19159
N 713-11-BAL-E
CNL03532
F

EFFETS DE LA POLLUTION PAR LES HYDROCARBURES DE L'"AMOCO CADIZ" SUR L'OSTREICULTURE

DÉPARTEMENT ENVIRONNEMENT
LITTORAL ET GESTION DU MILIEU
MARIN

Laboratoire d'Anatomie Pathologique et Laboratoire de Biochimie.

U.E.R. de Médecine.

Université de Bretagne Occidentale

Laboratoire de Chimie-Molysmologie.

Centre Océanologique de Bretagne (CNEXO)

BREST

Contrat CNEXO 78/5752

Juin 1979

EFFETS DE LA POLLUTION PAR LES HYDROCARBURES DE L'"AMOCO CADIZ" SUR L'OSTREICULTURE

Laboratoire d'Anatomie Pathologique
Laboratoire de Biochimie

U.E.R. de Médecine

Université de Bretagne Occidentale

Laboratoire de Chimie-Molysmologie
Centre Océanologique de Bretagne (CNEXO)

BREST

CONTRAT C.N.E.X.O. 78/5752

Juin 1979

RESPONSABLES SCIENTIFIQUES

1°) Laboratoire d'Anatomie Pathologique
Faculté de Médecine de BREST
- Professeur G. BALOUET, Professeur sans Chaire à l'Université de Bretagne Occidentale
- Monsieur Michaël PODER, Maîtrise Sciences et Techniques

2°) Laboratoire de Biochimie
Faculté de Médecine de BREST
- Monsieur F. BERTHOU, Docteur ès Sciences, Chef de Travaux des Universités
- Madame M.P. FRIOCOURT, Docteur 3ème Cycle

3°) Laboratoire de Chimie-Molysmologie
Centre Océanologique de Bretagne (collaboration extérieure)
- Monsieur M. MARCHAND, Docteur 3ème Cycle
- Monsieur R. COSSON, Docteur 3ème Cycle

Collaborations techniques
- Madame Y. FERREC, Interne en Pharmacie
- Mademoiselle A.M. ARZEL, Technicienne de Laboratoire
- Mademoiselle M. GOUZIEN, Technicienne de Laboratoire

REMERCIEMENTS

Nous remercions très vivement Messieurs A. MADEC, G. MAHEO et J. DANET, Ostréiculteurs, qui ont bien voulu nous aider dans la mise en place du dispositif expérimental et ont assuré la régularité des échantillonnages de contrôle.

ETUDE DES EFFETS DE LA POLLUTION
PAR LES HYDROCARBURES DE L'AMOCO CADIZ
SUR L'OSTREICULTURE

Rapport de Contrat C.N.E.X.O. 78/5752

RESUME

Conformément au protocole établi en Mai 1978, trois séries d'expériences ont été réalisées en Bretagne Nord pour préciser :

- dans le protocole "Pollution" (ACP), l'évolution de la pollution des huîtres laissées in situ en différents points de la Côte (ABERS, Rivière de PENZE, CARANTEC).

- dans le Protocole "Epuration" (ACE), la décontamination spontanée après transfert en eau non polluée (Rade de BREST ou bassins insubmersibles).

- dans le Protocole "Adaptation" (ACA), la possibilité de contamination d'huîtres saines, immergées tardivement en zones polluées.

A partir des 148 lots de 30 huîtres examinés, il a été étudié :

- sur le plan chimique, d'une part la concentration

en hydrocarbures totaux par spectrofluorométrie.

- d'autre part, sur certains échantillons sélectionnés, après séparation des fractions aromatiques et aliphatiques, leur composition précise par chromatographie en phase gazeuse à haute performance.

- sur le plan biologique, outre les indices de condition globaux, l'évolution des lésions histologiques au niveau des différents tissus, ainsi que les indices gonadiques. —

La confrontation des résultats obtenus par les trois méthodes montre que les huîtres de la zone des ABERS ont conservé de fortes teneurs en hydrocarbures totaux, ces huîtres n'ayant pratiquement subi aucune décontamination au cours de l'année écoulée, sans doute en raison du piégeage des hydrocarbures par les sédiments. Dans la région de CARANTEC et de PENZE, l'atteinte a été moins importante, avec une légère décontamination, mais les taux d'hydrocarbures restent, après un an, supérieurs à la normale.

La capacité d'épuration des huîtres transférées en zones non polluées semble avant tout liée à la durée du séjour initial en zones contaminées, les huîtres transférées 45 jours après l'échouage n'ayant pas retrouvé le niveau de contamination du lot témoin. Enfin, la contamination apparaît rapidement (un mois) dans les lots Adaptation, tout particulièrement chez les huîtres creuses.

Les analyses fractionnées montrent une accumulation préférentielle des polyaromatiques soufrés, qui représentent rapidement la totalité des hydrocarbures après disparition des aliphatiques, ceci aussi bien en zones polluées qu'après transfert en zones saines.

Les aromatiques paraissent donc les meilleurs indicateurs de pollution, les aliphatiques, rapidement éliminés, ne pouvant être utilisés comme marqueurs ; en outre, les aromatiques persistants, toxiques, ne sont pas métabolisés.

Sur le plan biologique, les altérations globales des huîtres sont moins importantes que l'on avait pu initialement l'envisager, sauf dans la zone de CARANTEC. Les lésions histologiques de nécrose cellulaire, histologiquement peu spécifiques, apparaissent particulières dans leur répartition, essentiellement digestives, puis gonadiques et interstitielles ; ces lésions sont très comparables chez les huîtres plates et les huîtres creuses, mais toujours très supérieures, après un an, à celles des lots témoins, en particulier après transfert. En outre, les altérations gonadiques posent, pour 1979, la question de la capacité de reproduction des huîtres polluées.

I N T R O D U C T I O N

Conformément au protocole établi en 1978, les Laboratoires d'Anatomie Pathologique et de Biochimie de la Faculté de Médecine de BREST, et l'équipe Chimie-Molysmologie du Centre Océanologique de Bretagne ont réalisé en collaboration, de début Mai 1978 au 31 Mars 1979, une étude des effets de la pollution par les hydrocarbures de l'AMOCO CADIZ sur l'Ostréiculture.

Cette étude s'est proposée d'apprécier l'évolution des taux d'hydrocarbures présents dans les huîtres (taux globaux et des différentes fractions), et leur répercussion sur la vitalité, les capacités de reproduction des huîtres, ainsi que les interférences avec les processus pathologiques déjà connus.

PROTOCOLES EXPERIMENTAUX

A - ECHANTILLONNAGES

Trois séries expérimentales ont été réalisées, toutes chez des huîtres adultes de 2 à 3 ans.

1°) Protocole "Pollution" (ACP)

Suivi, par échantillonnages mensuels réguliers, de lots d'huîtres plates et creuses provenant de :

- l'ABER-BENOIT : secteur haut (plates) et secteur bas (creuses)
- l'ABER-WRACH : secteur haut (creuses) et secteur bas (plates)
- CARANTEC (creuses)
- Estuaire de la PENZE (creuses)

2°) Protocole "Epuration" (ACE)

Epuration spontanée après transfert en zones non polluées.

1 - transfert, 10 et 21 jours après l'accident, de lots provenant de l'ABER-BENOIT et de l'ABER-WRACH à ROSCANVEL (Rade de BREST).

2 - transfert expérimental d'huîtres plates et creuses, effectué début Mai 1978, soit 45 jours après l'accident.

- huîtres plates de l'ABER-BENOIT transférées en Rade de BREST (LE RELECQ-KERHUON)
- huîtres creuses de l'ABER-WRACH transférées en Rade de BREST (LE RELECQ-KERHUON), examinées par comparaison avec des lots témoins provenant de BINIC et immergés également en Rade de BREST.

3 - deuxième transfert expérimental de deux lots (un lot d'huîtres plates et un lot d'huîtres creuses) provenant de l'ABER-BENOIT, placés en bassin insubmersible, et toujours comparés à un lot témoin venant de BINIC (Novembre 1978).

Dans ces trois expériences, les prélèvements ont été effectués tous les 15 jours pendant les deux premiers mois, puis mensuellement.

3°) Protocole "Adaptation" (ACA)

Portant sur un essai d'acclimatation d'huîtres plates saines, provenant de BINIC :

- immergées début Mai 1978 en zone polluée, dans l'ABER-BENOIT, l'ABER-WRACH, CARANTEC et l'Estuaire de la PENZE, ces lots étant examinés au même rythme que les lots "Epuration", soit bimensuellement, puis mensuellement.
- une deuxième immersion, comparable, a été effectuée en Novembre 1978 avec :
  - un lot d'huîtres plates transférées de BINIC dans l'ABER-BENOIT
  - un lot d'huîtres creuses transférées de ROSCANVEL dans l'ABER-BENOIT.

Le plan d'échantillonnages effectués est résumé, pour les trois protocoles cités, dans un tableau.

B - PRELEVEMENTS ET TECHNIQUES D'ETUDE

Pour chacun des 148 lots de 30 huîtres examinés

du 1er Mai 1978 au 31 Mars 1979 (4440 huîtres au total), il a été effectué :

1 - un examen macroscopique appréciant la vitalité de l'huître et, dans certains cas, l'importance des dépôts d'hydrocarbures directement visibles entre les valves.

2 - l'établissement, sur 10 huîtres, de l'indice de condition selon la formule de WALNE (technique infra).

3 - une étude histologique, portant également sur 10 huîtres, avec établissement d'un indice de nécrose et de l'indice gonadique, selon les techniques précisées ultérieurement.

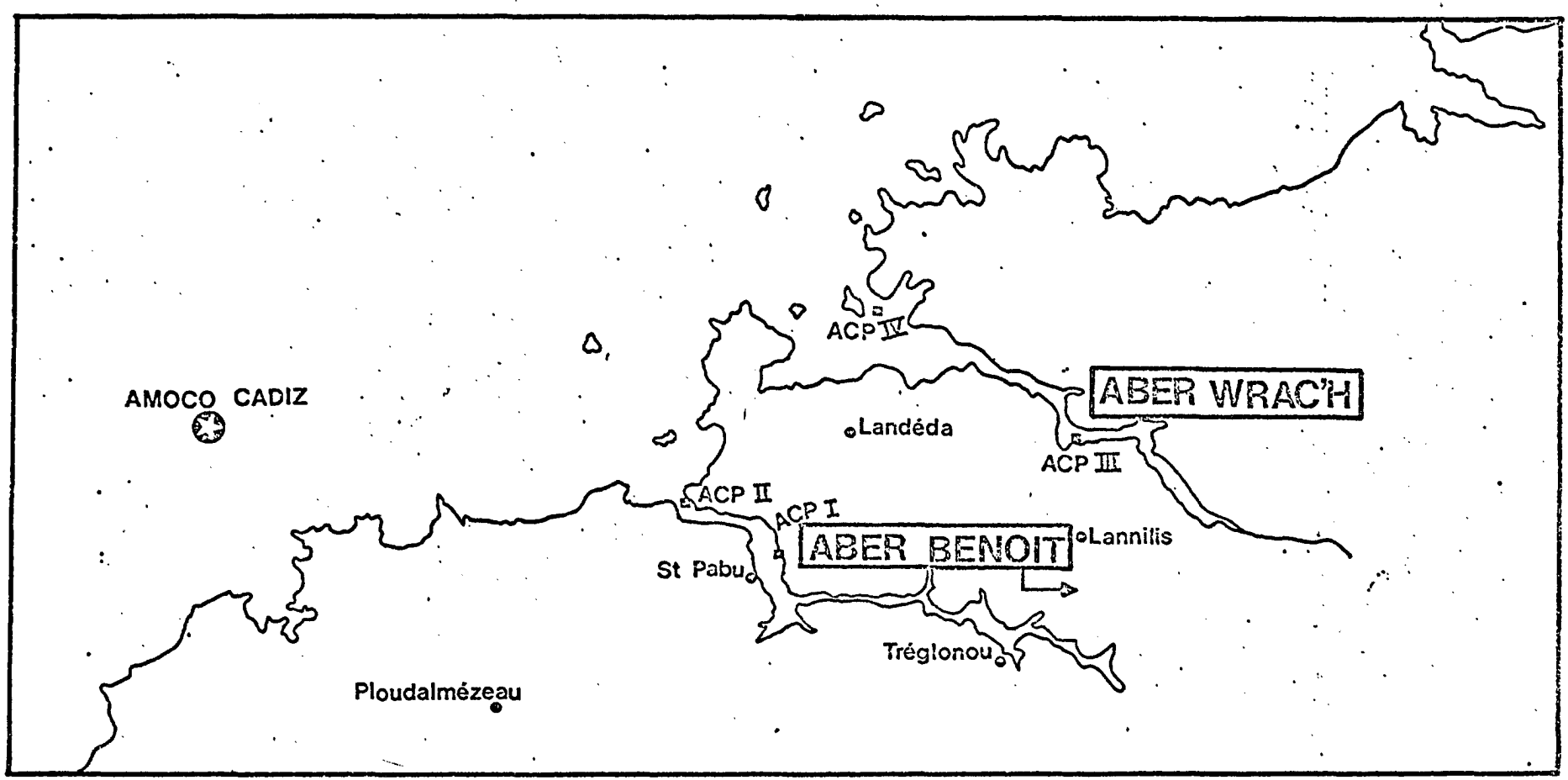
4 - sur le plan chimique (10 huîtres), il a été déterminé :

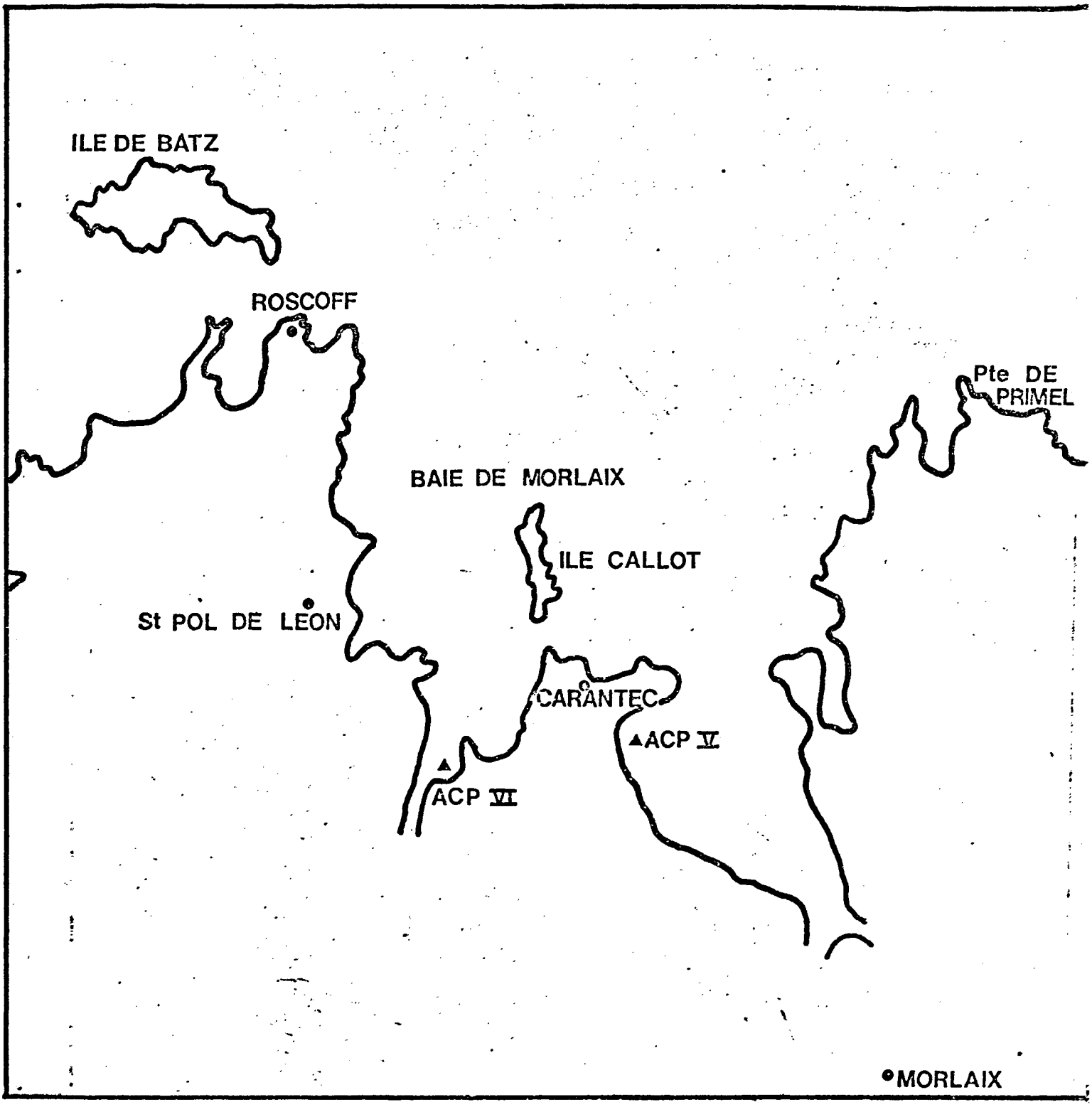
- la teneur en hydrocarbures totaux par spectrofluorométrie,

- par chromatographie en phase gazeuse à haute résolution, la nature des groupes d'hydrocarbures présents, ce dernier examen portant sur un nombre réduit d'échantillons (cf techniques détaillées, exposé infra).

PROTOCOLE EXPERIMENTAL

	PROTOCOLE	ZONES	HUITRES	DATES	CONTROLES	NBRE DE LOTS
	ACP I	Aber-Benoit (Haut)	Plates			9
	ACP II	Aber-Benoit (Bas)	Creuses	Début Mai 1978		10
POLLUTION	ACP III	Aber-Wrach (Haut)	Creuses	à	Mensuels	11
	ACP IV	Aber-Wrach (Bas)	Plates	Fin Mars 1979		10
ACP	ACP V	Carantec	Creuses			9
	ACP VI	Penzé	Creuses			3
	ACE I	Aber-Benoit→Roscanvel	Plates	Transfert 10 j ap. accident	Avril 1978	6
	ACE II	Aber-Wrach →Roscanvel	Creuses	" 21 j "		5
EPURATION	ACE III	Aber-Benoit→R. Brest	Plates	" 45 j "	Bimensuels	6
	ACE IV	Aber-Wrach →R. Brest	Creuses	" 45 j "	Mai 1978	7
ACE	ACE V	Binic (T.) →R. Brest	Plates	" 45 j "	puis	6
	ACE VI	Binic (T.) →Bas. Insub	Plates	" 7 mois "	Mensuels	5
	ACE VII	Aber-Benoit→Bas. Insub	Plates	" 7 mois "	Nov. 1978	6
	ACE VIII	Aber-Wrach →Bas. Insub	Creuses	" 7 mois "		8
	ACA I	Binic → Aber-Benoit	Plates	Transfert début Mai 1978		10
	ACA II	Binic → Aber-Wrach	Plates	"	Bimensuels	12
ADAPTATION	ACA III	Binic → Carantec	Plates	"	puis	9
	ACA IV	Binic → Penzé	Plates	"		5
ACA	ACA V	Binic → Aber-Benoit	Plates	Transfert en Novembre 1978	Mensuels	5
	ACA VI	Roscanvel→Aber-Benoit	Creuses	"		6


AMOCO CADIZ
ACP IV
ABER WRAC'H
Landéda
ACP III
ACP II
ACP I
ABER BENOIT
Lannilis
St Pabu
Tréglonou
Ploudalmézeau


ILE DE BATZ
ROSCOFF
Pte DE PRIMEL
BAIE DE MORLAIX
ILE CALLOT
St POL DE LEON
CARANTEC
ACP V
ACP VI
MORLAIX

A N A L Y S E D E S H Y D R O C A R B U R E S T O T A U X
D A N S L E S H U I T R E S

Laboratoire de Chimie - Molysmologie
Centre Océanologique de Bretagne - BREST

Des prélèvements mensuels d'huîtres ont été effectués à partir de Mai 1978 dans les sites suivants : ABER-WRACH, ABER-BENOIT, CARANTEC et PENZE. Cette partie du programme est appelée : "Pollution" (ACP).

Dans le même temps (dès Mai 1978), des huîtres prélevées dans les zones polluées citées plus haut ont été mises en décontamination dans des zones non touchées (LE RELECQ-KERHUON, CARANTEC, Bassins fermés de l'ABER-BENOIT). Cette partie du programme correspond à l' "Epuration" (ACE).

D'autre part, des huîtres provenant de zones non touchées par la marée noire (BINIC) ont été introduites dans les zones polluées. Ceci forme le troisième volet de ce programme d'étude des hydrocarbures contenus dans les huîtres, et s'intitule "Adaptation" (ACA).

I - METHODOLOGIE

A - PREPARATION DES ECHANTILLONS

- Congélation des huîtres après extraction de leurs coquilles.

- Lyophilisation des échantillons (48 heures).

- Passage à l'étuve ($< 60°$ C) si nécessaire, pour compléter la déshydratation des tissus.

- Détermination, en temps utile, des poids frais, secs et de la teneur en eau des échantillons.

B- EXTRACTION

- Deux extractions successives sont réalisées à l'aide d'un homogénéiseur par un mélange de 80 ml de pentane et 20 ml d'acétone. Une troisième extraction est réalisée par 60 ml de pentane et 15 ml d'acétone.

- Les 275 ml d'extraits sont récupérés, centrifugés, mélangés et évaporés à sec par un évaporateur rotatif.

- L'extrait sec est repris par 10 ml de pentane (extrait non purifié).

C - PURIFICATION

- 2 ml de l'extrait sont purifiés sur colonne de Florisil (3 g) : diamètre intérieur : 0,8 cm.

- Préalablement, le Florisil a été activé à 500° C et désactivé par addition de 5 % d'eau.

- L'élution des hydrocarbures est effectuée par 100 ml de pentane.

D - ANALYSE

- Une fraction adéquate de l'extrait purifié (100 ml)

est analysée par spectrofluorométrie :

+ Excitation : $\lambda = 310$ nm
+ Emission : $300 < \lambda < 500$ nm

- Calibration par rapport à une solution de résidu brut de l'AMOCO CADIZ.

- La limite de détectabilité pour 10 g de poids sec est de 8 ppm.

II - RESULTATS

A - AMOCO CADIZ : POLLUTION : ACP

Les teneurs en hydrocarbures totaux rencontrés dans les huîtres demeurées dans les sites pollués sont présentées dans le tableau I.

Il est à remarquer une forte pollution des huîtres des ABERS et une pollution plus faible, mais nette, des huîtres de CARANTEC et de PENZE. A titre comparatif, un exercice d'inter-calibration réalisé en collaboration avec l'I.S.T.P.M. (NANTES) nous a permis de mettre en évidence une teneur de 22 ppm (P.S.) d'hydrocarbures totaux dans des huîtres provenant d'une zone considérée comme non polluée (AURAY, MORBIHAN). De même, nous avons déterminé une valeur de 469 ppm (P.S.) dans un échantillon d'huîtres provenant de l'ABER-WRACH. Les résultats de la présente étude correspondent à des concentrations 10 à 100 fois supérieures à la teneur de 22 ppm rencontrée à AURAY. Pour ce qui concerne l'évolution des hydrocarbures totaux pendant l'année écoulée, nous pouvons nous reporter à la figure 1.

SITES	ABER BENOIT Amont ACP I	ABER BENOIT Aval ACP II	ABER WRACH Amont ACP III	ABER WRACH Aval ACP IV	CARANTEC ACP V	PENZE ACP VI
DATES	Plates	Creuses	Creuses	Plates	Creuses	Creuses
MAI	1411	2083	1291	1498	782	
JUIN	918	1450	1276	794	405	539
JUILLET		1491	1588	1737	332	
AOUT	939	879	804	932	299	
SEPTEMBRE	1547	1225	544	1324	343	
OCTOBRE	1484	829	716	942	369	101
NOVEMBRE	596	918	861	1107	102	335
DECEMBRE			1114		354	
JANVIER		1924	1689	1342	464	
FEVRIER	458	1829	2180	1455		
MARS	1127	1946	2215	1537		
AVRIL	1078	1225	1794	1022		
MAI	680	1125	1221	628	208	
MOYENNE	1023 ± 378	1410 ± 447	1330 ± 538	1193 ± 339	366 ± 178	325
	(34 %)	(32 %)	(40 %)	(28 %)	(49 %)	

TABLEAU I : Variations des concentrations d'hydrocarbures totaux présents dans les huîtres prélevées au cours d'une année dans les sites pollués choisis. Les teneurs sont exprimées en ppm de poids secs (mg HC/Kg).

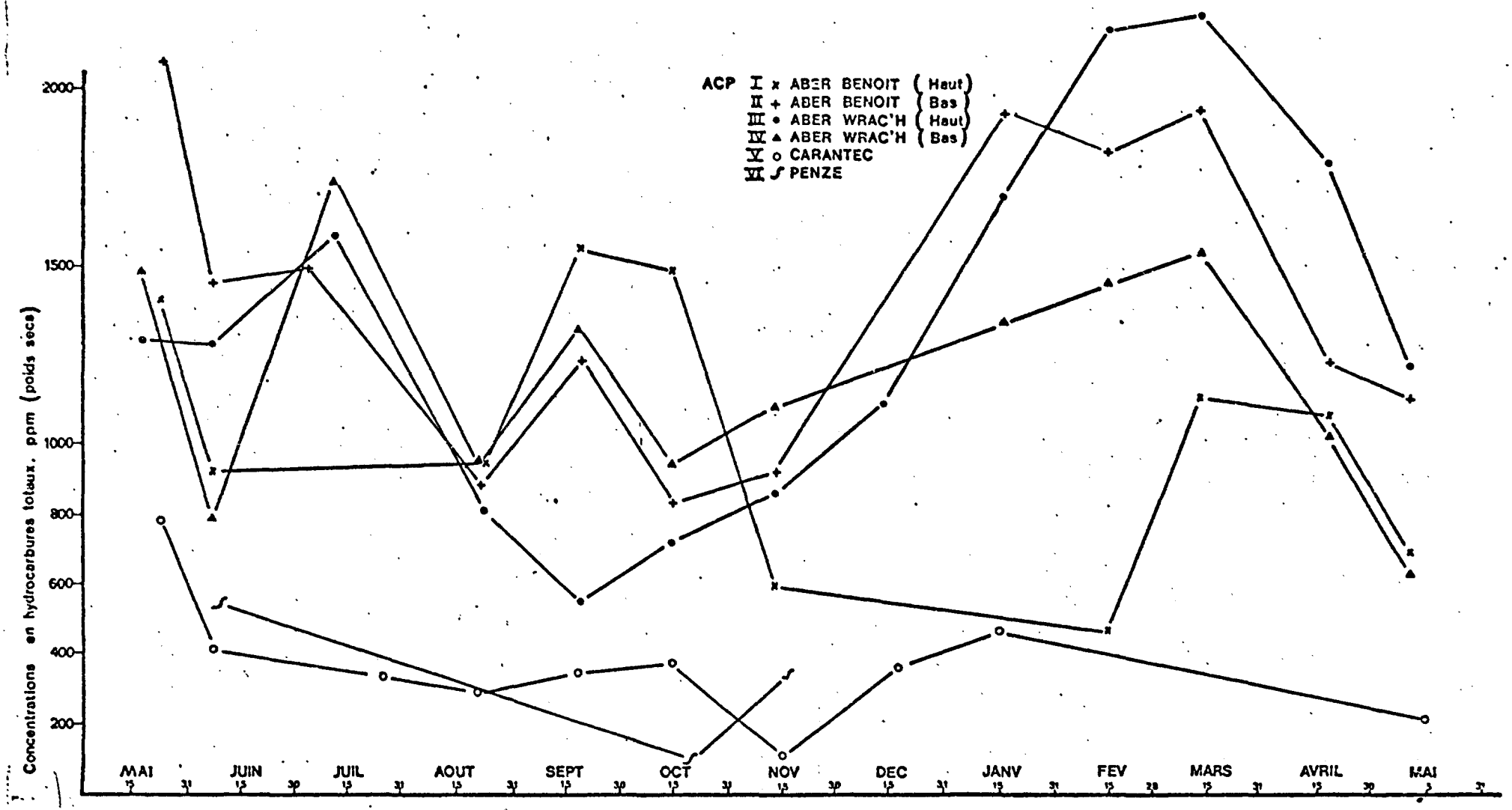


Figure 1 : Evolution des teneurs en hydrocarbures totaux dans les huîtres prélevées au cours de l'expérience ACP.

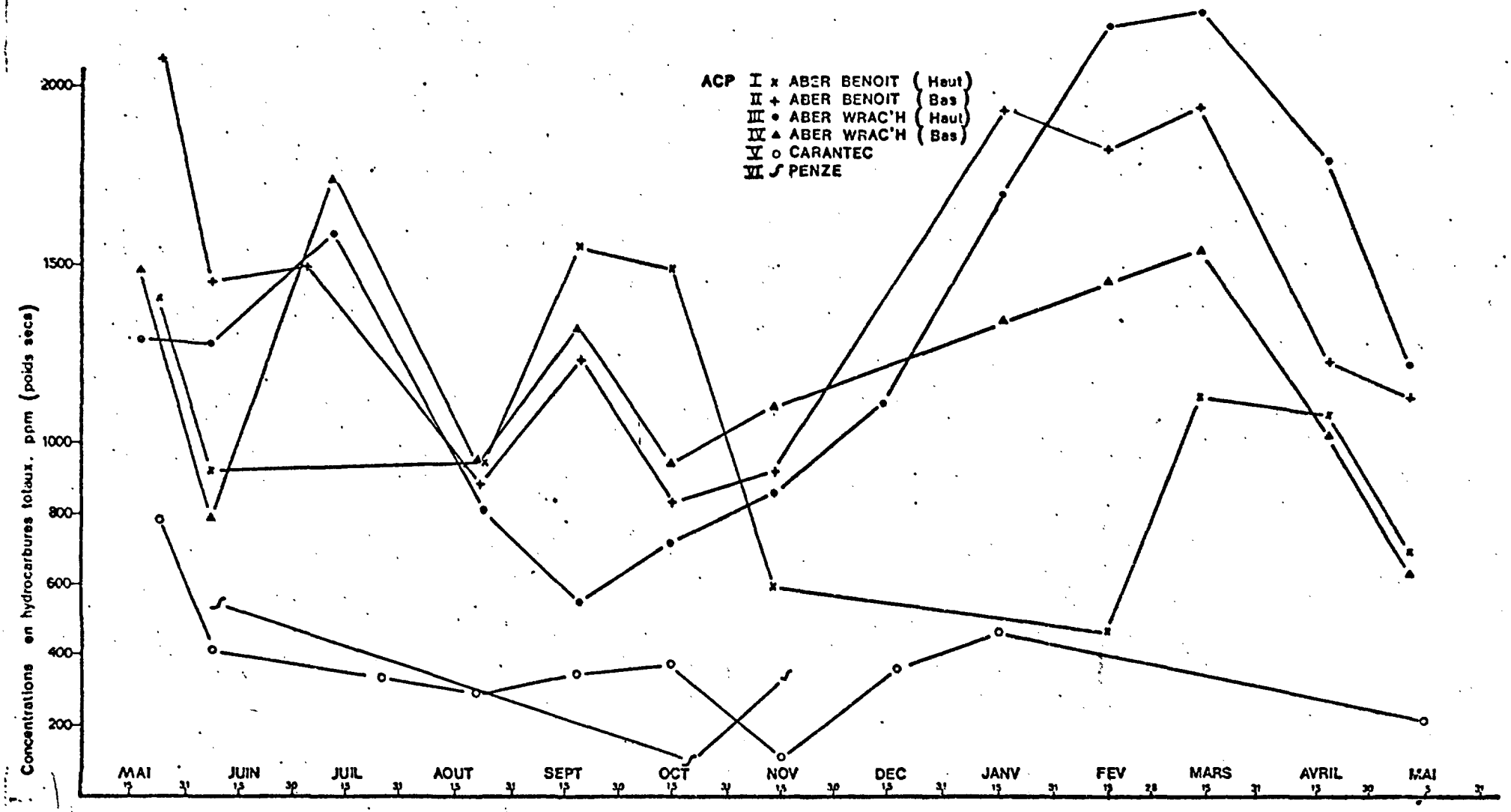


Figure 1 : Evolution des teneurs en hydrocarbures totaux dans les huîtres prélevées au cours de l'expérience ACP.

1°) ACP I : ABER-BENOIT (Haut ou Amont)

La courbe représentative des variations de la teneur en hydrocarbures totaux des huîtres traduit l'hétérogénéité des résultats. Nous passons d'une valeur de 1411 ppm en Mai 1978, à une valeur de 680 ppm en Mai 1979. Compte-tenu des fortes valeurs observées en Septembre et Octobre 1978, ainsi qu'en Mars et Avril 1979, nous ne pouvons pas conclure à une diminution du niveau de pollution des huîtres au cours de l'année écoulée.

2°) ACP II : ABER-BENOIT (Bas ou Aval)

C'est dans ce site que les valeurs observées sont en moyenne les plus fortes pour l'année écoulée (1410 ppm). En-dehors d'une légère diminution en Automne 1978, il est à remarquer une assez bonne stabilité du niveau de pollution qui fluctue autour de la valeur de 1400 ppm. Nous avons donc pour ce site une très forte accumulation d'hydrocarbures, et une absence totale de décontamination au cours du temps.

3°) ACP III : ABER-WRACH (Haut ou Amont)

Cette zone présente dans l'ensemble des teneurs équivalentes (1330 ppm) à celles observées dans le bas de l'ABER-BENOIT (ACP II). Les très fortes teneurs observées en Février et Mars 1979 nous entraînent à écarter l'éventualité d'une décontamination.

4°) ACP IV : ABER-WRACH (Bas ou Aval)

En moyenne (1193 ppm), les valeurs observées pendant l'année écoulée sont légèrement plus faibles que celles correspondant au haut de l'ABER-WRACH (1330 ppm) ou au bas de l'ABER-BENOIT (1410 ppm).

Cette moyenne est équivalente à celle du haut de l'ABER-BENOIT (1023 ppm). Ici encore, il faut conclure à une stabilité du niveau de pollution des huîtres et donc à l'absence de décontamination.

5°) ACP V : CARANTEC

Dans l'ensemble (366 ppm), les teneurs en hydrocarbures sont trois à quatre fois plus faibles que celles des huîtres des ABERS, mais elles restent toujours excessives par rapport aux 22 ppm enregistrés à AURAY. Toutefois, il faut noter que les valeurs observées pendant l'année écoulée sont toujours plus faibles que les valeurs enregistrées en Mai 1978. Il semblerait que, si une décontamination a eu lieu, celle-ci a été très rapide (Mai-Juin 1978) et par la suite le niveau de pollution s'est stabilisé autour d'une valeur moyenne de 330 ppm.

6°) ACP VI : PENZE

Nous n'avons que très peu de valeurs pour ce site ; toutefois, celles-ci sont plus faibles (325 ppm en moyenne) que celles enregistrées à CARANTEC ou dans les ABERS. Il est aussi à noter la diminution sensible du niveau de pollution entre le mois de Juin 1978 et les mois d'Octobre et Novembre de la même année. Il y aurait donc eu, ici, une légère décontamination, mais nous sommes toujours à un niveau de pollution dix fois plus élevé qu'à AURAY.

B - AMOCO CADIZ : EPURATION : ACE

Les résultats des dosages d'hydrocarbures effectués dans les huîtres mises à épurer en milieu non pollué (ACE) sont présentés dans le tableau II.

SITES	ABER-BENOIT → ROSCANVEL ACE I	ABER-WRACH → ROSCANVEL ACE II	ABER-BENOIT → RELECQ ACE III	ABER-WRACH → RELECQ ACE IV	BINIC → RELECQ ACE V
DATES	Plates	Creuses	Plates	Creuses	Plates
18.05.78	59	92			
23.05.78			954		39
07.06.78	61	83			
20.06.78			261	539	39
03.07.78		101	233	463	40
18.07.78			203	305	39
21.08.78	51				
01.09.78			116	99	27
18.09.78	48	43			
04.10.78			62	118	40
17.10.78	66	89			
03.11.78				132	

TABLEAU II : Variations des concentrations en hydrocarbures totaux présents dans les huîtres mises en épuration à ROSCANVEL et au RELECQ pendant l'année 1978. Les teneurs sont exprimées en ppm de poids secs (mg HC/Kg).

Deux lots d'huîtres provenant des ABERS ont été transplantés à ROSCANVEL 10 à 21 jours après l'échouage de l'AMOCO CADIZ. Deux autres lots ont été transférés au RELECQ le 1er Mai, c'est-à-dire 45 jours après l'échouage. Enfin, des huîtres provenant de BINIC (zone non atteinte par les nappes de pétrole) ont aussi été implantées au RELECQ afin de servir de témoin.

Pour ce qui concerne les huîtres transférées à ROSCANVEL, il n'apparaît pas de variation significative entre la teneur en hydrocarbures totaux détectée en Mai et celle détectée en Octobre. Par contre, il faut remarquer une très nette diminution du niveau de pollution moyen par rapport à celui des huîtres demeurées dans les ABERS. Ceci se remarque dès la première analyse (18 Mai 1978), donc 40 à 50 jours après le transfert en zone non polluée par l'AMOCO CADIZ. Une analyse d'huîtres témoins prélevées à ROSCANVEL au Printemps 1979 donnait comme teneur en hydrocarbures totaux : 142 ppm (poids secs).

Il semblerait donc que les teneurs résiduelles des huîtres transférées à ROSCANVEL soient dues à la pollution chronique de ce site. Il y a donc eu épuration lors du transfert de ces deux lots.

Dans le cas du transfert des huîtres des ABERS au RELECQ, il apparaît une nette diminution des teneurs en hydrocarbures au cours de l'année écoulée. En effet, au mois de Mai 1978, (le 23.05.78), la teneur en hydrocarbures totaux des huîtres plates provenant de l'ABER-BENOIT (954) est du même ordre de grandeur que celle des huîtres plates demeurées dans l'ABER-BENOIT. Par contre, en Octobre 1978, cette teneur est tombée à 62 ppm. Il y a donc eu un processus de décontamination très lent : 6 mois. Pour les huîtres creuses de l'ABER-WRACH, le phénomène de décontamination est moins évident étant donné l'absence de valeur pour le mois de Mai. Cependant, en Novembre 1978, nous avons une teneur de 132 ppm, donc bien inférieure aux teneurs enregistrées dans les huîtres demeurées dans l'ABER-WRACH.

Ici aussi, il y a une lente décontamination. Toutefois, il faut remarquer que dans aucun des deux cas d'épuration menée au RELECQ, la teneur des huîtres contaminées ne rejoint la teneur des huîtres témoins (40 ppm) en provenance de BINIC.

Si nous comparons les deux expériences d'épuration, nous constatons que les teneurs en hydrocarbures des huîtres mises en épuration à ROSCANVEL sont beaucoup plus faibles que celles des huîtres placées au RELECQ. D'autre part, il apparaît que l'épuration s'effectue beaucoup plus vite pour les huîtres placées à ROSCANVEL (40 à 50 jours) que pour celles placées au RELECQ (6 à 7 mois). Ces différentes remarques sont mises en évidence par les courbes de la figure 2.

Une deuxième expérience d'épuration (ACE bis) a été menée dans un bassin de l'ABER-BENOIT. Des huîtres plates et creuses de l'ABER ont été mises en décontamination au mois de Novembre 1978, donc huit mois après l'échouage de l'AMOCO CADIZ. Des huîtres provenant de BINIC ont aussi été soumises aux mêmes conditions d'expérience afin de servir de témoins (Tableau III).

SITES / DATES	Plates de BINIC TEMOIN ACE VI	Plates de l'ABER-BENOIT ACE VII	Creuses de l'ABER-BENOIT ACE VIII
03.11.78	46	358	612
Mise au Bassin le 06.11.78			
09.11.78	63	299	510
13.11.78	32	154	554
20.11.78		378	475
29.11.78	54	333	518
14.12.78	82	290	299
16.02.79			491
13.03.79			593
19.04.79			439

TABLEAU III : Variations dans le temps des teneurs en hydrocarbures totaux dans des huîtres mises en épuration à l'ABER-BENOIT. Les teneurs sont exprimées en ppm de poids secs.

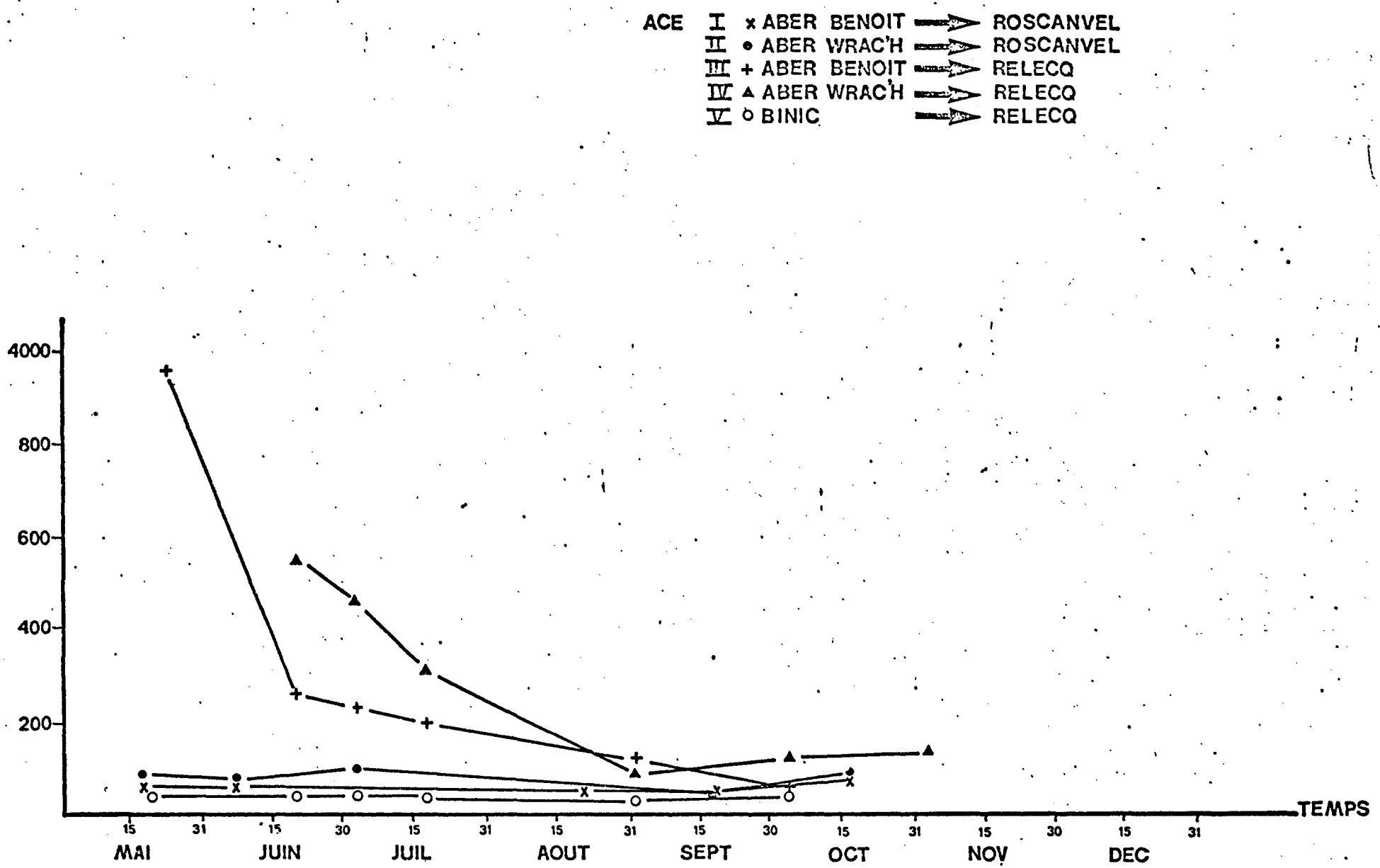


Figure 2 : Evolution des teneurs en hydrocarbures totaux dans les huîtres prélevées au cours de l'expérience ACE.

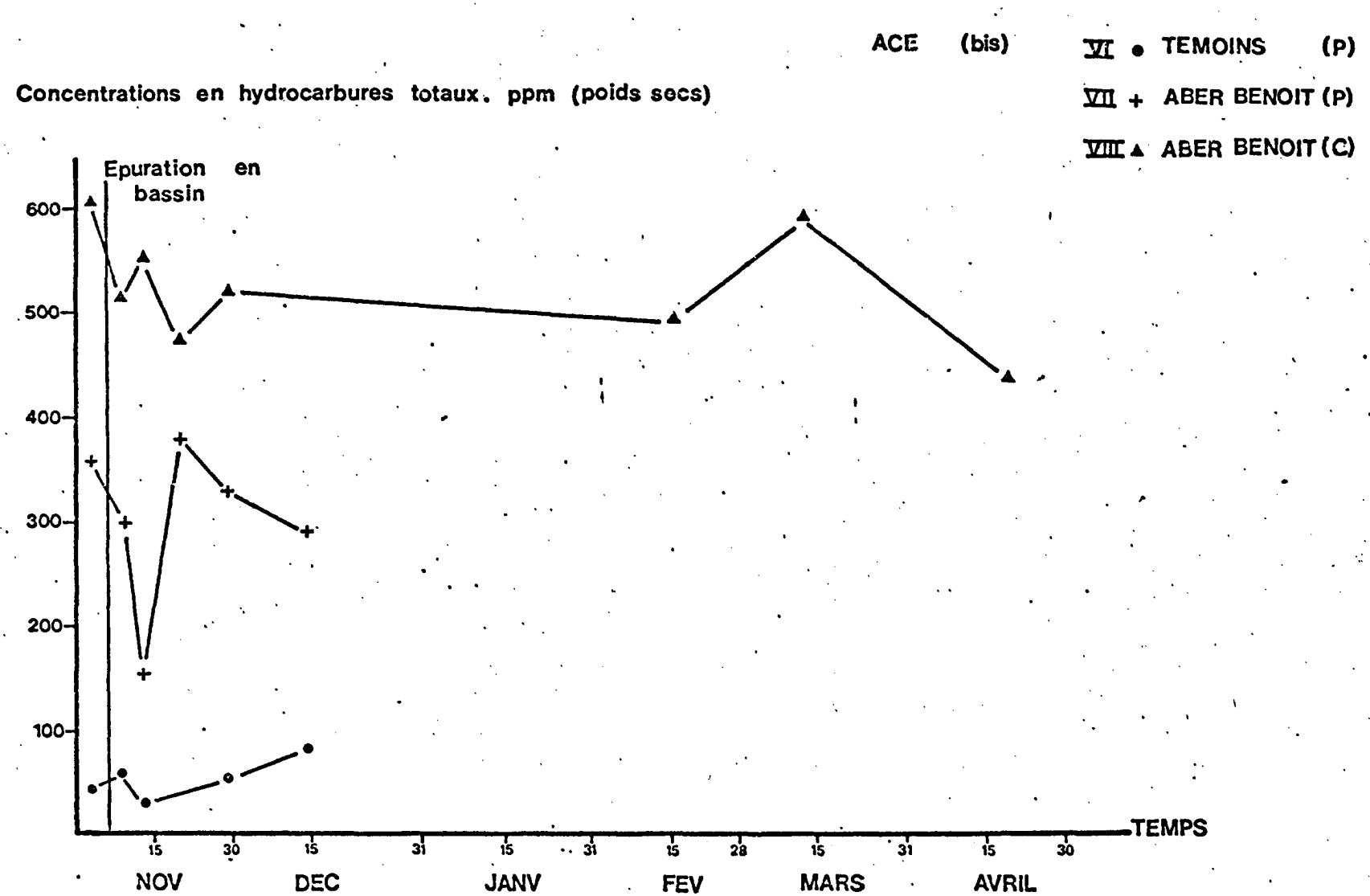


Figure 3 : Evolution des teneurs en hydrocarbures totaux dans les huîtres prélevées au cours de l'expérience ACE (bis).

Qu'il s'agisse de plates ou de creuses, les teneurs en hydrocarbures sont élevées et toujours supérieures à celles du témoin (55 ppm en moyenne). En un mois, il n'existe pas de variation significative du niveau de pollution des huîtres plates. Pour ce qui concerne les huîtres creuses, les teneurs en hydrocarbures totaux sont plus élevées dans l'ensemble que celles des huîtres plates. En six mois, une diminution du niveau de pollution des huîtres n'est pas observée. Il y a persistance du toxique dans les individus contaminés pendant plusieurs mois consécutifs (figure 3).

C - AMOCO CADIZ : ADAPTATION : ACA

Pour réaliser cette étude d'adaptation d'huîtres saines à un milieu pollué, des huîtres plates de BINIC ont été immergées dès le mois de Mai 1978 dans les ABERS, à CARANTEC et à PENZE. Les résultats des dosages effectués sont présentés dans le tableau IV.

Dans les quatre sites étudiés, les huîtres plates de BINIC, dont la teneur initiale en hydrocarbures totaux était de l'ordre de 40 ppm (P.S.), acquièrent dès les premiers prélèvements des concentrations en hydrocarbures proches de celles des huîtres d'origine. Tout au long de l'année, les teneurs en hydrocarbures sont élevées et aucune tendance particulière ne se manifeste sur les courbes (figure 4). Les ABERS apparaissent toujours comme les zones les plus contaminées. CARANTEC et PENZE, bien que plus faiblement polluées que les ABERS, présentent toujours une forte pollution par rapport aux zones telles que BINIC ou AURAY.

SITES / DATES	BINIC → ABER-BENOIT ACA I	BINIC → ABER-WRACH ACA II	BINIC → CARANTEC ACA III	BINIC → PENZE ACA IV
23.05.78	1008	258	429	
07.06.78	677	685	84	
09.06.78				335
21.06.78	1474	527		
23.06.78			170	146
06.07.78		654		
07.07.78	976			
25.07.78			226	
21.08.78			213	
22.08.78	619	755		
18.09.78		313	79	
19.09.78	393			
17.10.78	574			
18.10.78		332		
19.10.78				104
13.11.78	150	413		
17.11.78			241	212
14.12.78	985	583		
17.01.79		569		
15.02.79			210	
16.02.79		522		
13.03.79	423			

SITES / DATES	BINIC → ABER-BENOIT ACA I	BINIC → ABER-WRACH ACA II	BINIC → CARANTEC ACA III	BINIC → PENZE ACA IV
15.03.79		571	230	Plates :
16.03.79				
17.04.79			924	139
18.04.79	163			Creuses:
20.04.79		438		283
11.05.79	280			
14.05.79		395		
15.05.79			123	
MOYENNE	644	501	266	187

TABLEAU IV : Variations dans le temps des concentrations en hydrocarbures totaux des huîtres plates de BINIC, immergées dans les différents sites pollués étudiés. Les teneurs sont exprimées en ppm de poids secs.

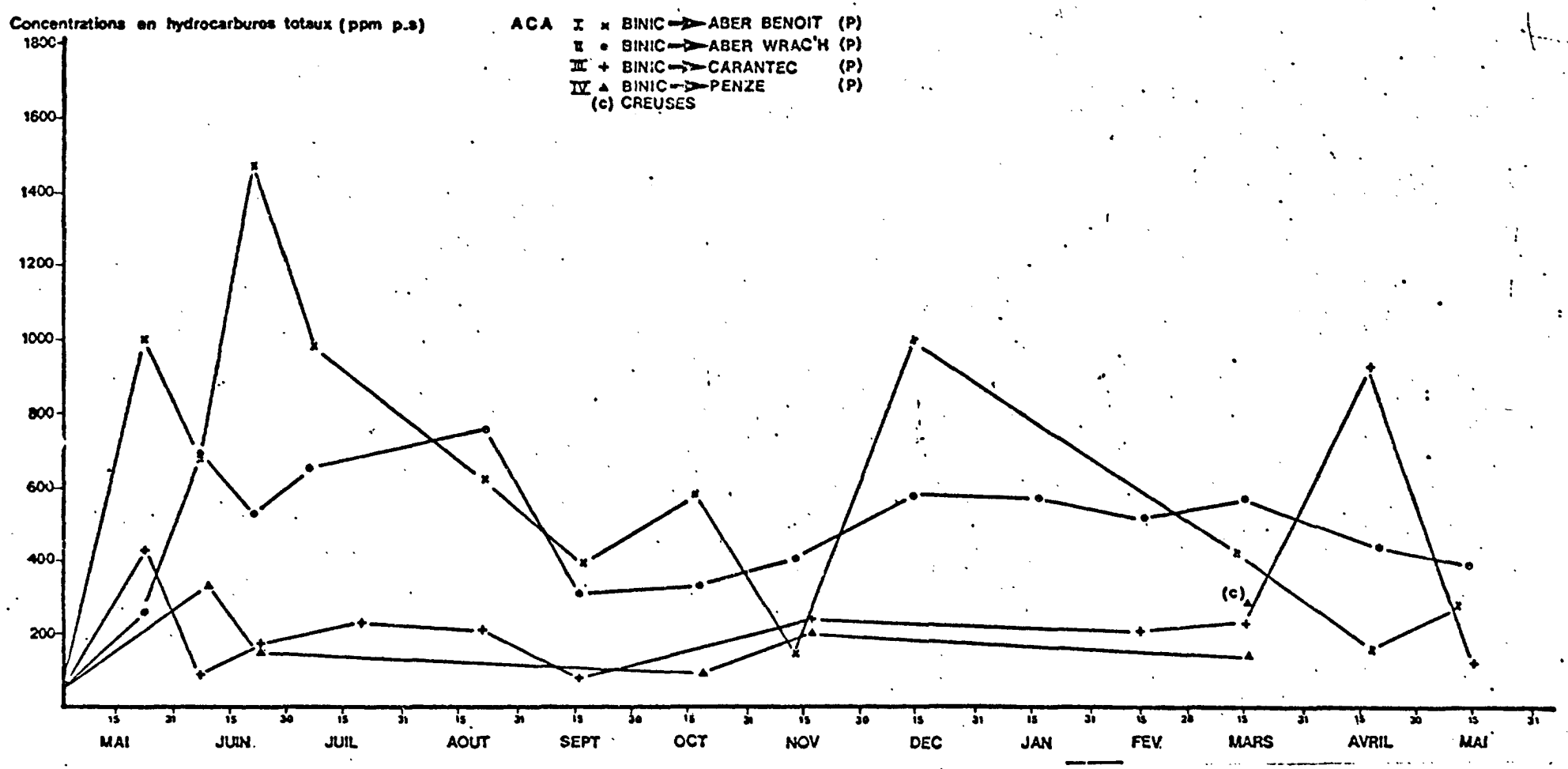


Figure 4 : Evolution des teneurs en hydrocarbures totaux dans les huîtres prélevées au cours de l'expérience ACA.

Une deuxième expérience, plus limitée dans le temps, a été menée à l'ABER-BENOIT et permet de comparer les réactions des huîtres plates à celles des huîtres creuses. Les résultats sont présentés dans le tableau V.

SITES	BINIC - Plates →	ROSCANVEL - Creuses →
DATES	ABER-BENOIT ; ACA V	ABER-BENOIT ; ACA VI
14.11.78	336	926
20.11.78	390	944
29.11.78	446	979
14.12.78	465	1312
	398	606
14.03.79		149
17.04.79		111

TABLEAU V : Variations dans le temps des teneurs en hydrocarbures totaux des huîtres de BINIC et ROSCANVEL immergées à l'ABER-BENOIT. Les teneurs sont exprimées en ppm de poids secs.

Les huîtres ayant été immergées le 6 Novembre 1978, il faut remarquer dans les deux cas une élévation des teneurs en hydrocarbures dès le 14 Novembre. Cette augmentation est beaucoup plus forte (de 140 ppm à 926 ppm) pour les huîtres creuses provenant de ROSCANVEL, que pour les huîtres plates provenant de BINIC (de 55 ppm à 336 ppm). Par contre, il semblerait qu'à partir du mois de Mars 1979 les huîtres creuses soient revenues à leur taux initial en hydrocarbures (figure 5).

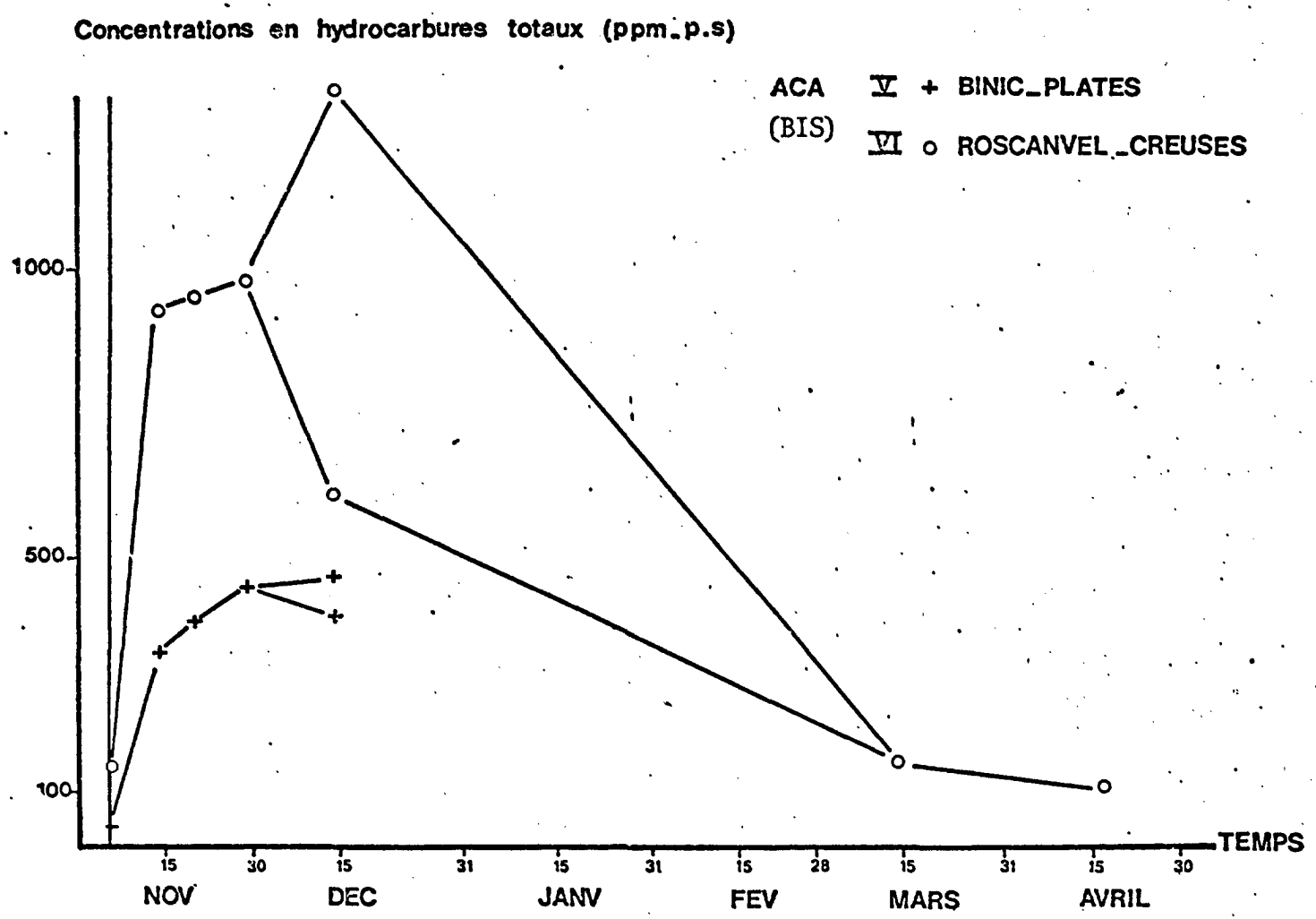


Figure 5 : Evolution des teneurs en hydrocarbures totaux dans les huîtres prélevées au cours de l'expérience ACA (bis).

III - DISCUSSION - CONCLUSION

L'étalonnage du spectrofluoromètre utilisé a été réalisé à l'aide d'une solution de résidu brut de l'AMOCO CADIZ. A l'origine, la composition de ce pétrole avoisinait 35 % d'hydrocarbures aromatiques et 65 % d'hydrocarbures aliphatiques. Lors des dosages effectués en spectrofluorométrie, les hydrocarbures aromatiques sont essentiellement pris en compte. De ce fait, la teneur en hydrocarbures totaux des échantillons analysés est extrapôlée de la teneur en hydrocarbures aromatiques effectivement déterminée, en supposant la composition du pétrole fixé par l'individu, proche de la composition de l'échantillon utilisé pour la calibration du spectrofluoromètre. Il apparaît que la composition en hydrocarbures aliphatiques et aromatiques peut fluctuer au cours du temps (voir le chapitre correspondant à l'analyse chromatographique des échantillons). De ce fait, les teneurs en hydrocarbures totaux déterminées par spectrofluorométrie peuvent être biaisées. Nous avons voulu comparer les résultats d'analyses obtenus par spectrofluorométrie à ceux obtenus par chromatographie en phase gazeuse. Nous avons donc calculé la droite de régression : $y = ax + b$; où y correspond à la concentration d'un échantillon, mesurée par chromatographie et x correspond à la teneur du même échantillon, mesurée par spectrofluorométrie.

Il existe une corrélation significative entre les mesures effectuées par les deux méthodes. La significativité du coefficient de corrélation a été établie au moyen du test + Le degré de confiance adopté étant compris entre 95 et 99 % ($0,01 < P < 0,05$) (figure 6). L'analyse spectrofluorométrique apparaît donc comme une méthode fidèle et rapide qui a permis de traiter les nombreux échantillons ($N = 150$) nécessaires à cette étude de l'évolution temporelle des teneurs en hydrocarbures totaux des huîtres polluées.

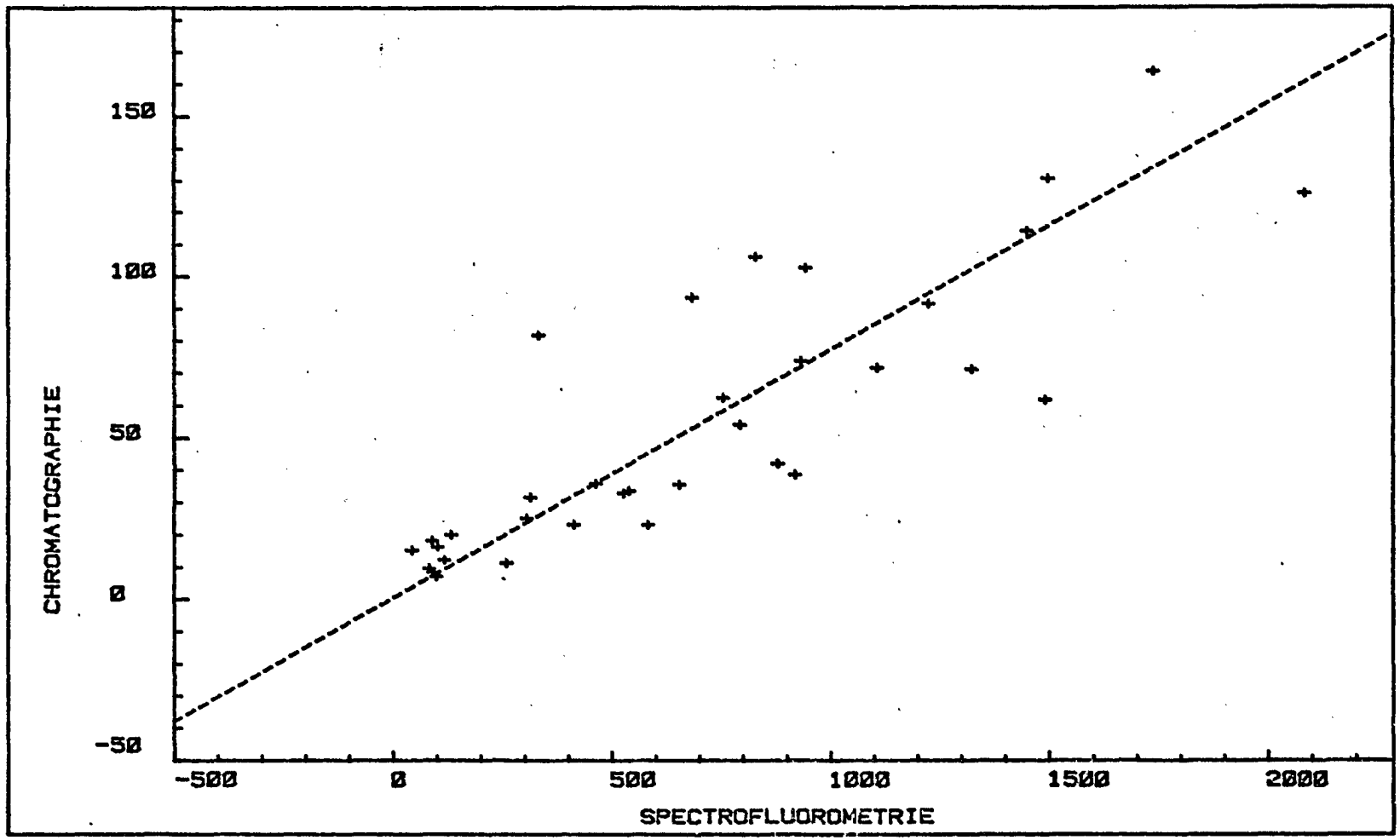


Figure 6 : Droite de régression : comparaison des taux d'hydrocarbures obtenus par spectrofluorométrie et par chromatographie

La zone des ABERS se distingue par les fortes teneurs en hydrocarbures totaux enregistrées chez les huîtres analysées. D'autre part, il est à noter l'absence de décontamination au cours de l'année écoulée. Deux hypothèses peuvent être émises pour tenter d'expliquer ce phénomène. Soit,les huîtres trop fortement atteintes sont incapables par la suite d'éliminer les hydrocarbures fixés. Soit, il existe un lent processus d'épuration mais aussi une intoxication chronique simultanée due à la persistance dans le milieu des fortes concentrations en hydrocarbures piégés. Cette seconde hypothèse semble confirmée par les analyses de sédiments des ABERS, réalisées au C.O.B. (M. MARCHAND et M.P. CAPRAIS ; sous presse).

Dans les régions de CARANTEC et PENZE, les huîtres ont été moins atteintes que dans les ABERS. Il semble même y avoir eu une légère décontamination. Cependant, les teneurs résiduelles sont toujours trop élevées par rapport à celles généralement rencontrées dans les zones non polluées.

Les expériences d'épuration d'huîtres menées à ROSCANVEL et au RELECQ mettent en évidence l'importance du temps de résidence des individus en milieu contaminé. En effet, les huîtres mises à ROSCANVEL 10 à 20 jours après l'échouage ont pu retrouver un niveau de pollution équivalent à celui dû à la pollution chronique du site, alors que les huîtres mises au RELECQ, 45 jours après l'échouage, n'ont pas pu retrouver un niveau de contamination équivalent à celui des témoins. Cette remarque peut être renouvelée pour ce qui concerne la deuxième expérience d'épuration (ACE bis). Les huîtres mises à épurer huit mois après l'échouage conservent des teneurs en hydrocarbures très élevées.

Les résultats de l'expérience d'adaptation mettent en évidence la rapidité avec laquelle des huîtres saines ont été

polluées lors de leur immersion dans les zones contaminées. En un mois, ces huîtres atteignent un niveau de contamination équivalent à celui des huîtres présentes dans le milieu au moment de l'échouage. En outre, la deuxième expérience d'adaptation (ACA bis) souligne la plus grande capacité de concentration du toxique des huîtres creuses. Cette capacité de concentration plus forte est peut être à relier au plus fort rapport gonado-somatique des huîtres creuses comparativement à celui des huîtres plates. Le développement plus important des gonades entraîne une plus grande richesse lipidique des tissus. Or, les hydrocarbures ont une grande affinité pour les tissus graisseux où ils se stockent préférentiellement.

Les analyses effectuées au cours de cette année nous permettent de conclure à une persistance des hydrocarbures dans les tissus des animaux présents au moment de l'échouage de l'AMOCO CADIZ. La présence d'hydrocarbures piégés dans les sédiments des ABERS font de ces zones des sources de pollution chronique. D'autre part, les expériences complémentaires qui ont été menées (ACE et ACA) mettent en évidence la difficulté des huîtres à éliminer les hydrocarbures fixés, et soulignent la toxicité résiduelle du milieu. La discussion des niveaux de pollution rencontrés dans les échantillons pourra être menée à partir du document fourni en annexe.

F R A C T I O N N E M E N T D E S
H Y D R O C A R B U R E S

Laboratoire de Biochimie
U.E.R. de Médecine - BREST

I - MATERIEL ET METHODES

A - MATERIEL

1°) Solvants

Tous les solvants utilisés (Pentane, Hexane, Dichlorométhane, Acétone) sont de haute pureté, pour analyse de résidus (S.D.S., qualité pestipur). Leur qualité est testée régulièrement en chromatographie en phase gazeuse.

2°) Verrerie

Toute la verrerie Pyrex est lavée successivement par un détergent type R.B.S.-25 puis par le mélange sulfo-chromique, rincée à l'eau bidistillée et à l'acétone .

Les colonnes pour chromatographie liquide ont une longueur de 21 cm et un diamètre intérieur de 1,1 cm et sont munies

d'un réservoir de 40 ml. Les supports sont retenus à l'aide d'un tampon de laine de verre traitée.

3°) Réactifs

1 - Gel de silice : le gel de silice est du type 60 (70-230 mesh), produit MERCK (DARMSTADT, R.F.A.). Il est purifié une nuit à 250° C.

2 - Florisil : cet adsorbant (100-200 mesh), produit TOUZART et MATIGNON (FRANCE), est purifié à 600° C pendant 12 heures.

3 - Produits radioactifs :

- n (10 (16)-^{14}C)-entacosane (AMERSHAM, G.B.), d'activité spécifique égale à 305,25 MBq/mmole

- n (12-^{14}C) benz (a) anthracène (AMERSHAM, G.B.), d'activité spécifique égale à 1813 MBq/mmole

La pureté radiochimique de ces deux composés a été vérifiée dans différents systèmes chromatographiques.

Des solutions standards de ces deux composés sont préparées dans l'hexane à la concentration de 18,3 Bq/ml. Leur stabilité est contrôlée régulièrement.

4 - Hydrocarbures standards

Les hydrocarbures standards sont d'origine commerciale diverse : Fluka (BUCHS, SUISSE) et E.G.A. Chemie (ALBUCH, R.F.A.) ; leur pureté est garantie. Ils sont utilisés en solution dans l'hexane à des concentrations de l'ordre de 10 à 20 µg/ml.

4°) Chromatographie en phase gazeuse - haute performance (C.P.G. - H.P.)

Le chromatographe utilisé est du type CARLO-ERBA (MILAN, ITALIE), modèle 2150-AC, équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'un injecteur "splitless" type GROB muni d'un "insert" en verre. La sensibilité de détection standard est de $3,2.10^{-11}$A pour une déviation pleine échelle de l'enregistreur 1 mV.

L'appareil est équipé d'une colonne capillaire de verre de 54 m x 0,3 mm, imprégné d'un film d'OV-1 d'épaisseur égale à 0,15 µm. Le nombre de séparation calculé selon le principe du test de GROB est égal à 50 pour les esters méthyliques des acides gras en C_{11} et C_{12}.

L'efficacité de la colonne est de 190 000 plateaux théoriques, calculée sur le n-octacosane (facteur de capacité égal à 4,4), ce qui donne un pourcentage d'efficacité de 92 %.

La colonne capillaire a été préparée selon la méthode de GROB, modifiée au Laboratoire. En résumé, après un dépôt de cristaux de carbonate de baryum, le verre est désactivé par du polyéthylène glycol type Carbowax 1000 et 20 M. L'imprégnation est réalisée par la méthode statique.

Les conditions opératoires sont les suivantes :

- injecteur : température 250° C
  débit septum : 20 ml/mn
- colonne : pression gaz vecteur hydrogène ultra-pur, 1,4 bar
  débit : 2 ml/mn
- four : température d'injection : 44° C.

B - METHODES

1°) Préparation des extraits biologiques

1 - Lyophilisation, Extraction

Cette première étape est effectuée au Centre Océanologique de BREST, préalablement à la quantification des hydrocarbures par fluorescence.

Les huîtres sont écoquillées, broyées, lyophilisées, extraites par un mélange acétone-pentane (1:4, v/v) selon la méthode de MICHEL (I.S.T.P.M.)

2 - Etalons internes de récupération

Le résidu d'extraction est porté à sec à 30° C sous azote, puis repris par 2 x 1 ml d'hexane contenant les produits radioactifs à rôle d'étalon interne. Après agitation au "Vortex", cet extrait est délipidé.

3 - Délipidation

Les lipides contenus dans les extraits biologiques sont éliminés par chromatographie sur colonne de Florisil. L'adsorbant, après activation à 150° C pendant une nuit, est porté à un degré d'activité standard par addition de 5 % (p/v) d'eau. 10 g de Florisil sont versés dans la colonne remplie de pentane.

Après équilibration de la colonne, et dépôt de l'extrait biologique, les hydrocarbures sont élués par 60 ml de pentane. L'éluat est porté à sec dans un évaporateur rotatif à 30° C.

4 - Séparation des hydrocarbures aliphatiques et aromatiques par chromatographie sur gel de silice.

Le gel de silice, avant utilisation, est activé une nuit à 150° C. Un volume de 15 ml de silice ainsi préparé est mélangé avec 25 ml de dichlorométhane.

Le gel ainsi obtenu est soigneusement dégazé par agitation puis versé dans la colonne remplie de dichlorométhane. Après décantation du gel, la colonne est soigneusement rincée par 25 ml de dichlorométhane. A la surface du gel de silice sont introduits 6 g de sulfate de sodium anhydre dont le rôle est d'éliminer l'eau résiduelle des extraits et de conserver un degré d'activité donné. Le résidu d'évaporation de l'étape précédente est repris par 1 ml d'hexane, déposé à la surface du sulfate. Le tube est soigneusement rincé par 2 x 0,5 ml d'hexane qui sont ajoutés à l'extrait déposé.

La fraction aliphatique est éluée par 15 ml d'hexane puis par 5 ml d'un mélange dichlorométhane-hexane (1:4, v/v). La fraction aromatique est éluée par 25 ml d'un mélange dichlorométhane-hexane (2:3, v/v). Les deux fractions obtenues sont évaporées à sec sous vide, à 30° C, reprises par de l'hexane, transférées en tubes bouchés à vis et portées à sec à 30° C, sous un courant d'azote. Pour chacune de ces deux étapes de purification, un témoin est fait, constituant le blanc de la méthode.

2°) Quantification par C.P.G.

1 - Analyse par C.P.G.

Les extraits secs obtenus sont repris par de l'hexane contenant, pour la fraction aliphatique, du pyrène (12,3 ng/µl) et, pour la fraction aromatique, du n-tétracosane (12,07 ng/µl). Ces deux composés jouent le rôle d'étalon interne secondaire lors de la

C.P.G. 2 µl des extraits dissous dans l'hexane (le volume est variable suivant la concentration en hydrocarbures attendue, de 0,1 à 3 ml) sont injectés suivant la technique de l'injection "splitless". Dès l'apparition du pic d'hexane, la température de la colonne est portée à 115° C puis à 290° C à raison de 4° C/minute.

2 - Quantification

Pour permettre à la fois l'identification et la quantification, deux gammes étalons sont préparées :

- gamme d'aliphatiques, du pentadécane au dotriacontane (10 à 12 ng/µl), additionnée de pyrène ;

- gamme d'aromatiques, constituée par un mélange de 12 hydrocarbures à des concentrations de 10 à 20 ng/µl, additionnée de tétracosane.

L'étalonnage a pour but de mesurer le facteur de proportionnalité de la réponse des aliphatiques par rapport au pyrène d'une part, et des aromatiques par rapport au tétracosane d'autre part.

Il faut noter ici que, pour quelques extraits biologiques, deux étalons internes primaires deutériés ont été utilisés : le n-tétracosane d-50 et le pyrène d-10. Ces produits jouent à la fois le rôle d'étalon interne secondaire et de récupération.

La quantification est réalisée à l'aide de la formule suivante, basée sur l'utilisation d'étalons internes secondaire et primaire :

$$(X)_n = k_n \frac{h_n}{h_{EI}} \times (EI) \times \frac{1}{R} \times \frac{1}{P}$$

Légende de la formule précédemment citée :

$(X)_n$: quantité d'hydrocarbure n présent dans l'échantillon

k_n : facteur de proportionnalité tenant compte de la réponse individuelle de chaque hydrocarbure n en C.P.G. - ionisation de flamme

hn, h_{EI} : hauteur des pics chromatographiques de l'hydrocarbure n et de l'étalon interne secondaire (pyrène ou tétracosane)

(EI) : quantité d'étalon interne ajouté à l'échantillon avant la C.P.G.

R : facteur de récupération de l'étalon interne radioactif (mesuré par scintillation liquide)

P : poids sec de l'échantillon

Les résultats sont exprimés en ppm (poids sec).

3 - Identification

L'identification a été réalisée uniquement sur quelques échantillons par le procédé de surcharge des échantillons biologiques par des produits standards et par détermination des temps de rétention.

II - RESULTATS

A - HUITRES TEMOINS

Des huîtres plates de BINIC sont utilisées comme témoins. Un lot a été immergé au RELECQ-KERHUON (Rade de BREST) et prélevé après un court séjour le 23 Mai 1978 (ACE V 1). Un autre lot a été prélevé en Novembre à BINIC et directement analysé (ACE VI 1).

Les teneurs en hydrocarbures totaux sont présentées sur le tableau I. Elles se situent entre 4,7 et 10,2 ppm. Le pourcentage en aromatiques est très faible (6 %) pour le lot provenant directement de BINIC. Par contre, on peut penser que le taux élevé d'aromatiques (3 ppm, représentant 64 % des hydrocarbures totaux) pour le lot ayant séjourné dans la Rade de BREST est dû à une pollution chronique (proximité du port de BREST). En conséquence, seront considérées comme non polluées des huîtres dont le taux d'aromatiques sera faible, de l'ordre de 1 à 2 ppm.

De plus, les taux d'hydrocarbures aliphatiques sont nettement différents entre les deux lots d'huîtres. Ceci est probablement dû aux variations saisonnières du métabolisme de l'huître.

	Hydrocarbures aliphatiques	Hydrocarbures aromatiques	Hydrocarbures totaux	% d'aromatiques	Indice de préférence
ACE V 1 23.05.78	1,7	3,0	4,7	64	1,18
ACE VI 1 03.11.78	9,6	0,6	10,2	6	1,30

TABLEAU I : Teneurs en hydrocarbures, exprimées en ppm/poids sec.

B - SEJOUR EN ZONES CONTAMINEES (POLLUTION - ACP)

Sur les deux sites étudiés (ABER-BENOIT : LE CARO (II) ; ABER-WRACH : ILE D'HER (IV)), la décontamination a lieu mais faiblement (tableau II). Elle débute dès le mois de Mai, mais de façon

PRELEVEMENT	DATE	HYDROCARBURES ALIPHATIQUES	HYDROCARBURES AROMATIQUES	HYDROCARBURES TOTAUX	% D'AROMATIQUES	INDICE DE PREFERENCE
II 1	24 Mai	18,9	107	125,9	85	0,86
II 2	7 Juin	13,4	100,7	114,1	88	0,98
II 3	4 Juillet	14,7	47,2	61,9	76	1,11
II 4	21 Août	5,5	36,5	42,0	87	0,73
II 5	19 Septembre	11	80,5	91,5	88	1,10
II 6	17 Octobre	6,5	99,7	106,2	94	1,19
II 7	13 Novembre	9,2	29,4	38,6	76	1,23
IV 1	18 Mai	91,6	39	130,6	30	1,18
IV 2	7 Juin	8,7	45,5	54,2	83,6	1,12
IV 3	4 Juillet	13,2	150,6	163,8	92	0,87
IV 4	21 Août	4,9	69	73,9	93	0,98
IV 5	19 Septembre	22	71,2	93,2	76,5	1,26
IV 6	17 Octobre	7,9	94,9	102,8	92	1,02
IV 7	13 Novembre	16	55,6	71,6	77,6	1,29

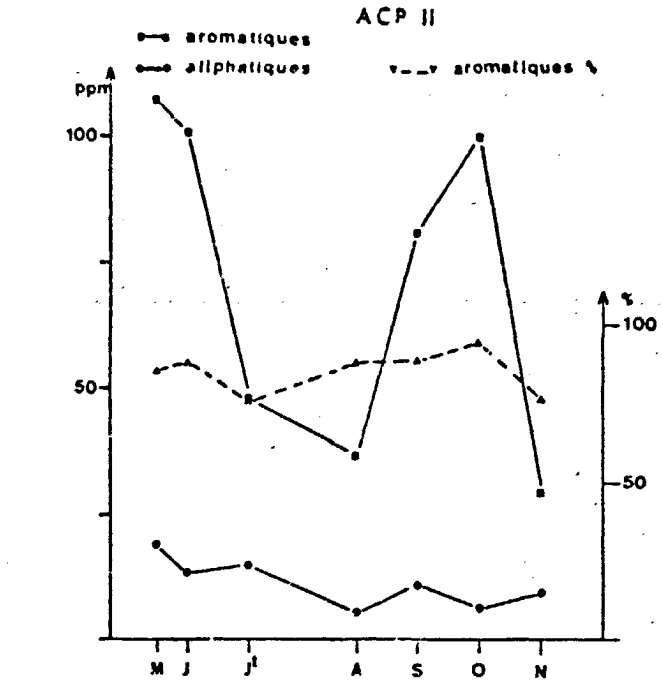
TABLEAU II : Teneurs en hydrocarbures (ppm/poids sec) d'huîtres creuses prélevées dans l'ABER-BENOIT (II) et l'ABER-WRACH (IV)

irrégulière (série II, remontées en Septembre-Octobre, série IV en Juillet). Ceci est probablement dû à la remise en suspension d'hydrocarbures piégés dans les sédiments.

La décontamination au niveau des hydrocarbures aliphatiques, peu toxiques, est rapide, particulièrement dans la série IV où, en trois semaines, les taux chutent de 91,6 à 8,7 ppm (figures 1A et 1B). L'évolution de l'indice de préférence (rapport des hydrocarbures à nombre impair de carbone sur ceux à nombre pair de carbone) dénote une modification dans la composition des hydrocarbures dans l'huître. Cet indice, égal à 1 pour les hydrocarbures fossiles, devient supérieur à l'unité dès que les hydrocarbures biogéniques l'emportent. Ceci est le cas en Novembre, l'indice de préférence est alors de 1,23 et 1,29.

Les taux de phytane et de pristane (figures 2A et 2B) subissent une augmentation notable en Juin et Juillet. Ceci est sans doute dû à des modifications de paramètres biologiques de l'huître, notamment de l'activité métabolique, et du milieu environnant.

La comparaison des fractions aliphatiques du pétrole déversé (prélèvement du 17 Mars 1978) et de l'extrait d'huîtres creuses de l'ABER-WRACH prélevé le 7 Juin 1978 montre une modification notable de la composition en hydrocarbures. Ainsi, les hydrocarbures légers, essentiellement des n-paraffines, isoalcanes et cycloalcanes de volatilité inférieure à celle de l'hexadécane (température d'ébullition : 287° C) n'apparaissent pas sur le chromatogramme de l'extrait d'huîtres (figure 3B). Ceci est sans doute dû à la volatilisation préférentielle de ces composés dès les premiers jours de la catastrophe. Par ailleurs, une rétention préférentielle par l'huître des hydrocarbures ramifiés est observée. Ceci est très caractéristique pour le pristane (2, 6, 10, 14 - tétraméthylpentane) et le phytane (2, 6, 10, 14 -tétraméthylhexadécane).



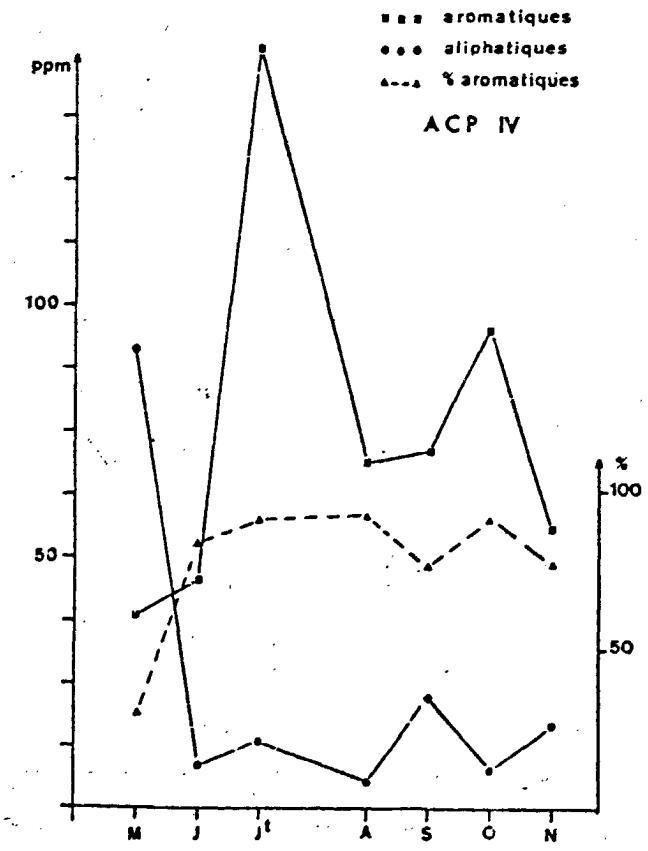
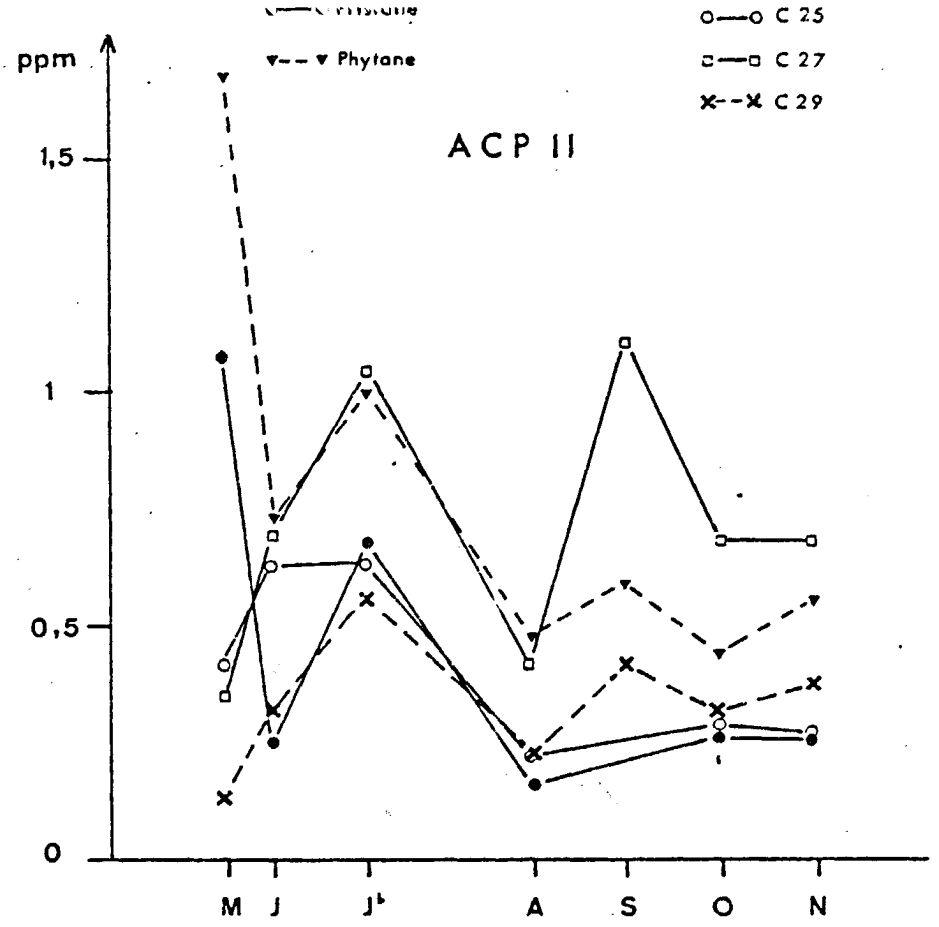


Figure 1 : Evolution des teneurs en hydrocarbures aromatiques et aliphatiques du pourcentage de composés aromatiques dans les huîtres maintenues sur les sites pollués de l'Aber-Benoît ACP II (A) et de l'Aber-Wrach ACP IV (B).



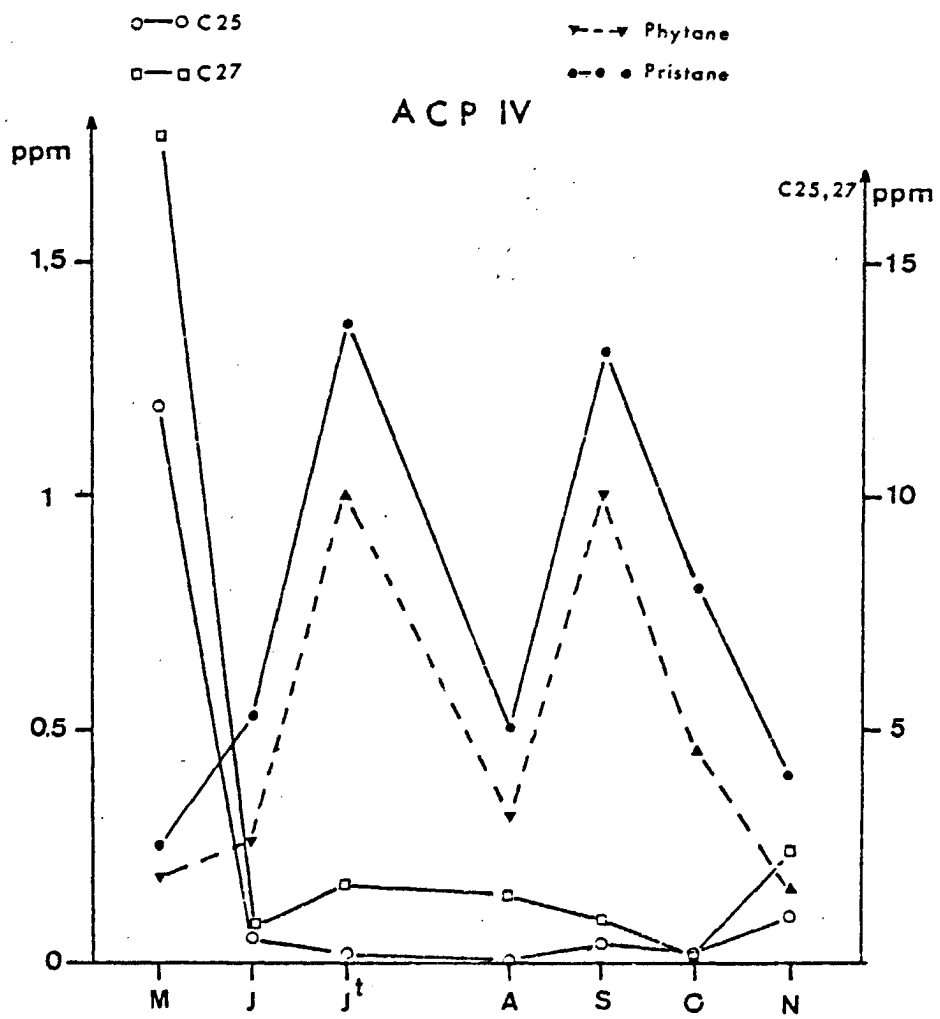


Figure 2 : Evolution des teneurs en pristane phytane, pentacosane, heptacosane et nonacosane dans les huitres maintenues sur les sites pollués de l'Aber-Benoît ACP II (A), et de l'Aber-Wrach ACP IV (B)

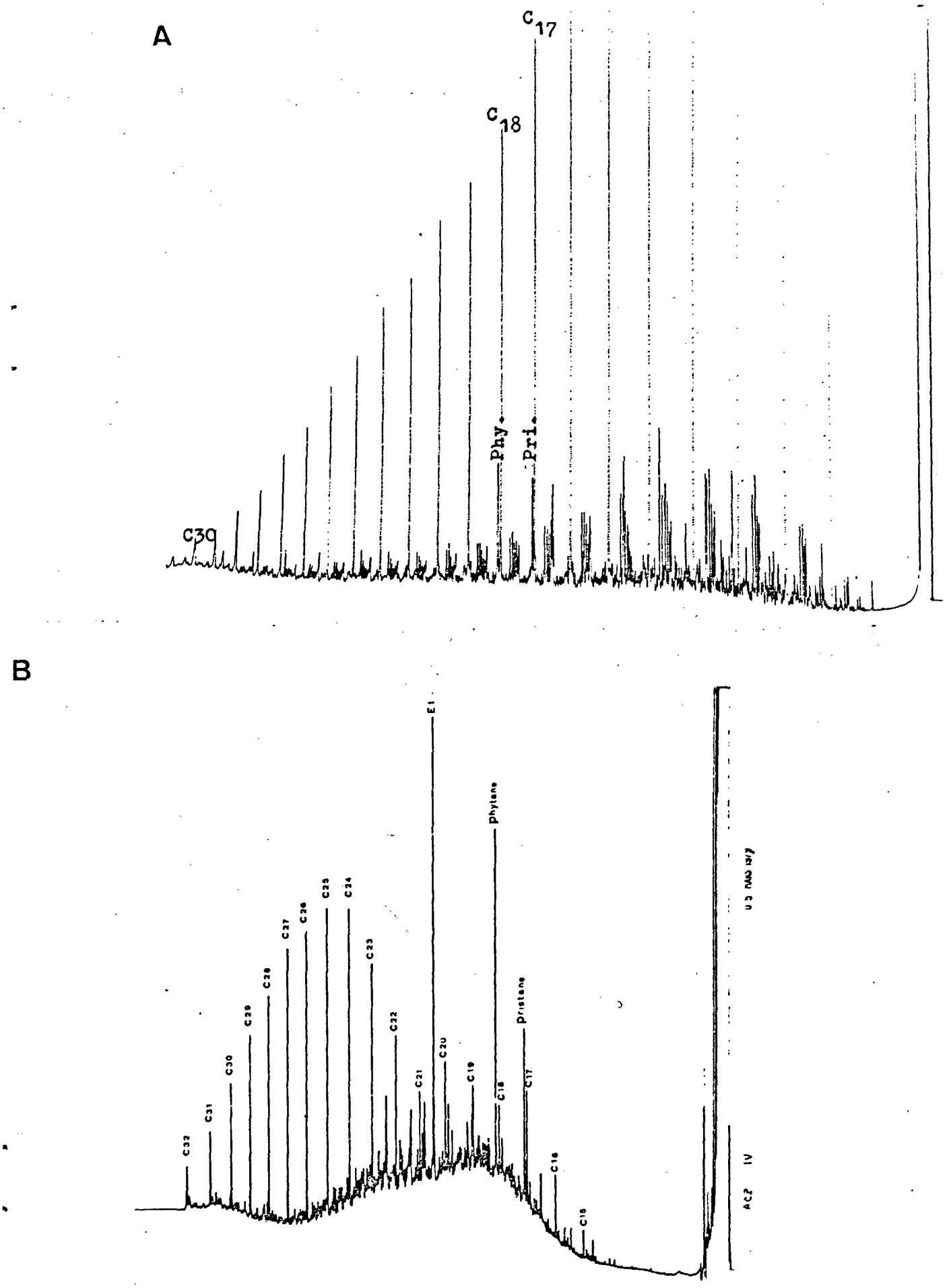


Figure 3 : Chromatogrammes en phase gazeuse haute résolution des fractions aliphatiques du pétrole de l'AMOCO-CADIZ (prélèvement du 17 mars 1978 à Portsall) (A) et d'un extrait d'huîtres prélevées le 18 mai à l'Aber-Wrach (B).

Le rapport heptadécane/pristane est égal à 0,65 pour les huîtres ACP IV 2 alors que ce rapport était de 5,42 dans le pétrole déversé. De même, le rapport octadécane/phytane qui était de 3,94 dans le pétrole n'est plus que de 0,18 dans ces mêmes huîtres. Par ailleurs, l'heptacosane est le n-alcane le plus abondant dans les huîtres ACP IV 2 (figure 2B) alors que dans le pétrole il s'agit des tri et tétradécane (figure 3A). Cette constatation est confirmée dans la série ACP II.

De même, la comparaison des fractions aromatiques du pétrole déversé et des huîtres ACP IV 2 montre le même phénomène de sélectivité de rétention. Ainsi, la fraction pétrolière obtenue par séparation et concentration, ces méthodes ayant éliminé les alkybenzènes, apparaît très riche en dérivés alkylés du naphtalène : monométhyl (pics 10 et 11), diméthyl (pics 15 à 20), triméthyl (pics 21, 23 à 31), tétraméthyl (pics 32 à 39) (figure 4B). Par contre, ces dérivés n'apparaissent pas dans l'extrait biologique (figure 4A). De plus, la fraction polyaromatique soufrée, type dibenzothiophène (pic 43) et dérivés alkylés : monométhyl (pics 50, 51), diméthyl (pics 57, 59, 60, 64), triméthyl (pics 65, 67, 70) apparaît préférentiellement retenue par l'huître (figure 4A). De plus, les dérivés diméthylés (pics 57, 59, 60, 64) et triméthylés (pics 67, 70, 75) du dibenzothiophène semblent les plus retenus dans les tissus de l'huître.

Par ailleurs, il faut noter que les hydrocarbures aromatiques représentent à eux seuls de 73 à 94 % des hydrocarbures totaux (figures 1A et 1B). Il apparaît donc clairement que cette accumulation est un phénomène important qui se traduit par une augmentation de l'aromaticité de la fraction hydrocarbonée. Ainsi, le lot d'huîtres ACP IV 1, prélevées en Mai 1978, contient de toute évidence le pétrole brut c'est-à-dire une fraction aromatique relativement peu importante : 30 % des hydrocarbures totaux. Ces huîtres

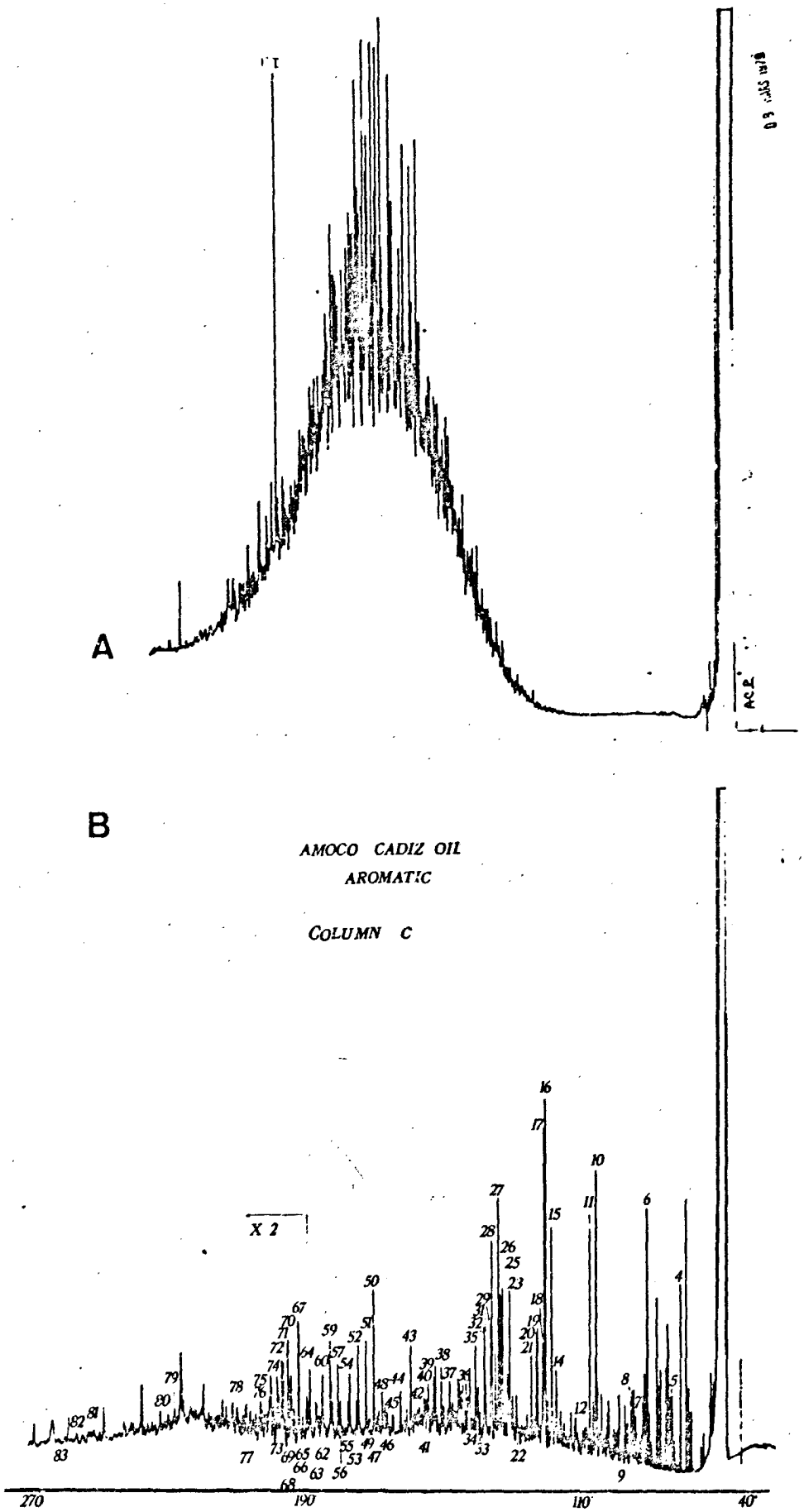


Figure 4 : Comparaison des chromatogrammes en phase gazeuse haute résolution des fractions aromatiques d'un extrait d'huîtres prélevées à l'Aber-Wrach le 7 juin ACP IV 2 (A) et du pétrole de l'AMOCO-CADIZ prélevé le 17 mars à Portsall.(B). (Pour la numérotation des pics, voir le texte)

voient leur taux d'aromatiques augmenter légèrement en trois semaines, tandis que le taux d'aliphatiques diminue d'environ dix fois. Ceci se traduit donc par une augmentation du degré d'aromaticité des hydrocarbures totaux.

C - EPURATION APRES TRANSFERT EN ZONES SALUBRES (ACE)

Des huîtres creuses ont été transférées de l'ABER-WRACH à ROSCANVEL (ACE II) et au RELECQ-KERHUON (ACE IV) respectivement 15 et 35 jours environ après la catastrophe. Leur épuration en zones salubres a été suivie jusqu'en Novembre (tableau III).

L'épuration, exprimée en hydrocarbures totaux, est effective et rapide ; seul 6,8 % du taux initial subsiste après quelques jours d'épuration (ACE II). Toutefois, il faut noter que cette épuration est bien moins rapide pour la série ACE IV dont le séjour en zone polluée a été prolongé de 20 jours. En effet, après 45 jours d'épuration, il subsiste encore 25 % du taux initial d'hydrocarbures totaux. Par comparaison, des huîtres maintenues dans l'ABER-WRACH voient leur taux d'hydrocarbures totaux diminuer de 58,5 % en l'espace de 40 jours.

Dans les deux lots d'huîtres étudiés, tous deux transférés dans la Rade de BREST, la décontamination, rapide pour le lot ACE II, lente pour le lot ACE IV, semble ne plus avoir lieu à partir de Septembre. Au contraire, les taux d'hydrocarbures totaux, après être descendus à des valeurs situées entre 7 et 10 ppm, remontent en Octobre-Novembre à 18-21 ppm. Il subsiste de façon évidente un résidu de pollution, en effet ces taux sont deux fois plus élevés que ceux des huîtres témoins (tableau I).

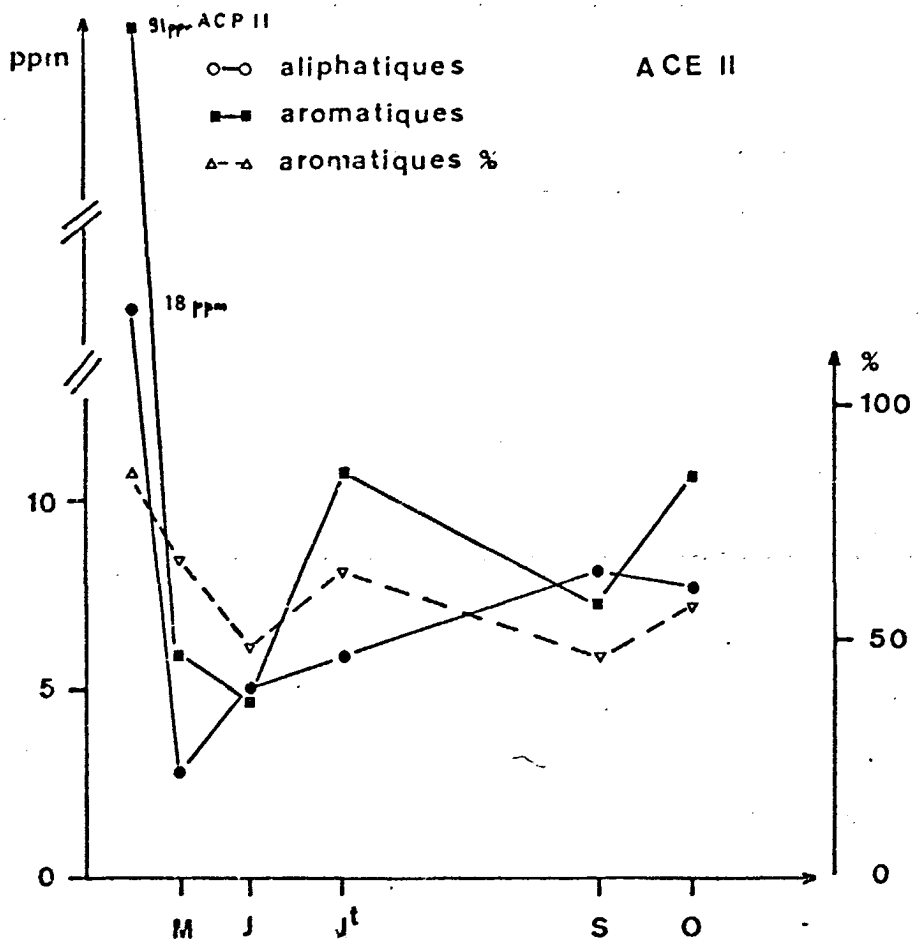
PRELEVEMENT	DATE	HYDROCARBURES ALIPHATIQUES	HYDROCARBURES AROMATIQUES	HYDROCARBURES TOTAUX	% D'AROMATIQUES	INDICE DE PREFERENCE
ACP II 1	28 Mai	18,9	107	125,9	85	0,86
ACE II 1	18 Mai	2,8	5,8	8,6	67	1,08
ACE II 2	7 Juin	5,0	4,7	9,7	49	1,15
ACE II 3	4 Juillet	5,7	10,6	16,3	65	1,07
ACE II 5	18 Septembre	8,1	7,2	15,3	47	1,24
ACE II 6	1e Octobre	7,7	10,5	18,2	57,5	1,13
ACP IV 1	18 Mai	91,6	39	130,6	30	1,18
ACE IV 6	20 Juin	4,3	25,2	29,5	85	1,21
ACE IV 7	3 Juillet	9,6	26,2	35,8	73	1,53
ACE IV 8	18 Juillet	7,6	19,9	27,5	73	1,27
ACE IV 10	1e Septembre	4,1	5,1	9,2	55	1,22
ACE IV 11	4 Octobre	6,7	9,0	15,7	57	1,45
ACE IV 12	3 Novembre	14,7	6,3	21,0	30	1,31

TABLEAU III : Teneurs exprimées en ppm (poids sec) d'hydrocarbures d'huîtres creuses transférées de l'ABER-WRACH à ROSCANVEL le 1er Avril (ACE II) ou de l'ABER-WRACH au RELECQ-KERHUON le 20 Avril (ACE IV)

Les figures 5A et 5B montrent l'évolution respective des teneurs en hydrocarbures aliphatiques et aromatiques des lots ACE II et ACE IV. Si l'épuration du lot ACE II est rapide pour ces deux fractions d'hydrocarbures, il n'en est pas de même pour le lot ACE IV. En effet, il faut environ deux mois pour que ce lot voit le taux d'hydrocarbures aromatiques chuter de 39 à 20 ppm alors qu'en l'espace de quelques jours ce taux chutait de 107 à 6 ppm pour le lot ACE II. Cette différence dans le temps de demi-vie d'élimination de la fraction aromatique globale est sans doute en relation avec la durée du séjour sur des zones polluées avant transfert. Une telle différence n'apparaît pas pour les fractions aliphatiques qui voient leur taux chuter en moins d'un mois de 19 à 3 ppm (lot ACE II) et de 92 à 4 ppm (lot ACE IV).

Les teneurs des fractions aliphatiques, après avoir subi une diminution rapide et brutale, augmentent régulièrement à partir de Septembre, confirmant la teneur élevée du lot témoin ACE VI prélevé en Novembre. Cette variation est sans doute due aux hydrocarbures biogéniques et trouve donc son origine dans le métabolisme même de l'huître. Ceci est confirmé par les variations de l'indice de préférence qui évolue vers une prédominance des hydrocarbures à nombre impair de carbone sur ceux à nombre pair de carbone (tableau III).

Le n-alcane majoritaire est, dans tous les cas, l'heptacosane, représentant à lui seul 12,1 % (± 3,1 %) et 13, 1 % (± 1,8 %) de la totalité des hydrocarbures aliphatiques respectivement dans les lots ACE II et ACE IV (figures 6A et 6B). Le n-alcane majoritaire dans l'eau de mer qui est le nonacosane (P.GENTIEN, Thèse de 3è Cycle, U.B.O.) ne constitue à lui seul que 4,4 % (± 1,8 %) et 6,4 % (± 2,3 %) de la totalité des hydrocarbures aliphatiques pour les lots ACE II et IV respectivement.



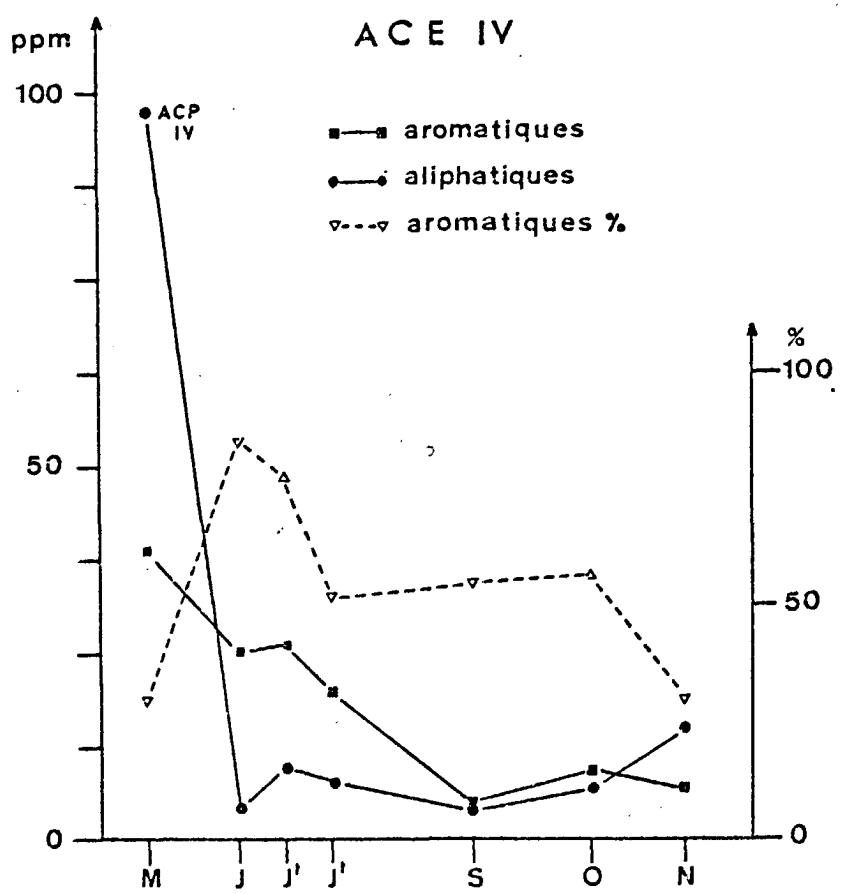
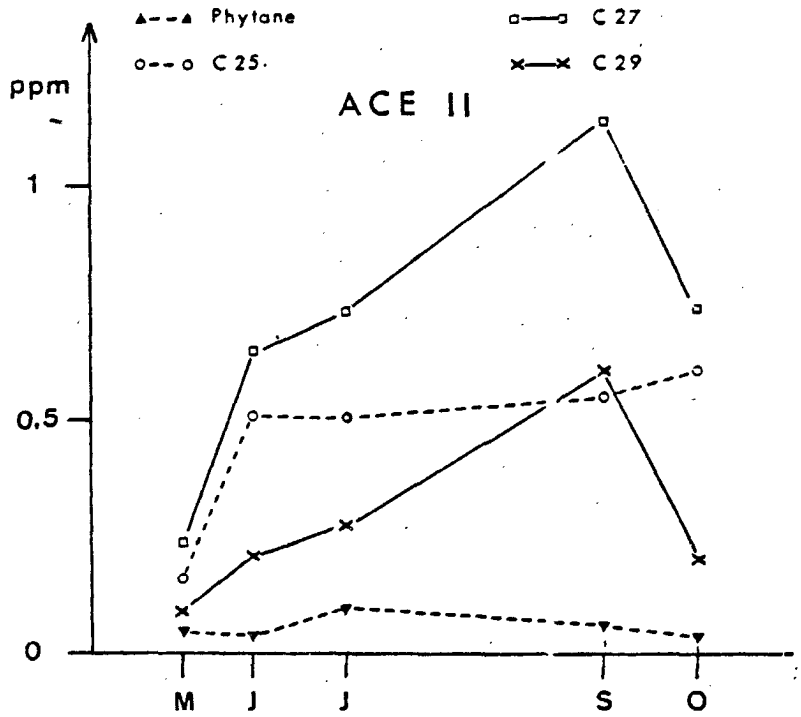


Figure 5 : Evolution des teneurs en hydrocarbures aliphatiques et aromatiques et du pourcentage en composés aromatiques des deux lots d'huîtres en zone salubre à Roscanvel ACE II (A) et au Relecq-Kerhuon ACE IV (B).



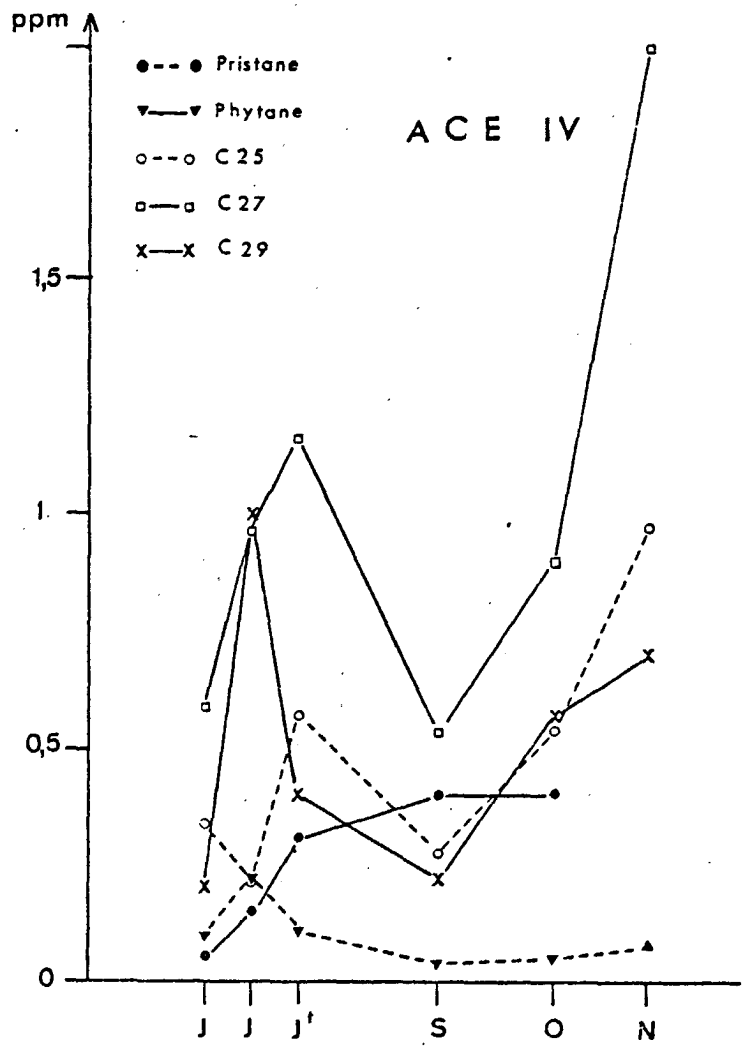


Figure 6 : Evolution de la teneur en pristane, phytane, pentacosane, heptacosane, nonacosane dans les deux lots d'huîtres transférées ACE II (A) et ACE IV (B).

Pour les deux lots témoins, le n-heptacosane représente 13 % du total des hydrocarbures saturés et le n-nonacosane 4,4 %. Ces deux valeurs très proches des lots ACE II et IV indiquent clairement que les huîtres transférées retrouvent effectivement leur composition initiale en hydrocarbures saturés bien qu'à un niveau plus élevé. En conséquence, la fraction aliphatique ne peut constituer un indice suffisamment significatif de l'état de pollution de l'huître.

Cependant, il faut noter, qu'à la différence des lots ACP, les variations saisonnières du phytane et du pristane sont peu prononcées (figures 6A et 6B).

Quant à la fraction aromatique, dont l'origine biogénique est négligeable, le taux semble se stabiliser à un niveau de 7,4 ± 2,3 ppm à partir du 18 Mai pour le lot ACE II et du 1er Septembre pour le lot ACE IV. Cette fraction représente en moyenne 51,4 % (± 11,1 %) de la teneur en hydrocarbures totaux. Aussi peut-on penser que la persistance d'un taux non négligeable d'hydrocarbures aromatiques est le signe de maintien d'un niveau de pollution significatif.

La composition de la fraction aromatique évolue de façon notable durant toute la phase d'épuration. Ceci est illustré par les trois chromatogrammes de la figure 7 qui montrent notamment la composition en hydrocarbures aromatiques du lot ACE IV le 3 Juillet, soit environ 70 jours après le transfert (ACE IV 7), et le 1er Septembre (ACE IV 10).

Par comparaison avec le lot ACP IV (figure 4A), il apparaît que l'épuration se fait plus lentement pour les polyaromatiques soufrés tels que les dibenzothiophène et méthyl-dibenzothiophène, alors que l'accumulation durant la phase de pollution ne semble pas préférentielle à l'intérieur de cette famille de

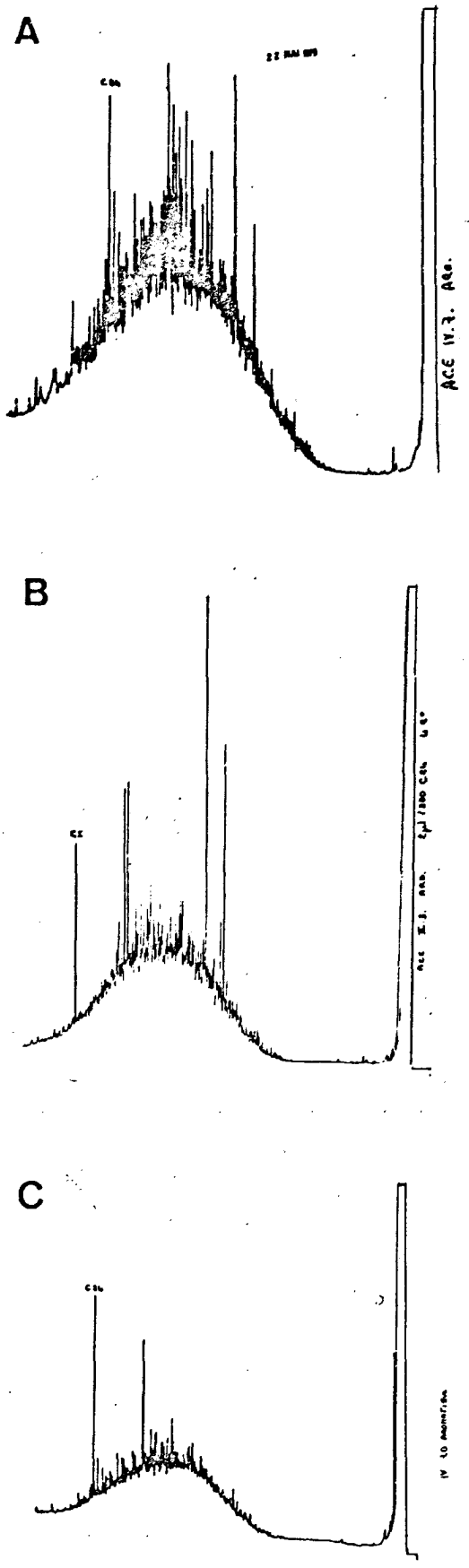


Figure 7 : Chromatogrammes des fractions aromatiques d'huîtres lors de l'épuration, respectivement dix semaines (A), (lot ACE IV), treize semaines (B), (lot ACE II), cinq mois (C), (lot ACE IV) après le transfert

composés. Ceci apparaît clairement sur la figure 7B où les deux pics importants du chromatogramme correspondent à ces produits, ceci après trois mois d'épuration. Par contre, pour le lot ACE IV 7, l'épuration ne semble pratiquement pas avoir démarré après un séjour de deux mois et demi en zone salubre. Cependant, une modification de la composition en hydrocarbures aromatiques apparaît nettement au niveau des deux pics importants du début du chromatogramme de la figure 7A, qui représentent les dibenzothiophène et méthyl-dibenzothiophène. Cette différence dans la cinétique d'élimination à l'intérieur de la famille des polyaromatiques soufrés entre dérivés monoalkylés et polyalkylés trouve son origine dans un mécanisme actuellement inconnu.

Après une épuration d'environ cinq mois, subsiste un ensemble de composés polyaromatiques non caractérisés actuellement (figure 7C).

D - ADAPTATION D'HUITRES SAINES EN MILIEUX POLLUES (ACA)

Après transfert d'huîtres plates saines, provenant de BINIC, à l'ABER-WRACH (lot ACA II), l'augmentation des hydrocarbures totaux (tableau IV) confirme le rôle d'espèce bio-accumulatrice de l'huître et son intérêt comme indicateur de pollution. On observe en 15 jours une accumulation rapide des hydrocarbures totaux (11 à 93,5 ppm) due à une augmentation simultanée des teneurs en aliphatiques et en aromatiques suivie d'une diminution lente et irrégulière jusqu'à un plateau de 23 ppm en Novembre et Décembre, ce qui est bien plus élevé que les teneurs trouvées dans les blancs (4 à 10 ppm, tableau I). Une remontée spectaculaire de la teneur en hydrocarbures totaux est à relever au mois d'Octobre. Ceci correspond au même phénomène observé lors de l'opération pollution ACP (voir tableau II). L'origine de ce phénomène est sans doute à rechercher dans les conditions spécifiques du site consistant en

PRELEVEMENT	DATE	HYDROCARBURES ALIPHATIQUES	HYDROCARBURES AROMATIQUES	HYDROCARBURES TOTAUX	% D'AROMATIQUES	INDICE DE PREFERENCE
II 1	23 Mai	4,4	6,9	11,3	61	0,96
II 5	7 Juin	53,2	40,3	93,5	43	1,19
II 6	21 Juin	7,9	25	32,9	76	1,17
II 7	6 Juillet	8,5	27	35,5	76	1,26
II 9	22 Août	35,5	26,9	62,3	43	1,37
II 10	18 Septembre	5,1	26,5	31,6	84	1,45
II 11	18 Octobre	5,5	76,2	81,7	93	1,29
II 12	13 Novembre	5,2	17,9	23,1	77	1,26
II 13	14 Décembre	5,5	17,6	23,1	76	1,24

TABLEAU IV : Teneurs en ppm/poids sec d'hydrocarbures d'huîtres plates, saines, introduites en zone polluée (ABER-WRACH)

une remise en suspension d'hydrocarbures par un moyen quelconque.

La courbe représentative des hydrocarbures aliphatiques (figure 8) montre une évolution en dents de scie, avec une accumulation massive entre le 23 Mai et le 7 Juin (4 à 53 ppm), suivie d'une épuration, marquée cependant par un accident au mois d'Août et une stabilisation à 5 ppm. L'évolution de la composition de la fraction aliphatique est illustrée par les chromatogrammes de la figure 9. On peut remarquer trois phénomènes :

- les rapports C17/pristane et C18/phytane évoluent tous deux dans le même sens. Ainsi, le rapport C17/pristane évolue de 0,8 (lot ACA II 1) à 0,32 (lot ACA II 7) et 0,30 (lot ACA II 12) alors que, dans le même temps, le rapport C18/phytane évolue pour les mêmes lots d'huîtres de 0,39 à 0,17 et 0,1.

- les n-alcanes lourds tendent à devenir majoritaires, notamment au niveau des C27, C28 et C29.

- la persistance d'une enveloppe chromatographique qui ne semble pas être en relation directe avec la teneur en hydrocarbures aliphatiques (voir tableau IV).

L'indice de préférence (tableau IV) évolue vers des valeurs supérieures à l'unité, confirmant l'importance des n-alcanes biogéniques et sans doute l'absence ou plutôt la diminution des n-alcanes d'origine pétrolière.

L'évolution des taux des deux alcanes ramifiés - pristane et phytane - et de deux n-alcanes à nombre de carbone impair - C25 et C27 - est illustrée sur la figure 10. L'évolution des deux alcanes ramifiés est pratiquement parallèle. Après une phase d'accumulation, suit une phase d'élimination perturbée sans doute par les hydrocarbures produits par l'huître elle-même.

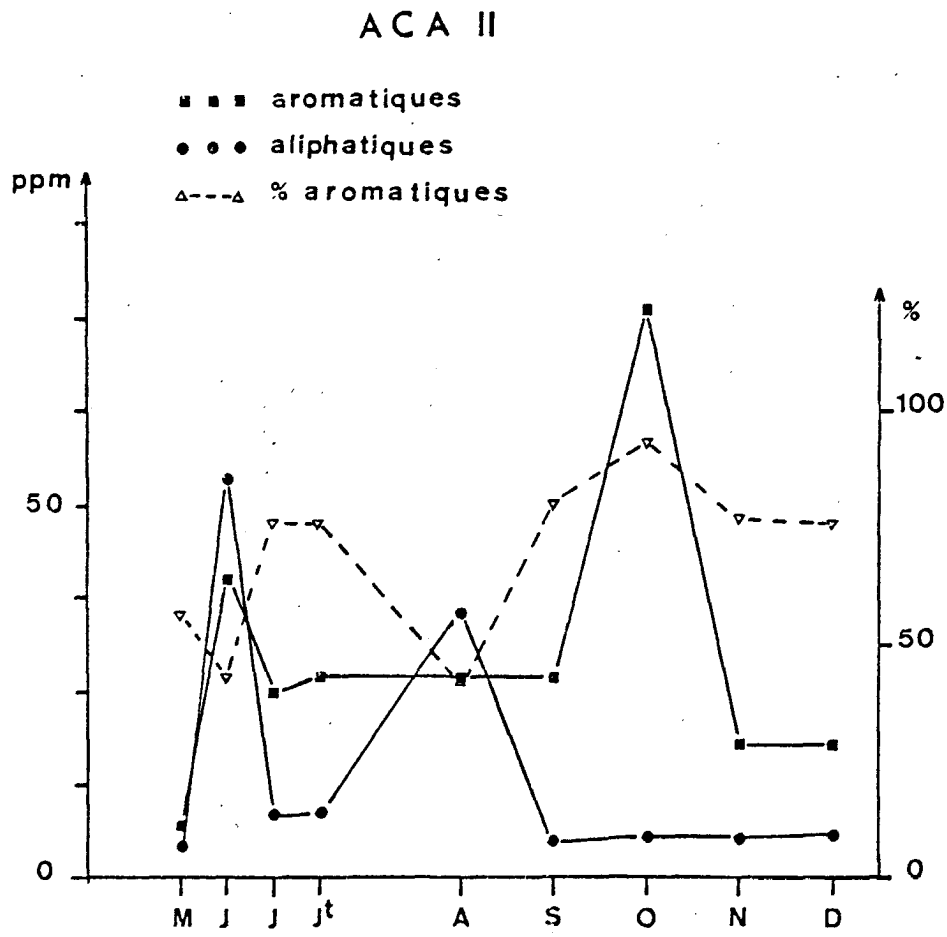


Figure 8 : Evolution des teneurs en hydrocarbures aliphatiques et aromatiques et du pourcentage en composés aromatiques d'huîtres de Binic transférées à l'Aber-Wrach en mai ACA II

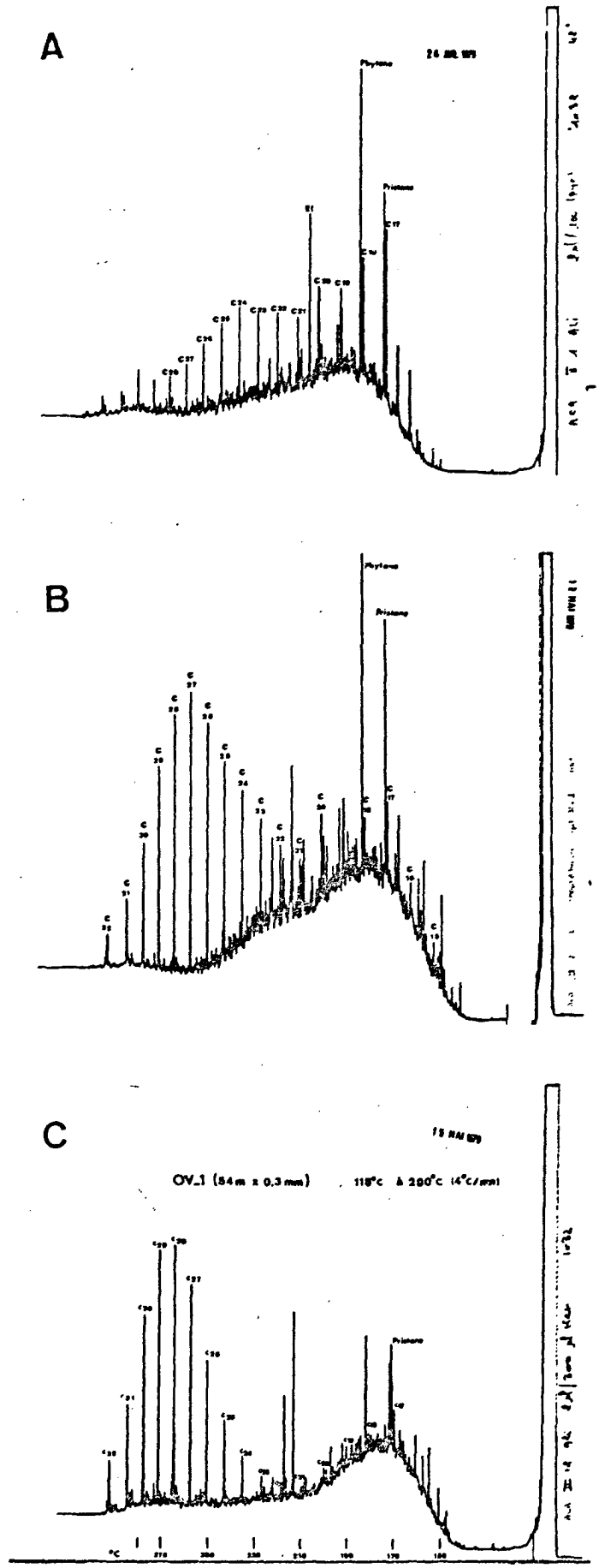


Figure 9 : Chromatogrammes des fractions aliphatiques d'huîtres de Binic transférées à l'Aber-Wrach : respectivement trois (A), neuf (B) et vingt-six semaines (C) après le transfert.

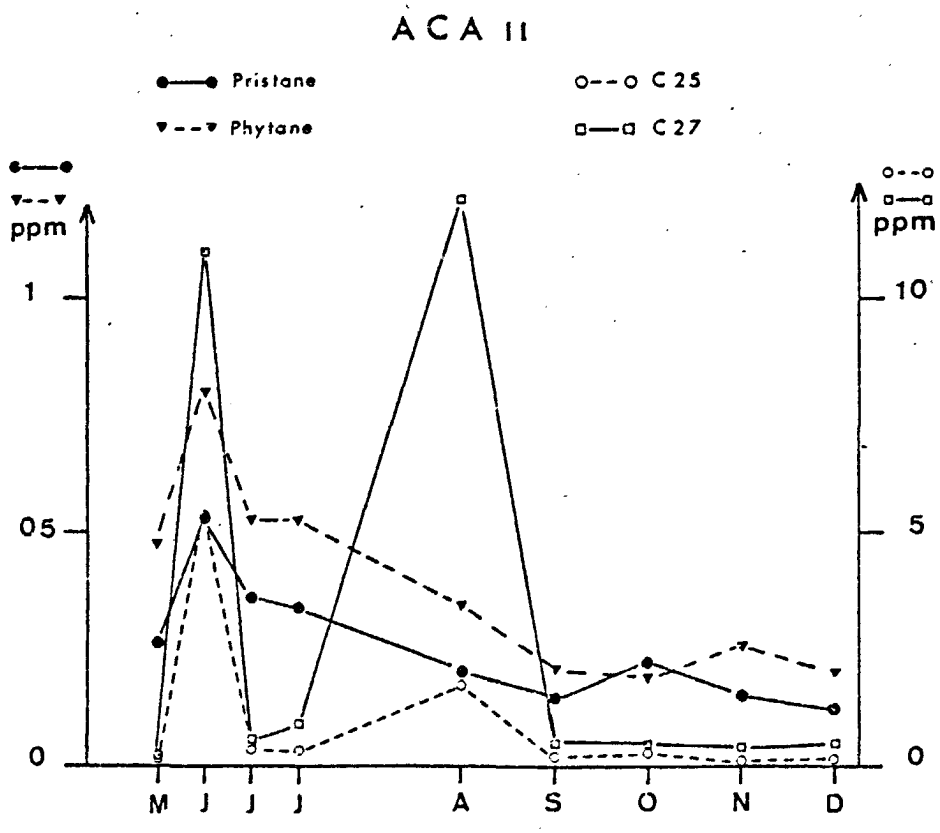


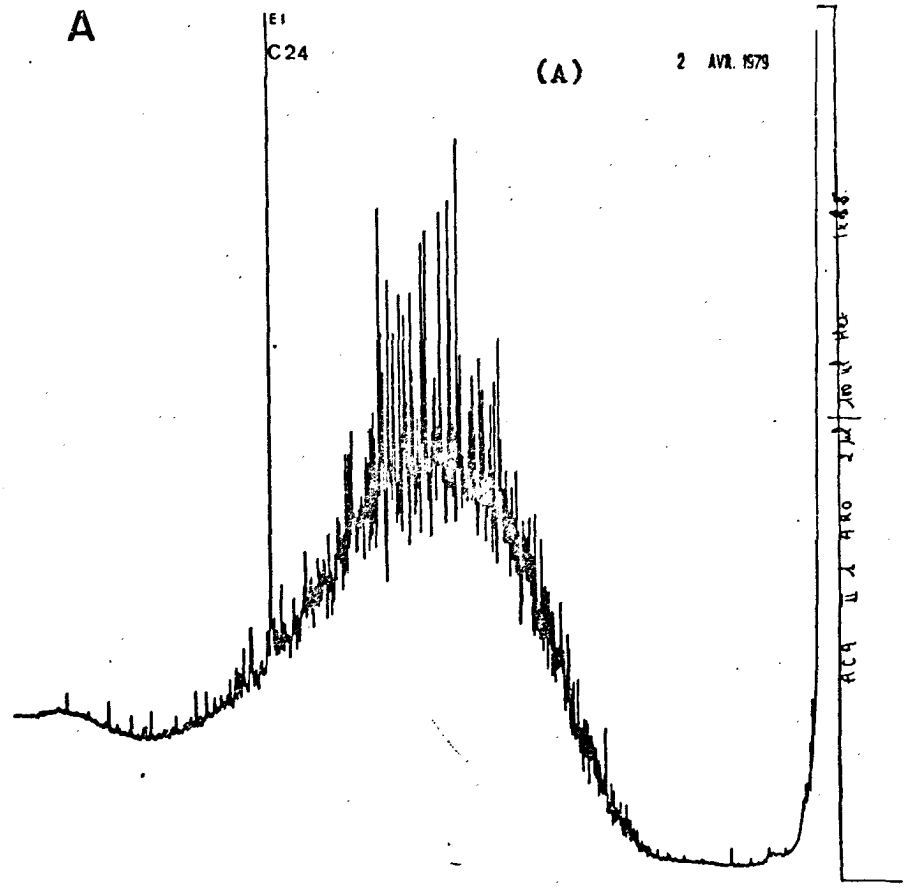
Figure 10 : Evolution des teneurs en pristane, phytane, pentacosane et heptacosane dans des huîtres de Binic transférées à l'Aber-Wrach.

L'évolution des pentacosane et heptacosane présente une double phase d'accumulation et d'élimination ; ceci est dû à une remontée spectaculaire de la fraction aliphatique globale en Août. Cependant, le heptacosane reste dans tous les cas majoritaire ; il représente environ 12 % de la fraction aliphatique alors que le nonacosane représente 4,1 % (± 1, 6 %) de la même fraction.

L'évolution des teneurs en hydrocarbures aromatiques montre une phase d'accumulation au cours des premiers jours, de 6,9 à 40 ppm. Cette phase est suivie d'une diminution très lente de 25 à 18 ppm. Il faut toutefois noter une remontée spectaculaire de la teneur en aromatiques en Octobre, confirmant les résultats des lots ACP II et IV. Le pourcentage d'aromatiques par rapport aux hydrocarbures totaux semble augmenter légèrement durant toute la période et se stabiliser à environ 76 % en Novembre-Décembre, ce qui est également observé pour les lots ACP II et IV (tableau II).

La teneur résiduelle en hydrocarbures aromatiques se situe en Décembre à 18 ppm, soit à un niveau significativement différent des teneurs des huîtres témoins. Cette observation indique clairement que la teneur en hydrocarbures aromatiques est un indicateur de l'état de pollution bien plus significatif que la teneur en hydrocarbures saturés.

L'évolution de la composition de la fraction aromatique est illustrée par les chromatogrammes de la figure 11. Trois semaines après le transfert, cette fraction aromatique est essentiellement constituée d'hydrocarbures polyaromatiques soufrés dérivant du dibenzothiophène. Parmi ceux-ci, on retrouve particulièrement les dérivés di et tri-méthylés. Cette observation est en accord avec les résultats des lots ACP (voir figure 4). De plus, après un séjour de 26 semaines sur le site de l'ABER-WRACH, une



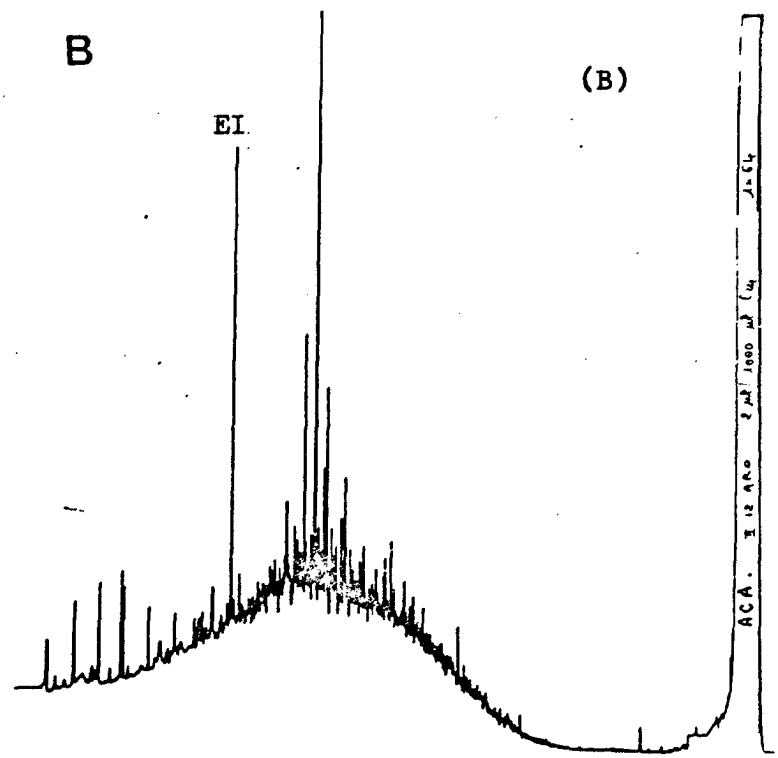


Figure 11 : Chromatogrammes des fractions aromatiques d'huîtres de Binic transférées à l'Aber-Wrach, prélevées respectivement trois (A) et vingt-six semaines (B) après le transfert

rétention préférentielle de ces mêmes dérivés est observée (figure 11B). Le lot d'huîtres ACA II 12 contient essentiellement trois composés polyaromatiques soufrés : diméthylé (pic 64), triméthylés (pics 67 et 70) ; ils représentent à eux seuls 30 % du total de la fraction d'hydrocarbures aromatiques.

De plus, il apparaît sur cette figure 11 que l'importance de l'enveloppe chromatographique n'est pas en relation directe avec le taux de composés aromatiques.

III - DISCUSSION

A - METHODOLOGIE

La méthodologie utilisée, basée sur la C.P.G. Haute Performance, permet à la fois de mesurer la quantité globale d'hydrocarbures et la composition du mélange. Elle permet en conséquence de vérifier si seuls des hydrocarbures sont pris en compte dans le résultat global.

Les hydrocarbures quantifiés sont soit aliphatiques, soit aromatiques, dans la gamme des poids moléculaires et volatilités situés entre le décane et le pentatriacontane. Il faut mentionner aussi que les métabolites ou produits de dégradation biologique (essentiellement oxygénés) ne sont pas quantifiés. En effet, ils sont éliminés lors de l'étape de délipidation. A l'heure actuelle, les données concernant l'analyse et la signification éventuelle de tels composés sont très fragmentaires.

Par ailleurs, il est évident que la méthodologie ne permet pas la distinction entre les hydrocarbures biogéniques et les hydrocarbures d'origine fossile. Seule, une éventuelle radio-datation à l'aide du ^{14}C permettrait de résoudre ce problème. Quoi qu'il en soit, certains hydrocarbures sont des constituants effectifs de la cellule et doivent être considérés comme tels et non comme des sous-produits, soit du métabolisme, soit de la pollution. Ces hydrocarbures biogéniques dans l'huître peuvent être estimés sur des animaux non pollués. Ils se situent aux environs de 5 à 10 ppm dont 1 à 3 ppm d'hydrocarbures aromatiques. La présence de composés aromatiques, surtout lourds, doit être considérée comme un indice de pollution et non la teneur en hydrocarbures totaux.

En plus d'un taux non négligeable d'aromatiques, la présence d'une pollution pétrolière peut être certifiée par les paramètres suivants :

- l'existence d'une large gamme d'hydrocarbures entre C15 et C35 ; les hydrocarbures biogéniques sont essentiellement situés entre C25 et C31.

- l'existence d'une série homologue d'hydrocarbures aliphatiques ; ceci se traduit par un indice de préférence voisin de 1.

- par ailleurs, de nombreux auteurs signalent que la présence d'une "enveloppe" chromatographique ("unresolved complex mixture") constitue un indicateur de pollution pétrolière. Cette enveloppe serait due à la complexité du mélange qui ne peut être résolue par chromatographie en phase gazeuse : il s'agirait de cycloalcanes et d'isoparaffines. Toutefois, la persistance de ce phénomène avec un dispositif chromatographique hautement performant aussi bien dans les fractions aliphatiques et aromatiques nous amène à discuter de la signification de cette "enveloppe". Plusieurs observations doivent être relevées.

- cette enveloppe n'existe pas dans le pétrole déversé malgré la complexité du mélange, riche en iso et cyclo-paraffines (voir figure 3A).

- de plus, cette "enveloppe" est parfaitement détectable lors d'analyse d'extraits d'huîtres placées en milieu non pollué mais uniquement dans la fraction aromatique. Son importance n'est pas en relation avec le taux d'aromatiques (figure 12). Elle est absente dans la fraction aliphatique des extraits correspondants.

- il est à noter que cette "enveloppe" chromatographique n'apparaît pas chez certains animaux marins pollués par des effluents pétroliers. Ceci est le cas chez certains poissons (I.S.T.P.M. , communication personnelle).

- par ailleurs, cette "enveloppe" apparaît également lors de la chromatographie liquide haute performance (C.L. - H.P.) - détection UV 254 nm sur des supports dits à polarité de phase inversée (type octadécylsilane ou ODS) (figure 13). Une telle "enveloppe" a été également mentionnée dans des conditions analytiques voisines (S.N. CHESLER et Al, Anal. Chem., 1978, 50, 805-810). Par contre, une telle "enveloppe" n'apparaît pas sur une phase greffée, type aminosilane qui retient tous les composés polaires ou moyennement polaires (à l'inverse d'une phase type ODS).

L'extrait purifié sur la phase greffée aminosilane a été analysé ensuite par C.P.G. . La persistance de l'enveloppe chromatographique en C.P.G. laisse supposer qu'elle n'est pas constituée de composés polaires ou moyennement polaires, qui seraient fortement retenus sur Lichrosorb-NH_2.

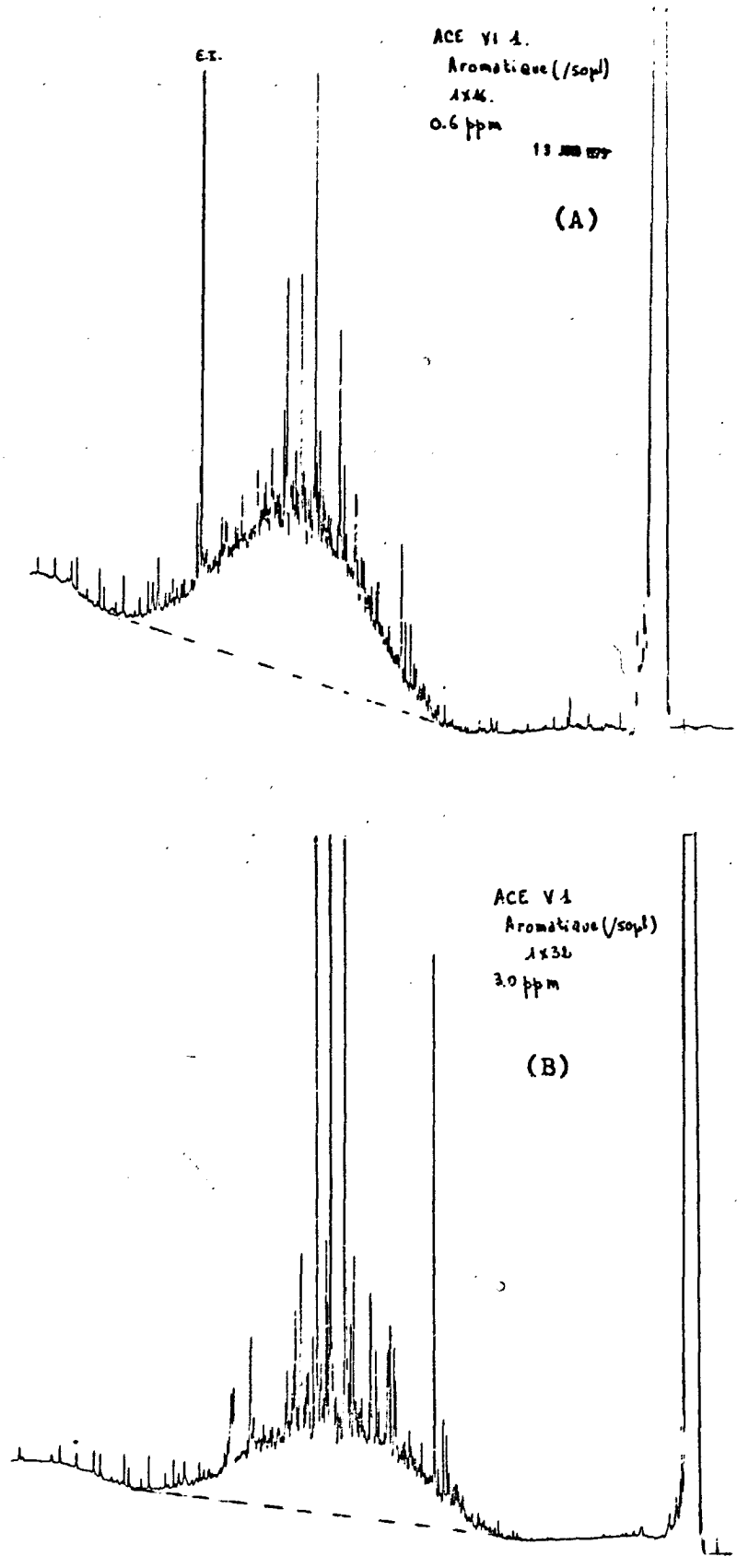


Figure 12 : Chromatogrammmes des fractions aromatiques d'huîtres témoins ACE VI 1 (A) et ACE V 1 (B) montrant l'enveloppe chromatographique

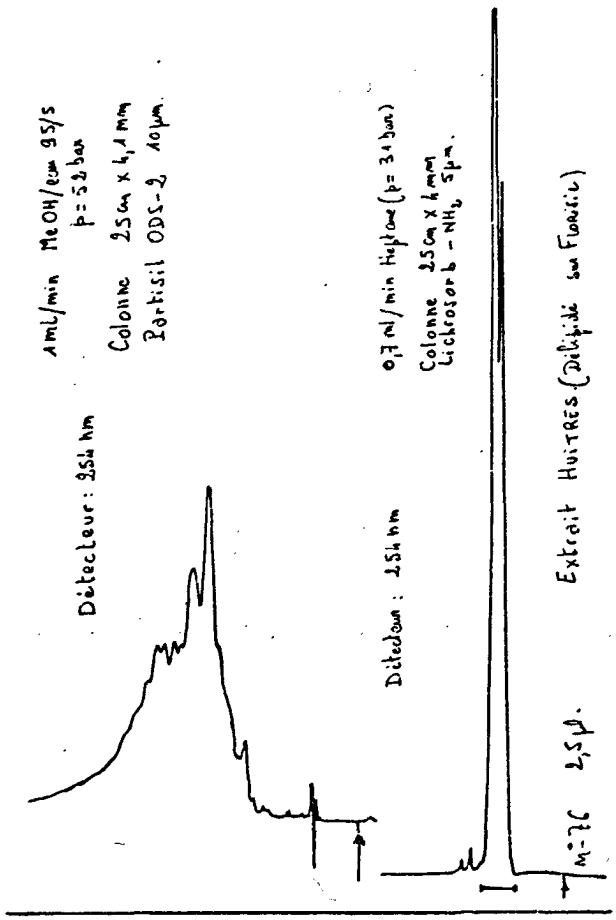


Figure 13 : Chromatogramme en phase liquide haute performance d' un extrait d'huîtres délipidé, sur des supports greffés : soit octadécysilane, soit aminosilane

Récemment, les laboratoires de l'organisme américain, FOOD and DRUG ADMINISTRATION, ont proposé une méthode de dosage des hydrocarbures aromatiques polynucléaires par C.L.-H.P. sur supports à polarité de phase inversée (J.P. HANUS et Al., 1979, J.A.O.A.C., 62, 29-35). Mais le point important de leurs résultats est que, pour éliminer les substances interférentes responsables de l'enveloppe chromatographique, il est nécessaire de réaliser une purification préalable sur Styragel. Il semble, en conséquence, que cette "enveloppe" ne peut être considérée comme représentative d'hydrocarbures complexes.

Par ailleurs, des essais de quantification des hydrocarbures sur extraits simplement délipidés sur Florisil ont montré que cette "enveloppe" est très importante et que les chromatogrammes sont souillés de toute une série de pics interférents (figure 14). Ce résultat laisse penser que cette enveloppe "peut représenter des lipides biogéniques, de polarité voisine de celle des hydrocarbures".

Enfin, une dernière observation doit être relevée. L'importance de cette enveloppe ne peut pas être corrélée significativement avec le taux d'hydrocarbures totaux (voir partie Résultats).

Aussi, en l'état actuel de nos connaissances, il ne semble pas possible de quantifier cette "enveloppe" lors du dosage des hydrocarbures. En effet, sa nature exacte et sa signification biologiques ne sont pas connues. De plus, certains auteurs ont mentionné que les extraits biologiques d'huîtres préparés lors du dosage d'hydrocarbures polyaromatiques contiennent sans doute des glycérolipides, des cires et des acides gras qui constituent un "bruit de fond" (H. BRAVO et Al., Bull. Environ. Contam. Toxicol., 1978, 171-176).

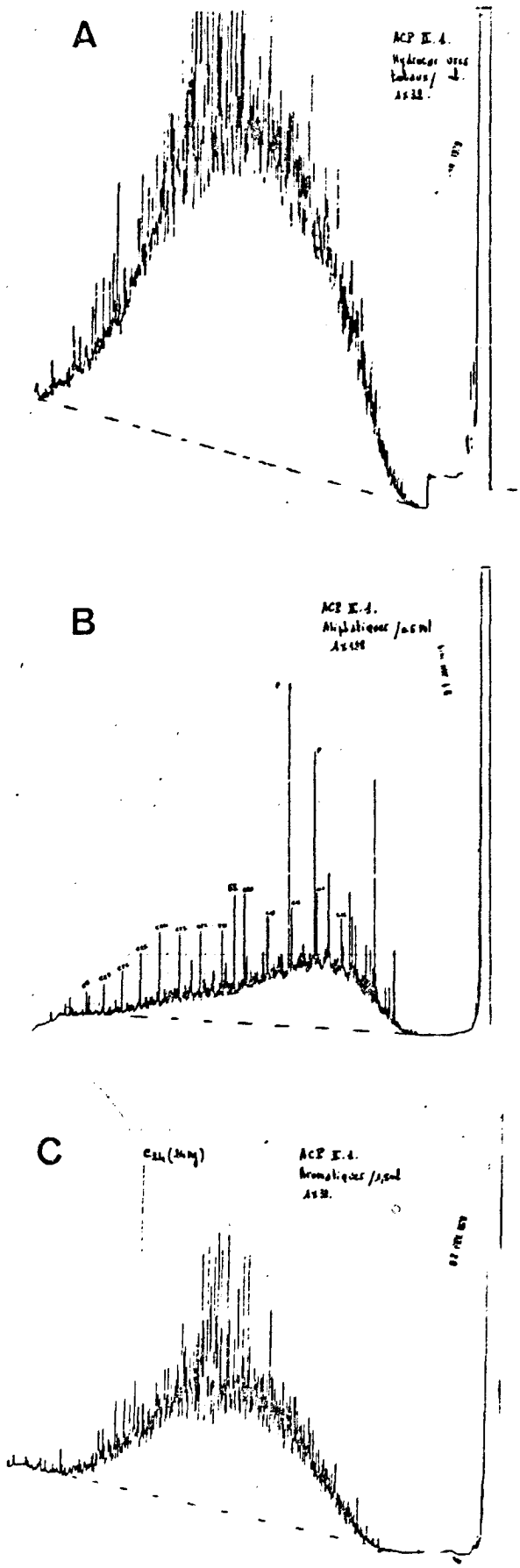


Figure 14 : Chromatogrammes en phase gazeuse du même extrait d'huître ACP II 1, après simple délipidation (A), fractionnement en aliphatiques (B) et aromatiques (C).

Quoi qu'il en soit, il nous semble important de réaliser des études complémentaires sur la nature exacte et la signification biologique d'une telle enveloppe chromatographique.

Par la technique d'étalonnage utilisée, la quantification est indépendante de la nature du pétrole et de son évolution spatio-temporelle, à la différence des méthodes globales relatives nécessitant un étalonnage. De plus, l'étalonnage interne permet de corriger les résultats bruts d'un facteur correctif représentant le taux de récupération des hydrocarbures à travers les étapes de purification. En effet, il a été mentionné des pertes importantes d'hydrocarbures, surtout aromatiques, lors d'évaporation de solvant mal contrôlée ou encore lors de chromatographie liquide par rétention sur les lipides. Les produits radioactifs permettent de contrôler les taux de récupération. Il s'est avéré satisfaisant et reproductible :

- de 88,51 % (± 6,75 %) pour le pentacosane
- de 87,1 % (± 13,3 %) pour le benz (a) anthracène.

De par ses critères de spécificité, de sensibilité et de précision, la C.P.G.-H.P. est appelée sans doute à constituer la méthode de référence, surtout si elle est couplée à la spectrométrie de masse. Toutefois, il semble nécessaire de disposer de méthodes de routine conseillées. Aussi, est-il temps qu'une intercalibration et une corrélation de résultats entre laboratoires deviennent une réalité.

B - RESULTATS

Une remarque générale concerne tous les résultats présentés plus haut. En effet, cette étude a été menée sur le terrain,

c'est-à-dire sur des sites où les arrivées de produits pétroliers sont aléatoires. Ceci est, bien entendu, vrai pour les sites de l'ABER-WRACH et de l'ABER-BENOIT qui sont soumis à des variations de pollution sans doute très irrégulières, soit par arrivée de nappes isolées, soit par remise en suspension de pétrole piégé dans les sédiments. De même, les sites dits salubres peuvent être soumis à des pollutions chroniques très limitées ; c'est le cas de la Rade de BREST. A la lumière de cette remarque, il est évident que les phases d'accumulation ou d'épuration des hydrocarbures pétroliers par l'huître peuvent ne pas être aussi régulières que lors d'expériences simulées sur site ou au Laboratoire (voir en annexe : revue générale).

De plus, les observations rapportées dans ce travail vont du mois de Mai au mois de Décembre. Ceci veut dire qu'à cette cinétique à long terme viennent se superposer des variations saisonnières du métabolisme de l'huître. Ainsi, il a été noté que l'accumulation et la rétention des hydrocarbures pétroliers fortement lipophiles sont en relation avec le stock lipidique du mollusque (voir en annexe). Or, actuellement, les variations saisonnières des teneurs en lipides et en hydrocarbures des huîtres implantées en Bretagne Occidentale (Ostrea edulis et Crassostrea gigas) ne sont pas connues.

1°) Teneur en hydrocarbures d'huîtres non exposées à la pollution

Les teneurs en hydrocarbures totaux d'huîtres provenant de zones salubres se situent entre 4,7 et 10,2 ppm. Ramenées par rapport au poids de chair humide (par convention, on admet un rapport de 1 à 5), ces teneurs sont de 1 à 2 ppm. Ces valeurs sont en parfait accord avec celles rapportées par d'autres

auteurs. Toutefois, les concentrations mesurées varient parfois de façon importante selon la technique de dosage utilisée:pour les mêmes huîtres (lots ACE V 1 et VI 1) , les teneurs en hydrocarbures totaux mesurées par spectrofluorométrie sont de 8 à 10 ppm (poids humide). Par ailleurs, des taux en hydrocarbures de 50 à 60 ppm (poids humide) sont considérés couramment par l'I.S.T.P.M. comme normales et acceptables.

Cependant, du fait que les hydrocarbures aliphatiques doivent être considérés comme des produits du métabolisme (J.W. FARRINGTON, in "Environmental chemistry", 1975, p 124) et doivent en conséquence présenter des variations saisonnières et inter-individuelles non négligeables, il nous semble préférable d'exprimer l'état de pollution par les teneurs en hydrocarbures aromatiques, dont l'origine biogénique peut être considérée comme négligeable.

Les teneurs en hydrocarbures aromatiques des huîtres témoins sont de 0,6 et 3 ppm (poids sec), soit 0,1 et 0,6 ppm (poids humide). On peut donc penser que, comme pour les moules (voir en annexe), les huîtres saines contiennent des taux d'hydrocarbures aromatiques inférieurs à 1 - 2 ppm (poids sec). En particulier, les dérivés alkylés, très nombreux dans les résidus pétroliers, sont pratiquement absents dans les organismes marins (J.W. FARRINGTON, P.A. MEYER, in "Environmental chemistry", 1975, p 116). Ils ne peuvent donc être considérés comme des métabolites naturels des organismes marins. La présence d'hydrocarbures aromatiques, essentiellement alkylés dans les mollusques marins constitue en conséquence un bon indicateur de l'état de pollution du milieu.

2°) Huîtres maintenues "in situ"

Les huîtres présentes lors de l'échouage de l'AMOCO CADIZ dans les ABERS contiennent, neuf mois après, des quantités importantes d'hydrocarbures. Une légère décontamination peut être observée

mais elle a la caractéristique d'être très irrégulière. Cette irrégularité trouve sans doute son origine dans le relargage des hydrocarbures piégés dans les sédiments vaseux de ces zones ostréicoles.

Dès les premiers jours de la pollution, les huîtres ont accumulé le pétrole tel qu'il arrivait sur les sites. L'accumulation ne présente pas de sélectivité. Par contre, par la suite, l'épuration "in situ" consiste principalement en une modification du degré"d'aromaticité" de la fraction hydrocarbonée contenue dans l'huître.

Les teneurs en hydrocarbures aliphatiques sont, dès le mois de Juin, de l'ordre de 8 - 14 ppm. Mais il faut tout de même attendre les mois d'Octobre-Novembre pour obtenir un indice de préférence supérieur à l'unité. A cette époque, on peut penser que les hydrocarbures aliphatiques biogéniques l'emportent sur ceux d'origine fossile. De plus, la composition se déplace vers les hydrocarbures lourds, heptacosane, et nonacosane essentiellement. Comme les n-alcanes sont des composés facilement dégradables par les micro-organismes, leur diminution dans les huîtres maintenues en zones polluées indique donc également une diminution dans l'environnement marin. Il en résulte une "aromaticité" plus grande des effluents pétroliers résiduels.

Dès le mois de Juin, 80 à 90 % des hydrocarbures des huîtres des ABERS sont constitués par des hydrocarbures aromatiques. L'épuration spontanée dans le milieu pollué consiste en une très légère diminution de ce pourcentage à 75 %. Alors que, pour les huîtres transférées en zones non polluées, les aromatiques ne représentent que 51 % des hydrocarbures totaux à la même époque ; le maintien d'un pourcentage élevé d'aromatiques dans les zones polluées ne peut s'expliquer que par le relargage de tels composés à partir

des vasières. De plus, les composés polyaromatiques surtout alkylés présentent un plus grand degré d'hydrosolubilité que les n-paraffines et peuvent donc plus facilement être accumulés par l'huître. Toutefois, le maintien d'un degré "d'aromaticité" élevé peut également être dû en partie à une rétention préférentielle des aromatiques par l'huître ou (et) éventuellement à une biodégradation sélective des n-paraffines. Quoi qu'il en soit, les résidus pétroliers accumulés par l'huître présentent une toxicité potentielle plus élevée que le pétrole déversé lui-même.

Les aromatiques résiduels sont essentiellement constitués par des polyaromatiques soufrés : dibenzothiophène et dérivés mono, di et tri-méthylés. Une telle sélectivité de rétention n'est pas observée pour les dérivés du naphtalène pourtant en grande quantité dans les deux pétroles "Arabian light" et "Iranian light" contenus dans l'AMOCO CADIZ. Certains auteurs ont rapporté des résultats différents (voir en annexe). Notamment, il a été mentionné que, parmi les hydrocarbures aromatiques accumulés préférentiellement, les teneurs les plus importantes sont observées pour le naphtalène et les alkyl-naphtalènes. Toutefois, ces résultats sont rapportés lors d'expérimentations en Laboratoire, où le phénomène d'altération du pétrole par les agents atmosphériques ("weathering") n'intervient pas. Or, de nombreuses observations (F. BERTHOU, résultats non publiés ; J.A. CALDER et Al. in "The AMOCO CADIZ oil spill ; a preliminary report") ont montré que la fraction aromatique du pétrole de l'AMOCO CADIZ évoluait très rapidement par élimination des naphtalène et alkyl-naphtalènes et persistance de polyaromatiques du type phénanthrène, dibenzothiophène et dérivés. En conséquence, les résidus pétroliers arrivant sur le site des ABERS étaient sans doute particulièrement riches en polyaromatiques soufrés qui ont été ainsi accumulés par les huîtres.

L'évolution chimique de la composition des hydrocarbures des huîtres maintenues "in situ" est donc due en très grande partie à des facteurs externes à l'huître elle-même : hydrosolubilité, altération par les agents atmosphériques, photo-oxydation et biodégradation.

Le degré d'aromaticité élevé laisse penser que le dosage des hydrocarbures aromatiques, essentiellement alkylés, est bien plus significatif du niveau de pollution que celui des hydrocarbures totaux ou aliphatiques.

3°) Epuration en zones salubres

L'épuration, mesurée par les teneurs en hydrocarbures totaux, est effective et rapide après le transfert des huîtres polluées en zones salubres. Cependant, cette épuration n'est pas totale car les teneurs restent, après dix mois d'épuration, nettement supérieures à celles d'huîtres saines. Les taux résiduels représentent 15 % des hydrocarbures accumulés sur les sites pollués.

La fraction aliphatique retrouve très rapidement des taux situés entre 5 et 10 ppm. Elle est constituée essentiellement par des n-alcanes lourds. L'indice de préférence qui évolue vers des valeurs supérieures à l'unité indique qu'aux hydrocarbures d'origine fossile viennent se superposer ou s'ajouter, en quantité non négligeable, ceux d'origine biogénique.

Après huit mois d'épuration, les taux d'hydrocarbures aromatiques restent à un niveau élevé entre 6 et 10 ppm, alors que les huîtres témoins ont des taux inférieurs à 1 - 2 ppm. La persistance de composés aromatiques à un pourcentage égal à 51 % des hydrocarbures totaux montre que l'épuration est difficilement totale.

La vitesse d'épuration apparaît être fonction du temps de séjour de l'huître dans les zones polluées préalablement à l'opération de transfert. Cette différence dans les cinétiques d'élimination est due en très grande partie à la fraction aromatique. Ainsi, on peut estimer, en première approximation, que le temps de demi-vie des hydrocarbures aromatiques est, pour le lot ACE II, de moins d'un mois alors que, pour le lot ACE IV, qui a séjourné vingt jours de plus dans les ABERS, ce temps de demi-vie est d'environ quatre mois. De nombreux auteurs ont rapporté, pour les bivalves - moules et huîtres - des temps de demi-vie bien plus courts, de l'ordre de 1 à 5 jours (voir en annexe). Ces temps sont légèrement plus importants - 7 jours - pour des temps d'accumulation de 4 jours (R.F. LEE, in "Fate and effects of petroleum hydrocarbons in marine organisms", Pergamon Press, 1977, p 64). Il faut noter que ces résultats ont été acquis lors d'expérimentations simulées ou en Laboratoire, c'est-à-dire dans des conditions très différentes de celles rencontrées dans les ABERS.

L'origine de cette modification du temps de demi-vie lors de la phase d'épuration ne peut être qu'interne à l'huître, les facteurs externes étant identiques pour les deux lots étudiés. En l'état actuel de nos connaissances, essentiellement des modifications métaboliques et physiologiques semblent être à l'origine de ce phénomène. Ainsi, lors d'un séjour prolongé en zone polluée, on peut penser que les hydrocarbures sont transférés dans des tissus constituant des stocks lipidiques, donc à renouvellement lent. De plus, il est possible que les huîtres voient, dans de telles situations, leur capacité de filtration diminuer et donc la vitesse d'épuration baisser sensiblement.

En outre, l'épuration à l'intérieur de la famille des polyaromatiques soufrés, accumulés lors du séjour en zone polluée,

est une épuration différentielle. Ainsi, les dérivés polyalkylés du dibenzothiophène sont éliminés plus rapidement que le dibenzothiophène lui-même ou son dérivé monométhylé. Le mécanisme de cette épuration différentielle peut trouver son origine soit dans le degré d'hydrosolubilité différent selon le nombre de substitutions sur les noyaux aromatiques, soit dans le métabolisme de l'huître elle-même.

Or, il semble que les huîtres et les moules, à la différence d'autres organismes marins, ne possèdent pas d'enzymes de détoxification, du type monoxygénases Cytochrome P-450 ou enzyme de conjugaison (D.C. MALINS, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1977, 298, 482). Il en résulte donc que la rétention sélective d'hydrocarbures par l'huître dépend en première approximation du coefficient de partage de ces hydrocarbures entre l'eau environnante et les lipides des tissus où ils sont accumulés.

4°) Adaptation en zones polluées

L'implantation d'huîtres saines dans les zones des ABERS (expérience Adaptation) est caractérisée par une accumulation rapide et importante d'hydrocarbures. L'huître constitue donc un indicateur de la pollution du milieu (colonne d'eau, sédiments). Cette accumulation n'est pas préférentielle ; l'huître accumule les hydrocarbures alors présents dans le milieu.

Après une phase d'accumulation, la fraction aliphatique retrouve rapidement des taux d'environ 5 ppm, c'est-à-dire voisins de ceux des huîtres témoins. Les n-alcanes lourds sont majoritaires et peuvent représenter jusqu'à 13 % de cette fraction pour l'heptacosane et 4 % pour le nonacosane. Les n-paraffines contenues dans les huîtres après dix mois de séjour dans les ABERS

sont donc essentiellement biogéniques. Ce résultat est en parfait accord avec ceux de l'expérience Pollution.

L'évolution des teneurs en hydrocarbures aromatiques montre une phase d'accumulation importante au cours des premiers jours. Cette phase est suivie d'une épuration très lente et d'une stabilisation des taux à environ 18 ppm, dénotant le maintien d'un niveau important de pollution des ABERS. Les temps de demi-vie ne peuvent être estimés car un équilibre dynamique d'entrée-sortie s'établit de toute évidence entre l'huître et son milieu environnant.

L'aromaticité de la fraction hydrocarbonée augmente durant toute l'opération pour se stabiliser à un pourcentage de 76 %. La rétention des hydrocarbures aromatiques consiste essentiellement en une accumulation de dérivés di et tri-méthylés du dibenzothiophène. Ces observations confirment les résultats de l'expérience Pollution.

CONCLUSION - IMPLICATIONS SANITAIRES

Il est évident que les huîtres polluées par les hydrocarbures pétroliers doivent être considérées comme impropres à la consommation humaine. Cependant, il est très difficile d'établir actuellement un seuil des teneurs en hydrocarbures au-delà duquel les huîtres doivent être considérées comme insalubres. Toutefois, les résultats de ce travail montrent que le taux d'hydrocarbures aromatiques, essentiellement alkylés, doit être considéré comme le seul significatif du niveau de pollution. En effet, les hydrocarbures aliphatiques doivent être considérés comme des produits du métabolisme normal de l'huître et sont donc d'origine biogénique. De plus, leur toxicité est négligeable. Par contre, les hydrocarbures aromatiques alkylés ne sont pas d'origine biogénique, du moins dans l'huître. Or, il est bien connu aujourd'hui que les hydrocarbures polyaromatiques, du moins pour certains d'entre eux, présentent des potentialités toxiques, notamment des effets mutagènes et (ou) cancérogènes. En conséquence, la présence de polluants polyaromatiques dans les sources d'alimentation doit conduire à la plus grande prudence.

Dans le cadre de cette étude, il faut noter que le pétrole déversé ne contenait pas de polyaromatiques lourds tels les benzopyrène ou méthylcholanthrène. Par ailleurs, l'accumulation de polyaromatiques soufrés dans l'huître ne présente sans doute pas de grand danger car ces composés ne présentent pas d'effet mutagène, du moins individuellement (O. CHAUDE, IFP, Communication personnelle). Cependant, un tel effet peut éventuellement apparaître par le mélange de différents produits inoffensifs pris un à un.

Par ailleurs, il est généralement admis que l'huître ne possède pas d'enzymes type monoxygénase à Cytochrome P-450. Or, de tels enzymes sont nécessaires à l'activation des polyaromatiques en dérivés du type diol-époxyde qui, eux, constituent les produits effectivement cancérogènes.

Quoi qu'il en soit, la présence d'hydrocarbures polyaromatiques à potentialité éventuellement mutagène ou cancérogène dans les huîtres polluées nous conduit à préconiser la mise au point de tests d'évaluation du caractère mutagène.

E T U D E B I O L O G I Q U E

Laboratoire d'Anatomie Pathologique
U.E.R. de Médecine - BREST

EXAMENS HISTOPATHOLOGIQUES

A - TECHNIQUES

Elles ont cherché à apprécier, essentiellement de façon dynamique, l'évolution de l'aspect général de l'huître, des altérations microscopiques à l'échelon tissulaire et cellulaire, et les répercussions sur, d'une part la fonction gonadique, d'autre part les autres éléments pathologiques éventuellement présents.

1°) L'étude de l'indice de condition a été réalisée, sur 10 huîtres de chaque lot, en appliquant la formule de WALNE :

$$\frac{\text{poids sec} \times 1000}{\text{volume inter-valvaire}}$$

où :

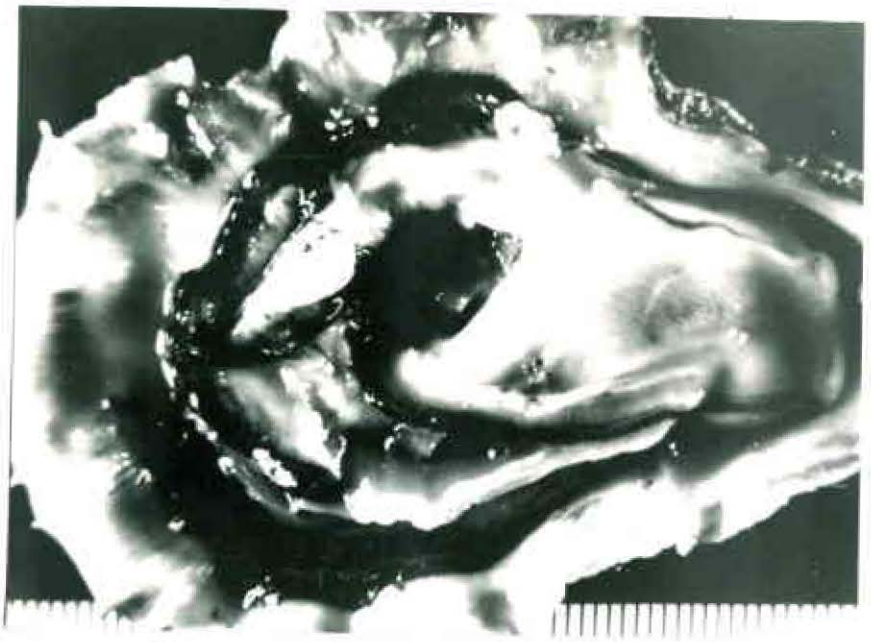
- le poids sec est déterminé après séchage du corps du mollusque 24 H (huîtres plates) et 48 H (huîtres creuses) à 60°.
- le volume intervalvaire est établi, en utilisant un appareil fabriqué au Laboratoire, par l'étude des déplacements liquidiens correspondant d'une part au corps total de l'huître, d'autre part à celui des valves isolées.

2°) L'examen histologique est réalisé sur 10 huîtres après fixation immédiate au Formol neutralisé à Ph 7, puis inclusion en Paraffine et coloration à l'Hématoxyline-Eosine-Safran ; sur certaines huîtres, une coloration à l'Acide Périodique Schiff a été en outre effectuée pour mieux apprécier les stocks glycogéniques.

Crassostrea gigas :

Huître Polluée

Protocole ACP V. Mai 1978

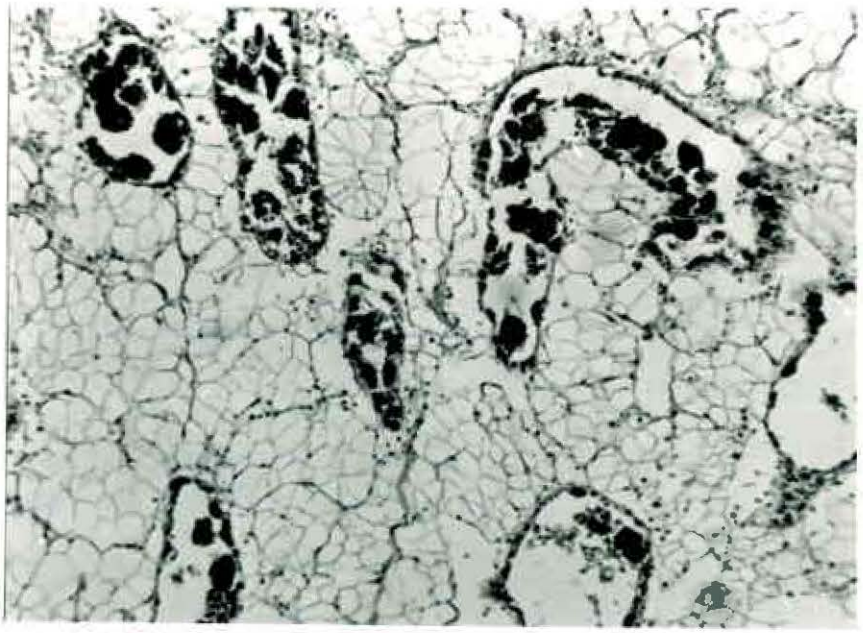


Ostrea edulis :

Altérations gonadiques

Protocole ACP I. Septembre 1978

Coloration H.E.S. x 100

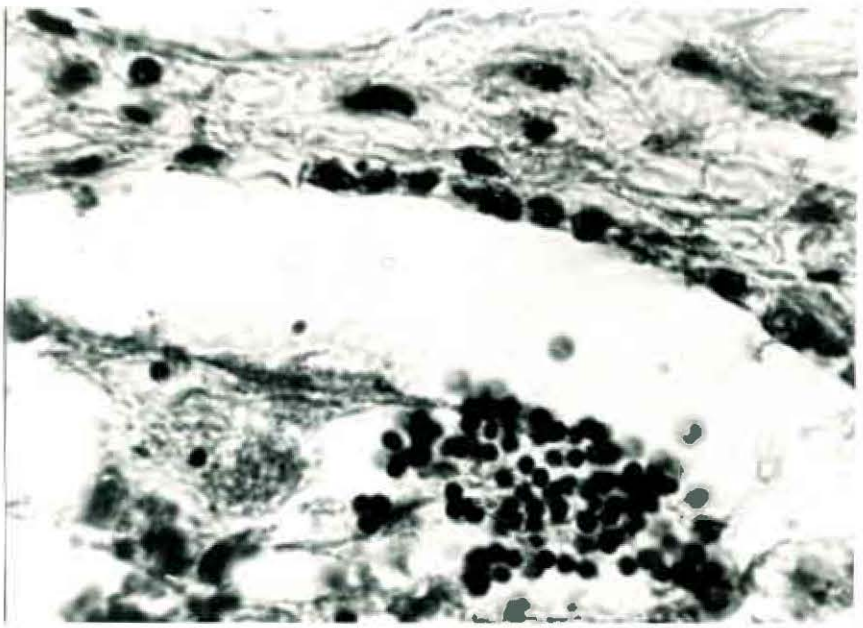


Ostrea edulis :

Détail des lésions gonadiques

Protocole ACP I. Août 1978

Coloration H.E.S. x 1000

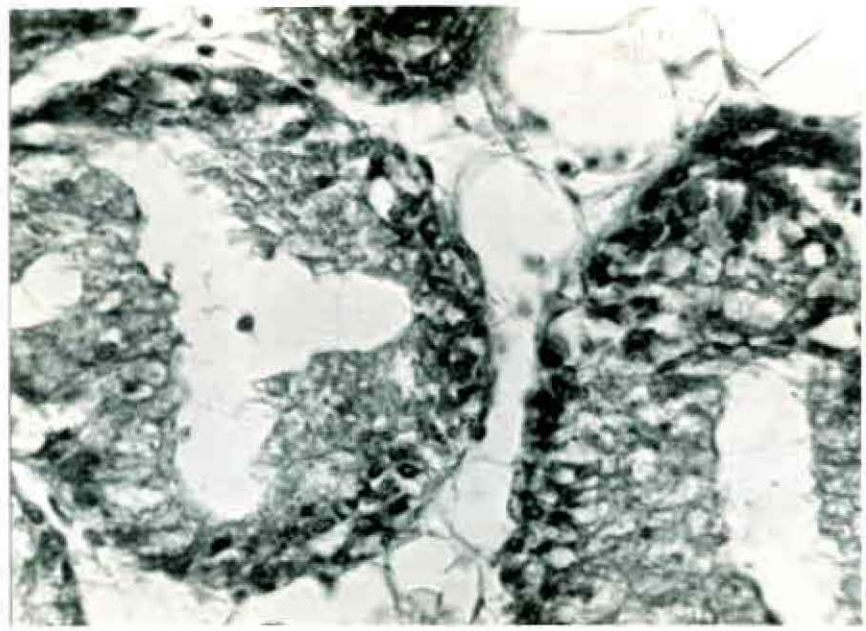


Ostrea edulis :

Nécrose digestive débutante

Protocole ACP I. Mai 1978

Coloration H.E.S. x 400

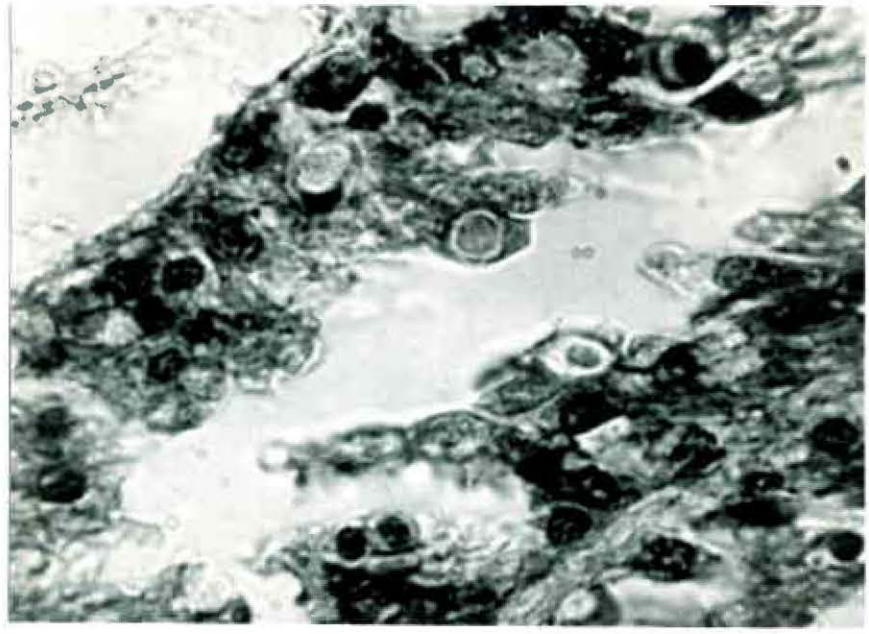


Ostrea edulis :

Détail des altérations digestives

Protocole ACP I. Mai 1978

Coloration H.E.S. x 1000

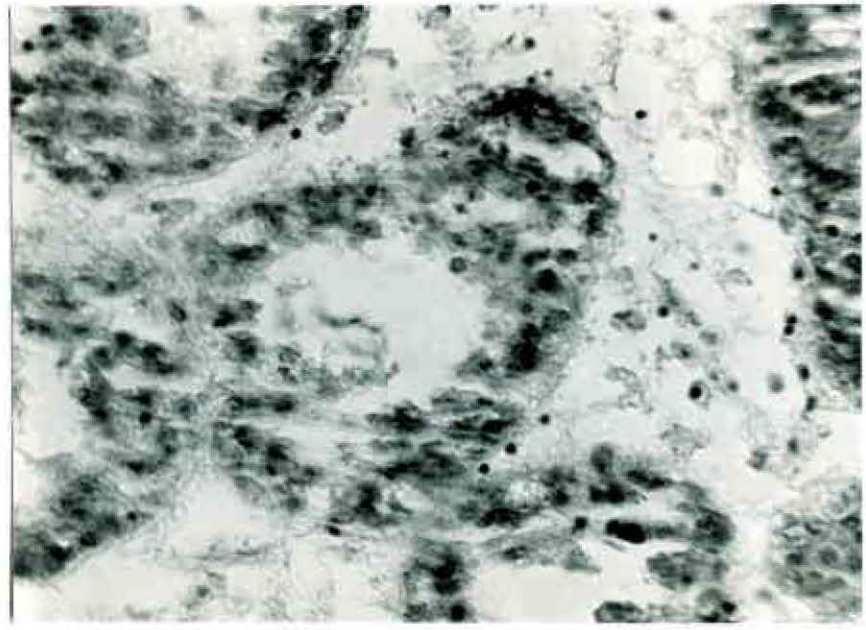


Ostrea edulis :

Nécrose digestive avancée

Protocole ACP I. Mai 1978

Coloration H.E.S. x 400



1 - L'examen au microscope a essentiellement porté sur les altérations des tissus de l'huître ; si la reconnaissance de ces altérations lésionnelles, dans l'ensemble peu spécifiques, est facile à l'échelon d'une structure tissulaire ou d'une cellule, il nous a paru indispensable de tenter de quantifier les observations pour pouvoir les comparer : pour cela, lors de chaque lecture de lame, avec contrôle en double aveugle, chacun des secteurs tissulaires retenu (tube digestif, tissu interstitiel, branchies et gonades) a été affecté d'un certain nombre de points en fonction de l'intensité des lésions : 0, + ou -, + ou ++ ⟶ 0, 1, 2, 3

Il a été ainsi possible d'établir, en additionnant les résultats pour l'ensemble de chaque lot :

- un "indice de nécrose" distinct pour chaque tissu,
- un indice global pour l'ensemble des lésions observées.

Cette méthode, obligatoirement assez subjective dans son principe, nous a cependant fourni des comparaisons cohérentes entre, d'une part les différents lots pathologiques, d'autre part avec des lots témoins (séries de lots provenant de l'ABER-BENOIT et examinés mensuellement en 1977 au cours d'une autre étude expérimentale).

2 - L'indice gonadique est établi en mesurant, au micromètre oculaire sur deux diamètres perpendiculaires, l'importance du développement de la gonade autour de la glande digestive coupée transversalement.

3 - Enfin, la recherche systématique des parasites de la glande digestive de l'huître plate (Marteilia refringens) et des lésions tumorales d'hyperplasie hémocytaire a été effectuée pour toutes les huîtres examinées.

B - RESULTATS

1°) Macroscopiquement

Chez de nombreuses huîtres provenant de la région des ABERS et examinées peu après la marée noire, les valves des mollusques, ainsi que leur corps, apparaissent englués par le mazout, celui-ci étant cependant assez facilement éliminé par un lavage superficiel ; le corps des mollusques apparaît alors sensiblement normal.

Sur les prélèvements effectués ultérieurement, on a observé dans certains cas un amaigrissement global de l'huître, mais pas d'aspect glaireux, et pas de zones de nécrose massive ; le plus souvent, le corps des mollusques apparaît sensiblement normal.

2°) Lésions de nécrose histologique

1 - Lésions élémentaires

Nos examens ayant débuté assez tardivement après la pollution initiale, il est difficile d'avoir une appréciation des altérations cellulaires initiales.

A partir de la sixième semaine, les modifications peuvent être classées en :

1a - altérations cellulaires dégénératives : elles sont particulièrement marquées au niveau des cellules épithéliales des diverticules digestifs, l'estomac et l'intestin apparaissant moins touchés : il s'agit de perte de la secrétion muqueuse (disparition des granules éosinophiles), puis de vacuolisation, ou de condensation cytoplasmique homogène, s'associant souvent à une

pycnose nucléaire. Ces lésions aboutissent, au maximum, à une nécrose de liquéfaction ou d'homogénéisation complète, se traduisant selon les cas par une desquamation cellulaire dans la lumière des tubes, ou par une véritable momification cytoplasmique avec perte nucléaire.

- des altérations, du même ordre, mais moins intenses, ont été constatées sur les cellules épithéliales du revêtement branchial, aboutissant parfois à des zones limitées d'érosion ; dans l'ensemble cependant, les cellules de ce revêtement sont assez peu touchées, avec, en particulier, au moment de nos examens, une intégrité remarquable du système ciliaire.

- enfin, au niveau des gonades, on assiste surtout à une atrophie des cellules, plus lente et plus progressive, avec, par comparaison aux témoins, un aspect cubique ou endothéliforme des cytoplasmes. Dans l'interprétation de ces faits, il convient sans doute de tenir compte d'une affinité des hydrocarbures pour les structures riches en lipides de la glande génitale.

1b - inflammation

La réaction inflammatoire est presque toujours présente, faite essentiellement de cellules d'aspect macrophagique (amaebocytes), à cytoplasme spumeux volumineux, présentant parfois une coloration A.P.S. partiellement positive du cytoplasme, et mêlées à de plus rares cellules réactionnelles hyalines. Enfin, et surtout chez les huîtres examinées plus tardivement (six mois après l'exposition à la marée noire), on observe de nombreuses cellules pigmentées ("brown cells") de grande taille, parfois plasmodiales.

Cette réaction interstitielle est surtout dense autour de la glande digestive, ou en plus petits ilôts dans l'axe des branchies ou autour des gonades. Elle n'aboutit jamais à une réaction d'enkystement.

1c - Dans l'ensemble, ces lésions sont donc histologiquement peu spécifiques, témoignant d'un processus de nécrose toxique, et de réactions inflammatoires secondaires évoluant sur le mode subaigu : seule la répartition topographique et évolutive dans les différents tissus de l'huître apparaît intéressante.

2 - Répartition tissulaire

Les indices de nécrose, calculés comme il a été indiqué, sont résumés dans le tableau I.

		HUITRES PLATES				HUITRES CREUSES	
		ACP	ACE	ACA	Tém.	ACP	ACE
NOMBRE DE PRELEVEMENTS		19	17	37	6	30	12
INDICE DE NECROSE	BRANCHIES	2,8	4,6	4,7	0,2	4	4,6
	TISSU INTERSTITIEL	5,5	7,7	7	2,8	4,9	5,7
	GONADES	4,3	6,6	3,7	0,8	3,7	4,3
	TUBE DIGESTIF	6,2	9	7,7	1,3	7,3	10,1
	TOTAL	18,8	27,9	23,1	5,3	19,9	24,7

TABLEAU I : Indices de nécrose moyens dans les différents tissus de l'huître.

Il est permis d'en déduire :

2a - variations topographiques et liées à l'origine des lots

a - les lésions dominent nettement dans le tube digestif, particulièrement dans les diverticules (indice de nécrose moyen : 6,9) puis dans le tissu interstitiel (indice de nécrose : 5,2), les

gonades (3,9) et les branchies (3,4), pour l'ensemble des lots, huîtres plates et creuses, des trois protocoles : Pollution, Epuration, et Adaptation ; l'indice de nécrose total moyen de ces lots est de 19,4.

b - ces lésions sont beaucoup plus marquées que dans une série comparable, examinée dans l'ABER-BENOIT en 1977, où l'indice de nécrose total moyen est de 5,3, avec une répartition topographique un peu différente (tube digestif : 1,3 ; tissu interstitiel : 2,8 ; gonades : 0,8 ; branchies : 0,2), les lésions étant donc, dans des conditions normales d'élevage, essentiellement celles d'une réaction cellulaire inflammatoire interstitielle modérée, sans nécrose associée en particulier digestive.

c - la comparaison entre les lots d'huîtres plates et creuses ne montre aucune différence notable : les indices moyens totaux sont respectivement de 23,2 pour les huîtres plates et 22,3 pour les creuses.

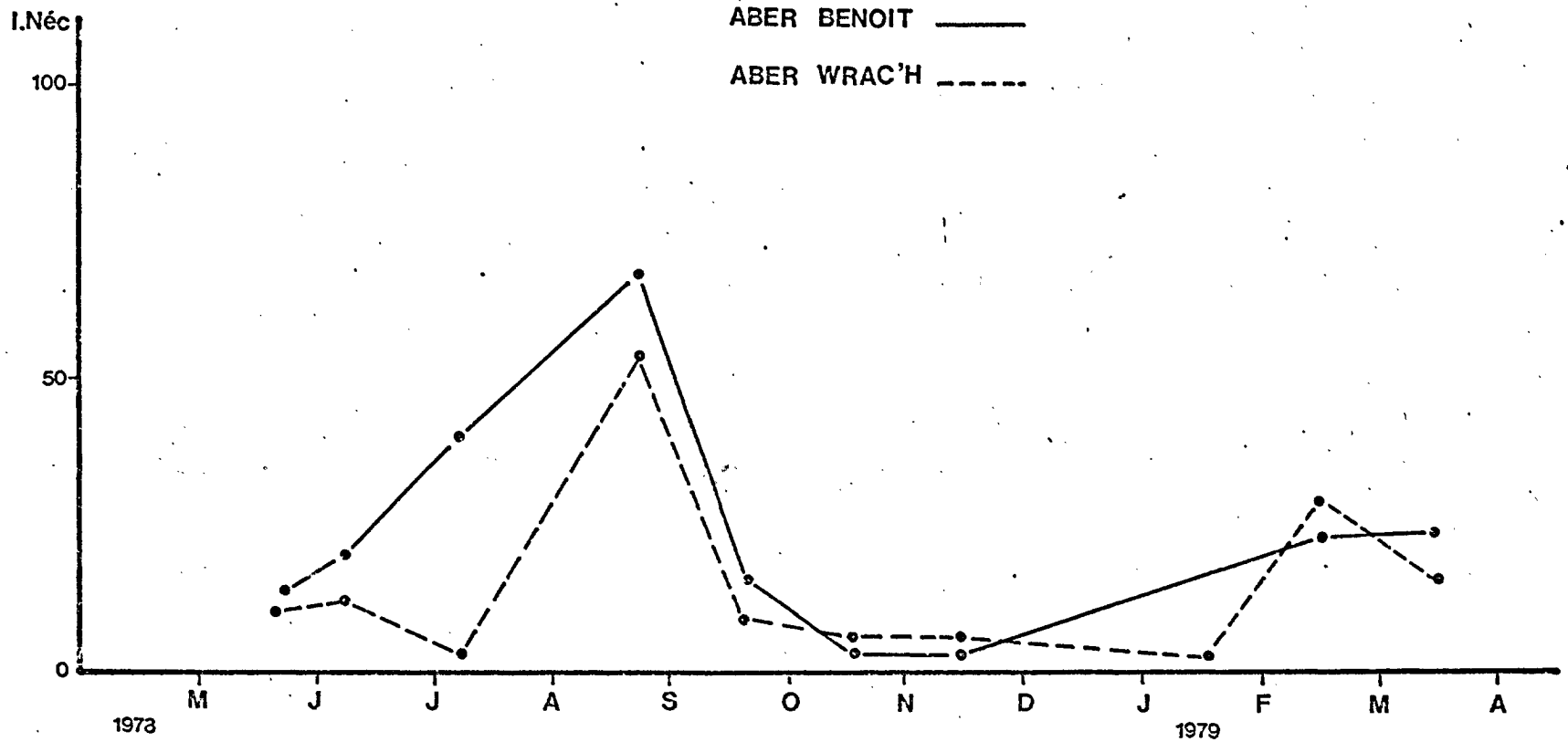
d - les indices de nécrose sont un peu plus élevés pour les lots Epuration (27,9 pour les huîtres plates et 24,7 pour les creuses) et Adaptation (23,1 pour les huîtres plates), que chez les huîtres laissées en zones polluées (indice de nécrose : 18,8 pour les huîtres plates et 19,9 pour les creuses).

2b - <u>variations évolutives</u>

Dans le temps, les variations de l'indice de nécrose les plus caractéristiques sont observées dans l'ABER-BENOIT, avec une augmentation de 14 à 68 de Mai à Août 1978, puis une chute à 3 en Octobre-Novembre 1978, et une stabilisation à 23 en Février-Mars 1979 chez Ostrea edulis. Les courbes sont sensiblement comparables pour les huîtres plates des lots Epuration et Adaptation, avec

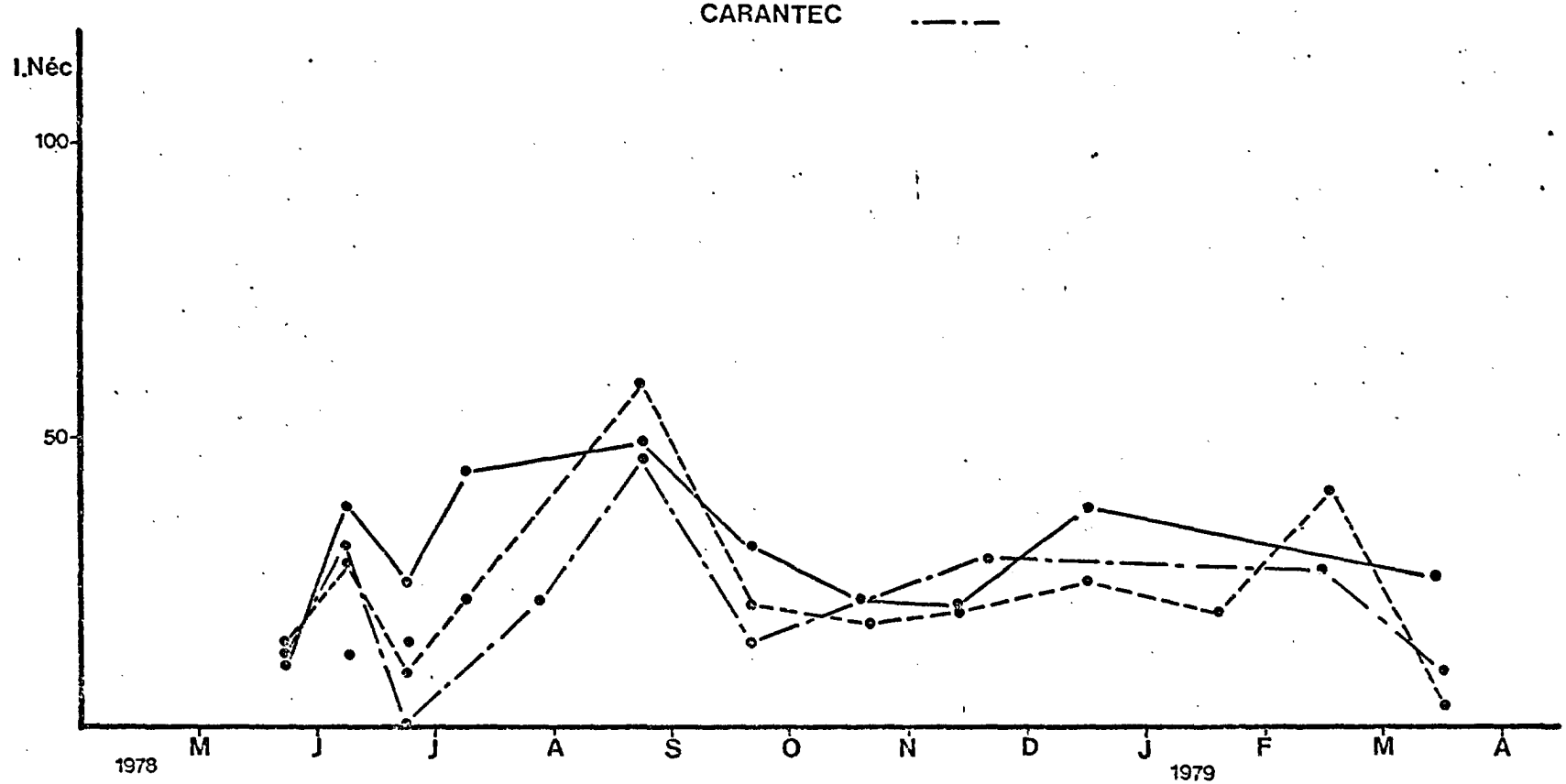
INDICE DE NECROSE

PLATES POLLUTION



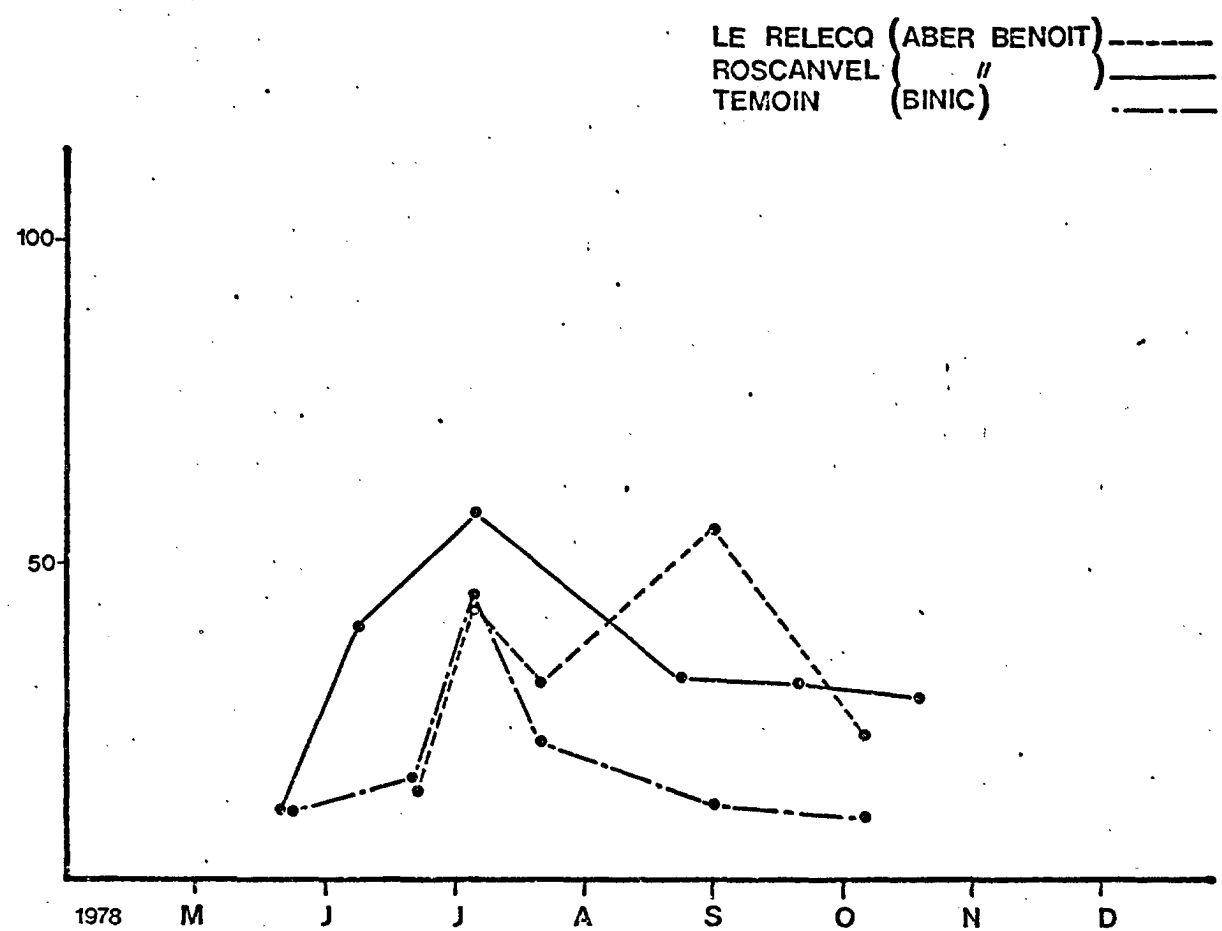
INDICE DE NECROSE

PLATES ADAPTATION



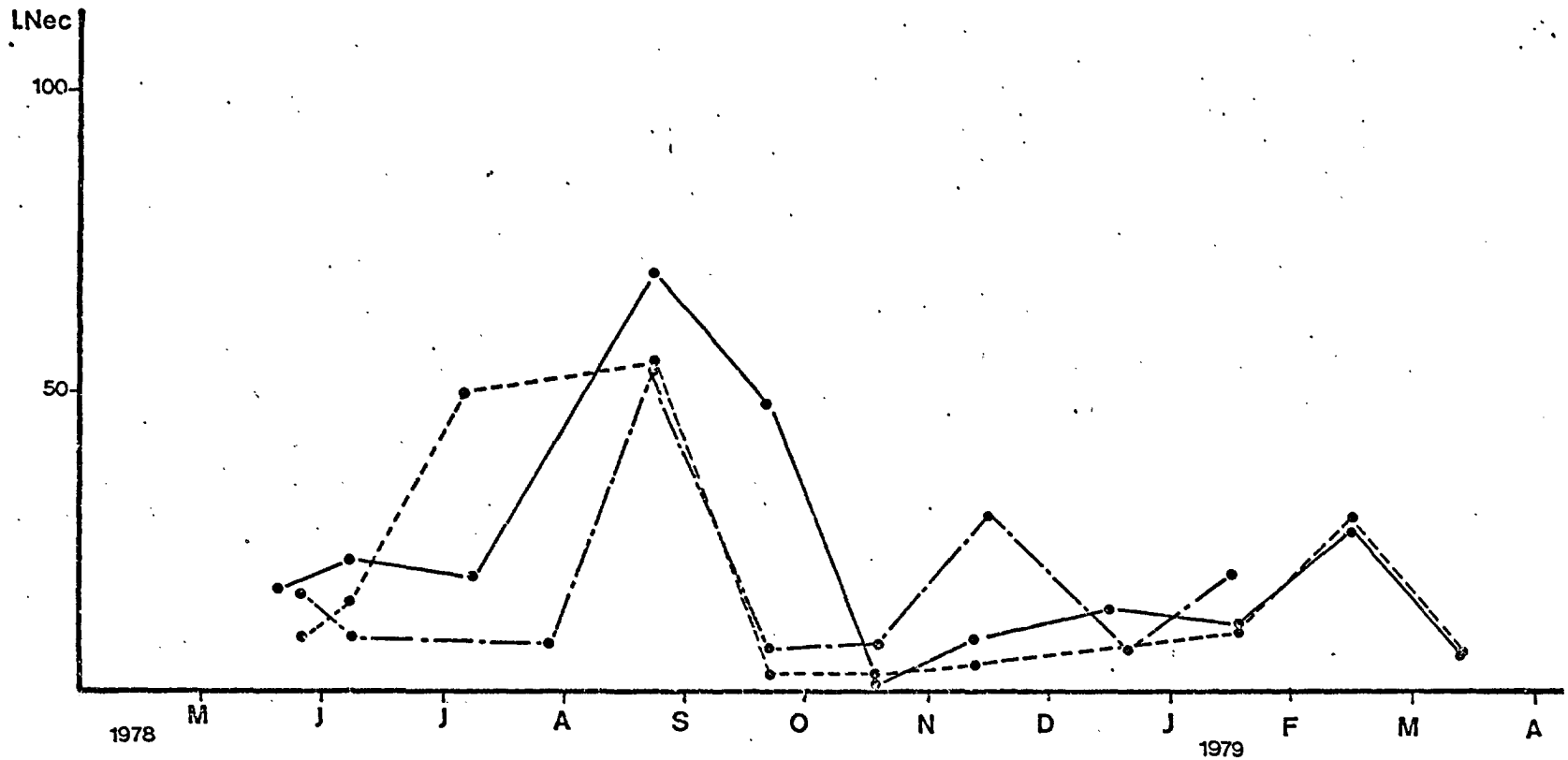
INDICE DE NECROSE

PLATES EPURATION



INDICE DE NECROSE

CREUSES POLLUTION



toutefois dans ces cas une régression moins rapide en période hivernale.

Ces indices restent toujours très supérieurs à ceux des lots témoins de 1977 (variations de 6 à 10 de Mai à Septembre, régression à 2 à partir d'Octobre) (Tableau II).

	05.78	06.78	07.78	08.78	09.78	10.78	11.78	12.78	03.79
ACP	14	20	40	68	16	3	3		23
Rosc.	15	40	58	32	31	29			
ACE Relecq		14	43	31	55	23			
ACA	11	38	44	49	31	22	21	38	26
Témoin 1977	6	5	6		10	2	3		

TABLEAU II : Indices de Nécrose totaux : Huîtres plates de l'ABER-BENOIT

3°) Indices gonadiques

1 - Dans l'ABER-BENOIT, la maturation gonadique pour les lots Pollution et Adaptation a été relativement satisfaisante chez les huîtres plates et creuses, mais il ne semble pas qu'il y ait eu de ponte, seule une involution modérée et tardive de la gonade débutant en Septembre-Octobre (indice gonadique passant de 9,2 à 6,1 pour Ostrea edulis et 31,4 à 23,1 pour Crassostrea gigas).

Cette évolution est différente de celle observée en 1977 dans la même zone (indice gonadique de 18,6 en Août, 3 en Octobre) chez les huîtres plates. Elle est également différente de celle d'un lot de même origine immergé à PAIMPOL en 1978 (indice gonadique de 11,9 en Juillet, 0,8 en Octobre).

2 - A ROSCANVEL, la maturation et la ponte ont été sensiblement normales chez les huîtres plates et creuses des lots Epuration, l'indice gonadique passant de 12,9 à 0,3 pour Edulis, de 15,7 à 5,4 pour Gigas.

3 -A CARANTEC, maturation et ponte correctes pour les huîtres plates (indice gonadique passant de 11,3 à 0,1) et creuses (de 36,4 à 16,5). (Tableau III).

4°) Incidences sur les autres éléments pathologiques

- des huîtres infectées par Marteilia refringens n'ont été trouvées qu'exceptionnellement dans les lots examinés histologiquement (8 cas dans l'ABER-BENOIT, 3 dans l'ABER-WRACH, sur 1480 examens) ; il s'agit toujours de lots Pollution, certainement infectés avant la marée noire.

- les cas d'hyperplasie hémocytaire tumorale sont également exceptionnels : 3 au total (1 dans l'ABER-WRACH, et 2 à CARANTEC), tous dans les lots Adaptation.

5°) Indices de condition globale

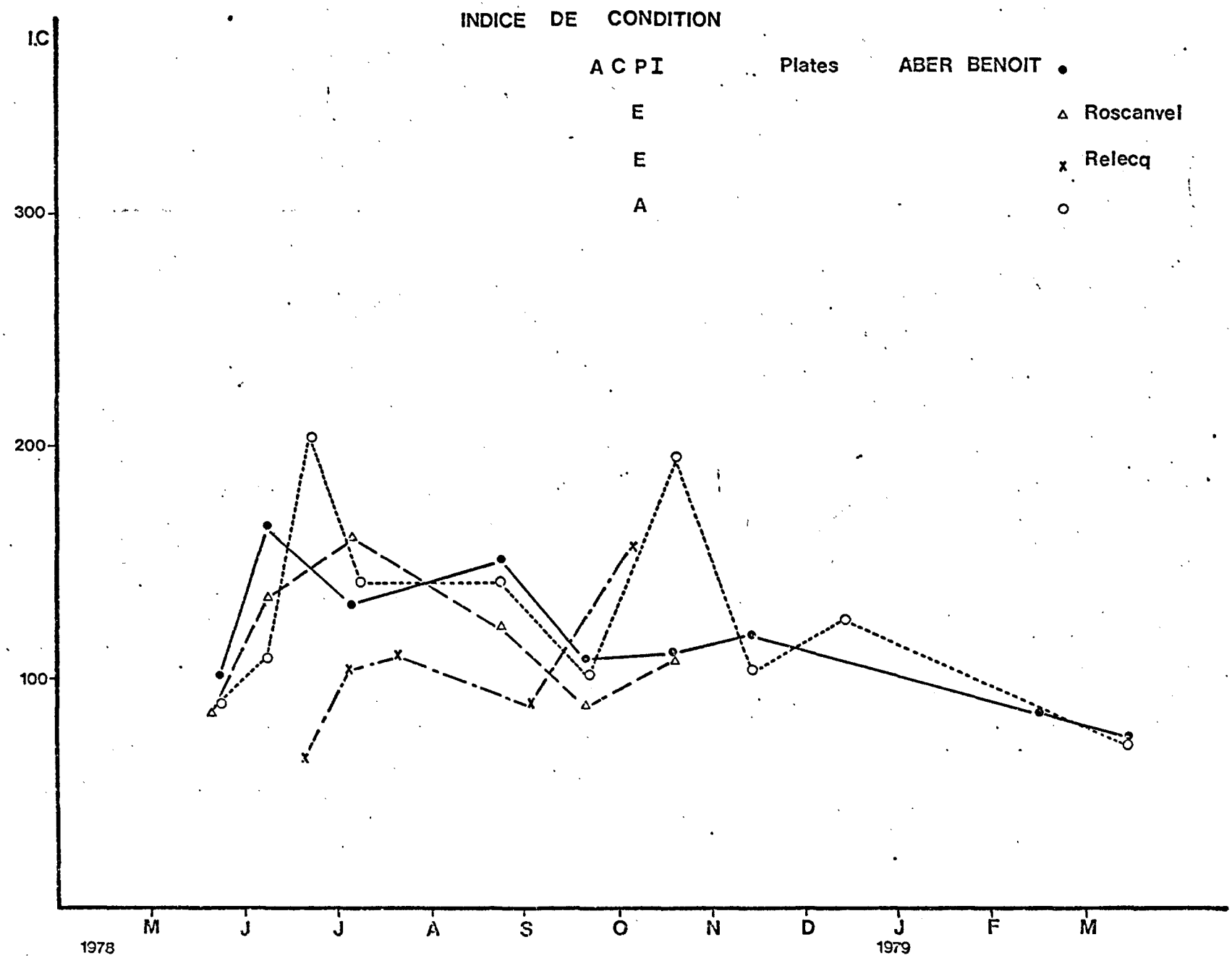
1 - sur les lots du protocole Pollution, l'indice de condition suit une courbe annuelle assez comparable à celle observée en 1977.

- dans l'ABER-BENOIT, indice de condition de 151 en Août, 85 en Février pour Ostrea edulis, 223 en Août et 150 en Février pour Crassostrea gigas.

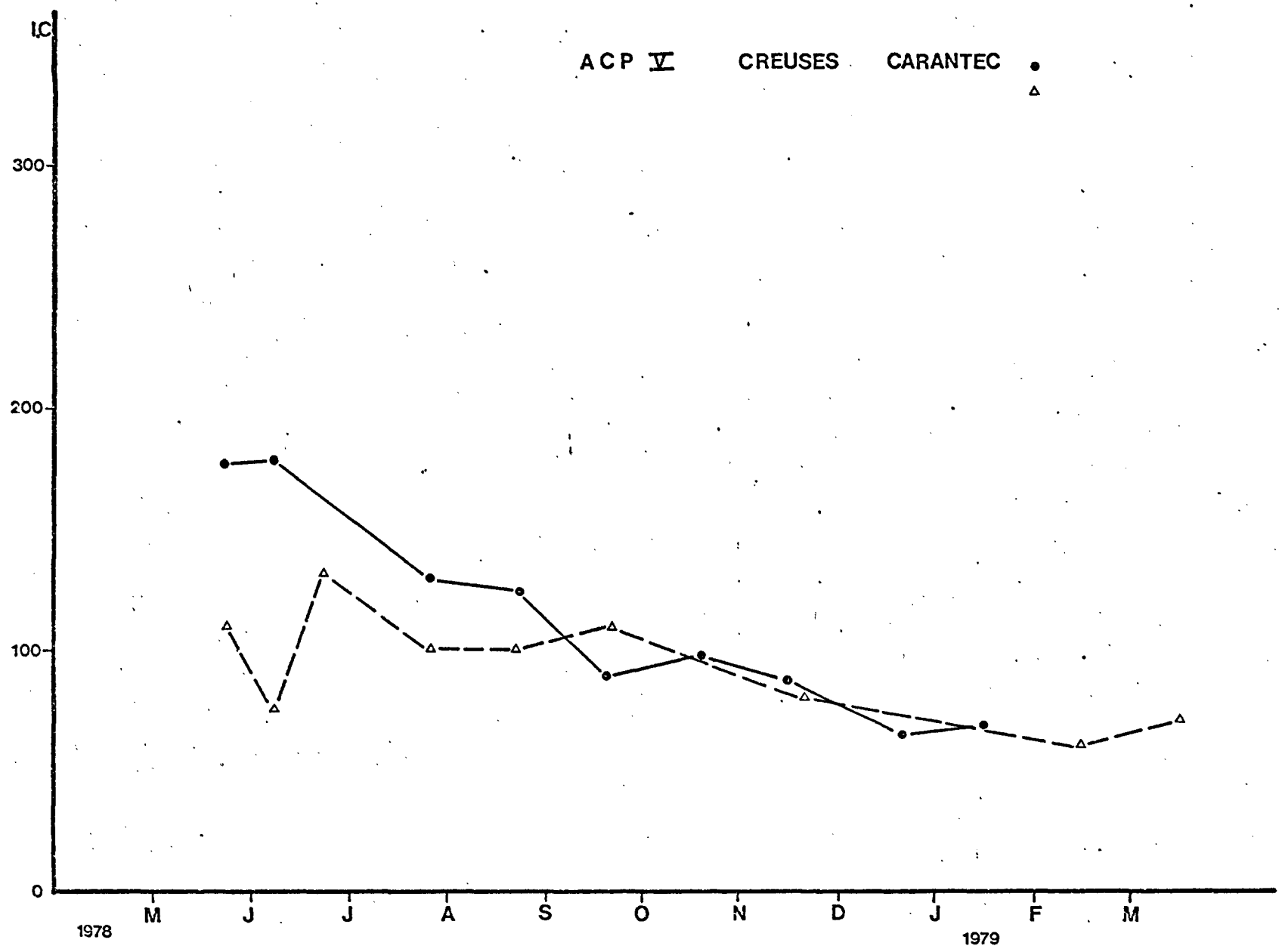
- dans l'ABER-WRACH, les indices passent de 220 à 110 pour Ostrea edulis, 172 à 130 pour Gigas, de Juillet 1978 à Février 1979.

			Mai	Juin	Juillet	Août	Sept.	Oct.	Nov.	Déc.
ABER-BENOIT	ACP	Huîtres plates	5,1	8,7	5,7	9,2	4,1	6,1	4,9	
		Huîtres creuses	11,8	10,6	24,2	31,4	23,1	20,2	19,5	
	ACA	Huîtres plates	3,4	8,5	10,1	15,2	7	2,7	6,2	2,8
	Témoin 1977	Huîtres plates		24,6	24,4	18,6	11,6	3		
ROSCANVEL	ACE	Huîtres plates	3,3	6,7	12,9	3,2	0,5	0,3		
		Huîtres creuses	5,6	20,6	15,7		15,1	5,4		
CARANTEC	ACP	Huîtres creuses	7,6	15,7	24,3	36,4	24,2	19,7	16,5	9,6
	ACA	Huîtres plates	5,3	10,4	7,4	11,3	4,1	0,1	0,1	0,1
PAIMPOL	Témoin 1978	Huîtres plates		11,9	11,9	3,1	0,8	0,8		0,9

TABLEAU III : Indices gonadiques (Mai à Décembre 1978)


INDICE DE CONDITION
A C P I
E
E
A
Plates
ABER BENOIT
Roscanvel
Relecq
I.C
300
200
100
M
J
J
A
S
O
N
D
J
F
M
1978
1979

INDICE DE CONDITION



2 - A CARANTEC par contre, les huîtres creuses des lots Pollution et Adaptation subissent une chute importante de l'indice de condition, qui passe de 177 à 70 et 110 à 62, de Mai 1978 à Janvier-Février 1979 (tableau IV).

Il n'y a donc pas, dans les ABERS, après un an, de répercussion sensible de la marée noire sur la qualité (commerciale) de l'huître ; l'évolution à CARANTEC est beaucoup plus péjorative, les indices inférieurs à 80 témoignant le plus souvent d'altérations profondes du mollusque, qui demanderont à être surveillés lors du prochain cycle.

III - CONCLUSION - DISCUSSION

A - Macroscopiquement et d'après les données de l'indice de condition, les altérations des huîtres sont moins importantes qu'initialement envisagées, la seule évolution inquiétante se produisant dans la zone de CARANTEC.

B - Histologiquement, les lésions, correspondant à une nécrose cellulaire non spécifique, épithéliale ou gonadique, et à une réaction inflammatoire hémocytaire, prédominent toujours dans le tube digestif, puis les zones interstitielles et les gonades.

Ces modifications, et particulièrement les altérations digestives, sont toujours plus marquées que chez les lots témoins.

Ces lésions sont toujours identiques chez les huîtres plates et les huîtres creuses ; elles sont par contre plus importantes

			Mai 78	Juin	Juillet	Août	Sept.	Oct.	Nov.	Déc.	Jan. 79	Février	Mars
ABER-BENOIT	ACP	Huîtres plates	102	164	132	151	108	112	118			85	74
		Huîtres creuses	130	140	223	198	95	154	166		178	150	134
ABER-WRACH	ACP	Huîtres plates	81	160	220	159	118	118	244		143	110	130
		Huîtres creuses	161	138	172	165	111	153	114	100	160	130	
CARANTEC	ACP	Huîtres creuses	177	179	130	125	90	99	89	66	70		
	ACA	Huîtres creuses	110	76	101	101	110		82			62	73

TABLEAU IV : Indices de condition (Mai 1978 à Mars 1979)

dans les lots transférés (Epuration en particulier), le déplacement constituant sans doute un facteur de stress supplémentaire, dont l'action paraît prolongée pendant plusieurs mois ; dans tous les lots, les lésions sont encore marquées, et en apparence stabilisées à un niveau 8 à 10 fois supérieur à la normale après un an d'évolution.

C - Il ne semble pas qu'il y ait eu de ponte gonadique tant dans les lots d'huîtres plates que d'huîtres creuses provenant des protocoles Pollution et Adaptation dans l'ABER-BENOIT, alors que les témoins de 1977 dans la même zone, ceux de 1978 à ROSCANVEL et à PAIMPOL, et les lots du protocole Epuration immergés à ROSCANVEL ont eu une ponte normale. Associés à la présence d'altérations histologiques dégénératives assez sensibles dans la glande génitale, ces faits amènent à surveiller, pour 1979, la capacité de reproduction des huîtres polluées.

D - La pollution n'a eu, à ce jour, aucune influence sur les lésions pathologiques déjà connues dans les ABERS et à CARANTEC.

- le nombre des lésions tumorales est très faible, comparable à celui des autres zones et des années précédentes.

- la parasitose à Marteilia refringens, en très nette régression depuis deux ans, persiste dans quelques huîtres, certainement antérieurement infectées. L'absence, depuis 1977, de nouveaux cycles de contamination dans les ABERS ne permet aucune conclusion sur les interactions Pollution-Maladie Parasitaire.

C O N C L U S I O N

Compte-tenu des données précédemment exposées et des discussions techniques concernant chacun des aspects du présent travail, il peut être tenté de résumer les conclusions auxquelles il a conduit concernant les "effets" de la pollution par les hydrocarbures de l'AMOCO CADIZ sur l'ostréiculture.

I - En ce qui concerne le devenir global des huîtres laissées sur place (protocole "Pollution"), il convient de noter l'importance relativement réduite de la mortalité, immédiatement et après un an, par rapport au pronostic pessimiste qui avait été formulé aussitôt après le naufrage. Un an après, un nombre appréciable des huîtres polluées sont encore vivantes, macroscopiquement peu modifiées, et présentent un indice de condition relativement satisfaisant sauf dans la région de CARANTEC. Cependant, ces huîtres présentent d'importantes altérations histologiques, avec un indice de nécrose tissulaire qui reste stabilisé à des chiffres dix fois supérieurs à la normale après un an, aussi bien chez les huîtres plates que chez les huîtres creuses.

En outre, il a été noté chez toutes les huîtres (protocoles "Pollution" et "Adaptation") présentes dans l'ABER-BENOIT

en 1978-1979 des altérations cellulaires des gonades, en même temps que des modifications de l'indice gonadique : compte-tenu de l'affinité des constituants lipidiques de la glande génitale pour les hydrocarbures, ces altérations posent le problème de la capacité de reproduction de ces lots lors du cycle 1979.

II - L'ensemble de ces modifications doit être rapproché des résultats obtenus dans les dosages des hydrocarbures, totaux et surtout fractionnés par chromatographie : les taux obtenus sont très élevés dans les ABERS, moins importants en Rivière de PENZE et à CARANTEC, mais demeurent très supérieurs à la normale après un an (taux résiduels de 50 à 10 fois supérieurs aux chiffres considérés comme normaux trouvés en Rivière d'AURAY).

Les fluctuations importantes observées dans l'année dans les différents secteurs étudiés sont certainement les résultats de deux processus opposés, d'une part la décontamination spontanée in situ, d'autre part la re-pollution par des hydrocarbures piégés par les sédiments. Ceci est confirmé par les résultats du protocole "Adaptation", qui objectivent bien la contamination rapide d'huîtres transférées après un mois, puis après sept mois, en zones polluées, contamination qui évolue globalement de façon parallèle à celle observée dans les huîtres laissées en place.

Par ailleurs, les analyses par chromatographie ont mis en évidence l'élément essentiel que représente la rétention sélective, aussi bien dans les protocoles "Pollution" qu'"Adaptation", des hydrocarbures aromatiques, essentiellement alkylés, par rapport aux aliphatiques rapidement éliminés. Ces produits, dont certains sont toxiques et ne sont en outre pas métabolisés, et qui représentent à la fin de nos observations 76 % de la totalité des hydrocarbures retenus, sont très certainement la cause de la persistance des lésions histologiques observées.

III - Les résultats des protocoles "Epuration" après transfert en zones saines ont par ailleurs mis en évidence deux faits importants : d'une part, le stress supplémentaire que représente le déplacement, stress dont l'effet paraît prolongé avec indices de nécrose moyens plus élevés dans ces lots ; d'autre part, la nécessité, s'il est décidé, d'un transfert rapide, les capacités d'épuration des hydrocarbures - et là encore tout spécialement des fractions aromatiques préférentiellement retenues - étant très abaissées lorsque le transfert est effectué après 45 jours (et au-delà) de séjour en zones polluées, avec dans ces cas une demi-vie d'au moins quatre mois pour les hydrocarbures aromatiques toxiques.

IV - Sur le plan pratique et des incidences sanitaires, malgré la survie apparemment rassurante des stocks pollués, il paraît donc évident que :

- les altérations histologiques constatées, reflets très probables de la persistance des taux élevés d'hydrocarbures, amènent à faire d'importantes réserves sur le devenir de ces stocks.

- la rétention préférentielle d'hydrocarbures toxiques dans ces huîtres les rend impropres à la consommation. Si les risques cancérigènes et mutagènes du produit retenu ne peuvent être actuellement exactement pesés, ces risques demeurent et doivent faire observer la plus grande prudence avant la mise en oeuvre de tests précis de mutagénicité.

La rétention d'hydrocarbures, et tout spécialement des fractions aromatiques toxiques, constitue donc, dans l'état actuel de nos résultats, l'indicateur de choix de la pollution.