump magnitude but decreases slightly the proportion of both short and long jumps; consequently, the distribution of jump duration spreads over a larger range of values. Exposure to nanocapsules filled with PCB results in a substantial decrease in jump magnitude; effects occur immediately and not progressively as with empty capsules. The distribution of jump duration shifts toward shorter values, with a substantial decrease in the proportion of long jumps.

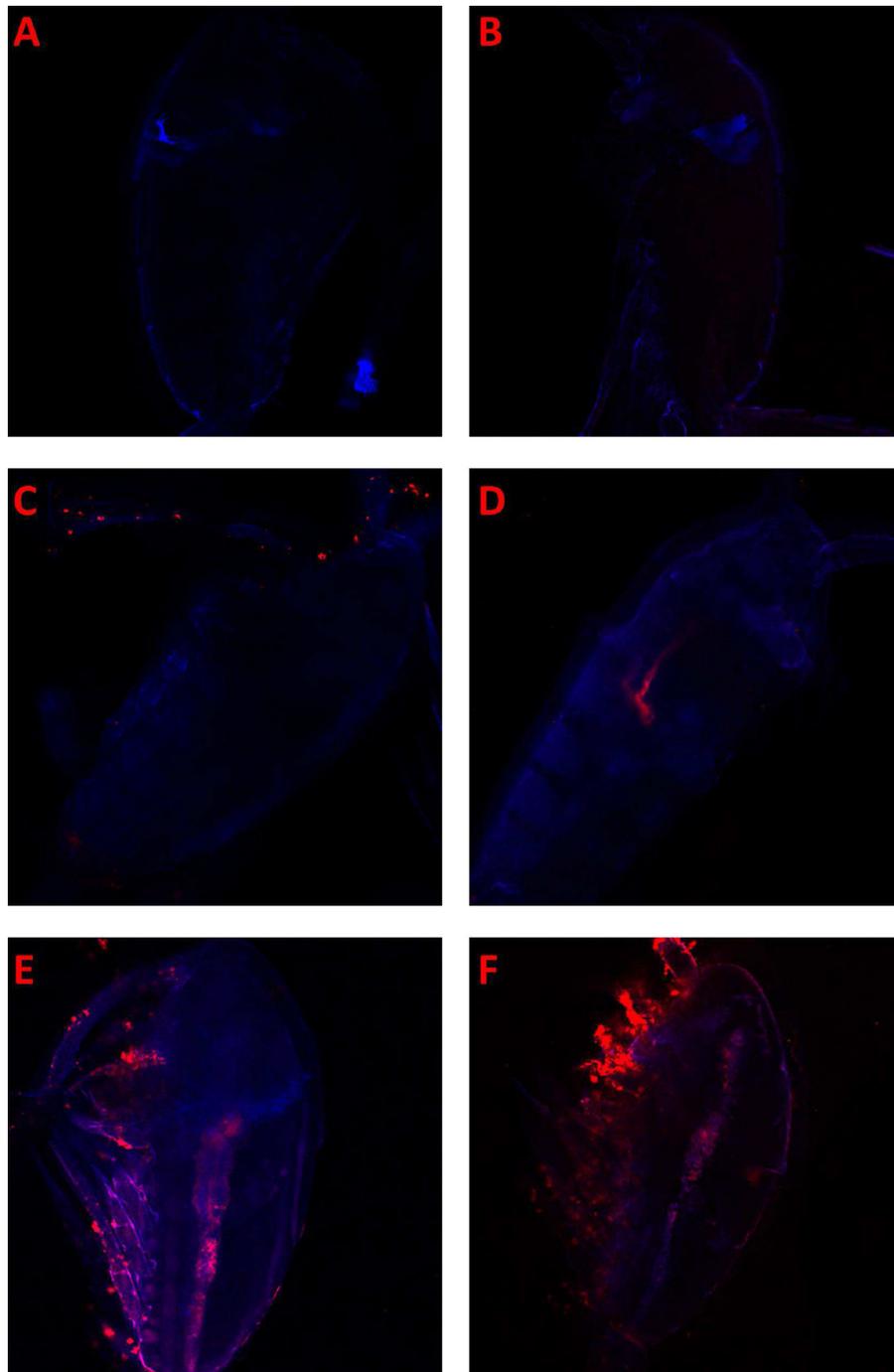


Fig. 2. Microscope images of the studied copepods showing fluorescence (nanocapsules loaded with Dil at 0.1% and PCB 153 at 1%) in control organisms (A), after 30 min of exposure (B), at $t = 3$ h (C and D) and at $t = 24$ h (E and F). The blue colour is due to the auto-fluorescence of the exoskeleton while the red colour comes from the fluorescence of the dye. The gut concentration of capsules and their adhesion to the cuticle and appendages increase drastically between $t = 3$ h and $t = 24$ h. Nanocapsules contained both Dil and PCB to ensure that even toxicant-loaded carriers were ingested by the copepods. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

3.5. Root mean square displacement

The root mean square displacement shows important variations between genders and between experimental conditions (Fig. 5). Exposure to empty nanocapsules causes in both males and females a marked increase in the spatial extent of their motion, with little effects at $t = 0$ h and maximal effects at $t = 3$ h (in males) and at $t = 24$ h (in females). Exposure to PAHs reduces considerably the influence of empty capsules; slightly higher values are observed in

females at $t = 3$ h and $t = 24$ h, but not in males. The largest effects are observed in the presence of nanocapsules filled with PCB, which cause a considerable increase in the spatial extent of copepod motion. Effects occur immediately and not progressively as with empty capsules; at $t = 24$ h, they reduce substantially in males but only slightly in females. Because larger values of the root mean square displacement can result from higher swimming velocities or from a straighter motion, we also quantify the geometrical properties of the trajectories.

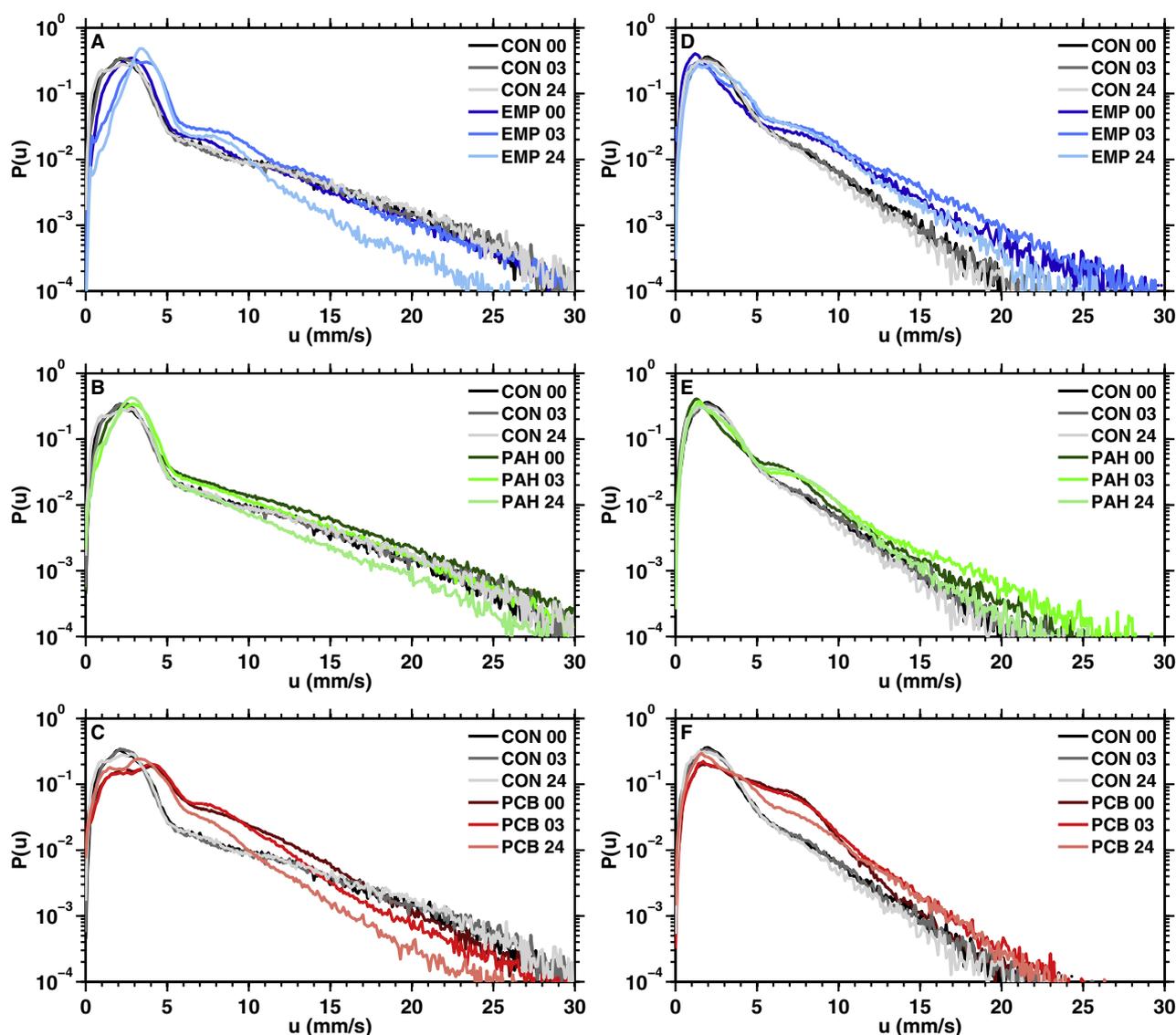


Fig. 3. Probability density functions of the magnitude of the velocity for *E. affinis* males (A, B and C) and females (D, E and F) exposed to empty nanocapsules (A, D), to nanocapsules filled with PAHs (B, E) and to nanocapsules filled with PCB 153 (C, F). Control curves are shown in each figure for comparison. Lighter colours indicate longer exposures. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

Table 3

Three-dimensional box-counting dimension (mean \pm std) of *E. affinis* trajectories for the different experimental conditions.

	CON	EMP	PAH	PCB
Males				
00	1.24 \pm 0.08	1.23 \pm 0.08	1.25 \pm 0.09	1.24 \pm 0.10
03	1.25 \pm 0.09	1.24 \pm 0.10	1.24 \pm 0.09	1.24 \pm 0.11
24	1.23 \pm 0.08	1.22 \pm 0.10	1.24 \pm 0.09	1.24 \pm 0.11
Females				
00	1.41 \pm 0.18	1.36 \pm 0.13	1.32 \pm 0.12	1.35 \pm 0.16
03	1.40 \pm 0.17	1.35 \pm 0.12	1.34 \pm 0.13	1.36 \pm 0.16
24	1.38 \pm 0.15	1.30 \pm 0.11	1.33 \pm 0.13	1.35 \pm 0.15

3.6. Box-counting dimension

Despite slight variations in the mean values, the box-counting dimension of the trajectories remains statistically similar between the three periods of recording for males and females swimming in control water (Kruskal–Wallis test, $p > 0.05$) (Table 3). It remains statistically similar in males and females exposed to empty capsules at $t = 0$ h and $t = 3$ h ($p > 0.05$) but decreases slightly (in males) and

substantially (in females) at $t = 24$ h ($p < 0.01$). It also remains similar in both genders during exposure to PAHs and PCB ($p > 0.05$).

There is at $t = 0$ h no statistically significant difference in the degree of space occupation for males swimming in clean water and in the presence of empty capsules or capsules loaded with pollutants ($p > 0.05$). However, the trend in the p -value after pairwise comparison (multiple comparison of mean ranks) suggests a slight influence of the empty carriers ($p = 0.05$), and that exposure to pollutants reduces this influence ($p = 0.53$ between control condition and exposure to PAHs and $p = 0.98$ between control condition and exposure to PCB). Indeed, we find significant differences between the box-counting dimension of males exposed to empty capsules and to capsules loaded with contaminants ($p < 0.01$) despite very similar mean values. At $t = 3$ h, the box-counting dimension of males swimming in clean water differs from that of males exposed to empty capsules ($p < 0.01$) and to capsules loaded with PCB ($p < 0.01$) but is similar to that of males exposed to carriers loaded with PAHs ($p > 0.05$). Pairwise comparison indicates that empty capsules and capsules loaded with PCB induce statistically similar effects ($p > 0.05$). However, no substantial difference is visible in the mean values. At $t = 24$ h, the box counting dimension of males swimming

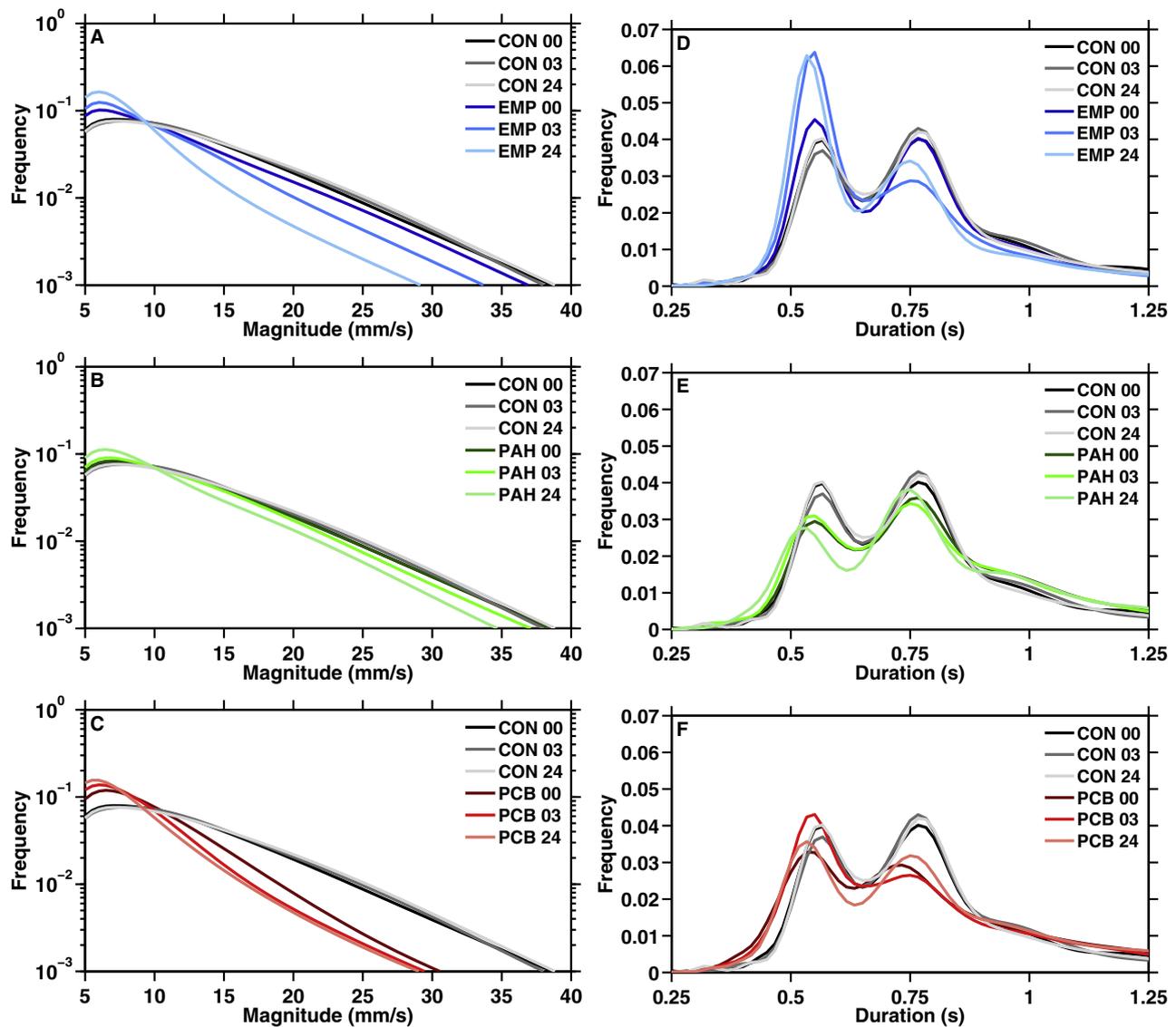


Fig. 4. Probability density functions of the magnitude (A, B and C) and duration (D, E and F) of jumps for *E. affinis* males exposed to empty nanocapsules (A, D), to nanocapsules filled with PAHs (B, E) and to nanocapsules filled with PCB 153 (C, F). Control curves are shown in each figure for comparison. Lighter colours indicate longer exposures. All curves are kernel density smoothing estimates. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

in clean water is statistically similar to that of copepods exposed to pollutants ($p > 0.05$). A slightly lower degree of space occupation is visible during exposure to empty capsules ($p < 0.01$).

In females, at $t=0$ h, exposure to empty capsules decreases strongly the degree of space occupation compared to control condition (Table 3). The box-counting dimension reduces further with particles loaded with PAHs ($p < 0.01$). It increases again with particles filled with PCB; for this condition, the degree of space occupation is statistically similar to that observed with empty capsules ($p > 0.05$), but is still much lower than in control condition ($p < 0.01$) and not statistically different from that observed with PAHs ($p > 0.05$). At $t=3$ h, the box counting dimension of females exposed to empty capsules and capsules loaded with PAHs and PCB is similar ($p > 0.05$) and substantially lower than in control condition ($p=0.01$). At $t=24$ h, exposure to empty capsules further reduces the degree of space occupation to its lowest value ($p < 0.01$). The box-counting dimension increases slightly in the presence of PAHs but remains different from that observed in clean water ($p < 0.01$) and similar to that observed with empty carriers. It increases further during exposure to PCB but the difference is not statistically significant ($p > 0.05$).

4. Discussion

We assessed the behavioural response of the calanoid copepod *E. affinis* to pollutants at concentrations found in its environment. We used lipid nanocapsules to deliver hydrophobic pollutants into the digestive track of the animals. We obtained both contact and trophic exposure without using contaminated phytoplankton and without relying on a solvent. We show that despite their lack of toxicity, empty nanocapsules induce changes in the swimming behaviour of copepods. Their confounding effects complicate interpretation of the results obtained with loaded capsules. However, clear trends are visible. Exposure to nanocapsules filled with pollutants exacerbated hyperactivity at $t=0$ h, which agrees with our second hypothesis. At $t=3$ h, exposure to PAHs reduces substantially the effects of empty capsules, but exposure to PCB 153 exacerbates hyperactivity.

Solutol is a nonionic solubilizer widely used as emulsifying agent in the preparation of lipophilic pharmaceutical active agents. It consists of polyglycol mono- and di-esters of 12-hydroxystearic acid and free polyethylene glycol. Solutol shows excellent biocompatibility (Coon et al., 1991; Vonarbourg et al., 2009) and is not toxic

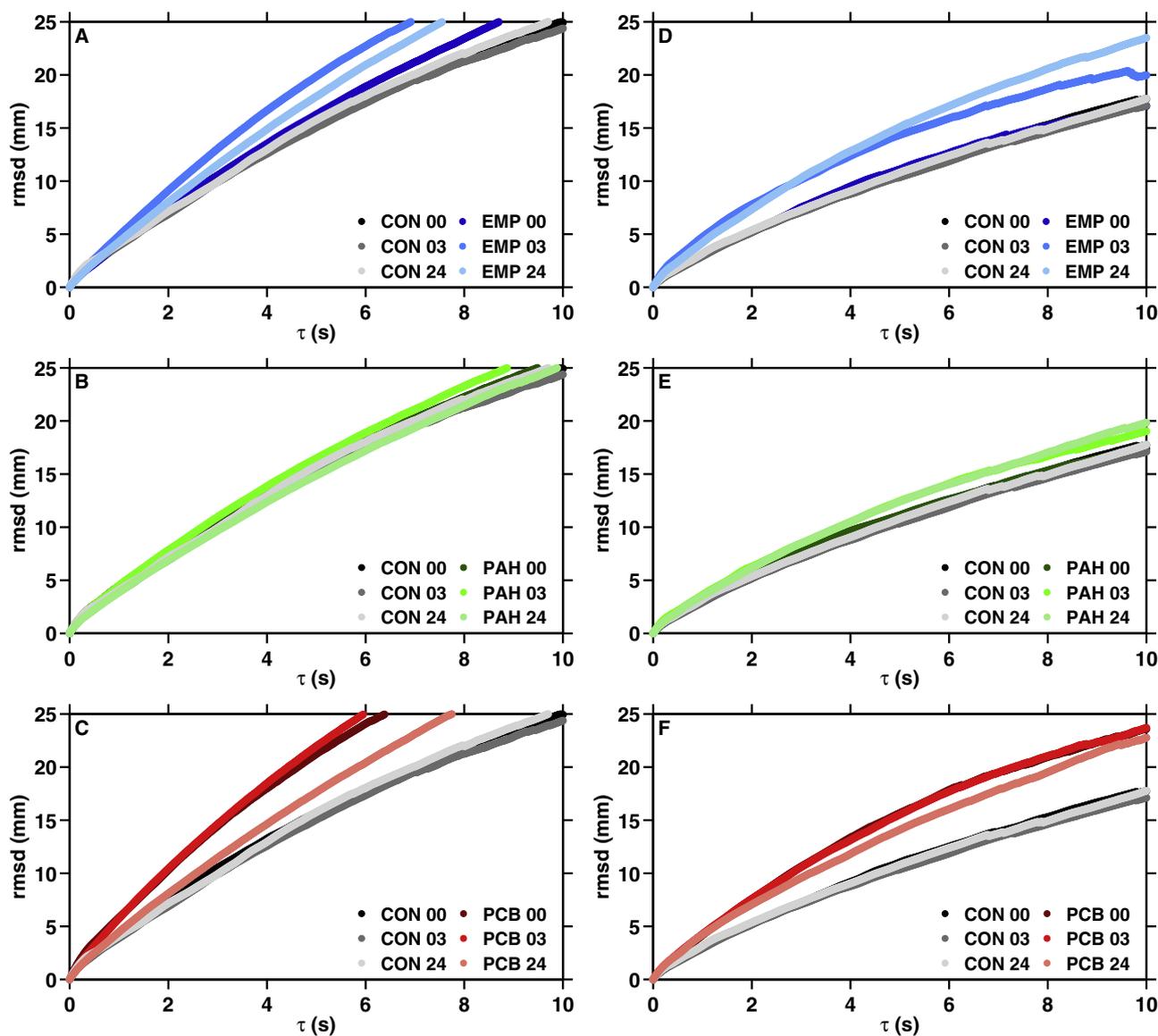


Fig. 5. Root mean square displacement for *E. affinis* males (A, B and C) and females (D, E and F) exposed to empty nanocapsules (A, D), to nanocapsules filled with PAHs (B, E) and to nanocapsules filled with PCB 153 (C, F). Control curves are shown in each figure for comparison. Lighter colours indicate longer exposures. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

to copepods (Stancheva et al., 2015). It seemed to be the ideal solubilizer for the preparation of nanocapsules, and we hypothesized that copepods would not react to its presence. However, after 3 h of exposure, unloaded capsules caused strong hyperactivity and higher swimming velocities. They also resulted in a larger spatial extent of copepod motion, and in straighter trajectories (especially in females). This behavioural response resembles that found in our earlier work, in which we exposed *E. affinis* to sub-lethal concentrations of pollutants having different modes of action (Michalec et al., 2013a). We observed a substantial increase in swimming speed, and we suggested an avoidance behaviour caused by contact between chemoreceptors on the cuticle and dissolved molecules. Avoidance behaviour and hyperactivity are often observed in aquatic organisms independently of the toxic properties of the chemicals. Avoidance behaviour was identified in *Daphnia magna* exposed to dissolved deltamethrin, chlorothalonil and nitrofen (Ren et al., 2009), in *D. longispina* exposed to free copper (Lopes et al., 2004) or in the calanoid copepod *Pseudodiaptomus annandalei* exposed to ethanol (Michalec et al., 2013b). Hyperactivity was evidenced in

Daphnia following fullerene exposure (Lovern et al., 2007). We suggest here a similar mechanism for the empty capsules. Our results also confirm that even non-toxic molecules can trigger increased activity and marked changes in behaviour (Steinke et al., 2004). Finally, we observed stronger behavioural effects at $t=3$ h than at $t=0$ h, and a reduced response at $t=24$ h. We also observed a time-dependent adhesion of empty nanocapsules on the external carapace and appendages of the animals, as previously described in small crustaceans exposed to diverse nanoparticles (Baun et al., 2008). We suggest that the higher response at $t=3$ h comes from a higher contact effect. Conversely, the substantial decrease in swimming activity at $t=24$ h suggests fatigue. This view is consistent with the lower proportion of high velocity values and with the marked decrease in jump magnitude and duration observed in males after 24 h of exposure. As shown in Fig. 3A, the peak of the probability density function of the velocity shifts to the right, indicating higher cruising velocities. Because *E. affinis* spends most of its time swimming slowly, higher cruising velocities may cost copepods a substantial fraction of their energy budget (Buskey, 1998). In

our measurements, after one day of exposure, males are only capable of shorter and weaker jumps. In females, the effects of empty nanocapsules are only visible at higher velocity values. There is no increase in cruising velocity, and no reduction in the proportion of large velocity values after 24 h of exposure.

The narcotic effects of PAHs on aquatic organisms are well established. A narcotic effect is defined as an apparently reversible alteration of the membrane fluidity and protein function caused by the accumulation of hydrophobic pollutants in the lipid bilayer region (van Wezel and Opperhuizen, 1995). This nonspecific partitioning of the chemical in nerve tissue results in anaesthetic effects. In Michalec et al. (2013a), we observed an immediate increase in swimming speed following exposure to a mixture of pyrene, phenanthrene and fluoranthene at 40 ng L^{-1} . Because there was no incubation period and concentrations were extremely low, this unexpected response was linked to the initial hyperactivity that often occurs in response to low doses of toxicants or during the first stage of exposure. Increased activity and velocity at low levels of toxicity have been reported in a variety of small aquatic organisms and in response to diverse pollutants (Kirkpatrick et al., 2006; Ren et al., 2007; Sornom et al., 2012; Chevalier et al., 2015). Higher concentrations of toxicants or longer exposure are expected to result in lower swimming activity, reflecting the metabolic cost of detoxification (Sokolova et al., 2012) or indicating loss of coordination due to impaired physiological functions (Escher and Hermens, 2002). Low-dose stimulation and high-dose inhibition have been observed in *Artemia* and in the rotifer *Brachionus plicatilis* exposed to zinc pyrithione and to a carbamate pesticide (Garaventa et al., 2010), and in the amphipod *Corophium volutator* exposed to water accommodated fraction of weathered crude oil (Kienle and Gerhardt, 2008). The slightly higher velocity observed here at $t=0 \text{ h}$ (compared to the unloaded carriers) suggests an additive effect of PAHs and empty capsules and tends to indicate contact toxicity and escape reaction. Additive effects of waterborne contaminants on swimming behaviour were also observed in *D. pullex* exposed to 4-nonylphenol and diazinon (Zein et al., 2015). On the opposite, the depressed mean velocity at $t=3 \text{ h}$ (compared to the unloaded carriers) and to an even greater extent at $t=24 \text{ h}$ agrees well with the narcotic properties of PAHs and suggests systemic toxicity due to ingestion of loaded capsules. These narcotic effects have been widely reported in the literature for different species of copepods and long exposure durations (Cowles, 1983; Barata et al., 2005; Almeda et al., 2014b), and they agree well with our second hypothesis. Surprisingly, we observed in our measurements a substantial increase, rather than a reduction, in the level of spontaneous swimming activity (in comparison to unloaded capsules). This result contrasts with the reduction in swimming speed and suggests a complex behavioural toxicity of PAHs. The slight decrease in the proportion of high velocity values after one day of exposure differs from the marked reduction observed with the empty capsules; the opposite influence of unloaded carriers and PAHs on cruising velocity (and hence fatigue) may explain this effect. Finally, because exposure to PAHs reduced both swimming velocity and the proportion of straighter trajectories (in comparison to unloaded capsules), the root mean square displacement is less than with unloaded capsules. Similarly, jump magnitude shows little variation with control values.

Pollutants can act through different modes of action, causing a tremendous variety of species-specific effects (Russom et al., 1997). Our knowledge on the toxic effects of PCBs in zooplankters is limited and insufficient to link the observed behavioural response to molecular toxicity. In our measurements, exposure to PCB induced very strong hyperactivity. The increase in mean swimming speed is much more significant than with empty capsules and occurs immediately, both in males and in females. These results suggest strong contact toxicity and agree well with our second

hypothesis. The level of spontaneous swimming activity and the mean swimming velocity drop substantially after one day of exposure. Because at $t=24 \text{ h}$ the probability density function of the velocity deviates substantially from that observed with empty capsules (in both genders) and over a wider range of values in males (from 5 to 15 mm s^{-1}), our results suggest systemic effects of PCB, in addition to fatigue caused by the unloaded carriers. These results tend to agree with our third hypothesis. Large differences are also visible between genders at $t=24 \text{ h}$ in the spatial properties of motion. In males, the degree of trajectory sinuosity following exposure to PCB does not differ substantially from that observed in clean water and with empty capsules. Consequently, the root mean square displacement reduces strongly with swimming velocity, toward control values. In females, trajectories are straighter in the presence of empty capsules and this effect persists during exposure to pollutants. The spatial extent of their motion (compared to control condition) remains larger than in males, despite the strong reduction in swimming speed.

We observed a much stronger hyperactivity and a much larger increase in swimming speed in males than in females, for both empty capsules and capsules loaded with PAHs. We also found that a 24 h exposure to PCB had less impact on the swimming velocity in females than in males, with effects visible over a much smaller range of velocity values (Fig. 3). Several studies have pointed out the greater sensitivity of male copepods to various environmental stressors, for instance salinity shocks (Chen et al., 2006), diatom aldehydes (Taylor et al., 2007) or insecticides (Medina et al., 2002; Chandler et al., 2004). This greater sensitivity translates into different behavioural response: *P. annandalei* males react much more strongly than females to a progressive salinity increase and to a diatom toxin (Michalec et al., 2012, 2013b). Boulangé-Lecomte et al. (2014) observed a weaker constitutive expression of the two major heat shock proteins (*Grp78* and *Hsp90A*) in *E. affinis* males than in females, indicating gender-specific stress tolerance and suggesting that substantial basal levels of expression may give females higher tolerance to stress conditions. Induction of heat shock proteins occurs rapidly in calanoid copepods (Gonzalez and Bradley, 1994; Xuereb et al., 2012) but whether these enzymes contribute substantially to the higher resistance of females to chemical stress remains unknown. Other xenobiotic-metabolizing enzyme systems such as the CYP monooxygenase or glutathione S-transferase are mainly responsible for the detoxification of large hydrophobic and toxic xenobiotic from the tissues (Lauritano et al., 2012). Whether these enzymes give female copepods more efficient and effective mechanisms involved in stress response than males has yet to be tested.

Very few studies have linked changes in swimming behaviour induced by pollutants to changes in ecological processes in zooplanktonic organisms. One-day exposure to sublethal concentrations of the water accommodated fraction of crude oil significantly increased the positive phototactic behaviour of the calanoid copepod *Calanus finmarchicus*, which may lead to changes in the vertical distribution of this species after offshore oil-spills (Miljeteig et al., 2013). Exposure to PCBs affected the response of *Daphnia* to the presence of fish kairomone and toxic filamentous cyanobacteria, which may result in an incorrect response to these biotic threats (Bernatowicz and Pijanowska, 2011). Fullerenes altered the vertical migration response of *D. magna* to the presence of food (Brausch et al., 2011). In calanoid copepods, the ecological significance of behavioural impairments on trophic interactions remains to be tested, but we can offer some assumptions based on the literature. Swimming behaviour has greatly contributed to the evolutionary success of calanoid copepods (Kiørboe, 2011). Behaviour mediates how they exploit their environment and interact with other organisms. Consequently, these small animals have evolved optimal motion strategies that are believed to enhance

mating encounters and foraging efficiency and minimize dangerous meetings with planktonic predators (Visser and Kjørboe, 2006; Kjørboe, 2008; Bianco et al., 2014). Variations in the optimal configuration of their trajectories following exposure to pollutants may destabilize the trade-off between beneficial and detrimental encounters (Visser, 2007). In Dodson et al. (1995) for instance, individual *Daphnia* treated with the pesticide carbaryl were preferentially eaten by bluegill sunfish, because of marked changes in their motility pattern. Hyperactivity and swimming faster may also lead to impairment in behavioural processes and to a reduced fitness because they determine both conspicuousness to predators and encounter rates. For instance, stripped bass fed at higher rates on nauplii *E. affinis* that were hyperactive due to exposure to copper (Sullivan et al., 1983). The success of copepods in feeding, reproducing and escaping predation depends on their relative velocity with respect to their prey, their mate and their predator from the time of the detection to the end of the interaction (Adhikari and Longmire, 2013). Compounds that influence the evasive ability of an organism may therefore directly affect its ability to avoid predation. Souissi et al. (2013) observed changes in swimming behaviour caused by fatigue, and reduced mating success in *E. affinis* following epibiont ciliate infestation. Similar effects on mating success are likely to occur following exposure to pollution, but this remains to be tested. Hyperactivity may also impair the ability of copepods to detect food particles in their feeding currents. Jiang et al. (2002b) demonstrated that a copepod swimming slowly can use chemoreception to remotely detect individual algae entrained by its surrounding flow field, whereas this is not feasible in fast-swimming individuals. Using numerical simulation, Jiang et al. (2002a) also showed that swimming slowly is more energetically efficient in terms of relative capture volume per energy expended than swimming faster. Irrespective of their feeding behaviour and size, copepods converge on optimal, size-independent specific clearance rates that maximize the net energy gain over the predation risk (Kjørboe and Jiang, 2013). Variation in the properties of their motion following fatigue or physiological incapacitation may result in a switch from preferred swimming strategies to less optimal behaviours.

Although we did not replicate measurements, we minimized the effects of unknown sources of variance by conducting measurements within a few days to prevent possible differences in swimming behaviour between generations, and with adult copepods from the same stable culture to avoid possible effects caused by different rearing conditions (Souissi et al., 2010). We have also recorded the motion of many organisms to account for the high inter-individual variability in copepod behaviour (Michalec et al., 2012).

In copepod ecology, little toxicological research has sought to integrate behavioural effects with molecular and physiological processes. It is therefore difficult to relate our results to observations from the literature. Future studies are needed to improve our knowledge on the complex impact of toxicants on zooplankton behaviour. The difference between contact and systemic behavioural toxicity of many common aquatic pollutants is not well studied. Nanocapsules offer the advantage that they mimic trophic exposure while eliminating the need of phytoplankton. They also represent an innovative alternative to the use of solvent, and are stable and homogeneously distributed in the water medium. It is our hope that this work will motivate further research on the development of nanosystems for behavioural testing. Calanoid copepods are only beginning to be considered as model species in behavioural assays. Our results add some new insights into the interactions between waterborne pollution and copepods. They prompt us to further explore how these important organisms react to the mixture of toxicants present in their environment.

Authors' contributions

S. Souissi and R.B. designed the experiments. A.S. and S. Souissi provided the test organisms. A.S. contributed to copepod acclimation and sorting. S. Stancheva, A.B. and R.B. synthesized the lipid nanocapsules and quantified pollutant encapsulation rate and nanocapsule stability. F.-G.M. carried out the measurements, performed data analysis and wrote the manuscript. M.H. participated in data analysis and helped draft the manuscript. All authors gave final approval for publication.

Funding statement

S. Souissi and R.B. gratefully acknowledge financial support from Lille 1 University (BQR 2014 *Convergence* grant). F.-G.M. and M.H. acknowledge support from Swiss National Science Foundation (SNSF) grant No. 144645 and ETH grant No. 2914-1. S. Stancheva was supported by a CIFRE grant from PFI Nouvelles Vagues (Boulogne-sur-Mer, France). This work is a contribution to the bilateral agreement between ETH Zurich and Lille 1 University, and to the ZOOGLOBAL project funded by GIP Seine-Aval. The funding sources had no involvement in study design and in the analysis and interpretation of data.

Acknowledgements

We are thankful to Y.-J. Pan for culturing copepods and algae and for his assistance during the experiments. We thank C. Spriet for his help in obtaining confocal microscopy images of copepods, D. Menu for manufacturing the experimental setup and the anonymous reviewers for their constructive comments.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.08.010>.

References

- Adhikari, D., Longmire, E.K., 2013. Infrared tomographic PIV and 3D motion tracking system applied to aquatic predator–prey interaction. *Meas. Sci. Technol.* **24**, 024011.
- Almeda, R., Baca, S., Hyatt, C., Buskey, E.J., 2014a. Ingestion and sublethal effects of physically and chemically dispersed crude oil on marine planktonic copepods. *Ecotoxicology* **23**, 988–1003.
- Almeda, R., Wambaugh, Z., Wang, Z., Hyatt, C., Liu, Z., Buskey, E.J., 2014b. Interactions between zooplankton and crude oil: toxic effects and bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *PLOS ONE* **8**, e67212.
- Ardekani, R., Biyani, A., Dalton, J.E., Saltz, J.B., Arbeitman, M.N., Tower, J., Nuzhdin, S., Tavaré, S., 2013. Three-dimensional tracking and behaviour monitoring of multiple fruit flies. *J. R. Soc. Interface* **10**, 20120547.
- Attanasi, A., Cavagna, A., Del Castello, L., Giardina, I., Jelic, A., Melillo, S., Parisi, L., Pohl, O., Shen, E., Viale, M., 2015. Emergence of collective changes in travel direction of starling flocks from individual birds' fluctuations. *J. R. Soc. Interface* **12**, 20150319.
- Barata, C., Calbet, A., Saiz, E., Ortiz, L., Bayona, J.M., 2005. Predicting single and mixture toxicity of petrogenic polycyclic aromatic hydrocarbons to the copepod *Oithona davisae*. *Environ. Toxicol. Chem.* **24**, 2992–2999.
- Baun, A., Hartmann, N.B., Grieger, K., Kusk, K.O., 2008. Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: a brief review and recommendations for future toxicity testing. *Ecotoxicology* **17**, 387–395.
- Bellas, J., Thor, P., 2007. Effects of selected PAHs on reproduction and survival of the calanoid copepod *Acartia tonsa*. *Ecotoxicology* **16**, 465–474.
- Bernatowicz, P., Pijanowska, J., 2011. *Daphnia* response to biotic stress is modified by PCBs. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **74**, 711–718.
- Berrojalbiz, N., Lacorte, S., Calbet, A., Saiz, E., Barata, C., Dachs, J., 2009. Accumulation and cycling of polycyclic aromatic hydrocarbons in zooplankton. *Environ. Sci. Technol.* **43**, 2295–2301.
- Bianco, G., Mariani, P., Visser, A.W., Mazzocchi, M.G., Pigolotti, S., 2014. Analysis of self-overlap reveals trade-offs in plankton swimming trajectories. *J. R. Soc. Interface* **11**, 20140164.

- Blinova, N.K., Cherkashin, S.A., 2012. The olfactory system of crustaceans as a model for ecologo-toxicological studies. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 48, 155–156.
- Boulangé-Lecomte, C., Forget-Leray, J., Xuereb, B., 2014. Sexual dimorphism in Grp78 and Hsp90A heat shock protein expression in the estuarine copepod *Eurytemora affinis*. *Cell Stress Chaperones* 19, 591–597.
- Brausch, K.A., Anderson, T.A., Smith, P.N., Maul, J.D., 2011. The effect of fullerenes and functionalized fullerenes on *Daphnia magna* phototaxis and swimming behaviour. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 878–884.
- Bunjes, H., 2010. Lipid nanoparticles for the delivery of poorly water-soluble drugs. *J. Pharm. Pharmacol.* 62, 1637–1645.
- Buskey, E.J., 1998. Energetic costs of swarming behavior for the copepod *Dioithona oculata*. *Mar. Biol.* 130, 425–431.
- Cailleaud, K., Budzinski, H., Lardy, S., Augagneur, S., Barka, S., Souissi, S., Forget-Leray, J., 2011a. Uptake and elimination, and effect of estrogen-like contaminants in estuarine copepods: an experimental study. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 18, 226–236.
- Cailleaud, K., Budzinski, H., Menach, K.L., Souissi, S., Forget-Leray, J., 2009a. Uptake and elimination of hydrophobic organic contaminants in estuarine copepods: an experimental study. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 239–246.
- Cailleaud, K., Forget-Leray, J., Peluhet, L., LeMenach, K., Souissi, S., Budzinski, H., 2009b. Tidal influence on the distribution of hydrophobic organic contaminants in the Seine Estuary and biomarker responses on the copepod *Eurytemora affinis*. *Environ. Pollut.* 157, 64–71.
- Cailleaud, K., Forget-Leray, J., Souissi, S., Hilde, D., LeMenach, K., Budzinski, H., 2007a. Seasonal variations of hydrophobic organic contaminant concentrations in the water-column of the Seine Estuary and their transfer to a planktonic species *Eurytemora affinis* (Calanoida, copepoda). Part 1: PCBs and PAHs. *Chemosphere* 70, 270–280.
- Cailleaud, K., Forget-Leray, J., Souissi, S., Lardy, S., Augagneur, S., Budzinski, H., 2007b. Seasonal variation of hydrophobic organic contaminant concentrations in the water-column of the Seine Estuary and their transfer to a planktonic species *Eurytemora affinis* (Calanoid, copepod). Part 2: Alkylphenol-polyethoxylates. *Chemosphere* 70, 281–287.
- Cailleaud, K., Michalec, F.G., Forget-Leray, J., Budzinski, H., Hwang, J.S., Schmitt, F.G., Souissi, S., 2011b. Changes in the swimming behavior of *Eurytemora affinis* (Copepoda, Calanoida) in response to a sub-lethal exposure to nonylphenols. *Aquat. Toxicol.* 102, 228–231.
- Carls, M.G., Short, J.W., Payne, J., 2006. Accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Neocalanus* copepods in Port Valdez, Alaska. *Mar. Pollut. Bull.* 52, 1480–1489.
- Chandler, G.T., Cary, T.L., Volz, D.C., Walse, S.S., Ferry, J.L., Klosterhaus, S.L., 2004. Fipronil effects on estuarine copepod (*Amphiascus tenuiremis*) development, fertility, and reproduction: a rapid life-cycle assay in 96-well microplate format. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 117–124.
- Chang, S.I., Reinfelder, J.R., 2002. Relative importance of dissolved versus trophic bioaccumulation of copper in marine copepods. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 231, 179–186.
- Chen, A., Sheng, J., Lin, Q., Gao, Y., Lv, J., 2006. Effect of salinity on reproduction and survival of the copepod *Pseudodiaptomus annandalei* Sewell, 1919. *Aquaculture* 258, 575–582.
- Chevalier, J., Harscoët, E., Keller, M., Pandard, P., Cachot, J., Grote, M., 2015. Exploration of daphnia behavioral effect profiles induced by a broad range of toxicants with different modes of action. *Environ. Toxicol. Chem.* <http://dx.doi.org/10.1002/etc.2979>.
- Cianelli, D., Uttieri, M., Strickler, J.R., Zambianchi, E., 2009. Zooplankton encounters in patchy particle distributions. *Ecol. Model.* 220, 596–604.
- Clotfelter, E.D., Bell, A.M., Levering, K.R., 2004. The role of animal behaviour in the study of endocrine-disrupting chemicals. *Anim. Behav.* 68, 665–676.
- Coon, J.S., Knudson, W., Clodfelter, K., Lu, B., Weinstein, R.S., 1991. Solutol HS 15, nontoxic polyxyethylene esters of 12-hydroxystearic acid, reverses multidrug resistance. *Cancer Res.* 51, 897–902.
- Cowles, T.J., 1983. Effects of exposure to sublethal concentrations of crude oil on the copepod *Centropages hamatus*. II. Activity patterns. *Mar. Biol.* 78, 53–57.
- Devreker, D., Souissi, S., Molinero, J.C., Nkubito, F., 2008. Trade-offs of the copepod *Eurytemora affinis* in mega-tidal estuaries: insights from high frequency sampling in the Seine estuary. *J. Plankton Res.* 30, 1329–1342.
- Devreker, D., Souissi, S., Winkler, G., Forget-Leray, J., Leboulanger, F., 2009. Effects of salinity, temperature and individual variability on the reproduction of *Eurytemora affinis* (Copepoda; Calanoida) from the Seine estuary: a laboratory study. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 368, 113–123.
- Dodson, S.I., Hanazato, T., Gorski, P.R., 1995. Behavioral responses of *Daphnia pulex* exposed to carbaryl and *Chaoborus kairomone*. *Environ. Toxicol. Chem.* 14, 43–50.
- Dracos, T. (Ed.), 1996. Three-dimensional velocity and vorticity measuring and image analysis techniques: lecture notes from the short course held in Zürich, Switzerland, 3–6 September 1996. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston.
- Duquesne, S., Küster, E., 2010. Biochemical, metabolic, and behavioural responses and recovery of *Daphnia magna* after exposure to an organophosphate. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 353–359.
- Escher, B.L., Hermens, J.L.M., 2002. Modes of action in ecotoxicology: their role in body burdens, species sensitivity, QSARs, and mixture effects. *Environ. Sci. Technol.* 36, 4201–4217.
- Fernandes, M.B., Sicre, M.A., Boireau, A., Tronczynski, J., 1997. Polyaromatic hydrocarbon (PAH) distributions in the Seine River and its Estuary. *Mar. Pollut. Bull.* 34, 857–867.
- Fisher, N.S., Hook, S.E., 2002. Toxicology tests with aquatic animals need to consider the trophic transfer of metals. *Toxicology* 181–182, 531–536.
- Forget-Leray, J., Landriau, I., Minier, C., Leboulanger, F., 2005. Impact of endocrine toxicants on survival, development, and reproduction of the estuarine copepod *Eurytemora affinis* (Poppe). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60, 288–294.
- Garaventa, F., Gambardella, C., Fino, A.D., Pittore, M., Faimali, M., 2010. Swimming speed alteration of *Artemia* sp. and *Brachionus plicatilis* as a sub-lethal behavioural end-point for ecotoxicological surveys. *Ecotoxicology* 19, 512–519.
- Garrido, S., Cruz, J., Santos, A.M.P., Ré, P., Saiz, E., 2013. Effects of temperature, food type and food concentration on the grazing of the calanoid copepod *Centropages chierchiae*. *J. Plankton Res.* 35, 843–854.
- Gonzalez, C.R.M., Bradley, B.P., 1994. Salinity stress proteins in *Eurytemora affinis*. *Hydrobiologia* 292–293, 461–468.
- Guo, F., Wang, L., Wang, W.X., 2012. Acute and chronic toxicity of polychlorinated biphenyl 126 to *Triopopus japonicus*: effects on survival, growth, reproduction, and intrinsic rate of population growth. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 639–645.
- Henry, M., Béguin, M., Requier, F., Rollin, O., Odoux, J.F., Aupinel, P., Aptel, J., Tchamitchian, S., Decourtye, A., 2012. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science* 336, 348–350.
- Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J.E., Benoit, J.P., 2002. A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. *Pharm. Res.* 19, 875–880.
- Hutchinson, T.H., Shillabeer, N., Winter, M.J., Pickford, D.B., 2006. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: a critical review. *Aquat. Toxicol.* 76, 69–92.
- Jarvis, T.A., Miller, R.J., Lenihan, H.S., Bielmyer, G.K., 2013. Toxicity of ZnO nanoparticles to the copepod *Acartia tonsa*, exposed through a phytoplankton diet. *Environ. Toxicol. Chem.* 32, 1264–1269.
- Jiang, H., Kiørboe, T., 2011. The fluid dynamics of swimming by jumping in copepods. *J. R. Soc. Interface* 8, 1090–1103.
- Jiang, H., Meneveau, C., Osborn, T.R., 2002a. The flow field around a freely swimming copepod in steady motion. Part II: Numerical simulation. *J. Plankton Res.* 24, 191–213.
- Jiang, H., Osborn, T.R., Meneveau, C., 2002b. Chemoreception and the deformation of the active space in freely swimming copepods: a numerical study. *J. Plankton Res.* 24, 495–510.
- Kelley, D.H., Ouellette, N.T., 2013. Emergent dynamics of laboratory insect swarms. *Sci. Rep.* 3, 1073.
- Kienle, C., Gerhardt, A., 2008. Behavior of *Corophium volutator* (Crustacea, Amphipoda) exposed to the water-accommodated fraction of oil in water and sediment. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 599–604.
- Kiørboe, T., 2008. Optimal swimming strategies in mate-searching pelagic copepods. *Oecologia* 155, 179–192.
- Kiørboe, T., 2011. What makes pelagic copepods so successful? *J. Plankton Res.* 33, 677–685.
- Kiørboe, T., Jiang, H., 2013. To eat and not be eaten: optimal foraging behaviour in suspension feeding copepods. *J. R. Soc. Interface* 10, 20120693.
- Kiørboe, T., Jiang, H., Colin, S.P., 2010. Danger of zooplankton feeding: the fluid signal generated by ambush-feeding copepods. *Proc. R. Soc. B* 277, 3229–3237.
- Kiørboe, T., Jiang, H., Gonçalves, R.J., Nielsen, L.T., Wadhwa, N., 2014. Flow disturbances generated by feeding and swimming zooplankton. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 11738–11744.
- Kirkpatrick, A., Gerhardt, A., Dick, J.T.A., McKenna, M., Berges, J.A., 2006. Use of the multispecies freshwater biomonitor to assess behavioral changes of *Corophium volutator* (Pallas, 1766) (Crustacea, Amphipoda) in response to toxicant exposure in sediment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64, 298–303.
- Koelmans, A.A., 2014. Limited reversibility of bioconcentration of hydrophobic organic chemicals in phytoplankton. *Environ. Sci. Technol.* 48, 7341–7348.
- Kwok, K.W.H., Souissi, S., Dur, G., Won, E.J., Lee, J.S., 2015. Copepods as reference species in estuarine and marine waters. In: Amiard-Triquet, C., Amiard, J.C., Mouneyrac, C. (Eds.), *Aquatic Ecotoxicology: Advancing Tools for Dealing with Emerging Risks*. Elsevier Academic Press, pp. 281–308.
- Lauritano, C., Procaccini, G., Ianora, A., 2012. Gene expression patterns and stress response in marine copepods. *Mar. Environ. Res.* 76, 22–31.
- Lee, K.W., Raisuddin, S., Hwang, D.S., Park, H.G., Lee, J.S., 2007. Acute toxicities of trace metals and common xenobiotics to the marine copepod *Triopopus japonicus*: evaluation of its use as a benchmark species for routine ecotoxicology tests in Western Pacific coastal regions. *Environ. Toxicol.* 22, 532–538.
- Lesueur, T., Boulangé-Lecomte, C., Restoux, G., Deloffre, J., Xuereb, B., Menach, K.L., Budzinski, H., Petrucciani, N., Marie, S., Petit, F., Forget-Leray, J., 2015. Toxicity of sediment-bound pollutants in the Seine estuary, France, using a *Eurytemora affinis* larval bioassay. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 113, 169–175.
- Lesueur, T., Boulangé-Lecomte, C., Xuereb, B., Budzinski, H., Cachot, J., Vicquelin, L., Giusti-Petrucciani, N., Marie, S., Petit, F., Forget-Leray, J., 2013. Development of a larval bioassay using the calanoid copepod *Eurytemora affinis* to assess the toxicity of sediment-bound pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 94, 60–66.
- Liberzon, A., Lüthi, B., Holzner, M., Ott, S., Berg, J., Mann, J., 2012. On the structure of acceleration in turbulence. *Physica D* 241, 208–215.
- Lopes, I., Baird, D.J., Ribeiro, R., 2004. Avoidance of copper contamination by field populations of *Daphnia longispina*. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 1702–1708.
- Lotufo, G.R., 1998. Bioaccumulation of sediment-associated fluoranthene in benthic copepods: uptake, elimination and biotransformation. *Aquat. Toxicol.* 44, 1–15.
- Lovern, S.B., Strickler, J.R., Klaper, R., 2007. Behavioral and physiological changes in *Daphnia magna* when exposed to nanoparticle suspensions (titanium dioxide, nano-C₆₀, and C₆₀HxC₇OHex). *Environ. Sci. Technol.* 41, 4465–4470.

- Lynn, S.G., Price, D.J., Birge, W.J., Kilham, S.S., 2007. Effect of nutrient availability on the uptake of PCB congener 2,2',6,6'-tetrachlorobiphenyl by a diatom (*Stephanodiscus minutulus*) and transfer to a zooplankton (*Daphnia pulex*). *Aquat. Toxicol.* 83, 24–32.
- Maas, H.G., Gruen, A., Papantoniou, D., 1993. Particle tracking velocimetry in three-dimensional flows. Part I. Photogrammetric determination of particle coordinates. *Exp. Fluids* 15, 133–146.
- Magnusson, K., Magnusson, M., Östberg, P., Granberg, M., Tiselius, P., 2007. Bioaccumulation of ¹⁴C-PCB 101 and ¹⁴C-PBDE 99 in the marine planktonic copepod *Calanus finmarchicus* under different food regimes. *Mar. Environ. Res.* 63, 67–81.
- Malik, N.A., Dracos, T., Papantoniou, D.A., 1993. Particle tracking velocimetry in three-dimensional flows. Part II. Particle tracking. *Exp. Fluids* 15, 279–294.
- McFarland, V.A., Clarke, J.U., 1989. Environmental occurrence, abundance, and potential toxicity of polychlorinated biphenyl congeners: considerations for a congener-specific analysis. *Environ. Health Perspect.* 81, 225–239.
- Medina, M., Barata, C., Telfer, T., Baird, D.J., 2002. Age- and sex-related variation in sensitivity to the pyrethroid cypermethrin in the marine copepod *Acartia tonsa* Dana. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42, 17–22.
- Melvin, S., Wilson, S.P., 2013. The utility of behavioral studies for aquatic toxicology testing: a meta-analysis. *Chemosphere* 93, 2217–2223.
- Michalec, F.G., Holzner, M., Hwang, J.S., Souissi, S., 2012. Three dimensional observation of salinity-induced changes in the swimming behavior of the estuarine calanoid copepod *Pseudodiaptomus annandalei*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 438, 24–31.
- Michalec, F.G., Holzner, M., Menu, D., Hwang, J.S., Souissi, S., 2013a. Behavioral responses of the estuarine calanoid copepod *Eurytemora affinis* to sub-lethal concentrations of waterborne pollutants. *Aquat. Toxicol.* 138–139, 129–138.
- Michalec, F.G., Kå, S., Holzner, M., Souissi, S., Ianora, A., Hwang, J.S., 2013b. Changes in the swimming behavior of *Pseudodiaptomus annandalei* (Copepoda, Calanoida) adults exposed to the diatom toxin 2-trans, 4-trans decadienal. *Harmful Algae* 30, 56–64.
- Michalec, F.G., Souissi, S., Holzner, M., 2015. Turbulence triggers vigorous swimming but hinders motion strategy in planktonic copepods. *J. R. Soc. Interface* 12, 20150158.
- Miljeteig, C., Olsen, A.J., Nordtug, T., Altin, D., Jenssen, B.M., 2013. Sublethal exposure to crude oil enhances positive phototaxis in the calanoid copepod *Calanus finmarchicus*. *Environ. Sci. Technol.* 47, 14426–14433.
- Moison, M., Schmitt, F.G., Souissi, S., 2012. Effect of temperature on *Temora longicornis* swimming behaviour: illustration of seasonal effects in a temperate ecosystem. *Aquat. Biol.* 16, 149–162.
- Raisuddin, S., Kwok, K.W.H., Leung, K.M.Y., Schlenk, D., Lee, J.S., 2007. The copepod *Tigriopus*: a promising marine model organism for ecotoxicology and environmental genomics. *Aquat. Toxicol.* 83, 161–173.
- Ren, Z., Li, Z., Ma, M., Wang, Z., Fu, R., 2009. Behavioral responses of *Daphnia magna* to stresses of chemicals with different toxic characteristics. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 82, 310–316.
- Ren, Z., Zha, J., Ma, M., Wang, Z., Gerhardt, A., 2007. The early warning of aquatic organophosphorus pesticide contamination by on-line monitoring behavioral changes of *Daphnia magna*. *Environ. Monit. Assess.* 134, 373–383.
- Rozon-Ramilo, L.D., Dubé, M.G., Squires, A.J., Niyogi, S., 2011. Examining waterborne and dietborne routes of exposure and their contribution to biological response patterns in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquat. Toxicol.* 105, 466–481.
- Russom, C.L., Bradbury, S.P., Broderius, S.J., Hammermeister, D.E., Drummond, R.A., 1997. Predicting modes of toxic action from chemical structure: acute toxicity in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 948–967.
- Sabia, L., Uttieri, M., Schmitt, F.G., Zagami, G., Zambianchi, E., Souissi, S., 2014. *Pseudodiaptomus marinus* Sato, 1913, a new invasive copepod in Lake Faro (Sicily): observations on the swimming behaviour and the sex-dependent responses to food. *Zool. Stud.* 53, 49.
- Saha, D., Soos, M., Lüthi, B., Holzner, M., Liberzon, A., Babler, M.U., Kinzelbach, W., 2014. Experimental characterization of breakage rate of colloidal aggregates in axisymmetric extensional flow. *Langmuir* 30, 14385–14395.
- Saiz, E., 1994. Observations of the free-swimming behavior of *Acartia tonsa*: effects of food concentration and turbulent water motion. *Limnol. Oceanogr.* 39, 1566–1578.
- Saiz, E., Movilla, J., Yebra, L., Barata, C., Calbet, A., 2009. Lethal and sublethal effects of naphthalene and 1,2-dimethylnaphthalene on naupliar and adult stages of the marine cyclopoid copepod *Oithona davisae*. *Environ. Pollut.* 157, 1219–1226.
- Sokolova, I.M., Frederich, M., Bagwe, R., Lanning, G., Sukhotin, A.A., 2012. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Mar. Environ. Res.* 79, 1–15.
- Sornom, P., Gismond, E., Vellinger, C., Devin, S., Féraud, J.F., Beisel, J.N., 2012. Effects of sublethal cadmium exposure on antipredator behavioural and anti-toxic responses in the invasive amphipod *Dikerogammarus villosus*. *PLOS ONE* 7, e42435.
- Souissi, A., Souissi, S., Hwang, J.S., 2013. The effect of epibiont ciliates on the behavior and mating success of the copepod *Eurytemora affinis*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 445, 38–43.
- Souissi, S., Michalec, F.G., Dur, G., Mahjoub, M.S., Schmitt, F.G., Hwang, J.S., 2010. How does salinity influence the swimming speed of the estuarine calanoid copepod *Eurytemora affinis*? Reply. *J. Plankton Res.* 32, 1227–1229.
- Stancheva, S., Souissi, A., Ibrahim, A., Barras, A., Spriet, C., Souissi, S., Boukherroub, R., 2015. Lipid nanocapsules as a new delivery system in copepods: toxicity studies and optical imaging. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 135, 441–447.
- Steinke, M., Stefels, J., Stadhuis, E., 2004. Dimethyl sulfide triggers search behavior in copepods. *Limnol. Oceanogr.* 23, 1702–1708.
- Sullivan, B.K., Buskey, E., Miller, D.C., Ritacco, P.J., 1983. Effects of copper and cadmium on growth, swimming and predator avoidance in *Eurytemora affinis* (Copepoda). *Mar. Biol.* 77, 229–306.
- Tackx, M.L.M., Herman, P.J.M., Gasparini, S., Irigoien, X., Billiones, R., Daro, M.H., 2003. Selective feeding of *Eurytemora affinis* (Copepoda, Calanoida) in temperate estuaries: model and field observations. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 56, 305–311.
- Taylor, R.L., Caldwell, G.S., Dunstan, H.J., Bentley, M.G., 2007. Short-term impacts of polyunsaturated aldehyde-producing diatoms on the harpacticoid copepod, *Tisbe holothuriae*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 341, 60–69.
- van Duren, L.A., Videler, J.J., 1995. Swimming behaviour of developmental stages of the calanoid copepod *Temora longicornis* at different food concentrations. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 126, 153–161.
- van Wezel, A.P., Opperhuizen, A., 1995. Narcosis due to environmental pollutants in aquatic organisms: residue-based toxicity, mechanisms, and membrane burdens. *Crit. Rev. Toxicol.* 25, 255–279.
- Visser, A.W., 2007. Motility of zooplankton: fitness, foraging and predation. *J. Plankton Res.* 29, 447–461.
- Visser, A.W., Kiorboe, T., 2006. Plankton motility patterns and encounter rates. *Oecologia* 148, 538–546.
- Vonarbourg, A., Passirani, C., Desigaux, L., Allard, E., Saulnier, P., Lambert, O., Benoit, J.P., Pitard, B., 2009. The encapsulation of DNA molecules within biomimetic lipid nanocapsules. *Biomaterials* 30, 3197–3204.
- Wang, W.X., Dei, R.C., 2001. Effects of major nutrient additions on metal uptake in phytoplankton. *Environ. Pollut.* 111, 233–240.
- Wang, X., Wang, W.X., 2005. Uptake, absorption efficiency and elimination of DDT in marine phytoplankton, copepods and fish. *Environ. Pollut.* 136, 453–464.
- Ward, A.J.W., Duff, A.J., Horsfall, J.S., Currie, S., 2008. Scents and scents-ability: pollution disrupts chemical social recognition and shoaling in fish. *Proc. R. Soc. B* 274, 101–105.
- Willneff, J., Gruen, A., 2002. A new spatio-temporal matching algorithm for 3D-particle tracking velocimetry. In: Proceedings of the 9th International Symposium on Transport Phenomena and Dynamics of Rotating Machinery, Honolulu, HI, USA, February.
- Wolf, M., Lüthi, B., Holzner, M., Krug, D., Kinzelbach, W., Tsinober, A., 2012. Investigations on the local entrainment velocity in a turbulent jet. *Phys. Fluids* 24, 105110.
- Xu, Y., Wang, W.X., Hsieh, D.P.H., 2001. Influences of metal concentration in phytoplankton and seawater on metal assimilation and elimination in marine copepods. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 1067–1077.
- Xuereb, B., Forget-Leray, J., Souissi, S., Glippa, O., Devreker, D., Lesueur, T., Marie, S., Danger, J.M., Boulangé-Lecomte, C., 2012. Molecular characterization and mRNA expression of grp78 and hsp90A in the estuarine copepod *Eurytemora affinis*. *Cell Stress Chaperones* 17, 457–472.
- Zala, S.M., Penn, D.J., 2004. Abnormal behaviours induced by chemical pollution: a review of the evidence and new challenges. *Anim. Behav.* 68, 649–664.
- Zein, M.A., McElmurry, S.P., Kashian, D.R., Savolainen, P.T., Pitts, D.V., 2015. Toxic effects of combined stressors on *Daphnia pulex*: interactions between diazinon, 4-nonylphenol, and wastewater effluent. *Environ. Toxicol. Chem.* 34, 1145–1153.