

Direction DRV/ RA/D  
Laboratoire Génétique et Pathologie

A. Thébault, M. Robert, T. Renault, M. Dumais, P. Gouletquer

**ifremer**

....  
nov-2001- R.INT.DRV/ RA/LGP/

IFREMER  
BIBLIOTHEQUE  
LA TREMBLADE

## **IMPACT DE L'ERIKA SUR LA PATHOLOGIE DE BIVALVES D'INTERET COMMERCIAL : RESULTATS PRELIMINAIRES**



# Impact de l'Erika sur la pathologie des bivalves d'intérêt commercial

## Résumé

Après le naufrage de l'Erika, la question s'est rapidement posée de l'impact des hydrocarbures sur la santé des coquillages, car la pollution concernait des zones de production conchylicoles. Le suivi zoosanitaire en place dans ces zones permettait d'avoir des données de référence avant impact. Il a été choisi différents sites exposés de référence, qui ont fait l'objet d'analyse en toxicologie et en pathologie. A la différence du cas de l'Amoco Cadiz, l'effort n'a pas été mis uniquement sur les huîtres mais aussi sur d'autres espèces de coquillages, comme les moules et des fouisseurs, particulièrement exposés comme les coques et les palourdes. La mesure de l'exposition effectuée par la Direction de l'Environnement Littoral (MONERIKA) montre qu'une contamination anormale a persisté toute l'année 2000, et d'autre part que le taux de concentration des HAP pouvait être différent d'une espèce à l'autre, et d'un site à l'autre sur une faible distance.

Les premiers résultats d'analyse ne montrent pas d'impact sur les huîtres et les palourdes. Sur les moules, le taux de Ciliés dans les branchies au Croisic et à Frandière sont plus élevés qu'ailleurs, et l'évolution de ce taux suit un processus de décontamination. Mais il existe de fortes variations spatiales de ce taux entre sites, en l'absence de pollution aux HAP, et il faudra confirmer ce résultat par d'autres analyses de moules en zone impactée.

Sur les coques du Croisic, il a été détecté un taux anormal de lésions d'infiltration avec présences de levures intracellulaires associées. La caractérisation n'a été possible qu'en histologie et en ultramicroscopie. Mais le lien avec l'Erika ne pourra être confirmé qu'au travers des nouvelles lectures histologiques et d'un suivi de ces lésions sur le site du Croisic sur plusieurs années.

# ETUDE DE L'IMPACT DE L'ERIKA SUR LA PATHOLOGIE DES BIVALVES D'INTERET COMMERCIAL

<b>1. Contexte de l'étude</b> .....	<b>3</b>
<b>2. Matériel et méthodes</b> .....	<b>6</b>
<b>3. Résultats</b> .....	<b>10</b>
3.1. Résultats sur les moules <i>Mytilus edulis</i> .....	10
3.1.1. Résultats sur la concentration des moules en HAP .....	10
3.1.2. Taille moyenne .....	13
3.1.3. Néoplasie .....	13
3.1.4. Résultats sur agents infectieux .....	14
3.2. Résultats sur les huîtres creuses <i>Crassostrea gigas</i> .....	19
3.2.1. Résultats sur la concentration des huîtres en HAP .....	19
3.2.2. Taille des individus .....	21
3.2.3. Résultats de l'examen histologique .....	21
3.3. Résultats sur les palourdes <i>Ruditapes philippinarum</i> .....	24
3.3.1. Résultats sur la concentration des palourdes en HAP .....	24
3.3.2. Taille des individus .....	26
3.3.3. Résultats de l'examen histologique .....	26
3.4. Résultats sur les coques <i>Cerastoderma edule</i> .....	28
3.4.1. résultats de la concentration des coques en HAP .....	28
3.4.2. Taille des individus .....	29
3.4.3. Hématosarcome .....	29
3.4.4. <i>Labratrema minimus</i> .....	30
3.4.5. <i>Meiogymnophallus minutus</i> .....	31
3.4.6. Grégarines .....	32
3.4.7. Autres parasites .....	33
3.4.8. Lésion fongique : champignon levure-like intracellulaire de coques .....	35
<b>4. Discussion générale</b> .....	<b>45</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>48</b>

## 1. Contexte de l'étude

Le 12 décembre 1999, le pétrolier ERIKA s'échouait à 70 km au sud de la pointe de Penmarch dans le Finistère. 20 000 tonnes de fioul lourd, en valeur estimée, se sont échouées entre le 24 et 26 décembre sur près de 400 km de côte entre le Finistère et la Vendée.

Les HAP ou Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques faisaient 55% de la composition du fuel de l'Erika (données DEL SEDERIKA). Ces HAP, au nombre de 181 composés différents sont reconnus comme appartenant à la famille chimique la plus toxique de la cargaison (données DEL SEDERIKA). Beaucoup d'entre eux sont en effet cancérigènes (Ramade, 1992). Par ailleurs le taux de Nickel et de Vanadium (données DEL MONERIKA)

L'impact des hydrocarbures sur les vertébrés se traduit entre autre par une baisse des défenses immunitaires, les rendant sensibles à l'action de pathogènes opportunistes (De Svarth *et al.*, 1996, Vos et Luster, 1989, Lorgue *et al.*, 1987). Cet effet peut aussi être recherché pour des doses subléthales sur les mollusques d'intérêt commercial. Les études qui ont suivis la catastrophe de l'Amoco-cadiz n'ont pas montré d'effet des hydrocarbures sur l'huître plate et sur l'huître creuse adultes vis à vis de *Marteilia* et de la néoplasie hémocytaire (Balouet et Poder, 1979) : les niveaux de prévalence avant impact étaient très faibles et le sont restés. Les lésions tissulaires n'ont pas donné de résultats aisément interprétables Balouet et Poder, 1989).

Mais les populations de mollusques vivant dans le sédiment, comme les coques et les palourdes, qui avaient présenté de fortes mortalités suite à la pollution, n'avaient pas fait l'objet d'un suivi zoosanitaire particulier et le cas de l'Erika se situe dans un contexte légèrement différent : la composition des hydrocarbures en cause était plus concentrée en HAP ce qui peut entraîner des effets à plus long terme et plus cancérigènes que ceux de l'Amococadiz. Certaines études montrent un impact des hydrocarbures sur le système immunitaire des coquillages, par exemple une diminution temporaire des granulocytes chez les moules exposées aux hydrocarbures, et chez *Crassostrea virginica* exposée aux PAH, montrait un changement de la formule hémocytaire avec une augmentation de petits hémocytes (Lorteau *et al.*, 1995). De la même façon, des moules exposée aux PAH du « Sea Empress » en 1997 avait montré une activité surperoxydases et phagocytaire réduite comparée à des moules de sites témoins (Dyrynda *et al.*, 1997). Leur résistance aux infections est elle réduite pour autant ?

Les connaissances sur les prévalences et leurs variations pour les principales espèces des régions touchées sont connues avant l'arrivée de l'Erika, grâce aux résultats du Réseau de surveillance zoosanitaire, le REPAMO (Réseau de Pathologie des Mollusques). Les différentes zones du littoral français font l'objet d'un suivi sur les différentes espèces de coquillages au minimum deux fois par an. Les cas de mortalité anormale sont aussi suivis et analysés. Enfin des actions ponctuelles, ciblées sur une espèce, permettent de mieux connaître la variabilité spatiale et temporelle des agents rencontrés. Des animaux sauvages ou de gisements font ainsi l'objet d'un suivi, ce qui permet de s'affranchir du problème des transferts et de la zootechnie.

La zone impactée par l'ERIKA a déjà été l'objet d'un suivi par le REPAMO :

- Pour les coques : tous les ans, des analyses sont réalisées au Croisic, en Baie de Bourgneuf et sur d'autres secteurs. Par exemple en septembre 1997, 240 animaux ont été analysés suite à des mortalités anormales. En 98, 3 secteurs du Croisic ont fait l'objet d'un suivi mensuel de 30 animaux d'avril à septembre. En 99, 4 lots ont été analysés sur deux secteurs différents. 12 agents intratissulaires sont ainsi présents sur ces populations, à des niveaux de prévalence ou d'infestation faibles : par exemple parmi les trématodes *Meigymnophallus minutus*, *Labratrema minimus*, *Himatshla*, parmi les protozoaires, des

Coccidies, les grégarines, et les Ciliés, parmi les bactéries les Rickettsies, parmi les métabolites les *Paravortex cardii*, *Mytilicola*, les larves de Nématodes, et parmi les pathologies d'origine indéterminée les hématosarcomes (Poder et Auffret, 1986). Les premiers résultats montraient des variations saisonnières au moins pour les Trématodes et peu de variation spatiale sur les 3 points suivis au sein de la Baie du Croisic (résultats non publiés). En 1999, dans le petit Traict sud, des coques de 14 mois en élevage et originaires de Vilaine, prélevées fin août ont montré pour la première fois en trois ans des hématosarcomes à des taux de prévalences faibles mais non négligeables (4/30 ou 5/26)(Thébault, 2000). Entre 1998 et 1999 des coques extérieures à la Vilaine ont été introduites au Croisic. Il faut rappeler que l'origine des hématosarcomes de la coque, d'origine infectieuse ou environnementale n'est pas totalement élucidée (Twomey et Mulcahy, 1988).

- Pour les moules : les moules font traditionnellement l'objet d'un suivi deux fois par an. 7 agents intratissulaires sont régulièrement décrits sur cette espèce sur nos côtes, avec peu de variabilité spatiale et temporelle en taux de prévalence et d'infestation, sauf pour *Marteilia refringens*, et les trématodes (Thébault, 1999). Des cas sporadiques d'hyperplasie hémocytaire atypique, communément appelée néoplasie hémocytaire sont régulièrement décrits sur nos côtes à des prévalences très faibles. Une étude récente montre une certaine corrélation entre les rejets anthropiques et la prévalence en « granulocytomes », autrement appelés néoplasie hémocytaire (Svardh, 1999). Les moules en élevage et sur gisements ne présentent pas différences majeures en terme d'infestation et de prévalence (Thébault, 2000). Deux espèces différentes *Mytilus edulis* et *galloprovincialis* étant présentes sur les zones impactées, toute étude doit différencier les 2 espèces. En effet leur sensibilité est différente au parasitisme (Coustau, 1991)
- Pour les palourdes : il existe une certaine variabilité spatiale et temporelle, mais qui se retrouve d'une année sur l'autre : absence de détection de *Perkinsus atlanticus* en Baie de Bourgneuf et présence au Croisic, présence d'haplosporidies en très faible prévalence en Baie de Bourgneuf (Thébault, 1999 et 2000, Thébault *et al.* , 2001). La sensibilité des palourdes *Ruditapes decussatus* et *philippinarum* n'est pas la même pour le VP1 (*Vibrio* P1) avec une sensibilité plus grande de *philippinarum* pour VP1 (Paillard *et al.* , 1994) et de *decussatus* pour *Perkinsus atlanticus*.
- Pour les huîtres creuses : peu d'agents sont décrits sur cette espèce au cours des suivis du REPAMO. Les taux de prévalence et d'infestation de Ciliés, Rickettsies, d'Haplosporidies sont le plus souvent modérés (Thébault, 1999 et 2000).

Les coques, les moules et les palourdes hébergent un certain nombre d'agents qualifiés d'opportunistes, sans que les prévalences ou que les taux d'infestation atteignent des niveaux très élevés. On peut s'attendre à un dérèglement de cet équilibre hôte-parasite, si les coquillages sont affectés par ailleurs. Une étude menée dans le golfe de Mexico sur *Crassostrea virginica* montrait l'impact des PAH et d'autres polluants sur l'infestation à *Perkinsus marinus* (Wilson *et al.* , 1990), pour atteindre des niveaux de prévalence de 75% dans les sites impactés. Sur les coques la pollution du port de Rotterdam augmente le taux de parasitisme, comparée à un témoin pris en mer du nord. (Timmermans *et al.* , 1996). Sur les moules, le système immunitaire serait affecté par les hydrocarbures (Dyrynda *et al.* , 1997). Svardh, en 1999 trouve une corrélation significative entre les granulocytomes de moules et la pollution d'origine anthropique. Sur les huîtres *Crassostrea virginica*, l'atrophie de la glande digestive, le nombre de cellules brunes, et le nombre de grégarines *Nematopsis pryterchi* ont été trouvés associés significativement à une pollution aux métaux lourds (Boyles, 1991). Scott *et al.* , en 1983, montre une interaction entre la salinité, le polluant (composé chloré oxydant ou CPO) et le taux de prévalence à *Perkinsus marinus*.

La mesure de l'exposition est faite par la mesure de la concentration des polluants sur les coquillages eux-mêmes (travail effectué par la DEL IFREMER, projet MONERIKA et RNO). La mesure des polluants a été effectuée parallèlement, sur un lot pris au même moment et au même endroit que le prélèvement destiné à l'examen pathologique. Parfois, cette mesure a été indirecte, par la mesure de polluants sur une autre espèce, mais il est alors possible d'avoir une valeur relative de l'exposition (collaboration avec le programme DEL IFREMER).

La coque et la palourde sont des suspensivores enfouis dans le sédiment à quelques cm de la surface. De ce fait ce sont des espèces particulièrement exposées à priori, aux dépôts d'hydrocarbures, et à tout polluant en général qui se concentre dans le sédiment.

La coque et la palourde sont aussi des espèces infectées par de nombreux parasites, quantitativement et qualitativement, ce qui rend ces deux espèces importantes pour cette étude.-----

Sur les moules on peut disposer de biomarqueurs, (Lundebye *et al.*, 1997) signalant des effets biologiques des PAH sur ces animaux (activité génotoxique notamment) et des mesures précises de toxiques. Ce travail sera mené dans le cadre du projet MONERIKA par la DEL.

Enfin un minimum de suivi sur l'huître creuse s'impose dans la mesure où les polluants sont différents de ceux de l'Amoco-cadiz, en tenant compte de la classe d'âge, dans la zone de production de la Baie de Bourgneuf.

La durée de l'étude de l'impact de l'Erika doit durer le temps de comprendre ce qui se passe à l'échelle de la vie « commerciale » du coquillage qui a été soumis à l'exposition, et éventuellement sur la première génération qui suit. C'est pourquoi l'étude devrait se terminer en 2002, notamment pour détecter des effets carcinogènes, et cela même si les dosages de toxiques reviennent à la normale.

Il a été retenu différents sites impactés pour chaque espèce de coquillage : en effet il existe une hétérogénéité spatiale pour certains parasites, comme les Trématodes (De Montaudouin *et al.*, 1998 ; Glize et Ponthoreau, 1997 ; Thébaud, 2000). L'effet d'un polluant sera d'autant plus imputable qu'il sera présent sur tous les sites exposés, mais il est aussi possible qu'il puisse interagir avec des situations locales particulières. Enfin il faudra tenir compte de la taille ou de l'âge des individus, qui peuvent interférer avec les taux de prévalence et d'infestation (De Montaudouin *et al.*, 1998). Il faudra aussi s'assurer de l'absence de biotoxines, dont la présence serait associée avec des hématosarcomes de coquillages (Landsberg, 1996).

**Objectifs de l'étude :** il s'agit d'abord de mettre en évidence l'impact d'une pollution par des agents opportunistes utilisés comme indicateurs d'un état de fragilisation des animaux, dans la mesure où il peut s'agir d'une valorisation des données déjà acquises par IFREMER. Il s'agit aussi de mieux comprendre l'agressivité potentielle et la pathogénie de certains parasites. Il sera possible de mettre en relation différents indicateurs, virulence parasitaire, biomarqueurs et facteurs environnementaux. Une activité cancérogène de ces polluants sur les coquillages pourra aussi être contrôlée, sur des espèces où des sarcomes sont par ailleurs décrits (Peters, 1988).

#### **Etat d'avancement de l'étude au 31 octobre 2001**

**Le tableau 1** récapitule les lots prélevés en 2000 et ceux dont l'étude histopathologique est terminée. Environ 40 % des résultats seulement sont aujourd'hui acquis.

En ce qui concerne l'exposition, la plupart des concentrations en PAH sur l'année 2000 dans les différents sites est connue (données MONERIKA et RNO).

Les résultats en écotoxicologie sur la moule ne nous sont pas encore parvenus.

C'est pourquoi, si dès à présent quelques tendances se dessinent, il faudra attendre le résultat de l'ensemble du suivi avant de pouvoir conclure.

**Tableau 1: Résultats acquis sur l'impact de l'Erika au 31 octobre 2001**

espèces	lieu de prélèvement	prélèvements	fev-00	mars-00	avr-00	mai-00	juin-00	juil-00	août-00	nov-00	déc-00	Total lots	% lus
coques	Grand Traict (Croisic)	DEL Nantes		00/23	00/44	00/89	00/143	00/180	00/230 00/240			7	43
	Sissable (Croisic)	DEL Nantes		00/21	00/45	00/90	00/142	00/181	00/229 00/239			7	
	Gros Banc (Croisic)	DEL Nantes		00/22	00/43	00/91	00/144	00/182	00/236	00/326		7	
Huitres Creuses	La Northe	DEL Nantes		00/27			00/125		00/193			3	33
	Coupelasse	DEL Nantes				00/58						1	
	Gresseloup	RA Bouin		00/13		00/60			00/221		00/328	4	
	Paillard	RA Bouin		00/09		00/62			00/220		00/327	4	
Palourdes	Croisic	X			00/31	00/77	00/126		00/222			4	29
	Le Gril	X		00/10,17,1					00/219			2	
	Noirmoutier (La Fos)	X		00/15					00/223			2	
	Le Guiluin	La Trinité	00/07	00/16	00/40	00/71	00/139	00/165				6	
Moules	La Frandière	DEL Nantes		00/26	00/34	00/51	00/146	00/187	00/228			6	48
	Le Fiol	DEL Nantes		00/28		00/94	00/145	00/184	00/241			5	
	Le Croisic	DEL Nantes		00/20	00/41	00/93	00/147	00/183	00/237			6	
	Maisons Blanche	DEL Nantes		00/24	00/42	00/92		00/186	00/238			5	
	Maresclé	La Trinité		00/19	64	00/67	00/135	00/163	00/227		00/329	7	
nb de lots terminés			1	5	5	5	7	3	7	0	0	35	
nb de lots fixés			1	14	9	13	10	9	16	1	3	76	
%de lots terminés au 31/10/2001			100	38	56	38	70	27	44	0	0	46	

## 2. Matériel et méthodes

- **Les espèces cibles** de l'étude sont les suivantes : il s'agit des moules, *Mytilus edulis*, des coques, *Cerastoderma edule*, des palourdes, *Ruditapes philippinarum*, et d'huîtres creuses, *Crassostrea gigas*. Des populations sauvages ou de gisements étaient recherchées, mais parfois il n'a été possible de prélever que des coquillages en élevage. Ces coquillages en élevages pouvaient avoir été transférés d'une autre zone, avant le naufrage de l'Erika. Après le naufrage, il n'y a pas eu d'introduction de nouveaux coquillages.
- **Indicateur d'exposition :**
  - L'indicateur d'exposition est une mesure de l'exposition au niveau du groupe, en données agrégées, c'est à dire à des niveaux de polluant auxquels la population est exposée dans son ensemble. En fait cette mesure est effectuée sur un lot différent de celui dont on mesure l'effet mais issu de la même population. L'indicateur d'exposition est de substitution lorsque la mesure de l'exposition est indirecte, comparée une autre espèce prélevée dans la même situation géographique au même moment, ou comparé à la même espèce prélevée au même moment dans un site proche, lorsque la mesure agrégée n'était pas possible.
  - La mesure des polluant HAP a été réalisée sur des lots comparables à ceux utilisés pour l'examen pathologique. Plusieurs dizaines d'individus, correspondant à un poids de matière sèche limite, sont analysés à chaque prélèvement. Le dosage et le traitement des données a été mené par les équipes de la Direction de l'Environnement Littoral de l'IFREMER. Les concentrations obtenues ne sont prises en compte que lorsqu'elles dépassent la valeur seuil fiable des appareils de mesure. En deçà, la concentration est ramenée à zéro (données MOLERIKA). Les concentrations de 16 HAP, dont la liste est donnée dans le tableau ci-dessous sont simplement ajoutées, pour obtenir une concentration en µg de composé par kg de poids sec.

en µg/kg de poids sec de chair

ACEPHTE	<b>Acénaphène</b>	CHRYSEN	<b>Chrysène</b>
ACEPHTY	<b>Acénaphthylène</b>	DBZAHANT	<b>Dibenzo(a,h)anthracène</b>
ANTHRAC	<b>Anthracène</b>	FLUORAN	<b>Fluoranthène</b>
BZAANT	<b>Benzo(a)anthracène</b>	FLUOREN	<b>Fluorène</b>
BZAPYR	<b>Benzo(a)pyrène</b>	IND123PY	<b>Indeno(1,2,3-cd)pyrène</b>
BZBFLU	<b>Benzo(b)fluoranthène</b>	NAPHTAL	<b>Naphtalène</b>
BZGHIPER	<b>Benzo(g,h,i)pérylène</b>	PHENATH	<b>Phénanthrène</b>
BZKFLU	<b>Benzo(k)fluoranthène</b>	PYRENE	<b>Pyrène</b>

- Un autre indicateur d'exposition pourra être utilisé lorsque les résultats seront connus. Il s'agit des résultats des dosages de biomarqueurs sur la moule. Ceux-ci sont soit des marqueurs de stress ou de génotoxicité, soit interviennent dans des processus de détoxification ou dans des processus de défense immunitaires. Ce travail fait partie du projet MONERIKA mené par la DEL.



- **Les indicateurs d'effet :**
  - La techniques d'analyse sera l'histologie classique avec coloration à l'hémalun-éosine, déjà utilisée dans le suivi en routine du REPAMO, puis le cas échéant mise en culture pour recherche mycologique (cf paragraphe sur les résultats de coques), et microscopie électronique à transmission.
  - Le principal indicateur d'effet sera le « taux » de prévalence de différents agents infectieux. C'est à dire le pourcentage de prévalence instantanée qui est le « nombre total de cas dans une population déterminée, à un instant donné, multiplié par 100 ». (Toma *et al.* , 2000). D'autre indicateurs d'effet pourront le cas échéant être pris en compte. Le taux d'infestation est le nombre de parasites détecté / individu. Cette mesure est semi-quantitative, ordonnée en classes 1, 2 et 3, car l'histologie n'est pas une technique quantitative sur l'individu, et ne permet qu'une mesure relative du taux d'infestation. En effet la partie examinée pour chaque coquillage ne fait que 2µm d'épaisseur. D'autre critères, comme la nécrose tissulaire et l'infiltration cellulaire des organes seront comptabilisées en terme de présence/ absence par organes.
  
- **Echantillonnage :** chaque échantillon se compose de 30 individus. En effet il est recherché de fortes différences entre taux de prévalence, par exemple entre 5 et 25-30%, avec un risque unilatéral de première espèce de 5% et de deuxième espèce de 20% (Noordhuizen *et al.* , 1997).
  
- **La couverture spatiale** des zones impactées s'est faite suivant les espèces et les possibilités de prélèvements :
  - Pour les coques : 3 points au Croisic (zone impactée)
  - Pour les huîtres creuses : 3 points (moyennement et fortement impactés)
  - Pour les palourdes : 3 points, à priori fortement impactés. (DEL)
  - Pour les moules : 5 points ( moyennement et fortement impactés)
  - Les témoins sont recueillis sur des sites de la façade atlantique, à la même période, en dehors des zones impactées.
  - Les témoins sont aussi les données recueillies sur les sites pollués, avant l'impact de l'Erika.

- Le tableau ci-dessous décrit les sites de prélèvements des points impactés :

espèce	lieu de prélèvement	impact attendu
coques	Grand Traict (Croisic)	élevé
	Sissable (Croisic)	élevé
	Gros Banc (Croisic)	élevé
	Autres points de suivi	témoin
huîtres creuses	La Northe	élevé
	Gresseloup	élevé
	La Coupelasse	élevé
	Paillard	très élevé
	Autres points de suivi	témoin
palourdes	Le guilvin	moyen
	Croisic	élevé
	Le Gril	élevé
	Autres points de suivi	témoin
Moules	La Frandière	très élevé
	Le Fiol	élevé
	Maisons Blanche	élevé
	Maresclé	moyen
	Autres points de suivi	témoin

Les réplicats en zone impactée permettront aussi de mieux comprendre le phénomène en cause, de mesurer s'il existe une certaine variabilité de réponse en zone impactée. **Les cartes 1, 2 et 3** données en annexe indiquent la position des différents sites de prélèvements.

- **Couverture temporelle** : mensuelle les 6 premiers mois, trimestrielle ensuite sur une période de 2 ans.
- **Type d'enquête épidémiologique** :
  - Le type d'enquête est une enquête avant-après ou ici-ailleurs, étude transversale répétée, dans le cadre d'une enquête analytique comparant des populations exposées-non exposées, avec suivi de différentes cohortes (Toma *et al.* , 2000) . En santé publique ce type d'enquête est une enquête écologique (Rumeau-Rouquette, 1993) car l'exposition n'est pas mesurée individuellement.
  - Il sera recherché une augmentation du taux de prévalence ou d'infestation dans les zones impactées comparée aux zones non impactées. Compte tenu du manque de robustesse des données d'observation, de nombreux facteurs pouvant jouer à une échelle locale, un minimum de résultats concordants seulement pourront nous faire suspecter l'impact de l'Erika dans une élévation de taux de prévalence. Ainsi la comparaison ici-ailleurs et avant-après doit donner le même type de tendance, et le même type d'effet doit être retrouvé sur différents sites impactés pour la même espèce. Les facteurs pris en compte pour ajustement sont la taille ou l'âge des animaux, et éventuellement la présence de biotoxines (Landsberg, 1996) (DEL IFREMER pour la partie environnementale). Le critère pour la taille sera la plus grande longueur, sauf dans le cas des huîtres où sera pris en compte le poids de coquille.

- Les données de référence servant de "témoin" avant impact ou sur d'autres sites français ont été publiées dans les rapports REPAMO de l'IFREMER aux années correspondantes (Thébault, 1999 ; Thébault, 2000 ; Thébault *et al.* , 2001).
- **Analyse statistique des données**

La comparaison des moyennes des tailles des lots de coquillages sera effectuée grâce au test de l'ANOVA avec SAS version 8.1 au risque de 5%.

L'intervalle de confiance des pourcentages sera calculée au risque de 5% (Schwartz, 1994) sous EXCELL 97.

Lorsque le taux de prévalence des zones exposées sera supérieur aux zones non exposées, on comparera les pourcentages à l'aide d'un test de X2 avec un risque de 5% (Noordhuizen *et al.* , 1997) à l'aide du logiciel SAS version 8.1. Lorsque les effectifs théoriques seront trop faibles on utilisera le test exact de Fisher.

Dans certains cas on calculera la probabilité d'obtenir certains échantillons par simulation stochastique, avec 1000 itérations, selon le modèle d'Audigé et Beckett, 1999.

Quand l'ensemble des résultats sera connu, il sera possible de calculer le Ratio de prévalence (comparaison géographique) et un risque relatif cumulé (comparaison avant-après), l'intervalle de confiance et la significativité de ce dernier à l'aide de SAS version 8.1. Pour ce dernier critère il faudra formuler l'hypothèse qu'il n'y a pas de guérison des coquillages durant la période d'observation servant à la comparaison (Noordhuizen *et al.* , 1997). On utilisera aussi un modèle de régression logistique, tenant compte des corrélations spatiales et temporelles, afin de confirmer les résultats précédents (SAS GENMOD, version 8.1).

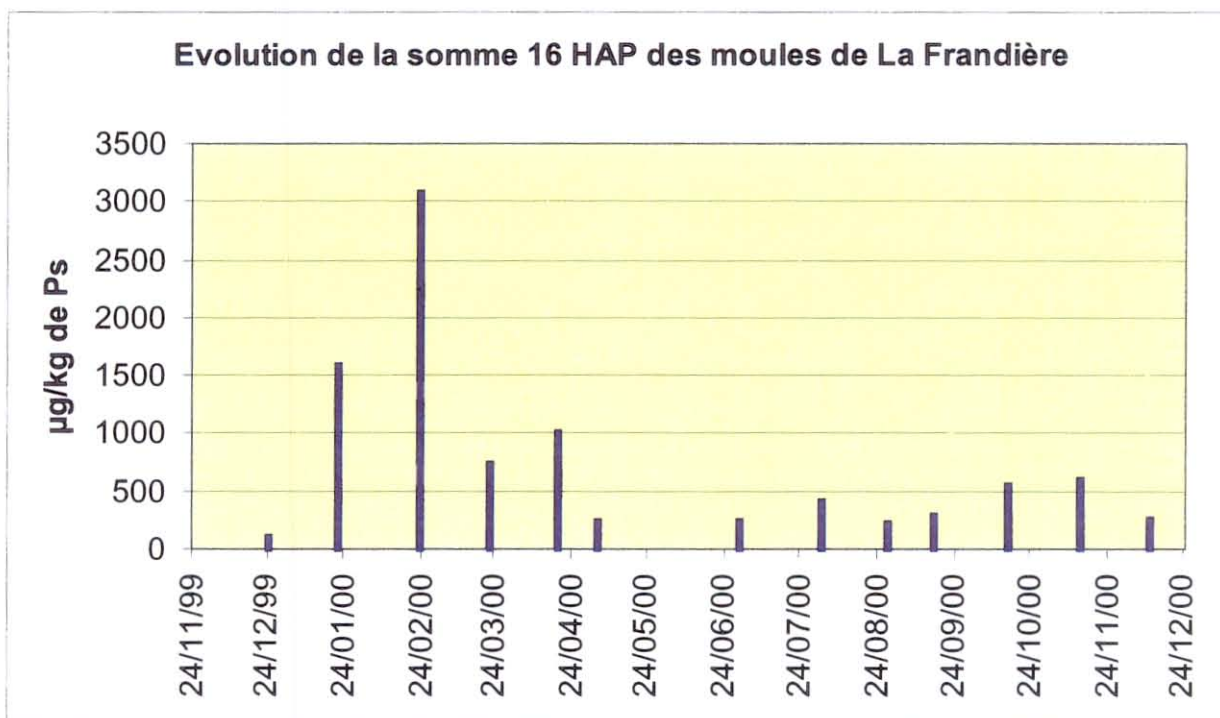
Sur les animaux infectés il sera possible de comparer la répartition des classes d'infestation, 1, 2 et 3 et de tester les différences avec un test de X2, lorsque les effectifs dans chaque classe seront suffisants.

### 3. Résultats

#### 3.1. Résultats sur les moules *Mytilus edulis*

##### 3.1.1. Résultats sur la concentration des moules en HAP

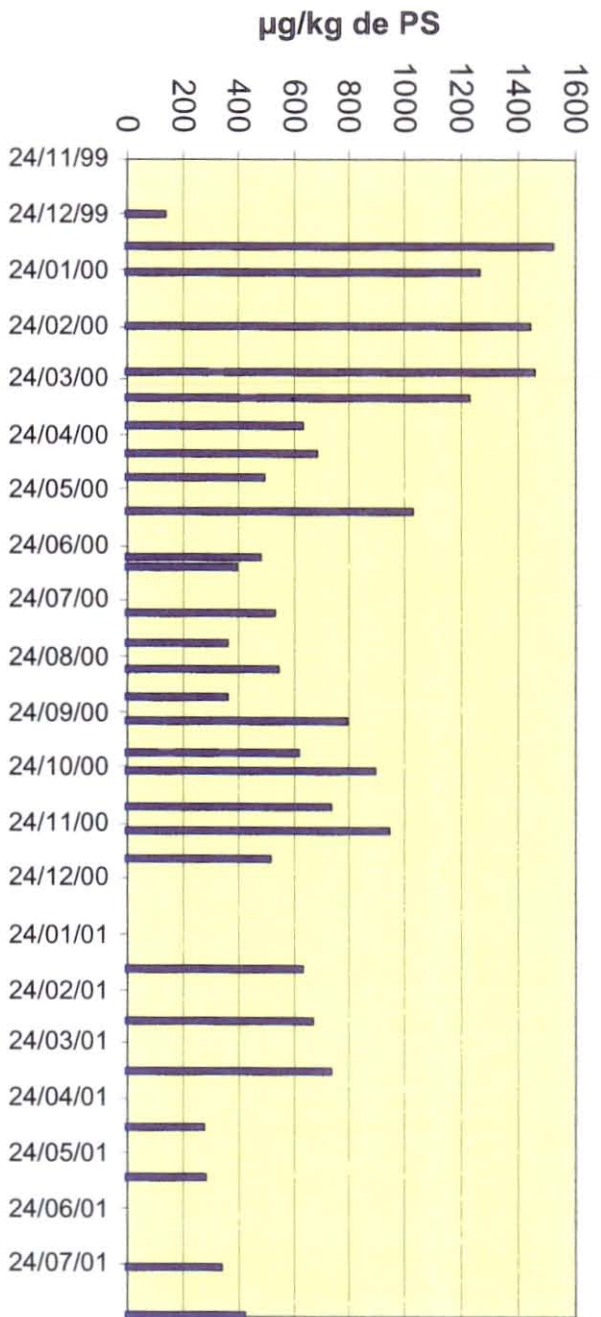
- A la Frandière



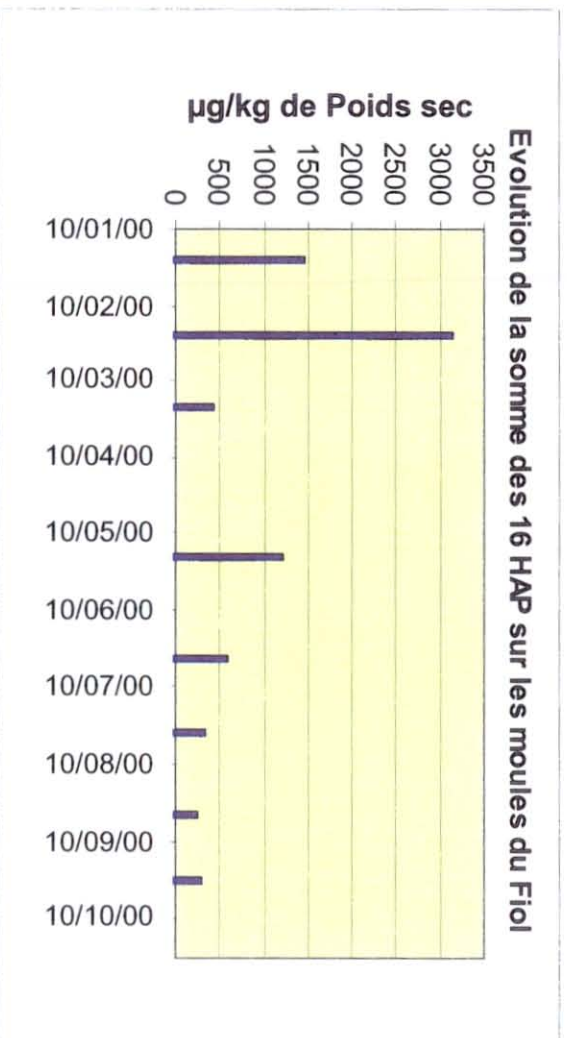
(données RNO MONERIKA non publiées)

- Au Croisic

### Evolution de la somme des 16 HAP sur les moules du Croisic

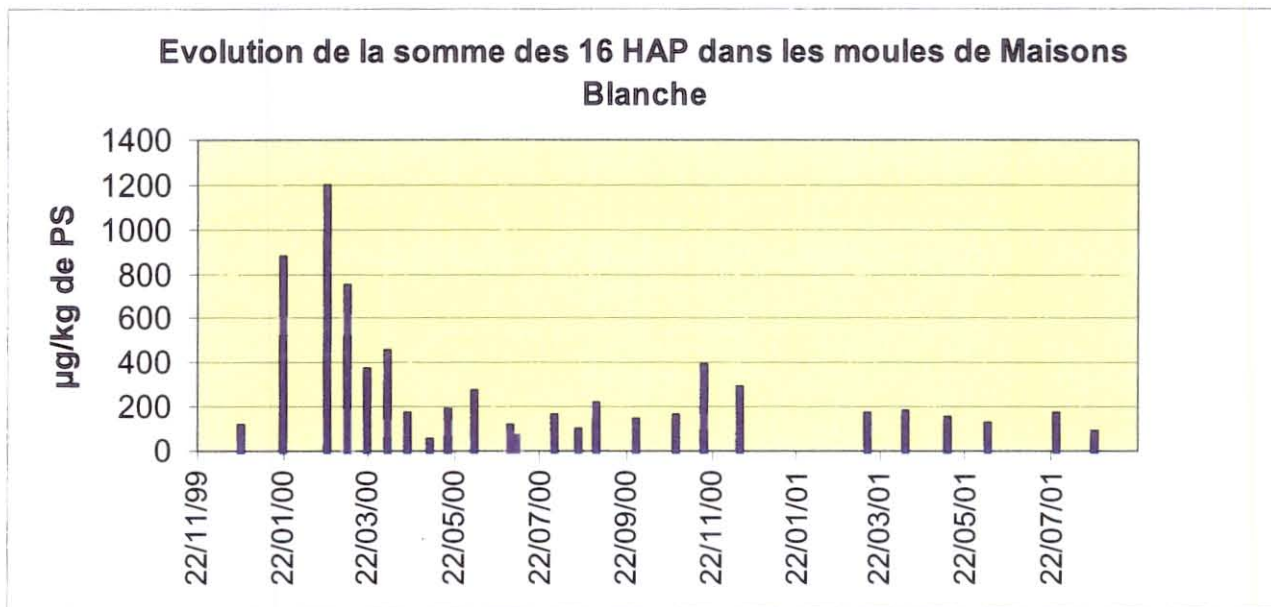


- données RNO MONERIKA non publiées)
- Au Fioil



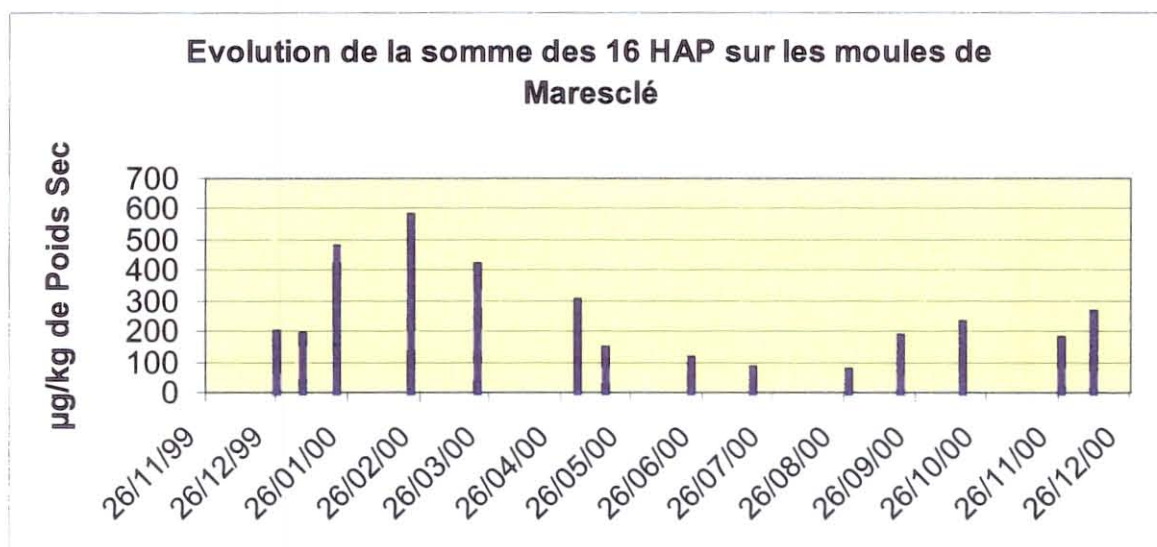
- données RNO MONERIKA non publiées)

- A Maisons Blanche



(données RNO MONERIKA non publiées)

- A Maresclé



(données RNO MONERIKA non publiées)

## Commentaires :

Les deux secteurs où les taux des 16 HAP ont été les plus élevés sont le Fiol et à La Frandière, comparées au Croisic et à Maisons Blanche. Les moules de Maresclé se montrant les moins contaminées. A la fin 2000, après des fluctuations liées à des redépôts de fuel, les taux n'étaient pas revenus normaux, la norme ayant été établie avant le passage de l'ERIKA (données RNO MONERIKA).

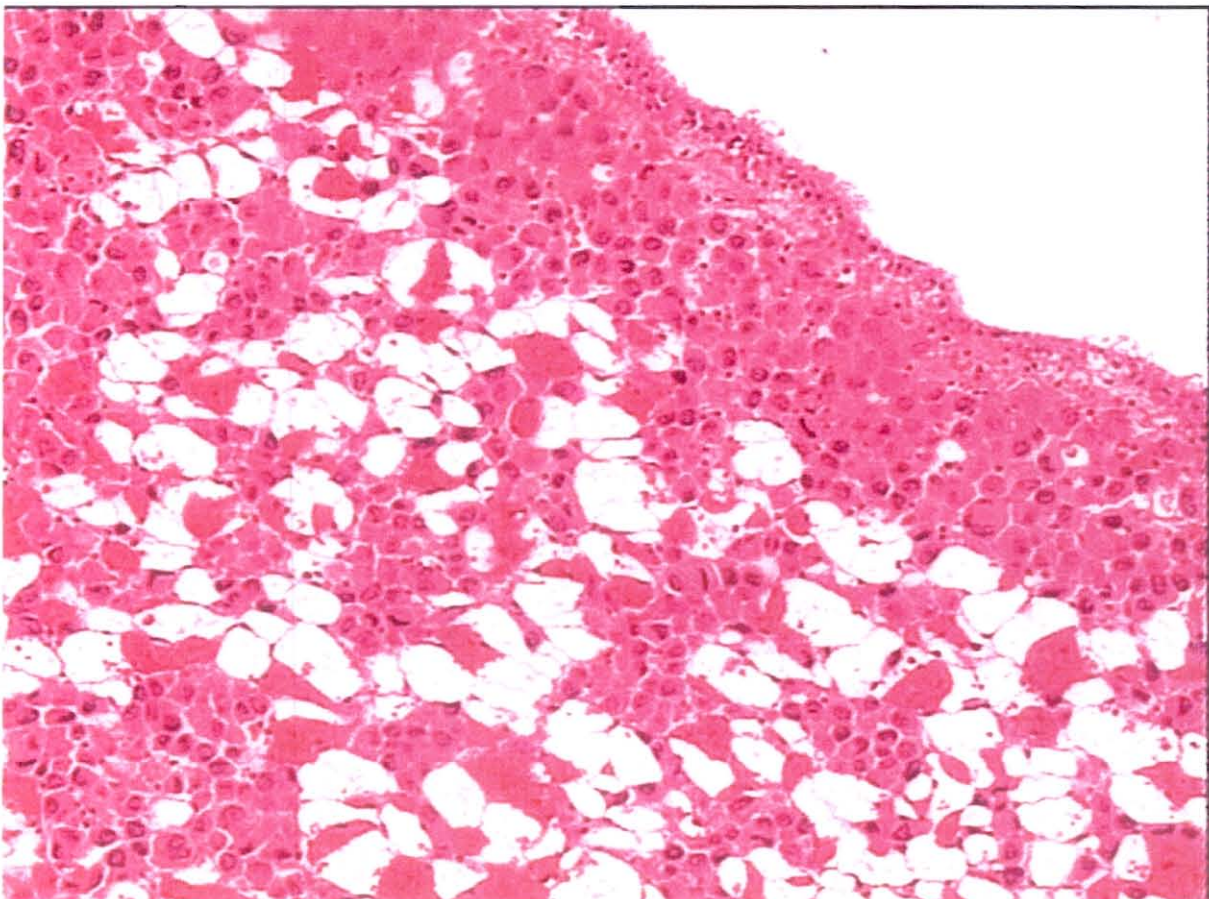
### 3.1.2. Taille moyenne

La taille des moules dans les prélèvements était de 4,5 cm $\pm$ 0,5 cm.

La différence de taille moyenne entre les lots de différentes origines, et à différentes dates était comprise entre 3,8 et 4,9 cm. La différence est significative en ANOVA. On fera cependant l'hypothèse que la classe d'âge des moules est la même pour les différents prélèvements. En effet au sein d'une même cohorte il existe des différences de taille, parfois importantes.

### 3.1.3. Néoplasie

L'aspect histologique de la néoplasie de moule est montrée sur la **photographie 1**.



photographie 1: néoplasie de moules, observées à G100, coloration hémalun-éosine.

	Cas de Néoplasie	Effectif analysé	Taux de prévalence	Intervalle de confiance à 95 %, +/-
La Frandière (zone exposée) de mars à août 2000 : 180 individus examinés	2 (2/30 en avril en 2000 )	180	1, 1%.	1,5
Le Croisic (zone exposée) d'avril à août 2000 :	1 (1/30 en juin 2000)	148	0, 7%.	1
Le Fiol (zone exposée) en juin 2000	0	30	0	0
Maison Blanche (zone exposée) en juillet 2000	0	30	0	0
Maresclé (exposition moyenne) mars, avril et juin 2000	0	90	0	0
Autres suivis de <i>Mytilus edulis</i> dans zones non impactées au cours de la même période de mars à août 2000 sur façade atlantique française, au nord et au sud rivièrè Trinité, Barfleur, baie du Mont Saint Michel, Agon Coutainville, et deux lots d'Arcachon	2	180	1, 1%	1
Suivis de <i>Mytilus edulis</i> en juin 2001 au Croisic	0	25	0	0
Suivis des années antérieures (99-98) dans zone impactée	0	180	0	0

Trois remarques permettent d'interpréter ces résultats :

- On ne note pas en 2000 de différences significatives entre zones impactées et non impactées.
- La probabilité de ne pas détecter avec 180 individus une infection présente à 1% de prévalence est de 25% (simulation stochastique), si toutes les conditions (période, site, qualité d'analyse) sont strictement comparables.
- Il n'est pas possible de conclure pour l'instant à une élévation du taux de prévalence de néoplasie sur les moules.

#### 3.1.4. Résultats sur agents infectieux

- *Marteilia maurini*

	<i>Marteilia maurini</i>	Absence de <i>Marteilia maurini</i>	Taux de prévalence
Toutes les zones exposées	0	478	0%.

Il n'y a aucun effet de l'Erika sur la prévalence en *Marteilia refringens*.



- *Mytilicola* sp

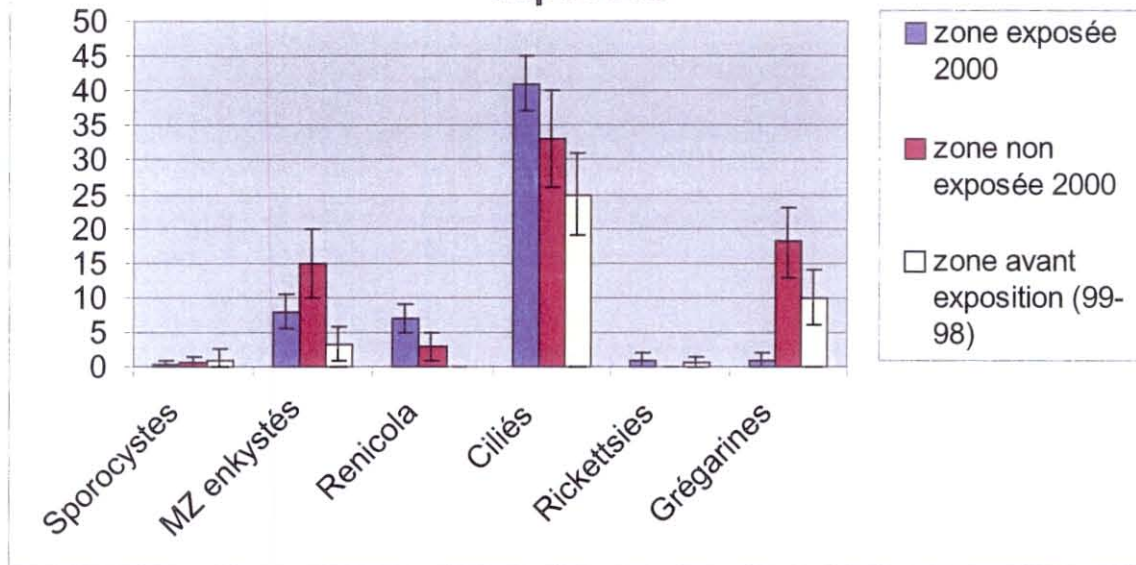
	<i>Mytilicola</i>	Effectif analysé	Taux de prévalence	Intervalle de confiance à 95 %, +/-
La Frandière (zone exposée) de mars à août 2000	12 (entre 6/30 en mars et 2/30 en août 2000 )	180	7 %.	3,6
Le Croisic (zone exposée) d'avril à août 2000	3	148	2 %	2,3
Le Fiol (zone exposée) en juin 2000	1	30	3 %	6
Maison Blanche (zone exposée) en juillet 2000	1 (en juillet 2000)	30	3 %	6
Maresclé (exposition moyenne) en mars, en avril et en juin	6	180	3 %	2
Autres suivis de <i>Mytilus edulis</i> dans zones non impactées au cours de la même période de mars à août 2000 sur façade atlantique française, au nord et au sud rivière Trinité, Barfleur, baie du Mont Saint Michel, Agon Coutainville, et deux lots d'Arcachon	32 (dont 19/30 sur un site en particulier)	180	17% (8% en moyenne si on exclue le site extrême)	5,6
Suivis de <i>Mytilus edulis</i> en juin 2001 au Croisic	0	25	0	0
Suivis des années antérieures (99-98) dans zone impactée	9	180	5 %	3

- Il y a moins ou autant de *Mytilicola* entre les zones exposées et non exposées.
  - Il y en a à peu près autant qu'avant l'échouage de l'Erika dans les zones exposées.
- L'effet de la pollution sur le taux de prévalence en *Mytilicola* des moules n'est pas significatif au seuil de 5 %.

• autres agents rencontrés

	Agents rencontrés	individus infectés	Effectif analysé	Taux de prévalence en %	IC à 95 % +/-
La Frandière (zone exposée) : de mars à août 2000	Paravortex	1	180	0,5	1
	Sporocystes	1		0,5	1
	Métazoaires enkystés et <i>Himasthla</i>	8		4,4	3
	<i>Renicola</i>	1		0,5	1
	Ciliés	60 (décroissance nette)		33,3	7
	Myicola	3		1,6	2
	Rickettsies	1		0,5	1
Le Croisic (zone exposée) : d'avril à août 2000	Sporocystes	1	148	0,6	1
	Métazoaires enkystés et <i>Himasthla</i>	25		17	6
	<i>Renicola</i>	30		20	6
	Ciliés	39		26	7
	Rickettsies	5		3	3
	Grégarines	1		0,6	1
Le Fiol (zone exposée) : en juin 2000	Ciliés	21	30	70	16
Maison Blanche (zone exposée) en juillet 2000	Métazoaires enkystés et <i>Himasthla</i>	1	30	3,3	6
	<i>Renicola</i>	1		3,3	6
	Ciliés	8		26	15
	Grégarines	1		3,3	6
Maresclé (exposition moyenne) en mars, en avril et en juin	<i>Renicola</i>	1	90	1	2
	Ciliés	69		76	9
	Grégarines	2		2,2	3
Autres suivis de <i>Mytilus edulis</i> dans zones non impactées au cours de la même période de mars à août 2000 sur façade atlantique	Sporocyste		180		
	Métazoaires enkystés et <i>Himasthla</i>	1		0,5	1
	<i>Renicola</i>	27		15	5
	Ciliés	5		2,7	2
	Myicola	61		33	7
	Grégarines	2		1,1	1,5
Suivis de <i>Mytilus edulis</i> au Croisic en 2001	<i>Himasthla</i>	3	25	12	13
	<i>Renicola</i>	2		8	10
	Ciliés	1		4	7
Suivis des années antérieures (99-98) dans zone impactée	Sporocyste	2	180	1,1	1,5
	Métazoaires enkystés et <i>Himasthla</i>	6		3,3	2,5
	Ciliés	46		25	6
	Rickettsies	1		0,5	1
	Grégarines	18		10	4
	Haplosporidies	2		1	1,5

### Comparaison des taux de prévalence observés sur *Mytilus edulis* entre zones exposées et non exposées



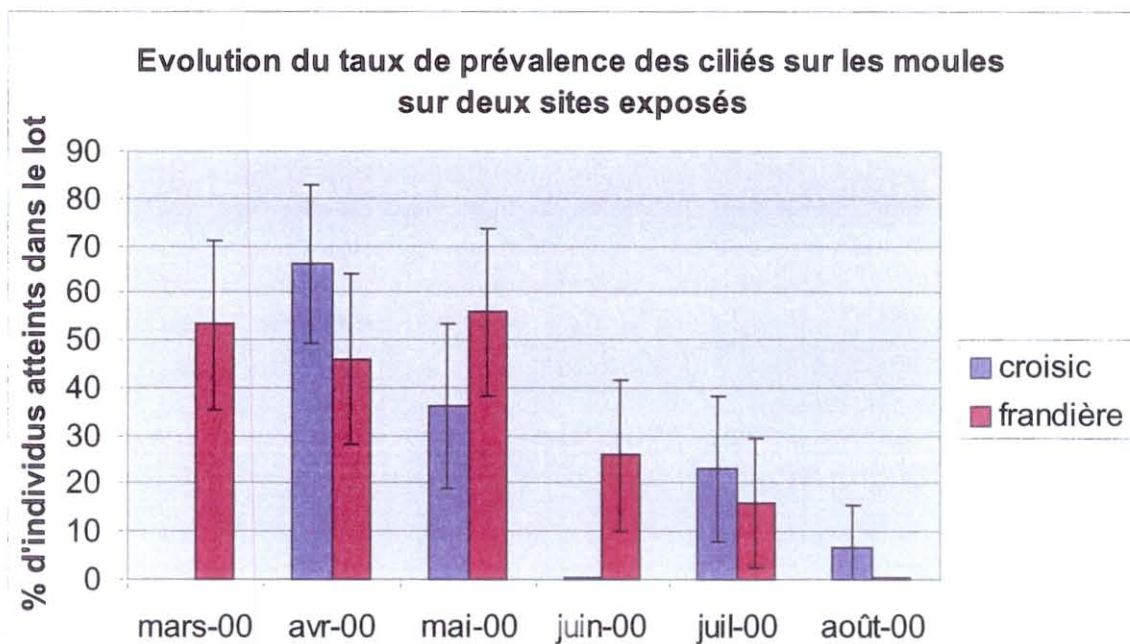
Les résultats du tableau, représentés sur le graphe ci-dessous ne montre pas d'effet de l'Erika sur les taux de prévalence.

Par exemple pour les métazoaires enkystés et les *Himasthla*, les zones exposées ont des taux de prévalence inférieurs aux zones non exposées.

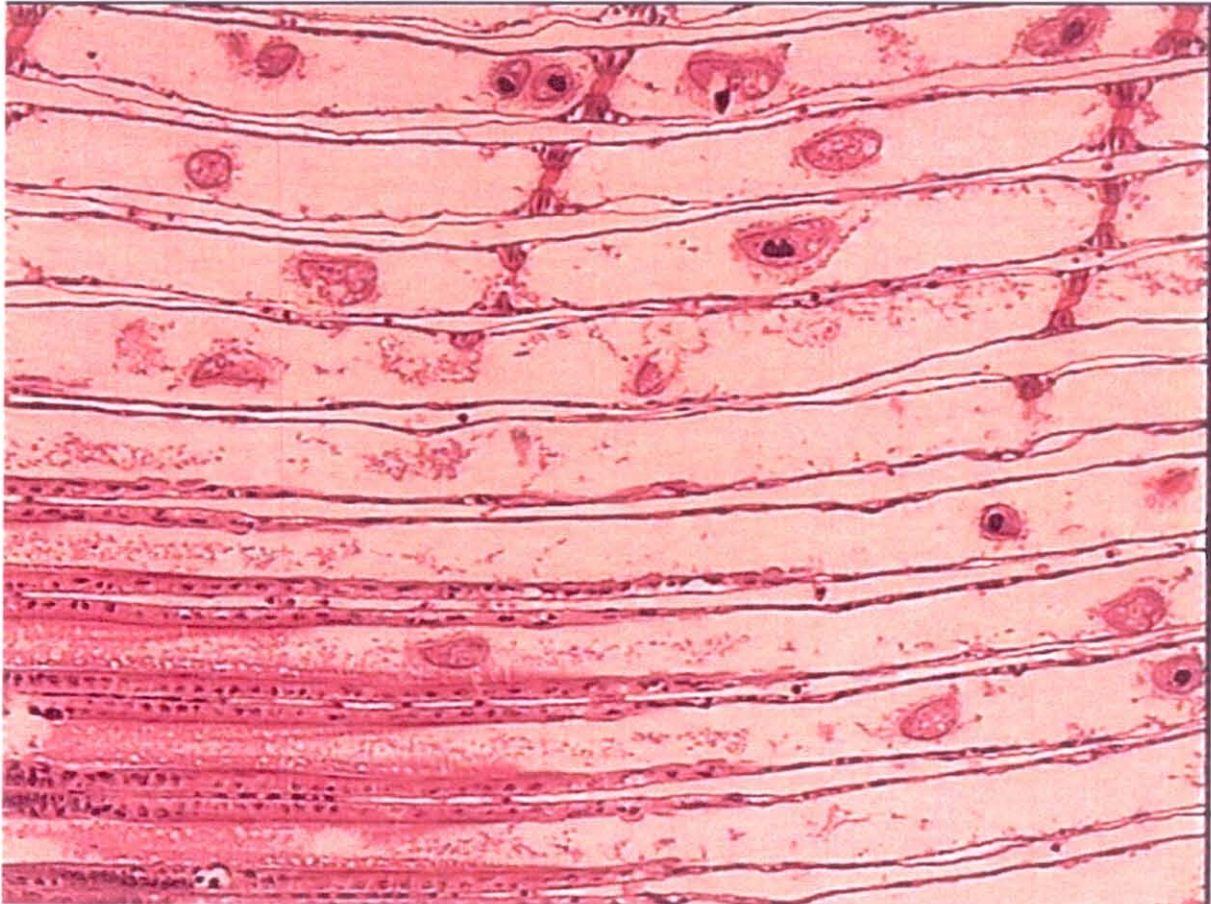
Pour les Grégarines, les taux sont inférieurs à ceux avant impact.

On note une faible élévation du taux de Rencicolidae, cependant le taux de prévalence autour des 5% est trop faible pour conclure, compte tenu des qualités de sensibilité et de spécificité de la technique histologique pour ce parasite.

Le cas des Ciliés est un peu particulier. Le taux global est significativement plus élevé que dans les zones non exposées ou avant exposition, mais seulement d'une dizaine de %. L'évolution du taux de prévalence sur le site de La Frandière et du Croisic est indiquée dans le graphe ci-dessous.



Il est possible de remarquer une décroissance compatible avec une décontamination. Les Ciliés sont surtout présents dans les branchies. Les Ciliés présentent une forte variation spatiale, ce qui n'en fait pas un indicateur facile à interpréter (Thébault *et al.* , 2001)  
L'aspect des Ciliés en histologie est montré sur la **photographie 2** ci-dessous.



photographie 2: Ciliés dans les branchies de moules G100, coloration Hémalun Eosine

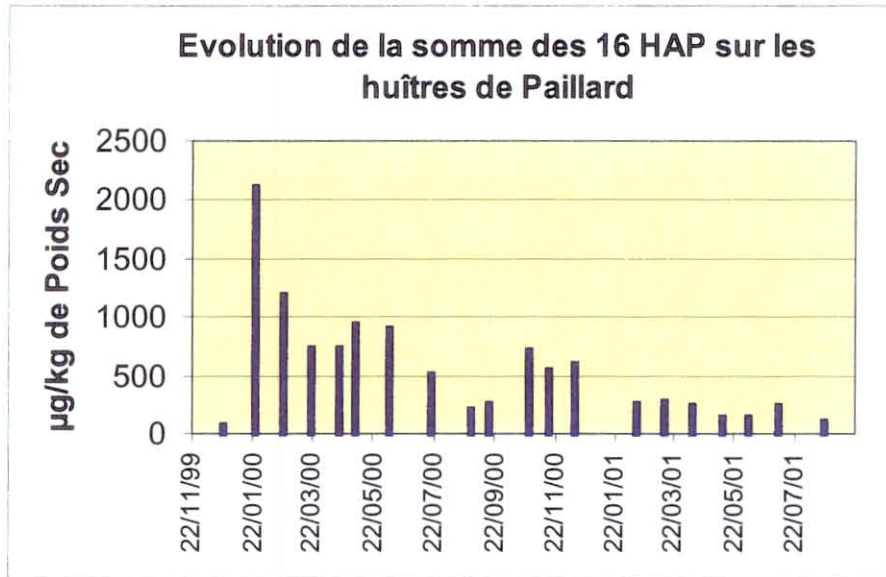
#### Dégradations tissulaires

Aucune lésion particulière n'a été observée sur un organe en particulier, ni à un niveau anormal, à l'échelle d'un lot de moules.

### 3.2. Résultats sur les huîtres creuses *Crassostrea gigas*

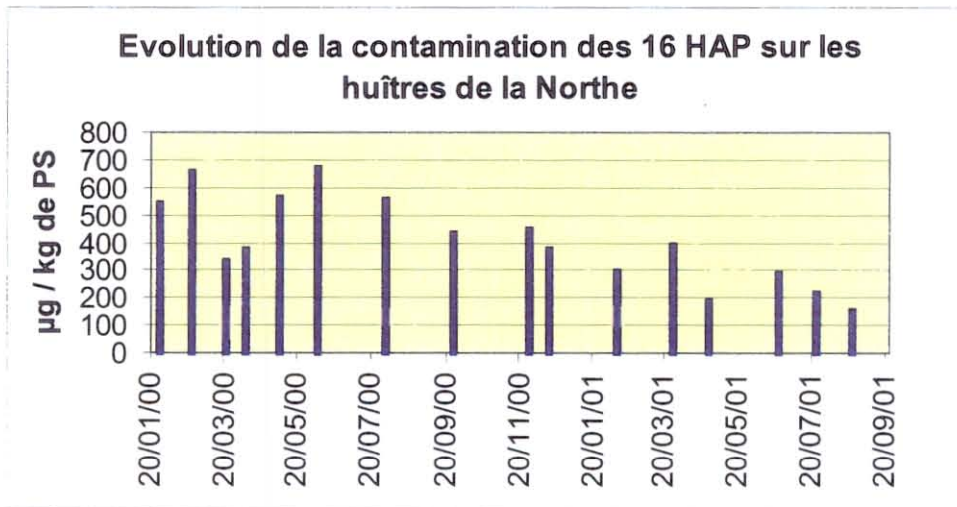
#### 3.2.1. Résultats sur la concentration des huîtres en HAP

- A Paillard



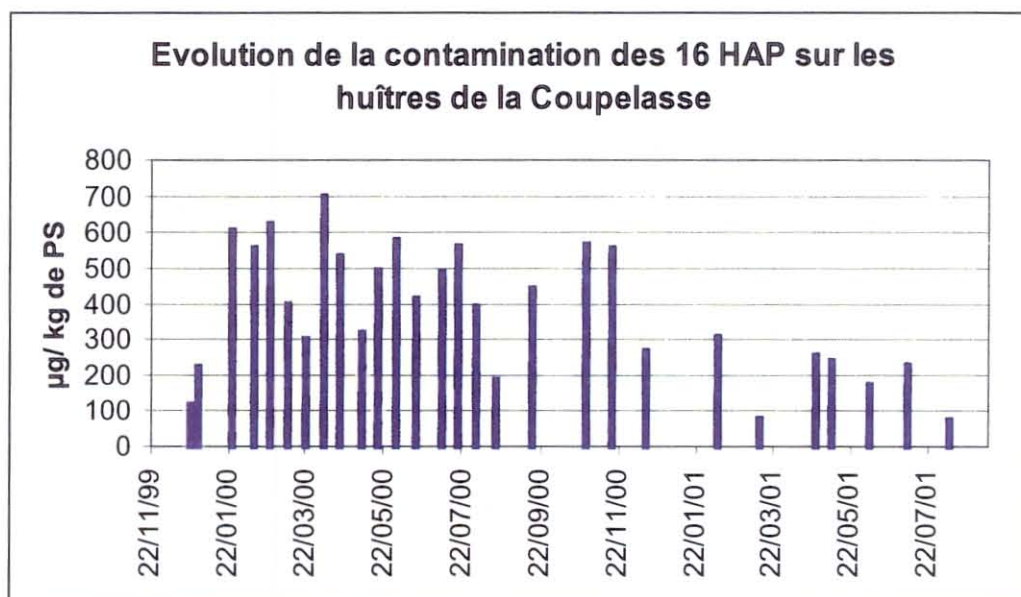
(données RNO MONERIKA, données non publiées)

- A La Northe



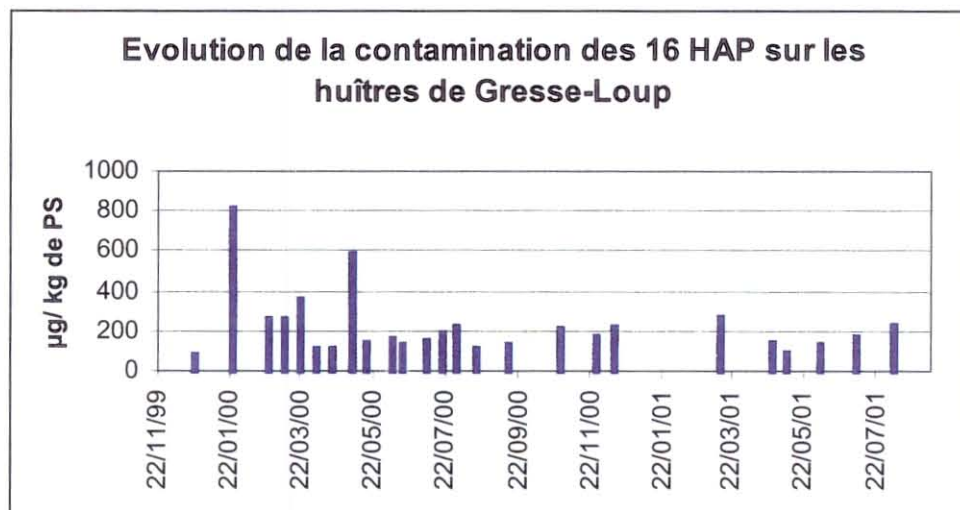
(données RNO MONERIKA, données non publiées)

- A La Coupelasse



(données RNO MONERIKA, données non publiées)

- A Gresse-Loup



(données RNO MONERIKA, données non publiées)

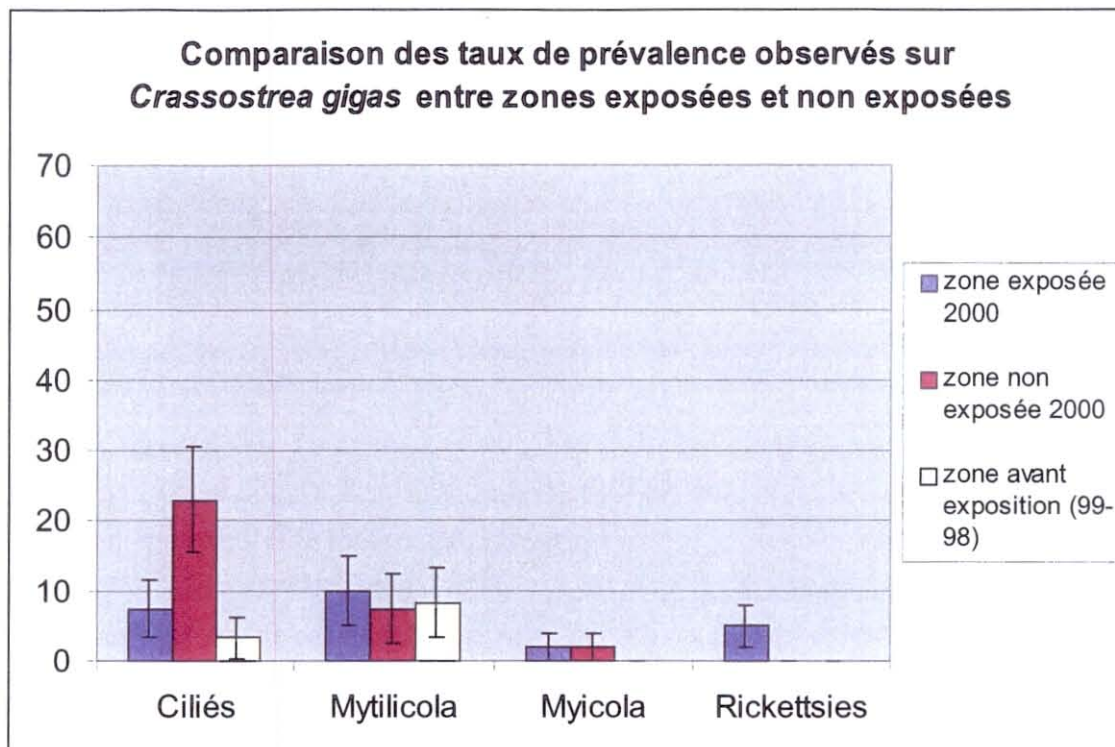
Commentaires : les taux les plus élevés sont observés à Paillard, et dans l'ordre décroissant à La Northe et à la Coupelasse, puis à Gresse-Loup. A la fin 2000, les taux n'étaient pas redescendus à des valeurs habituelles (données RNO MONERIKA).

### 3.2.2. Taille des individus

Le poids moyen des coquilles d'huîtres examinées était de 65 g +/- 25g. Les huîtres étaient globalement maigres. La différence est significative en ANOVA au seuil de 5%. On fera cependant l'hypothèse que la classe d'âge des huîtres est la même pour les différents prélèvements. En effet au sein d'une même cohorte il existe des différences de taille, parfois importantes.

### 3.2.3. Résultats de l'examen histologique

	Agents rencontrés	individus infectés	Effectif analysé	Taux de prévalence en %	IC à 95 % +/-
Paillard (zone exposée) , février 2000	Ciliés	11	60	18,3	10
	<i>Mytilicola</i>	1		1,6	3
	<i>Myicola</i>	0		0	0
	Rickettsies	1		1,6	3
Coupelasse (zone exposée) mai 2000	Ciliés	0	30	0	0
	<i>Mytilicola</i>	7		23,3	15
	<i>Myicola</i>	0		0	0
	Rickettsies	3		10	10
La Northe (zone exposée) mars et juin 2000	Ciliés	0	56	0	0
	<i>Mytilicola</i>	6		10,7	8
	<i>Myicola</i>	3		5,3	6
	Rickettsies	1		1,7	3,5
Autres suivis de <i>Crassostrea gigas</i> dans zones non impactées au cours de la même période de mars à août 2000 sur façade atlantique française, au nord et au sud, en baie de Quiberon, Baie des Veys, Charente et Arcachon en mai 2000	Ciliés	28	120	23,3	7,5
	<i>Mytilicola</i>	9		7,5	5
	<i>Myicola</i>	2		1,6	2
	Rickettsies	0		0	0
Suivis des années antérieures (99-98) dans zone impactée	Ciliés	4	120	3,3	3
	<i>Mytilicola</i>	10		8,3	5
	<i>Myicola</i>	0		0	0
	Rickettsies	0		0	0



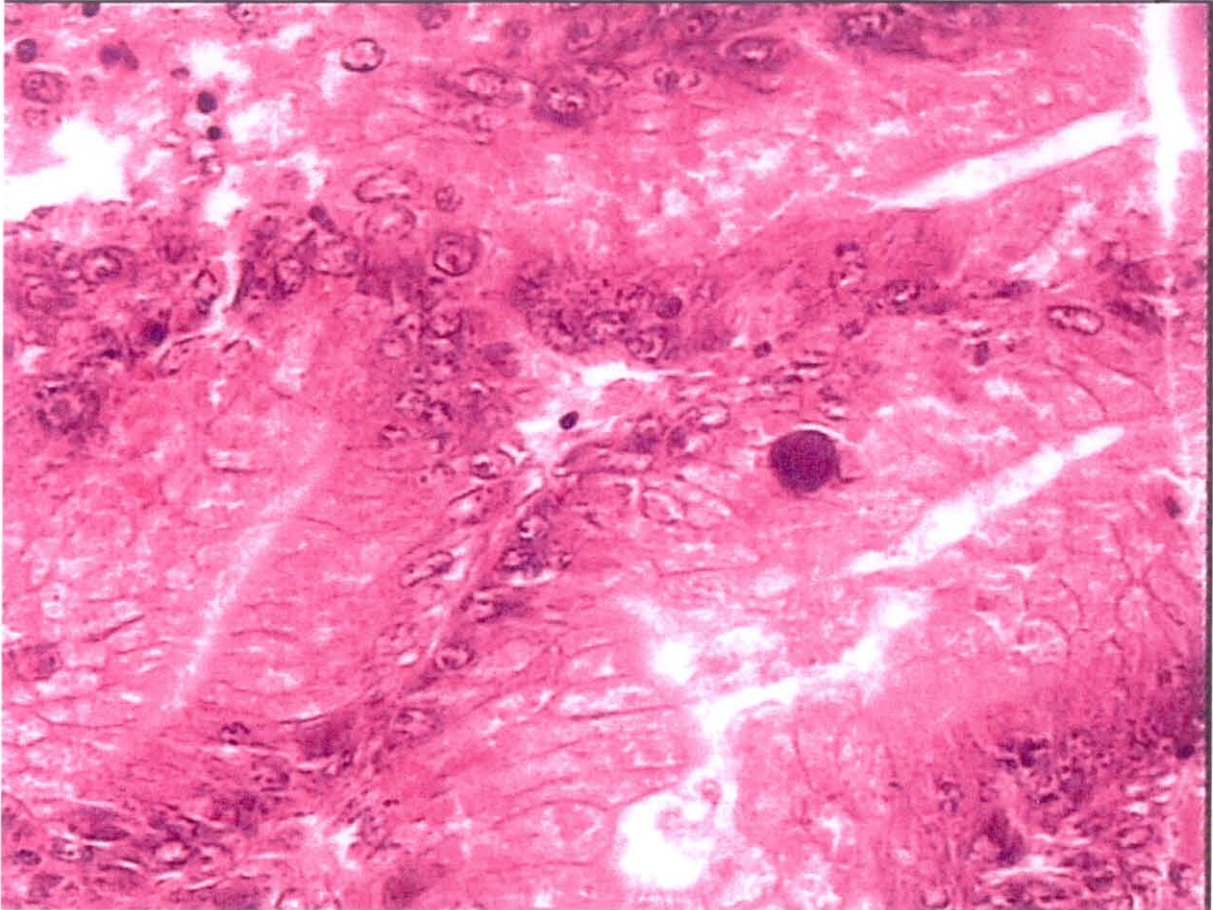
Les taux ne sont pas significativement augmentés par l'exposition, pour les ciliés avant-après exposition, de même pour *Mytilicola* et *Myicola*.

Le taux de Rickettsies ou de Chlamydies est plus élevé dans les zones exposées par rapport aux zones non exposées ou avant exposition, mais ceci est surtout lié au résultat de la Coupelasse avec un taux de prévalence de 10%. Le test exact de Fisher montre une différence significative à 5%.

La probabilité de ne pas détecter un taux de prévalence de 5% avec 120 huîtres est de 1,2%. Cependant le tableau indique qu'il existe une variabilité intersites des taux de prévalence dans les zones exposées de 1 à 10%.

La **photographie 3** montre l'aspect de Rickettsies sur *Crassostrea gigas*.





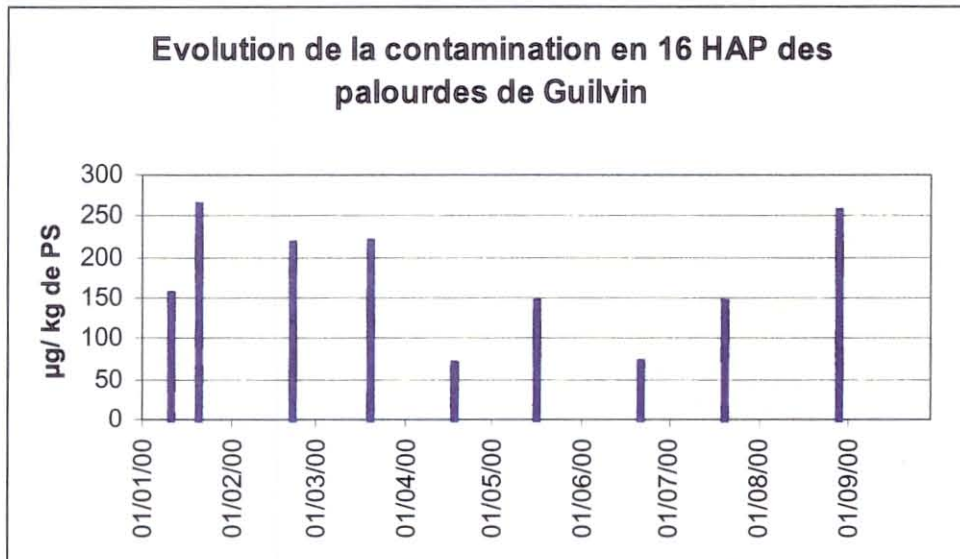
photographie 3: Rickettsies dans la glande digestive de *Crassostrea gigas*, coloration Hémalum-Eosine.

#### **Dégradations tissulaires**

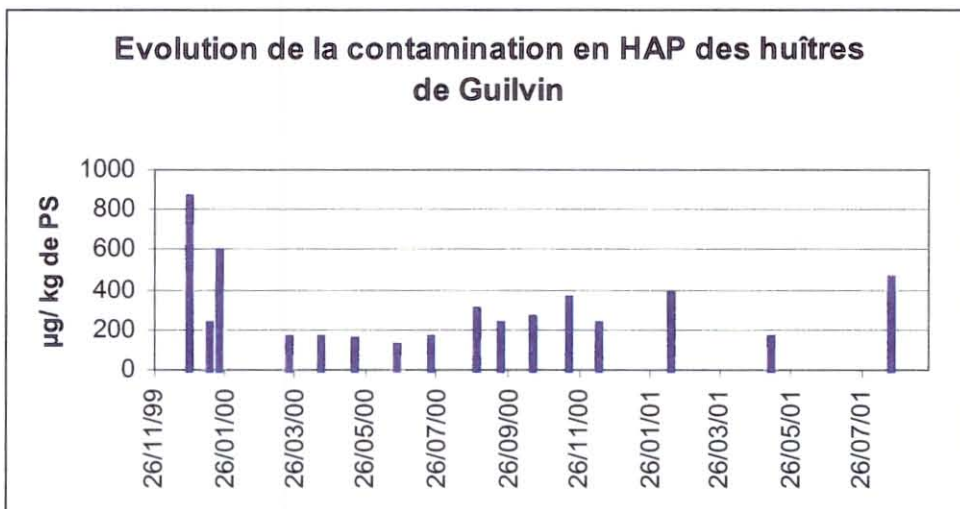
Aucune lésion particulière n'a été observée sur un organe en particulier, ni à un niveau anormal, à l'échelle d'un lot d'huîtres.

### 3.3. Résultats sur les palourdes *Ruditapes philippinarum*

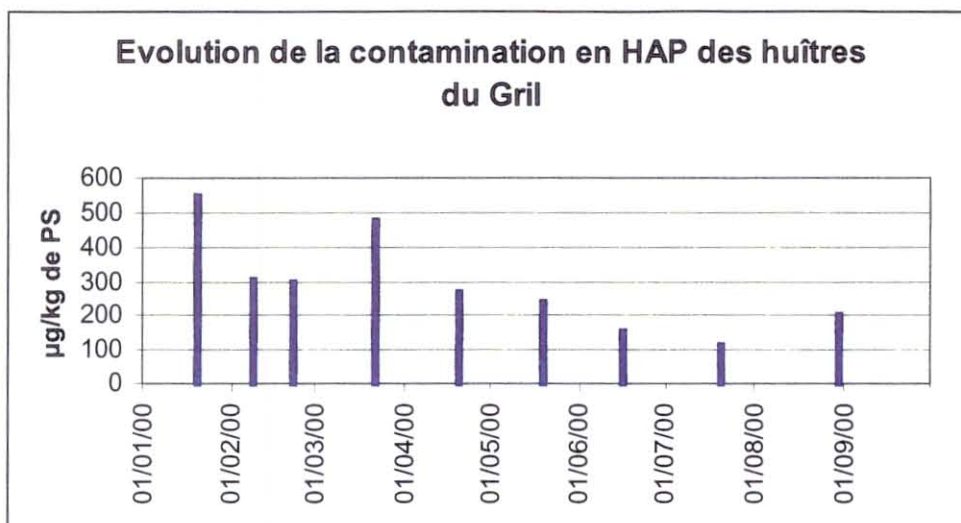
#### 3.3.1. Résultats sur la concentration des palourdes en HAP



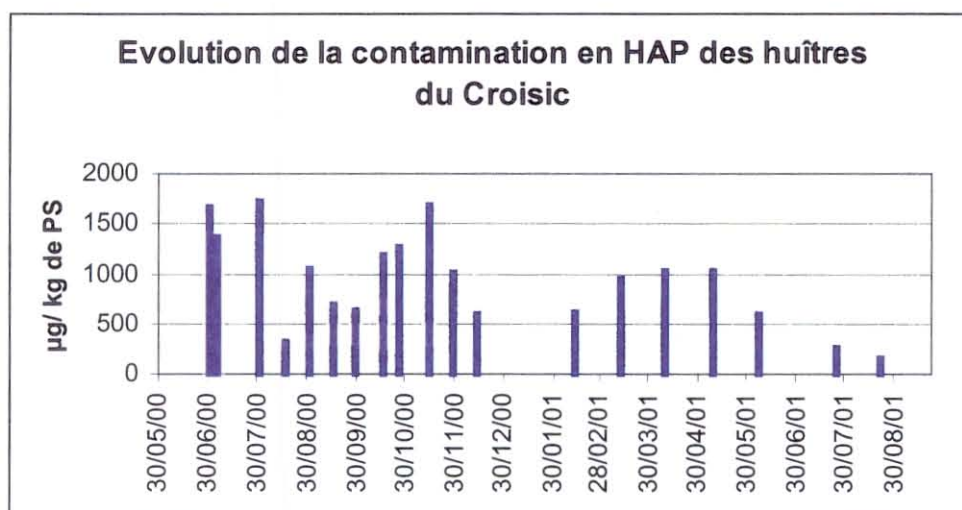
(données RNO MONERIKA, données non publiées)



(données RNO MONERIKA, données non publiées)



(données RNO MONERIKA, données non publiées)



(données RNO MONERIKA, données non publiées)

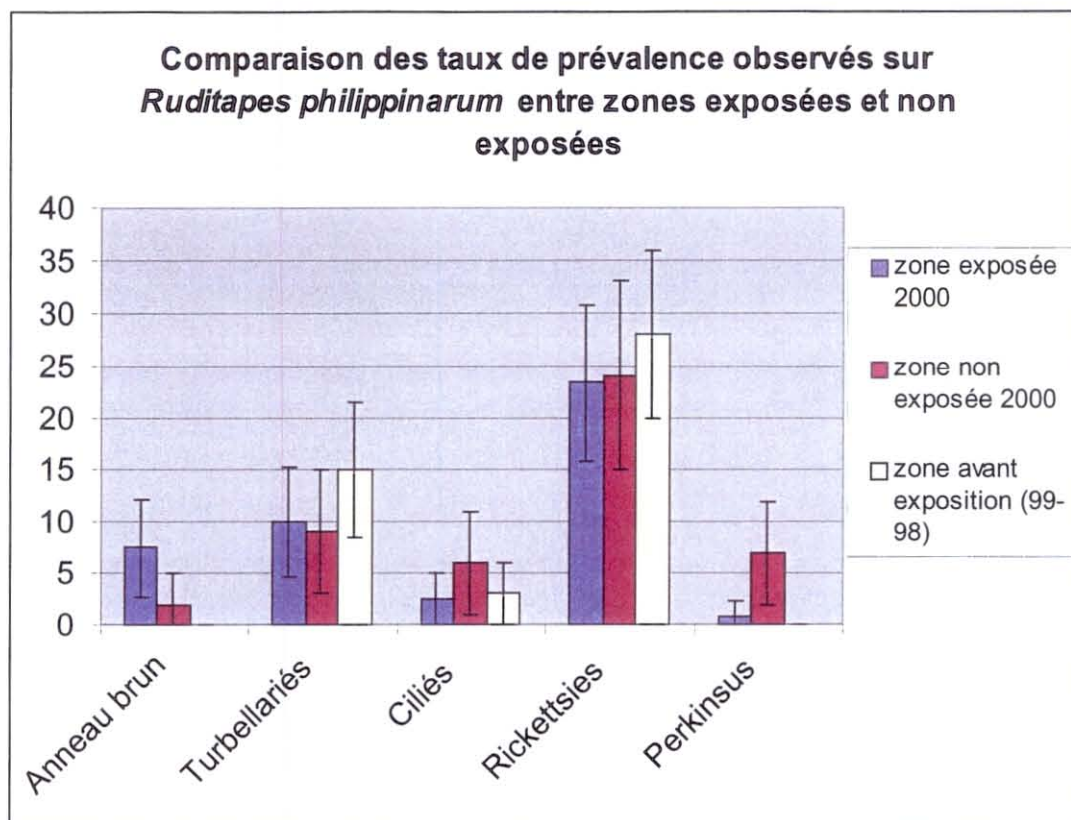
La comparaison des palourdes et des huîtres montre que la concentration en 16 HAP est moins forte chez les palourdes que chez les huîtres. En comparaison relative, il est possible de remarquer que les sites à priori les plus exposés sont dans l'ordre décroissant le Croisic, puis le Gril et le Guilvin. Par contre sur la palourde à Guilvin, on note une augmentation des taux en HAP début septembre 2000, comparable à celle du début de la pollution de l'Erika, mais à une concentration n'excédant pas 250µg/kg de Poids Sec environ.

### 3.3.2. Taille des individus

La longueur des palourdes *Ruditapes philippinarum* était en moyenne de 3,5 cm +/- 0,5 cm. La différence de taille moyenne entre les lots de différentes origines, et à différentes dates était de l'ordre de 0,5 à 1 cm maximum. La différence est significative en ANOVA. On fera cependant l'hypothèse que la classe d'âge des palourdes est la même pour les différents prélèvements. En effet au sein d'une même cohorte il existe des différences de taille, parfois importantes.

### 3.3.3. Résultats de l'examen histologique

	Agents rencontrés	individus infectés	Effectif analysé	Taux de prévalence en %	IC à 95 % +/-
Le Guilvin (zone exposée) : février 2000	Anneau brun	1	30	3	6
	Turbellarié	7		23	15
	Métazoaires	1		3	6
	Ciliés	2		7	9
	Rickettsies	5		17	13
Le Croisic (zone exposée) : avril, mai, juin 2000	Anneau brun	8	90	9	6
	Turbellarié	5		6	5
	Métazoaires	7		8	5,5
	Ciliés	1		1	2
	Rickettsies	23		26	9
	<i>Perkinsus</i>	1		2	3
	Grégarines	2		1	2
	Coccidies	1		2	3
Autres suivis de <i>Ruditapes philippinarum</i> dans zones non impactées au cours de la même période de mars à août 2000 sur façade atlantique française, au nord et au sud : dans Golfe du Morbihan, Pont l'Abbé en mai, Charente en période estivale 2000	Anneau brun	2	90	2	3
	Turbellarié	8		9	6
	Métazoaires	9		10	6
	Ciliés	5		6	5
	Rickettsies	22		24	9
	<i>Perkinsus</i>	6		7	5
	sporocystes	1		1	2
	foyers bactériens dans branchies	3		3	3
Suivis des années antérieures (99-98) dans zone impactée de la baie de Bourgneuf	Anneau brun	0	114	0	0
	Turbellarié	16		15	6,5
	Métazoaires	0		0	0
	Ciliés	3		3	3
	Rickettsies	32		28	8
	Haplosporidies	1		1	2



Le seul cas où il y a davantage d'individus infectés dans la zone exposée que non exposée, et après exposition qu'avant est le cas de l'anneau brun. Mais cette différence est non significative, et cette lésion peut être ancienne. De surcroît, les suivis des années antérieures n'avaient pas lieu au même endroit, dans une région plus au sud, et à priori moins exposée au *Vibrio tapetis* responsable de ce type de lésion.

Enfin moins de 30% des lots ont été lus, ce qui relativise la portée de ces premiers résultats. Le seul cas de mortalités anormales post-erika a concerné les palourdes du Gril, mais la période correspond aux mortalités post-hivernales « normales » des palourdes, et le phénomène n'a pas été observé ailleurs, notamment au Croisic. Les résultats du Gril sont indiqués ci-dessous :

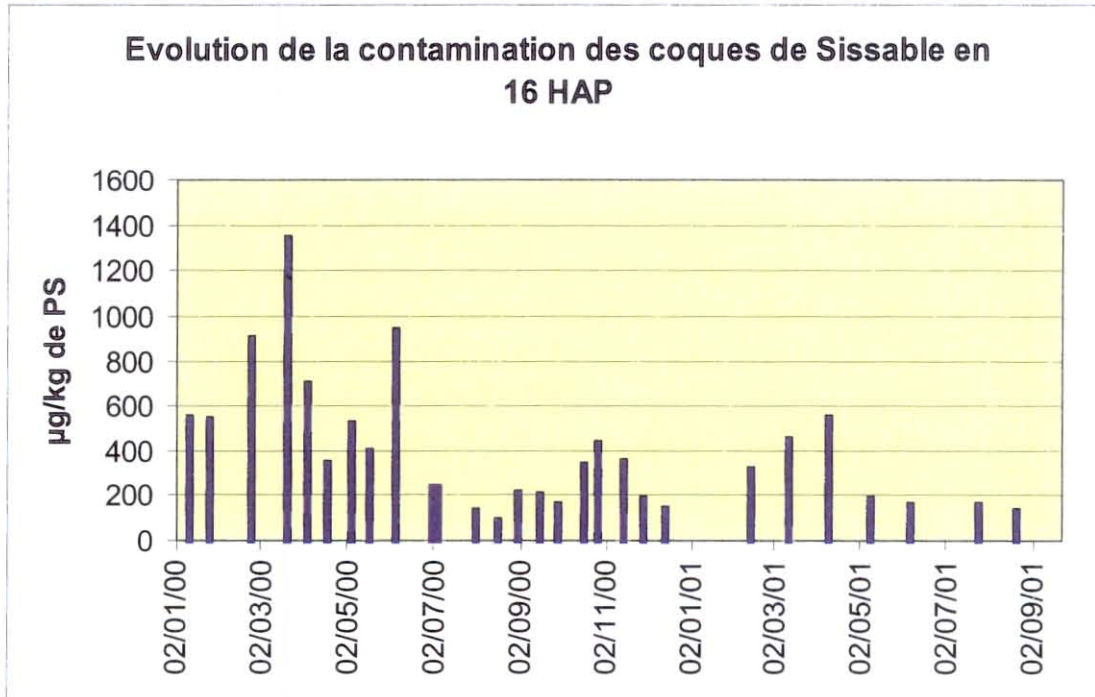
Site	Mois	Age	Nombre individus analysés	Résultats
• Le Gril	Mars	3-4 ans	30	1/30 bactéries dans manteau 3/30 rickettsies dans GD 2/30 amas de cellules granuleuses

Les individus de ce lot présentaient des lésions de nécrose dans tous les organes, ce qui rendait la lecture histologique délicate. Les taux de Rickettsies sont comparables à ceux des tableaux précédents. Des amas de cellules granuleuses, aux noyaux anormaux rejetés en périphérie du cytoplasme par une vacuole volumineuse très basophile, étaient particulièrement présents dans le manteau de deux palourdes. L'état de nécrose de ces individus ne permet pas de conclure sur la présence de ces amas, qui peuvent être une forme de dégradation de cellules granuleuses (T. Renault, com. pers.).

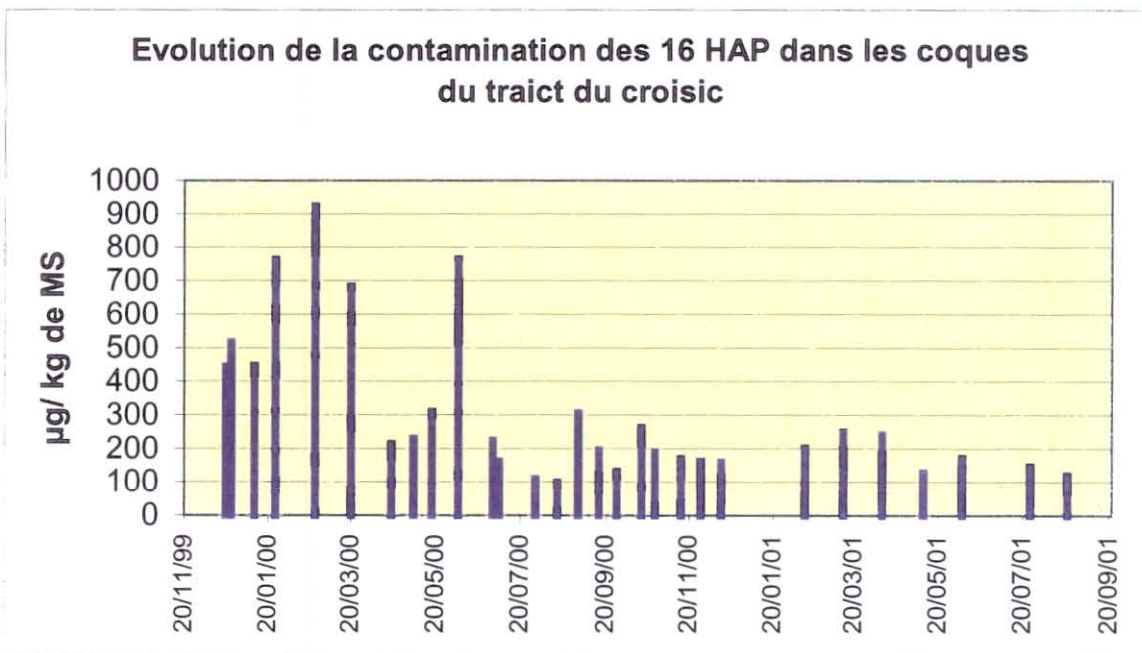
### 3.4. Résultats sur les coques *Cerastoderma edule*

#### 3.4.1. résultats de la concentration des coques en HAP

- A Sissable (données RNO MONERIKA, données non publiées)



- Au Grand Trait (données RNO MONERIKA, données non publiées)



### commentaire sur la contamination :

Les coques montrent des taux en 16HAP inférieurs mais comparables aux moules et aux huîtres sur le site du Croisic. Il faudra cependant tenir compte d'une différence qui existe non sur le plan quantitatif mais qualitatif. Entre les 4 espèces de coquillages, il existe en effet des différences « d'affinité » et de concentration pour tel ou tel HAP (données RNO MONERIKA). On peut aussi noter que même à l'intérieur de la baie du Croisic, il existe des différences de contamination, à une échelle spatiale relativement réduite. Fin 2000, les valeurs ne s'étaient toujours pas stabilisées à une valeur normale.

### 3.4.2. Taille des individus

La longueur des coques *Cerastoderma edule* était en moyenne de 3 cm $\pm$ 0,8 cm. La différence de taille moyenne entre les lots de différentes origines, et à différentes dates était de l'ordre de 0,5 cm maximum. La différence est significative en ANOVA. On fera cependant l'hypothèse que la classe d'âge des coques est la même pour les différents prélèvements. En effet au sein d'une même cohorte il existe des différences de taille, parfois importantes.

### 3.4.3. Hématosarcome

	individus infectés	Effectif analysé	Taux de prévalence en %	IC à 95 % +/-
Gros Banc (zone exposée) de mars à juillet 2000	3	175	1,7	2
Sissable (zone exposée) en juin et août 2000	1	79	1	2
Grand Traict (zone exposée) en août 2000	0	60	0	0
Autres suivis de <i>Cerastoderma edule</i> dans zones non impactées au cours de la même période de mars à août 2000 sur façade atlantique française, Côte d'Armor, Baie des Veys, Charente et Arcachon	3	120	2,5	3
Gros Banc en juin 2001	0	29	0	0
Sissable en juin 2001	0	26	0	0
Grand Traict en juin 2001	0	19	0	0
Pen Bron en septembre 2001	0	40	0	0
Sissable en septembre 2001	0	60	0	0
Grand Traict en septembre 2001	0	34	0	0
Suivis de 99 dans zone impactée	9	126	7	4,5

Il n'y a pas de différence significative de taux de prévalence, entre zone exposée et non exposée ou avant exposition.

### 3.4.4. *Labratrema minimus*

	Individus infectés	Effectif analysé	Taux de prévalence en %	IC à 95 % +/-
Gros Banc (zone exposée) de mars à juillet 2000	16	175	9	4
Sissable (zone exposée) en juin et août 2000	4	79	5	5
Grand Traict (zone exposée) en août 2000	1	60	2	3
Autres suivis de <i>Cerastoderma edule</i> dans zones non impactées au cours de la même période de mars à août 2000 sur façade atlantique française, Côte d'Armor, Baie des Veys, Charente et Arcachon	31	120	26	8
Gros Banc en juin 2001	2	29	7	9
Sissable en juin 2001	4	26	15	14
Grand Traict en juin 2001	6	19	32	21
Pen Bron en septembre 2001	2	40	5	7
Sissable en septembre 2001	9	60	15	9
Grand Traict en septembre 2001	1	34	3	6
Suivis d'août 99 dans zone impactée	5	126	4	3,4

Il n'y a pas d'augmentation significative du taux de prévalence en *Labratrema minimus*, entre zone exposée et non exposée ou avant exposition.



### 3.4.5. *Meiogymnophallus minutus*

	Individus infectés	Effectif analysé	Taux de prévalence en %	IC à 95 % +/-
Gros Banc (zone exposée) de mars à juillet 2000	40	175	23	6
Sissable (zone exposée) en juin et août 2000	41	79	52	11
Grand Traict (zone exposée) en août 2000	34	60	57	12,5
Autres suivis de <i>Cerastoderma edule</i> dans zones non impactées au cours de la même période de mars à août 2000 sur façade atlantique française, Côte d'Armor, Baie des Veys, Charente et Arcachon	21	120	17,5	7
Gros Banc en juin 2001	8	29	28	16
Sissable en juin 2001	0	26	0	0
Grand Traict en juin 2001	2	19	10,5	14
Pen Bron en septembre 2001	8	40	20	12
Sissable en septembre 2001	32	60	53	12
Grand Traict en septembre 2001	19	34	56	16
Suivis de 99 dans zone impactée	69	126	55	9

Il y a une augmentation significative du taux de prévalence en *Meiogymnophallus minutus*, entre zone exposée et non exposée mais pas avant-après exposition.

Le site du Croisic est probablement plus propice à l'infection à *Meiogymnophallus minutus* que les autres sites.

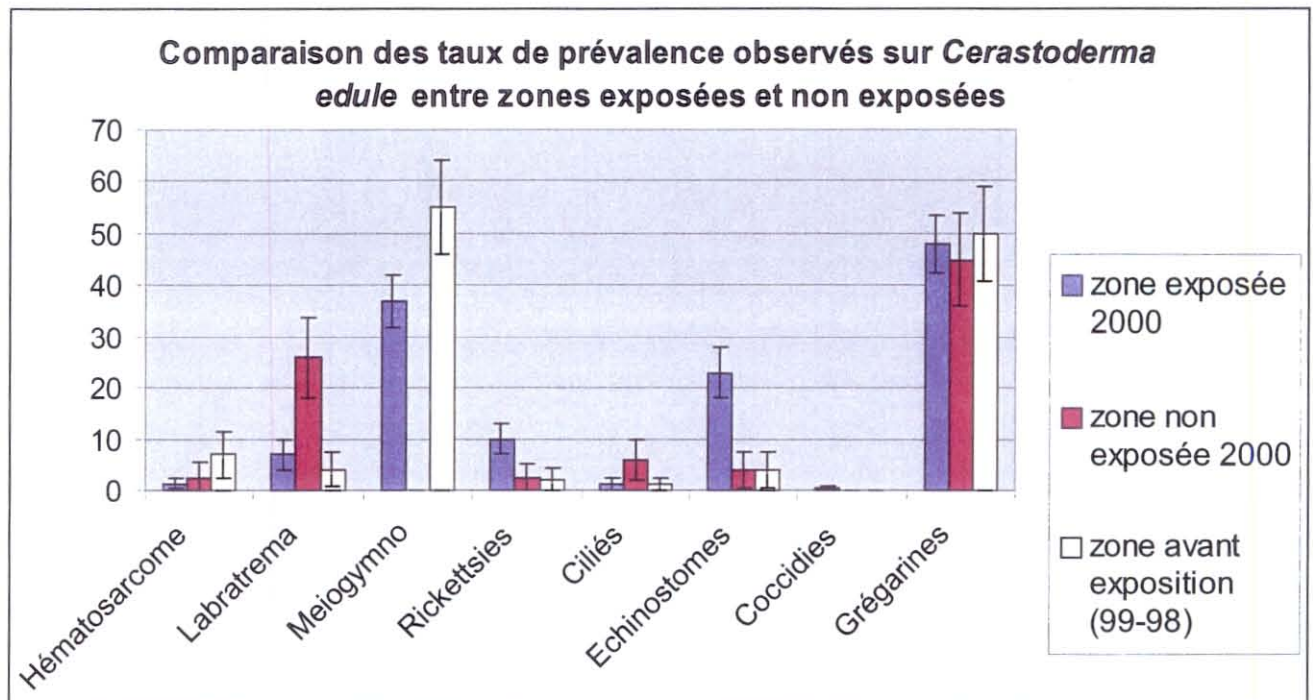
### 3.4.6. Grégarines

	<b>Individus infectés</b>	<b>Effectif analysé</b>	<b>Taux de prévalence en %</b>	<b>IC à 95 % +/-</b>
Gros Banc (zone exposée) de mars à juillet 2000	58	175	33	7
Sissable (zone exposée) en juin et août 2000	47	79	60	10
Grand Traict (zone exposée) en août 2000	47	60	78	10
Autres suivis de <i>Cerastoderma edule</i> dans zones non impactées au cours de la même période de mars à août 2000 sur façade atlantique française, Côte d'Armor, Baie des Veys, Charente et Arcachon	54	120	45	9
Gros Banc en juin 2001	17	29	59	18
Sissable en juin 2001	13	26	50	20
Grand Traict en juin 2001	10	19	53	22
Pen Bron en septembre 2001	4	40	10	9
Sissable en septembre 2001	33	60	55	12
Grand Traict en septembre 2001	11	34	33	16
Suivis de 99 dans zone impactée	63	126	50	9

Il n'y a pas d'augmentation significative du taux de prévalence en grégarines, entre zone exposée et non exposée ou avant exposition, si on tient compte de la variabilité entre sites exposés.

### 3.4.7. Autres parasites

	Agents rencontrés	individus infectés	Effectif analysé	Taux de prévalence en %	IC à 95 % +/-
Gros Banc (zone exposée) de mars à juillet 2000	Rickettsies	28	175	16	5
	Ciliés	3		2	2
	Turbellariés	12		7	4
	<i>Echinostomidae et Renicolidae</i>	51		28,5	6
	Métazoaire	9		5	3
	Haplosporidies	2		1	1
Sissable (zone exposée) en juin et août 2000	Rickettsies	2	79	2,5	3,5
	Turbellariés	5		6	5
	<i>Echinostomidae et Renicolidae</i>	17		21,5	9
Grand Traict (zone exposée) en août 2000	Rickettsies	1	60	2	3
	Ciliés	1		2	3
	Turbellariés	6		10	7
	<i>Echinostomidae et Renicolidae</i>	5		8	7
	Métazoaire	1		2	3
	Taches blanches sur palpes	3		5	5
	Coccidies	1		2	3
Autres suivis de <i>Cerastoderma edule</i> dans zones non impactées de mars à août 2000 , cote d'armor, baie des veys, charente et arcachon	Rickettsies	3	120	2,5	2,5
	Ciliés	7		6	4
	Turbellariés	2		2	2
	<i>Echinostomidae et Renicolidae</i>	5		4	3,5
	Métazoaire	11		9	5
	bactéries	5		4	3,5
Gros Banc en juin 2001	<i>Echinostomidae et Renicolidae</i>	2	29	7	9
	Coccidies	1		3,5	6
	Foyer bactéries dans branchies	1		3,5	6
Sissable en juin 2001	Rickettsies	1	26	4	7
	Turbellariés	1		4	7
Grand Traict en juin 2001	Turbellariés	1	19	5	10
	<i>Echinostomidae et Renicolidae</i>	6		32	20
Pen Bron en septembre 2001	<i>Echinostomidae et Renicolidae</i>	2	40	5	6
Sissable en septembre 2001	Turbellariés 4	4	60	6	6
	<i>Echinostomidae et Renicolidae</i>	5		8	7
Grand Traict en septembre 2001	Turbellariés	1	34	3	6
	<i>Echinostomidae et Renicolidae</i>	7		21	13
Suivis de 99 dans zone impactée	Rickettsies	3	126	2	2,5
	Ciliés	1		1	1,5
	Turbellariés	14		11	5,5
	<i>Echinostomidae et Renicolidae</i>	5		4	3,5
	Métazoaire	8		6,4	4
	bactéries	1		1	1,5



Le tableau et le graphe résument la situation pour tous les agents de la coques, excepté celui du paragraphe suivant.

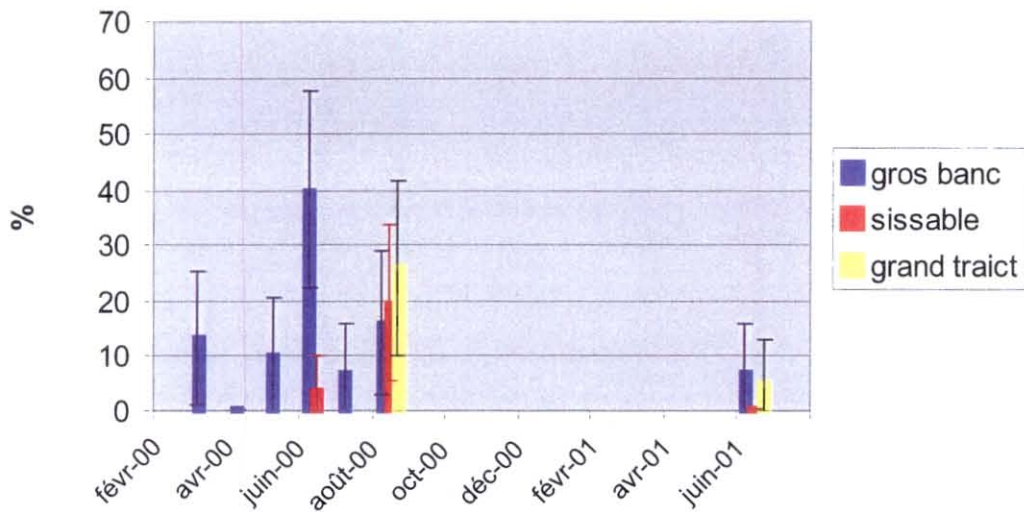
Pour tous ces agents il n'y a pas d'augmentation significative du taux de prévalence, entre zone exposée et non exposée ou avant exposition, si on tient compte de la variabilité entre sites exposés. Il faut cependant remarquer un taux un peu plus élevé de Rickettsies, mais qui ne s'observe que sur le site de gros banc. L'infestation aux Echinostomes et aux Rencolidae est plus élevée qu'avant ou ailleurs, mais il existe aussi une certaine variabilité intersites entre le grand traict et les autres sites du Croisic par exemple. De surcroît la technique histologique ne permet pas une comparaison fiable des taux de prévalence des *Rencolidae*, présents surtout dans les palpes labiaux et le bord extérieur du manteau. Il est facile de sous ou de surestimer ceux-ci par la présence ou l'absence des palpes labiaux sur la coupe, car la présence de ceux-ci n'est pas du tout systématique, et la part du bord extérieur du manteau sur la lame est aussi assez variable entre les lames.

### 3.4.8. Lésion fongique : champignon levure-like intracellulaire de coques

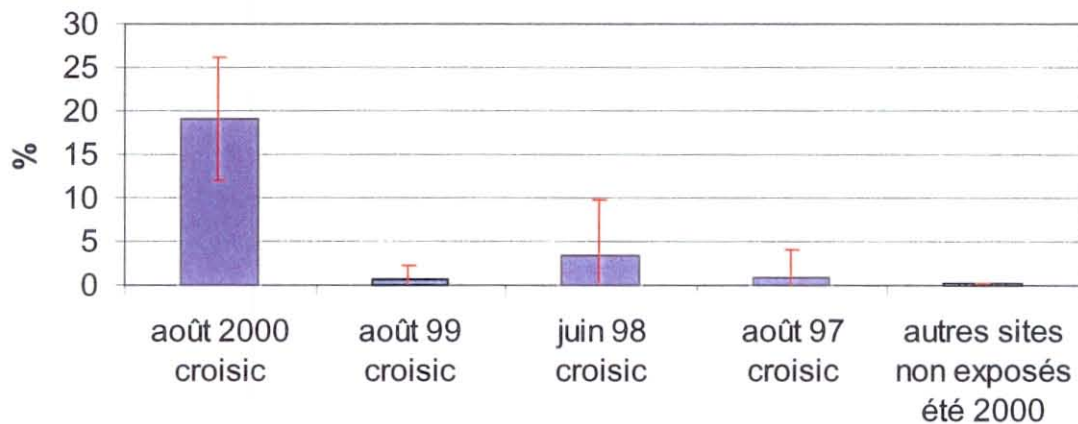
	Individus infectés	Effectif analysé	Taux de prévalence en %	IC à 95 % +/-
Gros Banc (zone exposée) de mars à juillet 2000	25	175	14	5
Sissable (zone exposée) en juin et août 2000	11	79	14	7,5
Grand Traict (zone exposée) en août 2000	10/60	60	17	9,5
Autres suivis de <i>Cerastoderma edule</i> dans zones non impactées au cours de la même période de mars à août 2000 sur façade atlantique française, Côte d'Armor, Baie des Veys, Charente et Arcachon	0	120	0	0
Gros Banc en juin 2001	2	29	7	9
Sissable en juin 2001	0	26	0	0
Grand Traict en juin 2001	1	19	5	10
Pen Bron en septembre 2001	0	40	0	0
Sissable en septembre 2001	0	60	0	0
Grand Traict en septembre 2001	3	34	9	9
août 99 dans zone impactée	1	126	1	1,5
Juin 98 dans zone impactée	1	30	3	6
août 97 dans zone impactée	1	120	1	3

Evolution sur le site de Gros Banc, situation en juin et en août 2001 au Croisic.

### Evolution des taux de prévalence des coques avec infection fongique sur sites exposés



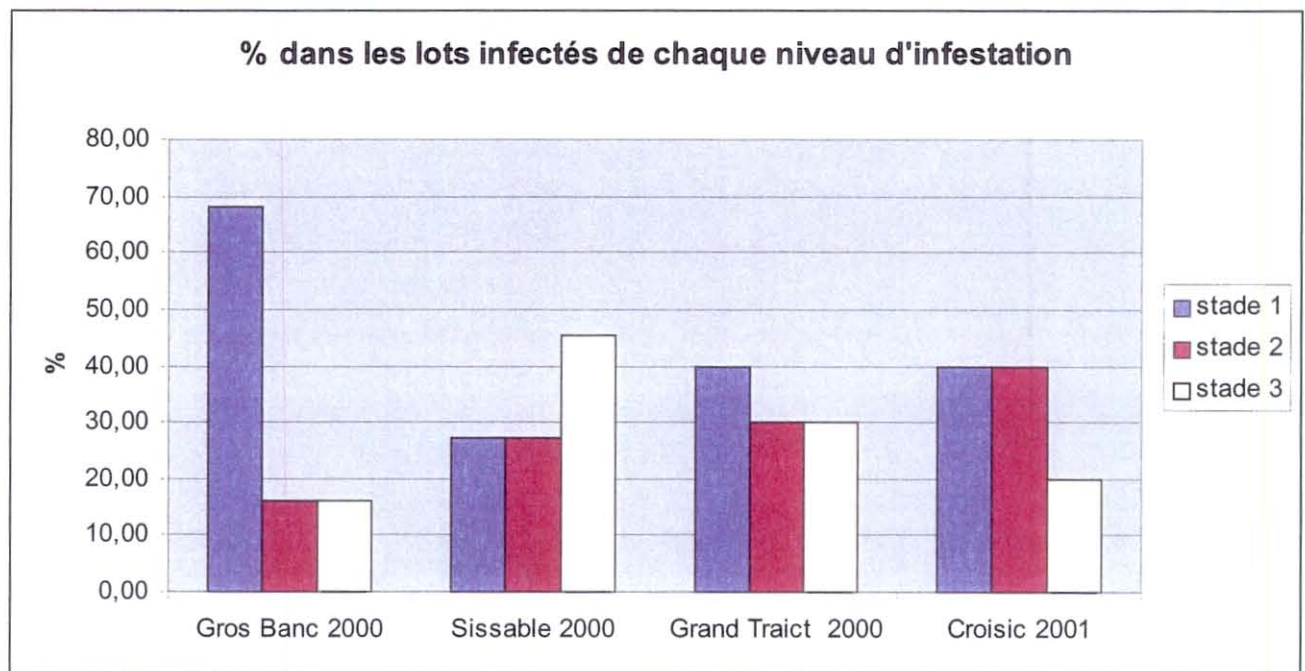
### Comparaison des taux de prévalence des coques atteintes par lésions fongiques zone avant-après exposition et comparaison zone exposée-non exposée



La comparaison des taux de prévalence « avant-après » et « ici ailleurs » indique une différence significative de taux de prévalence. Il existe néanmoins une différence intersites importante entre sites exposés, par exemple en juin entre gros Banc et Sissable et entre périodes, ou plutôt entre prélèvements. Il y en a moins, en 2001, sur le site de gros Banc. La lecture des autres lots devrait nous permettre d'obtenir un intervalle de confiance de la prévalence moins élevé.

Le tableau et le graphe ci-dessous donnent quelques indications sur les taux d'infestation rencontrés avec ces lésions sur les coques infectées. Ces données ne sont qu'indicatives, compte tenu du faible nombre d'individus infectés à chaque fois. Peu après l'Erika les stades les moins avancés sont les plus fréquents, et ensuite cette proportion évolue en faveur des stades plus avancés. Une étude menée sur 2001-2002 devrait nous permettre de compléter ces données.

	stade 1	stade 2	stade 3	Total d'individus infectés
Gros Banc 2000	17	4	4	25
Sissable 2000	3	3	5	11
Grand Traict 2000	4	3	3	10
Croisic 2001	2	2	1	5



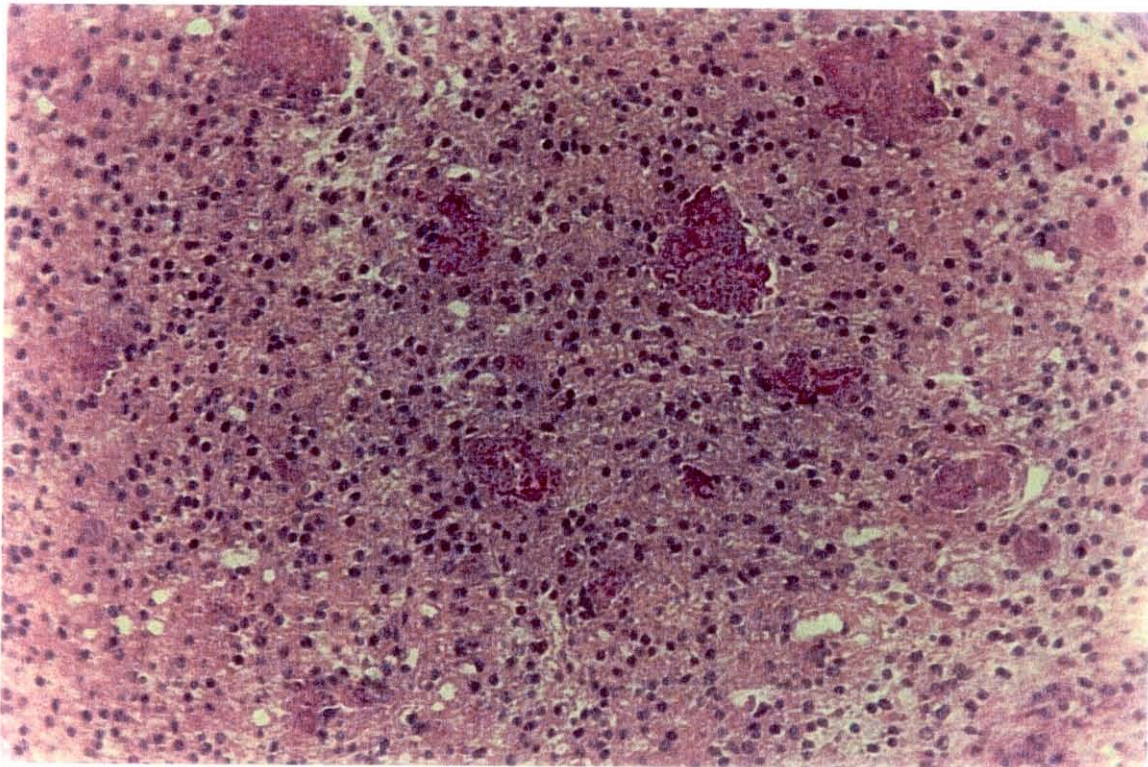
### **Description anatomopathologique :**

Il s'agit ici de la première description de ce type de lésions chez des coques, *Cerastoderma edule*, et même sur les bivalves étudiés en pathologie jusqu'à présent. Ce résultat nous a amené à relire une dizaine de lots de coques, du Croisic et d'autres sites. Nous en avons trouvé, sur 1 individu par année au Croisic, jamais ailleurs, et uniquement à un stade 1.

- **Examen en microscopie photonique**

Après coloration à l'Hémalun Eosine, des foyers d'infiltration cellulaires disséminés dans le tissu conjonctif, de la glande digestive, et du pied surtout, en nombre anormalement élevés ont attiré notre attention à la lecture du lot des coques de Gros Banc sur les lots prélevés dès mars 2000.

A l'intérieur des foyers d'infiltration cellulaires on distingue des amas acidophiles (photographie 4 ci-dessous à G20).

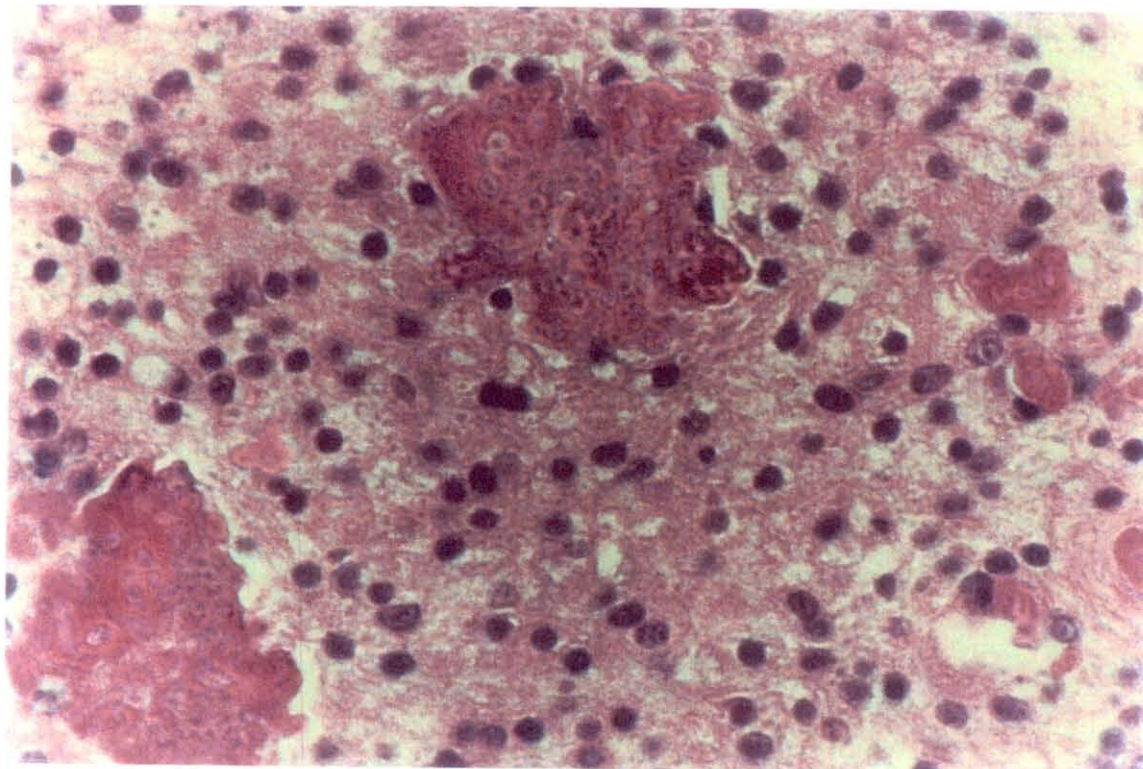


Photographie 4 : lésions fongiques dans tissu conjonctif de *Cerastoderma edule*, G20, coloration Hémalun -Eosine



A un plus fort grossissement à G100 on distingue des débris cellulaires, une substance gélatineuse acidophile, et une paroi autour d'un matériel nucléaire, ce qui a été vérifié par une coloration au Feulgen. Ces « spores » sont d'une taille de 1 à 2  $\mu\text{m}$  (photographie 5 ci-dessous à G100).

En périphérie, dans le cytoplasme des hémocytes entourant les lésions acidophiles, il est possible d'observer des inclusions du même type de « spores ». Il est aussi possible de distinguer des « spores » libres entre les hémocytes.



Photographie 5: lésions fongiques dans tissu conjonctif de *Cerastoderma edule*, G100, coloration Hémalum Eosine

Une coloration APS (Acide Périodique Schiff), spécifique de la coloration des sucres de la paroi des champignons (carbonyl primaires) a été tentée, selon la technique de Hotchkiss-Mac Manus (composition en annexe). Malheureusement cette coloration a aussi marqué les tissus sains de la coque.

Cet agent ressemble à des levures déjà détectées sur *Crassostrea gigas* (T. Renault, com. Pers.) En effet suite à des lésions analogues observées sur *Crassostrea gigas*, des essais de culture cellulaire des hémocytes avaient été tentés. L'examen en microscopie électronique de ces hémocytes avaient montré des images d'organismes interprétés comme des levures (T. Renault, com. Pers.).

- examen en microscopie électronique

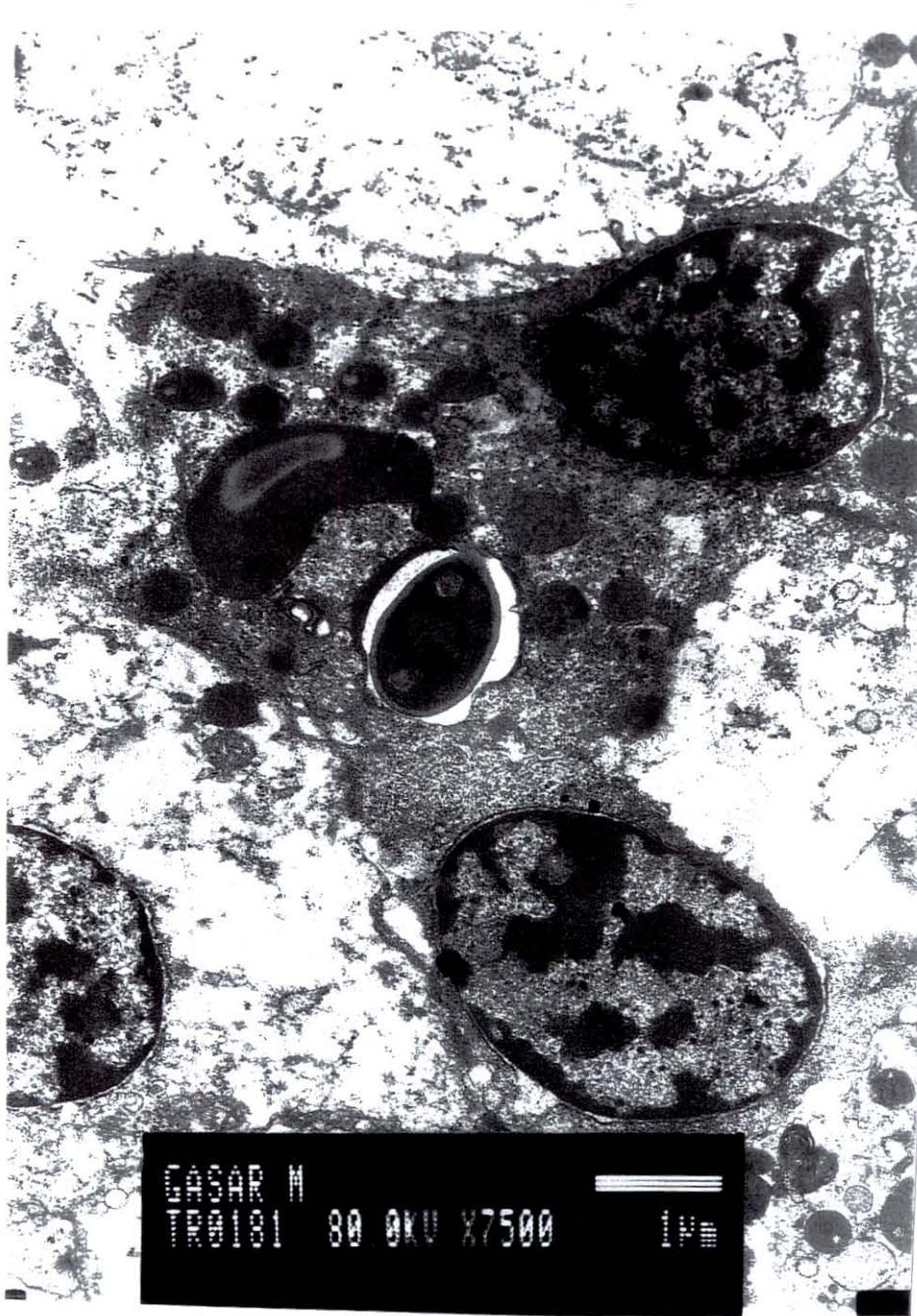
Quatre individus, correspondant à des individus particulièrement infestés et ayant des tissus en bon état de conservation par ailleurs, le premier de Sissable (août 2000), et trois du Grand Traict (août 2000) ont été examinés en coupes semi-fines (bleu de toluidine) et en microscopie électronique à transmission.

Les observations en microscopie électronique à transmission ont permis de mettre en évidence des structures interprétées comme des champignons. Ce sont en effet des organismes possédant un noyau identifié ainsi que des mitochondries (photo 6). Ils sont entourés d'une paroi épaisse (photo 6).

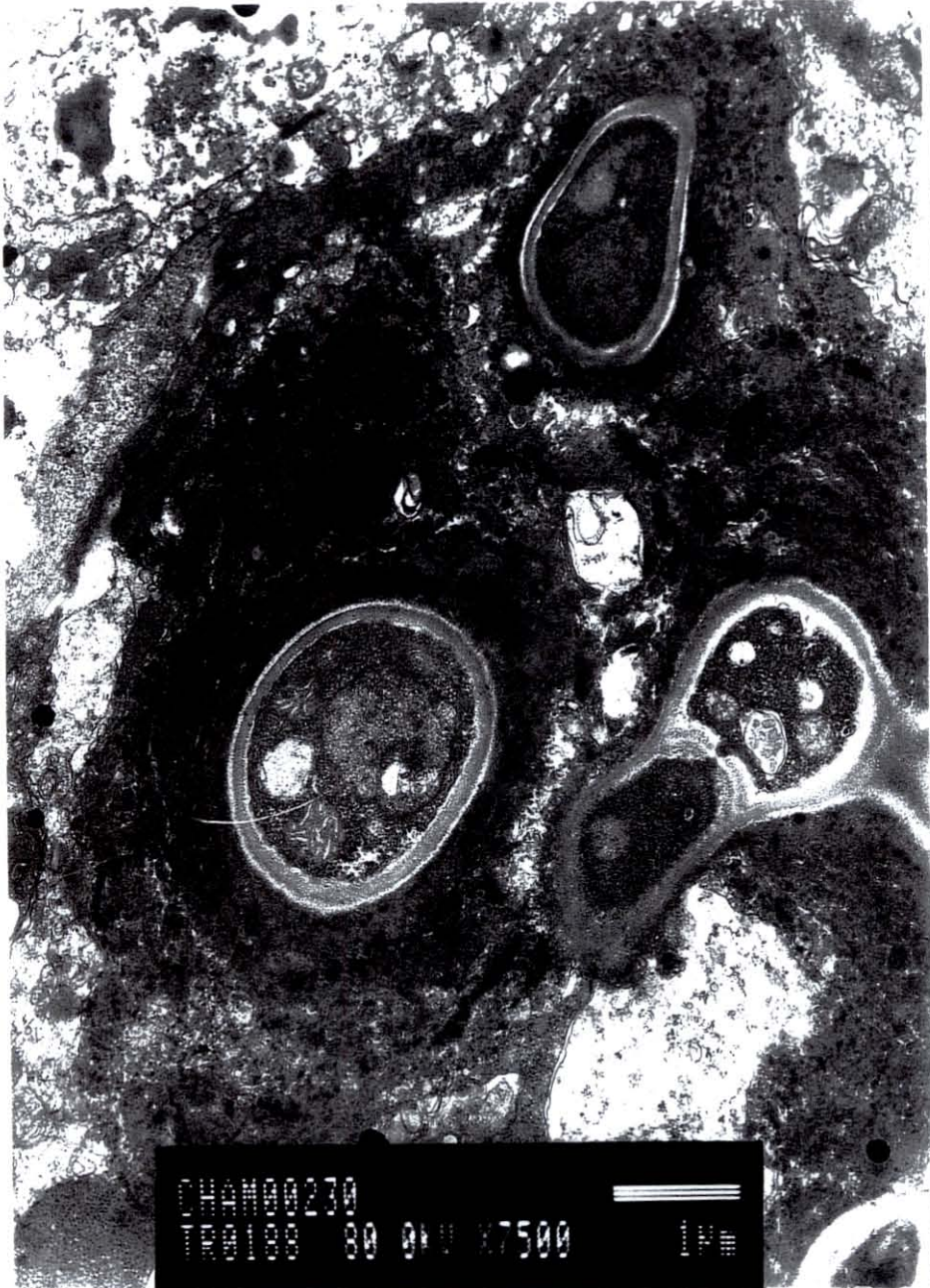


Photographie 6: Parasite en microscopie électronique à transmission, présence de mitochondrie et d'une paroi (T. Renault et M. Robert).

Ces levures apparaissent la plupart du temps sous forme unicellulaire d'aspect ovalaire et d'environ 1 à 2  $\mu\text{m}$  de diamètre (photo 7 et 8). Ces organismes sont le plus souvent observés en position intracellulaire dans des vésicules (photo 7 et 8 ci-dessous).

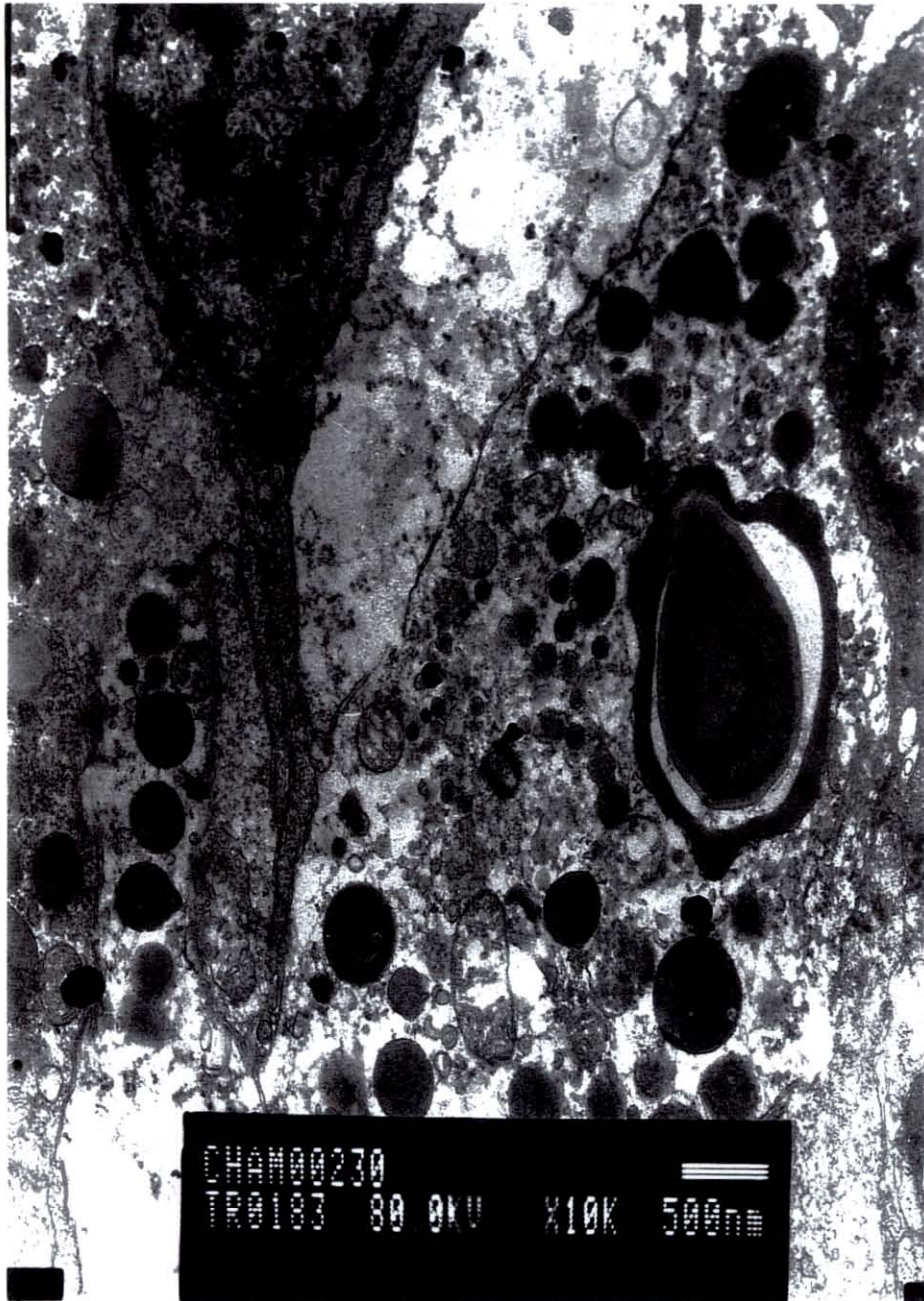


Photographie 7: Position intracellulaire de la levure, noyaux d'hémocytes visibles en microscopie électronique à transmission (T. Renault et M. Robert).



Photographie 8: Position intracellulaire de la levure, microscopie électronique à transmission (T. Renault et M. Robert).

Les cellules dans lesquelles sont détectés les champignons sont le plus généralement des hémocytes granuleux. De plus, les analyses en microscopie électronique montrent ces champignons dans une structure pouvant être interprétée comme un phagolysosome (photo 9 ci-dessous). Une couche de matériel dense aux électrons double la face interne de la membrane du phagolysosome, tandis que le champignon se trouve dans la lumière de la vésicule.



Photographie 9: Position intracellulaire de la levure dans phagolysosome, microscopie électronique à transmission (T. Renault et M. Robert).

Cependant dans certain cas, la localisation des organismes est extracellulaire.

L'ensemble des caractères morphologiques des organismes détectés laisse suspecter que nous sommes en présence de levures (Langeron et Vanbreuseghem, 1952). Cependant, une identification plus poussée demanderait la mise en œuvre de techniques complémentaires, la microscopie électronique à transmission ne permettant pas l'identification de genre ou d'espèce.

#### • **Essais de mise en culture**

En novembre, 45 coques de Gros Banc ont été prélevées. Des ponctions d'hémolymphe ont été réalisés. Des pools d'hémolymphe de 15 individus ont été mis en culture.

Des comptages sur cellule de Malassez ont permis de vérifier la présence de cellules sanguines dans les prélèvements. Des essais de culture cellulaires ont été faits avec un milieu Lybovits (L 15)+Alsever enrichi en VSF(sérum de veau foetal), du L15 + VSF+eau de mer filtrée à 2µm, et du Sabouraud, (Sallenave, 1999).

Un autre essai de culture a été tenté à partir de l'apposition d'une branchie, préalablement désinfectée avec de l'alcool, sur du Sabouraud.

Ces colonies étaient maintenues à 20° c.

Au bout de 15 jours il était possible d'observer des colonies.

Sur les 4 essais de mise en culture, les premiers résultats sur Sabouraud sont les suivants :

- 5 colonies différentes
- 9 colonies différentes
- 8 colonies différentes
- apposition 3 colonies différentes.

Les critères morphologiques pour différencier ces colonies sont :

Présence de filaments aériens,

Forme des contours de la colonie,

Texture de la colonie,

Couleur,

Enfoncement dans la gélose,

Présence d'exsudats

Les essais d'isolement n'ont pas tous réussis, certaines colonies n'ont pas survécus.

Le reste est d'une part maintenue dans du sabouraud sur gélose inclinée, et une partie est gardée au congélateur à -80°C.

Un témoin constitué d'une quinzaine de coques de Charente, prélevé au même moment, a aussi fait l'objet d'un prélèvement d'hémolymphe et d'un essai d'apposition de branchie pour essai de mise en culture.

- 4 colonies différentes ont été isolées, et aucune colonie n'a été décelée par apposition.

Les critères pour différencier les colonies sont :

Présence de filaments aériens,

Forme des contours de la colonie,

Texture de la colonie,

Couleur,

Enfoncement dans la gélose,

Présence d'exsudats.

L'identification de ce champignon, demeure, malgré nos essais, infructueuse.

## 4. Discussion générale

- Concernant l'exposition aux hydrocarbures :

L'exposition a été en général longue, inégale dans le temps, dans l'espace et entre espèces de coquillages. En général on peut considérer que les coquillages ont été contaminés à un taux inhabituel d'HAP pendant plus d'un an. Ces différents aspects valident à posteriori l'échantillonnage prévu par l'étude.

Parfois à faible distance, les préleveurs ont pu observer des zones où stagnait le fuel et d'autres zones plus dégagées, ceci, malheureusement constituera un biais inévitable pour l'étude des effets de l'Erika. C'est pourquoi la mesure de l'exposition individuelle est plus informative que celle mesurée à l'échelle d'un groupe. En effet, dans le cas de mesures agrégées il existe un risque de biais de classement entre exposés et non exposés, lorsqu'il peut exister des variations à faible distance de l'exposition.

De même on ne sait rien ou presque sur leur toxicité sur les coquillages, et ceux qui sont en concentration les plus élevés ne sont pas forcément ceux qui ont le plus d'effet. La connaissance des différentes concentrations d'HAP sur les différents coquillages donnent cependant des indications utiles pour des comparaisons ultérieures (données RNO-MONERIK). En effet certains toxiques auraient davantage d'affinités pour certaines espèces. Par rapport au mode de vie, c'est plutôt une surprise, en effet, la contamination des palourdes et des coques est relativement modérée si on la compare aux autres espèces, ce qui n'était pas un résultat attendu. Il aurait été intéressant de prélever des coquillages dépositivores, puisqu'on sait que les HAP ont une affinité pour la matière organique particulaire et colloïdale (Ramade, 1992) comme *Macoma balthica*. Cette approche est suggérée par Kaag *et al.*, 1997. Malheureusement on ne dispose que de très peu de données de pathologie sur cette espèce.

- Concernant la mesure des effets sur la santé des bivalves.

Le première remarque c'est qu'il n'y a pas eu de mortalités anormales de coquillages constatées, en comparaison des remarques sur l'Amoco-Cadiz, à l'exception des palourdes du Gril. La population suivie est donc restée relativement constante.

Le principal biais de ce type d'étude, mais c'est la seule possible à ce jour en pathologie sur les coquillages, est le fait de n'avoir qu'une mesure de prévalence et non d'incidence. D'un autre côté seules les maladies sans guérison spontanée rapide nous intéresse. Peu d'études, sur les différents agents rencontrés chez les coquillages nous permettent de connaître la durée de vie de la présence d'un agent infectieux, sauf en cas de forte variation saisonnière, comme pour *Labratrema minimus*. Mais cette étude est avant tout exploratoire, et il n'était pas forcément judicieux d'écarter à priori les agents infectieux trop variables sur le plan spatial et temporel.

De façon générale il n'a pas encore été possible d'observer de grands changements de taux de prévalence après l'échouage de l'ERIKA. Il faut cependant considérer que l'étude est encore loin d'être finie. Les résultats sur *Crassostrea gigas* sont en accord avec ceux observés au temps de l'Amoco-Cadiz. Par contre, aucun effet probant n'est apparu sur les néoplasies de moules et de coques, ce qui avait été décrit dans d'autres cas de pollution (Svardh, 1999). L'aspect lésionnel, les infiltrations non spécifiques et les signes de nécrose ne nous sont pas apparus comme de bons indicateurs. En effet ils étaient trop variables et trop peu spécifiques entre coquillages d'un même lot. Enfin l'histologie est une technique de sensibilité et de spécificité souvent moyenne, permettant rarement une identification complète et précise. Cette technique sous-estime vraisemblablement les taux de prévalence et ne permet qu'une quantification de l'infestation qui reste très relative.

Mais cette technique de référence pour l'étude des maladies de coquillages permet de voir une gamme étendue de parasites, et de vérifier leurs effets sur l'animal *in situ*. L'effort mené pour prendre des individus d'une taille comparable d'une fois sur l'autre a permis de s'affranchir d'une part importante de variabilité liée à la classe d'âge dans le cas des Trématodoses et des néoplasies notamment. L'effet de l'espèce a été pris en compte : pour les moules et les palourdes, seuls les lots homogènes de *Mytilus edulis* et de *Ruditapes philippinarum* ont été retenus pour l'étude, sur la base de critères morphologiques. Les lots n'ont pas été lus en aveugle vis à vis de l'exposition, mais aucun résultat n'apparaît comme incongru, puisque dans la plupart des cas les taux de prévalence sont similaires entre zones exposées et non exposées.

Il paraît de plus en plus essentiel de tenir compte de facteurs comme le positionnement géographique précis des prélèvements d'une fois sur l'autre, et même pour cela de s'aider d'un GPS. L'historique des lots et ce positionnement semblent être les facteurs pouvant être les sources les plus graves de confusion dans l'analyse des résultats. Un effort particulier a été fait à partir de 2000, mais est difficile à garantir dans la comparaison des données de 99-98.

Une autre difficulté est le manque de connaissances sur les principales causes de variation des taux de prévalence. Néanmoins les résultats sont relativement cohérents si on s'appuie sur une double comparaison « ici-ailleurs » et « avant-après », ce qui permet de limiter les erreurs dues un facteur spatial local ou à un historique particulier.

Ce qui permet de conclure qu'à priori il n'y pas d'effet tangible sur les huîtres et les palourdes, même si pour l'instant les résultats sont limités. Il était en effet recherché de fortes variations de prévalence, supérieures à 20%. En dessous, sauf données supplémentaires, les incertitudes sur l'échantillonnage et la pathologie empêchent une interprétation robuste.

A ce jour deux agents semblent émerger de l'impact de l'Erika.

- Le premier concerne les Ciliés dans les branchies des moules exposées aux HAP. Les Ciliés sont des protistes, du phylum des *Ciliophora*, et de la famille des *Sphenophrydae* (Kinne, 1983). Ce sont des opportunistes, et seule une infestation massive pourrait avoir un effet sur son hôte (Kinne, 1983). Leur présence accrue pourrait soit venir d'une pullulation de ce type d'agents dans le milieu ou d'une sensibilité accrue des moules, agressée par des facteurs externes comme les HAP. L'hypothèse d'une multiplication intempestive dans le milieu n'est pas évidente car les moules sont les seules à montrer ce type d'agents aussi présents dans leur tissu, comparées aux huîtres, aux palourdes et aux coques. Les ciliés ne sont pas non plus très spécifiques vis à vis des espèces hôtes, d'après nos connaissances actuelles, qui devront peut être, être revues par une taxonomie basée sur une phylogénie moléculaire. La biologie des Ciliés n'est pas forcément bien connue, mais il est possible d'admettre que les deux critères ont du jouer un rôle pour aboutir à cette allure de prévalence. Les Ciliés sont souvent présents dans des environnements dégradés (Bower *et al.* ; 1994, De Kinkelin *et al.* , 1985), et les branchies des moules ont pu être relativement agressées par les HAP. Il faut cependant être prudent dans l'interprétation, car un tiers facteur a pu jouer un rôle localement. Néanmoins l'hypothèse d'un effet de l'Erika sur la présence de Ciliés dans les branchies de moules reste plausible d'un point de vue biologique.
- Le second agent est réellement inattendu. Il s'agit vraisemblablement d'une levure intracellulaire, parasite des coques, occasionnant une réaction importante d'infiltration hémocytaire de la part des coques. Même si sa présence au Croisic est plus ancienne que l'Erika, son émergence coïncide curieusement et sur différents sites du Croisic à l'impact de l'Erika. Seule une étude menée sur un plus long terme permettra de relier ces lésions à



l'impact des HAP. La mycologie n'est pas une branche classique de la pathologie des coquillages (Bower *et al.* , 1994). Aucune maladie à déclaration obligatoire des coquillages n'est liée à un agent fongique, et la maladie observée au Croisic n'est pas décrite sur les coques. Seuls quelques champignons utiles en agroalimentaires ou néfastes en santé publique ont fait l'objet d'un séquençage permettant l'utilisation d'outils moléculaires qui auraient pu être utilisés sur les blocs histologiques (Pouchus, com. pers.). Les méthodes classiques de culture ont abouti à l'isolement de plusieurs souches, ce qui est fréquent en milieu marin et au Croisic en particulier, sur les coques de surcroît (Sallenave, 1999). Mais il n'a pas été possible d'établir de lien entre ces cultures et les lésions. L'aspect des champignons en culture et *in situ* chez l'animal peuvent être très différents. Lorsque les boîtes de cultures et la méthodologie ont été acquises, les taux de prévalence chez les coques avaient diminué. Il n'est même pas évident que le milieu de Sabouraud soit un milieu favorable à la culture, toujours lente et hasardeuse, des champignons présents dans ces lésions. Le matériel, blocs et souches obtenues sont cependant gardées pour des travaux futurs. D'autres approches, expérimentales par exemple, permettraient peut être de progresser dans l'identification. Il faut cependant, là encore, attendre l'ensemble des résultats, et surveiller l'évolution sur quelques années pour établir la suspicion du lien avec l'Erika. Nos connaissances sur la pathologie des coques est encore parcellaire, et le mérite de cette étude sera au moins d'avoir décrit une nouvelle pathologie. En 1999, des cas de néoplasie sur les coques du Croisic ont été décrits pour la première fois sur ce site, sans aucun lien avec un changement d'origine environnemental. Ce n'est donc pas parce qu'il est décrit une pathologie nouvelle qui coïncide avec une pollution aux hydrocarbures qu'il y a un lien de causalité entre les deux. Si c'est effectivement le cas, il faudra se poser la question si c'est le champignon qui a proliféré dans un milieu dégradé ou si les coques étaient fragilisées par les HAP. Les coques semblent fragilisées sur le plan physiologique par les hydrocarbures (Savari *et al.* , 1991). Par ailleurs ce champignon semble réellement virulent pour la coque, déclenchant une forte réaction inflammatoire.

- L'intérêt d'une étude d'observation est de suggérer des pistes qui seront démontrées par d'autres études. Les coques sont cependant une espèce qu'il serait intéressant de suivre dans le cas, malheureusement de nouvelles pollutions accidentelles aux HAP et aussi en routine, ce qui est le cas dans le suivi du REPAMO.

## BIBLIOGRAPHIE

- Audigé L., Beckett S. , 1999, *A quantitative assessment of the validity of animal-health surveys using stochastic modelling*. *Prev. Vet. Med*, 38, 259-276.
- Balouet G. , Poder M. , 1979, *Effets biologiques de la pollution par les Hydrocarbures de l'Amoco Cadiz sur l'Ostréiculture en Bretagne Nord*, Proceedings of the International Symposium, Brest, p. 703-714.
- Bouyer J. , Hémon D. , Cordier S. , Derriennic F. , Stucker I. , Stengel B. , Clavel J. , 1993. *Epidémiologie : principes et méthodes quantitatives*. Ed INSERM. 500 p .
- Bower S. M. , McGladdery S. , Price I. , 1994. *Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish*. *Annual Review of Fish Diseases*, 4, 199 p
- Boyles S. A. , Powell, S. A., Taylor R. , Gauthier J. , 1991. *Gulf of Mexico oysters : histopathology, parasites and heavy metals*. *J. Shellfish Res.*, vol 10, n°1, p 276-277.
- Coustau C. , 1991, *Analyse génétique et physiologique des interactions hôte parasite : le système *Prosorhynchus squamatus-Mytilus**. Thèse de Doctorat. Université de Montpellier 2, 1-137.
- De Kinkelin P. , Michel C. , Ghittino P. , 1985, *Précis de pathologie des poissons*. INRA-OIE, Paris, 348 p.
- De Montaudouin X. , Wegeberg A.M. , Jensen K. T., Sauriau P. G. , 1998, *Infection characteristics of *Himasthla elongata cercariae* in cockles as a function of water current*. *Dis. Aquat. Org.*,34(1), 63-70.
- De Swarth R. L. , Ross P. S. , Vos J. G. , Osterhaus, A. D. .M. E. , 1996, *Impaired immunity in harbour seals (*phoca vitulina*) fed environmentally contaminated herring*. *The veterinary quaterly*, 18 (3), 127-128.
- Dyrinda E. A. , Law R. J. , Burt J. , Dyrinda P. E. J. , Kelly C. A. , Pipe R. K. , Graham K. L. , Ratcliffe N. , 1997. *Modulations in cell-mediated immunity of *Mytilus edulis* following the « sea empress » oil spill*, *J. mar. Biol. Ass. UK*, vol 77, 281-284.
- Glize P. et Ponthoreau C. , 1997. *Optimisation du captage naturel de la coque (*Cerastoderma edule*) dans le traict du Croisic*. Rapport. Scient. Tech SMIDAP et laboratoire de Biologie marine de Pen Avel, 48 p.
- Kaag N. , Foekema E. M. , Scholten M. , Van Straale N. , 1997. *Comparison of contaminant accumulation in three species of marine invertebrates with different feeding habits*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol 16, 5, 837-842.
- Kinne O. , 1983, *Diseases of marine animals : vol II. Introduction Bivalvia to Scaphopoda*. O.Kinne, Hamburg, 1038 p.
- Langeron M. , Vanbreuseghem, R. , 1952, *Précis de Mycologie*, Masson, Paris 703p.
- Landsberg J.H. , 1996, *Neoplasia and biotoxins in bivalves : is there a connection ?* *J. Shellfish Res.* , vol 15, n°2, p203-230.
- Lorgue G. , Lechenet J. , Rivière A. , 1987,. *Précis de toxicologie clinique vétérinaire*. Ed du Point Vétérinaire. Maisons Alfort, 207 p.
- Lorteau C. , Auffret M. , Le Bris H. , 1995, *Le système d'immunodéfense des mollusques bivalves, effet modulateur des facteurs environnementaux*. *Recueil de Médecine Vétérinaire*, juillet, 423-429.
- Lundebye A. K. , Langston W. J. , Depledge M. H. , 1997, *Stress proteins and condition index as biomarkers of tributyltin exposure and effect in mussels*. *Ecotoxicology*, vol 6, p127-136.
- Noordhuizen J. P. T. M. , Frankena K. , Van der Hoofd C. M. , Graat E. A. M. , 1997, *Application of quantitative methods in veterinary epidemiology*. Netherland, Wageningen. 445 p.

- Paillard C. , Maes P. , Oubella R. , 1994, *Brown ring disease in clams*. Annual review of Fish diseases, vol 4., p 219-240
- Peters E. C. , 1988, *Recent Investigations on the Disseminated Sarcomas of Marine Bivalve Molluscs*. American Fisheries Society Special Publication 18 :74-92.
- Poder M. et Auffret M. , 1986, *Sarcomatous lesion in the cockle Cerastoderma edule.I. Morphology and population survey in Brittany, France*. Aquaculture, 58 :1-8.
- Ramade F. , 1992, *Précis d'écotoxicologie*. Masson, 299 p.
- Rumeau-Rouquette C. , Blondel B. , Kaminski M. , Breart G. , 1993, *Epidémiologie, méthodes et pratiques*. Médecine-Sciences, Flammarion, Paris, 312 p.
- Sallenave C. , 1999, *Etude de la flore fongique des zones conchylicoles de l'estuaire de la Loire. Recherche de souches toxigènes*. Thèse Doctorat de l'Université de Nantes, UFR de Sciences pharmaceutiques. Nantes, 194p.
- Savari A. , Lockwood A. , Sheader M. , 1991, *Variations in the physiological state of the common cockle Cerastoderma edule*. J. Mollusc. Stud. , 57, 1, 33-44.
- Scott G. I. , Middaugh D. P. , Sammons T. I. , Vernberg F. J. , Thurberg F. P. , Calabrese A. , Vernberg W. B. , 1983, *Interactions of chlorine-produced oxidants (CPO) and salinity in affecting lethal and sublethal effects in the eastern or American oyster, Crassostrea virginica, infected with the protistan parasite, Perkinsus marinus*. Symposium on Physiology and pollution of marine organisms, Mar. Sci. n°13, 351-376.
- Schwartz D. , 1994, *Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes*. 4<sup>ème</sup> ed. Médecine-Sciences, Flammarion, 310 p.
- Svardh L. , 1999, *Bacteria, granulocytomas, and Trematode Metacercariae in the digestive gland of Mytilus edulis : seasonal and interpopulation variation*. Journal of Invertebrate Pathology, vol 74, 275-280.
- Thébault A. , 1999, *Bilan du réseau national de surveillance zoosanitaire des mollusques de 1998*. Rapport IFREMER. 54 p.
- Thébault A. , 2000, *Rapport REPAMO 1999*. Rapport IFREMER, La Tremblade, 70p.
- Thébault A. , Robert M. , Chollet B. , Dumais M. , Joly J. P. , Garcia C. , Comtet T. , Le Coguic M. J. , Martin A. G. , Pichot Y. , 2001, *Rapport REPAMO 2000*. Rapport IFREMER, La Tremblade, 80 p.
- Timmermans B. M. H. , Hummel H. , Bogaards R. H. , 1996, *The effects of polluted sediment on the gonadal development and embryogenesis of bivalves*. Sci. Tot. Envir, vol 187, n°3, 231-236.
- Toma B. , Dufour B. , Sanaa M. , Benet J. J. , Shaw A. , Moutou F. , Louza A. , 2000, *Epidémiologie appliquée*. 2<sup>Nd</sup> ed., AEEMA, Maisons Alfort, 696 p.
- Twomey E. and Mulcahy M. F. , 1988, *Epizootiological aspects of a sarcoma in the cockle Cerastoderma edule*, Disease of Aquatic Organisms, vol 5, 225-238.
- Vos J. G. , and Luster M. I. , 1989, *Immune alterations*. In Kimbrough RD Jensen S, eds. *Halogenated biphenyls, terphenyls, naphtalenes, dibenzodioxins and related products*, Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 295-322.
- Wilson E. A. , Powell E. N. , Craig M. A. , Wade T. L. , Brooks, J. M. , 1990, *The distribution of Perkinsus marinus in Gulf coast oysters : its relationship with temperature, reproduction, and pollutant body burden*. Hydrobiol., vol 75, n°4, p 533-550.

# Carte 1 : Impact de l'Erika sur la santé des bivalves d'intérêt commercial : sites et espèces suivis du Morbihan en 2000



## Carte 2 : Impact de l'Erika sur la santé des bivalves d'intérêt commercial : sites et espèces suivis dans le traict du Croisic en 2000



### Carte 3 : Impact de l'Erika sur la santé des bivalves d'intérêt commercial : sites et espèces suivis en Baie de Bourgneuf en 2000

