

52725

Direction de l'Environnement Littoral de l'IFREMER Brest
UBO, URA CNRS D1513
DESS GRNR, USTL-LILLE I

**INFLUENCE DE L'ENVIRONNEMENT SUR LES
PHASES DE REPRODUCTION, FECONDATION ET
DEVELOPPEMENT LARVAIRE DES OURSINS :
CAS DE *SPHAERECHINUS GRANULARIS*
EN RADE DE BREST.**

Antoine **JUDAS**



DEL Brest 94-16
Rapport Interne

IFREMER Bibliotheque de BREST



0EL05266

**UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES
DE LILLE**

DIPLÔME D'ETUDES SUPERIEURES SPECIALISEES

**Gestion des ressources naturelles renouvelables et amélioration de la
qualité de la vie
Option Génie de l'Environnement**

**INFLUENCE DE L'ENVIRONNEMENT SUR
LES PHASES DE REPRODUCTION, FECONDATION
ET DEVELOPPEMENT LARVAIRE DES OURSINS :
CAS DE *SPHAERECHINUS GRANULARIS*
EN RADE DE BREST**

**(INFLUENCE OF THE ENVIRONMENT ON REPRODUCTIVE
STAGES, FERTILIZATION AND DEVELOPMENT OF LARVAE IN
THE SEA URCHIN *SPHAERECHINUS GRANULARIS*
FROM THE BAY OF BREST)**

Avril - Août 94

UBO, URA CNRS D1513 / IFREMER-BREST, DEL/EX

Antoine JUDAS

RESUME :

Dans le cadre du programme d'études pluridisciplinaire du contrat de baie mis en œuvre par la Communauté Urbaine de Brest, un travail d'observation intégrant certains paramètres biologiques (Indices Gonadique et de Réplétion), écotoxicologiques (fécondation et développement larvaire) et génétiques a été mené au laboratoire d'écologie benthique de l'Université des Sciences de Brest et au laboratoire d'écotoxicologie de l'IFREMER-Brest sur les oursins de l'espèce *Sphaerechinus granularis* de la rade en tant qu'indicateurs biologiques de pollution. Le site de l'archipel des Glénan (Finistère-Sud) a été choisi à titre de référence. Il ressort de l'étude que la station placée dans le goulet, en communication directe avec la mer d'Iroise, présente des résultats comparables aux Glénan et ne semble pas atteinte par les effets anthropiques contrairement aux stations proches de la zone portuaire. La population d'oursins de la pointe de l'Armorique s'avère sévèrement perturbée, tant dans son cycle biologique que dans son développement larvaire, et présente une perte de variabilité génétique par rapport à la station voisine (pointe Marloux). Parmi les causes possibles de tels phénomènes, l'hypothèse d'une contamination par les métaux lourds a été confortée par les résultats d'analyses effectuées par le Laboratoire Municipal. La responsabilité des activités militaires pratiquées sur ce site est discutée dans ce rapport.

Remerciements :

Je tiens à exprimer ma gratitude à toutes les personnes qui m'ont aidé pendant ce travail, en commençant par mes responsables de stage :

Madame **Monique GUILLOU**, pour sa disponibilité malgré quelques ennuis de santé et pour son aide dans les moments importants, Madame **Françoise QUINIOU**, pour avoir parfois sacrifié ses jours de repos pour venir m'assister, Monsieur **Dario MORAGA**, pour tout ce qu'il m'a appris de la génétique des populations.

Je remercie tout spécialement **Christian TARTU**, **Robert MARC** et **Sébastien DAO**, pour leurs compétences techniques et pour leur agréable compagnie à chaque sortie en mer.

Je voudrais dire merci également à **Laurent CHAUVEAU** et **Lucky LUMINGAS**, en thèse actuellement, qui ont bien voulu partager avec moi une partie des données qu'ils ont recueillies sur le terrain.

Je ne voudrais pas oublier **Françoise DENIS**, pour m'avoir fait part de son expérience dans le domaine de l'électrophorèse et dans l'utilisation du logiciel BIOSYS-1.

Je remercie aussi Madame **Marie-Renée LE LIART**, pour son accueil à mon arrivée à la faculté et pour l'aide qu'elle m'a apportée pour résoudre mes problèmes d'ordre matériel.

Je remercie bien sûr les responsables de ma formation, Madame **Nicole DHAINAUT** et Monsieur **Daniel PETIT**, pour m'avoir permis d'effectuer ce stage dans le cadre du D.E.S.S. Gestion des Ressources Naturelles Renouvelables et Amélioration de la qualité de la vie.

Enfin je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance au responsable du laboratoire d'écologie benthique, Monsieur **Michel GLEMAREC**, qui m'a beaucoup soutenu et que je remercie de sa confiance.

SOMMAIRE :

CADRE DU STAGE :	p. 4
I / INTRODUCTION :	p. 6
II / MATERIEL ET METHODE :	
1° - L'espèce	p. 7
2° - Le milieu	p. 7
3° - Echantillonnage	p.10
<i>Indices physiologiques</i>	p. 10
<i>Fécondations in vitro</i>	p. 10
4° - Méthodes	p. 10
<i>Indices physiologiques</i>	p. 10
<i>Tests de fécondation</i>	p. 11
<i>Généétique des population</i>	p. 12
5° -Traitement des données	p. 15
III / RESULTATS :	
1° - Indices physiologiques	p. 19
2° - Fécondation et développement larvaire	p. 20
3° - Génétique des populations	p. 24
IV / DISCUSSION :	p. 26
V / CONCLUSION :	p. 32
VI / BIBLIOGRAPHIE :	p. 33

CADRE DU STAGE

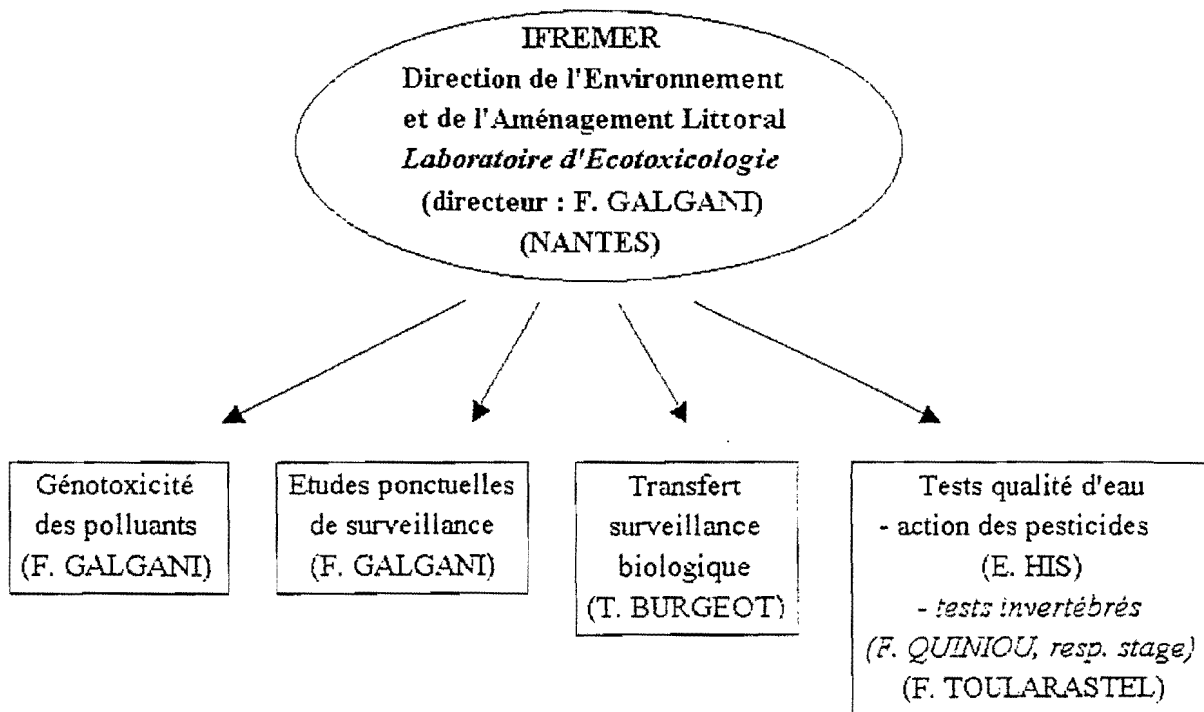
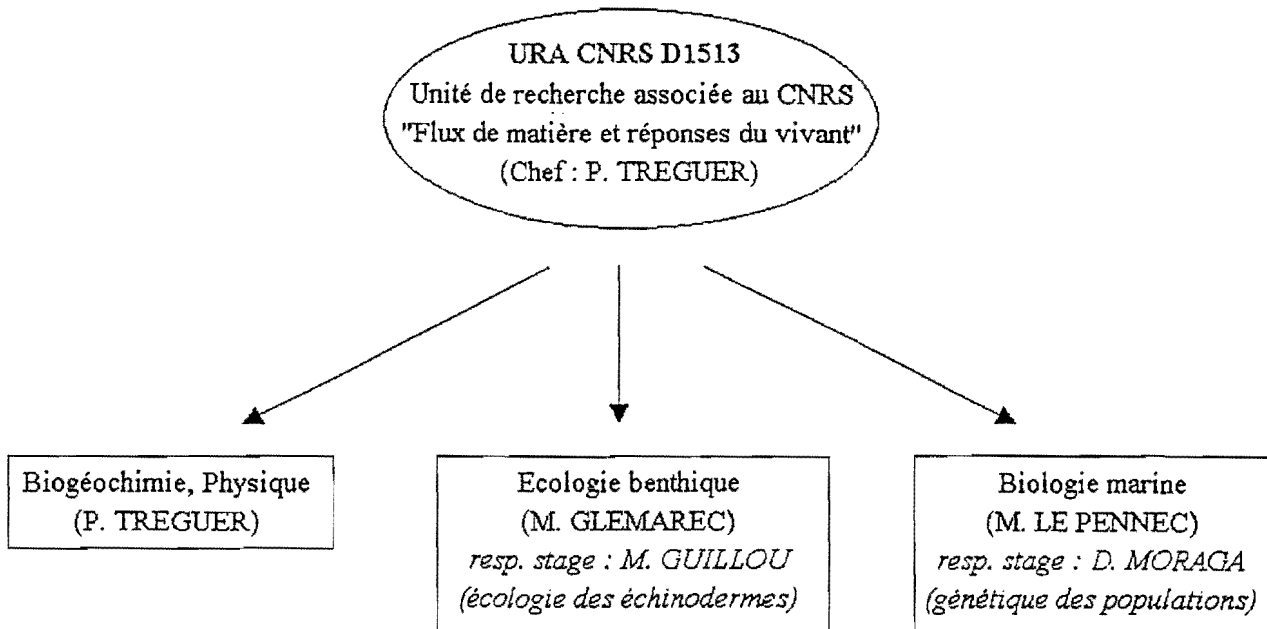
Ce stage s'inscrit dans le programme *Amélioration de la qualité des eaux, sauvegarde et restauration de l'écosystème marin en rade de Brest*, mené par la Communauté Urbaine de Brest dans le cadre d'un contrat de baie, qui fait l'objet de conventions d'études avec différents organismes de recherche (cf extraits de la circulaire ministérielle du 13/05/91 présentée en annexe). L'originalité du programme réside dans sa pluridisciplinarité, il intègre aussi bien le domaine continental que le domaine marin et associe disciplines scientifiques, socio-économiques et juridiques. Il vise d'une manière générale à préciser les mécanismes de dégradation de l'écosystème de la rade en examinant parmi les processus connus en biologie marine fondamentale lesquels s'appliquent à cette zone particulière, et à mettre en place les réseaux d'observation et les outils de suivi de la qualité du milieu grâce auxquels il devrait être possible de quantifier cette qualité et prévoir ses conséquences sur les ressources halieutiques.

Les résultats du programme d'études sont soumis au Comité Scientifique du contrat de baie et présentés ensuite à un Comité d'Expertise Scientifique International puis à un Comité Pilote pour décision opérationnelle.

Le contrat "rade de Brest" doit aboutir à la mise au point de méthodes de lutte appropriées contre les polluants et la fourniture aux décideurs politiques et administratifs d'un outil d'aide à la décision.

Le stage s'est déroulé d'une part dans l'Unité de Recherche Associée au CNRS D1513 à la Faculté des Sciences de Brest, et d'autre part, au laboratoire d'écotoxicologie du centre IFREMER de Brest, dont les organisations sont présentées ci-après. L'objectif de cette coopération dans le programme d'étude se situe dans la surveillance et l'appréciation de la qualité du milieu par l'observation d'indicateurs biologiques de pollution. Son but est d'évaluer la situation présente de la rade et permettre un suivi de l'impact des actions de dépollution.

ORGANISATION DES STRUCTURES D'ACCUEIL



I/ INTRODUCTION :

Les oursins sont reconnus pour être très sensibles aux modifications des conditions environnementales. Leur plasticité face aux conditions du milieu et leur mode de vie en font de bons indicateurs biologiques de pollution marine (Augier, 1987a; Kobayashi, 1971). D'ailleurs, depuis plus d'une vingtaine d'années, gamètes, embryons et larves d'oursins constituent un matériel de base dans les domaines de la pharmacologie, toxicologie ou écotoxicologie (Hagström & Lönning, 1974; Bougis, 1981; Dinnel *et al*, 1987; Pagano & Romaña, 1991).

Leur sensibilité aux conditions du milieu se manifeste par des perturbations du cycle de reproduction, des baisses de fécondité ou des troubles du développement larvaire et les effets observés en zones perturbées sur les populations d'oursins ont été souvent décrits (Harmelin *et al*, 1981; Delmas & Régis, 1984).

D'autre part, les biologistes de l'observatoire marin de Roscoff (Nord-Finistère) utilisant régulièrement des oursins de l'espèce *Sphaerechinus granularis* (Lamarck) prélevés en rade de Brest sur le site de la pointe de l'Armorique ont signalé, depuis 1985, des anomalies du développement cellulaire. Suite à ces observations, des travaux préliminaires ont mis en évidence sur ce même site des perturbations du développement de la population et un faible taux de croissance des individus (Chevallier, 1993).

Ces indications ont motivé le choix de *Sphaerechinus granularis*, très commun dans la rade, et dont la biologie est par ailleurs bien connue (Fenaux, 1972; Semroud & Senoussi, 1989; Guillou & Michel 1993), comme bioindicateur de la qualité du milieu dans le cadre du Programme d'études pluridisciplinaire de la rade de Brest. L'étude porte sur trois stations de la rade distribuées le long d'un gradient de pollution, et une quatrième dans l'archipel des Glénan (Bretagne Sud), exempt de pollution anthropique, et choisi comme site de référence.

L'observation consiste à suivre l'évolution d'indices physiologiques (Indice Gonadique et Indice de Réplétion), révélateurs de la condition des individus, et à effectuer des fécondations *in vitro* en vue de mesurer le taux de réussite de stade pluteus obtenu pour chaque site, de manière à mettre en évidence une éventuelle dégradation de l'environnement.

Par ailleurs, l'estimation de l'influence des conditions environnementales s'accompagne d'une étude de génétique inspirée des méthodes employées sur d'autres invertébrés marins (faune

profonde et intertidale) pour mesurer les adaptations génétiques de ces animaux vis à vis des contraintes écologiques (Siebenaller, 1978; Bristow & Vadas, 1991). Ce travail vise à évaluer la variabilité génétique présentée par *S. granularis* dans les populations des deux stations les plus exposées qui, quoique voisines géographiquement, ont montré des différences morphologiques et démographiques très marquées (Lumingas & Guillou, *sous presse*). Cette partie a également pour but de mesurer le degré de différenciation existant entre ces deux populations pour apporter une explication génétique à ces observations.

A terme, ce travail tend à mieux connaître les réponses de l'espèce et à estimer l'état de pollution de la rade sur les sites choisis en diagnostiquant, si possible, les agents responsables des dérèglements observés.

II / MATERIEL ET METHODES :

1° - L'espèce :

Sphaerechinus granularis (Echinodermata, Echinoidea, Toxopneustidae) est une espèce comestible de grande taille pouvant atteindre 14 cm, commune dans l'hémisphère Nord sur les côtes de l'Atlantique-Est, depuis la Manche occidentale jusqu'au Golfe de Guinée (Koehler, 1921) ainsi qu'en Méditerranée (Tortonese, 1965). Sa répartition verticale s'étend de la zone intertidale jusqu'à 130 m (Cherbonnier, 1958), sur divers substrats en fonction des classes d'âge et des préférences alimentaires (Guillou & Michel, 1993). En rade de Brest, les plus fortes populations se rencontrent essentiellement sur les fonds sédimentaires grossiers recouverts de maërl vivant (*Lithothamnium corallinoïdes*, Crouan).

2° - Le milieu :

La rade de Brest est une vaste étendue d'eau de plus de 150 km² qui communique avec la mer d'Iroise par un goulet de 1,8 km de large et de 20 m de profondeur. Elle reçoit les apports de deux rivières principales : au Nord-Est, l'Elorn (6m³/s de débit moyen), au Sud-Est, l'Aulne (24m³/s de débit moyen). Les bassins versants de la rade représentent près de 2800 km² qui sont essentiellement consacrés à l'agriculture.

Il est possible, pour simplifier, de subdiviser la rade elle-même en trois zones : un bassin Nord, tout d'abord, à l'embouchure de l'Elorn, où se concentrent les activités portuaires de Brest, ensuite un bassin Sud recevant les eaux de l'Aulne, moins urbanisé et mieux protégé de l'influence portuaire mais plus exposé aux effluents agricoles, enfin une zone de mélange formant un tourbillon dans la partie centrale de la rade allant des alentours de la presqu'île de Quelern jusque dans le goulet.

Le choix des sites s'est porté sur quatre zones propices au développement de *S. granularis* dont trois dans la rade, la dernière dans les îles Glénan, en fonction de leurs différentes caractéristiques. La situation géographique de chaque station se trouve illustrée en figure 1.

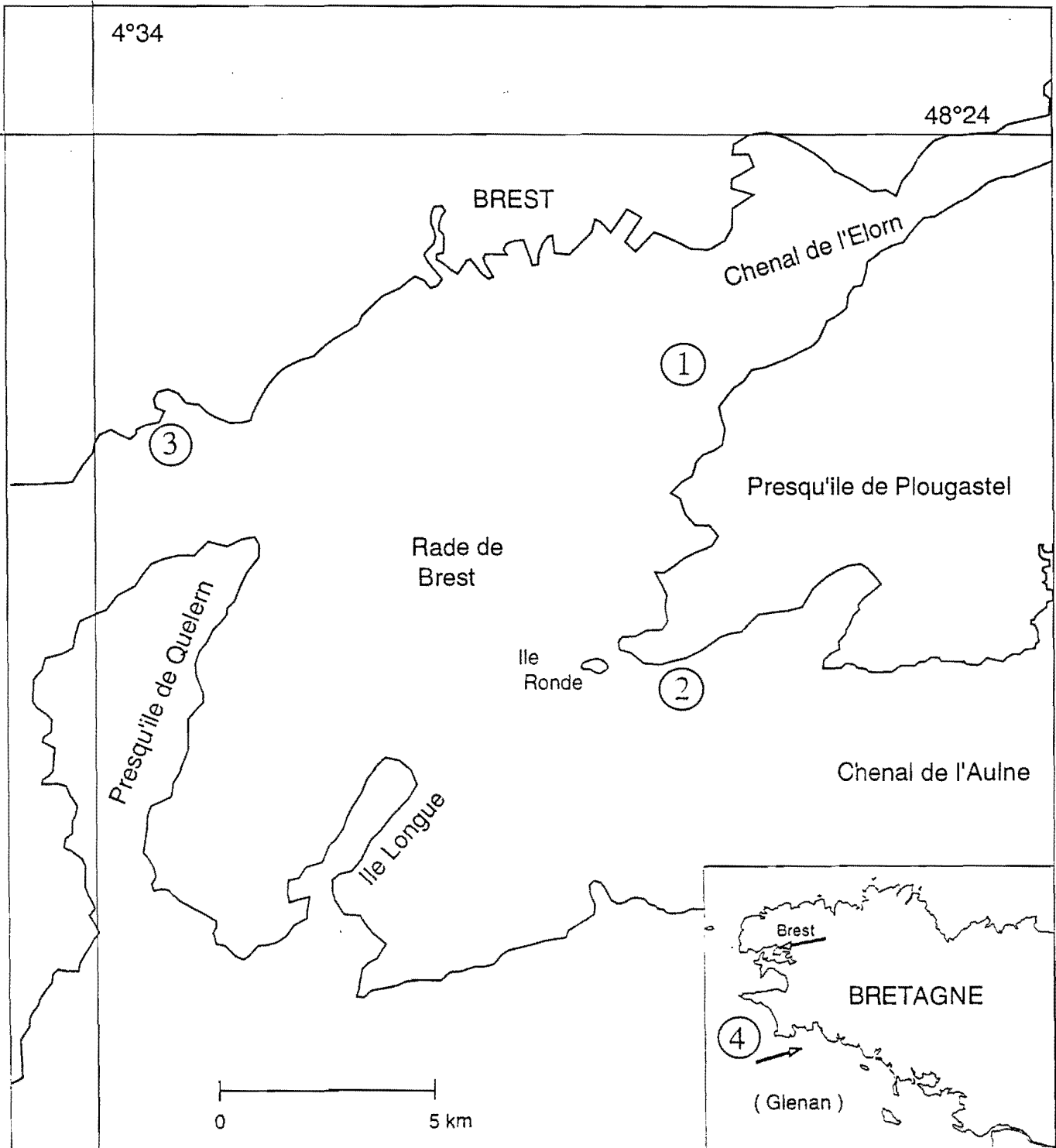
- (1) Pointe Marloux : située dans le bassin Nord, proche de la zone portuaire, dans une zone de calme relatif (<1 noeud en vives eaux). Le fond est constitué de maërl pur, la profondeur est faible (5 m). Une étude de la dynamique des populations a révélé de fortes irrégularités dans le recrutement (Lumingas et Guillou, *sous presse*).

- (2) Pointe de l'Armorique : située à l'embouchure de l'Aulne, où la présence de l'Île Ronde concentre les courants de marée dans un chenal étroit qui amplifie leur vitesse (jusqu'à 3 noeuds). L'influence estuarienne y est encore ressentie, le sédiment est hétérogène, composé de sable coquillier grossier et de débris de maërl, la profondeur peut atteindre jusqu'à 20 m au milieu du chenal.

- (3) Anse du Dellec : zone rocheuse située dans le goulet de Brest, directement sous influence océanique. L'hydrodynamisme est assez fort (>2 noeuds en vives eaux), favorable au développement d'une couverture algale importante. La zone de prélèvement se situe sur une pointe rocheuse appelée pointe du Diable, à l'abri des effets de l'agglomération voisine, à une profondeur maximale de 10 m.

- (4) Archipel des Glénan : en Baie de Concarneau, Bretagne-Sud, à l'écart de toute pollution anthropique et où la population d'oursins connaît un large essor (Guillou et Michel, 1993) et fait l'objet d'une pêche artisanale. Cette dernière station sera considérée comme site de référence.

Fig. 1 : Présentation de la rade de Brest



3° - Echantillonnage :

Indices physiologiques :

La récolte s'effectue par dragage ou en plongée selon l'accessibilité à la côte par bateau. La drague utilisée est large d'un mètre, équipée d'un filet de 2 cm de maille. La durée des traits de drague est d'environ 5 minutes. Le matériel est ensuite fixé dans l'alcool à 70 °. Le calcul des indices nécessite un échantillonnage mensuel, commencé sur certaines zones depuis décembre 1993, puis prolongé dans cette étude jusqu'au mois de juillet 1994. Pour chaque mois, un échantillon de 30 individus d'une classe de taille standard de 80-90 mm est prélevé.

Fécondations :

La récolte des oursins s'effectue en employant les mêmes techniques que précédemment. Toutefois, les animaux sont maintenus vivants et à l'abri des écarts de température, en les conservant à bord dans un circuit d'eau de mer et en évitant le déclenchement d'une ponte. Chaque échantillon comporte une quarantaine d'individus de taille variable, de façon à pouvoir disposer d'un choix satisfaisant d'animaux matures et d'un sex-ratio équilibré. Deux prélèvements par site sont réalisés entre mai et juin, durant la période de reproduction.

4° - Méthodes :

Calcul des indices physiologiques :

Le cycle de reproduction est étudié par l'intermédiaire de l'indice gonadique (I.G.), qui est le rapport entre l'état des gonades et le poids corporel. L'évolution dans le temps de ce paramètre permet de mesurer l'effort de reproduction et de situer la période de la ponte. La relation employée est la suivante :

$$\text{I.G.} = \text{Poids secs gonades} \times 10^6 / D_{\text{test}}^3$$

L'indice utilisé fait intervenir le poids sec de gonades et le diamètre du test (D_{test}), en raison d'une part, de la bonne corrélation entre taille et poids du test, d'autre part des fortes variations engendrées par l'utilisation de volumes ou de poids humides (Gonor, 1972).

L'indice de Réplétion du tube digestif (I.R.), correspond au rapport du poids de l'intestin et de son contenu sur le poids du corps. Ce paramètre reflète l'intensité de l'effort de collecte de nourriture.

La relation est donnée par Nédélec (1983) :

$$\text{I.R.} = \text{Poids sec intestin} \times 10^6 / D_{\text{test}}^3$$

Les variations de ce paramètre permettent de suivre l'état des besoins trophiques des individus et complètent les renseignements apportés par l'indice gonadique. Les oursins sont mesurés au mm près, ouverts sur la face orale à l'aide d'un marteau, puis disséqués. Les gonades et les intestins sont prélevés et séchés à l'étuve à 60°C pendant 48 à 72 h selon l'état de maturité. En période de maturation des gonades, des émissions accidentelles de produits sexuels sont quelquefois provoquées par la fixation dans l'alcool, ces produits doivent être pris en compte dans les mesures d'indices gonadiques. Pour obtenir des résultats comparables sur tous les sites, les indices sont calculés sur des échantillons moyens appartenant à la même classe de taille (80-90 mm).

Tests de fécondations :

Les animaux récoltés sont maintenus vivants en aquarium dans un circuit d'eau de mer en salle thermostatée (15°C). Les expériences doivent être effectuées dans les 24 h en raison du stress occasionné par le ramassage. Les bioessais sont réalisés en eau de référence provenant de l'écloserie IFREMER d'Argenton, reconnue de bonne qualité, filtrée sur cartouches Sartorius de 0,45 µm de porosité. Pour chaque manipulation, dix individus mâles et dix femelles sont sélectionnés, de manière à réaliser deux séries de tests en parallèle : chaque mâle étant testé par le mélange des dix femelles, et chaque femelle par l'ensemble des dix mâles, soit vingt essais par station répétés à deux reprises entre mai et juin. Les individus sont ouverts aux ciseaux en zone équatoriale et disséqués afin de prélever les gonades. Les gonades mâles sont conservées au sec pour éviter l'activation du sperme (l'excédent aqueux est éliminé à l'aide d'une poire), et maintenues au réfrigérateur jusqu'à leur emploi. Les gonades femelles sont conservées en eau de mer pour garder intacts les ovocytes, elles sont ensuite tamisées sur soies de 200 µm pour éliminer les débris d'ovaires. Les gonades mâles sont tamisées sur soies de 60 µm pour récupérer le sperme propre. Les ovocytes sont lavés par sédimentation et dilution, les ovocytes immatures et les débris de gonades étant à chaque fois éliminés. Pour chaque femelle, la concentration est amenée à 1500 ovocytes/ml par dilutions successives, dans un

temps, le pool de dix femelles est constitué avec la même densité. Après tamisage du sperme des dix individus mâles, un pool est aussi réalisé avec une microgoutte de chaque filtrat. Chaque essai se déroule dans des pots en polystyrène stériles dans lesquels à 30 ml d'eau filtrée sont inoculés 1 ml de solution d'ovocytes et 0,5 ml de sperme dilué (2 gouttes de sperme sec dans 100 ml). Les ovocytes fécondés sont alors mis en incubation dans une armoire thermostatée à 15,5°C soit 2,0°C à 2,5°C de plus que la température du milieu naturel, ceci dans le but d'éviter les effets néfastes pour le développement des larves d'un écart de température trop élevé. Un schéma du protocole expérimental est présenté en annexe I.

L'observation du taux de réussite de fécondation s'effectue une heure trente après le mélange des gamètes.

Le comptage des différentes catégories de larves est réalisable après 5 jours d'incubation. Les observations des larves reposent sur 5 critères, définissant chacun un type de larves différent (Pagano *et al*, 1989) :

N : pluteus normal ayant suivi un développement convenable

R : pluteus retardé ou inhibé, dont la taille n'atteint pas la moitié de la normale

P1 : pluteus pathologique, présentant des malformations du squelette
et/ou du tube digestif

P2 : embryons dont le développement s'est arrêté à différents stades
(morula, blastula, gastrula ou prisma).

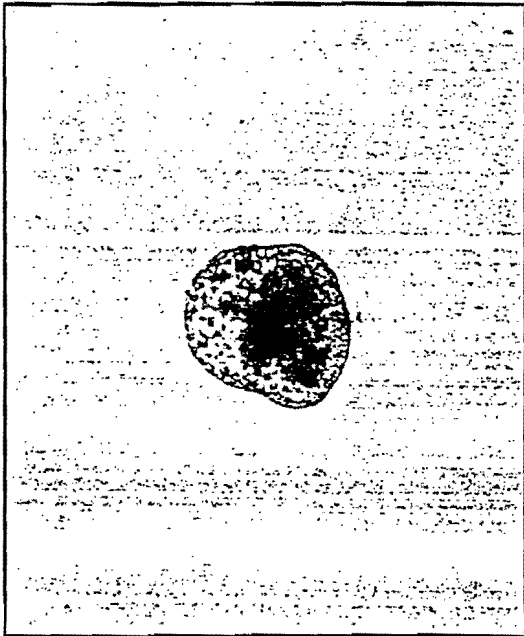
M : larve ou embryon mort.

L'examen de la qualité des larves obtenues sur chaque site mesure l'aptitude des animaux prélevés sur cette zone à produire des larves viables en eau de mer de référence, traduisant ainsi l'impact de l'environnement sur la qualité des gamètes.

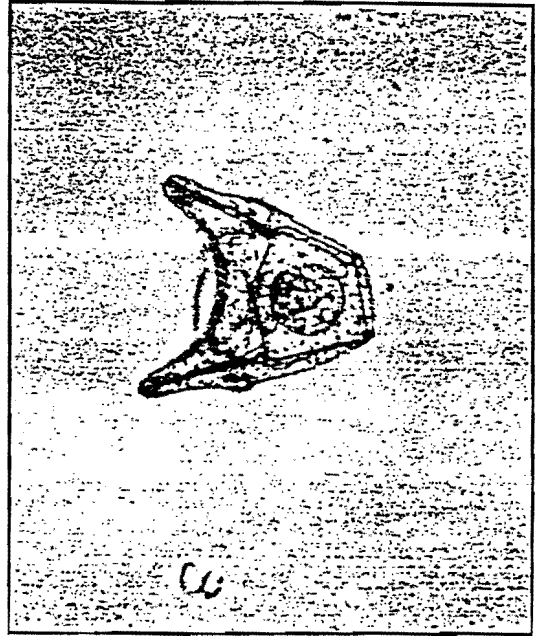
Génétique des populations :

Les recherches en génétique menées ces dernières années sont orientées vers une connaissance approfondie des mécanismes adaptatifs des populations d'animaux marins, notamment par l'étude des isoenzymes impliqués dans divers processus métaboliques. Ainsi, l'adaptation de la population à son environnement est décelée par la variabilité des gènes enzymatiques. L'analyse

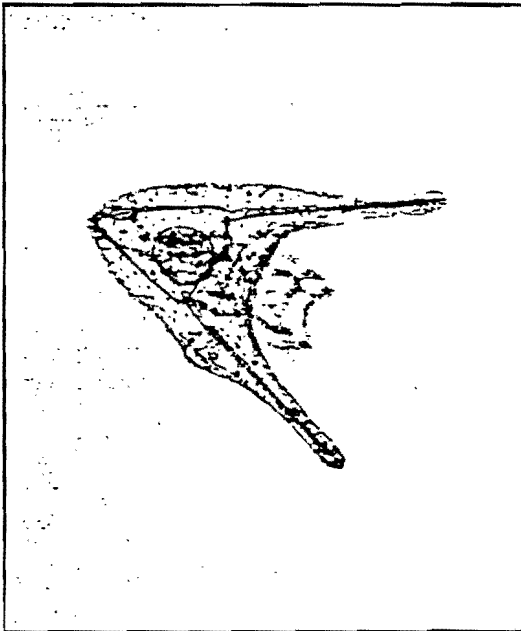
PLANCHE 1 :
Développement larvaire de *Sphaerechinus granularis*



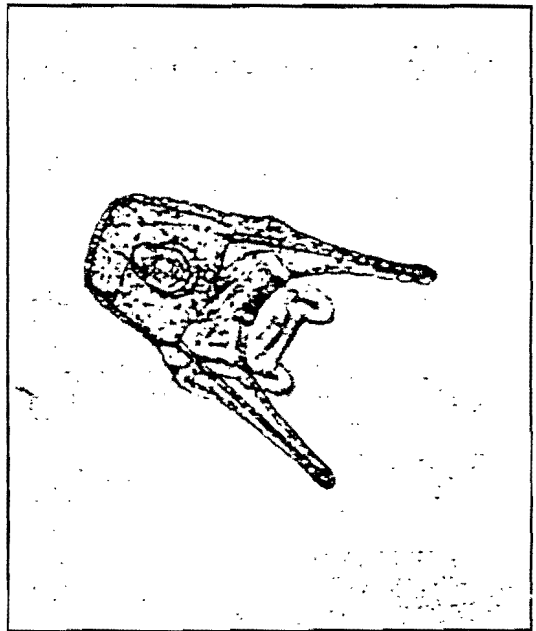
embryon (P2)



pluteus retardé (R)



pluteus pathologique (P1)



pluteus normal (N)

des structures génétiques a volontairement été réduit à deux stations (Marloux et Armorique), en raison d'une part du délai imparti à cette étude, et d'autre part d'une étude comparative de populations déjà effectuées sur ces deux sites (Lumingas & Guillou, *sous presse*). Dans cette étude a été analysé le polymorphisme¹ enzymatique des deux populations, mesuré par électrophorèse sur gel d'amidon. En effet, cette technique reposant sur le caractère amphotère des protéines, elle permet de déceler les variations de charges nettes des sous-unités constituant le système enzymatique étudié, de sorte que les substitutions entre acides aminés dans la structure primaire de la protéine sont rendues visibles. Ces substitutions étant issues de mutations sur les codons d'au moins un nucléotide de l'ADN (Ayala, 1982), il s'agit donc bien là d'un reflet du patrimoine génétique. Cependant toutes les mutations de triplet ne sont pas décelables en raison de la redondance du code génétique, de même que les substitutions d'acides aminés qui ne modifient pas la charge nette de la protéine. C'est pourquoi l'on considère que les deux tiers des mutations ne sont pas détectées (Nei, 1972). D'une manière générale, la variabilité génétique des organismes se trouve donc sous-estimée.

Les oursins ramenés frais au laboratoire sont aussitôt disséqués et des échantillons de différents organes (muscle, gonades, appareil digestif) sont prélevés sur chaque individu et placés séparément dans un cône d'Eppendorf annoté et conservé au congélateur (-70°C). Un lot de 40 individus par site est ainsi préparé. Les échantillons sont ensuite broyés à volume égal dans une solution de tampon d'extraction (TRIS 0,01M + NADP 1% + EDTA) ajustée à pH 6,8 puis centrifugés à 10000 g pendant 15 minutes à 4°C. Les échantillons sont placés dans des gels à 11% d'amidon en imprégnant de petites bandes de papier WhatmanTM n°3 introduits perpendiculairement au gel, après avoir déposé au préalable quelques gouttes de bleu de bromophénol pour visualiser le front de migration. Les gels sont refroidis durant toute la durée de la migration par un système de plaques de refroidissement placées au dessus et en dessous du moule. La migration est anodique. Un schéma du montage est figuré en annexe II. La composition des tampons d'électrophorèse et les résolutions obtenues sont données en annexe III. Les échantillons pénètrent dans le gel pendant une pré-électrophorèse de 10 minutes à 100 V. Lorsque la migration est commencée, le gel est soumis à un champ électrique

¹polymorphisme : existence simultanée dans une population de plusieurs gènes pour le même locus

constant de 80 mA pendant 4 à 5 heures. La séparation des génotypes des différents systèmes enzymatiques est révélée par des colorations spécifiques regroupées par Pasteur *et al.* (1987) et adaptées de Shaw et Prasad (1970). Les solutions utilisées pour la révélation des électrophorogrammes sont décrites en annexe IV. L'interprétation des résultats nécessite la connaissance de la structure quaternaire (le nombre de sous-unités) de l'enzyme, qui conditionne le nombre de taches observables chez les hétérozygotes correspondant aux différentes combinaisons possibles entre les sous-unités, sous l'hypothèse que les loci soient autosomiaux² et les allèles codominants³. Quand un système enzymatique possède plusieurs loci⁴, ces derniers sont numérotés de 1 à n suivant leur vitesse de migration en commençant par le plus rapide. Les allèles⁵ sont codés en fonction de leur distance (mesurée en mm) par rapport à l'allèle le plus fréquent noté "100" qui sert de référence.

5° - Traitement des données :

Les résultats des tests d'écotoxicologie sur les larves d'oursins sont traités statistiquement par analyse de variance à un critère de classification, qui permet de vérifier en un seul test si les différences observées au niveau des moyennes d'un ensemble d'échantillons sont imputables aux fluctuations d'échantillonnage ou non. Cette méthode analyse les sources de variation de l'ensemble des données, elle sous-entend l'égalité des variances et la normalité des populations d'origine. Le respect des conditions d'application est contrôlé au moyen d'un test de Bartlett. Les tests statistiques sont réalisés à l'aide du logiciel STATGRAPHICS (Statistical Graphics Corp., Rockville, Maryland, USA). Les comparaisons inter-sites sont effectuées avec un seuil de confiance de 95%.

Les données de génétique sont traitées par le logiciel BIOSYS-1 (Swofford et Selander, 1981), qui calcule les fréquences alléliques et donne les écarts par rapport à l'équilibre d'Hardy-Weinberg dans la population considérée. Les fréquences alléliques sont calculées à partir des

²autosome : chromosome présent en double dans les cellules diploïdes des deux sexes

³codominants : allèles exprimés de manière semblable dans un génotype hétérozygote

⁴locus : portion de chromosome correspondant à un gène

⁵allèle : l'une des expressions alternatives d'un gène (locus)

effectifs directement observés sur les zymogrammes. Pour un locus possédant k allèles et un échantillon de N individus, la fréquence du i^{ème} allèle est donnée par la formule :

$$x_i = \frac{(2N_{ii} + \sum_{j=1}^k N_{ij})}{2N}$$

N_{ii} : nombre d'homozygotes observés pour l'allèle i,

N_{ij} : nombre d'hétérozygotes observés pour l'allèle i.

Les fréquences génotypiques sont recalculées sous l'hypothèse de la loi d'Hardy-Weinberg qui postule que les fréquences alléliques restent constantes d'une génération à l'autre en l'absence de mutation, sélection et de migration (dans le cas d'une espèce diploïde en panmixie⁶). Etant donnée la faible taille des échantillons, les fréquences génotypiques attendues par cette loi sont calculées par la formule de Levene (1949) :

$$N_{ii} = \frac{N \cdot x_i (2N \cdot x_i - 1)}{2N - 1}$$

$$N_{ij} = \frac{4N^2 \cdot x_i \cdot x_j}{2N - 1}$$

N_{ii} : fréquence génotypique homozygote

N_{ij} : fréquence génotypique hétérozygote⁷ avec $\sum_k N_{ij} = 1$ (pour k allèles)

Le test de conformité des fréquences génotypiques calculées avec les résultats observés fait intervenir un χ^2 . Certains effectifs génotypiques étant compris entre 5 et 10, le test utilisé est celui du corrigé de Yates :

$$\chi_c^2 = \sum_{i=1}^{k(k+1)/2} \frac{(|Ob_{ij} - At_{ij}| - 1/2)^2}{At_{ij}}$$

Le nombre de degré de liberté est égal à m-k, m étant le nombre de génotypes et k le nombre d'allèles.

Les échantillons étant de faible taille, les loci multi-alléliques ont été analysés en regroupant les génotypes en trois classes : la classe des génotypes homozygotes possédant l'allèle le plus fréquent, la classe des hétérozygotes possédant l'allèle le plus fréquent et la classe regroupant les autres génotypes. Comme dans le cas des loci di-alléliques, le test du χ^2 est à 1 degré de

⁶panmixie : individus qui se croisent au hasard à l'intérieur d'une population pour laquelle l'équilibre de la loi d'Hardy-Weinberg est respectée (dème)

⁷hétérozygote : individu qui possède deux allèles distincts aux locus homologues des chromosomes parents d'un organisme diploïde

liberté lorsque toutes les classes ont un effectif supérieur à cinq. Dans le cas d'un locus diallélique, si l'un des effectifs est inférieur à 5, la probabilité exacte p est calculée suivant le test de Fisher utilisé dans le tableau de contingence 2×2 (Vithayasai, 1973).

Les descripteurs de variabilité génétique des populations sont donnés par les relations suivantes :

$$a) - \text{pourcentage de loci polymorphes}^8 : P_{95\%} = 100 \times (n_j/n)$$

avec n = nombre de loci échantillonnés et n_j nombre de loci polymorphes, un locus est polymorphe lorsque la fréquence de l'allèle le plus rare est supérieure à 0,05.

b) - l'hétérozygotie correspond à la fréquence moyenne d'hétérozygotes dans la population, on distingue l'hétérozygotie observée (h_o) et celle attendue d'après la loi d'Hardy-Weinberg (h_e).

$$h_o = 1 - \sum_{i=1}^k X_{ii}$$

X_{ii} étant la fréquence observée du génotype homozygote du $i^{\text{ème}}$ allèle contenu dans le locus

$$h_e = 1 - \sum_{i=1}^k x_i^2$$

x_i^2 étant la fréquence attendue du génotype homozygote du $i^{\text{ème}}$ allèle

Pour les échantillons de petite taille, l'utilisation de l'indice non biaisé (Levene, 1949) est nécessaire. Le calcul de l'hétérozygotie attendue s'effectue de la façon suivante :

$$h_{e(nb)} = \frac{2N(1 - \sum_{i=1}^k x_i^2)}{(2N - 1)}$$

où N est le nombre d'individus échantillonnés.

sur l'ensemble des loci, on effectue la moyenne :

$$H_o = 1 / n \sum_{i=1}^n h_o$$

$$H_e = 1 / n \sum_{i=1}^n h_e$$

c) - l'indice de fixation de Wright (F_{IS}) ou de Selander (D), permettent d'évaluer le déficit ou l'excès d'hétérozygotes. Pour le $i^{\text{ème}}$ locus, ils sont définis par :

⁸polymorphe : un gène est dit polymorphe lorsqu'il présente au moins deux états distincts d'un caractère donné

$$F_{ISi} = -D = (h_{ei} - h_{oi})/h_{ei}$$

Les deux indices se comportent de façon opposée : une valeur positive de D correspond à excès d'hétérozygotes et une valeur négative à un déficit en hétérozygotes.

La différenciation génétique des populations est appréciée par le calcul d'un indice de fixation moyen F_{ST} (Wright, 1965) défini de la manière suivante :

$$1-F_{IT} = (1-F_{IS})(1-F_{ST})$$

où F_{IT} et F_{IS} sont les indices de fixation respectivement des individus à la population totale et à ces sous-populations.

Les indices de fixation du $i^{\text{ème}}$ allèle sont définis d'après Nei (1977) par :

$$F_{ISi} = (P_i - p_i^2)/(p_i - p_i^2)$$

$$F_{ITi} = (P_i - p_i^2)/(p_i - p_i^2)$$

$$F_{STi} = (p_i^2 - p_i^2)/(p_i - p_i^2)$$

avec $P_i = \sum_n w_i \cdot X_{ij}$; $p_i = \sum_n w_i \cdot x_i$; où w_i représente le poids accordé à chaque sous populations ($w_i = 1/n$).

Les indices de fixation calculés pour le $j^{\text{ème}}$ locus à k allèles sont donnés par :

$$F_{ISj} = \frac{\sum_{i=1}^k x_i (1 - x_i) \cdot F_{ISi}}{\sum_{i=1}^k x_i (1 - x_i)}$$

$$F_{ITj} = \frac{\sum_{i=1}^k x_i (1 - x_i) \cdot F_{ITi}}{\sum_{i=1}^k x_i (1 - x_i)}$$

$$F_{STj} = \frac{\sum_{i=1}^k x_i (1 - x_i) \cdot F_{STi}}{\sum_{i=1}^k x_i (1 - x_i)}$$

L'hypothèse nulle H_0 que la valeur du F_{ST} s'écarte significativement de zéro est testée par $\chi^2 = 2N \cdot F_{ST}$ pour $n-1$ degré de liberté (Workman et Niswander, 1970) où n est le nombre de

sous populations et N le nombre total d'individus échantillonnés. La variance autour de la moyenne par prélèvement est déterminée par la méthode du "jackknife" (Weir et Cockerham, 1984). Elle permet de tester la significativité de la valeur moyenne à l'aide d'un test-t.

Le nombre d'individus migrants entre populations peuvent être estimés par la relation :

$$Nm = \left(\frac{1}{F_{sr}} - 1 \right) / 4 \quad (\text{Wright, 1965})$$

avec : N = nombre d'individus fertiles dans la population

m = taux de migration

III / RESULTATS :

1° - Indices Physiologiques :

L'examen des indices gonadiques fait apparaître de fortes disparités entre stations (fig : 2a). Tout d'abord, le site de l'Armorique se distingue par des valeurs très faibles, traduisant un niveau de développement des gonades très réduit, ne permettant pas de discerner une période de ponte. Le site du Dellec présente un développement des gonades moyen, comparable au témoin (Glénan), mais le pic de développement de printemps n'est pas observée bien que la chute de l'indice à partir du mois de mai permette d'y déceler une ponte. La population de Marloux présente une évolution assez semblable à celle des Glénan avec toutefois des valeurs nettement plus élevées et deux périodes de chute d'indice (janvier-mars, avril-juin).

L'analyse des indices de réplétion (fig.2b) montre un comportement radicalement différent entre les oursins de la rade et ceux des Glénan. En effet, alors que sur le site témoin on observe un maximum en hiver et une forte chute de l'indice de réplétion jusqu'en avril-mai, soit un mois avant la ponte, le comportement alimentaire des oursins des sites de la rade semble beaucoup plus anarchique : sur le site de Marloux, les indices de réplétion restent élevés même en période de ponte et, sur les deux autres sites, les valeurs hivernales sont singulièrement faibles. De manière générale, les indices de réplétion des stations de la rade sont plus stables au cours de la période étudiée et plus élevés pendant le printemps et l'été que sur le site de référence des Glénan. Ceci semble traduire un besoin énergétique plus constant à corrélérer avec la nature du substrat et la disponibilité des ressources trophiques (Comely & Ansel, 1989).

Fig. 2 : Evolution des indices physiologiques de *Sphaerechinus granularis* (IG et IR)

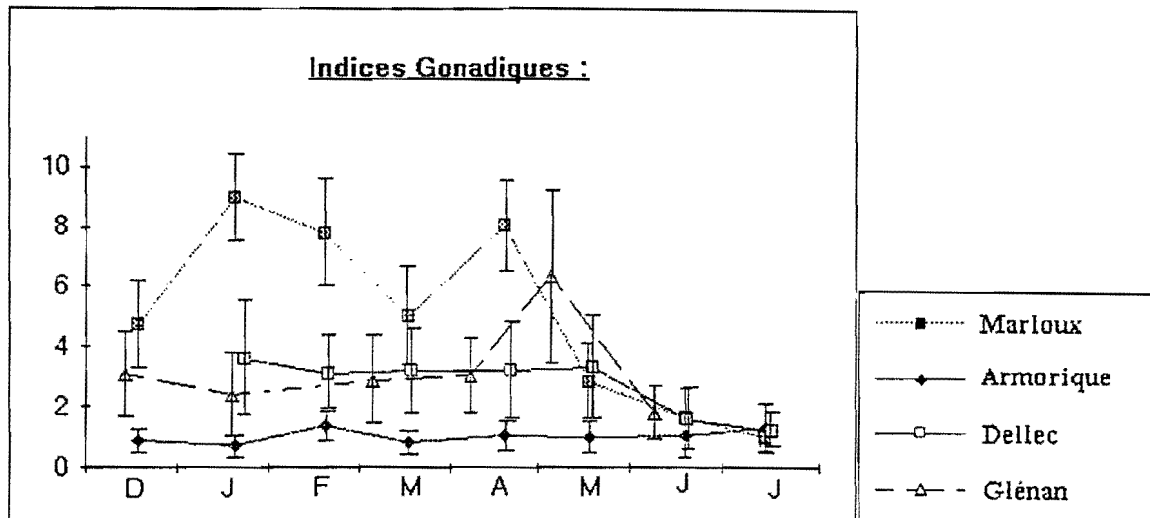


Fig.2a

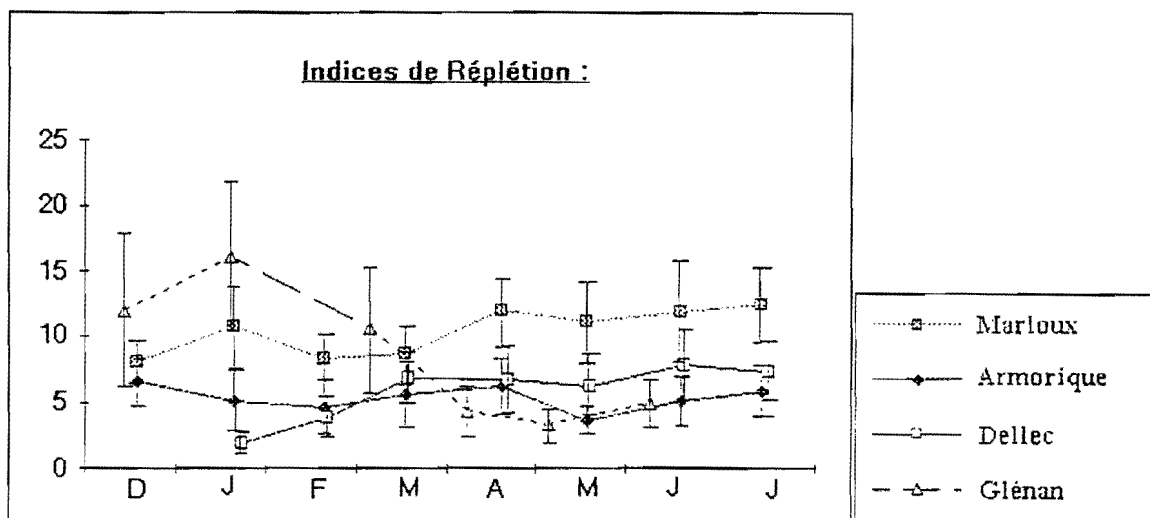


Fig.2b

2° - Fécondation et développement larvaire :

Les résultats sont rassemblés sur le tableau 1 et les graphes présentés en figure 3, où sont pris en compte les moyennes de l'ensemble des expériences. Les taux de fécondations moyens sont élevés sur tous les sites (>91%). On note cependant une réussite des fécondations (F) légèrement meilleure pour le site des Glénan (fig.3a), sans pour autant que les différences soient statistiquement significatives, sauf pour le site de Marloux où les valeurs sont significativement inférieures au site de référence (seuil de confiance 95%).

Les taux de pluteus normaux (N) obtenus pour les sites de l'Armorique et de Marloux sont significativement inférieurs au site des Glénan, choisi comme référence (respectivement 68,9% et 81,2% contre 86,9% aux îles Glénan; cf : fig.3d).

Le site de l'Armorique se distingue des trois autres populations par un taux de blocage au stade embryonnaire (P2=11,8%) et de pluteus retardés (R=14,3%; fig.3c) significativement plus élevés, de plus les tests sur les individus mâles montrent sur cette catégorie des résultats statistiquement plus élevés que pour les femelles ($t=2,49068$, $n=38$, $\alpha=0,005$)

Le site de Marloux présente un taux d'embryons intermédiaire entre celui trouvé à la pointe de l'Armorique et celui des Glénan (5,8%; fig.3b). Le taux de mortalité (M) y est significativement supérieur à toutes les autres stations (2,4% contre 0,8% à 1,2%; fig.3f).

En revanche, aucune différence statistique n'a été rencontrée en comparant les sites du Dellec et des Glénan à quelque stade de développement que ce soit, bien que les résultats soient généralement inférieurs pour le site de la rade.

Les pluteus pathologiques (P1) sont du même ordre de grandeur dans tous les sites (3,7%) et ne permettent pas d'établir de comparaison (fig.3e).

TABLEAU 1:
COMPARAISON DES RESULTATS DES TESTS DE FECONDATION :

		F (%)	N (%)	R (%)	P1 (%)	P2 (%)	M (%)
Armorique	Mâles	92,2±6,4	68,9±11,5	17,8±10,8*	3,8±1,6	8,2±8,0	1,3±2,6
	Femelles	93,0±4,5	68,8±16,6	10,8±7,0	3,9±2,6	15,3±17,7	1,2±1,3
	Total	92,2±6,4	68,9±14,5	14,3±9,4	3,8±2,2	11,8±14,3	1,2±2,0
Marloux	Mâles	92,8±3,7	80,0±4,2	7,9±3,4	4,1±2,7	5,1±3,1	2,8±2,8
	Femelles	91,0±9,4	82,4±8,4	5,9±3,5	3,3±1,4	6,5±6,1	1,9±2,2
	Total	91,9±7,4	81,2±6,9	6,9±3,6	3,7±2,1	5,8±5,0	2,4±2,5
Dellec	Mâles	92,5±5,7	85,0±5,9	8,1±3,6	3,3±1,5	2,7±2,7	0,9±1,0
	Femelles	92,8±6,1	82,0±9,0	9,6±5,6	4,5±2,6	2,7±3,2	1,2±2,4
	Total	92,6±5,8	83,5±7,7	8,9±4,7	3,9±2,2	2,7±2,9	1,0±1,8
Glénan	Mâles	94,9±4,5	85,1±6,9	7,7±5,0	3,8±2,3	2,7±2,3*	0,6±0,7
	Femelles	94,3±4,4	88,7±7,2	5,5±5,2	3,4±1,7	1,4±1,3	1,0±1,4
	Total	94,6±4,4	86,9±7,2	6,6±5,1	3,6±2,0	2,1±2,0	0,8±1,1

*: mise en évidence d'une différence significative entre les résultats des deux sexes

Fig. 3 : Présentation graphique des résultats des tests écotoxicologiques

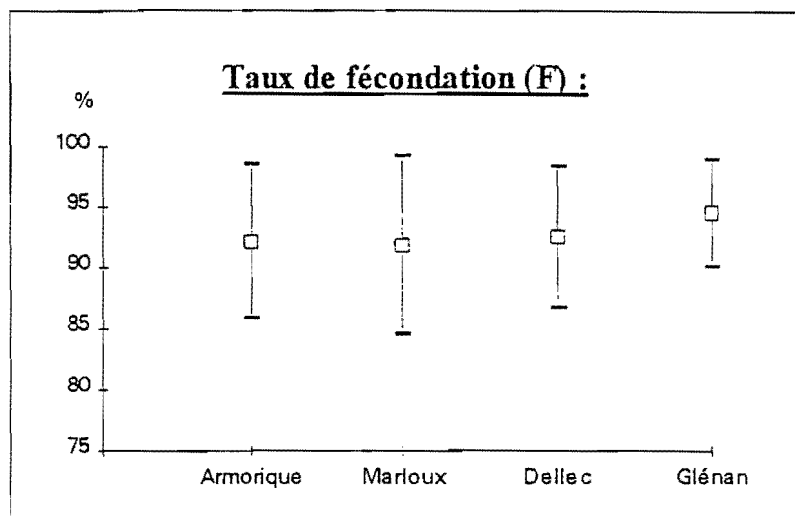


Fig. 3a : taux de fécondation observés pour chaque station

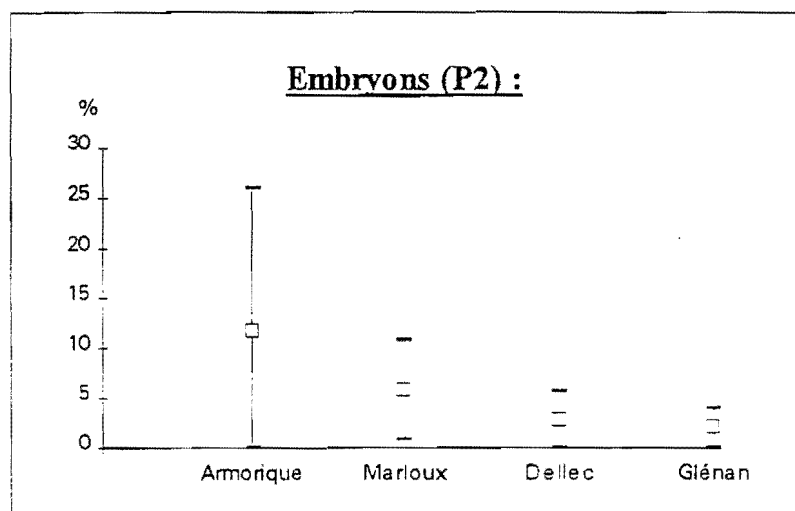


Fig 3b : taux de blocage embryonnaire observés pour chaque station

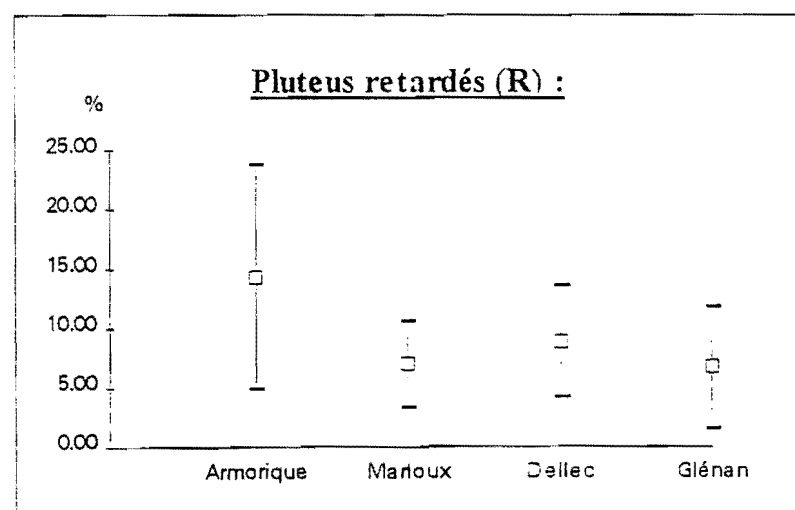


Fig. 3c : taux de pluteus retardés observés sur chaque station

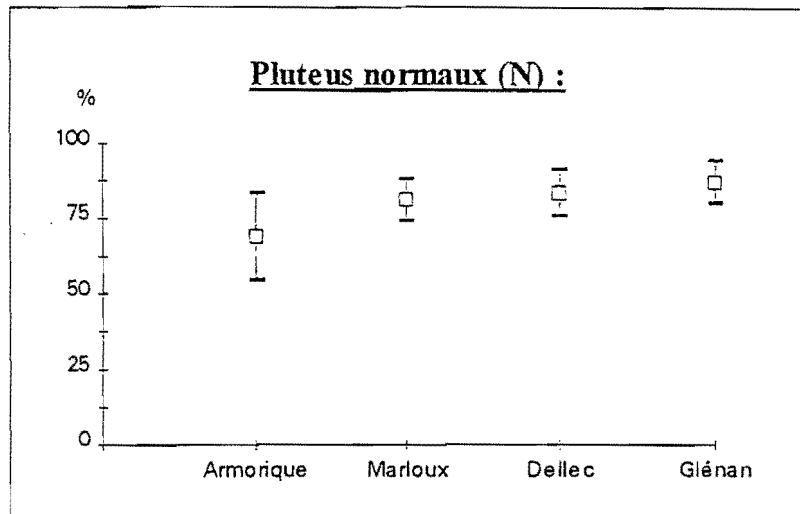


Fig.3d : taux de pluteus normaux observés sur chaque station

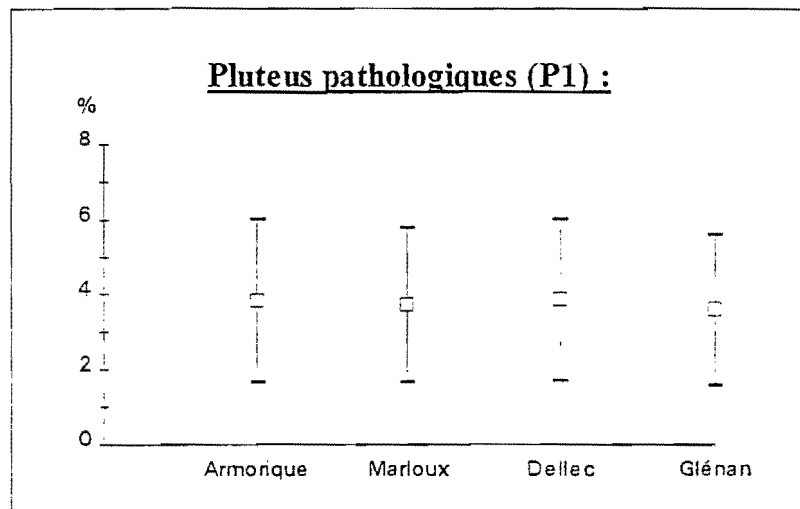


Fig.3e : taux de pluteus pathologiques observés sur chaque station

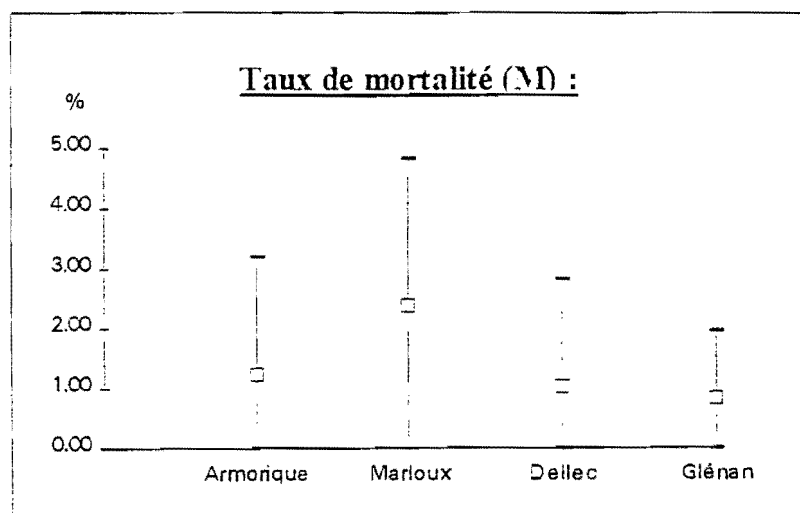


Fig 3f : taux mortalité observés pour chaque station

3° - Génétique des populations:

Les résultats sont rassemblés sur les tableaux n°2 et 3. Sur les 11 loci étudiés, on remarque que la population de l'Armorique s'écarte significativement de l'équilibre de Hardy-Weinberg pour 5 loci (PGM-1 et 2, IDH-1, PGD-1, GPI-1), alors que l'on observe seulement 2 cas pour le site de Marloux. Il est à noter que dans chaque cas, les indices de fixation de la population de l'Armorique sont plus élevés que ceux de Marloux, traduisant une déviation plus importante. Cette observation est corrélée par une hétérozygotie en moyenne plus élevée à Marloux qu'à l'Armorique ($0,207 \pm 0,057$ contre $0,180 \pm 0,052$). Le pourcentage de loci polymorphes (seuil 95%) est de 63,64% à Marloux contre 45,45% à l'Armorique.

L'indicateur de différenciation génétique moyen calculé selon la méthode de Weir et Cockerham est faible ($F_{ST} = 0,0059 \pm 0,0048$) et ne montre pas de différence significative. Dans ces conditions l'estimation du nombre d'individus échangés par génération donne une valeur élevée ($N_m = 42,12 \pm 23,11$).

TABLEAU 2:

RESUME DES F-STATISTIQUES :

Locus	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
PGM-1	0.381	0.384	0.004
PGM-2	0.359	0.360	0.001
IDH-1	0.226	0.233	0.010
PGD-1	0.351	0.352	0.002
MDH-1	-0.013	-0.009	0.005
MDH-2	-0.026	-0.013	0.013
GPI-1	0.346	0.352	0.012
ME-1	0.252	0.253	0.001
ME-2	-0.034	-0.030	0.005
AAT-1	-0.051	-0.040	0.012
AAT-2	0.137	0.137	0.000
Moy.	0.273	0.276	0.006

TABLEAU 3 :

**STRUCTURE GENETIQUE DE DEUX POPULATIONS DE *S.granularis* SUR UNE
BASE DE 11 LOCI :**

Locus	allèle	Pointe de Marlow					Pointe de l'Armorique				
		fréq	Ho	He	D	Het.	fréq	Ho	He	D	Het.
PGM-1	105	0.013	2	1.987	0.006	0.050	-	1	2.924	-0.658 *	0,073
	100	0.975					0.962				
	95	0.013					0.038				
PGM-2	110	0.025	15	22.177	-0.324 *	0.554	-	12	20.468	-0.414 *	0.512
	105	0.262					0.287				
	100	0.613					0.637				
	95	0.087					0.075				
	90	0.013					-				
IDH-1	105	0.081	7	8.260	-0.153	0.223	0.015	3	4.761	-0.370 *	0.140
	100	0.878					0.926				
	95	0.041					0.059				
PGD-1	110	0.025	15	19.392	-0.227	0.485	0.038	9	18.063	-0.502 *	0.452
	107	0.013					-				
	105	0.213					0.250				
	100	0.688					0.700				
	95	0.050					0.013				
	90	0.013					-				
MDH-1	105	-	1	1.000	0.000	0.025	0.013	1	1.000	0.000	0.025
	100	0.988					0.988				
	95	0.013					-				
MDH-2	110	-	0	-	-	-	0.025	2	1.975	0.013	0.049
	100	1.000					0.975				
GPI-1	110	0.112	11	14.620	-0.248 *	0.366	0.175	6	11.696	-0.487 *	0.292
	105	0.075					-				
	100	0.788					0.825				
	95	0.025					-				
ME-1	105	0.050	2	3.848	-0.480	0.096	0.038	3	2.924	0.026	0.073
	100	0.950					0.962				
ME-2	105	0.013	3	2.949	0.017	0.074	0.038	3	2.924	0.026	0.073
	100	0.962					0.962				
	95	0.025					-				
AAT-1	105	0.038	6	5.734	0.046	0.143	0.025	2	1.975	0.013	0.049
	100	0.925					0.975				
	95	0.038					-				
AAT-2	105	0.150	10	10.329	-0.032	0.258	0.138	7	9.608	-0.271	0.240
	100	0.850					0.863				

Hétérozygotie moyenne par locus (non biaisée) = 0.207±0.057

Nombre moyen d'allèles par locus = 3.09±0.44

Pourcentage de loci polymorphes (critère 95%) = 63.64

Hétérozygotie moyenne par locus (non biaisée) = 0.180±0.052

Nombre moyen d'allèles par locus = 2.36±0.20

Pourcentage de loci polymorphes (critère 95%) = 45.45

* locus présentant un déficit en hétérozygotes significatif (test de χ^2 , $p \leq 0,05$)

IV / DISCUSSION :

Il ressort de cette étude une convergence des résultats qui révèle la singularité de la population de la pointe de l'Armorique. En effet, le cycle de reproduction y est à l'évidence perturbé : les valeurs d'indice gonadique sont extrêmement faibles et la ponte non décelable. Le taux d'ingestion est faible. Les tests de développement larvaire présentent des anomalies (blocage aux stades embryonnaires et retard des pluteus), et l'analyse génétique y révèle pour près de 50% des loci une déficience en hétérozygotes traduisant là une baisse de variabilité génétique et une déviation par rapport aux conditions d'Hardy-Weinberg⁹.

Le site voisin de la pointe Marloux semble beaucoup moins affecté, le cycle de reproduction s'y déroule tout à fait normalement (IG plus élevés que sur le site de référence) et l'équilibre panmictique y est généralement mieux respecté. Cependant, les tests écotoxicologiques y décèlent quelques indices de perturbation : les taux de fécondations y sont inférieurs au témoin, les embryons présentent quelques blocages et les taux de mortalité des larves sont statistiquement plus élevés.

Les résultats concernant le site du Dellec n'indiquent pas de différences remarquables par rapport au site de référence. La période de ponte y survient avec un léger décalage, sans doute à mettre à l'actif d'une différence dans les conditions de température et/ou de développement de blooms phytoplanctoniques, certains auteurs faisant concorder le déclenchement de la ponte avec l'abondance de nourriture disponible pour les larves (Himmelman, 1978).

Le comportement des indices de réplétion des populations de la rade de Brest s'avère très distinct de celui de la population de référence, ce qui peut traduire une stratégie adaptative différente ou une couverture des besoins énergétiques insuffisante chez les populations de la rade. Cette observation mérite notre attention puisque dans le cas de la station de Marloux, le substrat est semblable à celui du site témoin et ne peut expliquer le maintien de l'indice de réplétion à des niveaux élevés pendant la période de reproduction.

On peut déduire de ces constatations, une distinction entre les populations du fond de la rade et la station du Dellec située dans le goulet qui semble *a priori* exempte de dégradation.

⁹Hardy-Weinberg (loi de) : loi d'hérédité où la présence des gènes demeure constante de génération en génération en l'absence de sélection, de mutation, d'accouplements dirigés ou d'accidents d'échantillonnage.

Les deux populations du bassin Nord subissent à l'évidence l'influence de facteurs environnementaux qui perturbent leur développement. Ces phénomènes sont provoqués par diverses causes, d'origine naturelle tout d'abord, auxquelles viennent s'ajouter les facteurs anthropiques.

Une certaine hiérarchisation dans l'état de dégradation des sites est à prendre en compte. En effet, des deux zones perturbées, la pointe de l'Armorique est celle où les effets se font le plus durement ressentir.

Ces deux stations diffèrent de par le substrat, le régime hydrodynamique et l'intensité de l'influence estuarienne. La nature du substrat à Marloux est la même que sur le site de référence des Glénan : il s'agit de fonds meubles composés de maërl vivant recouvert d'épiphytes synonymes de ressources trophiques abondantes et disponibles toute l'année; ce qui explique les indices gonadiques élevés observés pour ces deux sites. A Marloux, l'hydrodynamisme est calme, favorable au développement d'une végétation dense d'algues macrophytes saisonnières (Hily *et al*, 1992). Cette couverture végétale est renforcée par l'enrichissement du milieu en sels nutritifs provenant du bassin versant de l'Elorn à vocation agricole ($\text{NO}_3^- = 500$ à 1000kg/j , $\text{PO}_4^{3-} = 30$ à 700kg/j). Les concentrations dans cette zones sont élevées et varient au cours de l'année, elles sont maximales l'hiver ($\text{NO}_3^- = 28-51 \text{mg/l}$, $\text{PO}_4^{3-} = 0,67-1,37 \text{mg/l}$, $\text{NH}_4^+ = 4,1-3,7 \text{mg/l}$). La présence de ces algues contribue à augmenter et à diversifier les ressources trophiques disponibles, elle favorise le développement d'une faune diversifiée de brouteurs.

Sur le site de la pointe de l'Armorique, par contre, le substrat est rocheux et les courants forts. Le couvert végétal y est au contraire clairsemé et composé d'algues essentiellement saisonnières. La population de l'Armorique se trouve donc dans des conditions de ressources trophiques moins facilement accessibles et plus limitées, comme l'atteste le développement plus important de l'organe masticateur (par effet compensateur) signalé lors d'une étude comparée de ces deux populations. (Lumingas & Guillou, *sous presse*). L'analyse des indices physiologiques doit se faire en considérant que "le degré de prospérité d'une population résulte d'un compromis entre la nature et l'abondance des ressources trophiques d'une part, et d'autre part, de l'énergie que l'animal doit dépenser pour collecter, digérer et assimiler cette nourriture"

(Régis, 1979). Les deux populations étant au départ placées dans des conditions inégales, l'apparition de facteurs extérieurs ne pourrait qu'amplifier cette différence au détriment de la plus défavorisée.

L'examen comparatif des courbes d'évolution de température entre le Dellec et la pointe de l'Armorique (stations fixes de mesures hydrologiques) montre un écart de 0,5 à 1°C en faveur de la partie la plus reculée de la rade (cf Annexe V). En tenant compte de la profondeur, on peut en déduire pour le site de Marloux, où la profondeur est faible, un écart de température d'environ +1,5°C par rapport au Dellec. Cette particularité pourrait expliquer la précocité de la maturité remarquée chez la population de Marloux. Plusieurs interprétations peuvent expliquer la chute de l'indice gonadique observée en mars : interruption dans le développement des gonades provoquée par les précipitations hivernales (Cochran & Engelmann, 1975; Starr *et al* 1993), une mobilisation des réserves dues aux conditions climatiques (Guillou & Michel, 1993), ou au contraire une gamétogénèse précoce comme le laisse supposer la forte valeur de l'indice gonadique en janvier.

Les tests de fécondation étant réalisés dans une eau de référence, les causes de perturbation du développement larvaire sont intrinsèques aux gamètes. Il peut s'agir soit de la qualité du vitellus, soit d'altérations génétiques, soit de l'accumulation dans les gonades d'un agent contaminant présent dans le milieu. Gamètes et embryons d'oursins sont sensibles à un large éventail de facteurs physiques (température, pH, salinité etc...) et chimiques (métaux, pesticides, PCBs, hydrocarbures etc...). Ils conviennent également pour tester les effluents en mélange (Kobayashi, 1971; Dinnel *et al*, 1981; Pagano *et al*, 1987, Lassus *et al*, 1991), ce qui rend plus difficile la recherche des agents responsables des anomalies observées.

On peut tout de même mentionner les fortes teneurs en métaux lourds présents dans toute la partie Est de la rade (mine de plomb argentifère située à Huelgoat). Des mesures récentes de métaux dans les sédiments à proximité de la pointe de l'Armorique font état des concentrations suivantes : Cu=25,3 ppm, Pb=230 ppm, Zn=160 ppm (Troadec, com. pers.). Les oursins en tant qu'organismes inféodés au sédiment et participant à leur bioturbation, sont directement exposés à ce type de contamination. Plusieurs études *in situ* font état de l'accumulation de

métaux par les oursins, notamment dans les gonades et l'intestin (Augier *et al.*, 1987b; Albanedo *et al.*, 1990).

Les tests de toxicité des métaux lourds sur les larves de différentes espèces d'oursins ont fait l'objet de nombreux travaux, et les effets de ces polluants sur la fécondation et le développement des larves sont assez bien connus (Kobayashi, 1984; Dinnel *et al.*, 1989). A faibles doses, les ions métalliques peuvent exercer une action positive, caractérisant le phénomène d' "hormèse" observé par Stebbing (1981) sur des colonies d'hydrozoaires. Une action semblable est rapportée par Young au niveau du pouvoir fertilisant des spermatozoïdes d'oursins pour des concentrations en divers ions métalliques allant de 10^{-5} à 10^{-6} M (Young & Nelson, 1974). Cependant, il s'agit de phénomènes marginaux et la tendance générale de ces éléments se manifeste bien évidemment par un effet toxique. Le cuivre, le zinc, le cadmium provoquent à des seuils différents des dommages sur les gamètes et leur descendance en altérant soit la croissance des larves, soit la différenciation squelettique des pluteus (Bougis, 1961, 1965, Khristoforova *et al.*, 1984, Pagano *et al.*, 1982, Heslinga, 1976). Les différents stades larvaires présentent des sensibilités différentes, les travaux de Kobayashi (1980) montrent une plus forte sensibilité des spermatozoïdes et des larves au stade gastrula, ce qui coïncide avec les blocages embryonnaires observés à ce stade sur le site de l'Armorique. La présence de métaux dans les gonades pourraient donc logiquement expliquer les résultats obtenus. De plus, de fortes présomptions pèsent sur les rejets de matériel provenant du service pyrotechnique de la Marine Nationale sur la pointe de l'Armorique.

Les résultats d'une toute récente analyse effectuée par le Laboratoire Municipal de Brest (août 94) sur des gonades d'oursins provenant des trois stations de la rade confirme cette hypothèse (cf Annexe VI). Le site de l'Armorique se distingue par des teneurs nettement plus élevées en fer, zinc, plomb et en cadmium (Fe=263 ppm, Zn=356 ppm, Pb=0,75 ppm, Cd=0,76 ppm, c'est à dire, selon les métaux, entre 2 à 5 fois plus que dans les autres stations). Dans l'ensemble, une certaine contamination métallique peut être remarquée, dont l'origine se situe dans le trafic maritime, les rejets domestiques et portuaires et les peintures anti-fouling. Les fortes concentrations en zinc proviennent des toitures de l'agglomération brestoise. Les nombreux élevages porcins de la région peuvent aussi contribuer à la pollution en cuivre par

l'alimentation fournie aux animaux. Cependant, la forte contamination locale du site de l'Armorique en fer, zinc, plomb et cadmium ne peut avoir qu'une origine ponctuelle qui confirme les soupçons pesant sur les activités militaires dans ce secteur. Comparés aux chiffres trouvés dans la littérature, les résultats sont cohérents : Augier *et al.*(1987b), lors d'une étude sur *Paracentrotus lividus* en baie de Port-Cros, avance des concentrations dans les gonades comparables (Cd=0,52 à 2,31 ppm, Cu=1,67 à 5,42 ppm, Pb=0,33 à 1,17 ppm), mais des teneurs en mercure sensiblement plus faibles (Hg=0,03 à 0,04 ppm). Chez une autre espèce (*Echinometra mathaei*), les travaux d'Albanedo *et al.*(1990), indiquent dans une station très polluée du port de la Havane des concentrations élevées en métaux : Fe=108 ppm, Cu=4,73 ppm, Zn=267 ppm, chiffres qui, sauf pour le cuivre, restent inférieurs aux mesures observées à la pointe de l'Armorique. Ces auteurs montrent une accumulation des métaux lourds relativement importante dans les différents organes des oursins, notamment au niveau du tube digestif (cas du plomb et du cuivre). Il serait intéressant de connaître également les doses dans les autres parties de l'organisme. Cette accumulation présentant des fluctuations saisonnières liées au métabolisme de l'animal, un suivi plus régulier des concentrations en métaux devrait être envisagé.

Cependant les métaux peuvent ne pas être les seuls agents à mettre en cause. Les pesticides et les hydrocarbures sont également susceptibles de pouvoir provoquer des anomalies (cf Annexe VII). Les PCBs, employés dans de nombreux secteurs industriels, bien que quelquefois signalés dans les sédiments de la zone portuaire à des taux importants (PCBs=183 ppb:Marchand, 1985) semblent à écarter. En effet Trieff *et al.*(1988), bien qu'il mette en évidence un effet spermatoxique, signale l'absence d'accumulation de ce type de produits dans les organismes, ce qui présente comme impossible toute influence des PCBs dans les conditions où les expériences ont été menées.

La présence dans le bassin Nord de rejets de deux stations d'épuration situées en amont de la Penfeld exerce aussi une influence sur la qualité bactériologique des eaux de ce secteur. Leurs apports sont estimés à 10^{14} CF/h. D'autre part, le ruisseau du Relecq Kerhuon, situé près de l'estuaire de l'Elorn, amène quant à lui jusqu'à 10^{12} CF/h en hiver (source DDE : rapport "Saunier, eau et environnement"). Ces chiffres peuvent apporter une explication aux mortalité

des larves observées pour le site de Marloux : des bactéries pathogènes présentes dans les gonades peuvent s'être développées pendant la période d'incubation.

Les résultats de l'analyse génétique trahissent un déficit en hétérozygotes important sur le site de la pointe de l'Armorique. Ce déficit, fréquemment rencontré chez les mollusques bivalves (Buroker, 1983; Singh & Green, 1984) et d'autres invertébrés marins (Murphy *et al*, 1975; Day & Bayne, 1988), peut avoir plusieurs significations : il s'agit soit de la présence d'allèles "silencieux" (1), soit d'un phénomène d'inbreeding (2), soit d'un effet Wahlund (3), ou encore du résultat de la pression de sélection exercée par les facteurs énoncés plus haut (4).

(1) L'hypothèse de la présence d'allèles nuls¹⁰ est peu probable étant donné le nombre de loci présentant un excès d'homozygotes.

(2) Le phénomène d'autofécondation n'est pas à écarter car des cas d'hermaphrodisme, certes peu fréquents, ont déjà été rapportés sur ce même site (Neefs, 1952). L'éventualité que les gènes impliqués ne soient pas portés par des chromosomes autosomaux n'a pas été vérifiée.

(3) Les conditions d'hydrodynamisme s'exerçant sur cette zone peuvent être invoquées pour venir conforter la thèse d'un effet Wahlund (conséquence d'un échantillonnage effectué sur deux sous-échantillons d'un même site se comportant comme des populations Mendelliennes séparées).

(4) Une sélection exercée par les conditions du milieu reste l'explication la plus probable. Cette influence des facteurs environnementaux, comme la présence de métaux mentionnée précédemment, s'exerce pendant la vie larvaire pélagique mais surtout durant la phase critique de la métamorphose et les étapes qui suivent le recrutement. La métamorphose chez les oursins survient après une période variable de vie larvaire pouvant durer selon les espèces et les conditions entre 5 et 22 semaines (Strathmann, 1987), ce qui expose les larves à de nombreux aléas. Certains auteurs évoquent l'importance du recrutement comme facteur d'hétérogénéité génétique entre populations (Watts *et al*, 1990). Or, une étude comparative des populations des deux sites concernés a montré une forte irrégularité du recrutement dans la population de Marloux par rapport à celle de la pointe de l'Armorique (Lumingas & Guillou, *sous presse*). Ces auteurs imputent ce phénomène au spectaculaire développement d'algues qui apparaît

¹⁰allèle nul (ou silencieux) : est dit d'un allèle qui ne s'exprime pas sur le gel

chaque année sur ce site à la faveur des apports fluviaux en éléments nutritifs. D'une part il inhiberait l'action attractive du maërl, d'autre part, la décomposition de ces végétaux à l'automne provoquerait la mortalité des recrues en réduisant la couche superficielle du sédiment et entraînerait le développement d'un film bactérien empêchant la fixation des post-larves. Le site de la pointe de l'Armorique semble au contraire avoir des recrutements réguliers.

Les groupes de recrues connaissent donc des destins différents sur les deux sites, ce qui pourrait expliquer les différences d'hétérozygotie observées.

Pour confirmer cette hypothèse, il conviendrait de comparer des échantillons plus grands d'individus de même âge correspondant à une période où le recrutement a été bon sur les deux sites, voire même de comparer directement les génotypes des jeunes individus recrutés dans les deux sites. D'autre part, la comparaison du site de la pointe de l'Armorique avec celui du Dellec pourrait fournir des indications importantes pour confirmer l'hypothèse de l'existence d'une pression de sélection.

V / CONCLUSION :

L'étude des phases de reproduction et développement larvaire des populations d'oursins de la Rade de Brest met en évidence des troubles fonctionnels chez les populations du bassin Nord, proches de la zone portuaire, en particulier sur le site de la pointe de l'Armorique, qui contraste avec les bons résultats obtenus pour le site du Dellec, sous influence océanique. La convergence des données de génétique avec les résultats observés confirme la validité de la méthode utilisée, et renforce la fiabilité de *S. granularis* comme bioindicateur.

Les causes de ces dérèglements sont sans doute multiples, aussi ce travail mérite-t-il un suivi à plus long terme. L'étude des différents paramètres influençant les conditions de vie des oursins de la pointe de l'Armorique (température, salinité, sédimentologie, biomasse, matière organique...) ainsi que des essais de transplantations *in situ* d'individus sains devraient permettre de mieux préciser les facteurs responsables de ces perturbations.

Quant aux premiers résultats d'analyses des teneurs en métaux lourds du Laboratoire Municipal, ils devraient être étendus à d'autres parties du corps (test, intestin) et effectués sur un cycle annuel, y compris sur le site des Glénan.

VI / BIBLIOGRAPHIE :

- ALBANEDO N., H. GONZALEZ, M. RAMIREZ, I. TORRES (1990) : Evaluacion del erizo de mar *Echinometra lucunter* como indicador de contaminacion por metales pesades, Cuba, *Aquatic living ressour.* (3) : 113 - 120.
- AUGIER H. (1987a) : Bioindicateurs et indicateurs biologico-biochimiques en pollution marine, *Rev. Int. Océanogr. Méd.*, tomes LXXXV-LXXXVI.
- AUGIER H., G. RAMONDA, M. SANTIMONE (1987b) : Teneur en métaux lourds des oursins comestibles *Paracentrotus lividus* dans les zones à grande activité touristique de l'île de Port-Cros, *Coll. International sur P.lividus et les oursins comestibles*, C.F. BOUDOURESQUE edit., GIS Posidonie Publ., Marseille, p. 271 - 284.
- AYALA F. J., (1982) : *Biologie moléculaire et évolution*, Paris, New York, Barcelone, Milan, Mexico, Rio de Janeiro, Collection de Biologie évolutive, LUCOTTE G. (ed.), Masson.
- BOUGIS P., (1961) : Sur l'effet biologique du Zinc en eau de mer, *C. R. Acad. Scien. Paris*, 253, (4) : 740-741.
- BOUGIS P., (1965) : Effet du Cuivre sur la croissance du pluteus d'oursin (*Paracentrotus lividus*), *C. R. Acad. Scien. Paris*, 260 : 2929-2931
- BOUGIS P., (1981) : Utilisation des larves d'oursins pour des tests biologiques, *Colloques de l'INSERM*, vol. 106 : 415-419.
- BRISTOW G. A., S. VADAS R. L. Jr, (1991) : Genetic variability in bloodworm (*Glycera dibranchiata*) populations in the Gulf of Maine, *Marine Biology*, 109 : 311-319.
- BUROKER N.E., (1983) : Population genetics of the American oyster *Crassostrea virginica* along the Atlantic coast and the Gulf of Mexico, *Marine Biology*, 75 : 99-112.
- CHERBONNIER G., (1958) : *Faune marine des Pyrénées orientales, Fasc. 2 : Echinodermes*, Université de Paris et Laboratoire Arago, France, 1-67.
- CHEVALLIER B., (1993) : Influence de l'environnement sur le cycle vital de l'oursin *Sphaerechinus granularis* en rade de Brest, *rapport de DEA d'Océanographie Biologique*, Université de Bretagne Occidentale - Brest, 30 p.

COCHRAN R. C., ENGELMANN F., (1975) : Environmental regulation of the annual reproductive season of *Strongylocentrotus purpuratus* (Stimpson), *Biol. Bull.*, 148 : 393-401.

COMELY C. A., ANSELL A. D., (1989) : The reproductive cycle of *Echinus esculentus* on the Scottish West Coast, *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 29, 385-407.

DAY A. J., BAYNE B. L., (1988) : Allozyme variation in population of the dog-whelk *Nucella lapillus* (Prosobranchia, Muriacea) from the South West peninsula of England, *Marine Biology*, 99, 93-100.

DELMAS P., M. B. REGIS, (1984) : Influence d'une pollution complexe à dominante domestique sur les populations de l'échinoïde comestible *Paracentrotus lividus* (Lamarck), *Vie marine*, (6) : 63-72.

DINNEL P., STOBBER Q. (1981) : Sea urchin sperm bioassay for sewage and chlorinated sea water and its relation to fish bioassay, *Marine Environmental Research*, 5 : 29-39.

DINNEL P., LINK J., STOBBER Q., (1987) : Improved methodology for sea urchin sperm cell bioassay for marine waters, *Arch. of Envir. Contam. and Toxicology*, 16 : 23-32.

DINNEL P., LINK J., STOBBER Q., LETOURNEAU M., ROBERTS W. (1989) : Comparative sensitivity of sea urchin sperm bioassays to metals and pesticides, *Arch. of Environ. Contam. and Toxicology*, 18 : 748-755.

FENAUX L., (1972) : Modalités de ponte chez l'oursin *Sphaerechinus granularis* (Lamarck), *Internationale Revue der Gesamten Hydrobiol.*, 57, 4 : 551-558.

GONOR J. J., (1972) : Gonad growth in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* (Stimpson) (Echinodermata : Echinoïdea) and the assumptions of gonad index methods, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 10 : 89-103.

GUILLOU M., MICHEL C., (1993) : Reproduction and growth of *Sphaerechinus granularis* (Echinodermata : Echinoïdea) in Southern Brittany, *Journal of the marine biological Association of the United Kingdom*, 73 : 179-192.

HAGSTRÖM B. E., LÖNNING S., (1974) : The sea urchin egg as a testing object in toxicology, *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, vol. 32, sup. 1.

HARMELIN J. G., BOUCHON C., HONG J. S., (1981) : Impact de la pollution sur la distribution des Echinodermes des substrats durs en Provence (Méditerranée Nord Occidentale), *Thétys*, 10, (1) : 13-36.

HESLINGA G. A., (1976) : Effects of the Copper on the coral reef Echinoid *Echinometra mathaei*, *Marine Biology*, 35 : 155-160.

HILY C., POTIN P., FLOCH J.Y., (1992) : Structure of subtidal algal assemblages on soft-bottom sediments : fauna/flora interactions and role in disturbances in the Bay of Brest, France, *Marine Ecology Progress Series*, vol. 85, 115-130.

HIMMELMAN J. H., (1978) : Reproductive cycle of the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*, *Can. J. Zoology*, 56, 1828-1836.

KHRISTOFOROVA N. K., GNEZDILOVA S., VLASOVA G. A., (1984) : Effects of Cadmium on gametogenesis and offspring of the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*, *Mar. Ecol. Prog.*, Ser. 17 : 9-14.

KOBAYASHI N., (1971) : Fertilized sea urchin egg as an indicatory material for marine pollution bioassay, preliminary experiments, *Publ. Seto Mar. Biol. Lab.*, XVIII, (6) : 379-406.

KOBAYASHI N., (1980) : Comparative sensitivity of various developmental stages of sea urchins to some chemicals, *Marine Biology*, 58 : 173-171.

KOBAYASHI N., (1984) : Marine ecotoxicological testing with Echinoderms, *Ecotoxicological testing for the marine environment*, Persoone G. *et al* (eds.), State Univ. of Ghent and Inst. for Marine Scientific Research, Bredene - Belgium, vol. 1, 798 p.

KOEHLER R., (1921) : *Faune de France, vol. I, Echinodermes*, Paris : Paul Lechevallier.

LASSUS P., BOGE G., GENTIEN P., LOARER R., PAGANO G., QUINIOU F., (1991) : Toxicité des rejets urbains, *In La mer et les rejets urbains, Bendor, 13-15 juin 1990*, IFREMER, Actes de colloques, 11, 171-186.

LUMINGAS L., GUILLOU M., (sous presse) : Plasticité de l'oursin *Sphaerechinus granularis* en réponse aux variations de l'environnement, *Proc. 8th International Echinoderm Conference*, Dijon, Sept. 1993, Publ. Balkema.

MURPHY L. S., ROWE G. T., HAEDRICH R., (1975) : Genetic variability in deep sea echinoderms, *Deep Sea Research*, (1976), vol. 23 : 339-348.

NEDELEC H., (1983) : Sur un nouvel indice de réplétion pour les oursins réguliers, *Rapports de procès verbaux des réunions*, Commission Internationale pour l'Exploration Scientifique de la mer Méditerranée, Monaco, 28, (3) : 149-151.

NEEFS Y., (1952) : Sur le cycle sexuel de *Sphaerechinus granularis* (Lmk), *Compte rendu de Séances de l'Académie des Sciences*, 234, 2233-2235.

NEI M., (1977) : F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations, *Annals of Human Genetics*, 41, 225-233.

PAGANO G., ESPOSITO A., GIORDANO G. (1982) : Fertilization and larval development in sea urchins following exposure of gametes and embryos to Cadmium, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 11 : 47-55.

PAGANO G., CORSALE G., ESPOSITO A., GIORDANO G. (1987) : Essais de toxicité sur les embryons et le sperme des Echinoïdes, *Coll. International sur P. lividus et les oursins comestibles*, C.F. Boudouresque Edit., GIS Posidonie Publ., Marseille, p 285-297

PAGANO G., CORSALE G., DINNEL P., ESPOSITO A., ROMANA L. A., (1989) : Use of the sea urchin sperm and embryo bioassay in testing sublethal toxicity of realistic pollutants levels, *Carcinogenic mutagenic and teratogenic marine pollutants : impacts on human health and environment*, E. Grandjean ed., Houston, Gulf publishing Co., 153-164.

PAGANO G., ROMANA L. A., (1991) : L'utilisation des oursins de mer comme témoins de contamination, *Océanis*, vol. 17, (4) : 367-381.

PASTEUR N., PASTEUR G., BONHOMME F., CATALAN J., BRITTON-DAVIDIAN J., (1987) : *Manuel technique de génétique par électrophorèse des protéines*, Technique et documentation, Lavoisier Ed.

REGIS M. B., (1979) : Analyses des fluctuations des indices physiologiques chez deux échinoïdes *Paracentrotus lividus* (Lmk) et *Arbacia lixula* (L.) du golfe de Marseille, *Thétys*, 9, (2) : 167-181.

- SEMROUD R., SENOUSSE Y., (1989) : Données préliminaires sur l'indice de réplétion, l'indice gonadique et le sex ratio de *Sphaerechinus granularis*, *Vie marine*, HS 10, 86-94.
- SHAW C. R., PRASAD R., (1970) : Starch gel electrophoresis of Enzymes - a compilation of recipes, *Biochemical genetics*, 4 : 297-320.
- SIEBENALLER J. F., (1978) : Genetic variation in deep sea invertebrate populations : the bathyal Gastropod *Bathybembyx bairdii*, *Marine Biology*, 47 : 265-275.
- SINGH S. M., GREEN R. H., (1984) : Excess of allozyme homozygosity in marine molluscs and its possible significance, *Malacologia*, 25, (2) : 569-581.
- STARR M., HIMMELMAN J. H., THERRIAULT J. C., (1993) : Environmental control of green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis* spawning in the St. Lawrence Estuary, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 50, (5) : 894-901.
- STATISTICAL GRAPHICS CORPORATION, (1993) : Statistical graphics system, reference manual, *STATGRAPHICS Version 7*, Rockville, USA : Manugistics Inc.
- STEBBING A., (1981) : Hormesis - Stimulation of colony growth in *Campanularia flexuosa* (Hydrozoa) by Copper, Cadmium and other toxicants, *Aquat. Toxicol.*, 1 : 227-238.
- STRATHMANN M., (1987) : Reproduction and development of marine Invertebrate of the Northern Pacific Coast, *Univ. of Washington Press*, 592, (16) : 511-534.
- SWOFFORD D. L., SELANDER R. B., (1981) : BIOSYS - 1 - a FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoresis data in population genetics and systematics, *Journal of Heredity*, 72, 282-283.
- TORTONESE E., (1965) : *Fauna d'Italia, vol. VI Echinodermata*, ed. Calderine, Bologna : Italia.
- TRIEFF N. M., CIPOLLARO M., CORSALE G., ESPOSITO A., RAGUCCI E., GIORDANO G., RAMANUJAM S. V., LIVINGSTONE D. R., PAGANO G., (1988) : Aroclor 1254 toxicity in sea urchin embryos and gametes, *Exp. Oncol. (Life Science Adv.)*, 7 : 57-64

WATTS R. J., JOHNSON M. S., BLACK R., (1990) : Effects of recruitment on genetic patchiness in the urchin *Echinometra mathaei* in Western Australia, *Marine Biology*, 105 : 145-151.

WEIR B. S., COCKERHAM C. C., (1984) : Estimating F-statistics for the analysis of population structure, *Evolution*, 38, (6) : 1358-1370.

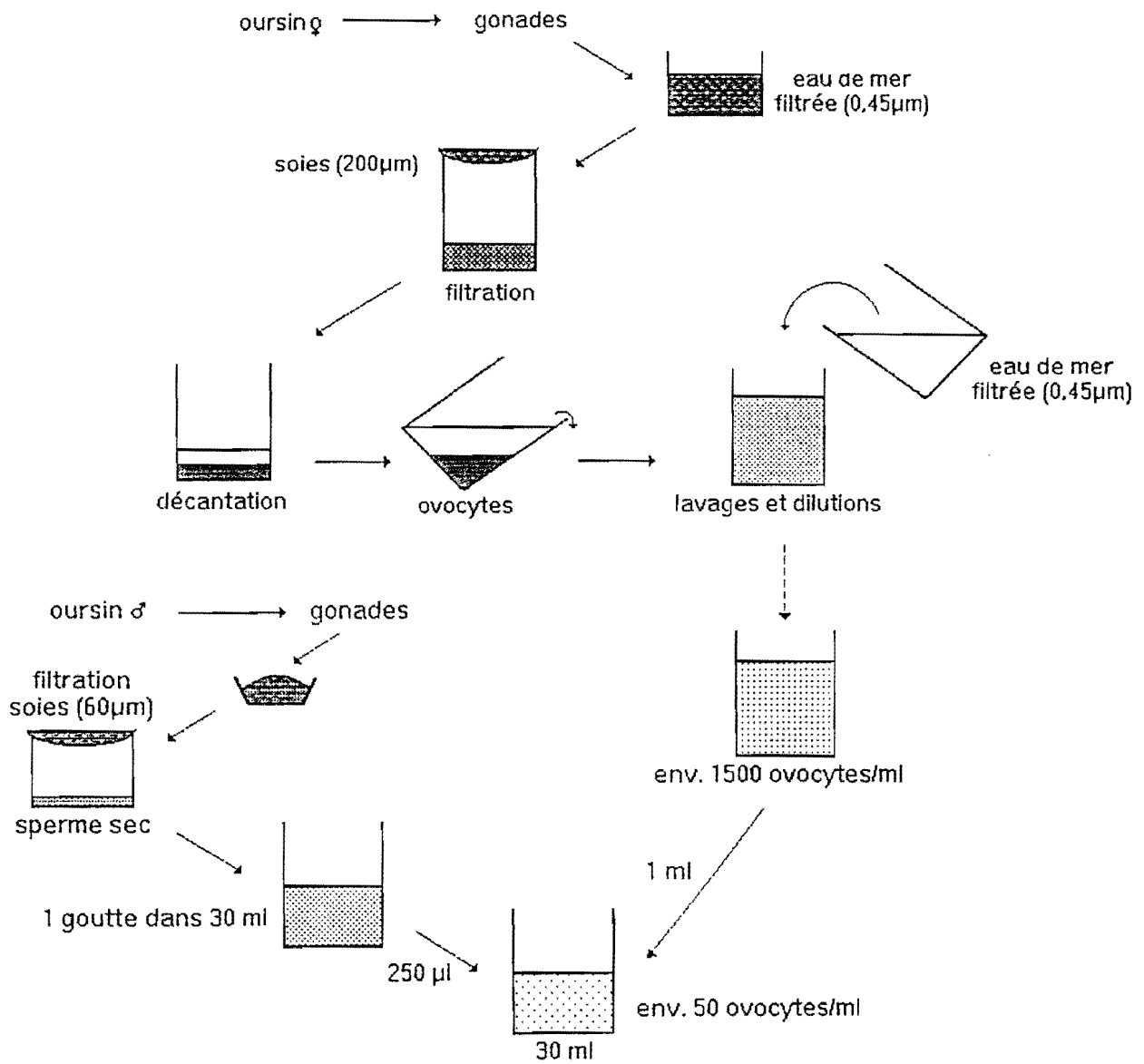
WORKMAN P. L., NISWANDER J. D., (1970) : Population studies on Southwestern indian tribes. II Local genetic differentiation in the Papago, *American journal of Human Genetics*, 22, 24-49.

WRIGHT S., (1965) : The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to system of mating, *Evolution*, 19, 395-420.

YOUNG L., NELSON L., (1974) : The effects of heavy metals ions on the motility of sea urchins spermatozoa, *Biol. Bull.*, 147 : 236-246.

ANNEXE I :

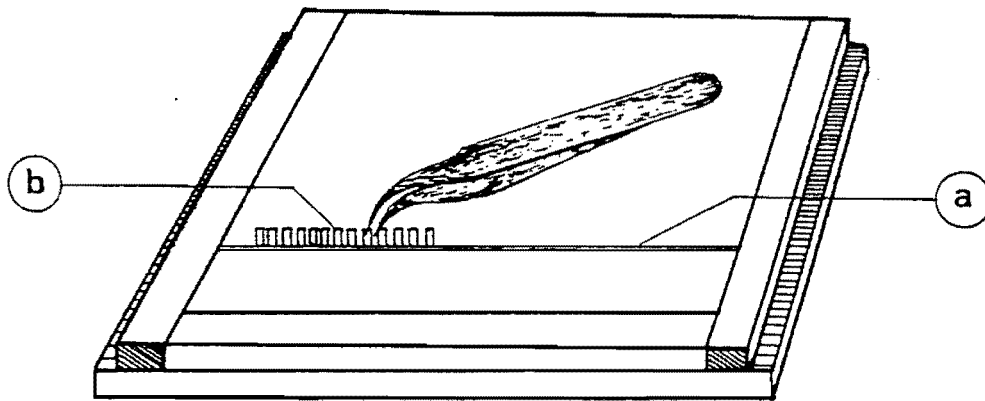
SCHEMA DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL DES TESTS DE FECONDATION *IN VITRO* :



ANNEXE II :

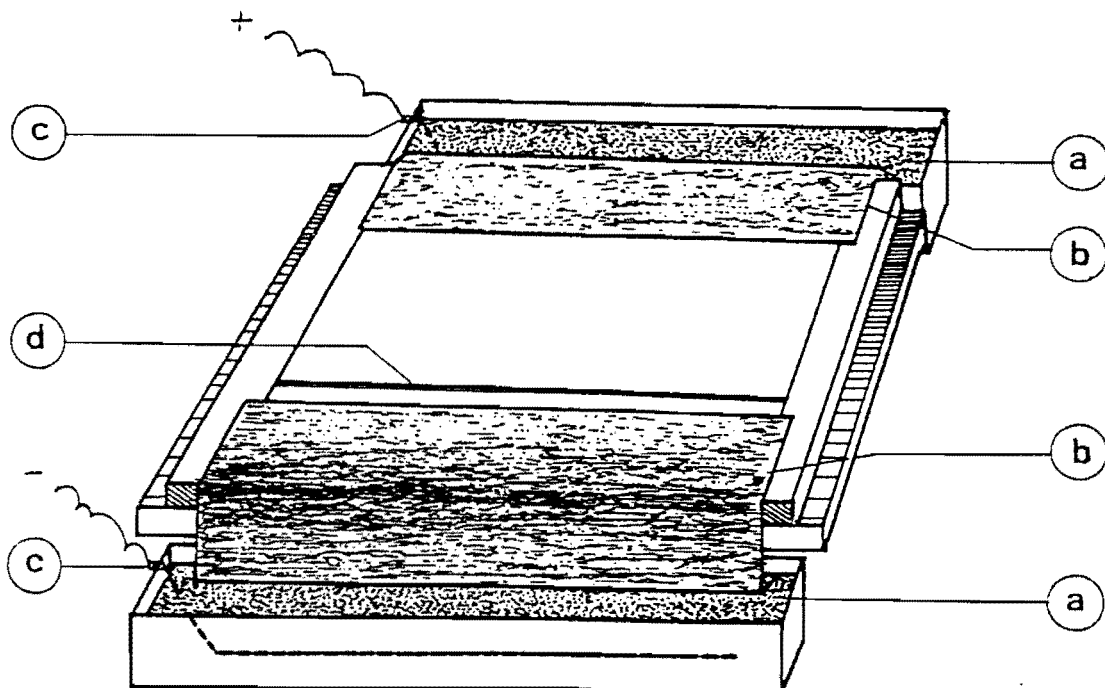
ELECTROPHORESE :

Installation des échantillons :



- a : coupe pratiquée dans le gel
- b : échantillons

Montage du circuit :



- a : tampon d'électrodes
- b : éponges
- c : électrodes reliées au générateur
- d : ligne d'insertion des échantillons

ANNEXE III :

PREPARATION DES SOLUTIONS D'ELECTROPHORESE :

Tampon Tris Citrate pH 8 (TC 8):

- Electrodes :

Tris (0,62M) : 75,6 g
Ac. citrique (0,14M) : 30,0 g
eau distillée qsp 1 l.

- Gel :

30 ml de tampon électrodes dans 900 ml d'eau distillée.
ajuster à pH 8 avec du Tris (1M) ou de l'acide citrique (1M).

Tampon discontinu Tris Citrate pH 6,7 (TC 6,7) :

- Electrodes : pH 6,3

Tris (0,22M) : 27,0 g
Ac. citrique (0,08M) : 18,0 g
eau distillée qsp 1 l.

ajuster à pH 6,3 avec du Tris (1M) ou de l'acide citrique (1M).

- Gel : pH 6,7

Tris (0,008M) : 0,97 g
Ac. citrique, H₂O (0,003M) : 0,63 g
eau distillée qsp 1 l.

ajuster à pH 6,7 avec du Tris (1M) ou de l'acide citrique (1M).

Résolution obtenue par système enzymatique :

Locus	Muscle		Tube Digestif		Gonades		Nbre d'allèles
	TC pH 8	TC pH 6,7	TC pH 8	TC pH 6,7	TC pH 8	TC pH 6,7	
AAT-1	-	+		-		+	3
AAT-2	+	++		-		+	2
GPD-1	-	-				-	
IDH-1	+	+	+			+	3
LAP-1	-	-		-		-	
MDH-1	+++		++		+		3
MDH-2	+++		++		+		2
ME-1	+	++		-		-	2
ME-2	+	++		-		-	3
PGD-1	++	-	+	-	+	-	6
PGI-1	+++	++	++	++	+	+	4
PGM-1	+	++		+		-	3
PGM-2	+++	+++		+		++	4

- : Faible ++ : Bonne
+ : Moyenne +++ : Très bonne

ANNEXE IV :

SOLUTIONS DE COLORATIONS :

AAT :

(Aspartate-aminotransférase)

Tris A : 80 ml
Ac. α CétoGlutarique : 100 mg
Ac. Aspartique : 200 mg
Phosphate de pyridoxal : 10 mg
dissoudre, vérifier que pH < 7,4
(ajuster avec Tris 1M)
verser et incubé à 37°C pendant 15 min.
puis ajouter : Fast Blue BB : 100 mg

IDH :

(Isocitrate déshydrogénase)

Tris A : 70 ml
Isocitrate (0,1M) : 8 ml
MnCl₂ (0,25M) : 0,6 ml
MgCl₂ (0,5M) : 0,5 ml
ajouter avant coloration :
Isocitrate (poudre) : 10 mg
NADP 1% : 2 ml
PMS : 1 ml
NBT : 1 ml
MTT : 0,5 ml

MDH :

(Malate Déshydrogénase)

Tris A : 10 ml
MgCl₂ (0,5M) : 0,2 ml
Ac. Malique (2M) : 3 ml
NAD 1% : 1,5 ml
puis ajouter avant coloration :
PMS : 0,3 ml
NBT : 0,7 ml
MTT : 0,7 ml
+Agar dans Tris A tiède : 10 ml

6PGD :

(6Phosphogluconate Déshydrogénase)

Tris A : 10 ml
MgCl₂ (0,5M) : 1,5 ml
6Phosphogluconate : 20 mg
puis ajouter avant coloration :
NADP 1% : 0,1 ml
PMS : 0,1 ml
NBT : 0,2 ml
MTT : 0,2 ml
+Agar dans Tris A tiède : 10 ml

GPI :

(Glucose-Phosphate Isomérase)

Tris A : 10 ml
MgCl₂ (0,5M) : 1 ml
Fructose 6P : 10 mg
puis ajouter avant coloration :
NADP 1% : 0,5 ml
PMS : 0,5 ml
NBT : 0,5 ml
MTT : 0,5 ml
G6PDH : 6 μ l ou 17u
+Agar dans Tris A tiède : 10 ml

LAP :

(Leucine-aminopeptidase)

Tris-Malate : 90 ml, préchauffé à 30°C
MnCl₂ (0,1M) : 1 ml
MgCl₂ (0,5M) : 1 ml
L.leucil β Naphthylamine : 15 à 20 mg
incubation 30 min. à 37°C
ajouter avant coloration:
Fast Garnet GBC : 60 mg
dilué dans quelques gouttes de Tris-Malate
(manipuler ce produit avec des gants)

ME :

(Malico-Enzyme)

Tris A : 10 ml
MgCl₂ (0,5M) : 1,5 ml
Ac. Malique (2M) : 1 ml
puis ajouter avant coloration :
NADP 1% : 0,1 ml
PMS : 0,3 ml
NBT : 0,7 ml
MTT : 0,7 ml
+Agar dans Tris A tiède : 10 ml

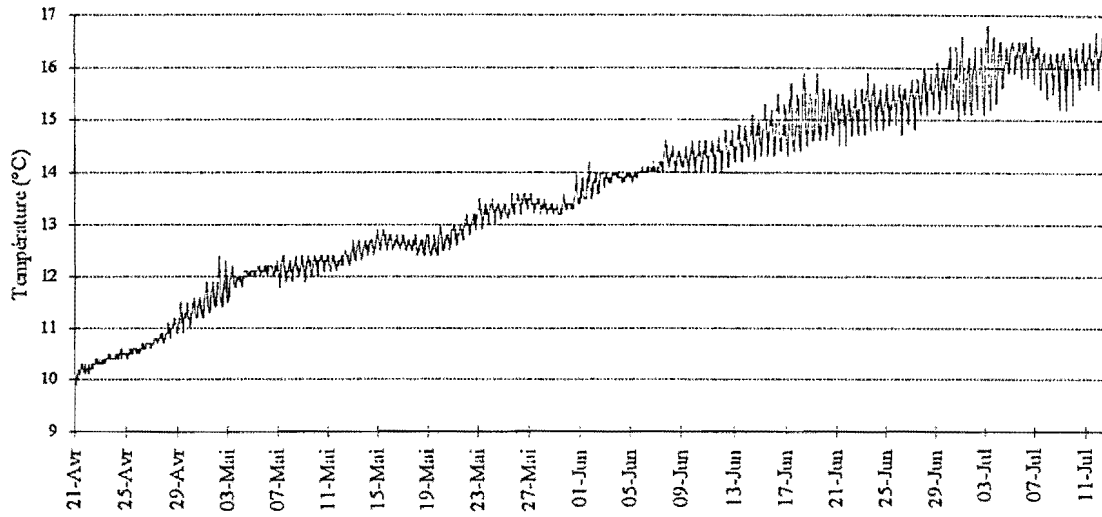
PGM :

(PhosphoglucoMutase)

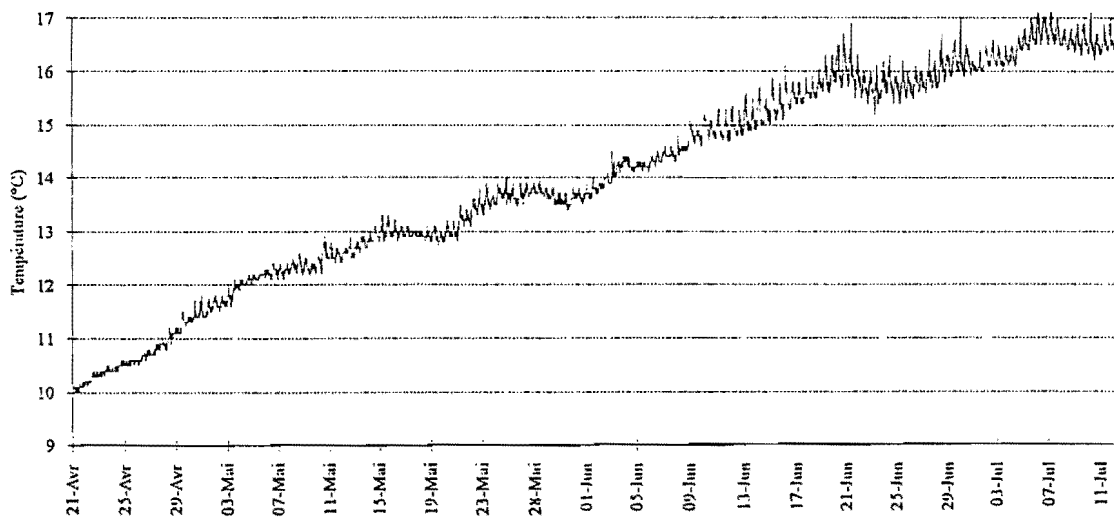
Tris A : 10 ml
MgCl₂ (0,5M) : 1 ml
Glucose 1P (+1,5 diP) : 100 mg
puis ajouter avant coloration :
NADP 1% : 0,5 ml
PMS : 0,5 ml
NBT : 0,5 ml
MTT : 0,5 ml
G6PDH : 6 μ l ou 17u
+Agar dans Tris A tiède : 10 ml

ANNEXE V :

Température à l'interface eau-sédiment au site du Déléec



Température à l'interface eau-sédiment à la pointe de l'Armorique



(données UR4 CNRS D1513, Faculté des Sciences, Brest)

ANNEXE VI :

**TENEURS EN QUELQUES METAUX LOURS DANS LES GONADES D'OURSINS
DE LA RADE DE BREST :**

	Armorique (n=7)	Marloux (n=8)	Dellec (n=8)
Fer (Fe), mg/Kg	286,9±141,0	53,1±43,8	41,0±25,0
Plomb (Pb), mg/Kg	0,75±0,24	< 0,2	0,26±0,18
Cuivre (Cu), mg/Kg	0,76±0,33	0,30±0,11	0,45±0,42
Cadmium (Cd), mg/Kg	4,64±1,25	3,96±0,55	4,63±2,12
Zinc (Zn), mg/Kg	356,3±282,8	181,1±124,1	152,8±150,6
Mercure (Hg), mg/Kg	0,26±0,12	0,18±0,08	0,20±0,13

(données Laboratoire Municipal de Brest, 16 rue Alexandre Ribot - 29287 BREST Cedex : 01/08/94)

ANNEXE VII :

**Agents toxiques essayés pour leur toxicité sur le développement, la reproduction
et pour leur toxicité génétique sur les embryons et le sperme d'oursins**

(d'après PAGANO *et al.*, 1987) :

Classe d'agents	Agents	Références
I. Agents Physiques	Rayons X Rayons γ Lumière visible	RUSTAD, 1959 GIORDANO <i>et al.</i> , 1983 PAUL <i>et al.</i> , 1970; SPECK <i>et al.</i> , 1980
II Agents chimiques A. Inorganiques	Arsenic Béryllium Cadmium Chrome Cuivre Mercure Nickel Changements de pH Zinc	PAGANO <i>et al.</i> , 1982a GIORDANO <i>et al.</i> , 1983 PAGANO <i>et al.</i> , 1982b PAGANO <i>et al.</i> , 1983a HESLINGA, 1976; PAGANO <i>et al.</i> , 1986 KOBAYASHI, 1980 GIORDANO <i>et al.</i> , 1982 PAGANO <i>et al.</i> , 1985a; 1985b CIPPOLARO <i>et al.</i> , 1986 DUBE <i>et al.</i> , 1985 GIORDANO <i>et al.</i> , 1983 PAGANO <i>et al.</i> , 1986
B / Organiques 1 - Polluants industriels	Pétrole, dispersants du pétrole, Pesticides organochlorés Styrène et dérivés Diphényl, diphényl ether PCBs	HAGSTROM et LONNING, 1976; FALK-PETERSEN, 1979 BRESCH-ARENDT, 1977 PAGANO <i>et al.</i> , 1978 PAGANO <i>et al.</i> , 1983b ADAMS, 1983 PAGANO <i>et al.</i> , 1985c
2 - Cancérogènes	Acridines Benzo(a)pyrènes 7,12 diméthylbenz(a)anthracène TPA (phorbol ester) Urethane	BRACHET, 1968 DE ANGELIS et GIORDANO, 1974 HOSE <i>et al.</i> , 1983 DE ANGELIS et GIORDANO, 1974 BRESCH-ARENDT, 1978 NAKASHIMA et ISHIKAWA, 1978
3 - Composés pharmaceutiques	Agents antinéoplastiques Thalidomide Acide nalidixique Povidone iodine	REMILLARD <i>et al.</i> , 1975 WANG <i>et al.</i> , 1977 HAGSTROM et LONNING, 1973 CZINN <i>et al.</i> , 1981 ROZENKRANZ <i>et al.</i> , 1980
III Mélanges		KOBAYASHI, 1971; 1984 KINAE <i>et al.</i> , 1981 OSHIDA <i>et al.</i> , 1981 DINNEL <i>et al.</i> , 1981

LES MÉTAUX LOURDS : DES PRODUITS MARINS AUX CONSOMMATEURS

(Les valeurs exprimées dans ce tableau sont les plus fréquemment rencontrées dans les publications actuelles)

	Arsenic	Bore	Cadmium	Chrome	Cuivre	Mercuré	Plomb	Sélénium	Zinc
Dose quotidienne nécessaire à l'homme (en mg)	0,01-0,02 mg				2 mg				6 — 10 mg
Dose toxique pour l'homme (1)	70 mg AS ^{III} sont mortels	100 mg/j	30 mg sont toxiques	300 mg Cr ^{VI} sont mortels	2,5 g sont mortels		1 mg/j		
Doses admises dans les aliments (mg/kg)			Poisson : 1 Mollusque : 5	0,1	Poisson : 5 Mollusque : 10	Poisson : jusqu'à 0,7		3	35
Eau de mer (mg/l)	0,002-0,003	4,6	0,000 01	0,000 05	0,003-0,01	0,000 03	0,000 03	0,000 09	0,001-0,01
Algues (mg/kg)	0,14-1	0,4-20	0,0006		1,7-12,4		0,5-9		42-962
Mollusques (mg/kg)	7-120 (moule)	1 (moule)			60-900 (huitre)	0,025-0,2	2,8-6 (huitre)		100-1 600 (huitre)
Crustacés (mg/kg)	15-174 (crevette)	0,25-1,5 (langoustine)			20-90 (crevette)	0,04	0,1-2,3 (homard)		122-184 (tourteau)
Poissons (mg/kg)	2,5-75 (grondin)	0,20	0,15-3	0,02-1	1,5-6 (thon)	0,1-10	0,3-6	0,2-0,4	0,2-1 200 (hareng)

Remarques :

- Les doses admissibles dans les aliments sont exprimées en milligrammes par kilogramme d'aliment.
- Les concentrations dans les produits marins sont toutes exprimées en milligrammes par kilogramme de matière sèche.
- Chaque fois que cela a été possible, on a indiqué entre parenthèses dans quelle espèce avait été trouvée la plus forte dose.

(1) En cas d'ingestion en une seule fois.

(Source : Rapport du Groupe Interministériel des problèmes de Pollution de la Mer, 1973).

EXTRAITS DE LA CIRCULAIRE DU 13 MAI 1991

Circulaire du Ministère de l'Environnement créant les contrats de baie

Les eaux littorales françaises doivent se situer en permanence à un niveau de qualité suffisant pour ne pas mettre en péril les écosystèmes côtiers, qui constituent un élément majeur du patrimoine écologique national. (...)

L'approche retenue tient compte de la diversité et de la complexité des situations rencontrées le long des côtes françaises. Certains secteurs sont principalement affectés par des pollutions chimiques (métaux et/ou composés organiques). (...)

De plus, les phénomènes regroupés sous une même appellation (eustrophies marines par exemple) résultent en fait de mécanismes différents, dont les causes et les facteurs de maîtrise doivent être déterminés dans chaque cas particulier afin d'être certain de mettre en oeuvre, au plus juste coût, des remèdes efficaces. (...)

Il apparaît, au contraire, que, pour chaque secteur du littoral où une action est nécessaire, la solution adéquate ne peut être trouvée qu'au niveau local, en associant tous les responsables concernés. Un outil nouveau est proposé : le Contrat de Baie, dont l'initiative peut être prise par l'Etat, mais aussi par d'autres acteurs (collectivités locales, associations notamment). (...)

Chaque Contrat de Baie doit correspondre à une unité littorale homogène. (...)

Puisque la lutte contre la pollution des eaux littorales ne peut être efficace que par la prise

en compte des apports de l'ensemble du bassin versant, le Contrat de Baie doit être élaboré à ce niveau.

Pour éviter ces écueils, tout Contrat de Baie devra reposer sur une connaissance aussi précise que possible :

- *de l'ensemble des sources de pollution affectant le secteur : rejets côtiers (ponctuels ou diffus), apports par les cours d'eau, immersions de déblais de dragage...etc*
- *des mécanismes de transfert des pollutions au milieu marin,*
- *des caractéristiques du milieu récepteur (morphologie, courants, caractéristiques hydrochimiques et biologiques)*
- *des usages à protéger et des zones sensibles du point de vue écologique*

Puisque l'amélioration de la qualité des eaux d'un secteur du littoral implique de définir un programme concernant l'ensemble du bassin versant, la maîtrise d'ouvrage de l'étude ne pourra en général être confiée qu'à une collectivité locale de niveau supra-communal. (...)

La finalité du Contrat de Baie est d'inciter les divers partenaires concernés, en particulier les collectivités locales, à dépasser le cadre des schémas classiques d'assainissement dans tous les cas où des dispositions spécifiques doivent être prises pour restaurer la qualité des eaux. (...)