

La surveillance de la qualité du milieu marin : l'expérience du Réseau national d'observation (RNO) et le développement de biomarqueurs

Claude Amiard-Triquet¹, Thierry Burgeot² & Didier Claisse²

¹ CNRS, GDR 1117
ISOMer, SMAB, Écotoxicologie
2, rue de la Houssinière
BP 92208
44322 Nantes cedex 01
claud.amiard-triquet@isomer.univ-nantes.fr

² IFREMER
rue de l'Île d'Yeu
BP 1105
44311 Nantes cedex 01

Mots clés : contaminants chimiques, biosurveillance, bio-indicateurs, biomarqueurs

Résumé

La surveillance de la qualité du milieu marin est principalement basée sur l'analyse chimique des contaminants dans les principaux compartiments de l'environnement : eau de mer, sédiments, organismes. L'intérêt respectif de ces différentes matrices est discuté, et les bases fondamentales de l'utilisation des bivalves dans le « *Musset Watch* » et dans sa version française, le Réseau national d'observation de la qualité du milieu marin (RNO), sont présentées. Les objectifs du RNO sont d'évaluer :

- les niveaux et les tendances des contaminants et des paramètres généraux qui caractérisent la qualité de l'environnement ;
- les effets biologiques des contaminants.

L'analyse des contaminants chimiques dans les organismes est un complément indispensable à l'approche biologique, car elle permet de quantifier leur fraction biodisponible. Cependant, seule une fraction des xénobiotiques incorporés est biologiquement active et peut exercer un effet néfaste sur le vivant. De façon complémentaire, les biomarqueurs

permettent d'évaluer l'impact des polluants à différents niveaux d'organisation biologique. Certains de ces biomarqueurs sont maintenant considérés comme classiques : leur utilisation dans le milieu naturel est en phase de validation, et des procédures d'assurance qualité basées sur leur quantification sont en cours (EROD, MT, AChE, etc.). Cependant, la recherche de nouveaux biomarqueurs à différents niveaux d'organisation biologique est aussi nécessaire, afin de proposer un diagnostic global de l'état de santé d'un écosystème.

Biomonitoring of the marine environment quality: experiences of the French National Observation Network (RNO) and the development of biomarkers

Keywords: chemical contaminants, biomonitoring, bioindicators, biomarkers

Abstract

Monitoring of marine environment quality can be based on chemical analysis of contaminants in the major components of the environment: seawater, sediment, biota. The respective interest of these different matrices is discussed and the fundamentals for the use of bivalves in the International Mussel Watch and in the French RNO are presented. The objectives of the RNO are 1) to evaluate the levels and tendencies of contaminants and general parameters characterizing the quality of the environment; 2) to evaluate the biological effects of contaminants. Analysis of the chemicals in the biota is an indispensable complement to the biological approach, allowing their bioavailable fraction to be quantified. However, only a fraction of xenobiotics incorporated in living beings is biologically active and can exert a noxious effect on the biota. In addition, biological markers allow the assessment of the impact of pollutants at different levels of biological organization. Some of them are now considered as classical: their use in the field is in a validation phase and they are the object of quality control procedures based on their quantification (EROD, MT, AChE, etc.). However, the development of new biological markers ranging over different levels of biological organization is also needed.

1. Introduction

Le Réseau national d'observation de la qualité du milieu marin (RNO), mis en place en 1974 par le ministère de l'Aménagement du territoire et de l'Environnement, et coordonné par l'Institut français de recherche et d'exploitation de la mer (IFREMER), doit répondre à un double objectif :

— évaluer les niveaux et les tendances des contaminants et des paramètres généraux de la qualité du milieu ;

— évaluer les effets biologiques des contaminants sur la faune et la flore.

Cependant, pour des raisons de faisabilité et de développement méthodologique, l'activité principale du RNO repose depuis vingt-cinq ans sur l'analyse des contaminants chimiques dans les différents compartiments de l'environnement : eau, sédiment, organismes. La relative complexité du « monde vivant » limite le volet biologique à des études expérimentales sur des sites sensibles, pour des séries temporelles longues ou le développement d'indicateurs biologiques comme les bioessais et les biomarqueurs. L'analyse des contaminants chimiques apporte ainsi des informations très utiles sur les variations des niveaux de contamination sur l'ensemble du littoral français, mais cette approche est insuffisante pour évaluer le risque d'exposition et les effets sur des organismes vivants dans des habitats contaminés. L'analyse des contaminants chimiques dans les organismes demeure néanmoins très complémentaire de l'approche biologique, car elle caractérise une partie de la fraction biodisponible des contaminants présents dans l'environnement et effectivement incorporés et bioaccumulés dans les tissus vivants. Toutefois, c'est à partir des effets d'exposition que peut être estimée la toxicité de la fraction active des xénobiotiques assimilés.

Différentes approches méthodologiques ont été développées pour évaluer les effets biologiques des contaminants :

- les bioessais (HIS *et al.*, 1999 ; PAVILLON *et al.*, 1999, ce fascicule) ;
- les biomarqueurs (voir ROMÉO, 1999, ce fascicule) ;
- l'étude des impacts au niveau des communautés benthiques.

Cette dernière approche a été développée avec succès dans les milieux d'eau douce, et a abouti à la définition d'un indice biologique global normalisé (AFNOR, 1995). En milieu marin, il paraît plus difficile de mettre en évidence l'importance respective des facteurs naturels et de contamination (BACHELET & CASTEL, eds, 1997), à l'exception de phénomènes de contamination massive tels que la pollution accidentelle par les hydrocarbures qui a été bien décrite, particulièrement lors de l'échouage de l'*Amoco Cadiz* (GENTIL & DAUVIN, 1999). Toutefois des progrès peuvent être attendus de l'application à ce type d'études des analyses multivariées (CLARKE, 1999 ; MAUND *et al.*, 1999). Le travail de développement méthodologique et de validation des biomarqueurs sur le terrain réalisé depuis une quinzaine d'années dans le milieu aquatique (BURGEOT *et al.*, 1994 ; FLAMMARION, 1997), permet aujourd'hui de proposer un premier biomarqueur pour une norme AFNOR. La méthode de dosage d'activité enzymatique EROD est actuellement dans une phase probatoire avant de devenir une méthode de référence AFNOR.

2. Intérêt comparé des compartiments eau, sédiment et organismes pour l'évaluation de la contamination chimique de l'environnement

Nous allons passer en revue les avantages et les inconvénients d'utilisation de chacune de ces matrices environnementales.

2.1. Le compartiment « eau »

L'eau est le siège de fluctuations spatio-temporelles importantes, en particulier dans les milieux estuariens (LE DOUAREC, 1978; AVOINE, 1981), qui représentent des zones particulièrement à risque en raison de leur urbanisation et de leur industrialisation importantes (75 % de la population mondiale vit à moins de 50 km de la mer). Concomitamment, ces zones sont d'une grande richesse biologique et ont un rôle clef dans le développement de nombreuses espèces commercialisées. Elles sont soumises aux variations saisonnières et pluriannuelles du débit des fleuves, et au phénomène de la marée. En conséquence, en un point donné, la masse d'eau présente ne sera pas la même au cours de la journée, du mois, de l'année. Cette variation induit un problème majeur de représentativité de l'échantillonnage. En effet, si l'analyse en continu est actuellement maîtrisée pour les éléments majeurs, il n'en est pas de même pour les éléments à l'état de trace, ni pour les micropolluants organiques.

Du fait des faibles concentrations rencontrées, les difficultés à obtenir des prélèvements non contaminés et à en réaliser l'analyse constituent une seconde limitation à l'utilisation de la matrice eau pour l'évaluation de la contamination chimique du milieu marin dans des programmes de routine.

La matière en suspension dans l'eau, de nature minérale ou organique, vivante (phytoplancton) ou inerte, est constituée de particules de taille variable. Conventionnellement, il est généralement admis que la limite entre la phase soluble et la phase particulaire se situe à 0,45 μm , ce qui est faire abstraction de la phase colloïdale, dont l'importance dans la physico-chimie et la biodisponibilité des micropolluants ne peut pas être négligée (HOROWITZ *et al.*, 1996; EVS ENVIRONMENT CONSULTANTS, 1997). Les données de la littérature rapportent des concentrations de contaminants chimiques soit dans des eaux filtrées, soit dans des eaux brutes, qui sont difficilement comparables. De plus, la filtration peut influencer le résultat de la détermination soit que le micropolluant à doser est retenu partiellement par le système de filtration (erreur par défaut), soit que cette opération apporte une contamination secondaire, notable par rapport aux faibles concentrations environnementales (erreur par excès), ce qui peut se produire en particulier pour les contaminants métalliques.

Toutefois, en ce qui concerne un certain nombre de pesticides qui se caractérisent par leur dégradation relativement rapide dans le milieu, l'analyse

chimique dans la phase aqueuse apparaît comme pratiquement incontournable.

2.2. Le compartiment « sédiment »

Contrairement à ce que nous avons mentionné pour l'eau, le sédiment présente des concentrations plus élevées pour beaucoup de micropolluants, ce qui réduit assez généralement les difficultés analytiques, à condition toutefois que des procédures d'extraction adéquates aient été mises au point.

En opposition avec le compartiment eau, le sédiment apparaît comme un intégrateur à long terme, ce qui constitue un aspect positif quant à la représentativité de ce type d'échantillon à l'égard de la situation de contamination qui a prévalu sur le site étudié, dans la période qui a précédé la collecte.

Toutefois, il s'agit d'un milieu qui est encore relativement mobile comme en témoigne la variation de l'extension du bouchon vaseux en estuaire (accumulation de particules au point nodal correspondant à l'annulation des vitesses résiduelles des flux opposés d'eaux douce et marine) en fonction du débit du fleuve ou des coefficients de marée (LE DOUAREC, 1978; AVOINE, 1981), ou bien de l'alternance des remises en suspension et de la sédimentation dans les milieux côtiers, en particulier lorsque les conditions climatiques sont responsables d'un hydrodynamisme élevé.

Le sédiment se caractérise encore par son hétérogénéité qui est double, tenant à la fois à la nature des particules et à leur taille. La teneur en matière organique du sédiment est un facteur important de sa capacité à fixer les micropolluants minéraux (par exemple le cuivre a une grande affinité pour la matière organique) ou organiques. La capacité d'adsorption des matières en suspension (MES) à l'égard des polluants organiques non ioniques dépend de la matière organique contenue à la périphérie des particules, c'est pourquoi il a été proposé de normaliser la capacité d'adsorption sur la base du contenu en carbone organique des MES (ABBT-BRAUN & FRIMMEL, 1996).

Il est établi de longue date que ce sont les particules fines, riches en argiles, qui présentent la plus grande capacité de fixation des contaminants métalliques et radioactifs. Pour prendre en compte l'influence de la granulométrie, une procédure couramment utilisée consiste à mener l'analyse sur la fraction de l'échantillon de sédiment qui n'est pas retenue sur un tamis avec une ouverture de maille de 63 μm . La figure 1 montre les résultats d'une campagne effectuée en 1993 dans le cadre du RNO sur la baie de Seine (RNO, 1995) : plus la fraction fine est importante au sein d'un sédiment, plus la concentration de plomb, de zinc ou de cuivre dans le sédiment global est élevée. De ce fait, l'interprétation des résultats obtenus sur des sédiments bruts est peu fiable si l'on fait abstraction de la granulométrie. En revanche, si l'on compare les

sédiments originaires des deux zones étudiées en baie de Seine pour une richesse en fraction fine similaire, il devient possible de comparer les résultats (la zone est apparaissant comme plus contaminée que la zone ouest).

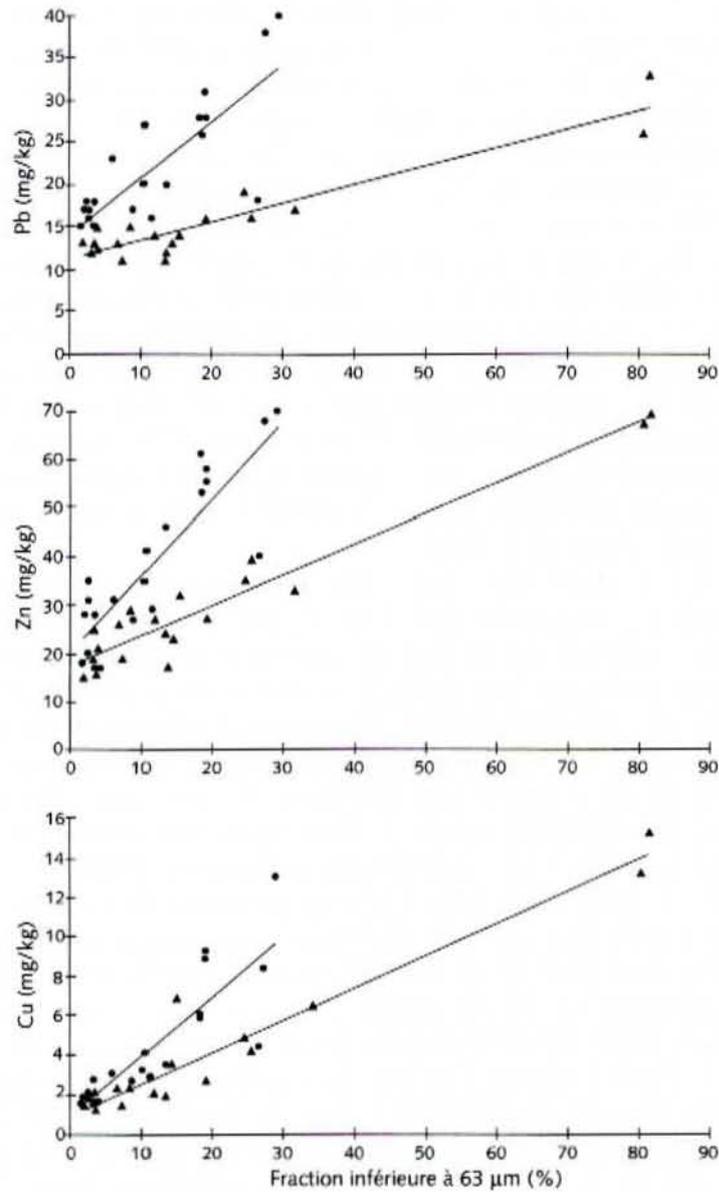


Figure 1 — Influence de la granulométrie sur les concentrations métalliques dans les sédiments de la baie de Seine (▲ : points ouest ; ● : points est). (RNO, 1995).

2.3. La matière vivante

La matière vivante apparaît comme un intégrateur à moyen terme pour un grand nombre de micropolluants. Les concentrations déterminées dans les tissus vivants sont généralement plus élevées que celles mesurées dans la phase aqueuse. Cette capacité de bioaccumulation des êtres vivants est quantifiée à l'aide d'un « facteur de concentration » que l'on peut définir, sans rentrer dans les détails, comme le rapport entre les concentrations respectives dans l'organisme et dans son environnement. Du fait de cette capacité de bioaccumulation, les quantités de contaminants présentes dans la matière vivante sont généralement suffisantes pour que les difficultés analytiques soient raisonnables. Toutefois, le fait de travailler sur des organismes vivants introduit quelques problèmes qui seront détaillés ci-dessous.

3. Analyse des contaminants dans la matière vivante

3.1. Critères de sélection d'une espèce bio-indicatrice

La capacité de bioaccumulation varie selon les espèces, et ce caractère intégrateur de la contamination du milieu va être primordial dans le choix d'un bio-indicateur pertinent. La capacité de métabolisation à l'égard d'un contaminant donné va aussi gouverner la concentration mesurée dans l'organisme à un instant t . L'étude de devenir des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et des polychlorobiphényles (PCB) dans la chaîne alimentaire du flet en estuaire de Seine a ainsi démontré une biomagnification des PCB et une diminution des HAP du bas vers le sommet de la chaîne trophique (ABARNOU *et al.*, 2000). En ce qui concerne les contaminants métalliques, le métabolisme propre à chaque espèce (ou groupe zoologique) a des implications dans le choix de celles qui pourraient être utilisées comme bio-indicateurs (RAINBOW, 1999, ce fascicule).

Toutefois, le critère de bioaccumulation n'est pas suffisant pour sélectionner une espèce et les différents impératifs ont été discutés lors de la mise en œuvre des programmes de surveillance basés sur l'analyse chimique dans la matière vivante (programmes du type *Mussel Watch*, in : NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1980, et sa version française le RNO) dans les pays développés. Pour que la surveillance puisse bénéficier du caractère intégrateur d'une espèce, il faut que les individus aient une durée de vie suffisante. Il faut également que les échantillons soient représentatifs des conditions du milieu où ils ont été prélevés, et les organismes sédentaires, en particulier les organismes fixés, répondent particulièrement bien à ce critère de représentativité. Dans un objectif de cartographie de la contamination de notre environnement à grande échelle, et si

possible à l'échelle mondiale, l'espèce bio-indicatrice doit être aussi ubiquiste que possible, résistante au stress pour être présente et permettre la surveillance des milieux les plus pollués, tolérante aux variations de salinité puisque nous avons souligné précédemment l'intérêt majeur des milieux estuariens. Enfin, la faisabilité de la biosurveillance nécessite de disposer d'individus d'une taille suffisante et en abondance pour faciliter la collecte et le traitement des échantillons. Les espèces qui répondent au mieux à l'ensemble de ces critères sont les huîtres et les moules, et les programmes comme le *Mussel Watch* (tels le RNO en France) sont basés sur différentes espèces de ces bivalves filtreurs.

3.2. Importance de la variabilité biologique

Nous avons évoqué ci-dessus, pour l'ensemble des êtres vivants, la variabilité interspécifique de la capacité de bioaccumulation. Même entre des espèces relativement proches tant du point de vue phylogénique qu'écologique comme les huîtres et les moules, cette variabilité est très importante comme cela est illustré dans la figure 2. Divers facteurs écologiques (taux de filtration différents, rétention de particules alimentaires de taille et de nature différentes) ont été invoqués pour expliquer cette observation, mais au moins pour les métaux comme le cadmium, le cuivre ou le zinc, la différence s'explique plus vraisemblablement par leur devenir au sein de l'organisme : accumulés dans des structures spécialisées de la cellule, les lysosomes, ils sont éliminés avec ceux-ci de façon régulière chez la moule, tandis que, chez l'huître, ils restent présents tout au long de la vie de l'animal dans ses lysosomes, mais ce mode de

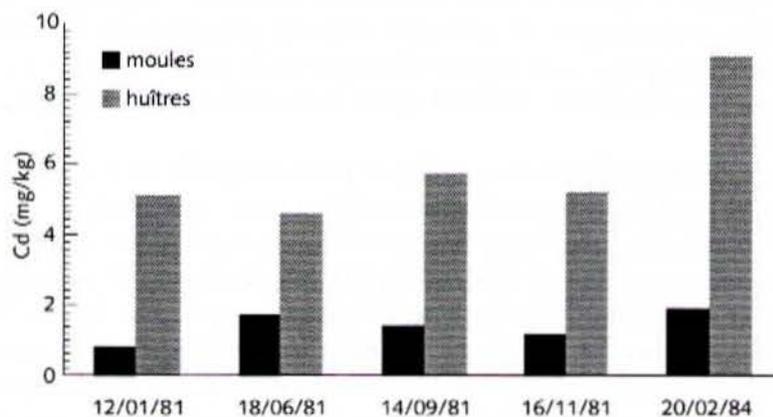


Figure 2 — Variation interspécifique des teneurs métalliques : l'exemple du cadmium dans des huîtres et des moules prélevées à une même date sur un même site (Boyardville, Charente-Maritime). Données RNO.

stockage assure leur innocuité à l'égard du bivalve.

Les variations saisonnières ont été souvent évoquées (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1980), mais la relation entre les taux de métaux et la condition des bivalves (période de reproduction, nourriture disponible) n'a été clairement établie qu'à l'aide des expériences dans le milieu naturel (BERTHET, 1986) ou en mésocosmes (AMIARD *et al.*, 1991, 1994), en utilisant des populations contrôlées. Ce point est d'une grande importance pour définir la stratégie d'échantillonnage dans le cadre de la biosurveillance comme l'illustre la figure 3. De 1979 à 1983, quatre prélèvements annuels ont été effectués dans le cadre du RNO, mais à des dates relativement aléatoires. En revanche, de 1984 à 1996, les prélèvements trimestriels ont eu lieu selon une rythmicité stricte. Au cours de la première de ces périodes de prélèvements, aucune tendance nette ne se dégage. Au cours de la seconde période, le cycle saisonnier des fluctuations de la concentration de cadmium est parfaitement mis en évidence, tandis qu'une tendance inter-annuelle à une diminution de la concentration apparaît clairement.

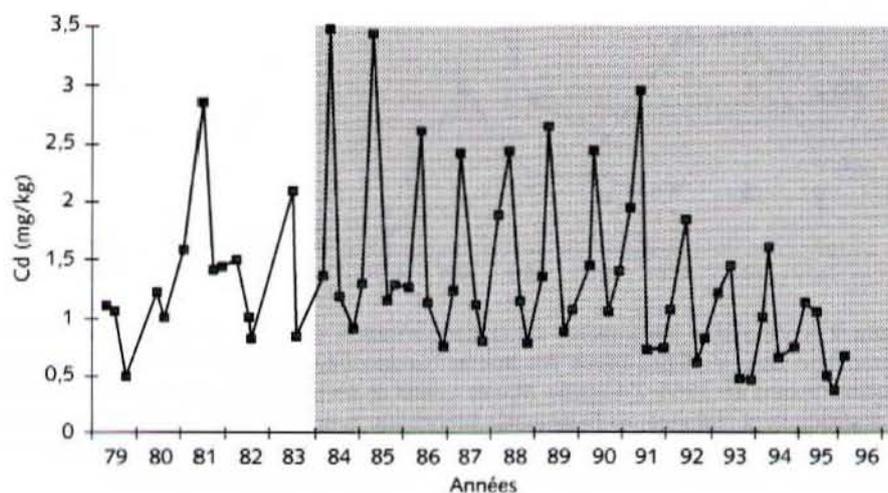


Figure 3 — Concentrations de cadmium dans les moules de La Moulière (Charente-Maritime), mesurées lors de prélèvements aléatoires (jusqu'en 1983), ou lors de prélèvements cycliques (trimestriels). Données RNO.

En ce qui concerne les contaminants organiques liposolubles, les variations saisonnières doivent être également prises en compte dans l'interprétation des résultats. La figure 4 montre les variations saisonnières des concentrations du DDT et de ses produits de dégradation dans les tissus mous de l'huître

Crassostrea virginica, dans trois estuaires texans. Comme c'est le cas dans cet exemple, la concentration des pesticides montre fréquemment un pic principal au printemps ou en été, c'est-à-dire à la période où ces pesticides étaient appliqués aux cultures. Cela paraît satisfaisant dans une optique de surveillance (*biomonitoring*), mais il faut tenir compte du fait qu'il se produit, de façon concomitante, un changement du contenu lipidique de l'organisme à relier au cycle sexuel (BUTLER *et al.*, 1972).

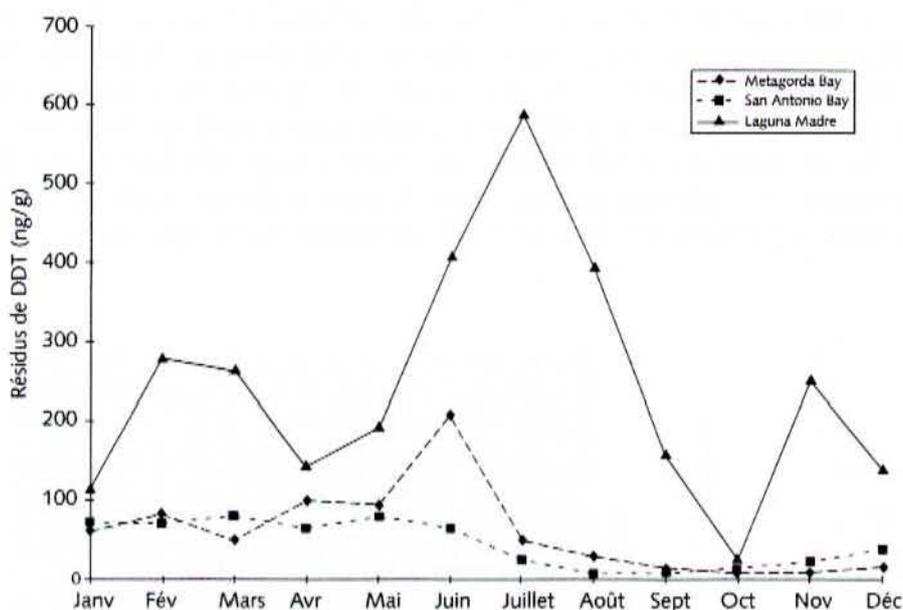


Figure 4 — Variations saisonnières de la concentration du DDT et de ses produits de dégradation dans les tissus mous des huîtres (*Crassostrea virginica*) prélevées dans trois estuaires texans en 1965. *i*) Laguna Madre : dans ce secteur, trois applications annuelles du pesticide sont réalisées; *ii*) Matagorda Bay et San Antonio Bay : une seule application annuelle au printemps. Les tonnages utilisés en 1965 atteignaient respectivement 950, 154 et 180 tonnes pour chacun de ces trois secteurs. D'après BUTLER *et al.* (1972).

La nourriture disponible est également un paramètre important de la condition des bivalves. Une expérience de transplantation menée en 1996, sur 84 stations implantées au long des 1 800 km de la façade méditerranéenne française, a permis de confirmer l'influence prédominante de l'état énergétique du bio-intégrateur sur la bioaccumulation des contaminants chimiques. Des modèles biologiques d'ajustement ont été proposés pour s'affranchir de ce phénomène (ANDRAL & STANISIÈRE, 1999). Ceci est particulièrement important dans le cas d'une surveillance basée sur des organismes transplantés, en particulier

lorsque ce procédé vise à combler l'absence de populations sauvages, généralement liée à des conditions de milieu défavorables pour l'espèce.

L'âge des individus apparaît aussi parmi les facteurs qui contrôlent le degré de contamination des individus, qu'il s'agisse de polluants cumulatifs (comme cela a été montré pour le cuivre chez la littorine, le zinc chez l'huître, le mercure et le sélénium chez les mammifères marins) ou de métaux essentiels à l'égard desquels les besoins sont différents selon le stade vital. Chez les jeunes individus, les concentrations initialement élevées décroissent lorsque la taille et l'âge s'accroissent, jusqu'à la maturité sexuelle. La relation concentration-taille reste alors stable jusqu'à ce que l'individu cesse de croître et atteigne la sénescence au cours de laquelle on assiste à nouveau à un accroissement des concentrations (figure 5, d'après COSSA, 1989).

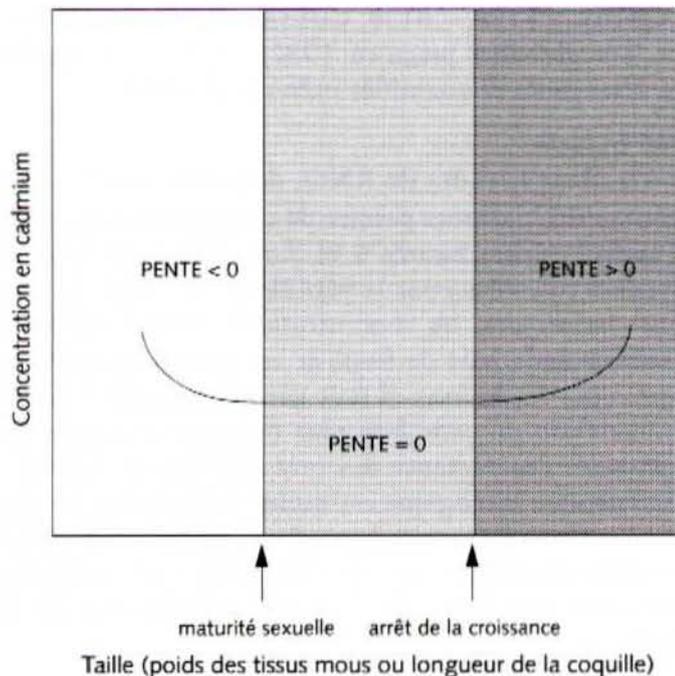


Figure 5 — Courbe théorique représentant l'évolution de la concentration d'un contaminant chimique au cours de la vie d'un bivalve utilisé comme bio-indicateur (d'après COSSA, 1989).

Il ressort de l'ensemble de ces considérations que, en dépit de ses avantages manifestes, l'utilisation d'organismes vivants, et plus particulièrement l'huître et la moule, en tant que bio-indicateurs de contamination, nécessite de grandes précautions d'échantillonnage pour contrôler un maximum de facteurs.

3.3. Les acquis du RNO

Les paramètres généraux de la qualité du milieu sont mesurés dans l'eau depuis 1974, les contaminants dans les organismes et les sédiments depuis 1979.

3.3.1. Sites surveillés et contaminants mesurés dans la matière vivante

Une liste non exhaustive des sites surveillés est fournie dans les figures 6 et 7.

Les contaminants mesurés comprennent :

- cinq métaux (Cd, Cu, Hg, Pb, Zn) ;
- des contaminants organiques : DDT et ses produits de dégradation (DDD, DDE), hexachlorocyclohexane (α HCH) et lindane (γ HCH), polychlorobiphényles (PCB) et hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).

En ce qui concerne les PCB, les différents congénères n'étaient pas distingués jusqu'en 1992, tandis que, depuis 1993, la quantification concerne séparément CB28, CB52, CB101, CB118, CB138, CB153, CB180. De même, les HAP ont été dosés dans leur globalité jusqu'en 1992, tandis que, depuis 1994, seize composés sont déterminés et quantifiés individuellement.

3.3.2. Variabilité spatiale

La mise en œuvre, dans le cadre du RNO, de toutes les précautions d'échantillonnage mentionnées ci-dessus permet de comparer le degré de contamination des sites surveillés. Les figures 6 et 7 montrent les résultats obtenus à partir des moyennes calculées pour la période 1979-1993. En ce qui concerne le cadmium chez les moules, les concentrations les plus élevées sont rencontrées dans le secteur de la baie de Seine et sur la côte méditerranéenne, dans l'étang de Bages. Pour les huîtres, il faut garder présente à l'esprit leur capacité de bioaccumulation du cadmium plus marquée que celle des moules, ce qui incite à relativiser l'importance des pics observés en rade de Brest tandis que cette caractéristique biologique est moins importante lorsque l'on considère la pollution par le cadmium en Gironde (BOUTIER *et al.*, 1989) et dans les zones côtières adjacentes (figure 6). Pour les PCB, la biosurveillance souligne la contamination très importante de l'estuaire de la Seine et des zones côtières adjacentes (figure 7).

3.3.3. Variabilité temporelle

L'étude de la variabilité temporelle est d'une importance primordiale, qu'il s'agisse de mettre en évidence le succès d'une mesure visant à réduire la contamination de l'environnement, ou une augmentation de la concentration d'un contaminant dont il convient alors de repérer la source.

Ainsi, l'interdiction de l'usage du DDT (très répandu en sylviculture dans la forêt landaise) a conduit à une diminution marquée des concentrations de ce contaminant et de ses produits de dégradation dans les tissus des

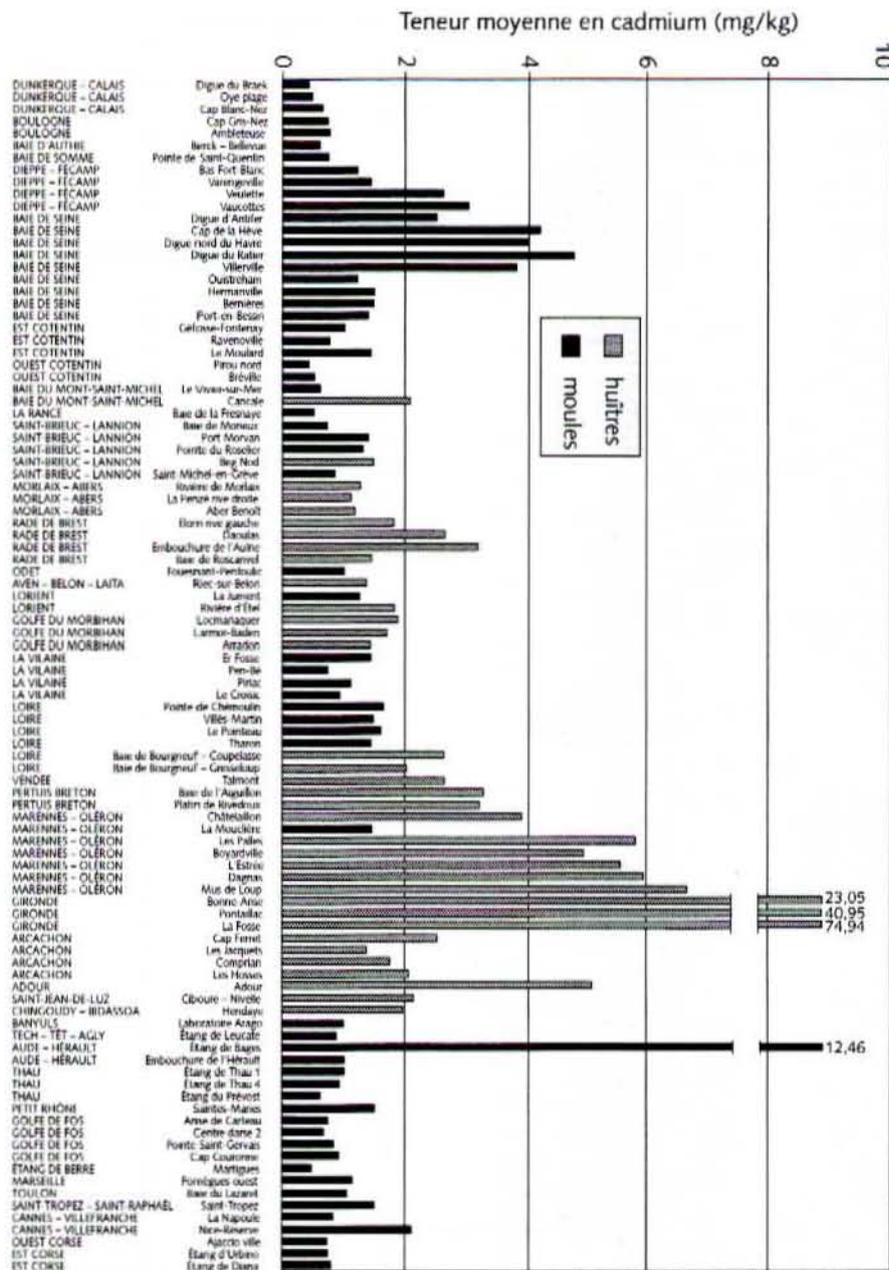


Figure 6 — Teneurs moyennes en cadmium (1979-1993) dans les tissus mous de moules et d'huîtres récoltées sur les côtes françaises dans le cadre du Réseau national d'observation de la qualité du milieu marin (RNO, 1995).

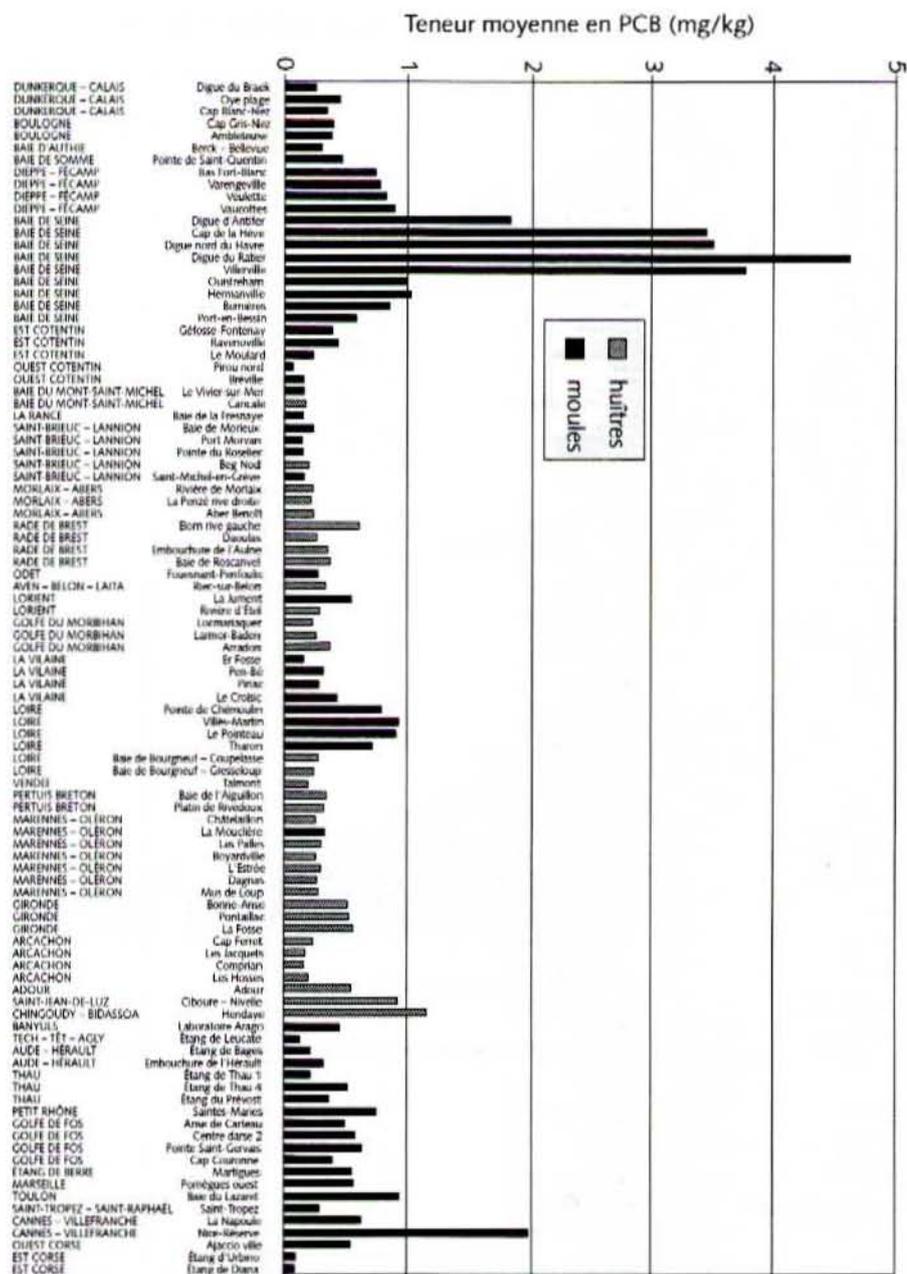


Figure 7 — Teneurs moyennes en PCB (1979-1993) dans les tissus mous de moules et d'huîtres récoltées sur les côtes françaises dans le cadre du Réseau national d'observation de la qualité du milieu marin (RNO, 1995).

huîtres prélevées dans le bassin d'Arcachon (figure 8). La persistance de taux relativement élevés tient au fait que les résultats présentés somment le DDT et ses produits de dégradation, et qu'il s'agit de composés très rémanents.

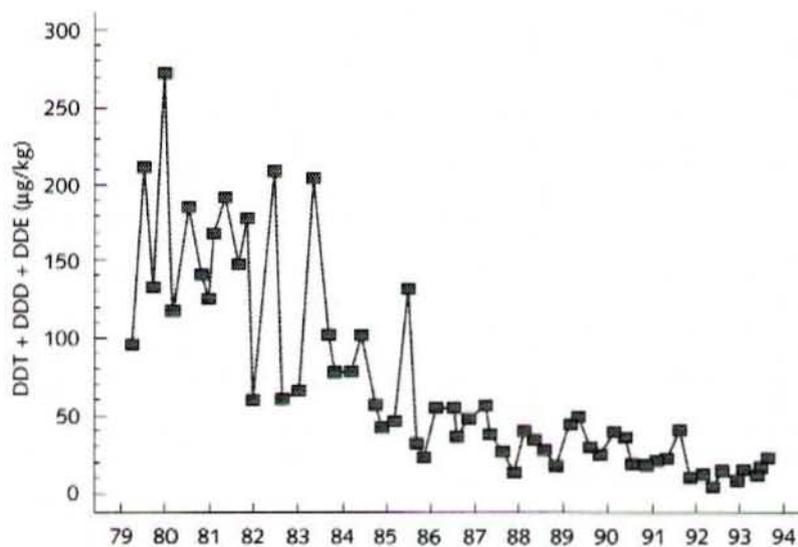


Figure 8 — Évolution temporelle des concentrations du DDT et de ses produits de dégradation dans les tissus mous d'huîtres prélevées dans le bassin d'Arcachon. Données RNO.

Dans l'estuaire de la Gironde, dont nous signalions précédemment l'importante contamination par le cadmium, une décroissance progressive a également été observée en raison d'une réduction des apports à l'amont de 1,5 t/an, avant 1986, à 1 t/an environ en 1996 (valeurs estimées par l'Union minière de France, *in* : ANDRÈS *et al.*, 1999). Sur le site estuarien le plus contaminé (La Fosse, figure 6), la quasi-totalité des concentrations de cadmium déterminées dans les tissus mous des huîtres avant 1989 se situait entre 60 et 120 mg · kg⁻¹ (poids sec). Depuis 1996, ces concentrations varient au cours des saisons entre 20 et 60 mg · kg⁻¹ (poids sec).

Plus généralement, pour l'ensemble des contaminants mesurés, le tableau 1 indique les tendances enregistrées sur la période 1979-1993 sur l'ensemble des sites surveillés. Dans de nombreux cas, aucune tendance significative n'est mise en évidence. Les tendances significatives montrant une amélioration de la qualité de l'environnement sont très nombreuses, tandis que les tendances positives concernent principalement les contaminants métalliques.

Tableau 1 — Variations temporelles des contaminants, mises en évidence au cours de la période 1979-1993 sur les 109 points de prélèvement surveillés dans le cadre du RNO. Données exprimées en nombre de tendances à l'augmentation ou à la diminution.

Contaminant	Augmentations significatives	Diminutions significatives	Pas de tendance significative
Hg	1	23	85
Cd	4	15	90
Pb	8	24	77
Zn	16	5	88
Cu	13	1	95
PCB	1	19	89
DDT	0	89	20
DDD	0	74	35
DDE	2	66	41
Σ DDT	0	86	23
α HCH	9	69	31
γ HCH	2	31	76
HAP	5	19	85
Total	61	521	835

4. Suivi des effets biologiques à l'aide des biomarqueurs

Si l'analyse chimique peut donner une bonne image des niveaux de contamination, sa faible pertinence dans l'évaluation des risques biologiques a déjà été soulignée dans l'introduction. De plus, il convient de mentionner qu'un nombre considérable de substances nouvelles est mis chaque année sur le marché. Leur détermination et leur quantification nécessitent des efforts de mise au point analytiques quasiment insurmontables, tant au plan technique qu'économique. Les études visant à évaluer l'impact des nouvelles substances avant leur mise sur le marché sont peu adaptées lorsqu'on s'intéresse aux doses qui n'entraînent pas d'intoxication aiguë, mais qui s'accumulent au fil des années. Enfin, les interactions entre contaminants chimiques (synergies ou antagonismes) ne sont pas prises en compte dans la réglementation bien que dans la nature,

la situation la plus couramment rencontrée soit l'exposition des êtres vivants à des contaminants multiples (ASCHIERI & GRZEGRZULKA, 1998). L'intérêt majeur des effets biologiques analysés sur des organismes exposés dans leur habitat naturel réside dans leurs capacités intégratrices. Ils permettent d'évaluer le stress environnemental qui résulte à la fois des facteurs naturels et des mélanges complexes de contaminants chimiques présents dans le milieu marin.

4.1. Aspects fondamentaux

La méthode d'évaluation des effets biologiques des contaminants réalisée sur la base des biomarqueurs a été revue dans des ouvrages récents (LAGADIC *et al.*, eds, 1997, 1998). Dans ces ouvrages, la définition retenue pour un biomarqueur est « un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant ».

Pour les principales catégories de contaminants de l'environnement marin (pesticides, HAP, PCB, métaux), NARBONNE & MICHEL (1992) ont montré les principaux effets qui pouvaient être utilisés pour développer la méthodologie des biomarqueurs, que l'on s'intéresse à des réponses aussi spécifiques que possible d'une classe de contaminants ou que l'on prenne en considération des réponses généralistes qui vont rendre compte d'un « état de santé » global du milieu (figure 9).

Si les effets biologiques des polluants peuvent être abordés à différents niveaux d'intégration depuis la molécule jusqu'aux populations et aux communautés (ADAMS *et al.*, 1989), lorsque l'on progresse vers les niveaux d'organisation les plus élevés, la représentativité à l'égard des phénomènes naturels s'accroît, mais la réponse aux polluants se manifeste à long terme, et les effets observés sont alors difficilement réversibles. À l'opposé, les approches réductionnistes ont une faible pertinence dans une optique écologique mais, en terme opérationnel, elles fournissent des indices précoces d'exposition et d'effet. De plus, la dose susceptible d'induire une réponse biologique est d'autant plus faible que l'on s'adresse aux mécanismes les plus intimes de l'organisme.

En effet, le nombre des molécules cibles susceptibles d'être atteintes dépend de la dose du composé chimique. Si un petit nombre de molécules est concerné, la vie cellulaire pourra ne pas être perturbée, mais cela se produira lorsque des doses croissantes induiront une toxicité moléculaire plus générale. De même, si les dégâts cellulaires affectent un faible pourcentage des cellules d'un organe, la fonction de celui-ci ne sera pas perturbée et ce raisonnement peut être poursuivi pour les niveaux d'organisation biologique successifs. Toutefois, lorsque la dose augmente, on peut assister à un changement de nature de l'effet

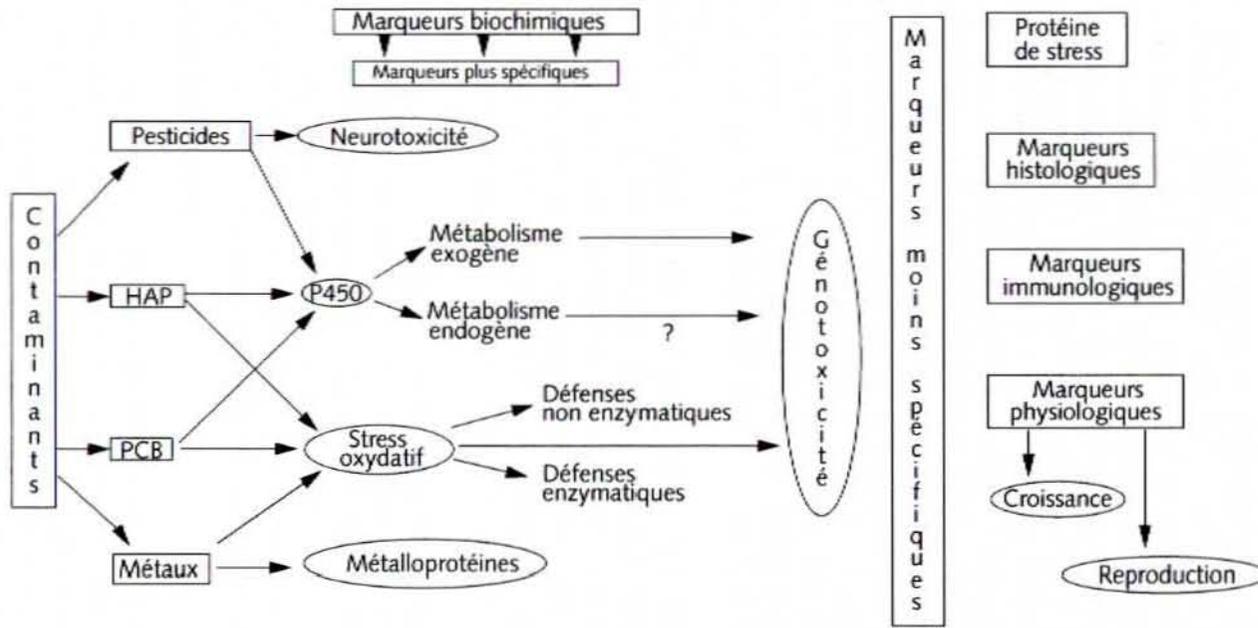


Figure 9 — Réponses biologiques aux principaux contaminants chimiques de l'environnement estuarien et côtier, susceptibles d'être utilisées comme biomarqueurs (d'après NARBONNE & MICHEL, 1992).

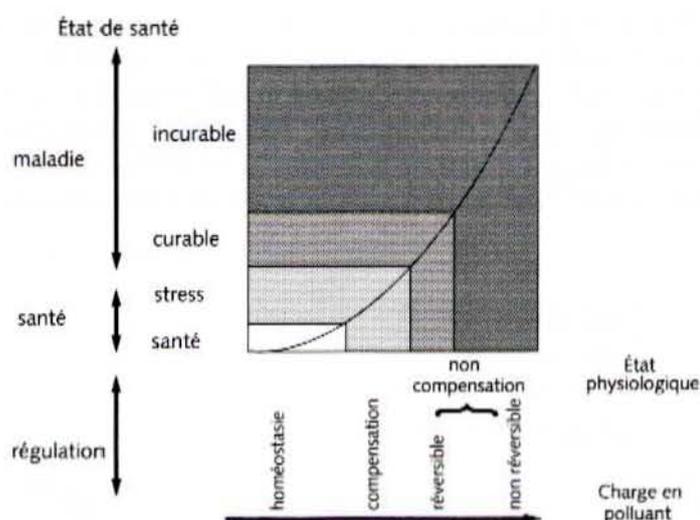


Figure 10 — Différents niveaux de l'état de santé d'un organisme en fonction de la charge en polluants (d'après BURGEOT *et al.*, 2000).

(figure 10). Quatre grandes étapes peuvent être considérées pour caractériser les niveaux de perturbation physiologique d'un organisme :

- à faible dose, d'éventuelles contaminations chimiques n'entraînent pas de modification significative du biomarqueur (santé et/ou stress) ;
- ensuite la réponse s'intensifie. Le stress apparaît sur la courbe de santé comme un état intermédiaire précoce avant des pathologies plus graves. Il se caractérise par des mécanismes de compensation mis en place pour faire face à une déstabilisation issue du milieu environnant ;
- quand la dose augmente, le stress évolue vers des symptômes entraînant des pathologies ;
- à forte dose enfin, le mécanisme est saturé ou ne peut s'exprimer en raison d'une toxicité spécifique : inhibition de la capacité catalytique d'une enzyme, hépatotoxicité bloquant le développement du réticulum endoplasmique, réduisant la capacité des cellules à produire une enzyme, perturbation globale du métabolisme protéique (KLAUNIG *et al.*, 1979 ; BIAGIANTI-RISBOURG, 1990 ; MONOSSON & STEGEMAN, 1991 ; ADAMS *et al.*, 1992 ; GEORGE *et al.*, 1992 ; PARIS-PALACIOS *et al.*, 1997 ; FLAMMARION, 1997, et littérature citée par cet auteur).

La perturbation des mécanismes conduit à des pathologies plus ou moins graves. À titre d'exemple, la figure 11 permet de comparer l'induction de la métallothionéine chez des huîtres exposées à de faibles doses de façon chronique

dans leur milieu (Gironde), ou à de fortes doses en laboratoire. Malgré une bioaccumulation du métal beaucoup plus importante au laboratoire (remarquer le changement d'échelle), les concentrations de métallothionéine ne sont pas plus affectées qu'en milieu naturel (GÉRET *et al.*, 2000). Les auteurs mettent en relation cette faible induction expérimentale avec la perturbation du métabolisme protéique général sous l'influence de doses élevées de contaminants dans le milieu.

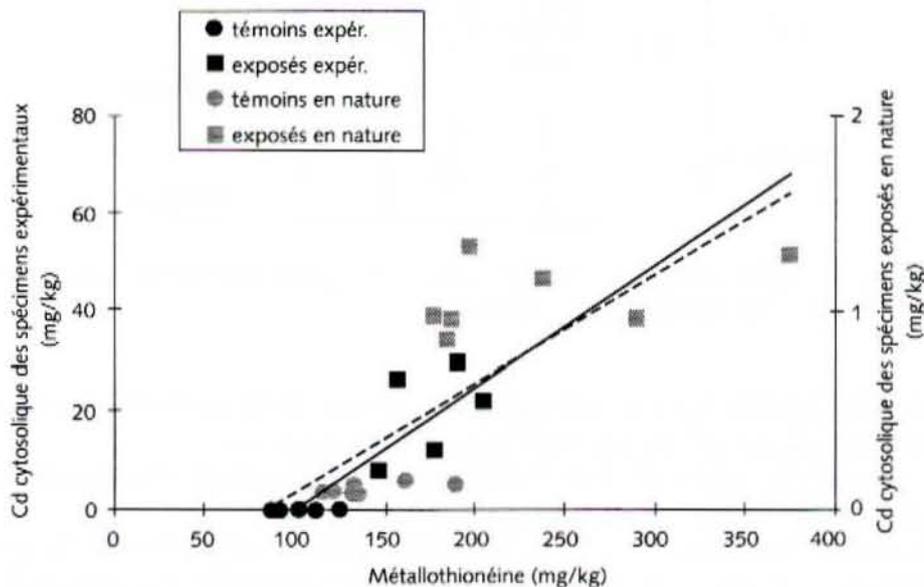


Figure 11 — Relation entre les concentrations de cadmium et de métallothionéine dans les branchies des huîtres *Crassostrea gigas* contaminées de façon chronique en milieu naturel (estuaire de la Gironde, trait continu) ou de façon subaiguë en laboratoire (tirets). D'après GÉRET *et al.* (2000).

Spécimens expérimentaux : $y = 0,2471x - 24,553$, $R^2 = 0,740$.

Spécimens prélevés dans la nature : $y = 0,0055x - 0,4593$, $R^2 = 0,567$.

La relation dose-effet peut être modulée par un grand nombre de facteurs naturels au plan métabolique, comme au niveau de l'état général de l'organisme. Divers facteurs endogènes ou exogènes sont susceptibles d'interférer avec le métabolisme des micropolluants de l'environnement : voies d'administration, voies d'assimilation (filtration, alimentation), température et/ou saison, âge, sexe, espèce ou, même, souche. En ce qui concerne les xénobiotiques organiques, cet aspect a été revu par SIJM & OPPERHUIZEN (1989), MICHEL (1993) et RICHERT (1994). L'influence des facteurs écologiques a été bien décrite dans

la littérature, dès avant 1980. En revanche, les différences interspécifiques ou interpopulationnelles ont été l'objet d'investigations plus restreintes, mais elles sont avérées et trouveraient parfois leur origine dans l'adaptation des populations exposées à des pollutions chroniques dans leur milieu ou encore à une sensibilité accrue des populations vivant en conditions extrêmes par rapport aux exigences de l'espèce (HUMMEL *et al.*, 1996 ; HUMMEL, 1999, ce fascicule ; LAULIER *et al.*, 1999, ce fascicule).

4.2. Études de cas

4.2.1. Les campagnes GICBEM (Groupe interface chimie-biologie des écosystèmes marins) en Méditerranée nord-occidentale

Les données obtenues concernent deux familles de contaminants (HAP et PCB), et les réponses induites chez un poisson (*Serranus cabrilla*) et un bivalve (*Mytilus galloprovincialis*) (MICHEL *et al.*, 1998). Chez le poisson, deux activités enzymatiques de phase I, caractéristiques du cytochrome P-4501 A1 (l'éthoxyrésorufine-O-déséthylase, EROD, et la benzo(a)pyrène hydroxylase, BPH) ont été mesurées. Chez la moule, des marqueurs biochimiques des activités enzymatiques de phase I et II, de neurotoxicité et de stress oxydant ont été étudiés. Les auteurs soulignent la variabilité des paramètres biochimiques étudiés qu'ils attribuent à l'hétérogénéité génétique des individus mais aussi à divers facteurs biotiques, abiotiques et nutritionnels, ainsi qu'aux caractéristiques des échantillons et des techniques de dosage. Malgré cette dispersion des valeurs, certaines corrélations ont pu être établies avec la présence de polluants dans le milieu. Ainsi les activités BPH (activité de phase I qui rend compte de la capacité des microsomes à métaboliser le BaP) mesurées chez la moule sont corrélées positivement avec la concentration en HAP des sédiments. Il en est de même des activités EROD et BPH chez le serran. Les concentrations des TBAR (substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique, révélant la présence de peroxydes lipidiques dans les microsomes ou dans le cytosol) mesurées dans les moules sont corrélées positivement à la concentration en PCB dans les sédiments.

4.2.2. Développement des biomarqueurs en surveillance des côtes françaises.

La convention d'Oslo et de Paris constitue un cadre de recommandations déterminantes pour les orientations des pays européens en matière de protection de l'environnement. Cette convention qui a pour objectif la protection du milieu marin et la gestion des ressources durables prévoit le développement d'outils pour la surveillance des substances dangereuses présentes dans le milieu marin. En 1987, une déclaration ministérielle a entraîné la création d'un groupe d'intervention pour estimer les effets des activités humaines en mer du Nord.

Sous la responsabilité du Conseil international pour l'exploration de la mer (CIEM) et de la commission d'Oslo et de Paris (OSPAR), ce groupe d'intervention a développé un programme de surveillance et d'évaluation de la qualité de la mer du Nord (NORTH SEA TASK FORCE, 1993). La France, avec sa façade Manche-Atlantique, était impliquée dans ce programme.

Parmi les thématiques importantes, les apports et la dispersion des polluants ainsi que les effets biologiques ont été étudiés. Des contaminants majeurs ayant pour origine les activités humaines, comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et les polychlorobiphényles (PCB), ont été mesurés dans le sédiment, l'eau et les organismes. Pour la première fois un biomarqueur d'effets précoces (l'éthoxyrésorufine-O-déséthylase : EROD) a également été mesuré dans des limandes dans le but de compléter l'évaluation des niveaux de contaminations chimiques et les effets biologiques à long terme observés par mesure des fréquences de pathologies internes et externes chez la limande (BURGEOT & GALGANI, 1998).

L'expérience acquise par l'IFREMER pour l'application de l'EROD comme biomarqueur d'exposition significatif d'effets de détoxication chez un poisson a été déterminante pour l'intégration des biomarqueurs d'exposition dans le RNO. Une étude expérimentale a ainsi été initiée sur deux sites pilotes : en baie de Seine et à Fos-sur-Mer (Marseille). Le site méditerranéen a été sélectionné pour répondre aux recommandations d'une autre convention importante pour la France, la convention de Barcelone. Les résultats obtenus en Méditerranée ont montré quelques difficultés pour l'application d'un suivi biomarqueur sur des poissons. La typologie des côtes françaises de la Méditerranée offre des habitats très diversifiés pour des poissons tels que le rouget barbet de vase, *Mullus barbatus*, espèce sentinelle étudiée. Les fortes bathymétries en zone littorale peuvent ainsi être à l'origine de situations d'exposition aux polluants très variées qui influencent directement les activités métaboliques caractérisées par l'activité EROD. Cependant, les travaux de la baie de Seine ont permis de démontrer un gradient d'effets chez la limande, espèce sentinelle de référence en mer du Nord, et le callionyme, espèce sentinelle secondaire particulièrement adaptée à la surveillance de la Manche et des côtes atlantiques françaises. Vivant à demi enfoui dans le sédiment, ce poisson a la mobilité limitée en zone côtière, intègre les critères nécessaires à la surveillance. Le suivi de l'activité EROD montre ainsi l'existence d'un gradient d'effets suivant des niveaux de pollution chimique décroissants, de la côte vers le large (figures 12 et 13). D'importantes variations de l'activité EROD sont observables chaque année. Bien que les prélèvements aient tous été réalisés en septembre, les variations de l'état physiologique des callionymes (liées aux variations des facteurs écologiques du milieu tels que température, nourriture...) ainsi que

les rejets ponctuels liés à l'activité humaine, sont à l'origine d'élévations de l'activité EROD sur certaines zones de la baie de Seine.

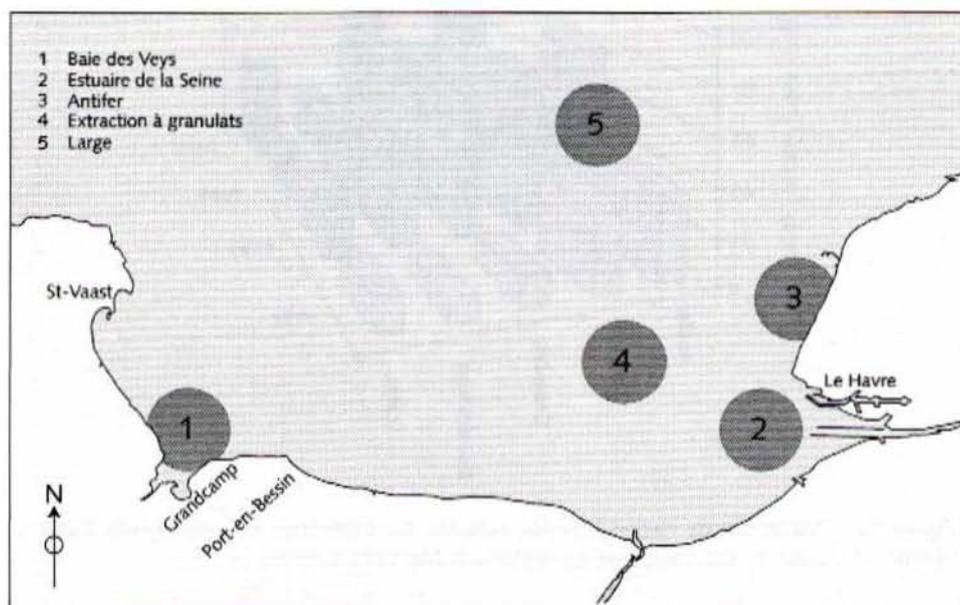


Figure 12 — Zones d'étude sélectionnées en baie de Seine dans le cadre du RNO (BURGEOT *et al.*, 1994).

4.2.3. L'expérience du GDR 1117 sur le site atelier de Gironde

En vue d'examiner la possibilité d'utiliser les métallothionéines (MT) pour surveiller la contamination métallique de l'environnement marin, une transplantation croisée d'huîtres a été effectuée d'un site pratiquement indemne de pollution métallique, la baie de Bourgneuf, vers l'estuaire de la Gironde, dont la pollution, en particulier par le cadmium mais aussi par le cuivre et le zinc, est bien documentée (RNO, 1995; AMIARD-TRIQUET *et al.*, 1998; MOUNEYRAC *et al.*, 1998). De mars à octobre 1997, des prélèvements mensuels ont été effectués et les concentrations des trois métaux et de la MT ont été déterminées dans les branchies et les glandes digestives des quatre catégories d'huîtres (figure 14). Pour la glande digestive (non illustré), les variations temporelles du poids sont apparues comme un facteur important pour expliquer les variations des concentrations de MT, et en conséquence seuls les prélèvements effectués en automne ont montré une corrélation positive significative entre les concentrations de MT et de métaux (GEFFARD *et al.*, 2001). En revanche, pour les branchies, la teneur en métallothionéine est plus importante dans les huîtres

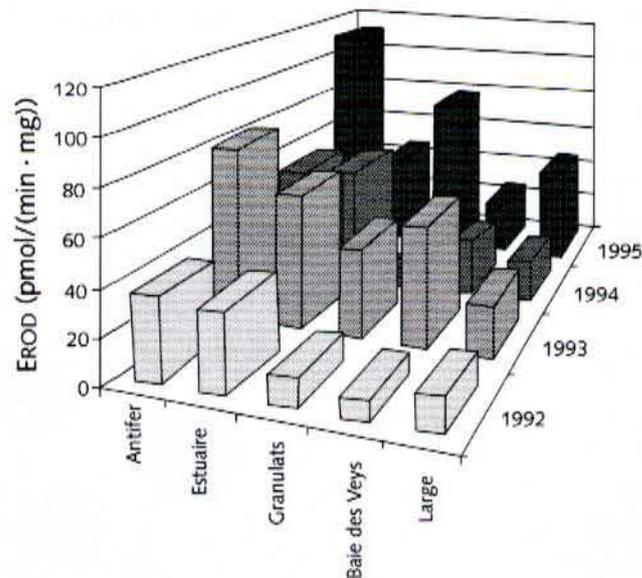


Figure 13 — Variations de l'activité EROD, mesurée dans des foies de callionymes *Callinectes lyra*, prélevés par chalutage en septembre (de 1992 à 1995).

de Gironde que dans celles maintenues sur le site de référence, tandis que les huîtres transplantées de Gironde vers la baie de Bourgneuf ont leur taux de MT qui décroît, une évolution inverse étant observée pour les spécimens transférés du site sain vers le site contaminé (figure 14). De plus, la corrélation MT-métaux est positive (et significative pour la plupart des prélèvements).

4.3. Perspectives

Les études de cas permettent de valider les réponses observées en conditions maîtrisées au laboratoire. Ceci préjuge favorablement de la faisabilité de la méthodologie des biomarqueurs. L'influence des facteurs naturels peut interférer dans l'interprétation des résultats analytiques, mais cette situation rejoint par bien des aspects les problèmes rencontrés lorsque la faisabilité des analyses chimiques du *Mussel Watch* était discutée (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1980). L'intégration des facteurs naturels capables d'interagir sur les réponses biologiques des organismes exposés constitue ainsi un des principaux défis pour l'interprétation des biomarqueurs et leur application future en surveillance. Les procédures d'échantillonnage peuvent également contribuer à minimiser l'influence des facteurs naturels, en particulier en sélectionnant des spécimens de taille comparable. Le facteur âge est également important et

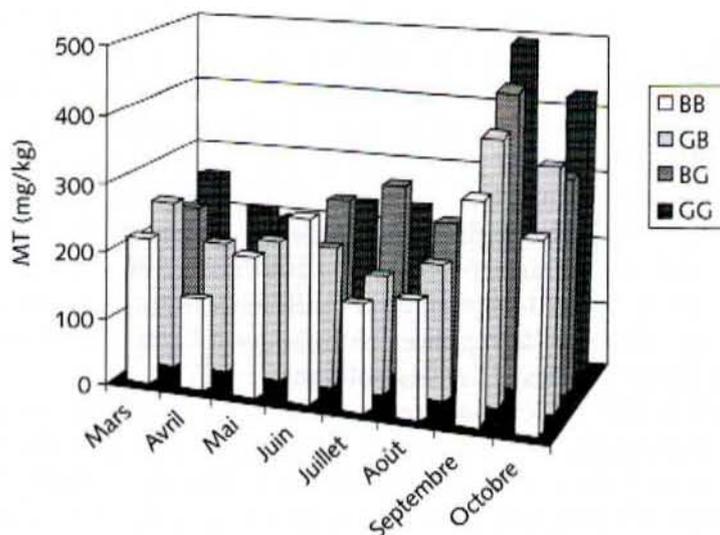


Figure 14 — Variations temporelles des concentrations de métallothionéine dans les branchies d'huîtres *Crassostrea gigas*. GG : spécimens originaires de l'estuaire de la Gironde (site riche en métaux); GB : spécimens de Gironde transplantés en baie de Bourgneuf (site pratiquement indemne de pollution métallique); BB : spécimens originaires de la baie de Bourgneuf; BG : spécimens de la baie de Bourgneuf transplantés en Gironde (GEFFARD *et al.*, 2001).

les procédures de transplantation basées sur des animaux d'élevage peuvent permettre de le contrôler, de même qu'elles permettent d'expérimenter sur des populations naturelles qui partagent un même patrimoine génétique et qui ont connu des conditions de vie similaires (DE KOCK & KRAMER, 1994). L'influence de la saison peut être limitée en choisissant des dates de prélèvement qui évitent les phases les plus critiques de la maturité sexuelle. Dans le cas de variations saisonnières et interannuelles, des méthodes de désaisonnalisation et d'analyses des séries temporelles peuvent être utilisées (COSSA, 1989).

En plus des facteurs naturels, un certain nombre d'interférences sont susceptibles de se produire entre contaminants. Par exemple, l'activité de l'acétylcholine estérase particulièrement étudiée sur les côtes françaises (BOCQUENÉ & GALGANI, 1998), et qui apparaît pourtant comme l'un des marqueurs les plus « spécifiques » (pour des contaminations du milieu par les carbamates et les pesticides organochlorés), serait également inhibée expérimentalement par différents métaux (LABROT *et al.*, 1996). Cette hypothèse a été avancée pour expliquer l'inhibition de l'activité AChE dans les moules transplantées en Gironde, milieu comme nous l'avons vu ci-dessus principalement pollué par des

teneurs élevées en cadmium (AMIARD-TRIQUET *et al.*, 1998). Pour répondre à ce problème, une approche multimarqueurs est recommandée par divers auteurs, et NARBONNE *et al.* (1999) ont proposé de transcrire les données scientifiques issues de l'analyse de biomarqueurs multiples au travers d'un « *Global Biomarker Index* » pertinent pour la gestion des environnements côtiers soumis à des apports polluants. Une autre tentative d'intégration des réponses obtenues à partir d'une batterie de biomarqueurs a également été proposée dans le cadre d'une étude estuarienne en Seine (BURGEOT *et al.*, 2000), sur la base d'un indice biomarqueur. L'objectif de ces différentes approches est d'exprimer simplement un ensemble de réponses biologiques à l'aide d'un indice intégrateur utile au diagnostic des effets des polluants.

Dans l'état actuel des connaissances, il reste indispensable de ne pas déconnecter l'examen des réponses biologiques de la détection des principaux groupes de contaminants des milieux estuariens et côtiers (HAP, PCB, pesticides, métaux) et des facteurs environnementaux qui influent sur l'état physiologique des organismes. Des efforts de validation dans le milieu naturel (transplantation) doivent être poursuivis avant qu'une approche basée sur les biomarqueurs (moins coûteuse et plus rapide que l'analyse chimique, donc d'un grand intérêt dans les pays émergents) puisse être considérée comme opérationnelle et intégrée dans les réseaux de surveillance de la qualité de l'environnement.

De plus, l'utilisation des biomarqueurs n'a d'intérêt que si les résultats émanant de divers laboratoires sont directement comparables. Or, pour certains d'entre eux, les techniques de quantification disponibles sont variées et non validées car toujours en phase de développement méthodologique. À titre d'exemple, les techniques disponibles pour la détermination des concentrations en MT incluent des approches aussi variées que la colorimétrie, les essais immunologiques ou la polarographie (DUQUESNE, 1992) mais, avant même leur mise en œuvre, la conservation et le prétraitement des échantillons peuvent considérablement influencer le résultat final (GÉRET *et al.*, 1998). Dans ce domaine tout comme pour les stratégies d'échantillonnage et de traitement des données, la démarche peut s'appuyer sur l'expérience acquise par les chimistes analystes en matière de contrôles de qualité :

— contrôles de qualité internes basés sur l'utilisation d'échantillons de référence ;

— contrôles de qualité externes au travers d'exercices d'intercalibration internationaux.

Une procédure d'harmonisation des méthodes d'analyses des biomarqueurs a été initiée en 1991 par le CIEM (STAGG & ADDISON, 1995), et des actions d'intercomparaison ont également été menées dans le cadre de la convention

de Barcelone sous l'égide du programme de suivi des pollutions en Méditerranée (MEDPOL) (VIARENGO *et al.*, 2000). En 2000, le BEQUALM (*Biological effects quality assurance in monitoring programmes*) un programme international d'intercomparaison des biomarqueurs et des bioessais les plus avancés en milieu marin (EROD, MT, adduits à l'ADN, ALA-D ou δ aminolévulinate déshydratase, stabilité lysosomale, imposex, pathologies hépatiques, toxicité du sédiment et de l'eau, diversité et abondance des communautés benthiques et phytoplancton...) a été initié (MATHIESSEN, 2000). Organisé sous l'égide de la commission européenne *Measurement and Testing Monitoring in Europe* (SMT), ce programme intéresse tous les pays cosignataires de la convention OSPAR. Directement inspiré de l'expérience d'un programme d'assurance qualité mené sur les analyses chimiques le QUASIMEME (*Quality Assurance of Information for Marine Environmental*), le BEQUALM a pour objectif d'harmoniser les différentes méthodes d'analyses des biomarqueurs employées en Europe, de produire des méthodes de références pour les actions de surveillance, et d'élever à un même niveau d'excellence tous les pays européens participants.

Bien qu'il paraisse judicieux « d'appuyer » le développement méthodologique des biomarqueurs sur l'expérience et la rigueur analytique de la chimie, il faut cependant préciser que seule une stratégie d'application des biomarqueurs spécifiques aux contraintes de la diversité biologique naturelle doit absolument s'imposer dans les prochaines années pour une utilisation en surveillance.

Enfin, une question majeure reste posée : quelles sont les conséquences des atteintes individuelles précoces, telles qu'elles peuvent être révélées par les biomarqueurs classiques, sur la dynamique des populations et la structuration des communautés et des écosystèmes (LAGADIC & CAQUET, 1998) ? Peu d'études ont tenté de mettre en relation des perturbations observées au niveau individuel et les observations aux niveaux d'organisation biologique supérieurs. Divers auteurs ont souligné que le déclin d'une population ou la diminution de la richesse spécifique au sein d'une communauté, en réponse à la présence de contaminants, peuvent être dus à diverses altérations du comportement des individus intoxiqués (*in* : LAGADIC & CAQUET, 1998). L'exposition à des substances neurotoxiques peut se traduire par des modifications du comportement, qui peuvent être évaluées indirectement par la mesure de marqueurs biochimiques comme l'activité de l'AChE. Toutefois, cette mesure n'a été que rarement couplée à l'observation du comportement des animaux *in situ*. De nombreuses séquences comportementales (comportement d'évitement, d'enfouissement, de recherche et de prise de la nourriture, comportement reproducteur...) peuvent être plus ou moins profondément altérées en réponse à la présence de contaminants. La reproduction des organismes et leur développement reposent essentiellement sur des mécanismes physiologiques régulés par des hormones et sur

l'utilisation des ressources énergétiques disponibles. Une attention particulière doit donc être accordée aux substances mimétiques d'œstrogènes (DDT, PCB, TBT...), qui sont susceptibles d'interagir avec les récepteurs de ces hormones. Les perturbations de l'allocation des ressources énergétiques à la croissance et à la reproduction (AECR) sous l'effet des polluants ont également été évoquées (*in* : LAGADIC & CAQUET, 1998). La dépense énergétique nécessaire à la synthèse ou au fonctionnement de certains systèmes de défense (MT, enzymes dépendantes du cytochrome P-450, etc.) a été décrite en termes de coût de tolérance (HOLLOWAY *et al.*, 1990), car elle priverait les systèmes métaboliques normaux d'une partie de leur fourniture basale en énergie, en particulier celle qui aurait pu être utilisée pour la croissance et la reproduction. Ce domaine est actuellement en pleine émergence et les chercheurs tentent maintenant de prédire ces événements à l'aide de modèles mathématiques (NISBET *et al.*, 2000).

Enfin, le développement de nouveaux biomarqueurs couvrant différents niveaux d'organisation biologique et allant de l'échelle moléculaire à l'échelle physiologique constitue aujourd'hui un véritable défi pour les écotoxicologistes, qui implique une évolution vers un domaine de plus grande complexité. Cette démarche est cependant nécessaire pour proposer un diagnostic de l'état de santé d'un écosystème.

Références bibliographiques

- ABARNOU A., BURGEOT T., CHEVREUIL M., LE BOULENGER F., LOIZEAU V., MADOULET-JAUEN A. & MINIER C., 2000. — « Les contaminants organiques : Quels risques pour le monde vivant ? », fascicule Seine-Aval, 35 p.
- ABBT-BRAUN G. & FRIMMEL F.H., 1996. — « Interaction of pesticides with river sediments and characterization of organic matter of the sediments », *In : Sediments and toxic substances*, Calmano W. & Förstner U. (eds), p. 51-89, Springer-Verlag, Berlin.
- ADAMS S.M., CRUMBY W.D., GREELEY M.S. JR, RYON M.G. & SCHILLING E.M., 1992. — « Relationships between physiological and fish population responses in a contaminated stream », *Environ. Toxicol. Chem.*, n° 11, p. 1549-1557.
- ADAMS S.M., SHEPARD K.L., GREELEY M.S., RYON M.G., JIMENEZ B.D., SHUGART L.R., MC CARTHY J.F. & HINTON D.E., 1989. — « The use of bioindicators for assessing the effects of pollutant stress in fish », *Mar. Env. Res.*, n° 28, p. 459-464.

- AFNOR, 1995. — « Détermination de l'indice biologique global normalisé (IBGN) », In : *Essais écotoxicologiques*, Norme NF T 90-350, déc. 1992, p. 287-295, AFNOR, Paris.
- AMIARD J.-C., MÉTAYER C., BAUD J.-P. & RIBEYRE F., 1991. — « Influence de divers facteurs écologiques sur la bioaccumulation d'éléments métalliques (Cd, Cu, Pb, Zn) chez de jeunes palourdes (*Ruditapes philippinarum*) au cours du prégrossissement en nourricerie », *Rev. Sci. Eau*, n° 4(4), p. 441-452.
- AMIARD J.-C., MÉTAYER C., BAUD J.-P. & RIBEYRE F., 1994. — « Influence de divers facteurs écologiques sur la bioaccumulation d'éléments métalliques (Cd, Cu, Pb, Zn) chez de jeunes huîtres (*Crassostrea gigas*) au cours du prégrossissement en nourricerie », *Water Res.*, n° 28(1), p. 219-231.
- AMIARD-TRIQUET C., ALTMANN S., AMIARD J.-C., BALLAN-DUFRANÇOIS C., BAUMARD P., BUDZINSKI H., CROUZET C., GARRIGUES P., JEANTET A.Y., MENASRIA R., MORA P., MOUNEYRAC C., NARBONNE J.-F. & PAVILLON J.-F., 1998. — « Fate and effects of micropollutants in the Gironde estuary, Fr. : a multidisciplinary approach », *Hydrobiol.*, n° 373/374, p. 259-279.
- ANDRAL B. & STANISIÈRE J.-Y., 1999. — « Transplants de moules : approche méthodologique pour la surveillance spatio-temporelle de la qualité des milieux littoraux. Le réseau intégrateur biologique en Méditerranée », In : *RNO 25 ans de surveillance du milieu marin*, Nantes 27-28 oct. 1999, Actes du Colloque, MATE, Paris, p. 75-81, IFREMER, Nantes.
- ANDRÈS S., BAUDRIMONT M., LAPAQUELLERIE Y., RIBEYRE F., MAILLET N., LATOUCHE C. & BOUDOU A., 1999. — « Field transplantation of the fresh-water bivalve *Corbicula fluminea* along a polymetallic contamination gradient (River Lot, France) : I. Geochemical characteristics of the sampling sites and cadmium and zinc bioaccumulation kinetics », *Environ. Toxicol. Chem.*, n° 18(11), p. 2462-2471.
- ASCHIERI D. & GRZEGRZULKA O., 1998. — *Propositions de renforcement de la sécurité sanitaire environnementale*, Rapport adressé à monsieur le Premier Ministre, 92 p.
- AVOINE, 1981. — « L'estuaire de la Seine : sédiments et dynamique sédimentaire », thèse de doctorat d'État, université de Caen.
- BACHELET G. & CASTEL J., eds, 1997. — « Long-term changes in Marine Ecosystems », *Oceanol. Acta*, 20(1), 329 p.
- BERTHET B., 1986. — « Étude in situ et expérimentale du devenir de quelques éléments métalliques (Cd, Pb, Cu, et Zn) dans un écosystème de zone

- conchylicole », thèse de doctorat d'État ès sciences, université de Rennes, 204 p.
- BIAGIANTI-RISBOURG S., 1990. — « Contribution à l'étude du foie de juvéniles de muges (Téléostéens, Mugilidés) contaminés expérimentalement par l'atrazine (s-triazine herbicide) : Approche ultrastructurale et métabolique ; Intérêt en écotoxicologie », thèse de doctorat d'État, université de Perpignan.
- BOCQUENÉ G. & GALGANI F., 1998. — « Biomarqueurs moléculaires d'exposition des organismes marins aux pesticides organophosphorés et carbamates », *In : Utilisation des biomarqueurs pour la surveillance de la Qualité de l'Environnement*, Lagadic L., Caquet T., Amiard J.-C. & Ramade F. (eds), p. 111-134, Tec & Doc Lavoisier, Paris.
- BOUTIER B., CHIFFOLEAU J.-F., JOUANNEAU J.-M., LATOUCHE C. & PHILIPPS I., 1989. — « La contamination de la Gironde par le cadmium ; origine, extension, importance », *Rapp. sci. tech. IFREMER*, Plouzané, n° 14, 105 p.
- BURGEOT T., BOCQUENÉ G., PINGRAY G., GODEFFROY D., LEGRAND J., DIMEET J., MARCO F., VINCENT F., HENOCQUE Y., OGER JEANNERET H. & GALGANI F., 1994. — « Monitoring biological effects of contamination in marine fish along French coasts by measurement of ethoxyresorufin-O-deethylase activity », *Ecotox. Environ. Saf.*, n° 131, p. 131-147.
- BURGEOT T. & GALGANI F., 1998. — « Application de l'EROD chez les poissons marins dans un programme pluridisciplinaire de surveillance de la Mer du Nord », *In : Utilisation des biomarqueurs pour la surveillance de la Qualité de l'Environnement*, Lagadic L., Caquet T., Amiard J.-C. & Ramade F. (eds.), p. 33-56, Tec & Doc Lavoisier, Paris.
- BURGEOT T., MINIER C., BOCQUENÉ G., VINCENT F., CACHOT J., LOIZEAU V., JAOUEN A., LESUEUR P., MIRAMAND P., GUYOT T., ROCHARD E. & BOET P., 2000. — *Des organismes sous stress*, Collection de 15 fascicules du programme scientifique Seine-Aval, région Haute-Normandie, Rouen, agence de l'eau Seine-Normandie, Nanterre, IFREMER, Plouzané, 39 p.
- BUTLER P.A., CHILDRESS R. & WILSON A.J., 1972. — « The association of DDT residues with losses in marine productivity », *In : Marine Pollution and Sea Life*, Ruivo M. (ed.), p. 262-266, Fishing News (Books) Ltd, London.
- CLARKE K.R., 1999. — « Nonmetric multivariate analysis in community-level ecotoxicology », *Environ. Toxicol. Chem.*, n° 18 (2), p. 118-127.
- COSSA D., 1989. — « Sampling strategies and normalization for optimizing the use of *Mytilus* spp. as quantitative indicators of metal contamination », *Oceanol. Acta*, n° 12, p. 417-432.

- DE KOCK W.C. & KRAMER K.J.M., 1994. — « Active biomonitoring (ABM) by translocation of bivalve molluscs », *In : Biomonitoring of coastal waters and estuaries*, Kramer K.J.M. (ed.), p. 51-84, CRC Press, Boca Raton, Fl., USA.
- DUQUESNE S., 1992. — « Bioaccumulation métallique et métallothionéines chez trois espèces de poissons du littoral Nord-Pas-de-Calais », thèse de doctorat, université des Sciences et Technologies de Lille, 264 p.
- EVS ENVIRONMENT CONSULTANTS, 1997. — « Technical evaluation : water quality and biological effects », *Aquatic Effects Technology Evaluation (AETE) Program (Project 3.1.2)*, Ottawa, Ont., Canada, 132 p.
- FLAMMARION P., 1997. — « Mesure in situ de l'induction du cytochrome P450 1A chez les cyprinidés d'eau douce. Optimisation de l'interprétation », thèse de doctorat, université de Metz, 126p.
- GEFFARD A., AMIARD-TRIQUET C., AMIARD J.-C. & MOUNEYRAC C., 2001. — « Temporal variations of metallothionein and metal concentrations in the digestive gland of oysters *Crassostrea gigas* from a clean and a metal-rich sites », *Biomarkers*, n° 6(2), p. 91-107.
- GENTIL F. & DAUVIN J.-C., 1999. — « Le macrobenthos marin : témoin des variations de l'environnement côtier. Le suivi des peuplements benthiques de la Baie de Morlaix dans le cadre de la surveillance des effets biologiques du RNO (Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin) », *In : RNO 25 ans de surveillance du milieu marin*, Nantes 27-28 oct. 1999, Actes du Colloque, MATE, Paris, p. 45-55, IFREMER, Nantes.
- GEORGE S.G., BURGESS D., LEAVER M. & FRERICHS N., 1992. — « Metallothionein induction in cultured fibroblasts and liver of a marine flatfish, the turbot *Scophthalmus maximus* », *Fish Physiol. Biochem.*, n° 10, p. 43-54.
- GÉRET F., RAINGLET F. & COSSON R.P., 1998. — « Comparison between isolation protocols commonly used for the purification of mollusc metallothionein », *Mar. Environ. Res.*, n° 46, p. 545-550.
- GÉRET F., GEFFARD A., AMIARD J.-C., COSSON R.P., MOUNEYRAC C. & AMIARD-TRIQUET C., 2000. — « Field and laboratory assessment of metallothionein as a biomarker of metal exposure in oysters », *In : Global environmental issues in the 21th century : problems, causes and solutions*, p. 96, 3^e SETAC World Congress, 21-25 May 2000, Brighton, UK.
- HIS E., BEIRAS R. & SEAMAN M.N.L., 1999. — « The assessment of marine pollution. Bioassays with bivalve embryos and larvae », *In : Advances in Marine Biology*, n° 37, p. 1-178, Academic Press, London.
- HOLLOWAY G.J., SIBLY R.M. & POVEY S.R., 1990. — « Évolution in toxin-stressed environments », *Funct. Ecol.*, n° 4, p. 289-294.

- HOROWITZ A.J., LUM K.R., GARBARINO J.R., HALL G.E.M., LEMIEUX C. & DEMAS C.R., 1996. — « Problems associated with using filtration to define dissolved trace element concentrations in natural water samples », *Environ. Sci. Technol.*, n° 30, p. 954-963.
- HUMMEL H., AMIARD-TRIQUET C., BACHELET G., DESPREZ M., MARCHAND J., SYLVAND B., AMIARD J.-C., RYBARCZYK H., BOGAARDS R.H., SINKE J., DE WIT Y. & DE WOLF L., 1996. — « Sensitivity to stress of the estuarine bivalve *Macoma balthica* from areas between the Netherlands and its southern limits (Gironde) », *J. Sea Res.*, n° 35 (4), p. 315-321.
- HUMMEL H., 1999. — « Limits to adaptations in marine organisms : the model *Macoma balthica* », *Océanis*, ce fascicule.
- KLAUNIG J.E., LIPSKY M.M., TRUMP B.F. & HINTON D.E., 1979. — « Biochemical and ultrastructural changes in teleost liver following subacute exposure to PCB », *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, n° 2, p. 953-963.
- LABROT F., RIBERA D., SAINT DENIS M. & NARBONNE J.-F., 1996. — « *In vitro* and *in vivo* studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination : lipid peroxidation, acetylcholine esterase, catalase and glutathione peroxidase activities in three non-mammalian species », *Biomarkers*, n° 1, p. 21-28.
- LAGADIC L. & CAQUET T., 1998. — « Conséquences des atteintes individuelles précoces sur la dynamique des populations et la structuration des communautés et des écosystèmes », *In : Utilisation des biomarqueurs pour la surveillance de la Qualité de l'Environnement*, Lagadic L., Caquet T., Amiard J.-C. & Ramade F. (eds), p. 265-298, Tec & Doc Lavoisier, Paris.
- LAGADIC L., CAQUET T., AMIARD J.-C. & RAMADE F., eds, 1997. — *Biomarqueurs en écotoxicologie; aspects fondamentaux*, Masson, Paris, 419 p.
- LAGADIC L., CAQUET T., AMIARD J.-C. & RAMADE F., eds, 1998. — *Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement*, Tec & Doc Lavoisier, Paris, 320 p.
- LAULIER M., LEMOINE S. & DENIS F., 1999. — « Stratégies adaptatives des mollusques marins face aux polluants métalliques », *Océanis*, ce fascicule.
- LE DOUAREC P., 1978. — « L'intrusion saline dans l'estuaire interne de la Loire. Étude du front de salinité et de ses variations saisonnières », thèse de doctorat de 3^e cycle, université de Nantes, 197 p.
- MATHIESSEN P., 2000. — *Biological effects quality assurance in monitoring programmes (BEQUALM)*, Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science (CEFAS), Burnham-on-Crouch, UK, 24 p

- MAUND S., CHAPMAN P., KEDWARDS T., TATTERSFIELD L., MATTHIESEN P., WARWICK R. & SMITH E., 1999. — « Application of multivariate statistics to ecotoxicological field studies », *Environ. Toxicol. Chem.*, n° 18 (2), p. 111-112.
- MICHEL X., 1993. — « Contribution à l'étude des interactions entre les contaminants chimiques organiques et les organismes marins : bases moléculaires et applications à la biosurveillance de l'environnement côtier », thèse de doctorat, université Bordeaux I, 234 p.
- MICHEL X., NARBONNE J.-F., MORA P., DAUBÈZE M., RIBERA D., LAFABRIE M., BUDZINSKI H. & GARRIGUES P., 1998. — « Indicateurs biochimiques de pollution des écosystèmes côtiers : Expérience du groupe interface chimie-biologie des écosystèmes marins (GICBEM) », In : *Utilisation des biomarqueurs pour la surveillance de la Qualité de l'Environnement*, Lagadic L., Caquet T., Amiard J.-C. & Ramade F. (eds), p. 9-32, Tec & Doc Lavoisier, Paris.
- MONOSSON E. & STEGEMAN J.J., 1991. — « Cytochrome P450E (P450IA) induction and inhibition in winter flounder by 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl : comparison of response in fish from Georges bank and Narragansett bay », *Environ. Toxicol. Chem.*, n° 10, p. 765-774.
- MOUNEYRAC C., AMIARD J.-C. & AMIARD-TRIQUET C., 1998. — « Effects of natural factors (salinity and body weight) on cadmium, copper, zinc and metallothionein-like protein levels in resident populations of oysters *Crassostrea gigas* from a polluted estuary », *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, n° 162, p. 125-135.
- NARBONNE J.-F. & MICHEL X., 1992. — « Use of biomarkers in assessment of contamination in marine ecosystems. Fundamental approach and applications », *Medit. Action Plan Tech. Rep. Ser.*, n° 71, p. 1-20.
- NARBONNE J.-F., DAUBÈZE M., CLÉRANDEAU C. & GARRIGUES P., 1999. — « Scale of classification based on biochemical markers in mussels : application to pollution monitoring in European coasts », *Biomarkers*, n° 6, p. 415-424.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1980. — « The international mussel watch », In : *Report of a workshop sponsored by the environmental studies board*, Natural Resources Commission, Washington, DC, USA, 248 p.
- NISBET R.M., MULLER E.B., LIKA K. & KOIJMAN A.L.M., 2000. — « From molecules to ecosystems through dynamic energy budget models ». *Journal of Animal Ecology*, n° 69, p. 913-926.

- NORTH SEA TASK FORCE, 1993. — *North Sea Quality Status Report 1993, bilan de santé de la mer du Nord 1993, Oslo and Paris Commissions, London, Olsen & Olsen, Fredensborg, 130 p.*
- PARIS-PALACIOS S., BIAGIANTI-RISBOURG S. & VERNET G., 1997. — « Perturbations hépatiques induites expérimentalement par une concentration sub létale de procymidone (Fongicide, Dicarboximide) chez *Brachydanio rerio*. Approche histo-cytopathologique », *Bull. Fr. Pêche Piscic.*, n° 350, p. 547-562.
- PAVILLON J.-F., MENASRIA R., FORGET J. & BARKA S., 1999. — « Utilisation des copépodes en écotoxicologie marine : l'exemple de *Tigriopus brevicornis* », *Océanis*, ce fascicule.
- RAINBOW P.S., 1999. — « Bioaccumulation of trace metals : biological significance », *Océanis*, ce fascicule.
- RICHERT C., 1994. — « Comparaison de marqueurs biochimiques chez les poissons (induction de l'activité éthoxyrésorufine-O-dééthylase et inhibition de l'activité acétylcholinestérase) et d'indicateurs écologiques (Peuplement de macro-invertébrés) pour le diagnostic *in situ* de la pollution toxique dans les cours d'eau », thèse de doctorat, université Lyon I, 169 p.
- RNO, 1995. — « Surveillance du Milieu Marin », *In : Travaux du RNO*, édition 1995, IFREMER, Nantes, et ministère de l'Environnement, Paris, p. 9-24.
- ROMÉO M., 1999. — « Effet des contaminants au niveau infra-populationnel », *Océanis*, ce fascicule.
- STAGG R.M. & ADDISON R.F., 1995. — « An interlaboratory comparison of measurements of ethoxyresorufin-O-deethylase activity in dab (*Limanda limanda*) liver », *Mar. Environ. Res.*, n° 40, p. 93-108.
- SIJM D.T.H.M. & OPPERHUIZEN A., 1989. — « Biotransformation of organic chemicals by fish : enzyme activities and reactions », *In : The Handbook of Environmental Chemistry*, Hutzinger O. (ed.), p. 163-235, Vol. II, part E, *Reactions and Processes*, Springer, Berlin.
- VIARENGO A., LAFAURIE M., GABRIELIDES G.P., FABBRI R., MARRO A. & ROMÉO M., 2000. — « Critical evaluation of an intercalibration exercise undertaken in the framework of the MEDPOL biomonitoring program », *Mar. Environ. Res.*, n° 49, p. 1-18.