ifremer environnement

R.N.O

Surveillance du Milieu Marin

Travaux du Réseau National d'Observation de la Qualité du Milieu Marin

Edition 1994

MINISTERE DE L'AMENAGEMENT DU TERRITOIRE ET DE L'ENVIRONNEMENT

Ifremer

INSTITUT FRANÇAIS DE RECHERCHE POUR L'EXPLOITATION DE LA MER

SOMMAIRES DES EDITIONS PRECEDENTES

EDITION 1988

LE RNO : PROGRAMMES ACTUELS
NIVEAUX ET TENDANCES DES PARAMETRES PRIORITAIRES
GROS PLAN SUR LES NITRATES EN RADE DE BREST

EDITION 1989-1990

LE RNO : PROGRAMMES ACTUELS
NIVEAUX ET TENDANCES DES PARAMETRES PRIORITAIRES (suite)
GROS PLAN SUR LA SURVEILLANCE DES EFFETS BIOLOGIQUES

EDITION 1991

LE RNO : PROGRAMMES ACTUELS
TENDANCES DES POLLUANTS DANS LA MATIERE VIVANTE
GROS PLAN SUR LA SURVEILLANCE MICROBIOLOGIQUE ET PHYTOPLANCTONIQUE

EDITION 1992-1993

LE RNO : PROGRAMMES ACTUELS
SURVEILLANCE DES ELEMENTS NUTRITIFS ET DE LA CHLOROPHYLLE
QUALITE DU MILIEU MARIN LITTORAL : UNE SYNTHESE

MINISTERE DE L'ENVIRONNEMENT

INSTITUT FRANÇAIS DE RECHERCHE POUR L'EXPLOITATION DE LA MER

Surveillance du milieu marin

TRAVAUX DU RNO

Edition 1994

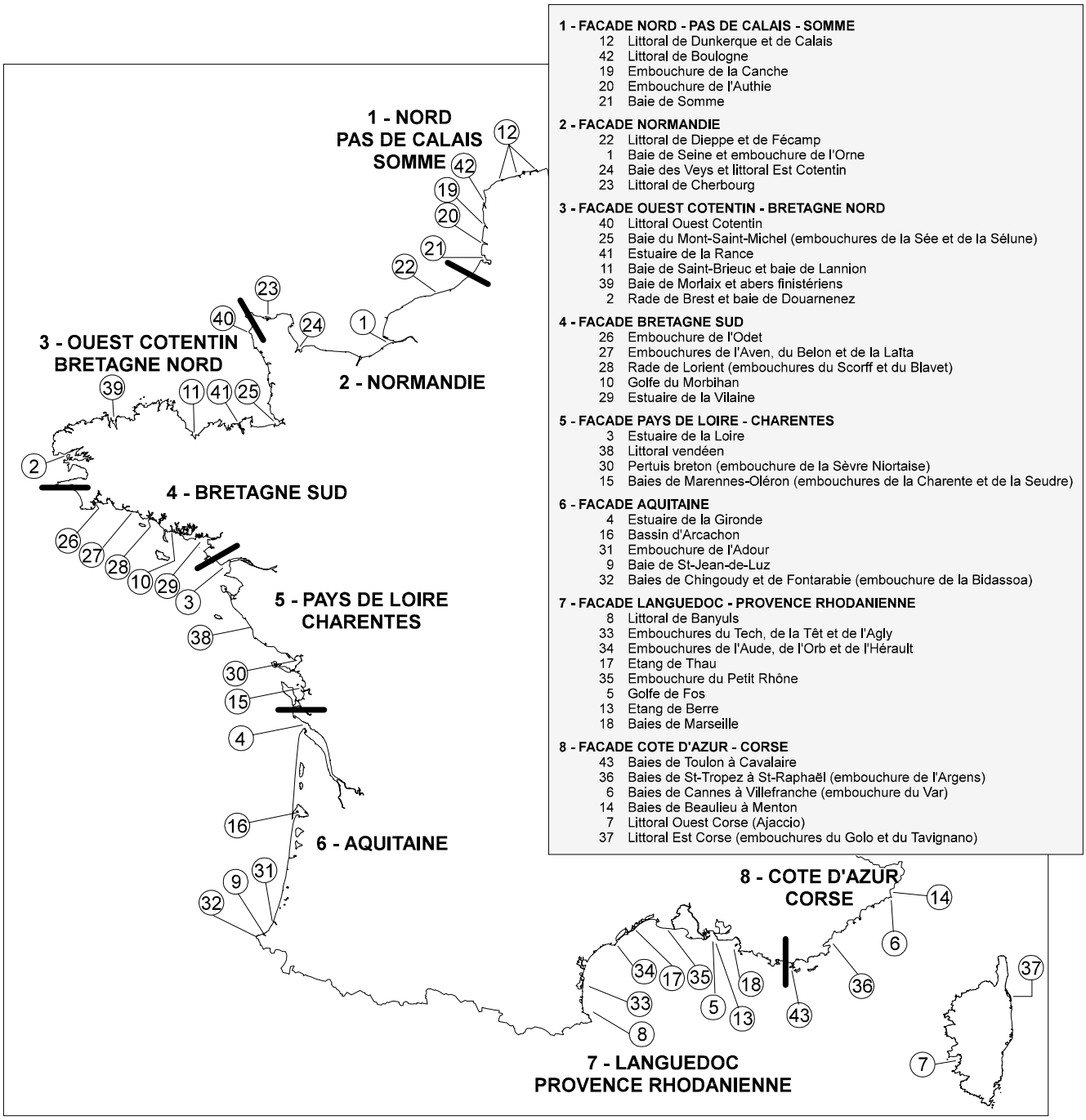
- LE RNO : PROGRAMMES ACTUELS
- SURVEILLANCE DES EFFETS BIOLOGIQUES PAR LA MESURE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE EROD
- L'ARSENIC ET LE CHROME DANS LES COQUILLAGES

DC/BULL94

RESEAU NATIONAL D'OBSERVATION

DE LA QUALITE DU MILIEU MARIN

DISPOSITION DES SITES DE SURVEILLANCE



1 - FACADE NORD - PAS DE CALAIS - SOMME

12	Littoral de Dunkerque et de Calais
42	Littoral de Boulogne
19	Embouchure de la Canche
20	Embouchure de l'Authie
21	Baie de Somme

2 - FACADE NORMANDIE

22	Littoral de Dieppe et de Fécamp
1	Baie de Seine et embouchure de l'Orne
24	Baie des Veys et littoral Est Cotentin
23	Littoral de Cherbourg

3 - FACADE OUEST COTENTIN - BRETAGNE NORD

40	Littoral Ouest Cotentin
25	Baie du Mont-Saint-Michel (embouchures de la Sée et de la Sélune)
41	Estuaire de la Rance
11	Baie de Saint-Brieuc et baie de Lannion
39	Baie de Morlaix et abers finistériens
2	Rade de Brest et baie de Douarnenez

4 - FACADE BRETAGNE SUD

26	Embouchure de l'Odet
27	Embouchures de l'Aven, du Belon et de la Laïta
28	Rade de Lorient (embouchures du Scorff et du Blavet)
10	Golfe du Morbihan
29	Estuaire de la Vilaine

5 - FACADE PAYS DE LOIRE - CHARENTES

3	Estuaire de la Loire
38	Littoral vendéen
30	Pertuis breton (embouchure de la Sèvre Niortaise)
15	Baies de Marennes-Oléron (embouchures de la Charente et de la Seudre)

6 - FACADE AQUITAINE

4	Estuaire de la Gironde
16	Bassin d'Arcachon
31	Embouchure de l'Adour
9	Baie de St-Jean-de-Luz
32	Baies de Chingoudy et de Fontarabie (embouchure de la Bidassoa)

7 - FACADE LANGUEDOC - PROVENCE RHODANIENNE

8	Littoral de Banyuls
33	Embouchures du Tech, de la Têt et de l'Agly
34	Embouchures de l'Aude, de l'Orb et de l'Hérault
17	Etang de Thau
35	Embouchure du Petit Rhône
5	Golfe de Fos
13	Etang de Berre
18	Baies de Marseille

8 - FACADE COTE D'AZUR - CORSE

43	Baies de Toulon à Cavalaire
36	Baies de St-Tropez à St-Raphaël (embouchure de l'Argens)
6	Baies de Cannes à Villefranche (embouchure du Var)
14	Baies de Beaulieu à Menton
7	Littoral Ouest Corse (Ajaccio)
37	Littoral Est Corse (embouchures du Golo et du Tavignano)

PREMIERE PARTIE

LE RNO : PROGRAMMES ACTUELS

1. CADRE GENERAL

Le Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin (RNO) a été mis en place par le Ministère de l'Environnement avec pour premier objectif l'évaluation des niveaux et des tendances des polluants et des paramètres généraux de la qualité du milieu marin.

Les premiers prélèvements ont débuté en juin 1974, et jusqu'en 1978 ont essentiellement porté sur les eaux marines. Par la suite se sont développés les programmes de surveillance dans la matière vivante et le sédiment. Le progrès des connaissances, et notamment une analyse critique des résultats de la période 1974-1984, a permis d'optimiser les programmes "niveaux et tendances".

Mais cette activité ne peut se concevoir sans une surveillance des effets biologiques de la qualité du milieu. Ce deuxième objectif de surveillance qui vise à évaluer l'état de santé de la flore et de la faune marines par la mesure de la réponse de ces organismes à des perturbations de la qualité du milieu, a été introduit en 1987 dans les programmes du RNO.

L'ensemble des activités du RNO est coordonné par l'IFREMER pour le compte du Ministère de l'Environnement.

2. PROGRAMMES EN COURS ET TRAVAUX MENES EN 1993

2.1. Surveillance des paramètres généraux de qualité

Cette surveillance ne porte que sur les masses d'eaux. Les paramètres de base sont la température, la salinité, les sels nutritifs nitrate, nitrite, ammonium, phosphate, la chlorophylle et les phéopigments. Sur certains sites, l'oxygène dissous et le silicate sont aussi mesurés.

Ce type de surveillance est pratiqué sur douze sites : Calais-Dunkerque, baie de Seine, baie des Veys, rade de Brest, rade de Lorient, estuaire de la Loire, Gironde, golfe de Fos, étang de Berre, Cortiou, Villefranche sur Mer - Menton et golfe d'Ajaccio. En Manche-Atlantique, cette surveillance ne comporte en général que deux à cinq campagnes par an, uniquement en périodes hivernale et estivale, et le plan d'échantillonnage s'attache à décrire au mieux l'ensemble de la masse d'eau par des prélèvements répartis sur toute la gamme de salinité. En Méditerranée, des campagnes un peu plus nombreuses (six à douze par an) portent sur un nombre limité de stations fixes. Sur la quasi totalité des sites, les Cellules Qualité des Eaux Littorales du Ministère de l'Environnement avec l'appui des Ports

Autonomes se chargent de l'organisation des campagnes dont les analyses sont confiées aux laboratoires municipaux ou départementaux correspondants.

En 1992, les résultats de cette surveillance sur le littoral du Calvados ont fait l'objet d'une interprétation à la demande de l'Agence Seine-Normandie. Les conclusions de ce travail montrent une certaine redondance avec la surveillance pratiquée par le RNO en baie de Seine et par le RNB, plus en amont sur les rivières. En 1993 il a donc été mis un terme à la surveillance des paramètres généraux de qualité sur le littoral du Calvados. En contrepartie il a été décidé de mettre en oeuvre un programme dans la baie des Veys (site Est Cotentin). Cette surveillance a débuté en 1993. Les deux premières années sont à considérer comme expérimentales. Au vu de ces premiers résultats, un programme définitif sera mis en place à partir de 1995.

Le tableau 1 exprime le volume des travaux menés pour la surveillance de routine dans l'eau en 1993.

N° de façade et site		Nombre de campagnes		Nombre de stations par campagne	Nombre d'échantillons pour l'année
		Hiver	Eté		
1.	Dunkerque	2	1	20	60
2.	Seine (baie)	3	2	10	150
	Seine (estuaire)	6 dans l'année		2	12
	Est Cotentin	2	2	5	20
3.	Brest	3	1	30	120
4.	Lorient	2	2	15	60
5.	Loire	3	2	6	150
6.	Gironde	2	2	10	120
7.	Fos (golfe)	10 dans l'année		5	90
	Fos (Rhône)	12 dans l'année		1	12
	Berre	10 dans l'année		2	70
	Cortiou	6 dans l'année		4	84
8.	Ajaccio	2	1	10	42
	Nice - Menton	8 dans l'année		5	80
TOTAL		**84**		**125**	**1 070**

Tableau 1 : Surveillance 1993 (hydrologie).

2.2. Surveillance des polluants

Compte tenu des difficultés et du coût des analyses à très faible concentration dans l'eau, cette surveillance porte en priorité sur la matière vivante, essentiellement moule et huître utilisées comme indicateurs de contamination. Les polluants suivants sont systématiquement recherchés : mercure (Hg), cadmium (Cd), plomb (Pb), zinc (Zn), cuivre (Cu), polychlorobiphényles (PCBs), DDT, DDD, DDE, lindane (γHCH), αHCH, hydrocarbures polyaromatiques (PAH). Une centaine de stations sur 43 sites du littoral sont échantillonnées quatre fois par an par les agents IFREMER et les analyses sont faites au Centre IFREMER de Nantes pour les métaux et de Brest pour les organiques. Une partie aliquote des échantillons est systématiquement conservée pour d'éventuels contrôles ou pour la recherche ultérieure d'autres polluants.

En 1993, et suivant en cela les recommandations internationales, la mesure des hydrocarbures polyaromatiques (PAH) "totaux" par HPLC et détection infrarouge a été abandonnée au profit de l'analyse de certains hydrocarbures individuels ciblés.

En complément à ce programme principal, et pour satisfaire notamment aux obligations internationales de la France, la surveillance des polluants s'effectue aussi, dans le poisson (baie de Seine et Marseille) ainsi que dans les sédiments. Ces derniers peuvent conserver dans leurs couches successives toute l'histoire chimique d'une région. En fonction des vitesses de sédimentation, des remises en suspension, de la bioturbation, etc., les premiers centimètres de la couche superficielle peuvent intégrer plusieurs années de contamination. Dans ces conditions il est inutile de revenir tous les ans sur un même lieu. Une campagne annuelle portant sur des façades différentes chaque année permet de couvrir en cinq à dix ans l'ensemble du littoral français. En 1993, cette campagne a été réalisée en baie de Seine, donnant lieu au prélèvement de 40 échantillons de sédiments. Les polluants recherchés sont les mêmes que dans la matière vivante, accompagnés des paramètres descriptifs et normalisateurs propres à cette matrice, tels que granulométrie, carbone organique, carbonates, perte au feu, aluminium, fer, lithium, manganèse.

Le tableau 2 exprime le volume des travaux menés pour la surveillance de routine des polluants dans la matière vivante en 1993.

Façade	Nombre de stations	Nombre d'échantillons pour l'année	Espèce
1. Nord - Pas de Calais - Somme	7	28	Moule
2. Normandie	15	60	Moule
	1	25	Flet
3. Ouest Cotentin - Bretagne Nord	7	28	Moule
	9	36	Huître
4. Bretagne Sud	6	24	Moule
	5	20	Huître
5. Pays de la Loire - Charente	5	20	Moule
	11	44	Huître
6. Aquitaine	10	40	Huître
7. Languedoc - Provence rhodanienne	14	56	Moule
	1	1	Sardine
8. Côte d'Azur - Corse	7	28	Moule
TOTAL	**98**	**410**	

Tableau 2 : Surveillance 1993 (matière vivante). Un échantillon se compose de 50 individus de moules ou de 10 individus d'huîtres analysés ensemble, ou d'un poisson dont l'analyse porte sur le muscle et sur le foie pour les flets de Normandie. Dans le cas des poissons de Méditerranée, un seul échantillon composite (25 poissons) est utilisé.

2.3. Surveillance des effets biologiques

Cette surveillance peut se faire à différents niveaux d'organisation biologique (communauté, population, individu, cellule, ...) et met en oeuvre pour chacun des méthodes adaptées. Aussi, il n'existe pas encore vraiment de consensus au plan international sur le choix des techniques à mettre en oeuvre, hormis la nécessité de parvenir à ce consensus compte tenu de son importance. Toutefois, des recommandations de techniques appliquées à la surveillance d'effets biologiques ont été incorporées aux programmes de surveillance de la North Sea Task Force (NSTF) sur proposition des différents pays, et donc au RNO qui y participe. Les groupes zoologiques concernés sont la macrofaune benthique, les larves d'huîtres, les poissons, tels que définis dans l'annexe 6 du rapport de la quinzième réunion du Groupe Conjoint de Contrôle et de Surveillance Continus (GCCSC) qui s'est tenue à Lisbonne du 23 au 26 janvier 1990.

Jusqu'en 1991, l'activité RNO dans ce domaine a donc consisté à mener à bien des études de faisabilité des techniques de surveillance biologique jusqu'à leur mise en oeuvre éventuelle dans un programme de routine. Dans le domaine de la physiologie et de la biochimie, des études menées par les équipes de l'IFREMER sont parvenues à ce stade. C'est notamment le cas pour la mesure biochimique de l'EROD (Ethoxyrésorufine-o-dééthylase) et de l'AChE (Acétylcholinestérase) pour la détection d'effets de certains polluants organiques.

A partir de 1992, deux sites pilotes ont été créés pour la mesure en routine de l'activité EROD. Il s'agit des laboratoires IFREMER de Port-en-Bessin sur la baie de Seine et de Toulon sur la Méditerranée. Ces laboratoires effectuent chacun deux campagnes par an dans leur zone respective. Chaque campagne donne lieu au prélèvement et à l'analyse d'environ 200 échantillons de poissons. Jusqu'en 1992, les analyses étaient effectuées au laboratoire Ecotoxicologie de l'IFREMER, à Nantes. En 1993 le laboratoire de Toulon a été équipé de façon à pouvoir mener cette surveillance de façon autonome. L'année 1994 verra l'équipement de celui de Port-en-Bessin. Cette édition du bulletin RNO présente les premiers résultats acquis sur ce nouveau paramètre. En 1993, 800 échantillons de poisson ont été analysés dans le cadre de ce programme.

Comme par le passé, le RNO a soutenu financièrement le suivi benthique des Pierres Noires réalisé par la station biologique de Roscoff (Muséum National d'Histoire Naturelle, Laboratoire de Biologie des Invertébrés Marins et Malacologie). Cette action qui a débuté à l'époque de l'échouage de l'Amoco Cadiz s'intègre bien dans la programmation de la surveillance des effets biologiques.

En 1993, les résultats acquis pendant les années 1990-1992 ont fait l'objet d'un rapport synthétique les replaçant dans le contexte d'un suivi de longue durée : J.C. DAUVIN. - Surveillance des effets biologiques. Suivi des populations benthiques dans la baie de Morlaix. Synthèse des principaux résultats 1990-1992. Il en ressort que les séries de données acquises en Baie de Morlaix sont parmi les mieux documentées à l'échelon mondial. Les changements observés pendant les premières années traduisent à la fois les effets de la pollution par les hydrocarbures et les variations d'origine climatique. La période actuelle est désormais suffisamment éloignée de l'événement de l'Amoco Cadiz pour révéler les modifications des peuplements en fonction des seules variations de l'environnement : apports de nutriments et climat. Plusieurs auteurs ont mis en évidence des changements cycliques d'abondance avec des périodes variant de quelques années au siècle. Il est donc nécessaire de poursuivre ce suivi pour identifier les cycles de grande période et connaître les variations à long terme des peuplements dans des conditions environnementales normales.

2.4. Assurance de qualité

L'organisation d'intercalibrations spécifiques au RNO, l'aide aux laboratoires, le suivi des développements méthodologiques restent un thème permanent dans les programmes RNO. La participation aux exercices internationaux de calibration est systématiquement recherchée. L'année 1993 a vu la parution du rapport de l'intercomparaison RNO sur la salinité et les sels nutritifs organisée en 1991-92 par l'équipe Chimie des Cycles Naturels du centre IFREMER de Brest. D'autre part, IFREMER et de nombreux laboratoires partenaires du RNO sont impliqués dans le programme QUASIMEME (Quality Assurance for Information from Marine Environmental Monitoring in Europe) auquel participent 84 laboratoires de 17 pays, et dans un exercice CIEM portant sur l'analyse des congénères de PCB. Ces deux programmes s'étalent sur plusieurs années. Dans le cadre de QUASIMEME de nombreux exercices sont organisés, portant sur les métaux lourds et les organochlorés dans la matière vivante et le sédiment, ainsi que sur les sels nutritifs dans l'eau. En ce qui concerne les analyses de routine dans la matière vivante et le sédiment, l'usage de matériel de référence, inclus dans les séries analytiques, est systématique.

2.5. Gestion des données. Publications

La mise en pratique du principe de gestion informatisée des données conduit à un système qui a fortement évolué depuis l'origine, en parallèle avec le développement de l'outil informatique lui-même, aussi bien matériel que logiciel. Le système RNO actuel se compose d'un Système de Gestion de Base de Données (SGBD) configuré pour l'archivage du type RNO, associé à un langage d'interrogation adaptable à l'utilisateur, qui peut traiter ensuite les données extraites et transférées sur son propre matériel. L'activité de gestion des données du RNO est réalisée au Centre IFREMER de Brest. Cependant, malgré les nombreuses améliorations dont elle a bénéficié depuis 1974, la base RNO souffre de l'ancienneté de sa conception. IFREMER a donc entrepris la refonte et la fusion des bases de données des différents réseaux de surveillance dont il a la charge. Le but de l'opération est de mettre en place une base moderne, regroupant en particulier les données du RNO et des réseaux REMI et REPHY (voir édition de 1991). Ce projet est prévu sur deux ans à partir de 1994.

Le besoin d'une information régulière et synthétique sur les résultats des travaux du RNO a été jugé nécessaire et constitue le but du présent document. Les livraisons de 1988 et 1989-1990 se sont surtout attachées à fournir les niveaux des paramètres généraux de qualité et des polluants. Celle de 1991 était principalement consacrée à la présentation des tendances des polluants dans la matière vivante. Celle de 1992-1993 présentait les résultats acquis sur la chlorophylle et les éléments nutritifs dans l'eau. Celle-ci porte sur les mesures de l'activité EROD dans les poissons et sur les niveaux de deux contaminants dans la matière vivante, le chrome et l'arsenic.

En 1993 plusieurs publications scientifiques en relation avec les techniques ou les résultats de la surveillance RNO sont parues :

BELIN C. *et al.*, 1993. Surveillance du milieu marin et santé publique. in Coquillages, coordination de P. Elzière-Papayannie, Informations Techniques des Services Vétérinaires Français. pp 431-442.

BOCQUENE G. *et al.*, 1993. Acetylcholinesterase levels in marine organisms along French coasts. *Mar. Pollut. Bull.*, 26, (2), 101-106.

CLAISSE D., 1993. Copper contamination as a result of antifouling paint regulation ? *Mar. Pollut. Bull.*, 26, (7), 395-397.

CLAISSE D., 1993. Accumulation des métaux lourds et polluants organiques par les coquillages. in Coquillages et Santé Publique, coordination de J. Lesne, ENSP. pp 99-111.

IBANEZ F. *et al.*, 1993. Comparaison des évolutions à long terme (1977-1990) de deux peuplements macrobenthiques de la baie de Morlaix (Manche occidentale) : relations avec les facteurs hydroclimatiques. *J. expl mar. Biol. Ecol.*, 169 : 181-214.

DAUVIN J.C. *et al.*, 1993. Les genres *Ophelia* et *Ampelisca* de la région de Roscoff : exemple d'allotropie et de syntopie dans les communautés marines de substrat meuble. *Cah. Biol. Mar.*, 34 : 1-15.

DAUVIN J.C. *et al.*, 1993. Cinétique de *Abra alba* (mollusque bivalve) de 1977 à 1991 en Manche-Mer du Nord, relation avec les facteurs climatiques. *Oceanologica Acta*, 16, 4.

DEUXIEME PARTIE

SURVEILLANCE DES EFFETS BIOLOGIQUES PAR LA MESURE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE EROD

1. INTRODUCTION

Les zones côtières sont exposées à toute une série de menaces, parmi lesquelles la commission mondiale de l'environnement et de l'aménagement a pu citer en 1987 la surexploitation, la pollution due aux activités sur le continent, les apports sédimentaires et les émissions transportées par l'atmosphère. Les réponses aux grandes questions scientifiques que pose la protection de l'environnement littoral passent nécessairement par une meilleure connaissance des mécanismes de toxicité, afin d'améliorer l'évaluation prédictive des impacts. Aujourd'hui, les connaissances acquises sur le fonctionnement des écosystèmes permettent une meilleure appréciation de la capacité d'acceptation du milieu. Ceci pose la question des stratégies de surveillance de l'environnement, mais également des méthodologies permettant de connaître les tendances d'évolution à long terme des paramètres de qualité du milieu et des niveaux de contamination des populations.

L'écotoxicologie marine est maintenant en mesure de proposer un premier élément de réponse à l'évaluation de l'effet des polluants par le développement d'indicateurs biologiques ou bioindicateurs. Depuis 1987 le RNO a initié un travail de recherche et de développement de bioindicateurs adaptés à la surveillance des effets biologiques en milieu marin. Cette première phase, consistant surtout en des études de faisabilité et de mise au point méthodologique, a conduit à proposer un premier marqueur biologique, l'enzyme de détoxification EROD (ethoxyrésorufine-o-deethylase).

L'induction de l'EROD, dépendante des mono-oxygénases à cytochrome P450, est relativement spécifique et révélatrice d'une exposition à certains polluants organiques tels que les hydrocarbures polyaromatiques (PAH), les polychlorobiphényles (PCB) et les dioxines. Le niveau d'activité de cette enzyme donne une information sur l'état d'exposition d'un organisme et plus globalement sur les modifications de l'évolution des écosystèmes dues aux activités humaines. La mise en place de ce volet de surveillance biologique a respecté les recommandations internationales qui prévoient trois grandes phases : développement, validation et interprétation.

L'existence d'un acquis de connaissances sur l'EROD au niveau de la communauté scientifique et la possibilité de travailler à l'échelle océanographique a favorisé l'approche des bioindicateurs sur le terrain. Les critères d'utilisation de l'EROD comme outil de surveillance ont été définis en intégrant les contraintes océanographiques. La validation d'une technique rapide de mesures sur microplaques, au cours d'un exercice organisé par le CIEM (Conseil international pour l'Exploration de la Mer) en 1991, a permis de mettre en place une surveillance en pré-routine sur la baie de Seine et le golfe de Fos-sur-Mer.

Les résultats obtenus depuis 1991 seront intégrés dans la base RNO. Ceux de la baie de Seine ont été utilisés dans le cadre de la surveillance internationale (North Sea Task Force). L'année 1994 sera une

année charnière pendant laquelle devront être évalués ces premiers résultats dans le but de mettre en place une véritable surveillance de routine. Cette deuxième partie représente donc une première tentative d'interprétation des mesures d'induction de l'activité enzymatique EROD comme indicateur de l'exposition des organismes à des contaminations, en s'appuyant sur les informations pluridisciplinaires disponibles (courantologie, mécanismes hydrosédimentaires, cartographie des polluants, etc.). Si ces premiers résultats sont prometteurs, ils soulèvent aussi quelques questions qui devront être résolues dans le cadre de la mise en place d'une stratégie à long terme.

2. LE CONCEPT DE BIOSURVEILLANCE

2.1. Utilisation des biomarqueurs en surveillance

Le concept de "biomarqueurs" retient depuis ces dernières années l'attention croissante des écotoxicologues car il constitue un outil très intéressant pour la détection des effets de l'exposition d'organismes aux polluants. Un biomarqueur peut être défini comme une réponse provoquée par un composé xénobiotique et dont la mesure indique qu'un organisme ou une population a subi un stress. La mesure de biomarqueurs à un niveau d'organisation aussi complexe que celui de la cellule permet d'accéder à une réponse rapide de l'organisme face à un polluant. L'objectif d'un programme de surveillance biologique est d'évaluer l'état de santé de l'écosystème marin et de prédire les effets à long terme des polluants. La qualité d'un biomarqueur est donc d'intégrer les différents stress environnementaux auxquels sont soumis les organismes marins. Il doit exprimer les effets cumulés des fluctuations naturelles tels que la température, la qualité de la nourriture, les variations physiologiques et les interactions pharmacocinétiques et toxicologiques de mélanges complexes de molécules chimiques présentes dans le milieu marin. L'interprétation de la réponse mesurée par un biomarqueur est parfois délicate car tout test de toxicité a ses propres limites. Dans le but d'améliorer le diagnostic des effets biologiques, il est donc recommandé de développer des tests de toxicité complémentaires et de mesurer chimiquement les concentrations de polluants dans les tissus ou le sédiment marin.

2.2. Plusieurs tests pour un diagnostic

Aucun test n'est approprié à toutes les circonstances. Il faut établir un répertoire des méthodes qui peuvent répondre à des situations variées. Au niveau biochimique ou physiologique, quelques-unes de ces méthodes sont aujourd'hui bien connues et prêtes pour une application à court terme.

Il existe des tests maîtrisés :

- les biomarqueurs moléculaires de type MFO (mixed function oxidases) et en particulier l'Ethoxyrésorufine-O-Deethylase (EROD), l'Acethylcholinestérase (AChE) ou les altérations de l'ADN,
- les anomalies de la fécondation et l'embryotoxicité, en général chez les échinodernes, les mollusques bivalves et les poissons,
- le bilan énergétique chez les moules et autres espèces.

D'autres techniques sont en cours de développement :

- des réponses cytogénétiques : induction de "micronuclei" ou aberrations chromosomiques,
- la mesure de métalloprotéines et métallothionéines,
- des distributions cellulaire et subcellulaire de polluants, par microanalyses,

- des marqueurs de stress oxydatifs, tels que le calcium intracellulaire ou les indices de lipopéroxydation,
- des marqueurs prénéoplasiques du foie chez les poissons,
- la réponse immune aux xénobiotiques,
- les protéines de résistance MXR (multi xenobiotic resistance).

3. L'EROD : ENZYME DE BIOTRANSFORMATION

3.1. Les systèmes de biotransformation

La biotransformation est l'ensemble des réactions biochimiques, en général enzymatiques, capables de modifier la structure des substances exogènes ayant pénétré dans l'organisme, afin d'en favoriser l'élimination. Ces réactions se déroulent en deux temps : une phase de dégradation (le plus souvent sous forme d'oxydation) et une phase d'hydratation. Ceci a pour résultat de rendre les produits exogènes solubles dans l'eau et donc d'en faciliter l'excrétion. L'existence d'un tel système de métabolisation a été démontré chez la truite pour la première fois en 1965. Le métabolisme oxydatif est impliqué dans la synthèse de molécules endogènes comme les hormones stéroïdes, les acides gras, les vitamines, les acides biliaires, les prostaglandines, et dans la transformation de molécules exogènes telles que les polluants organiques.

Situés dans la cellule, les monooxygénases à cytochrome P450 (CYP450) constituent un des systèmes oxydatifs majeurs responsables de la biotransformation de nombreux xénobiotiques. Des poissons exposés à des polluants chimiques répondent par une modification de leur système monooxygénase, le foie étant l'organe cible. Les agents exogènes que sont les polluants aromatiques peuvent augmenter ou diminuer l'activité catalytique des CYP450. Chez le poisson, les monooxygénases hépatiques sont particulièrement induites par les composés de type hydrocarbures aromatiques halogénés tels que les polychlorobiphényls (PCB), les hydrocarbures aromatiques polycycliques (PAH) et les dioxines. L'induction des monooxygénases constitue un bon indicateur de la contamination d'un milieu par une catégorie de produits chimiques mais ne permet pas l'identification d'un produit chimique spécifique. Parmi ces monooxygénases, l'EROD présente de fortes réponses aux inductions et cette enzyme est de plus en plus utilisée dans la surveillance de l'environnement marin.

3.2. Persistance et bioaccumulation des polluants organiques dans l'écosystème marin

Les composés organiques lipophiles sont des polluants persistants largement distribués dans les océans. Ce sont par définition des substances qui possèdent une grande stabilité dans le sédiment, l'eau et les organismes marins. Ils parcourent des distances importantes, transportés par les courants, l'air et les animaux migrateurs. Ils sont aussi véhiculés à travers la chaîne alimentaire, atteignant parfois des niveaux de concentrations élevés chez les prédateurs, situés en bout de chaîne. En dehors des aspects spectaculaires d'une pollution pétrolière accidentelle, leurs effets peuvent être insidieux à long terme et difficiles à établir car le nombre des composés toxiques est conséquent.

L'élimination de ces composés (xénobiotiques) par les organismes vivants dépend des procédés de métabolisation et d'excrétion. Ils sont dits persistants lorsque la métabolisation ou l'excrétion est incomplète. Les causes d'élimination inefficace des xénobiotiques varient suivant les espèces et les différents groupes d'organismes (invertébrés ou vertébrés marins). Certains composés sont donc persistants chez certaines espèces et non chez d'autres. De nombreux hydrocarbures sont plus persistants chez les invertébrés marins que chez les vertébrés. D'autres hydrocarbures aromatiques halogénés comme les PCB sont persistants chez tous les animaux. L'accumulation de ces molécules chimiques et leur persistance dans les tissus lipidiques (bioaccumulation) dépendent de facteurs

physiologiques (variations saisonnières, reproduction, nutrition), et de caractères environnementaux (température, hydrologie, géochimie du milieu). La distribution des xénobiotiques dans les tissus est aussi dépendante de leur concentration dans le milieu, de leur hydrophobicité, de la taille et de la structure chimique de la molécule, ainsi que des capacités métaboliques de chaque espèce.

3.3. Les composés organiques PAH et PCB

Les organismes sont en contact permanent avec de multiples molécules organiques entrant dans les cycles vitaux ou bien qui leur sont étrangères. Parmi les xénobiotiques les plus répandus dans l'environnement les PCB et PAH sont les plus étudiés. Leurs propriétés chimiques leurs confèrent une relative stabilité et leur permet de pénétrer dans les cycles biologiques.

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (PAH)

Les composés aromatiques de type PAH sont présents dans les pétroles, charbons, schistes bitumineux et autres types de sédiments. Ils sont formés au cours de la lente maturation de la matière organique dans le milieu sédimentaire. Les PAH sont aussi le produit de pyrolyse ou de combustion incomplète de la matière organique et sont dispersés dans l'atmosphère par adsorption sur les particules atmosphériques. Dans le milieu marin, leur principale origine est anthropogénique : déchets provenant des activités industrielles et urbaines acheminés par les pluies et les eaux de lessivage, fuites accidentelles à partir de puits de pétroles ou de plates-formes de forages, dégazage de pétroliers... Il convient aussi de ne pas oublier les combustions naturelles de matières organiques ou les infiltrations à partir de la croûte terrestre. Certains organismes procaryotes marins peuvent aussi synthétiser les PAH mais leur apport reste minime. Moins biodégradables que les autres hydrocarbures, les PAH subsistent plus longtemps dans le milieu marin et sont également les plus toxiques.

Les polychlorobiphényls (PCB)

Les PCB sont des molécules de synthèse peu solubles dans l'eau et chimiquement très stables, d'où leur forte rémanence dans le milieu marin. Leurs propriétés physiques et chimiques présentent des caractéristiques très utiles aux applications industrielles, mais leur toxicité et leur rémanence ont fait réglementer leur usage. Ces molécules peu ou pas métabolisables en fonction de leur halogénation ont largement contaminé les écosystèmes aquatiques sur toute la surface du globe.

Les PAH et PCB inducteurs d'EROD et promoteurs tumoraux

Les PAH et les PCB peuvent causer directement ou indirectement des cancers chez les animaux exposés. Ils sont classés parmi les cancérigènes indirects car ils deviennent toxiques après une activation métabolique. Les produits chimiques cancérigènes sont métabolisés au niveau des hépatocytes (cellules du foie), par les mécanismes enzymatiques de détoxification. L'EROD fait partie du système de détoxification monooxygénase. Elle catalyse la transformation de ces molécules liposolubles en composés hydrosolubles pouvant être excrétés. Plus les PCB ou PAH sont en concentrations élevées dans le milieu marin, plus ils sont nombreux à pénétrer dans le poisson et plus ils activent son système de défense, c'est-à-dire l'induction de l'EROD.

Mais au cours des réactions de biotransformation des molécules chimiques, une fraction échappe à la détoxification et génère des métabolites. Certains métabolites vont se lier à l'ADN (acide désoxyribonucléique) et aux protéines cellulaires pour former des adduits. Ces adduits provoquent des mutations, à l'origine de la formation de tumeurs. Les PAH sont des initiateurs de cancérogenèse chez

les poissons benthiques alors que les PCB sont des promoteurs tumoraux. Des organismes vivant dans un environnement chimique altéré par des concentrations élevées de PCB ou PAH risquent de subir des lésions dans leur génome pouvant conduire à la mutagenèse voir même à la cancérogenèse.

4. LA SURVEILLANCE BIOLOGIQUE DES COTES FRANCAISES

4.1. L'EROD : premier biomarqueur développé sur les côtes françaises

Les études de faisabilité et de mise au point menées depuis 1987 sur les côtes françaises dans le domaine de la physiologie et de la biochimie ont permis d'intégrer un test d'évaluation de l'effet des polluants dans le cadre du Réseau National d'Observation. Le premier biomarqueur retenu pour la surveillance est donc l'EROD. L'intérêt de cette enzyme en tant que biomarqueur est quelle est induite par des polluants chimiques très largement répartis dans le milieu marin. Plus la concentration de ces polluants est élevée, plus l'enzyme est active. Le principe d'analyse est basé sur la mesure de l'activité enzymatique de l'EROD dans des foies de poissons utilisés comme témoins de la santé de leur environnement.

4.2. Dosage de l'activité EROD

Plusieurs méthodes permettent d'évaluer les modulations du système CYP450 (en particulier de la forme spécifique P450 1A1) et de l'EROD induites par des contaminants organiques. Une première méthode permet d'estimer la modification de l'expression des gènes P450 1A1 par des hydrocarbures aromatiques. Cependant l'induction de ces gènes a lieu dès les premiers jours d'exposition aux polluants et leur dosage doit être réalisé dans cette période sinon l'induction n'est plus visible.

L'utilisation d'anticorps pour un dosage immunochimique des protéines P450 1A1 est une seconde méthode tout aussi sensible, donnant des informations sur l'exposition à des polluants après plusieurs semaines. Cependant sa mise en oeuvre est actuellement jugée trop lourde pour une application en routine.

La troisième méthode consiste en un dosage d'activité de l'enzyme EROD donnant également des informations après plusieurs semaines. La simplification de la mesure par l'utilisation des lecteurs à microplaques en fait une méthode particulièrement adaptée à la surveillance. La technique d'immunoquantification peut apporter une information complémentaire, mais l'effort analytique nécessaire pour mener de front les deux méthodes paraît disproportionné par rapport à l'information actuellement recueillie avec le dosage d'EROD.

Dans le cadre du RNO, le choix a été fait de développer la méthode de dosage de l'activité EROD car elle a été testée et validée sur le littoral français lors de campagnes océanographiques menées depuis 1987. Cette méthode de dosage par microplaques a fait l'objet d'une revue technique éditée par le CIEM et a été intercomparée avec les autres méthodes utilisées par les pays de la mer du Nord. Les résultats de l'exercice d'intercomparaison mené à Aberdeen en 1991 ont montré qu'un effort d'homogénéisation de la méthode de mesure permettrait d'obtenir des résultats d'une variabilité inférieure à 20 % entre les différents participants. Ces résultats encourageants font apparaître que des données obtenues suivant une méthode de référence préconisée par le CIEM pourraient être comparées dans des conditions raisonnables. La Hollande et la France appliquent d'ores et déjà la méthode de référence pour la surveillance des effets biologiques.

Les mesures sont effectuées à l'aide d'un fluorimètre, sur des plaques portant 96 micropuits. Ceci permet donc de mener de front l'analyse de 96 échantillons (photo de couverture). On mesure en 10

minutes la dégradation de l'ethoxyrésorufine en un produit fluorescent, la résorufine. Cette réaction, catalysée par l'EROD, permet d'estimer par mesure indirecte l'activité de cette dernière.

4.3. Stratégie de surveillance

Différents facteurs doivent être considérés pour la mise en oeuvre de biomarqueurs en surveillance. La réponse d'un biomarqueur dépend de l'état physiologique de l'organisme (âge, sexe, conditions de reproduction) et de facteurs environnementaux tels que la température, la qualité de la nourriture, la géochimie, l'hydrologie du milieu, etc. Toutes ces variables biologiques et environnementales doivent être considérées pour interpréter la réponse d'un organisme vivant dans un site contaminé. Le choix de l'organisme témoin de la qualité de son environnement doit intégrer trois grands critères : une large répartition géographique dans le site étudié, une capture aisée, une certaine sédentarité et représentativité de l'écosystème côtier. Le choix des espèces de poissons sentinelles, le dragonet ou callionyme (*Callionymus lyra*) et la limande (*Limanda limanda*) en Manche-Atlantique ainsi que le rouget (*Mullus barbatus*) et les serrans (*Serranus cabrilla* ou *hepatus*) en Méditerranée a été déterminé suivant ces critères.

Les résultats du RNO en matière de contaminants ont permis de choisir deux sites pilotes particulièrement contaminés par les PCB et/ou les PAH pour démarrer la surveillance des effets biologiques : la Baie de Seine et le golfe de Fos-sur-Mer. La situation géographique de ces deux sites, sur les façades de la Manche et de la Méditerranée permet à la France de participer de manière active au développement de la surveillance biologique dans les programmes internationaux existant sur ces deux régions. Sur chacun de ces sites un échantillonnage de dix poissons par station est pêché sur une radiale de 5 à 6 stations, lors de deux campagnes annuelles. Cette radiale s'étend de la zone la plus contaminée, souvent la plus proche de la source de contamination, vers la zone la moins influencée, située au large des côtes. La qualité de l'échantillonnage constitue un paramètre important de toute surveillance. La recherche de l'optimisation de l'échantillonnage intégrant les contraintes scientifiques et économiques est menée actuellement sur les deux sites expérimentaux.

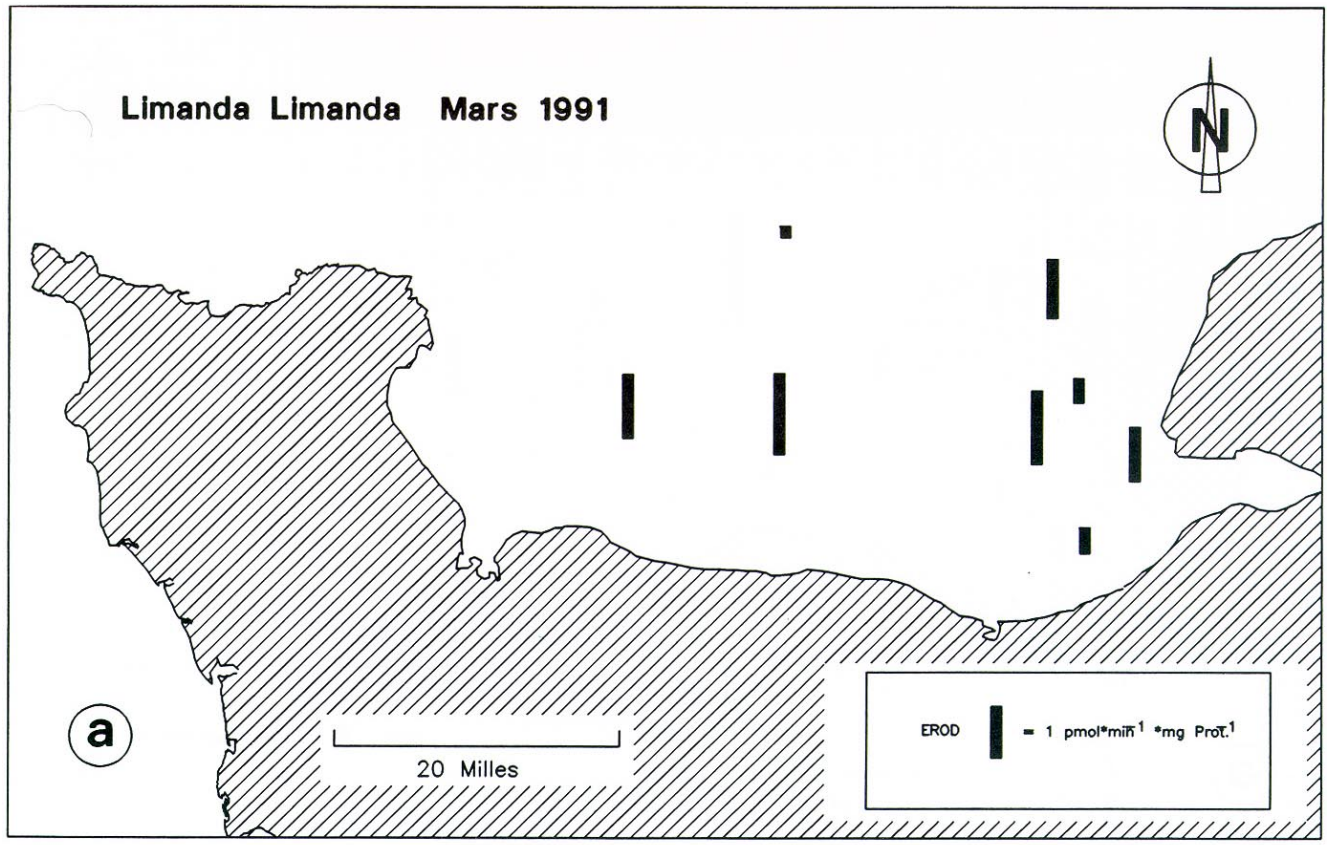
4.4. Interprétation des premiers résultats (1991 - 1992)

Dans cette présentation, les résultats sont exprimés en **pmol.mn^{-1}.mg prot^{-1}** (picomoles par minute et par milligramme de protéine). Ceci signifie que l'on mesure l'apparition en une minute du produit résultant de l'activité EROD pour un milligramme de protéine contenue dans le foie du poisson. Plus cette valeur est élevée, plus l'activité enzymatique EROD induite par les contaminants est importante.

Baie de Seine

Les stations échantillonnées en 1991 au cours d'une campagne expérimentale (fig. 1) et en 1992, année de démarrage de la surveillance (fig. 2 et 3), font apparaître les variations saisonnières et géographiques de l'induction de l'activité EROD mesurées sur la limande et le callionyme. L'ensemble des mesures montre une induction de l'EROD plus importante dans l'estuaire de la Seine et dans la zone sub-estuarienne. Tous sexes confondus on observe, à la fois chez le callionyme et la limande, une activité enzymatique plus élevée en août. Un facteur de 4 à 5 est observé entre les mois de mars et août chez les deux espèces pour les stations situées dans la zone estuarienne (Tableau 1).

Les MFO de poissons sont impliqués dans le métabolisme de biotransformation des xénobiotiques, mais aussi des composés endogènes tels que les hormones sexuelles. Il serait donc intéressant à l'avenir de pouvoir comparer l'induction de l'activité enzymatique pendant et hors périodes de reproduction. Le niveau de ces hormones est en effet plus élevé au moment de la reproduction.



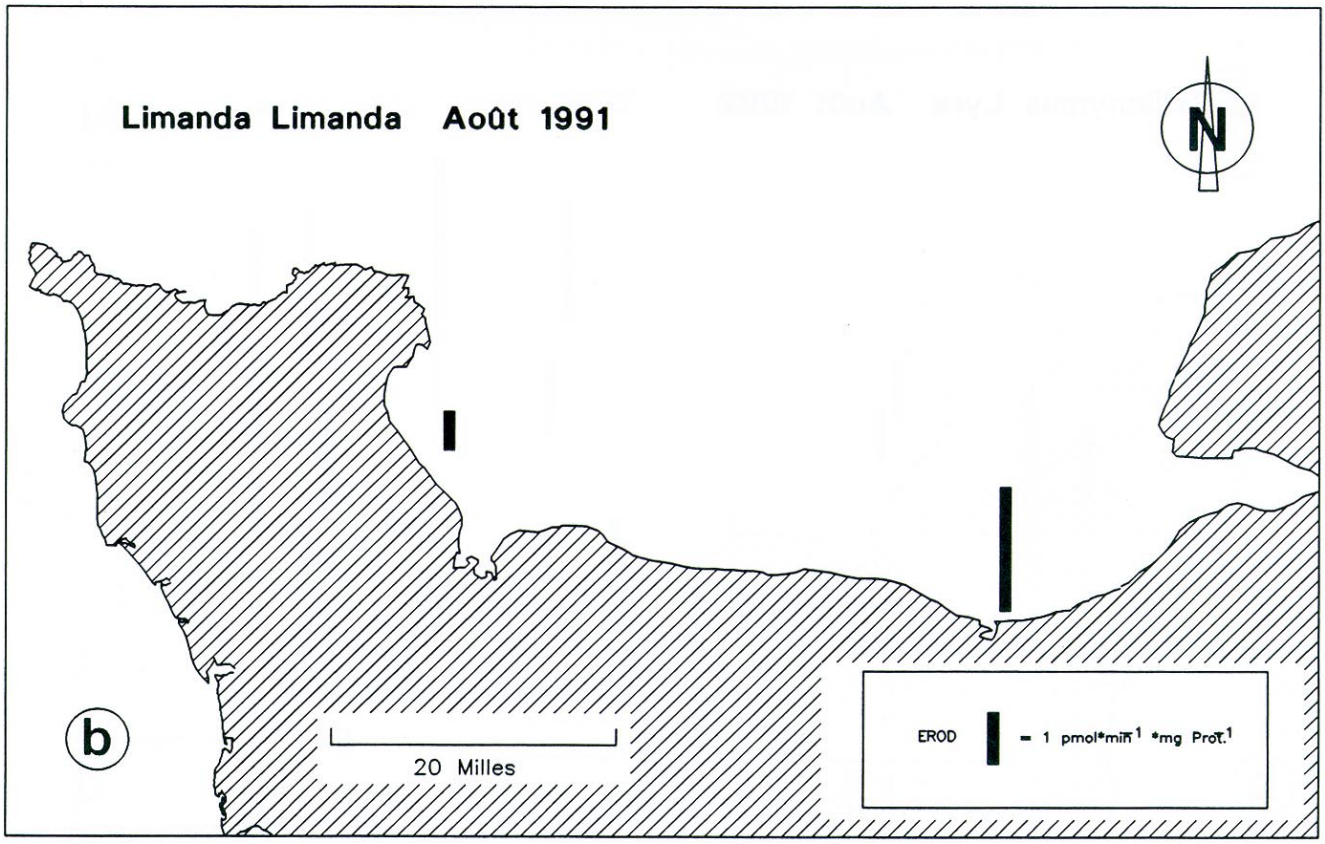
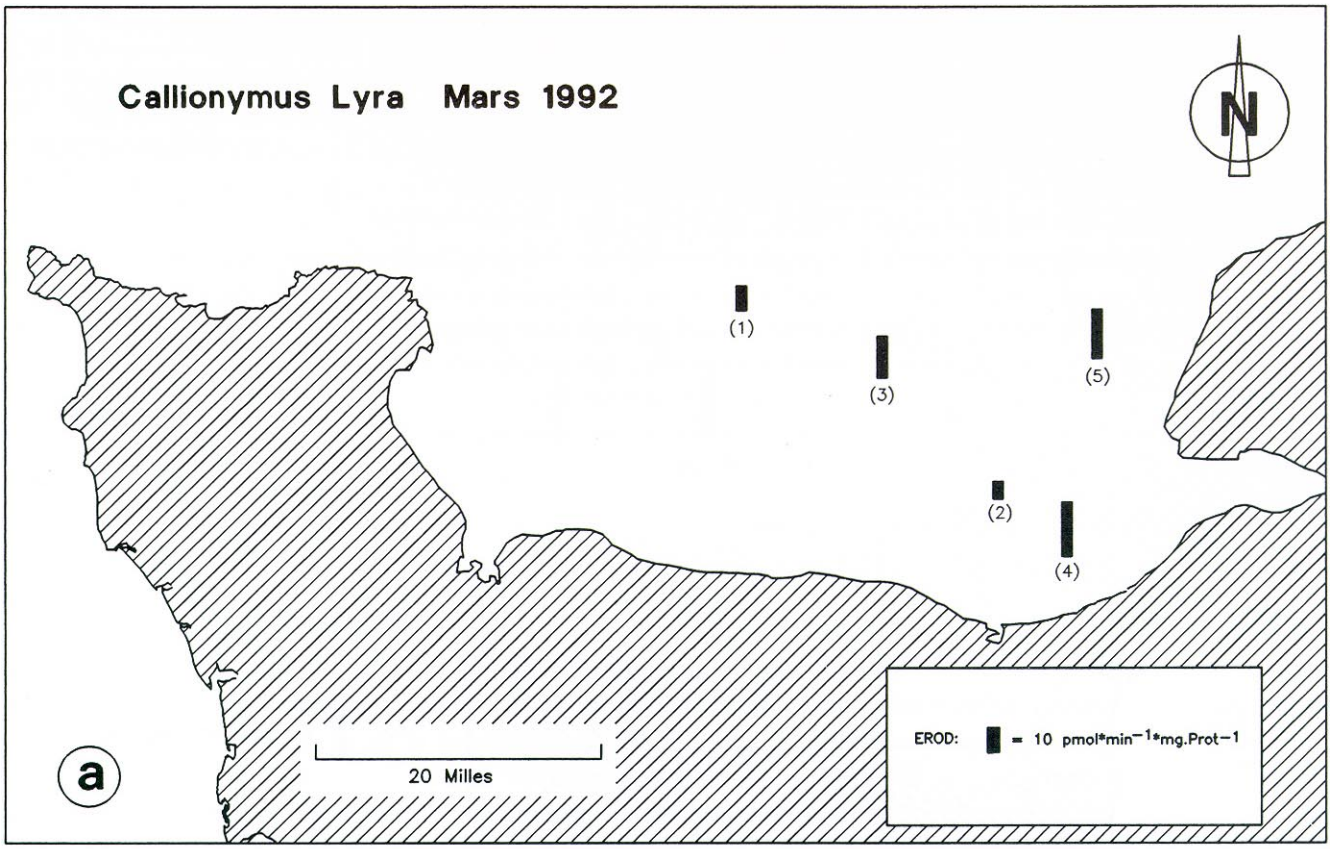


Fig. 1 : Mesures de l'activité EROD dans les foies de *Limanda limanda* échantillonnées en baie de Seine en mars 1991 (a) et en août 1991 (b).



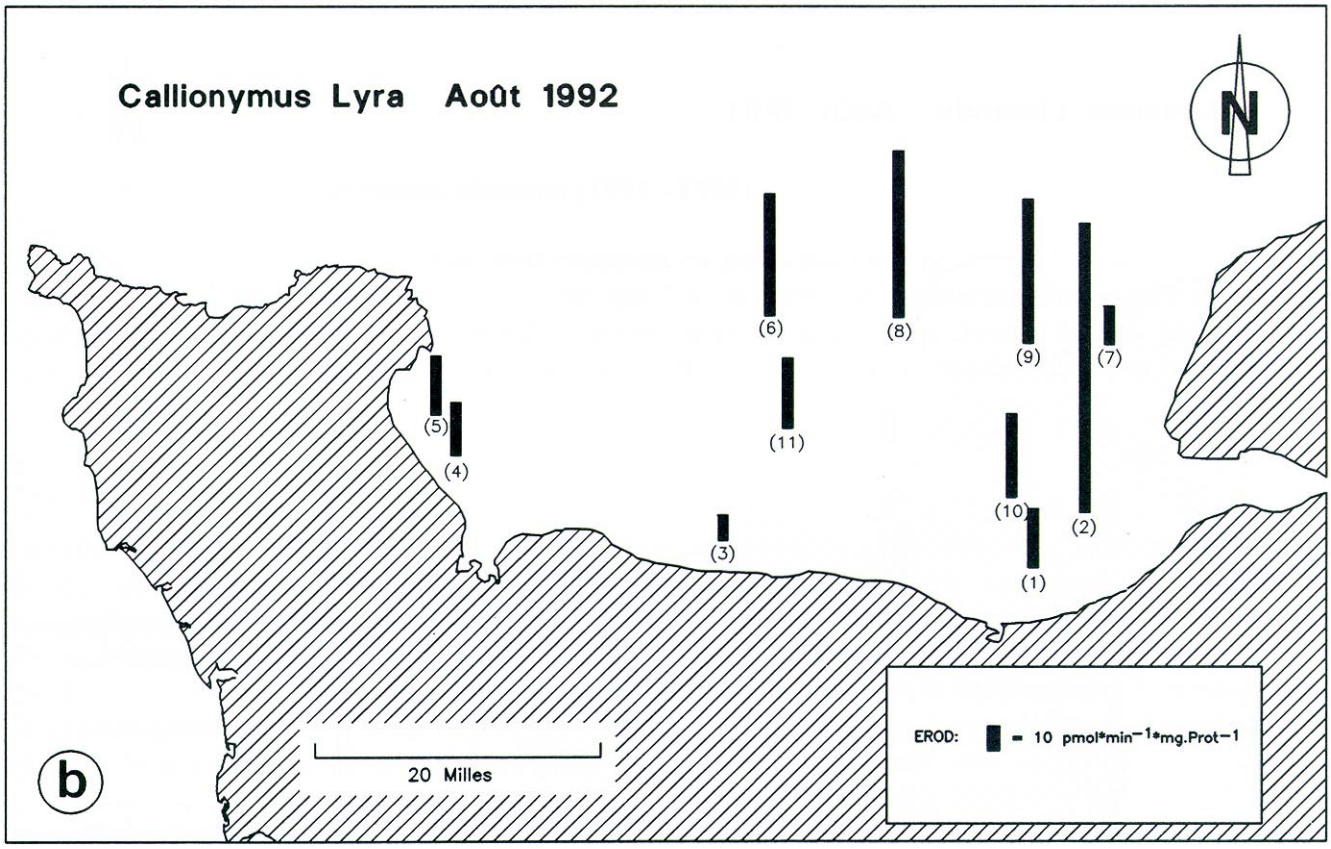
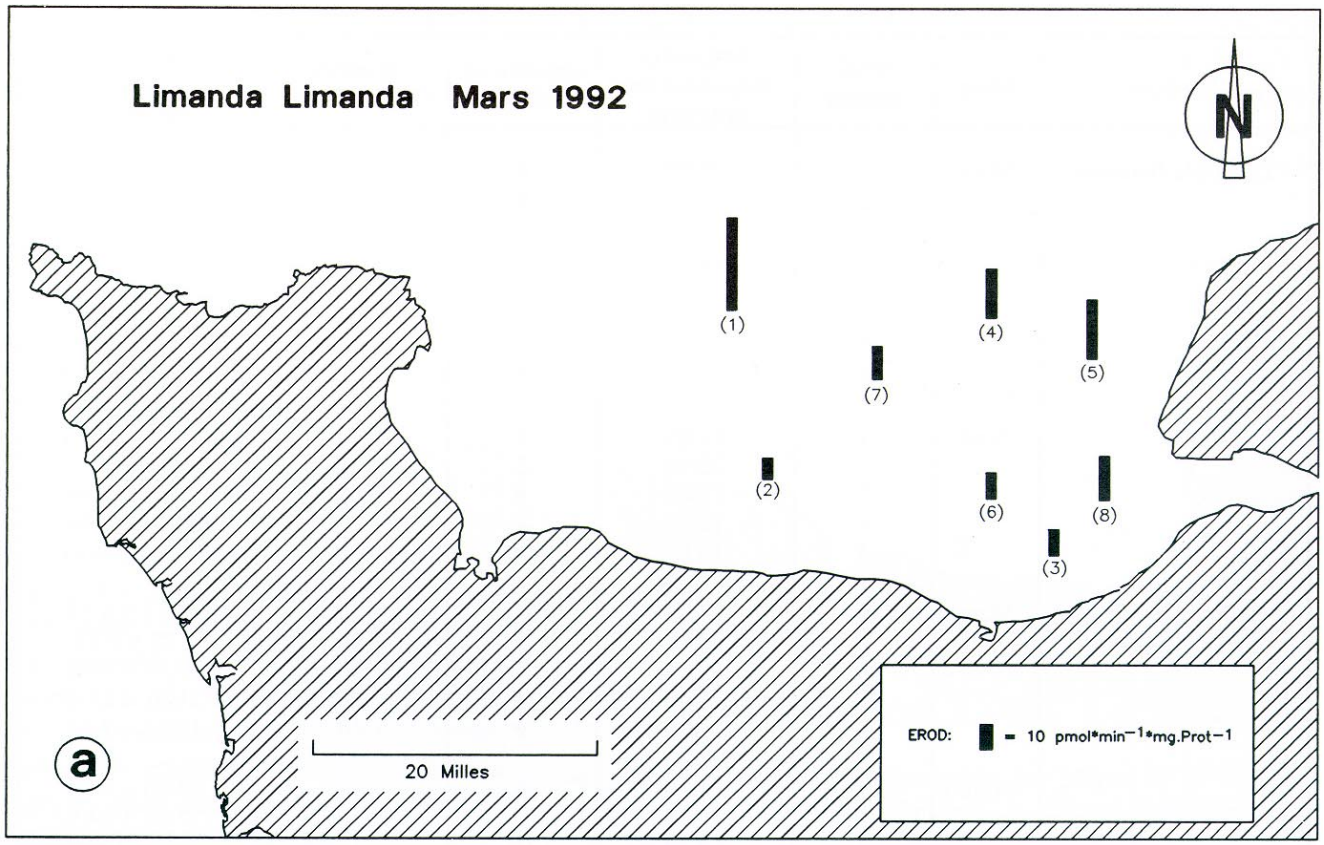


Fig. 2 : Mesures de l'activité EROD dans les foies de *Callionymus lyra* échantillonnés en baie de Seine en mars 1992 (a) et en août 1992 (b). (n) = numéro de station.



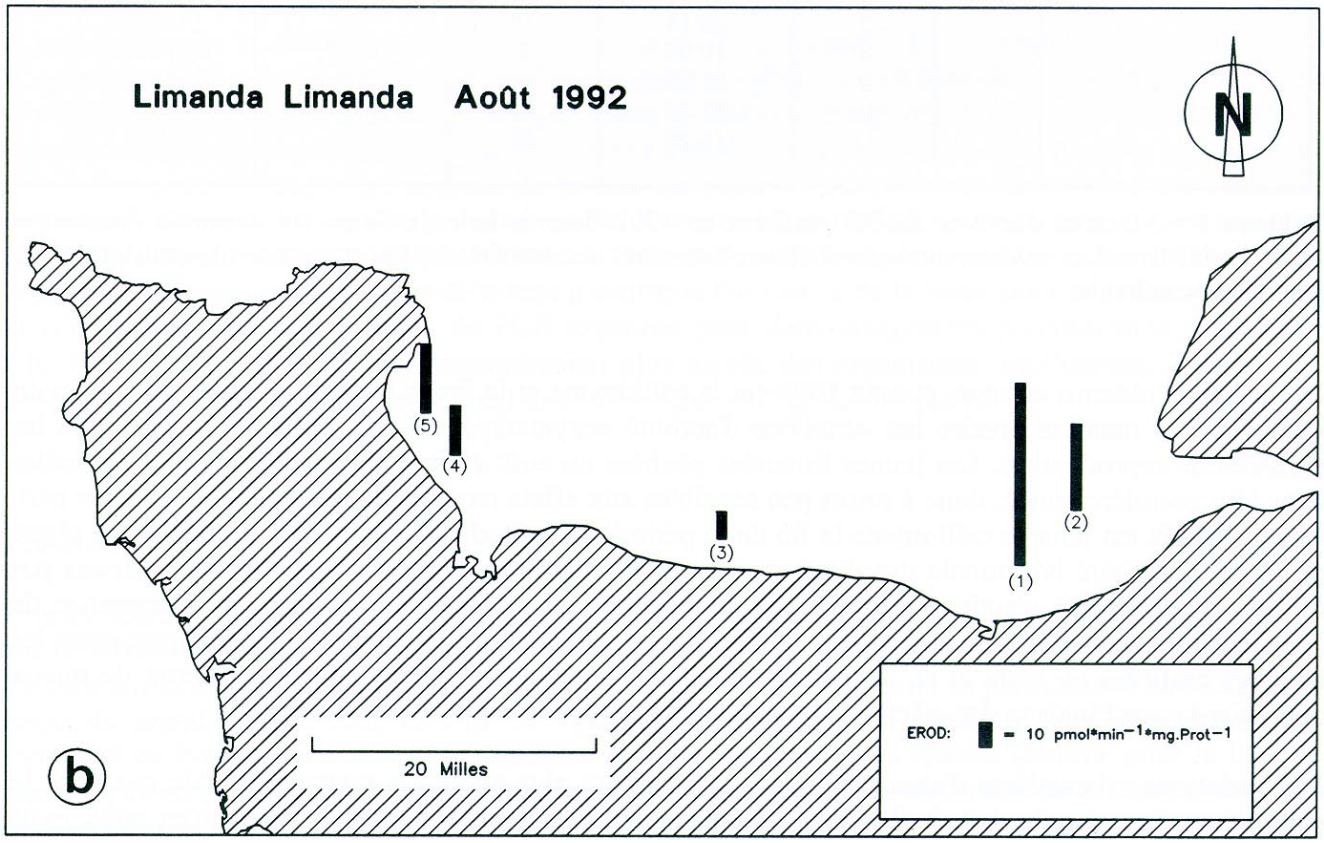


Fig. 3 : Mesures de l'activité EROD dans les foies de *Limanda limanda* échantillonnées en baie de Seine en mars 1992 (a) et en août 1992 (b). (n) = numéro de station.

Espèces	Mois	N° de station	longueurs moyennes des individus	nombre de mâles	nombre d'individus	EROD pmol.min^{-1}. mg prot^{-1}
Limanda limanda	Mars	1	20.75	6	10	38.10 ± 19.46
		2	20.80	9	10	8.39 ± 4.52
		3	23.20	3	10	13.41 ± 04.74
		4	22.10	6	10	20.06 ± 08.15
		5	23.10	7	10	24.53 ± 13.82
		6	22.07	3	7	10.10 ± 06.66
		7	22.30	2	10	18.21 ± 06.55
		8	23.37	1	4	18.34 ± 08.67
	Août	1	17.85	6	10	74.59 ± 30.51
		2	20.50	2	10	35.39 ± 12.19
		3	17.65	5	10	11.04 ± 7.56
		4	18.95	8	10	20.15 ± 4.63
		5	16.85	7	10	27.96 ± 10.01
Callionymus lyra	Mars	1	22.93	10	10	10.24 ± 4.14
		2	20.10	7	10	7.25 ± 3.43
		3	19.65	7	10	16.59 ± 9.62
		4	18.40	4	10	21.91 ± 11.6
		5	19.05	9	10	19.35 ± 7.97
	Août	1	20.10	8	10	23.95 ± 5.04
		2	14.85	7	10	117.81 ± 44.61
		3	19.10	10	10	10.31 ± 3.15
		4	17.40	6	10	21.59 ± 6.72
		5	18.45	6	10	23.68 ± 5.66
		6	21.40	9	10	49.93 ± 11.67
		7	20.15	10	10	15.46 ± 4.75
		8	19.95	8	10	68.10 ± 16.55
		9	21.00	10	10	58.74 ± 15.83
		10	21.45	9	10	34.05 ± 13.07
		11	19.70	10	10	28.40 ± 9.78

Tableau 1 : Mesures d'activité EROD réalisées en 1992 dans la baie de Seine sur *Limanda limanda* et *Callionymus lyra*. Les valeurs correspondent aux moyennes des activités EROD mesurées sur quatre réplicats pour chaque individu.

Les résultats obtenus en mars et août 1992 sur le callionyme et la limande, ne sont pas suffisants pour interpréter de manière précise les variations d'activité enzymatique EROD, en dehors et pendant les périodes de reproduction. Les jeunes limandes pêchées en août étaient composées à 60 % de mâles dans leur première année, donc à priori peu sensibles aux effets naturels de reproduction. D'autre part, le mois d'août est pour le callionyme la fin de la période de reproduction et pour la limande une phase de repos. L'activité hormonale des deux espèces étant décroissante à cette époque nous n'avons pas observé de différence d'activité enzymatique EROD entre les mâles et les femelles. La température de l'eau est un autre paramètre susceptible d'interférer sur l'induction de l'activité enzymatique entre les mesures réalisées en mars et en août. Seul un suivi sur plusieurs années pourra permettre de mieux apprécier la combinaison des effets environnementaux et hormonaux sur les poissons.

Les variations saisonnières d'abondance dans la baie sont plus marquées pour la limande que pour le callionyme. En mars la distribution des limandes d'environ deux ans est meilleure qu'en août, mois pour lequel elle est essentiellement côtière. Ceci pose le problème de l'échantillonnage dans les différentes zones de la baie.

Les connaissances de la courantologie, de l'influence des apports fluviatiles, des mécanismes hydrosédimentaires estuariens, ainsi que la cartographie proposée de la contamination par les PCB dans l'estuaire et la baie de Seine, permettent de proposer quatre zones de contamination différentes (fig. 4). Notre expérience d'interprétation étant limitée jusqu'à présent à des études expérimentales nous avons tenté de mettre en relation les mesures d'activités enzymatiques et la spécificité hydrologique et hydrosédimentaire de la baie de Seine.

Les stations situées dans la zone sub-estuarienne sont plus directement exposées aux flux de contaminants de la Seine et présentent une induction de l'activité enzymatique plus importante que les stations des trois autres zones. Bien qu'un gradient de pollution de la zone sub-estuarienne vers le large soit observable, l'interprétation des résultats est parfois délicate. En mars 1992 pour la limande, nous observons une activité EROD en zone marine supérieure à celle de la zone centrale ou sub-estuarienne. De fortes inductions enzymatiques sont obtenues dans la zone marine et au Nord de la zone centrale pour le callionyme en août 1992 qui, bien qu'inférieures à celles de la zone estuarienne, empêchent l'observation du gradient de contamination de la côte vers le large observé en mars 1992. La mobilité des reproducteurs à l'intérieur de la baie entre des zones rapprochées de contaminations différentes en période de reproduction est une explication possible des quelques résultats allant à l'inverse du gradient le plus souvent observé. Néanmoins, les différences d'induction de l'activité EROD sur le callionyme et la limande apparaissent en relation avec le découpage proposé de la baie de Seine en quatre zones. Les trois zones, marine, centrale et côtière sud montrent globalement des activités EROD inférieures à la zone sub-estuarienne qui semble la plus exposée au panache de la Seine. Une étude de la distribution des PCB dans la limande et les espèces benthiques de la baie a confirmé l'influence de la Seine pour la contamination de la zone estuarienne. Les niveaux de PCB exprimés pour deux congénères prédominants (CB153 et CB138) ont fait apparaître une contamination plus élevée des organismes, mollusques, crustacés et limandes, dans la zone estuarienne, quel que soit le sexe et l'âge des limandes.

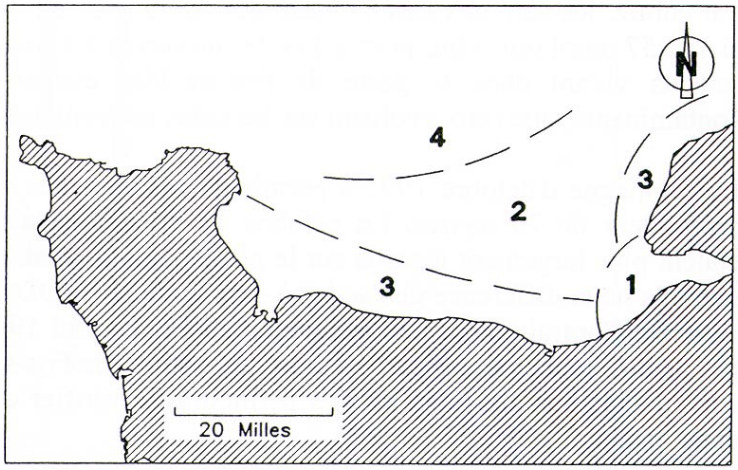


Fig. 4 : Proposition de découpage par zones de la baie de Seine suivant l'influence combinée du fleuve et des courants de marée : zone 1 sub-estuarienne, zone 2 centrale, zone 3 côtière et zone 4 marine.

Fos-sur-Mer

Une stratégie d'échantillonnage identique à celle de la baie de Seine a été développée en Méditerranée sur le *Serranus hepatus* (serran) et le *Mullus barbatus* (rouget barbet de vase) en mai et octobre 1992. Le secteur d'échantillonnage choisi, de Fos-sur-Mer à Cortiou, est soumis en permanence aux effets des rejets du grand émissaire de la ville de Marseille et se trouve au coeur de l'important complexe industriel de Fos-sur-Mer ainsi qu'en bordure de l'aire de dilution du Rhône. Comme pour la baie de Seine, seul un travail à long terme permettra de dégager de réelles tendances de contamination des organismes marins. Les stations sont situées suivant les contraintes de chalutage et de façon à refléter au mieux les grandes influences qui s'affrontent dans le golfe (fig. 5 et 6).

Le **rouget barbet de vase**, très largement distribué sur la côte méditerranéenne en mai et en octobre, est une espèce sentinelle bien adaptée à la surveillance. Il a été facilement collecté par chalutage sur la portion de côte allant de Cortiou à Fos-sur-Mer. Nous n'avons pas pêché de rouget au large des côtes en mai 1992 (fig. 5 et tableau 2) car pendant la période de reproduction, d'avril à août, les géniteurs se regroupent sur des zones de fonds côtiers de 10 à 55 m. Cette absence de résultats sur des individus pêchés plus au large empêche l'observation d'un gradient de contamination.

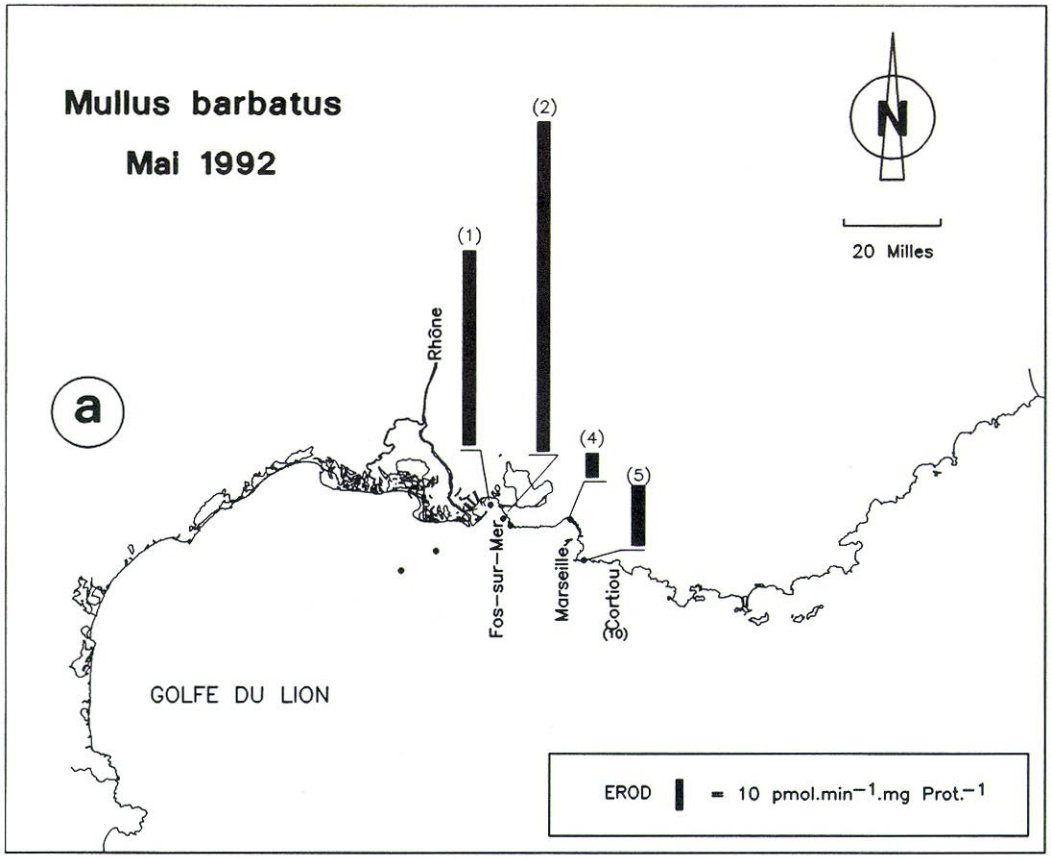
Par contre, les activités EROD mesurées sur le site de Fos-sur-Mer sont 8 à 12 fois supérieures (66.69 et 101.57 $pmol.min^{-1}\cdot mg\ prot^{-1}$) à celles mesurées à Marseille (8.01 $pmol.min^{-1}\cdot mg\ prot^{-1}$). En mai, les rougets vivant dans le golfe de Fos-sur-Mer étaient donc significativement plus exposés aux contaminants, que ceux évoluant sur les côtes marseillaises.

La campagne d'octobre 1992 a permis de collecter des rougets sur des stations plus au large, à une profondeur de 70 mètres. En octobre les rougets n'étaient pas en période de reproduction et donc étaient plus largement répartis sur le plateau continental. Cette meilleure répartition permet d'observer une très nette différence de l'activité enzymatique EROD entre la station la plus au large et les stations côtières. Contrairement aux mesures réalisées en mai 1992, celles effectuées en octobre ne montrent pas de différences significatives entre les stations de Fos-sur-Mer et celles de Marseille et Cortiou. Une surveillance sur plusieurs années permettra de vérifier cette première tendance spatiale observée en mai.

Le **serran** est un poisson benthique sédentaire vivant sur des fonds allant jusqu'à 100 mètres. C'est une espèce hermaphrodite synchrone se reproduisant durant la période de mars à août. Connaissant l'influence des hormones sexuelles sur l'activité EROD et les différences observées suivant le sexe, l'hermaphrodisme du serran constitue un modèle intéressant pour le suivi des variations saisonnières de l'activité enzymatique EROD dans un site contaminé. Le serran a été facilement échantillonné par chalutage entre Fos-sur-Mer et Cortiou (fig. 6 et tableau 2). La pêche réalisée en mai a été menée pendant une période où la vitellogenèse est très active. C'est à partir de mai que de nombreux ovocytes atteignent la maturité. Les périodes de maturité observées en Méditerranée s'échelonnent de fin mars à mi-juillet à Marseille avec une période de ponte à partir d'avril-mai.

Un gradient de pollution de la côte vers le large est cependant observé sur des fonds de 25 à 100 mètres (fig. 6a). Une étude menée sur les flux et le devenir des PAH dans le delta du Rhône a montré une forte décroissance vers le large. A l'embouchure du Rhône l'accumulation de polluants dans les sédiments superficiels est importante. L'analyse sur les foies, organe reconnu comme siège de la vitellogenèse, montre des inductions enzymatiques significativement supérieures dans le golfe de Fos (8.88 et 5.41 $pmol.min^{-1}.mg\ prot^{-1}$) par comparaison avec la station la plus au large (0.65 $pmol.min^{-1}.mg\ prot^{-1}$).

Ce même gradient de pollution est inversé pour les serrans pêchés en octobre 1992 entre la station dans le golfe de Fos (3.04 $pmol.min^{-1}.mg\ prot^{-1}$) et la station plus au large (8.18 $pmol.min^{-1}.mg\ prot^{-1}$). La station intermédiaire, située sur la radiale joignant le site de Fos-sur-Mer et la station la plus au large, présente une induction de l'activité EROD supérieure à celle mesurée à l'intérieur du golfe de Fos-sur-Mer, aussi bien en mai qu'en octobre. Se pose alors le problème de l'interprétation des mesures d'activités enzymatiques sur les poissons prélevés dans la zone côtière des 30 miles suivant une radiale qui n'est peut-être pas suffisamment étendue. Une bonne connaissance de la biologie des espèces sentinelles et de la géochimie spécifique du site étudié semble nécessaire. La distribution hétérogène des polluants (PAH), inducteurs spécifiques de l'EROD, dans les diverses classes de particules influence leur transport dans le milieu aquatique et leur dépôt ultime dans les sédiments. L'augmentation des teneurs en PAH parfois observée à la limite du plateau continental, pour des profondeurs de 80 à 100 m, est peut-être liée à des apports supplémentaires véhiculés par le courant liguro-provençal qui longe la côte dans la direction sud-sud-ouest. L'érosion naturelle favorisant le déplacement du sédiment et les mouvements naturels des poissons, même réduits, sont autant de facteurs susceptibles de compliquer l'interprétation des inductions d'activités EROD.



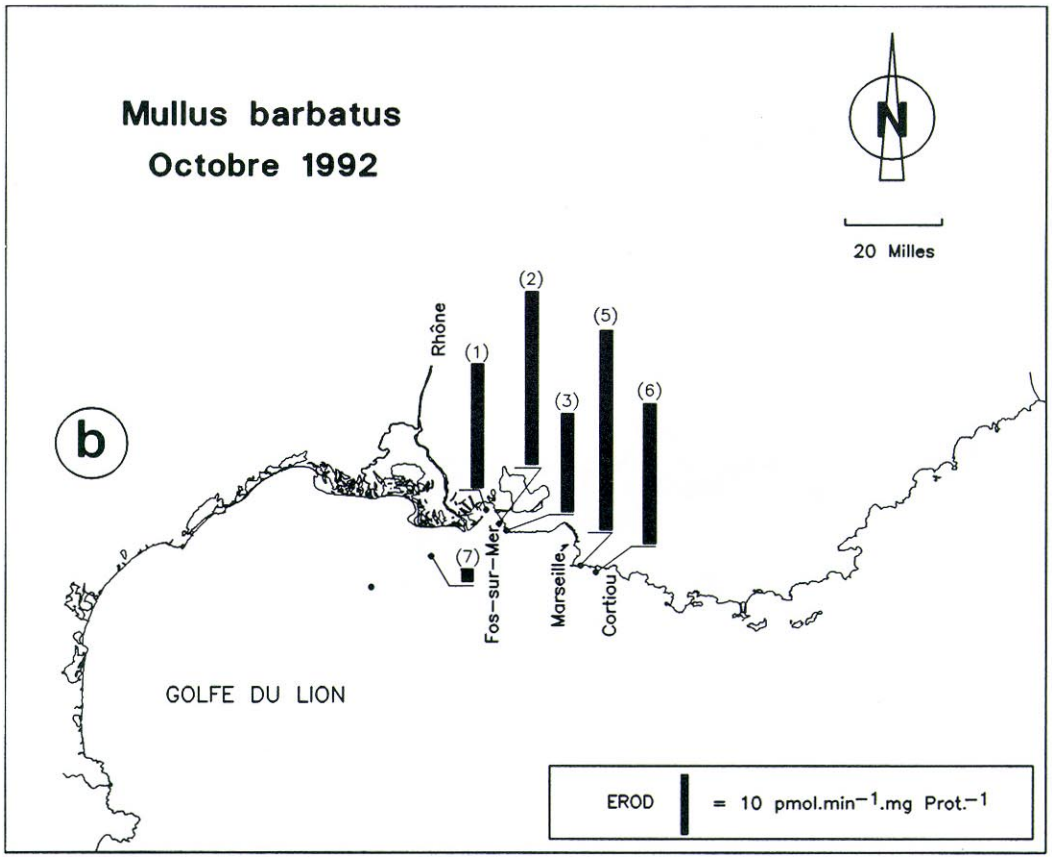
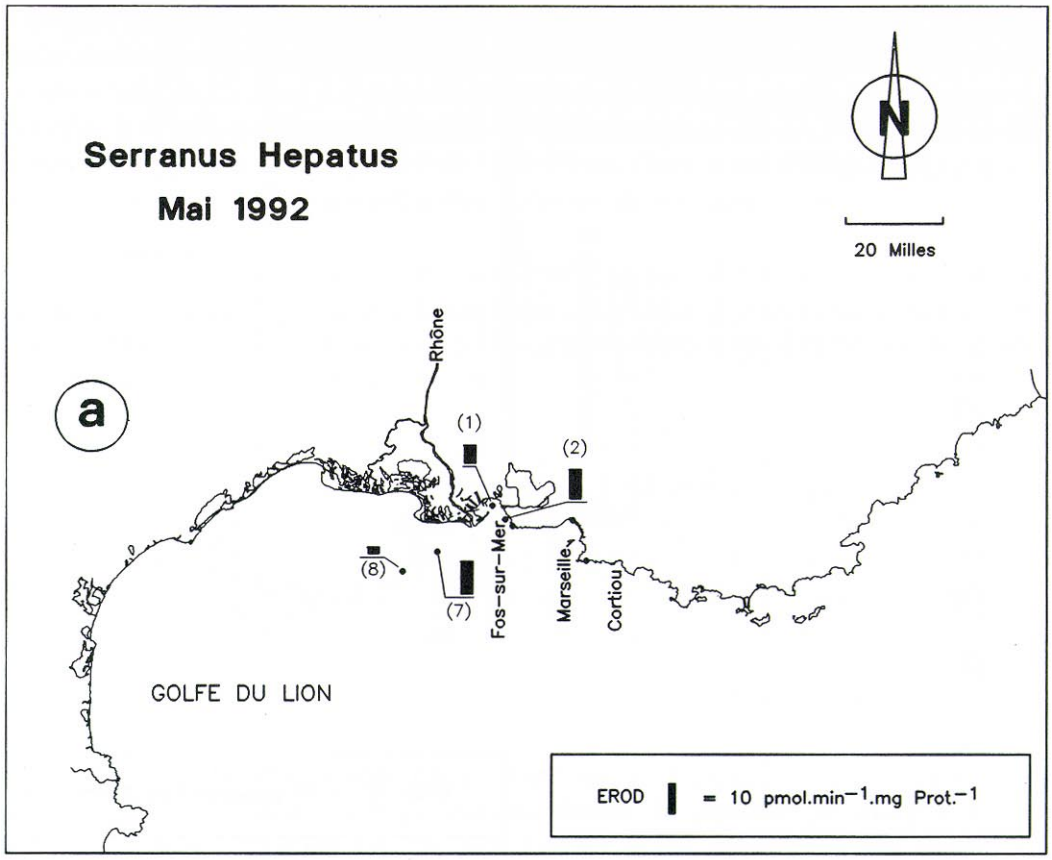


Fig. 5 : Mesures de l'activité EROD dans les foies de *Mullus barbatus* échantillonnés dans la région de Fos-sur-Mer en mai 1992 (a) et en octobre 1992 (b). (n) = numéro de station.



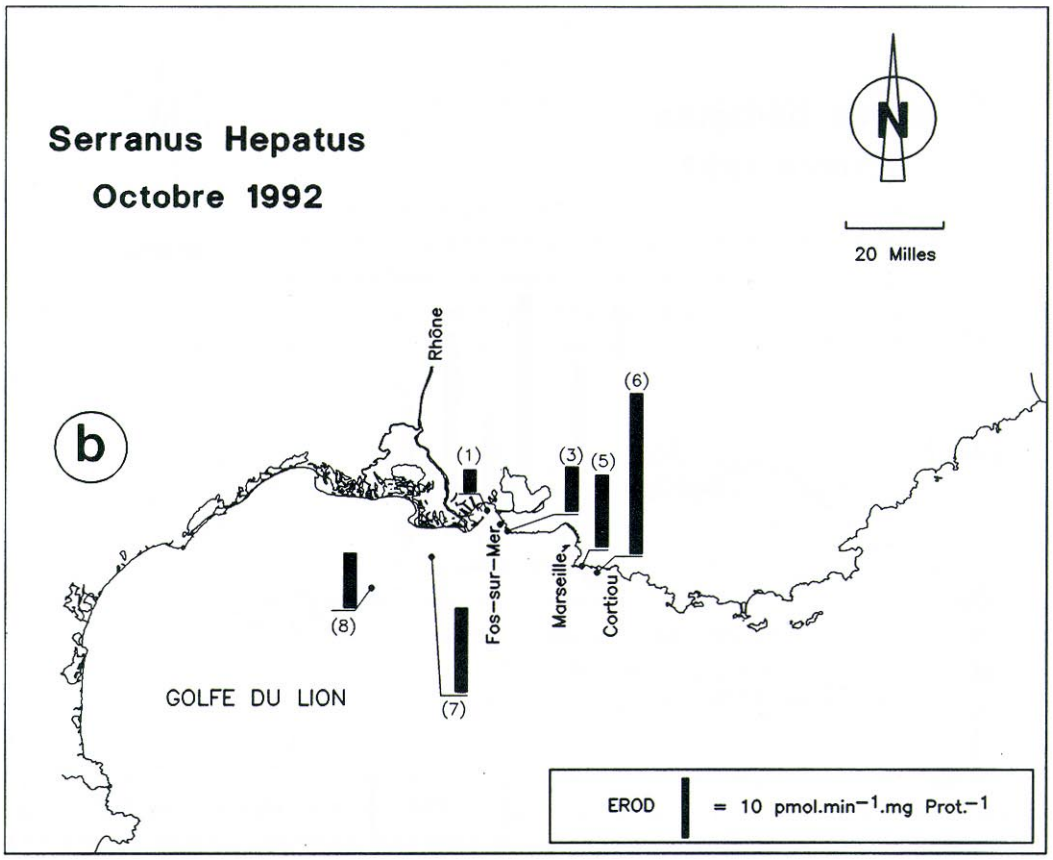


Fig. 6 : Mesures d'activité EROD dans les foies de *Serranus hepatus* échantillonnés dans la région de Fos-sur-Mer en mai 1992 (a) et en octobre 1992 (b). (n) = numéro de station.

Espèces	Mois	Numéro de station	Zone géographique	Longueur moyenne des Individus	Nombre d'individus	EROD pmol.min^{-1}. mg prot^{-1}
Mullus barbatus	Mai	1	Golfe de Fos	13.2	8	66.69 ± 20.08
		2	Golfe de Fos	12.0	8	101.57 ± 80.00
		4	Marseille	17.3	10	8.01 ± 4.10
		5	Cortiou	18.0	10	20.10 ± 10.17
	Octobre	1	Golfe de Fos	13.4	8	18.69 ± 18.53
		2	Golfe de Fos	11.5	10	26.21 ± 13.26
		3	Fos-Couronne	18.4	9	15.87 ± 9.42
		5	Cortiou	18.8	5	33.22 ± 38.13
		6	Cortiou	17.9	10	20.75 ± 7.88
		7	Large	11.6	10	1.50 ± 0.78
Serranus hepatus	Mai	1	Golfe de Fos	12.0	9	5.41 ± 3.66
		2	Golfe de Fos	11.0	8	8.88 ± 4.51
		7	Large	11.0	6	10.34 ± 6.29
		8	Large	10.5	9	0.65 ± 1.00
	Octobre	1	Golfe de Fos	11.0	8	3.04 ± 1.67
		3	Fos-Couronne	10.2	8	7.69 ± 5.42
		5	Cortiou	18.8	9	11.60 ± 7.96
		6	Cortiou	10.5	10	24.23 ± 12.52
		7	Large	11.0	10	12.40 ± 8.32
		8	Large	11.0	9	8.18 ± 4.77

Tableau 2 : Mesures d'activité EROD réalisées en 1992 dans la zone de Fos-sur-Mer sur le *Mullus barbatus* et *Serranus hepatus*. Les valeurs correspondent aux moyennes des activités EROD mesurées sur quatre réplicats pour chaque individu.

Le choix d'une maille géographique plus large devrait être envisagé pour les futurs échantillonnages. Ceci permettrait de s'affranchir des interactions potentielles entre zones voisines dues au déplacement, même restreint, des espèces sentinelles sélectionnées. Cette condition paraît nécessaire à l'observation d'une relation entre la pollution du sédiment et l'induction de l'activité enzymatique EROD.

En octobre 1992 l'induction de l'activité EROD mesurée sur des *Serranus hepatus* dans le site contaminé de Cortiou (24,23 pmol.min^{-1}.mg prot^{-1}) est significativement supérieure à celle mesurée au large (8.18 pmol.min^{-1}.mg prot^{-1}). Cette observation confirme les mesures effectuées à Cortiou sur des *Mullus barbatus* et *Serranus* sp. lors d'une campagne d'étude en octobre 1991. Le mois d'octobre est une période de repos sexuel pour le *Serranus hepatus* pendant laquelle le niveau des hormones sexuelles est moins élevé. Celles-ci sont alors moins influentes sur l'activité EROD. Un suivi à plus long terme est nécessaire pour vérifier si les activités enzymatiques EROD sont plus élevées en octobre qu'en mai.

La stratégie adoptée pour évaluer l'effet biologique des contaminants ne permet pas toujours de montrer un gradient de pollution très net, mais permet de comparer les effets de l'exposition à des polluants de poissons vivant dans des zones contaminées côtières et dans des zones plus au large utilisées comme référence. Cette stratégie permet d'intégrer sur une courte période (1 à 4 jours) les effets des contaminants sur une même espèce. Les variations saisonnières observées montrent que les activités EROD doivent être comparées pendant une même saison. Un suivi à long terme permettra de comparer les résultats obtenus au printemps et en automne sur plusieurs années.

5. CONCLUSION

Le but de la mise en place d'un réseau de surveillance des effets biologiques sur les côtes françaises est d'estimer à plus ou moins long terme l'impact des polluants sur les différents niveaux d'organisation des écosystèmes. L'intérêt d'utiliser le marqueur enzymatique EROD dans des programmes de surveillance fait maintenant l'objet d'un bon consensus sur le plan international. L'intérêt de la biosurveillance est de compléter les informations recueillies par mesures chimiques sur les côtes françaises depuis 1979 dans le cadre du RNO. L'EROD intègre les interactions toxicologiques et pharmacocinétiques résultant de l'exposition d'organismes à des mélanges complexes de contaminants et constitue un indice biologique mesurant des effets toxiques cumulés. Cependant l'interprétation de l'induction de l'activité EROD sur des animaux collectés sur le terrain n'est pas toujours directe.

La connaissance de l'effet des facteurs environnementaux et physiologiques est un outil précieux pour l'interprétation des mesures. Les tentatives de rapprocher les études de courantologie, les mesures de contamination des sédiments et la bioaccumulation des PCB dans les poissons et les espèces benthiques servant de nourriture à ceux-ci semblent utiles à une meilleure interprétation. Dans ce sens, les organisations internationales NSTF et CIEM ont recommandé en 1992 de réaliser simultanément des dosages chimiques sur le tissu des poissons et le sédiment afin de faciliter l'interprétation des mesures biologiques. Les campagnes réalisées en 1992 sur les sites de la baie de Seine et de Fos-sur-Mer révèlent une variation de l'induction de l'activité EROD entre les zones proches des sources de polluants et les zones plus au large. Il semble cependant nécessaire d'optimiser la stratégie d'échantillonnage. Celle ci, tout en intégrant les contraintes océanographiques et économiques, paraît devoir être basée sur une maille spatiale plus large, séparant distinctement la zone côtière du large, tout en accordant une attention particulière aux sites de contamination spécifique. Les premières mesures méritent d'être complétées pour confirmer les variations saisonnières entre le printemps et l'automne qui semblent se dessiner. La mesure du biomarqueur EROD sur des poissons collectés dans des sites potentiellement contaminés offre de grandes promesses pour l'évaluation des risques environnementaux causés par les apports de polluants. Néanmoins l'utilisation d'un seul biomarqueur peut entraîner des erreurs d'interprétations et de diagnostic qu'il serait bon de pallier par l'utilisation de biomarqueurs supplémentaires. Le réseau de surveillance des effets biologiques se doit d'être évolutif et l'emploi d'autres biomarqueurs tels que l'acétylcholinestérase (AChE), spécifique des pesticides de la famille des organophosphorés et des carbamates, est actuellement développé au niveau expérimental sur les côtes allemandes et françaises, dans le cadre du CIEM.

Un groupe de travail sur la mise en place de la surveillance biologique s'est réuni en février 1994 à Port-en-Bessin afin de dresser un bilan des résultats acquis sur le paramètre EROD en baie de Seine et à Fos sur Mer. Plusieurs problèmes ou questions évoqués plus haut ont été identifiés. Des recommandations ont été formulées pour la poursuite de la surveillance, concernant le stockage et la présentation des données, la stratégie d'échantillonnage, l'expérience nécessaire à une bonne interprétation des résultats et l'assurance de qualité. Ces recommandations seront prises en compte dès les campagnes de 1994. Le réseau mis en place sur les deux sites pilotes doit être parfaitement au point avant d'envisager son extension à d'autres sites.

TROISIEME PARTIE

L'ARSENIC ET LE CHROME DANS LES MOLLUSQUES DU LITTORAL FRANCAIS

1. INTRODUCTION

Les contaminants mesurés dans le cadre du RNO sont loin de représenter la totalité des éléments et substances pouvant altérer la qualité du milieu marin. Ils ont été sélectionnés en fonction de plusieurs facteurs, tels que leur toxicité, leur rémanence, leur caractère obligatoire dans le cadre de la surveillance internationale, l'état de l'art en matière de chimie analytique, et aussi les contraintes budgétaires imposées. Cependant, IFREMER, dans le cadre de ses programmes de recherche, développe des méthodes de mesure pour d'autres contaminants. Ayant la charge des analyses dans la matière vivante, et disposant donc des échantillons du RNO, il est dès lors intéressant d'utiliser ce savoir-faire à l'obtention d'une ligne de base des niveaux de présence de ces contaminants dans les coquillages du littoral français. Les résultats acquis pour le chrome et l'arsenic font l'objet de cette troisième partie.

2. L'ARSENIC DANS LES MOLLUSQUES DU LITTORAL FRANCAIS

2.1. Introduction

L'histoire, la littérature, le roman nous incitent naturellement, dans un raccourci trop rapide, à une association des mots "arsenic" et "poison violent". La réalité est plus complexe, plus nuancée et moins dramatique. En fait, l'arsenic est un élément naturellement présent dans le milieu marin à des concentrations 100 à 1000 fois supérieures à celles du cadmium et du mercure. Il y est assimilé par le phytoplancton et toute la chaîne trophique. Les concentrations dans les produits de la mer peuvent atteindre des records sans qu'on puisse pour autant, ni mettre en cause la salubrité des produits, ni faire la preuve d'une contamination du milieu marin par les activités humaines. Les résultats ici présentés de la concentration en arsenic total dans les mollusques bivalves du littoral français sont l'illustration de ces propos.

2.2. Echantillonnage et analyse

Au cours de l'année 1988, 352 échantillons ont été prélevés sur 84 stations du littoral français à une fréquence trimestrielle (moules: 51 stations et huîtres: 33 stations). Ces échantillons sont représentatifs de zones estuariennes, avec des apports terrigènes, et de zones océaniques supposées à l'écart de ces contaminations. Après lyophilisation ces échantillons ont été minéralisés à 205°C en présence d'acides sulfurique et perchlorique avec l'objectif d'une transformation complète des espèces chimiques organoarséniées en arsenic inorganique accessible à l'analyse. La mesure finale était réalisée par

génération d'hydrures volatils par une solution de tétrahydroborure de sodium et détection par spectrométrie d'absorption atomique à 193,7 nm. Dans ces conditions, toutes les molécules contenant de l'arsenic, toxiques ou non toxiques, donnent un signal positif à l'analyse.

2.3. Résultats et discussion

Les résultats obtenus sont exprimés (figure 2) en $\mu g.g^{-1}$ d'arsenic total par rapport au poids sec (chair lyophilisée). La représentation graphique correspond au développement linéaire du littoral français depuis Dunkerque jusqu'à la frontière italienne et la Corse.

Globalement, les teneurs en arsenic des mollusques du littoral français sont tout à fait comparables aux données provenant d'autres pays (Australie, Japon, Groenland, Etats-Unis). Au plan national, il peut être noté chez la moule des teneurs généralement plus fortes en Méditerranée que sur les côtes de la Manche et de l'Atlantique. Les taux d'accumulation ne diffèrent pas fondamentalement entre moules et huîtres bien que cette dernière espèce présente en moyenne des concentrations légèrement plus élevées. Ces variations doivent cependant être interprétées prudemment, car la simple variation saisonnière, pour une même espèce et une même station présente fréquemment une amplitude importante qui relativise les autres observations.

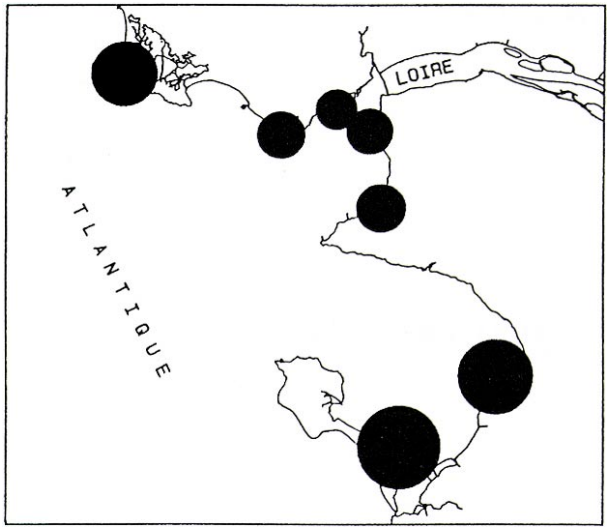


Figure 1 : Teneurs en arsenic total dans les moules de l'estuaire de la Loire. Le diamètre des cercles est proportionnel à la concentration. Chaque point représente la moyenne de quatre mesures saisonnières.

Si l'on examine plus en détail les données géographiques, deux faits doivent être notés. Tout d'abord il faut remarquer les concentrations moyennes plus élevées dans les moules de la pointe du Roselier en Baie de Saint-Brieuc et dans celles de l'étang de Leucate. La cause de ces teneurs excessives n'est pas connue, mais l'hypothèse d'une contamination anthropique mériterait d'y être vérifiée même si les valeurs atteintes ne sont pas encore inquiétantes. La seconde anomalie, bien que moins visible, concerne les zones estuariennes pour lesquelles des concentrations moyennes sont, à l'encontre de toute attente, inférieures à celles mesurées dans les zones adjacentes. On sait par exemple en Loire, que la teneur en arsenic des eaux douces, de l'ordre de 3 $\mu g.l^{-1}$ est abaissée progressivement jusqu'à 1,4 $\mu g.l^{-1}$ par dilution avec les eaux océaniques; mais les concentrations mesurées dans les moules de cet estuaire varient en sens inverse (figure 1). On ne peut expliquer ce phénomène que si l'on tient compte des diverses espèces chimiques d'arsenic présentes dans le milieu et dont le facteur d'accumulation est très différent. Les estuaires sont des zones où la minéralisation bactérienne de l'arsenic est intense, alors que plus au large, l'activité phytoplanctonnique prédomine avec la synthèse de molécules organoarséniées de haut poids moléculaire plus facilement accumulées par les organismes marins.

2.4. Conclusions

Pour conclure, il faut souligner tout d'abord l'absence de risque pour le consommateur de produits de la mer des concentrations en arsenic total que nous avons mesurées. Il convient de rappeler en effet que les composés organoarséniés (dont l'arsénobétaïne) constituent la quasi totalité de l'arsenic

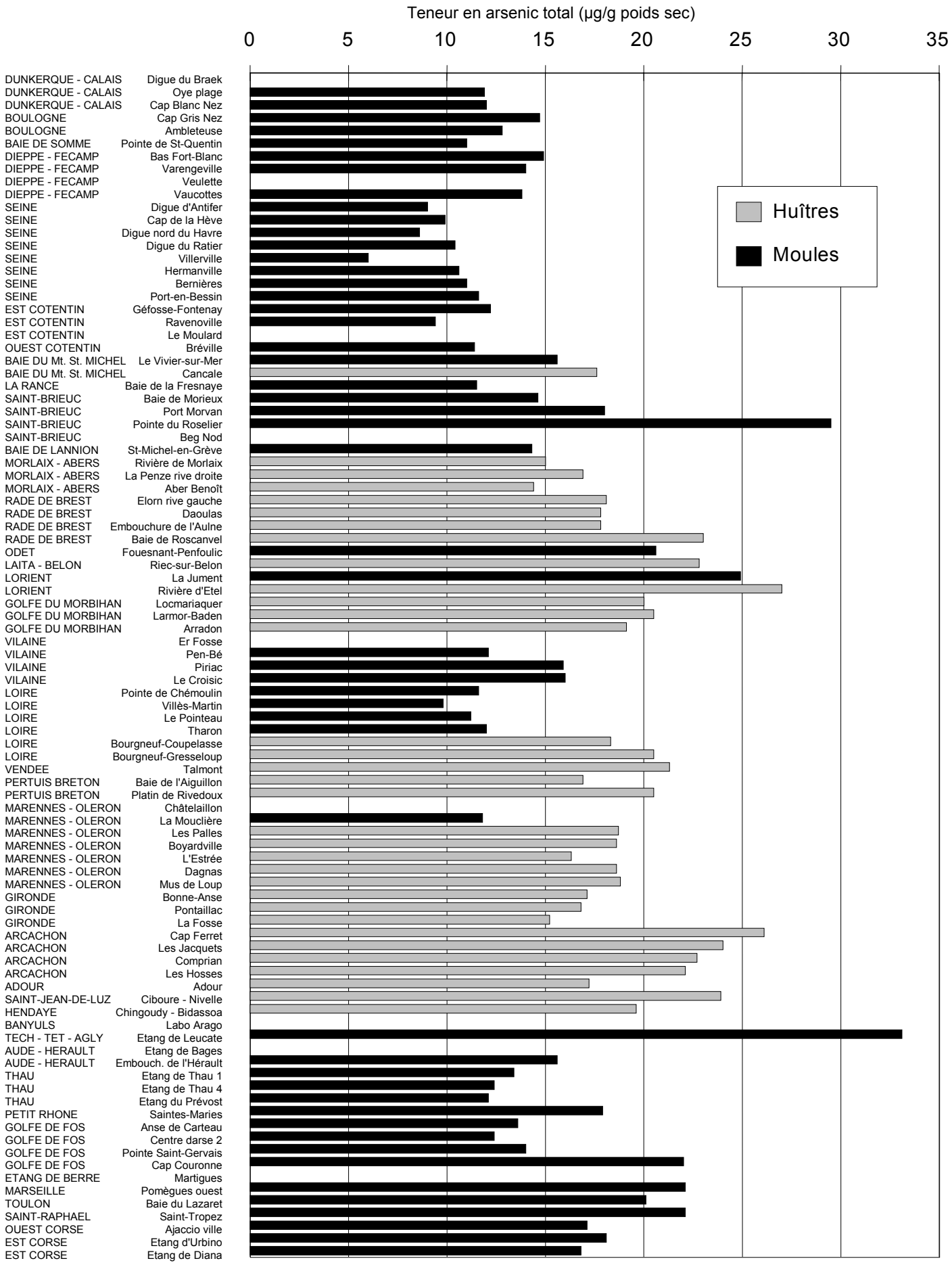


Fig. 2 : Teneurs en arsenic total dans les moules et les huîtres du littoral français, exprimées en $\mu g.g^{-1}$ de poids sec. Chaque donnée représente la moyenne de 4 analyses saisonnières au cours de l'année 1988, soit 352 échantillons analysés.

bioaccumulé, et que ces composés sont dépourvus de toute toxicité. Ces faits sont parfaitement documentés et ne peuvent laisser planer le moindre doute.

Il faut admettre aussi que contrairement à ce qui est réalisé avec succès pour d'autres éléments ou d'autres contaminants, l'analyse des moules et des huîtres du littoral représente très mal l'état des teneurs en arsenic total dans le milieu marin. Un usage sans précaution de telles données conduirait à des conclusions erronées.

En effet, l'arsenic est présent dans le milieu sous de nombreuses formes organiques ou inorganiques en relation avec l'activité biologique de ce milieu. Plus d'une quinzaine d'entre elles sont d'ores et déjà identifiées. Aussi est-il strictement impossible d'y interpréter quoi que ce soit sans l'étude détaillée des processus biogéochimiques dont les mollusques ne constituent qu'un des maillons extrêmes. Pour plus de renseignement sur l'arsenic on pourra consulter l'ouvrage "L'arsenic en milieu marin - Biogéochimie et écotoxicologie" par P. MICHEL, - *Repères Océan (Ed. Ifremer - Brest)* - N°4 - 62p.

3. LE CHROME DANS LES MOLLUSQUES DU LITTORAL FRANCAIS

Le chrome fait partie des métaux les plus utilisés dans le monde (4ème rang mondial par rapport au tonnage). Il est donc aussi largement rejeté par l'industrie, notamment la métallurgie, aussi bien dans l'atmosphère que dans les eaux continentales. Suivant la forme chimique de ces effluents, le chrome peut être déposé dans les sédiments à proximité immédiate des rejets ou être transporté sous forme dissoute à plusieurs centaines de kilomètres de sa source. Le chrome est transféré aux invertébrés préférentiellement par la nourriture. Comme il n'est pas incorporé par le phytoplancton de manière importante, on ne rencontre des concentrations très importantes chez les invertébrés que dans des régions fortement industrialisées et à proximité immédiate des rejets. Comme pour l'arsenic, la toxicité du chrome dépend de sa forme chimique. La forme réduite Cr(III) fait partie des éléments essentiels dans la nutrition animale et humaine alors que la forme oxydée Cr(IV) est toxique et cancérigène à forte dose. L'étude présentée ici, décrivant la distribution spatiale du chrome chez les mollusques le long du littoral français, a pour but de faire un état des lieux de la contamination du milieu côtier par cet élément.

La mesure du chrome a été effectuée sur des mollusques (huîtres et moules) prélevés au cours du premier trimestre de l'année 1991 dans le cadre du RNO, sur 91 stations réparties tout au long du littoral français. Contrairement aux résultats présentés précédemment pour l'arsenic, qui prenaient en compte les quatre prélèvements annuels, ceux obtenus pour le chrome ne concernent donc qu'un seul trimestre. Les variations saisonnières pouvant être importantes (voir l'édition 1991 de ce bulletin), les résultats présentés ici ne sont représentatifs que de la saison des prélèvements, à savoir l'hiver. Les organismes épurés pendant 24 heures dans de l'eau de mer décantée, ont été décoquillés, broyés, homogénéisés et lyophilisés, puis minéralisés à 80°C en présence d'acide nitrique concentré, avant d'être analysés par absorption atomique à four graphite et correction Zeeman.

Les résultats obtenus (figure 3) sont exprimés en $\mu g.g^{-1}$ par rapport au poids sec. On observe une forte variabilité entre les différentes stations, puisqu'il existe un facteur 14 entre les concentrations extrêmes. Cependant, il doit être noté que les différentes espèces de mollusques ne possèdent pas de facteurs de concentration identiques pour le chrome, et donc que les données présentées pour les différentes espèces doivent être discutées séparément. A la période de l'étude, on peut établir des valeurs moyennes de concentration en France : $2,1 \pm 0,9$ $\mu g.g^{-1}$ pour *Mytilus edulis*, $1,7 \pm 1,0$ $\mu g.g^{-1}$ pour *Mytilus galloprovincialis* et $1,0 \pm 0,5$ $\mu g.g^{-1}$ pour *Crassostrea gigas*. Ces concentrations sont du même ordre de grandeur que celles mesurées dans d'autres pays, et ne reflètent pas de contamination aiguë d'une région particulière par le chrome. Cependant, une observation un peu plus fine appelle quelques

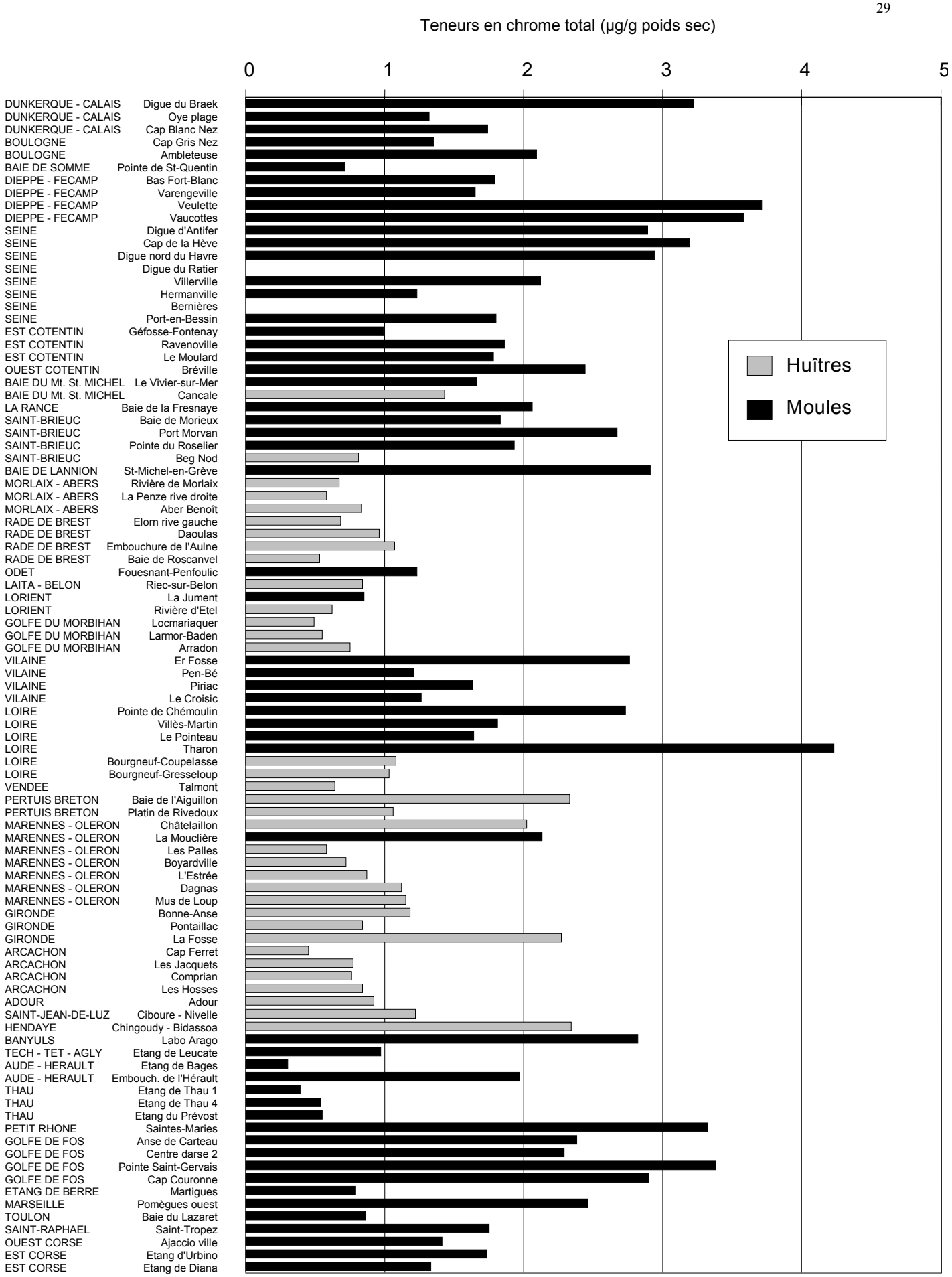


Fig. 3 : Teneurs en chrome total dans les moules et les huîtres du littoral français, exprimées en $\mu g.g^{-1}$ de poids sec. Données du premier trimestre 1991.

commentaires : si l'on considère que certaines régions françaises sont épargnées par la contamination par le chrome (la Bretagne où les moules *M. edulis* présentent des concentrations moyennes de l'ordre de 1,0 $\mu g.g^{-1}$ et les huîtres 0,7 $\mu g.g^{-1}$, ou le Roussillon où les moules *M. galloprovincialis* ont une concentration moyenne de l'ordre de 0,5 $\mu g.g^{-1}$, soit des valeurs très inférieures à la moyenne nationale), on peut identifier des régions où une contamination est significative : l'estuaire et le panache de la Seine où les moules *M. edulis* ont une concentration moyenne 3,1 $\mu g.g^{-1}$ et la région delta du Rhône - golfe de Fos où les moules *M. galloprovincialis* ont une concentration moyenne de 2,8 $\mu g.g^{-1}$. Mises à part ces 2 régions fortement industrialisées, des contaminations tout à fait ponctuelles peuvent être observées (présence d'une station contaminée dans des régions épargnées par la contamination); c'est le cas par exemple de Tharon dans l'estuaire de la Loire (4.2 $\mu g.g^{-1}$ chez les moules *M. edulis*), du Verdon dans l'estuaire de la Gironde (2.3 $\mu g.g^{-1}$ chez les huîtres). Cependant, au regard de certaines concentrations mesurées dans des sites fortement contaminés (jusqu'à 300 $\mu g.g^{-1}$ dans des moules prélevées sur un site recevant des effluents de tannerie très chargés en chrome), le littoral français semble relativement épargné par la contamination par le chrome.

En conclusion, on peut écrire que l'étude de la distribution spatiale de la concentration en chrome des mollusques du littoral français révèle une absence de contamination significative, à part les zones estuariennes fortement industrialisées. Les niveaux dans ces régions, bien que très inférieurs à ceux rencontrés dans des sites fortement contaminés, révèlent cependant un apport de chrome au milieu marin. Cette étude pourra être considérée comme achevée lorsque des travaux auront été menés pour estimer les flux et identifier les sources.

QUELQUES ABREVIATIONS ET UNITES UTILISEES

NSTF : North Sea Task Force
RNB : Réseau National de Bassin
CIEM : Conseil International pour l'Exploration de la Mer
GCCSC : Groupe Conjoint de Contrôle et de Surveillance Continus

AChE : Acethylcholinestérase (enzyme de biotransformation)
EROD : Ethoxyrésorufine-o-deethylase (enzyme de biotransformation)
MFO : Mixed Function Oxydases (famille d'enzymes dont font partie l'EROD et l'AChE)

Mole : unité de quantité de matière d'une substance chimique
Picomole : 10^{-12} mole (millième de milliardième de mole)
$\mu g.l^{-1}$: microgramme (millionième de gramme) par litre
$\mu g.g^{-1}$: microgramme par gramme. Equivalent à milligramme par kilo

Document préparé sous la responsabilité de D. CLAISSE
avec T. BURGEOT pour la partie 2,
J.F. CHIFFOLEAU et P. MICHEL pour la partie 3,
L. GIBOIRE et C. LE PAUL pour les cartes.
Photo O. BARBAROUX

Impression et couverture :
INSTAPRINT - 1-2-3, levée de la Loire - LA RICHE - B.P. 5927 - 37059 TOURS cedex - Tél. 47 38 16 04

Dépôt légal 3ème trimestre 1994

Direction de l'Eau
20, avenue de Ségur, 75302 PARIS 07 SP

Centre de Nantes
Direction de l'Environnement et de l'Aménagement Littoral
BP 21105, 44311 NANTES CEDEX 03