

Annexes

Annexe A - Les travaux en mer	103
A.1. Les chalutages	103
A.2. Les prélèvements à la benne.....	104
A.3. Les plongées	107
A.3.1. Le microphytobenthos	107
A.3.2. La méiofaune et la petite macrofaune benthique	107
A.3.3. L'interface sédimentaire et le sédiment superficiel.....	110
Annexe B - La caractérisation des sédiments	111
B.1. Les analyses granulométriques.....	111
B.1.1. La granulométrie sur colonne de tamis normalisés AFNOR.....	112
B.1.2. La micro-granulométrie laser	113
B.2. Les essais rhéologiques	114
B.3. L'interprétation bio-sédimentaire	114
B.4. La teneur en matières organiques	115
Annexe C - La mesure de la contamination par les PCB	116
C.1. La purification	116
C.2. Le dosage.....	117
C.3. La validation de la méthode analytique.....	119
Annexe D - L'étude du benthos.....	120
D.1. Le dosage de la chlorophylle a et des phéopigments	120
D.2. Le tri du méiobenthos et de la petite macrofaune benthique.....	120
D.3. Le tri du macrobenthos.....	122
Annexe E - Les données biologiques sur les soles.....	123
E.1. Les mesures et les prélèvements.....	123
E.2. Les contenus stomacaux	123

Annexe A - Les travaux en mer

A.1. Les chalutages

Les opérations de chalutage se sont déroulées du 1er au 8 septembre 2007 et du 8 au 12 septembre 2008.

Deux navires ont été utilisés : le "Léo", vedette de 5 m de longueur de l'Ifremer, pour les fonds inférieurs à 4 m et le chalutier professionnel "Le Redoutable" pour les zones plus profondes (**Figure A 1**). Des stations chalutées en parallèle ont permis une comparaison du travail des deux navires.



Le Léo



Le Redoutable

Figure A 1 : Les deux bateaux utilisés pour les chalutages.

Les deux navires ont utilisé le même chalut à perche de 2 m de largeur d'un type normalisé pour les prélèvements scientifiques (**Figure A 2**). La description des principales caractéristiques est donnée par Kuipers *et al*, (1992). Une évaluation de la capturabilité du chalut à perche a été présentée en 1985 par Dorel *et al*. Les chalutages ont été réalisés de jour à une vitesse de 2 nœuds et ils ont duré 15 minutes.



Figure A 2 : chalut à perche utilisé pour les pêches de soles.

Au cours de la campagne, une sonde multiparamétrique automatique type Micrel à mémoire (profondeur, température, salinité, oxygène), a été immergée sur la verticale, en station fixe avant le filage du chalut sur les différents points. Les traces des traits ont été enregistrées avec un récepteur GPS.

L'ensemble de l'ichtyofaune a été gardé pour identification et dénombrement (**Figure A 3**). Les soles sont triées de manière à pouvoir être mesurées et pesées individuellement en frais dès le lendemain des pêches. Leurs otolithes ont été prélevés pour détermination ultérieure de l'âge. Selon les classes de taille, tout (au-delà de 9 cm) ou partie des poissons a été âgé par observation des otolithes.



Figure A 3 : tri des espèces pêchées.

A.2. Les prélèvements à la benne

L'ensemble de prélèvements de benthos à la benne a été réalisé en 8 journées à la mer du 04/09/2007 au 13/09/2007 à bord de l'ESTRAN (**Figure A 4a**) et a mobilisé 60 jours-homme y compris la journée de préparation du matériel au laboratoire et à bord du navire (**Tableau A 1**).

Tableau A 1 : Calendrier des prélèvements de benthos.

Site	Date	Personnel & pilote	Station	Embarquement	Nombre benne	Nombre essai nul	Temps station	Trajet inter-station
Installation	03/09/2007	4	-	La Pallice	-	-	-	-
pertuis Breton	04/09/2007	7	15	La Pallice	45	26	15 mn	26 mn
pertuis Breton	05/09/2007	7	17	La Pallice	51	22	13 mn	24 mn
Pertuis Breton	06/09/2007	7	10	La Pallice	30	1	10 mn	21 mn
Pertuis Breton	07/09/2007	7	7	La Pallice	21	1	12 mn	29 mn
pertuis d'Antioche	10/09/2007	7	17	La Pallice	51	1	11 mn	26 mn
pertuis d'Antioche	11/09/2007	7	13	Port des Barques	39	0	10 mn	29 mn
pertuis d'Antioche	12/09/2007	7	10	La Pallice	30	5	18 mn	30 mn
pertuis d'Antioche	13/09/2007	7	9	La Pallice	27	2	9 mn	31 mn

En chaque point retenu, l'échantillonnage en bateau a consisté à recueillir :

- 3 bennes Van Veen de 1/10 m², avec un contrôle qualité sur le rendement de la benne, une benne rempli à moins de 75% de son volume n'étant pas conservée (Figure 4 b,c et d). Il est à noter que les deux premières journées en mer ont permis de mettre au point la façon de travailler avec la benne Van Veen à partir d'essais-erreurs, la manipulation de la benne étant devenue optimale dès le troisième jour de travail en mer avec très peu d'essai nul comptabilisé par jour (Tableau 1). De façon corrélative, le temps passé sur une station a diminué significativement après les deux premières journées pour se stabiliser autour de 10 mn de travail effectif pour réaliser 3 prélèvements successifs, à l'exception de la journée du 12/09/2007 où la durée plus élevée des stations s'explique par les conditions météorologiques défavorables.
- 1 prélèvement de sédiments (< 500 g) pour une analyse granulométrique globale.
- 1 prélèvement de sédiment (2 premiers centimètres) pour une analyse de la teneur en matière organique.

Les opérations en mer, suite à chaque prélèvement ont consisté à :

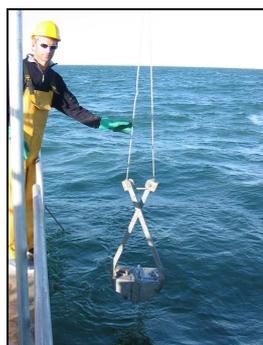
- tamiser l'échantillon à bord sur un tamis de maille de 1 mm de côté (**Figure A 4 e et f**).
- stocker l'échantillon faunistique ainsi tamisé dans une solution d'eau de mer avec formol à 4%.
- stocker le prélèvement granulométrique et le prélèvement pour analyse de la matière organique dans glacière pour analyse ultérieure au laboratoire.



Bateau ESTRAN (a)



Mise à l'eau de la benne Van Veen (b)



Remontée de la benne Van Veen (c)



Validation du prélèvement (d)



Poste de tamisage à bord (e)



Travail de tamisage sur tamis de 1 mm (f)



Exemple de faune observée (g)



Exemple de faune observée (h)

Figure A 4 : Illustration des différentes phases d'un prélèvements à la benne Van Veen sur l'ESTRAN (a), depuis la mise à l'eau (b), la remontée du prélèvements (c), sa validation (d) et son tamisage sur maille de 1 mm de côté (e & f). Exemples de faune récoltée (g & h). Photo P.-G. Sauriau ©

A.3. Les plongées

Les plongées ont été effectuées en 2007, du 3 au 7 septembre et du 17 au 21 septembre, et en 2008, du 8 au 12 septembre et du 22 au 26 septembre.

Chaque année, les dix jours nécessaires ont été divisés en deux périodes, compte tenu de la nécessité de travailler en mortes eaux. Deux bateaux ont été mobilisés (**Figure A 5**), l'un support des plongeurs, l'autre support des travaux de traitement des échantillons.



Figure A 5 : Les deux bateaux supports, à quai : à gauche, l'HASLEA (plongeurs) et à droite, le LEO (Traitement des échantillons).

A.3.1. Le microphytobenthos

Les prélèvements de la partie superficielle du sédiment ont été réalisés avec des seringues mise au point spécialement pour l'opération pour pouvoir extraire l'interface sédimentaire (**Figure A 7**), à raison de trois échantillons par plongée.

En surface (bateau support des traitements), 2 cm de sédiment de chaque seringue sont mis dans un petit flacon référencé sans l'eau surnageante. Ces flacons sont ensuite stockés dans une glacière très froide (accumulateurs de froid préparés dans le congélateur -20°C) puis, de retour au laboratoire, dans un congélateur à -20°C .

A.3.2. La méiofaune et la petite macrofaune benthique

Les prélèvements pour la collecte de la méiofaune et de la petite macrofaune benthique ont été réalisés avec des carottiers qui ont aussi été mis au point spécialement pour l'opération (**Figure A 6**). Les échantillons ont également été triplés sur chaque point de plongée. Ces carottiers ont 4 cm de diamètre et sont enfoncés de 20 cm.

En surface (bateau support des traitements), chaque carotte est mise avec l'eau surnageante dans un bocal plastique référencé. Les animaux présents dans le

prélèvement sont endormis avec du chlorure de magnésium à 7 % ($MgCl_2$) et 10 minutes plus tard, un mélange d'éthanol 70% et 5% de glycérol est ajouté (Figure 7).

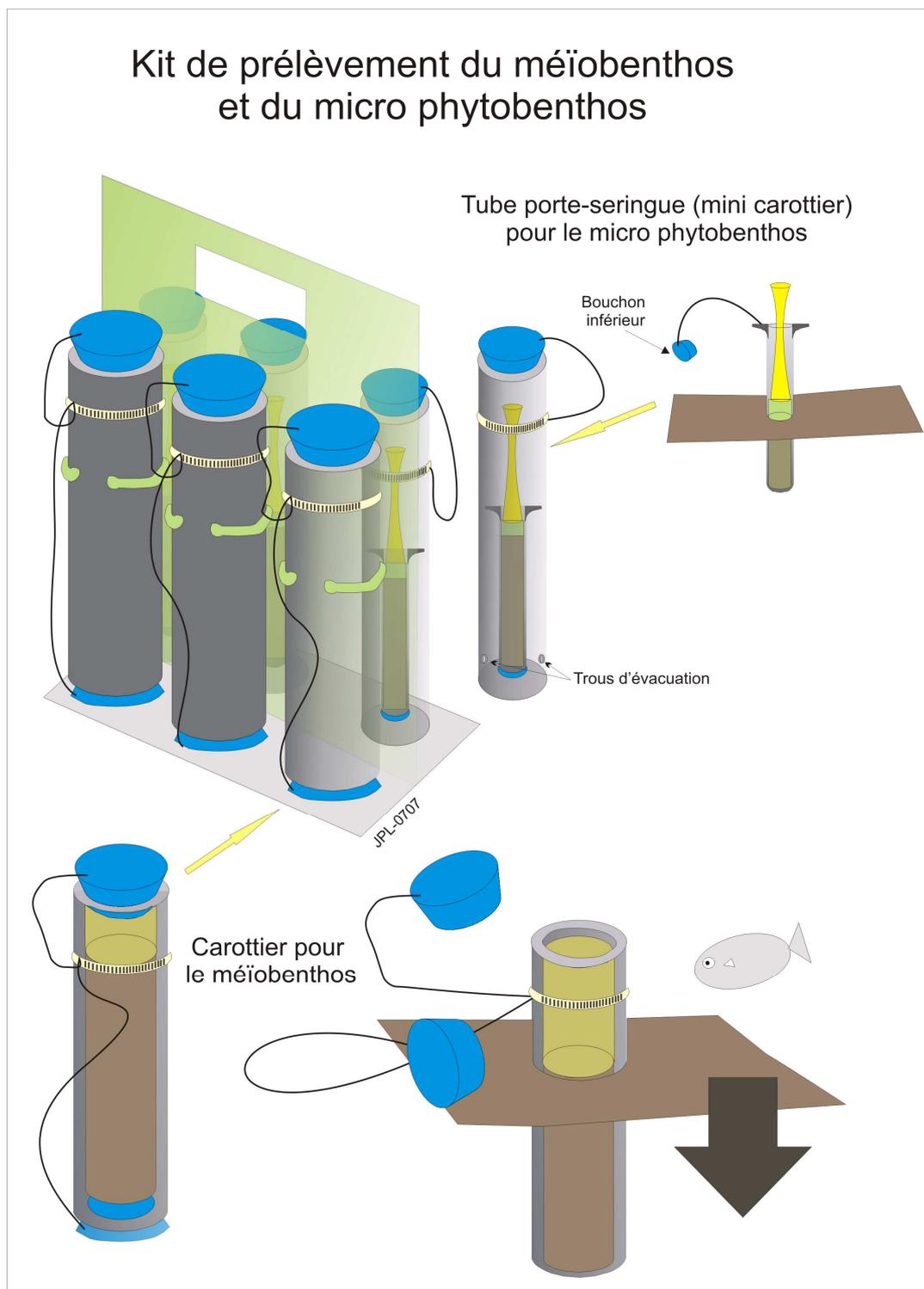


Figure A 6 : matériel de prélèvement en plongée du micro phytobenthos et du méiobenthos.

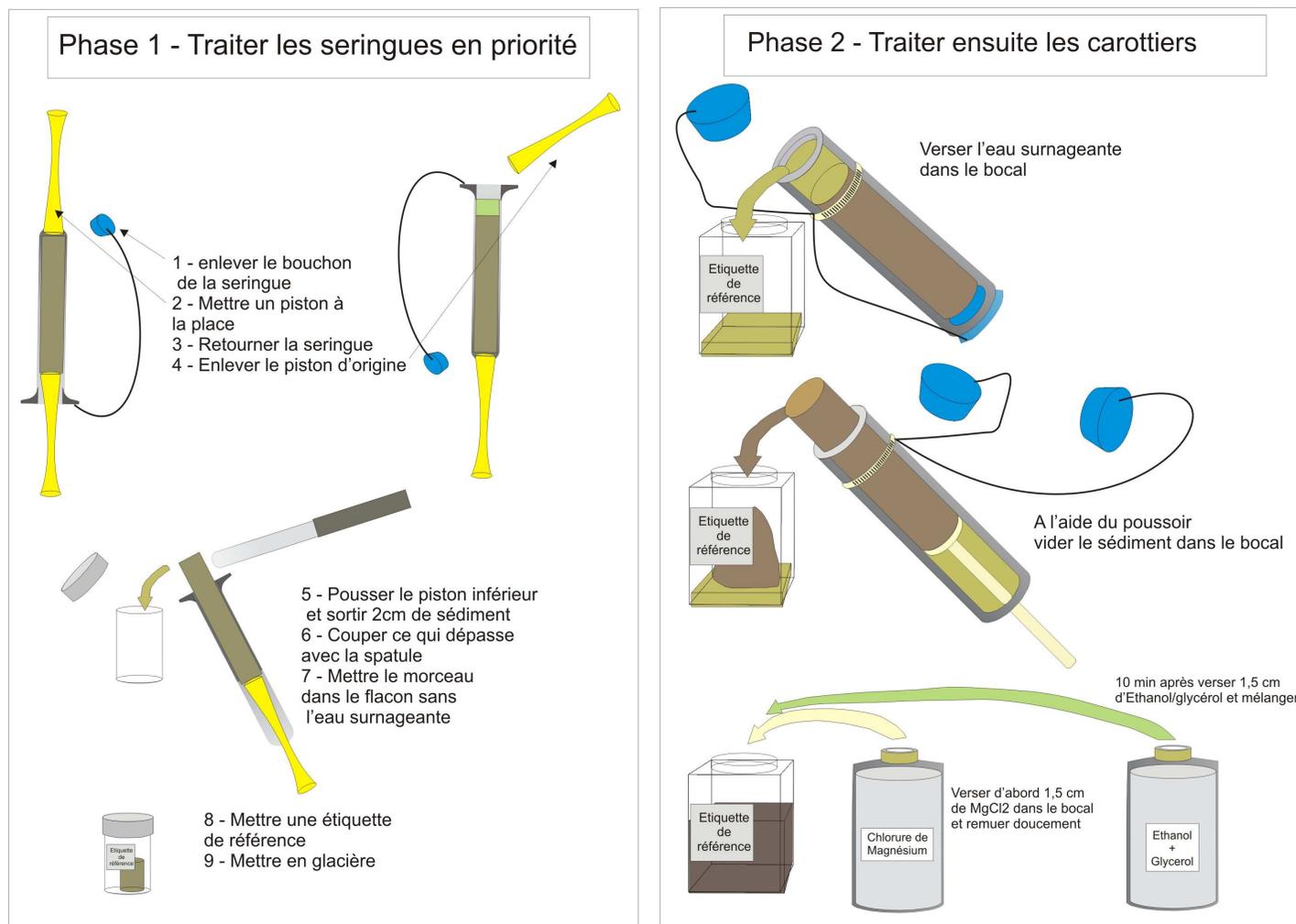


Figure A 7 – Procédures de traitements des prélèvements de sédiments.

A.3.3. L'interface sédimentaire et le sédiment superficiel

Les prélèvements de sédiments ont été de deux types. D'une part, l'interface eau-sédiment a été ponctionnée à l'aide d'une seringue et, d'autre part, un carottage du sédiment a été effectué. Les carottes (20 cm de hauteur et de 10 cm de diamètre) qui en sont issues sont alors découpées (**Figure A 8**) selon les 6 niveaux principaux suivants : 0-0,5 cm / 0,5-1 cm / 1-2 cm / 2-5 cm / 5-10 cm / 10-15 cm. Ces échantillons, ainsi que les prélèvements par seringue, sont ensuite placés dans des petits pots.

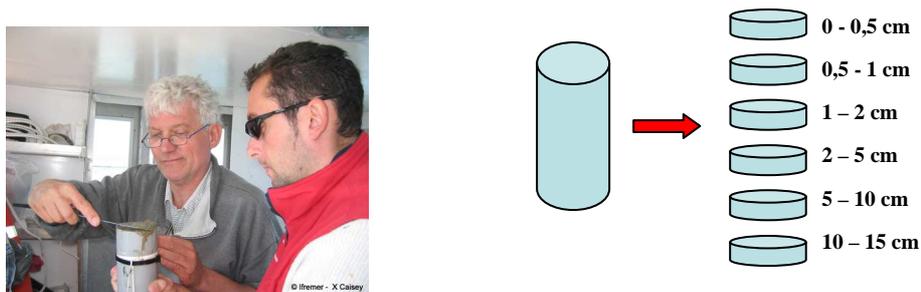


Figure A 8 : Travaux de découpe de la carotte sédimentaire en 6 niveaux principaux

Annexe B - La caractérisation des sédiments

Les sédiments sont caractérisés par des analyses granulométriques (tailles de particules, paramètres de position, de dispersion et de classement), des essais rhéologiques (seuil d'écoulement, viscosité), des mesures des paramètres physico-chimiques basiques (Eh, pH) et un dosage des contaminants organiques.

B.1. Les analyses granulométriques

Le principe de l'analyse repose sur la reconnaissance de classes de tailles dans les sédiments. Il existe 3 principaux types de sédiments : les graviers (supérieur à 2 mm), les sables (entre 2 mm et 63 μm) et les pélites (inférieur à 63 μm) ; ils sont déterminés à partir des échelles granulométriques AFNOR et unité Φ (**Tableau B 1**).

Tableau B 1 : Echelles granulométriques AFNOR et unité Φ (Cojan & Renard, 1999).

MOYEN D'ÉTUDE	AFNOR		UNITÉS		CLASSIFICATION		
	α	mm	Φ	Wentworth	Cailleux		
mesure directe	-24	250-256	-8	BLOCS (BOULDERS)	RUDITES	BLOCS	
	-18	63-32	-5	GRAVE (COBBLE)		GALETS	
	-6	4	-	CAILLOUX (PEBBLE)			
	microscopie binoculaire tube de sédimentation tamisage	-3	2	1	GRANULES	ARÉNITES (SANDS)	GRAVILLONS
		-2	1,6		TRÈS GROSSIER		
		-1	1,25				
		0	1	0	GROSSIER		
		1	0,8				
		2	0,63				
		3	0,5	1	MOYEN		
5		0,315	2	FIN			
9		0,125	3	TRÈS FIN			
12		0,0625-1/16	4	GROSSIER	LUTTES (SILTS) (CLAYS)		SABLONS
14	0,04	5	MOYEN				
17	0,02	6	FIN				
20	0,01	7	TRÈS FIN				
24	0,004-1/256	8					
	0,00006	14					

B.1.1. La granulométrie sur colonne de tamis normalisés AFNOR

Chaque prélèvement est vidé dans un bol numéroté pour être séché à l'étuve à 100°C pendant au minimum 72h. Un sous-échantillon de 100g (200g pour les sables) est remouillé dans un défloculant (méta-phosphate de sodium à 40g /l), et malaxé avec une spatule pour désagréger les amas. Après 24 h au minimum, l'échantillon est tamisé à l'eau sur un tamis de maille 63 μm jusqu'à obtenir un filtrat clair. Le refus de tamis est récupéré et mis à l'étuve à 100°C pendant au minimum 72h.

Le refus de tamis est ensuite passé sur une colonne de tamis normalisés placée sur une vibreuse Retsch (**Figure A2**) pendant 15 minutes à 2000 vibrations par secondes et une oscillation verticale de 1 à 2 mm. La colonne contient 17 tamis (4000 μm , 2000 μm , 1600 μm , 1250 μm , 1000 μm , 800 μm , 630 μm , 500 μm , 400 μm , 315 μm , 250 μm , 200 μm , 160 μm , 125 μm , 100 μm , 80 μm , 63 μm), répartis en deux passages successifs (4000 à 400 et 315 à 63 μm).



Figure A2 : Colonne de tamis normalisés et balance à 0,01 g. Photo P.-G. Sauriau ©

Chaque tamis est pesé vide au préalable du passage sur la vibreuse en colonne de tamisage puis plein avec sa fraction de sédiment après tamisage. Les pesées sont réalisées avec une balance Sartorius FB12CCE-S à une précision de 0,01 g. Les tamis sont débarrassés régulièrement de leurs impuretés grâce à un appareil de nettoyage aux ultrasons Elma.

B.1.2. La micro-granulométrie laser

La mesure de la taille des particules a été faite avec un microgranulomètre à diffraction laser Beckman Coulter LS13320C (**Figure B 3**) pour l'étude des faciès sédimentaire et en complément de la méthode précédente pour la détermination des type bio-sédimentaire, dans le cas de prélèvements vaseux dont le diamètre moyen est inférieur à 63 μm .

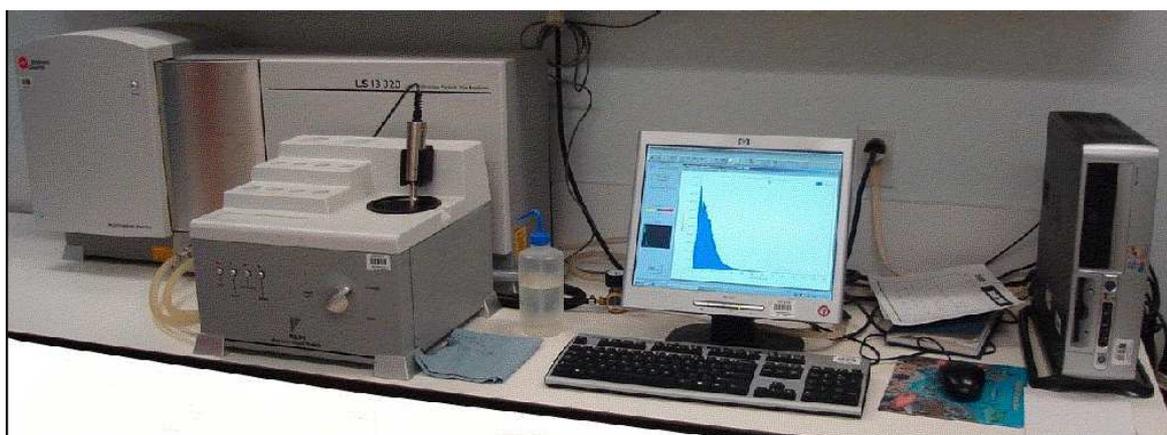


Figure B 3 : Granulomètre laser LS13320 Beckman coulter.

Des séries de 3 essais (eau de mer filtrée et sans traitement chimique) a été réalisée pour chaque échantillon préalablement bien homogénéisé. Ceux-ci doivent aboutir à l'obtention de 3 courbes en fréquences très similaires (**Figure B 4**). Dans le cas contraire, on procède à un nombre impair d'essais supplémentaires). On en déduit d'abord la moyenne et la médiane, puis les fractions principales et secondaires, fondées sur les 3 pôles "argileux", "silteux" et "sableux", à fins de classification texturale (suivant le modèle de Flemming), enfin des paramètres statistiques indiquant des états de dispersion et de classement des particules.

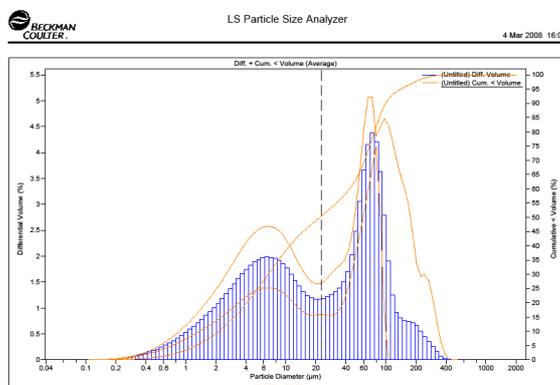


Figure B 4 : Exemple de courbe granulométrique et ses principales caractéristiques (distribution bimodale - moyenne = 44 μ - médiane = 22 μ).

B.2. Les essais rhéologiques

Le comportement sédimentaire a été caractérisé par des essais rhéologiques (appelés ‘rhéogrammes’). Ceux-ci sont effectués au moins au nombre de trois (des essais supplémentaires sont réalisés dans le cas où il n’y a pas *quasi*-superposition, voire forte similarité, des rhéogrammes). Ils sont réalisés en mode écoulement à partir d’un rhéomètre Anton Paar MCR 301, muni d’un système cône-plan (**Figure B 5**), en suivant le protocole en deux temps, ci-après, avec une température fixée à 18°C (température du fond) : d’abord, une première série de mesures donnant la contrainte de cisaillement (en Pa) en fonction d’un taux de cisaillement (en s^{-1}), lors d’une rampe croissante de vitesses, allant de $10^{-4}.s^{-1}$ à $100.s^{-1}$; puis, une seconde série de mesures, toujours pour déterminer la contrainte de cisaillement, fonction du taux de cisaillement, lors d’une rampe décroissante de vitesses, allant de $100.s^{-1}$ à $10^{-4}.s^{-1}$. Et lors de la ‘descente’ (rampe décroissante), on détermine à $10^{-1}.s^{-1}$, la valeur de la contrainte de cisaillement, correspondant au "seuil d’écoulement apparent" qui est l’équivalent, en terme de dynamique sédimentaire à la ‘contrainte de déformation en masse’ du niveau sédimentaire considéré.

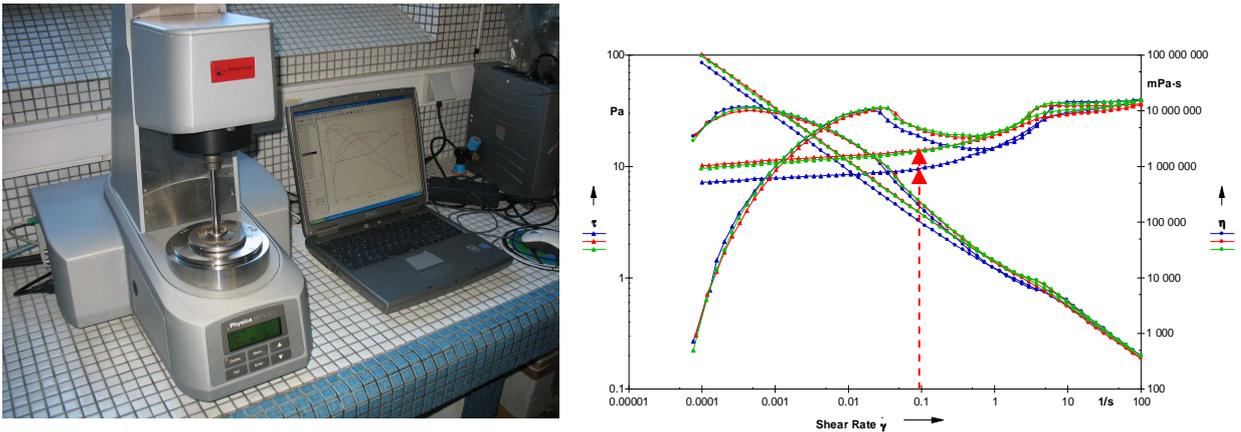
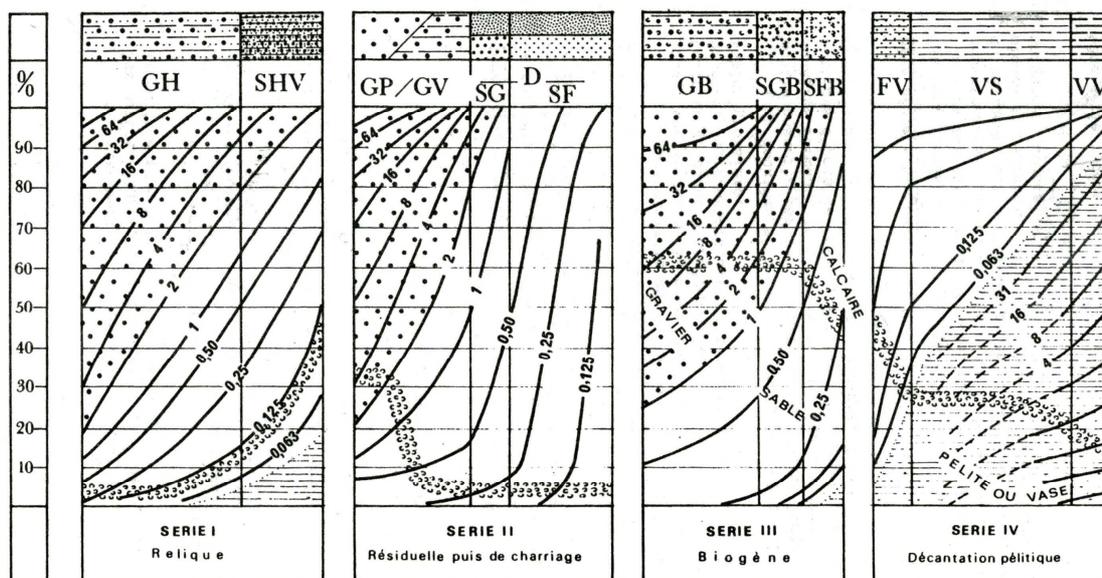


Figure B 5 : Rhéomètre Anton Paar MCR 301 –

Exemple de rhéogramme, avec le seuil d’écoulement apparent (à $10^{-1}.s^{-1}$ – en rouge).

B.3. L'interprétation bio-sédimentaire

La classification bio-sédimentaire de Chassé & Glémarec (1976) utilise des types de sédiments (**Figure B6**). Elle permet en fonction de la courbe des fractions cumulées de déterminer le type sédimentaire : les vases franches ont une fraction 63 μm supérieure à 85 %, pour les vases sableuses elle est comprise entre 85 et 35 % et pour les sables fins envasés entre 35 et 10 %. Les sables fins ont une fraction à 500 μm supérieure à 50 % et pour les sables grossiers elle est comprise entre 17 et 50 %.



SFB sables fins biogènes

D sédiments dunaire

GH graviers hétérogènes sableux

SHV sables hétérogènes plus ou moins envasés

GP graviers propres

GV graviers vaseux

SG sables grossiers

SF sables fins

GB graviers biogènes

SGB sables grossiers biogènes

FV sables fins vaseux

VS vases sableuses

VV vases franches

Figure B6 : À toute verticale du graphique correspond un sédiment déterminé dont on lit, aux intersections avec les courbes d'isodimension, la composition granulométrique en pourcentage pondéral sur l'axe des ordonnées. L'évolution de la teneur moyenne en calcaire est également précisée.

B.4. La teneur en matières organiques

Les échantillons de sédiment prélevés simultanément aux échantillons servant aux analyses granulométriques ont été conservés au congélateur (-20°C). Séchés à l'étude à 60°C pendant au minimum 72h, 1 g sec est prélevé puis calciné à 450°C pendant 8 h afin de déterminer par perte au feu son taux de matière organique.

Annexe C - La mesure de la contamination par les PCB

Pour étudier la distribution des polychlorobiphényles (PCB) présents à l'état de trace dans l'environnement, il est nécessaire de déterminer avec précision leurs concentrations. Le protocole inclut plusieurs étapes : l'extraction de l'échantillon, la purification de l'extrait et finalement l'identification et la quantification par chromatographie en phase gazeuse sur colonnes capillaires de type DB17 et détection par capture d'électrons. Le protocole utilisé pour ces analyses a été mis au point par le laboratoire BE/CO de l'Ifremer à Brest.

La quantification des contaminants organiques présents dans les organismes nécessite une étape d'extraction préalable afin d'isoler les PCB hydrophobes du reste de la matrice. L'extraction au Soxhlet est une des méthodes les plus couramment utilisées pour l'analyse des contaminants organiques dans des matrices de nature différentes (De Boer, 1988 ; Jaouen Madoulet, 2000). Le procédé d'extraction Soxtec®, utilisé pour le projet Fonsole, est un dérivé de cette méthode. Il permet l'extraction en continu de six échantillons lyophilisés, par un mélange de solvants organiques (hexane/acétone = 45 : 10, v/v). L'extraction est réalisée sur une prise d'essais de 50 à 200 mg de poids sec selon le matériel à analyser (muscle, foie, gonade). Au cours de cette étape, il est possible de déterminer la matière extractible hexane / acétone par gravimétrie, qui est proche de la quantité de lipides totaux (Monbet, 1996).

C.1. La purification

L'étape de purification a pour principal objectif d'éliminer tout le matériel extrait autre que les composés recherchés, tels que les lipides, les molécules polaires, les pigments, les macromolécules... Si ce matériel n'est pas éliminé, il peut interférer lors de l'analyse instrumentale finale, soit en contaminant les colonnes chromatographiques et en saturant le détecteur, soit en engendrant des problèmes de co-élution avec les différents congénères de PCB. La purification est réalisée en deux temps :

1/ Hydrolyse à l'acide sulfurique : 2 ml de H₂SO₄ concentré sont ajoutés à l'extrait. Après agitation au vortex, l'émulsion obtenue est laissée à décanter pendant au minimum 12 heures à l'abri de la lumière. Les composés polaires (lipides) passent en solution aqueuse tandis que le surnageant contient les composés hydrophobes (PCB). Celui-ci est donc récupéré, mis à sec, et repris dans 500 µl d'hexane.

2/ Purification supplémentaire par chromatographie d'absorption sur colonne (**Figure C 1**). Cette étape permet d'éliminer les composés polaires restants et les traces d'eau. La purification est réalisée sur des colonnes de Florisil (coprécipité de Magnésie et de Silice: 16% MgO + 84% SiO₂; taille 60/100 mesh soit 0.15/0.25 cm) afin de permettre une excellente séparation des PCB des tissus biologiques complexes. Avant son emploi, le Florisil doit être activé. Pour cela, 100 g de Florisil sont grillés au four (200°C) pendant une nuit, puis 3% d'eau lui sont ajoutés. Des colonnes chromatographiques en verre (hauteur 16 cm ; diamètre 3 mm) contenant 2,35 g de Florisil activé sont ensuite lavées avec 25 ml d'hexane. Sur chaque colonne, 500 µl d'échantillon puis 20 ml d'hexane sont déposés. Le tout est récupéré dans un ballon puis évaporé à sec sous jet d'azote. Enfin, l'extrait purifié est repris dans 450 µl d'isooctane

et 50 μ l de tétrachloronaphtalène (TCN), utilisé comme étalon interne, puis transvasé dans un vial.



Figure C 1 : Purification d'adsorption sur colonne de Florisil

C.2. Le dosage

La dernière étape de ce protocole consiste en l'analyse instrumentale permettant à la fois la séparation des composés, leur identification et la détermination quantitative de seize congénères : CB 28, 31, 52, 101, 105, 110, 118, 128, 132, 138, 149, 153, 156, 170, 180, 194. Parmi ces derniers, 7 composés sont des marqueurs de la contamination par les PCB, deux sont des composés à structure plane de type dioxin-like (CB 105 et 156), et d'autres nous intéressent par leur caractère persistant (CB170, 187 et 194) ou par leur potentiel à être partiellement biotransformés par certains organismes marins (CB110, 132 et 149).

Le dosage des PCB est réalisé par chromatographie en phase gazeuse à haute résolution (**Figure C 2**) selon le principe suivant : les constituants d'un mélange injecté sont entraînés par une phase mobile (gaz vecteur) le long d'une colonne imprégnée d'une phase stationnaire. Chaque composé migre à une vitesse propre, dépendant des interactions du composé avec la phase stationnaire. Le temps de rétention dans la colonne permet l'identification de chaque constituant.



Figure C 2 : L'appareillage de lachromatographie en phase gazeuse

La quantification des composés nécessite la réalisation d'une gamme d'étalonnage établissant la relation entre la réponse du détecteur et la concentration de chaque composé. A titre d'exemple, la **figure C3** représente la droite d'étalonnage du CB153.

CB153

$$\text{Area Ratio} = 0.47434504 \cdot \text{AmtRatio} + 0$$

Correlation: 0.99997

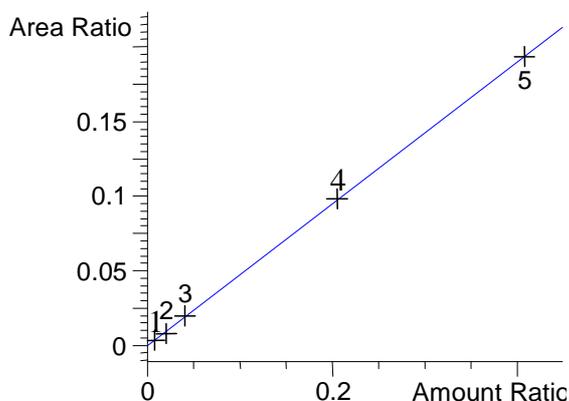


Figure C 3 : Courbe d'étalonnage du CB153

La technique utilisée est celle de l'étalon interne. Elle consiste à mesurer les concentrations des différents composés grâce à des solutions étalons, contenant les composés recherchés en concentrations connues. Afin d'établir la calibration, une gamme d'étalonnage a été réalisée dans l'isooctane. Cette gamme comprend 16 CB, disponibles à l'état pur, et qui sont représentatifs des principaux congénères présents dans les matrices biologiques. Ces composés sont, par ordre croissant de degré de chloration : CB 28/31, 52, 101, 105, 110, 118, 128, 132, 138, 149, 153, 156, 170, 180, 194. L'étalon interne est ajouté aux extraits purifiés juste avant l'analyse. Pour être performant, cet étalon doit posséder des propriétés physico-chimiques similaires à celles des composés étudiés, avoir un temps de rétention différents de ceux des composés

recherchés, ne pas être présent dans les échantillons à analyser et être chimiquement stable.

Pour l'analyse des PCB, l'étalon interne utilisé est le 1,2,3,4-tétrachloronaphtalène (TCN) en raison de sa bonne détection en capture d'électrons et de son temps de rétention différent de ceux des PCB recherchés et des interférences.

C.3. La validation de la méthode analytique

La vérification de l'absence d'une éventuelle contamination des échantillons lors de l'analyse s'effectue grâce à un blanc d'essai. Ce témoin négatif est traité suivant le même protocole que les autres échantillons, tous les 10 échantillons. Il garantit que les composés détectés dans les échantillons ne proviennent pas d'une contamination lors de l'analyse. Les blancs d'analyse ont été comparés au chromatogramme du plus petit standard (8,2 ng/mL) (**Figure C 4**).

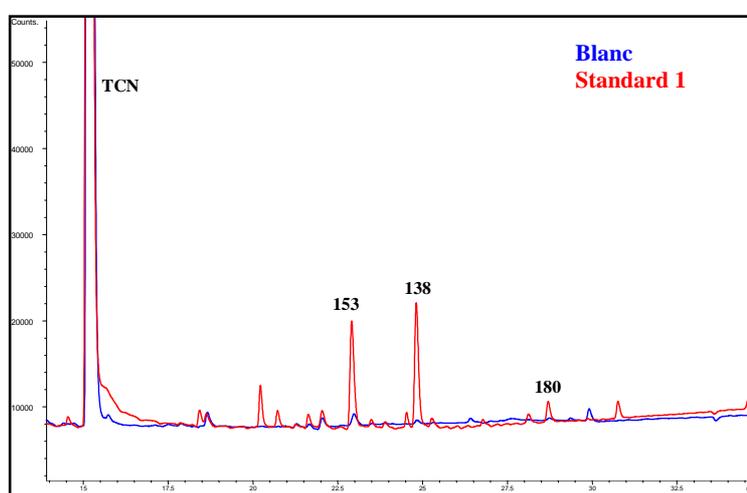


Figure C 4 : Comparaison d'un chromatogramme d'un blanc d'essai et du plus petit standard.

La répétabilité du protocole a été testée sur un échantillon certifié. Quatre réplicats, avec une prise d'essai de 0,1g ont été réalisés. Les coefficients de variation ($C.V. = E.T. / M * 100$) sont compris entre 5 et 36%, mettant en évidence une bonne reproductibilité de la méthode. Pour la suite des analyses, une matrice de laboratoire sera régulièrement analysée afin de s'assurer de la répétabilité du protocole au cours du temps

La vérification de la justesse des mesures s'effectue grâce à un échantillon certifié d'huile de foie de morue (CRM 349 du Bureau Communautaire de Références de Bruxelles : BCR). Les concentrations en PCB obtenues avec notre mode opératoire ont été comparées aux valeurs certifiées ainsi qu'à celles d'un autre manipulateur du laboratoire. Cet échantillon certifié nous permet de contrôler la qualité des analyses de routine par leur utilisation à intervalles de temps réguliers (tous les 20 échantillons).

Annexe D - L'étude du benthos

D.1. Le dosage de la chlorophylle a et des phéopigments

Les échantillons de sédiments prélevés pour analyse de leurs teneurs en pigments chlorophylliens (Chl *a*) et phéopigments totaux ont été conservés à l'obscurité et à moins 20°C avant d'être lyophilisés. Le poids total de l'échantillon est déterminé pour estimer la concentration de pigments par unité de volume prélevé.

Le sédiment est ensuite broyé. Un sous-échantillon de 120 à 200 mg est pesé dans un tube pyrex de 10 ml et la détermination de sa teneur en pigments est réalisée suivant la méthode Fluorimétrique (Yentsch et Menzel, 1963 ; Holm-Hansen et al. ,1965 ; Lorenzen, 1966). Après ajout de 8 ml d'Acétone 90 % , les tubes sont placés sur un agitateur par retournement dans un frigo à 4°C et à l'obscurité pendant 16h à 18 h. Les manipulations se font en lumière atténuée. Les tubes sont ensuite centrifugés à 2000 t/mn pendant 10 minutes à 4°C pour limiter l'évaporation. Un volume de 5 ml est alors transvasé doucement un tube en verre pour lecture de la fluorescence avec un fluorimètre TURNER TD 700 I.

La Fluorescence *F* avant acidification est mesurée quand les tubes sont à température ambiante. On ajoute 10µl d'acide HCL 1N par ml d'extrait (50 µL) et on mélange par retournement. La Fluorescence *Fa* après acidification est lue 3 à 5 mn maximum après l'ajout de l'acide.

Les concentrations en Chlorophylle a et phéopigments sont ensuite calculées :

$$\text{CHLa } \mu\text{g/g} = [((F-Fa) / (K-Ka)) * (v / 1000)] / P \text{ g de sédiment sec de l'aliquot}$$

$$\text{PHEO } \mu\text{g/g} = [((K * Fa - Ka * F) / Ka (K-Ka)) * (v / 1000)] / P \text{ g de sédiment sec de l'aliquot}$$

(*F* = fluorescence avant acidification ; *Fa* = fluorescence après acidification ; *P* = poids de sédiment pesé dans l'extrait de volume *v* ml ; *K* et *Ka* = facteurs d'étalonnage de la chlorophylle a et de la phéophytine a pures)

La teneur en pigments est ramenée au volume prélevé en tenant compte du poids total de sédiment.

D.2. Le tri du méiobenthos et de la petite macrofaune benthique

Les échantillons de sédiment ont été tamisés (mailles de 1mm, 500µm et 50µm) avec lavage à l'eau douce pour élimination des sédiments fins et décantation pour élimination des sables. Les refus de tamis de 50 µm et ceux de 500 µm ont été récupérés séparément dans des flacons pour une extraction ultérieure (50 µm) ou examen à la loupe binoculaire (500 µm), avec ajout d'alcool à 70° pour conservation.

L'extraction de la meiofaune (refus de tamis de 50 µm) a été faite par centrifugation (**Figure D 1**). Ensuite ces refus comme ceux du tamis de 500 µm ont été colorés par

addition de quelques gouttes d'une solution de Rose Bengale (1g/l et 12 heures avant un lavage) pour détermination par principaux taxons (copépodes, nématodes,...) et comptage des individus observés à la loupe binoculaire (uniquement les individus vivants lors du prélèvement sans, par exemple, compter les bivalves qui n'ont plus leur chair).

Préparation d'une solution de Ludox de densité 1,13 à partir du Ludox HS 40 pur en faisant une dilution à l'aide d'un densimètre



Rinçage de l'échantillon sur le tamis de 50 μm avant extraction afin d'éviter des réactions avec le Ludox)



Centrifugation (Centrifugeuse JOUAN CR4i) à 3500 tours/min (2500g) pendant 1 min à 10°C des échantillons dans un flacon à centrifugation de 250ml (50ml d'échantillon pour 200ml d'eau)



Tamissage du surnageant (50 μm) et rinçage à l'eau

Récupération du refus de tamis à l'aide d'une pissette de Ludox dans le flacon à centrifugation et le compléter avec du Ludox (200ml)

Centrifugation à 3500 tours/min pendant 4 min à 10°C et rinçage le surnageant à l'eau sur le tamis de 50 μm

Seconde centrifugation au Ludox

Rassemblement des refus de tamis et conservation à l'alcool



Figure D 1 : extraction de la meiofaune (refus de tamis de 50 μm)

D.3. Le tri du macrobenthos

Un protocole de double-tri des échantillons de benthos a été adopté. Celui-ci correspond à deux opérations indépendantes et successives :

- Le premier tri s'effectue sur des refus disposés dans une bassine (**Figure D 2 a**). Si les refus comportent des débris coquilliers, végétaux ou minéraux de grande taille (bivalves, zostère, plantes halophytes, graviers ou galets), les refus de tamis doivent être tamisés sur plusieurs tamis successifs afin d'homogénéiser l'aspect et la forme des débris (**Figures D 2 b**). La série de tamis à utiliser peut comporter des tamis de 20 mm, 10 mm et obligatoirement en dernier un tamis de 500 μ m. Le premier opérateur effectue un tri des refus de tamis à vue ou éventuellement à la binoculaire si jamais la taille des organismes de la macrofaune présents dans l'échantillon est proche du millimètre.
- Le second tri s'effectue obligatoirement à la binoculaire et concerne les refus de tamis obtenus sur 1 mm. Il a pour but d'optimiser le premier tri et de s'assurer que tous les organismes présents dans l'échantillon ont été collectés. Ces refus de tamis doivent être disposés dans une ou plusieurs boîtes de pétri en réalisant dans chaque boîte une mono-couche de matériaux à trier (**Figure D 2 c**).



Prélèvement brut (a) : couverture de *Spisula solida* (Linné, 1758) mollusque bivalve.



Prélèvement préalablement tamisé sur maille de 20 et 10 mm (b)



Prélèvement préparé pour vérification à la binoculaire (c) Echelle 30 cm. Photo P.-G. Sauriau ©.

Figure D 2 : Exemples d'aspect de refus de tamis avec débris coquilliers de grande taille

Les analyses de tri faunistique ont été réalisés par deux équipes, l'une traitant le pertuis d'Antioche (une personne), l'autre traitant le pertuis Breton (2 personnes). Le protocole de tri suivi par ces deux équipes a été strictement identique. L'ensemble de la faune a été mise dans des bocaux d'alcool à 70% selon les groupes de mollusques, annélides, crustacés, échinodermes et divers groupes.

Annexe E - Les données biologiques sur les soles

E.1. Les mesures et les prélèvements

Chaque poisson a été mesuré, pesé, le poids du foie a été déterminé. Pour les individus les plus gros, le sexe a également été déterminé. Chacun est identifié par un numéro qui permet de lui faire correspondre les otolithes prélevés, ceux-ci étant conservés individuellement. Cette pièce osseuse de l'oreille interne des poissons est un marqueur de la croissance des individus et permet ainsi de connaître leur âge par lecture de coupes fines (**Figure E 1**).

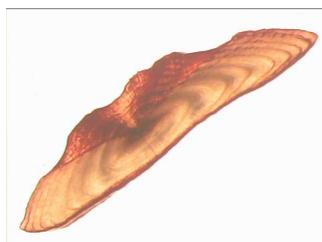


Figure E 1 : coupe fine d'un otolithe (chaque strie correspond à une année)

E.2. Les contenus stomacaux

Les soles ont été conservées congelées pour analyse ultérieure de leur contenus stomacaux. Pour cela, l'estomac vrai est prélevé (la poche stomacale est délimitée par les sphincters œsophagien et pylorique) ainsi que la partie antérieure de l'intestin qui sert d'estomac secondaire (**Figure E 2**), la capacité de stockage de l'estomac vrai étant inférieure au volume journalier de proies ingérées (Laffargue, 2004). La partie postérieure de l'intestin, contenant des éléments très digérés, compacts et peu identifiables, provenant de phases antérieures d'alimentation, n'est pas utilisée pour les analyses.

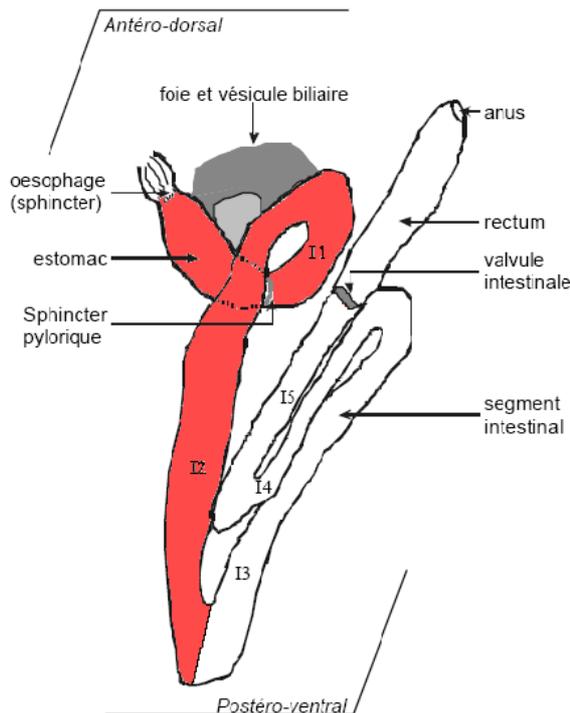


Figure E 2 : Schéma de l'appareil digestif de la sole (source : Laffargue, 2004.).

En rouge la partie du tube digestif prélevée pour l'étude.

L'estomac vrai et la partie antérieure de l'intestin sont pesés pleins (à 0,001 g près), le contenu est vidé dans une boîte de pétri avec un peu d'alcool et enfin, le tube digestif antérieur vide est pesé (à 0,001 g près). La différence des deux pesées donne le poids du contenu stomacal et celui-ci est étudié sous la loupe binoculaire afin d'identifier les proies ingérées.

Lorsqu'il est impossible d'identifier des proies du fait de la digestion complète du bol alimentaire, l'estomac est considéré comme vide.

Quand l'identification des proies est possible, elle se fait à l'aide de clefs de détermination trouvées dans la littérature. L'identification peut aller jusqu'à la famille, le genre voire l'espèce. Les individus sont alors comptés par type de proies.

Lorsque les fragments de proies ne sont identifiables qu'au niveau de l'embranchement (par exemple des articles de crustacés ou des débris de bivalves), le "comptage" s'effectue avec un critère d'abondance (+ : peu abondant ; ++ : moyennement abondant ; +++ : très abondant).