

Maîtrise de biologie des populations et des écosystèmes, mention
environnement, option écotoxicologie-toxicologie.

Université de La Rochelle -- 17000 La Rochelle

IFREMER - Centre de Nantes

Direction Environnement Littoral

Département Polluants Chimiques

Rue de l'Île-d'Yeu - B.P. 1105 - 44311 NANTES CEDEX 03

Nathalie BODIN

Septembre 2001

**COMPARAISON DES VARIATIONS SAISONNIERES DE
LA MATURATION DES GONADES ET DE
BIOMARQUEURS CHEZ LA MOULE
(*Mytilus galloprovincialis*)**

REMERCIEMENTS

Mes premières pensées vont pour **Thierry BURGEOT** qui a bien voulu m'accueillir au sein du Laboratoire d'écotoxicologie, Département Polluants Chimiques. Je tiens à lui exprimer ma plus vive reconnaissance pour sa disponibilité, ses conseils et sa gentillesse. Je le remercie en particulier pour m'avoir fait confiance durant ce travail de recherche appliquée.

Pour m'avoir initié aux techniques en histologie et pour leurs conseils avisés, je remercie spécialement **Nathalie COCHENNEC** du centre Ifremer de La Tremblade et **Ewa LUKOMSKA** du centre Ifremer de Nantes. Merci pour leur disponibilité et leur bonne humeur.

Je remercie le laboratoire côtier de l'IFREMER à La Seyne sur mer (**Jean Yves STANISIERE, Françoise MARCO MIRALLES, Fabienne CHAVANON, et Christophe RAVEL**) pour leur active participation à l'échantillonnage.

Je tiens également à remercier l'ensemble du personnel, les thésards et les stagiaires du centre IFREMER de Nantes pour leur gentillesse et leur accueil, tout particulièrement **Farida AKCHA, Benoît BELIAEFF, Fabien LAURIER, Jacek TRONCZYNSKI, et Gilles BOCQUENE.**

AVANT - PROPOS : L'IFREMER

L'IFREMER (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer), établissement public, à caractère industriel et commercial (EPIC), est le seul organisme français à vocation entièrement maritime. Il est placé sous la tutelle conjointe des ministères de l'Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie, de l'Agriculture et de la Pêche, de l'Equipement, des Transports et du Logement.

Les moyens de l'IFREMER :

- A terre : - 5 centres de recherches
 - leurs stations rattachées
 - des délégations dans les DOM-TOM
- En mer : - 9 navires océanographiques
 - 3 submersibles habitables
 - 1 engin robotique autonome (ROV 6000m)
 - 1 sous-marin lance-plongeur
 - des équipements de reconnaissance

L'Institut regroupe 1700 cadres, chercheurs, ingénieurs, marins, techniciens et administratifs.

Les missions de l'IFREMER :

- ◇ connaître, évaluer, mettre en valeur et rationaliser l'exploitation des ressources de l'océan.
- ◇ améliorer la connaissance, les méthodes de protection et de restauration de l'environnement marin.
- ◇ favoriser le développement socio-économique du monde maritime.
- ◇ apporter son secours à l'Etat, aux professions maritimes et aux autres organismes scientifiques, techniques et économiques concernés.
- ◇ créer et gérer les équipements d'intérêt général (flotte).
- ◇ recueillir, diffuser, valoriser les informations nationales et internationales.
- ◇ s'associer à l'élaboration d'accords et de conventions de coopération internationale dans le domaine marin.

Les programmes de l'Institut :

Les thèmes peuvent être regroupés en quatre catégories :

- ◇ la recherche fondamentale, souvent menée en collaboration avec des universités ou d'autres organismes publics, couvre des domaines très variés allant des géosciences à la biologie des organismes marins en passant par de nombreuses autres spécialités liées à la mer.
- ◇ les développements en technologies marines couvrent des besoins internes ou de la communauté scientifique et industrielle, pour promouvoir de nouvelles techniques dans les industries de la mer.
- ◇ Le suivi des ressources halieutiques et aquacoles, et la surveillance de l'environnement marin permettent d'établir des diagnostics fondés dans ces domaines.
- ◇ La mise à la disposition de la communauté scientifique d'une flotte océanographique hauturière.

L'IFREMER est à la fois un organisme de recherche finalisée, centre d'expertise, agence de moyens, centre de production et diffusion de connaissances scientifiques et techniques, ainsi qu'acteur de la politique extérieure de la France.

Le siège social de l'IFREMER est situé à Issy-les-Moulineaux. Il gère un budget de près d'un milliard de francs, dont 85% proviennent des subventions de l'Etat, auxquelles s'ajoutent des ressources propres que son statut d'EPIC lui permet de développer.

**CENTRE DE NANTES
DIRECTION ENVIRONNEMENT LITTORAL
DEPARTEMENT POLLUANTS CHIMIQUES**

L'IFREMER de Nantes est l'un des cinq centres régionaux. Le centre de Nantes, avec ses cinq stations, compte environ 300 personnes.

La Direction Environnement Littoral, Polluants Chimiques, résulte de la fusion des laboratoires de biogéochimie et d'écotoxicologie.

L'activité de recherche du département se distingue en 4 sous-programme :

- Devenir des contaminants métalliques et organiques
- Détermination des flux en milieu estuarien et côtier
- Evaluation des risques des polluants chimiques pour l'environnement et le consommateur
- Etude des effets à court et long terme sur les organismes vivants.

Ces divers travaux s'insèrent dans des programmes nationaux et internationaux, en vue de mesure des effets à long terme des polluants et du développement de réseaux de surveillance.

INTRODUCTION

L'un des problèmes majeurs de cette fin de siècle est la préservation de la qualité de l'environnement. Le rejet de substances d'origine naturelle ou de synthèse constitue l'un des plus importants facteurs de dégradation de la biosphère par l'homme. L'une des caractéristiques essentielles de la pollution d'origine humaine consiste en la dispersion, volontaire ou involontaire, de substances (pesticides, hydrocarbures) ou éléments (métaux par exemple), qui sont susceptibles de contaminer divers compartiments de la biosphère (atmosphère, hydrosphère, lithosphère), y compris dans des endroits très éloignés de leur site initial d'émission.

Pour faire face à un tel stress environnemental, les organismes marins doivent s'adapter pour survivre. Cependant, leurs capacités d'adaptation sont parfois dépassées et les organismes développent des pathologies, ou meurent. C'est pour évaluer ce stress environnemental qu'une discipline nouvelle, l'écotoxicologie, s'intéresse aux effets des polluants sur la structure et le fonctionnement de l'écosystème. Très proche de la physiologie qui étudie les processus de fonctionnement vitaux des organismes, l'écotoxicologie porte sur l'étude de mécanismes perturbés ou modifiés par les polluants sur des organismes physiologiquement normaux en apparence. L'objectif est de comprendre les mécanismes de toxicité et les effets des polluants sur des organismes modèles afin d'évaluer et prédire leur impact dans l'environnement.

Depuis une quinzaine d'années, de nombreux outils sont développés dans le but d'étudier les effets biologiques des polluants sur des espèces sentinelles et de surveiller la qualité de l'environnement. Les effets des contaminants majeurs tels que les métaux lourds, les polychlorobiphényles (PCB) et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont ainsi évalués à l'aide d'indicateurs biologiques appelés biomarqueurs. Un biomarqueur est un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant (Lagadic *et al.*, 1997). Appliqués en batterie sur des organismes sauvages ou introduits à dessein (encagement), les biomarqueurs permettent d'évaluer les effets cumulatifs ou antagonistes de l'ensemble des contaminants présents dans le milieu naturel. Les biomarqueurs sont mesurés au sein d'organismes modèles, également appelés organismes sentinelles, étudiés comme témoins de la pollution chimique de l'environnement. Il s'agit de toute espèce vivante susceptible d'être utilisée en tant qu'indicateur de la présence et de la toxicité d'au moins un contaminant, et qui permet d'évaluer les effets potentiels de ce contaminant sur la santé de l'environnement et/ou celle de la santé humaine (Lower et Kendall, 1990 ; Sheffield et Kendall, 1997). Les invertébrés marins sont largement utilisés comme espèce sentinelle pour la surveillance du niveau de pollution dans le milieu. Notamment la moule, *Mytilus sp.*, de par ses qualités bio-écologiques (organisme sessile, filtreur, abondant, de large répartition géographique), et ses possibilités de transplantation, est l'organisme clef de réseaux de surveillance tels que le « Mussels Watch Program » aux Etats Unis (Goldberg, 1975) et le Réseau National d'Observation (RNO) en France (Claisse *et al.*, 1992).

L'utilisation de biomarqueurs pour le suivi de la qualité des milieux procure, comparativement aux autres méthodes de surveillance, l'avantage d'une évaluation intégrée dans le temps et dans l'espace des polluants biodisponibles, non seulement en terme de présence, mais également par rapport aux effets qu'ils sont susceptibles d'exercer sur les populations animales. En dépit de ces avantages, le handicap principal à l'utilisation de

biomarqueurs dans le milieu naturel demeure l'interférence avec d'autres facteurs de l'environnement (conditions climatiques, caractéristiques physico-chimique du milieu telles que la température, la salinité et la turbidité).

L'emploi de références relatives est l'approche la plus communément appliquée : elle est basée sur la comparaison entre sites de niveaux de contamination différents étudiés pendant la même période. Plus particulièrement adaptée dans le cas d'études ponctuelles, cette approche présente quelques lacunes pour des suivis temporels ou des applications en surveillance. Le plus souvent ciblée, dans la pratique, sur la quantification de quelques contaminants chimiques et de biomarqueurs, cette approche faisait souvent abstraction des interférences liées aux facteurs naturels ou à l'état physiologique des organismes exposés.

Une étude visant à intégrer les facteurs environnementaux et l'état physiologique a donc été initiée en 1999 sur des moules transplantées. Conduite sur une période de deux ans, l'objectif général est d'évaluer les variations saisonnières des biomarqueurs mais également celles des contaminants chimiques bioaccumulés chez les moules, en tenant compte de leur état physiologique. Menée dans le cadre d'un projet IFREMER récurrent, basé sur le développement d'outils pour la surveillance, cette étude a pour but d'identifier les « niveaux de base aux niveaux naturels » d'une batterie de biomarqueurs en fonction du cycle biologique et des quantités de contaminants bioaccumulés. La détermination de ces niveaux de base sur deux sites de typologies variées en Méditerranée devrait permettre de différencier les effets de facteurs naturels des effets des polluants. La quantification de facteurs environnementaux (température, salinité, turbidité) et d'indicateurs physiologiques (indice de condition, maturation des gonades, croissance) apportera des informations utiles à l'interprétation des variations observées avec les biomarqueurs.

Au cours de mon stage de maîtrise, ma contribution à cette étude a pour objectifs :

(1) évaluer le stade de la maturation des gonades et déterminer le sexe des moules échantillonnées, à l'aide d'une technique d'analyse histologique. Ce travail a pour but de valider le développement gonadique comme indicateur physiologique du niveau de contamination du milieu.

(2) comparer les variations saisonnières de la maturation des gonades et les sexes ratio avec des indices physiologiques tel que l'indice de condition et l'indice de croissance, un biomarqueur (les adduits à l'ADN), les paramètres physico-chimiques du milieu (température, salinité, turbidité), et la contamination chimique des tissus des moules par les PCB, les HAP, et les métaux lourds. Ce travail permettra de déceler d'une part les variations saisonnières intra-sites, d'autre part une éventuelle différence entre les deux stations étudiées.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. La surveillance du milieu marin

1.1. Généralités

L'écotoxicologie est une science qui tente de déterminer les effets des polluants sur la structure et le fonctionnement des communautés dans le but de préserver les écosystèmes.

Les nombreuses méthodes permettant de surveiller la qualité de l'environnement peuvent être réparties en deux catégories : la détection des polluants et éventuellement leur quantification, dans les milieux physiques et biologiques, d'une part, et l'évaluation des effets des pollutions sur les organismes vivants, soit au niveau des individus, soit au niveau des populations et/ou des communautés, d'autre part. C'est l'association judicieuse de ces différentes approches qui permet d'évaluer de façon précise l'état des milieux et des organismes qui y vivent (Amiard *et al.*, 1998).

L'approche biologique a ainsi débuté dès le début du 20^{ème} siècle lorsque Kolwitz et Marson (1908 ; 1909) ont proposé d'utiliser les communautés d'organismes aquatiques comme indicateurs de la qualité des rivières au travers de la méthode des Saprobies.

A l'heure actuelle, deux approches complémentaires, basées sur l'étude des organismes vivants, sont employées :

- la recherche de certaines espèces ou de certains groupes d'espèces qui renseignent, par leur présence (ou leur absence) et/ou leur abondance, sur la qualité du milieu. On parle de bioindicateurs.

- la mesure, au sein d'individus provenant du milieu naturel, de paramètres moléculaires, biochimiques, cellulaires ou physiologiques, regroupés sous le terme de « biomarqueurs ».

1.2. Les biomarqueurs : définition et principes

On distingue différents types de biomarqueurs permettant la détection plus ou moins précoce, à différents niveaux d'organisation cellulaire, de la présence (biomarqueurs d'exposition) et des effets (biomarqueurs d'effets) induits par les polluants chimiques (figure1) (Amiard *et al.*, 1998).

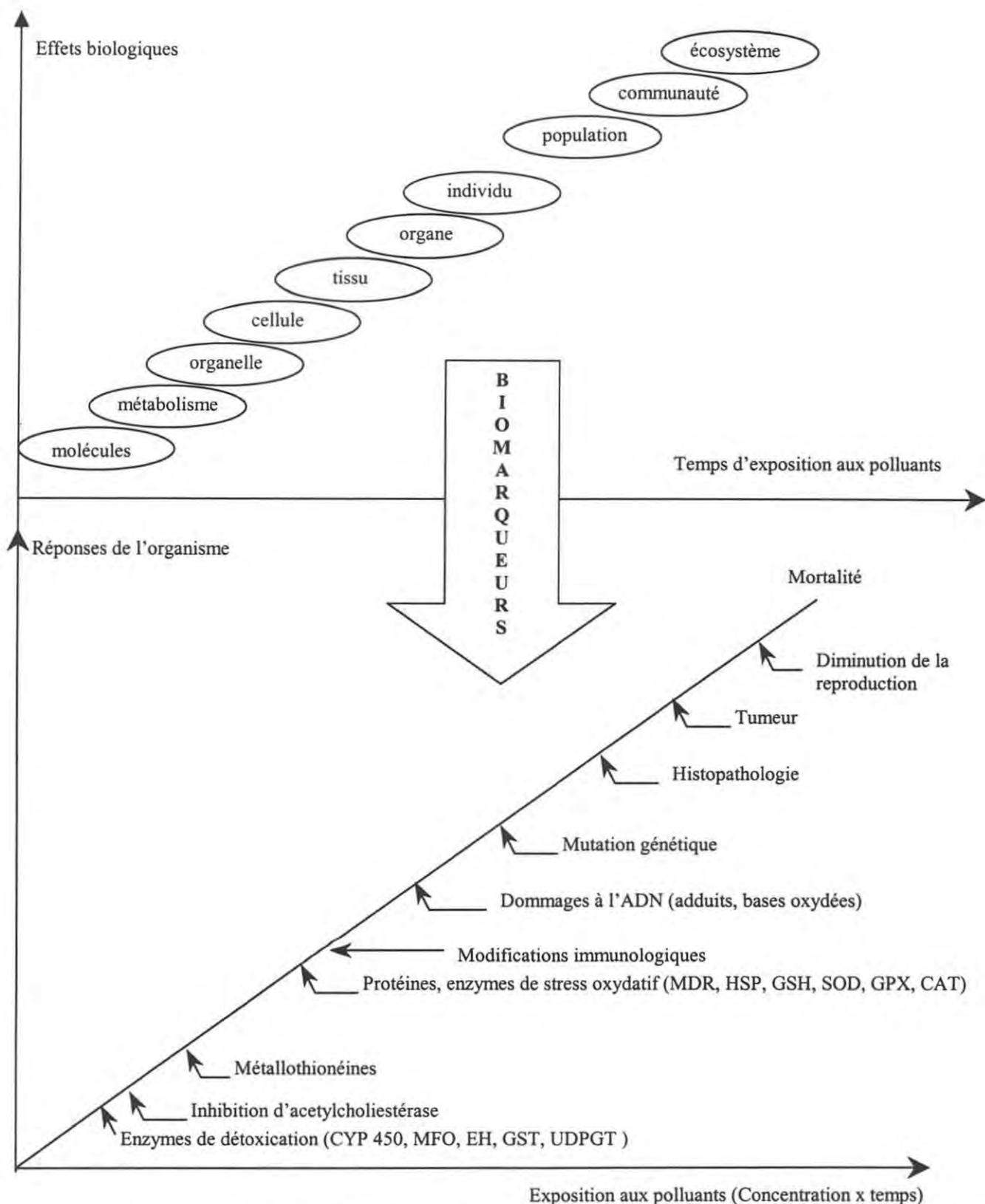


Figure 1 : Chronologie du niveau d'observation des effets induits par les polluants et de l'utilisation des biomarqueurs (d'après Burgeot, 1994). CYP 450 : cytochrome P450, MFO : oxydases à fonctions multiples, EH : époxyde hydrolase, GST, Glutathion-S-transférase, UDPGT : uridine diphosphoglucosyle transférase, MXR : protéines de résistance multiple aux xénobiotiques, HSP : protéines de choc thermique, GSH : glutathion, SOD : superoxyde dismutase, GPX : glutathion péroxydase, CAT : catalase.

Un biomarqueur mesuré au niveau individuel ne trouve sa signification écotoxicologique que lorsqu'il permet de décrire, d'expliquer, voire même de prédire, les effets des polluants sur les populations et communautés (végétales et animales) évoluant dans leur environnement. Cependant, les biomarqueurs ne sont que des indicateurs de la présence actuelle ou passée de polluants dans le milieu et/ou dans l'organisme, leur validation pour la prédiction d'effets sur les niveaux d'organisation biologique élevés (populations et communautés) n'étant pas encore clairement établie (Brouwer *et al.*, 1990 ; Calow et Sibly, 1990 ; Depledge, 1994 ; Lagadic *et al.*, 1994 ; Peakall, 1994 ; Weeks, 1995).

1.3. Un biomarqueur : les adduits à l'ADN

La métabolisation de certains xénobiotiques peut s'accompagner de la production de métabolites électrophiles très réactifs, capables d'interagir avec les groupements nucléophiles des macromolécules cellulaires (ADN, protéines). Cette liaison covalente à l'ADN, ou aux protéines, est appelée adduit.

Selon l'hypothèse développée par Miller et Miller (1981), la formation d'adduits à l'ADN constituerait l'étape critique de l'initiation de la cancérogenèse chimique chez les vertébrés. En effet, cette altération du matériel génétique peut conduire, lorsqu'elle n'est pas réparée, à une mutation stable après réplication de l'ADN, notamment au niveau des proto-oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs.

Dans le cadre de la biosurveillance du milieu marin, la formation d'adduits à l'ADN a pu être étudiée grâce au développement de la méthode de dosage par post-marquage au phosphore 32. Ainsi, parmi les contaminants, les HAP et les PCB ont été identifiés comme inducteurs d'adduits à l'ADN chez les organismes exposés, tels que les poissons et les bivalves (Scilderman *et al.*, 1999 ; Akcha *et al.*, 1999).

La formation d'adduits renseigne donc non seulement sur l'absorption par les organismes de xénobiotiques génotoxiques, mais aussi sur la présence, chez ces individus, de mécanismes de biotransformation. Ainsi, les adduits à l'ADN peuvent être considéré comme des biomarqueurs de génotoxicité.

2. La moule *Mytilus Galloprovincialis* :

2.1. Généralités :

Les moules sont des mollusques appartenant à la classe des bivalves, ordre des filibranches. Elles font partie de la famille des mytilidés dont les membres se distinguent par leurs valves égales, un ligament presque toujours externe, une charnière sans dent (ou avec des dents très réduites), des branchies à filaments séparés, deux muscles adducteurs, un pied allongé et un byssus. Les moules appartiennent enfin au genre *Mytilus* qui est extrêmement répandu dans le monde. L'espèce *Mytilus galloprovincialis* est très commune surtout en Méditerranée, mais se retrouve également sur les côtes atlantiques et jusqu'en Manche occidentale.

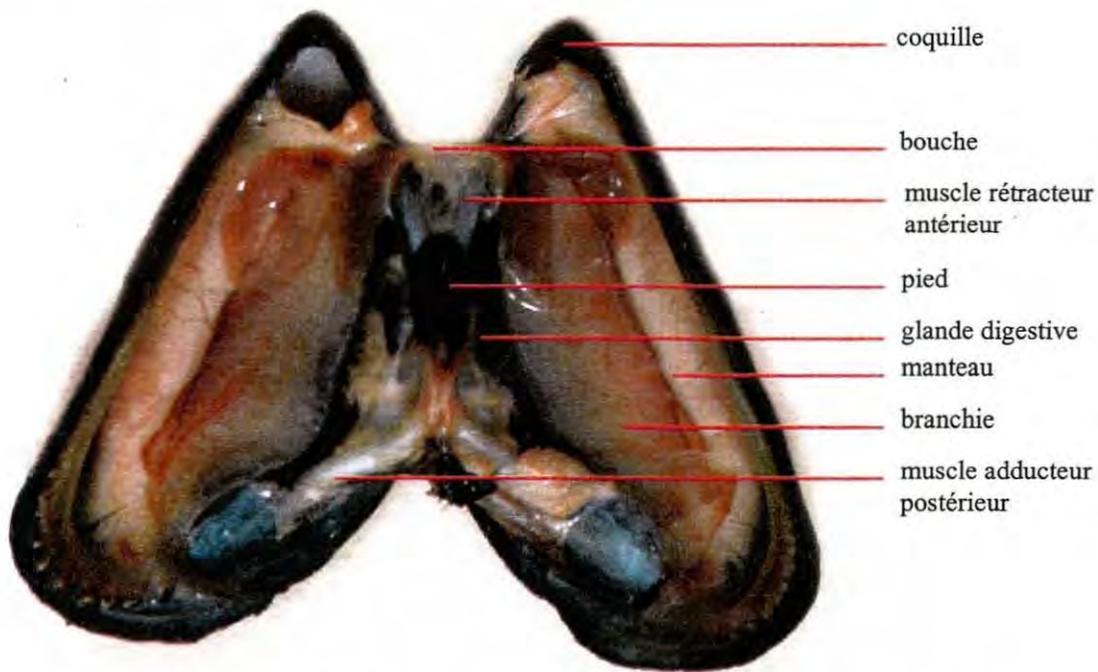


Figure 2 : Anatomie de la moule *Mytilus galloprovincialis* (photographie G. et M-T. Thébaud).

- le manteau

Le manteau, dont la couleur, chez la moule, va du blanc au jaune plus ou moins foncé, présente deux lobes (droit et gauche). Le manteau joue un rôle non négligeable dans la circulation de l'eau au niveau des branchies ; il participe à la respiration grâce à un échange directe de gaz avec l'eau environnante et accumule des réserves. Toutefois, son rôle principal est d'assurer la formation de la coquille, sa calcification et la sécrétion du ligament.

- le tractus génital et histophysiologie

Les moules sont des animaux à sexes séparés. La glande génitale est diffuse dans le manteau et la masse viscérale. Elle est formée par des acini qui aboutissent à des gonoductes constitués par un épithélium cilié unistratifié.

Après un stade de repos au cours duquel l'animal accumule des réserves, les produits génitaux se forment dans la gonade ; arrivés à maturité, ils sont émis dans l'eau. Des variations brusques du milieu favorisent cette émission.

Aussitôt après la ponte, il peut y avoir formation de nouveaux produits génitaux qui donneront lieu à une seconde émission. Plusieurs pontes peuvent ainsi se succéder au cours de la période de reproduction.

La fécondation a lieu dans l'eau ; elle donne naissance à un œuf qui se transforme en larve nageante.

Lorsqu'on arrive au moment de la métamorphose, la larve se pose sur un support, s'y fixe à l'aide de son byssus et se transforme en un individu semblable à l'adulte. Toutefois, s'il n'y a pas de support convenable dans l'immédiat, la métamorphose peut être retardée ce qui augmente les chances de survie. Des phénomènes de dégénérescence commencent néanmoins à apparaître et arrive le moment où, si elle n'a toujours pas trouvé à se fixer, la larve est condamnée à mourir.

2.2. La moule comme espèce sentinelle

Les bioindicateurs sont des espèces ou groupes d'espèces qui, par leur présence et/ou leur abondance, sont significatifs d'une ou de plusieurs propriétés de l'écosystème dont ils font partie (Guelorget et Perthuisot, 1984). Parmi les bioindicateurs, peuvent être distinguées les espèces bioaccumulatrices, et les espèces sentinelles :

- Les espèces bioaccumulatrices présentent, de par leur mode de vie et/ou leurs caractéristiques physiologiques et métaboliques, la capacité de bioaccumuler certains contaminants directement à partir du milieu ambiant ou par d'autres voies (nourriture par exemple) jusqu'à des niveaux nettement supérieurs au niveau de contamination du milieu physique (eau, sédiments, atmosphère...) (Amiard *et al.*, 1998).

- Les espèces sentinelles correspondent à toutes les espèces vivantes susceptibles d'être utilisées en tant qu'indicateur de la toxicité d'au moins un contaminant, et qui permet à partir de mesures directes dans l'organisme d'évaluer les effets potentiels de ce contaminant sur la santé humaine et/ou celle de l'environnement (Lower et Kendall, 1990 ; Sheffield et Kendall, 1997). Les espèces sentinelles vivent sur le site naturel à étudier : soit elles y sont présentes naturellement, soit elles sont introduites par l'homme (encagement par exemple). Le choix des espèces sentinelles se fait selon des critères tels que :

- la large répartition géographique sur la zone étudiée
- la représentativité pour l'écosystème côtier considéré
- la biologie et le cycle connus
- la facilité de capture
- l'exposition aux polluants (espèce benthique, sédiment)

Ainsi, les mollusques marins constituent d'excellents indicateurs de contamination non seulement par le respect des différents critères ci-dessus, mais aussi de par leurs fortes capacités de bioconcentration des xénobiotiques. Les moules marines entrent, par exemple, dans le cadre des réseaux de surveillance de la qualité des eaux côtières.

Organismes transplantés :

Les moules mises en expérience doivent provenir d'un lot homogène (âge et état physiologique). Le recours à des organismes transplantés (cages) permet d'évaluer les effets des polluants dans des zones où les moules sont absentes naturellement. Les pseudo-équilibres entre l'animal et son milieu ne sont pas à rechercher à tous prix, surtout si leur obtention nécessite une durée d'exposition pouvant conduire à une situation de stress physiologique de l'animal.

3. La reproduction : la maturation des gonades

Les variations du poids de la gonade sont l'une des caractéristiques essentielles de son état de maturité. Ce poids est évidemment étroitement lié à la taille de l'organisme.

Les stades du cycle sexuel chez *Mytilus sp* sont identifiés selon la classification de Lubet (1959) reprise par Wilson et Seed (1974), qui comporte 7 stades :

Stade 0 : (repos sexuel), le sexe est indéterminé. Cette phase est caractérisée par l'accumulation de réserves constituées par des cellules adipogranuleuses et des cellules vésiculeuses. Le manteau est alors homogène et transparent.

Stade I : (reprise de l'activité génitale), le développement commence par les premiers stades de la gamétogenèse, les jeunes groupes de cellules germinales étant éparpillés dans le manteau. Une lignée de spermatogonies et d'ovogonies apparaît sur le mur folliculaire.

Stade II : (gamétogenèse), on y trouve tous les stades de la gamétogenèse. Une grande partie du manteau est occupée par des follicules. Dans ceux des femelles, les ovocytes continuent de croître en accumulant du vitellus. Dans les follicules mâles apparaît une large bande centripète de spermatogonies, spermatocytes, et spermatides avec quelques spermatozoïdes libres dans le lumen.

Stade IIIA : (maturité génitale), le manteau est envahi par des follicules qui occupent presque toute la surface gonadique recouvrant ainsi le tissu conjonctif. Chez les mâles, une bande étroite des produits gamétogénétiques apparaît du côté de l'ouverture des follicules, les spermatozoïdes sont disposés en lamelles. Chez les femelles, les ovocytes sont bien développés et présentent une forme polygonale due à leur forte densité dans le follicule. A ce stade, les animaux sont facilement « excitables » et libèrent leurs gamètes sous l'action des stimuli externes.

Stade IIIB : (émission des gamètes), la ponte ou l'éjaculation peuvent être totales ou partielles. Un très grand nombre de follicules sont vidés, et ne renferment que des gamètes résiduels. L'arrangement lamellaire des spermatozoïdes disparaît et la densité des follicules diminue, les ovocytes restant prennent une forme sphérique du moment que la pression dans les follicules diminue. On observe donc une réduction générale de la surface du manteau occupée par le tissu germinatif.

Stade IIIC : (restauration de la gonade), c'est le stade de redéveloppement, le renouvellement gamétogénétique a lieu à partir de ce stade. La bande qui correspond aux premiers stades gamétiques est apparente dans les follicules mâles. Chez les femelles, les jeunes ovocytes attachés au pourtour folliculaire sont abondants. Ce stade pourrait être confondu avec le stade II puisque, dans le même follicule, on trouve des gamètes pondus et des gamètes en développement.

Stade IIID : (arrêt de l'activité génitale et reconstitution des réserves), au cours de ce stade l'activité génitale s'arrête complètement. D'importants phénomènes ont lieu dans le manteau. Les follicules s'écroulent et dégèrent. Les amœbocytes attaquent les gamètes non pondus. On observe souvent, dans la lumière, des follicules et des débris cellulaires. L'animal se retrouve de nouveau au stade de repos sexuel.

La maturité des produits sexuels intervient à la fin de la gamétogenèse. Cette période très brève correspond à un état physiologique particulier ou « stade instable » (Lubet, 1959). L'application brusque de stimuli de nature variée (mécaniques, thermiques, chimiques, électriques) et entre des limites définies, provoque alors la ponte ou l'éjaculation. Celles-ci peuvent être partielles s'il s'agit de la première émission annuelle, les autres pontes (ou éjaculations) étant en général plus importantes chez les animaux à cycle court (*Crassostrea angulata* : Le Dantec, 1968). Chez les animaux à cycle étalé (*Mytilus edulis* : Lubet et Bourcart, 1963– Lubet et Le Gall, 1967) les pontes les plus fortes ont lieu en automne et au printemps, mais il existe plusieurs émissions de moindre importance pour le renouvellement des stocks. Pour *Mytilus galloprovincialis* le repos sexuel a lieu de début juin à mi-septembre. Les pontes ont lieu en février/mars et avril/mai (figure 3) (Cossa *et al.*, 1998).

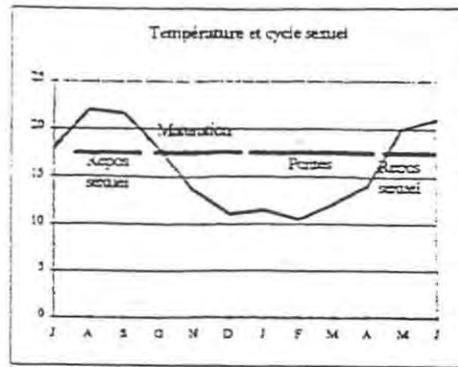


Figure 3 : Cycle sexuel chez un animal standard de taille 30-35 mm (Cossa *et al.*, 1998).

4. Les variations saisonnières

4.1. Généralités

Les moules vivant sur des gisements naturels ou dans des zones mytilicoles peuvent être utilisées comme organisme modèle de l'effet des polluants.

Plusieurs auteurs ont passé en revue les facteurs biotiques et abiotiques dont il faut tenir compte pour optimiser l'interprétation du biomonitoring utilisant la moule (N.A.S., 1980; Phillips, 1980; Phillips et Segar, 1986; Cossa, 1989). La figure 4 en résume les principaux : la taille (âge), la croissance, la gamétogénèse, la ponte, la saison, la salinité, la température, la production primaire. Nous rappelons ici simplement quelques précautions et solutions techniques préconisées pour prendre ces facteurs de variation en compte.

Idéalement, pour maximiser l'évaluation de l'effet des polluants et minimiser les effets des facteurs environnementaux chez la moule par exemple, on doit utiliser des individus de même âge et de même condition physiologique.

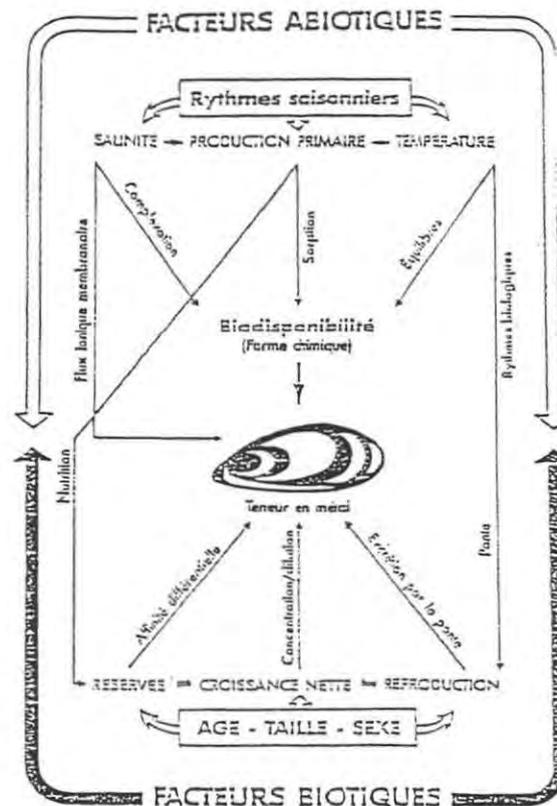


Figure 4 : Représentation schématique des facteurs régulant la concentration en contaminants chez la moule (Cossa, 1989).

4.2. Les variations saisonnières de la maturation des gonades

Nous pouvons déjà nous rendre compte de la grande diversité des comportements sexuels. Certaines espèces ne possèdent qu'une seule période de reproduction généralement printanière ou estivale. Dans la plupart des cas, la période de reproduction est plus largement étendue. La maturation génitale peut alors devenir cyclique et même survenir chaque mois chez quelques bivalves tropicaux.

De nombreuses incidences externes régissent ces rythmes sexuels. Elles sont d'ordre climatique, hydrologique, nutritionnel. Des facteurs internes génétiques, nerveux, endocriniens, métaboliques commandent ces phénomènes.

Les facteurs externes, par exemple, agissent à la fois sur la vitesse de la gamétogenèse, sur le rythme des pontes ou éjaculations, la durée de la vie larvaire et l'établissement des jeunes dans le benthos.

- La température

Orton (1933) considère que la température est le facteur principal du rythme sexuel des animaux marins. Il croit pouvoir affirmer qu'il existe pour chaque espèce une température critique de ponte. *Mytilus galloprovincialis* pont en méditerranée à partir de 10-11°C (Lubet, 1959).

- La salinité

Si la salinité agit en tant que facteur limitant le développement des espèces, l'étude de son intervention directe dans le cycle sexuel n'a pas encore été précisée de façon satisfaisante. Lubet (1959) notait que les basses salinités automnales et hivernales retardaient la gamétogenèse des jeunes individus de *Mytilus edulis*. Toutefois, l'action de la salinité est difficile à dissocier de celle de la température et de la nutrition. L'activité ciliaire permettant la nutrition particulière dépend fortement de la salinité (Cole et Hepper, 1954 ; Chappuis et Lubet, 1966).

- Zonation et nutrition

L'apport nutritionnel a une incidence directe sur le départ et la durée de la gamétogenèse, le jeûne provoquant l'arrêt des phénomènes sexuels et la lyse des gamètes (Lubet, 1959).

Ainsi la zonation exercera une influence très nette sur les phénomènes sexuels, par la durée du temps d'émergence qui limite la prise de nourriture.

Mytilus edulis a une période de reproduction qui augmente lorsque l'on passe des stations les plus hautes aux stations les plus basses de la zone intertidale. Les individus constamment immergés (chaînes des bouées) montrent un cycle sexuel presque continu (Lubet, 1959). On peut considérer que chez cet organisme, les températures optimales provoqueraient un niveau d'utilisation plus faible des métabolites, ceux-ci s'accumulant sous forme de réserves dans le tissu conjonctif (cellules adipo- granuleuses et vésicules de Langer riches en glycogène). Le cycle sexuel est alors freiné et peut complètement s'arrêter (repos estival).

Les facteurs externes ont donc une action sur l'incitation de la gamétogenèse, la maturation des produits sexuels et la libération des gamètes. L'action simultanée de plusieurs facteurs est à envisager car il est artificiel de dissocier les différentes actions.

MATERIEL ET METHODE

1. Stratégie d'échantillonnage

ECHELLE D'OBSERVATION							
Niveau d'observation	Spatial	Temporel			Prélèvement		Analytique
Source de variabilité	Inter station	Mensuelle	Hebdomadaire	Journalière	Inter-mesures	Inter-poches	Intra-mesures
Nombre de répétition	- Carteau - La Fourcade	24 mois mars 1999 mars 2001	4 semaines en août	4 jours en août	6 pools de 5 individus	4 poches différentes	4 réplcats par pools

Ce tableau présente le plan d'échantillonnage développé pour l'étude générale sur deux ans. Ce plan intègre trois niveaux de variabilité : niveau d'observation, sources de variabilité et nombre de répétitions. Le but est de définir une stratégie permettant de rechercher un compromis entre l'estimation des biomarqueurs sur un site et l'effort d'échantillonnage correspondant.

1.1. Triage et calibrage du lot expérimental

Le lot de moules employé provient d'une table située sur le site de production de Carteau dans le Golfe de Fos. Ce sont des moules autochtones. Au total 25 cordes de 50 kg ont été nécessaires pour l'obtention de l'échantillon de 150 kg de moules calibrées.

Toutes les opérations de triage et de calibrage des différents échantillons ont été standardisées et effectuées de la façon suivante :

- Le détroquage de la corde a été réalisé manuellement et non mécaniquement afin de limiter la mortalité.

- Les moules ont subi ensuite un calibrage sur grille de 19 mm. Cette méthode trie chaque individu sur la plus petite dimension de sa coquille c'est à dire sa hauteur.

- Les moules ainsi calibrées montraient une longueur de coquille très hétérogène en raison d'une proportion de moules dites "rondes" assez importante dans les cordes. Un calibrage supplémentaire sur la longueur a été effectué manuellement. La longueur de sélection a été fixée entre 45 et 55 mm.

Le lot obtenu est considéré comme calibré et mis en poche directement et de façon continue.

1.2. Mise en poche du lot calibré

Le lot calibré était stocké en poche ostréicole de maille 18 mm et de dimension de 0,5m x 1m divisée en 3 compartiments. Dans chaque compartiment ont été placés 2 kg de moules soit un équivalent de 160 moules ce qui permet de garantir l'obtention des 100 individus nécessaires à la réalisation de l'ensemble des analyses à chaque prélèvement.

Au total, 11+2+10=23 poches de 6 kilos de moules calibrées ont été réalisées.

1.3. Mise en place des poches sur les sites d'échantillonnage



Figure 6 : Fixation des poches sur les tables (Burgeot, 1999)

Ce lot de moules est ensuite divisé en deux parties : une qui continuera sa croissance sur sa station d'origine, Carteau, et une seconde qui sera transplantée à La Fourcade, près de Cannes. Ces deux sites ont été choisis en raison de leurs différences de typologie.

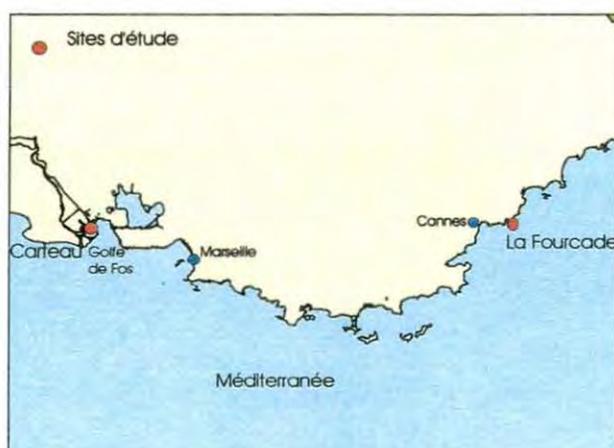


Figure 5 : Carte représentant les sites d'échantillonnage en Méditerranée

Carteau se situe dans le golfe de Fos, zone surtout soumise à une pollution industrielle, caractérisée par une forte activité pétrochimique. Au total 13 poches ont été fixées sur une même table de production. Elle est située sur le flanc ouest du site de production mytilicole de Fos-Carteau. La table est située sur un fond de 6 mètres de nature sablo-vaseux. Les échantillons de moules sont situés à une profondeur de 2,5 mètres. La surface totale de stockage des poches est de 20 m² environ.

En revanche, la zone de La Fourcade, près de Cannes, est principalement soumise à une pollution domestique d'origine urbaine, et de niveau très inférieur au site de Carteau. Les moules ont été stockées sur la darse du centre IFREMER de Toulon pendant 3 jours. Pendant cette période les échantillons ont pu être soumis à :

- une contamination par hydrocarbure
- un stress dû à une chute de salinité en raison de fortes pluies enregistrées pendant la stabulation.

Au total 10 poches de 3 x 2 kilos de moules ont été mises en place à une profondeur de 2,5 mètres environ.. Elles ont été fixées sur la ligne de mouillage délimitant la concession aquacole. Elles sont situées sur un fond variant de 5 à 6 mètres environ, de nature sableuse. Les 10 poches occupent un linéaire de 10 mètres de long environ.

Sur la période de deux ans, une première cohorte a été mise en poche de mars 1999 à mars 2000, puis une seconde de avril 2000 à avril 2001.

2. Protocole expérimental

Un prélèvement par mois a été effectué de mars 1999 à mars 2001. Pour le mois d'août, un prélèvement par semaine et quatre échantillonnage lors de la dernière semaine ont été réalisés. Les étapes suivantes ont ensuite été réalisées au centre IFREMER de Toulon.



Figure 7 : Prélèvement des poches (Burgeot, 1999)

2.1. Collecte des échantillons

Les moules prélevées ont été maintenues à l'intérieur d'une glacière jusqu'au laboratoire. Cent individus de taille homogène ont été prélevés par station.

a - 30 moules pour l'indice de condition et le dosage chimique des PCB, HAP, et métaux lourds (maintenue à - 20°C en attente du départ dans la carboglace).

b - 30 moules pour la maturité des gonades.

c - 10 moules pour la recherche de biomarqueurs d'altérations tissulaires.

d - 30 moules pour les biomarqueurs sur les branchies (Adduits à ADN, MXR et AChE) et sur la glande digestive (BPH).

De plus, la température de l'eau et la salinité ont été relevée ainsi que la direction et force du vent.

2.2. Préparation des échantillons

2.2.1. Protocole pour les biomarqueurs d'exposition (cytochrome P450, adduits à l'ADN, MXR et AChE) et maturation des gonades

a. Chaque moule est mesurée.

b. Les moules sont disséquées le plus rapidement possible après prélèvement. Les tubes eppendorf sont maintenus dans la glace pendant la dissection et lorsque les tissus (glande digestive ; branchies ; manteau) sont dans les tubes (couvercle percé), ceux-ci doivent être plongés dans l'azote liquide très rapidement.

➤ La glande digestive est prélevée et le stylet est enlevé :

- 1/2 de glande digestive par tube eppendorf pour la mesure de l'activité de la BPH et pour le dosage des protéines du cytochrome P450 par immunocytochimie.
- Coupe de 1 mm de glande digestive dans un pilulier contenant du liquide de Davidson, maintenu à 4°C à l'abri de la lumière, pour les analyses histologiques de la maturation des gonades.

➤ Le manteau est prélevé pour les analyses histologiques de la maturation des gonades.

➤ Les branchies sont prélevées :

- 1/3 par tube eppendorf pour l'ACHÉ.
- 1/3 par tube eppendorf pour les adduits à l'ADN.
- 1/3 par tube eppendorf pour les MXR.

2.2.2. Protocole pour les biomarqueurs d'effets (histologie)

10 moules ont été prélevées pour la recherche de biomarqueurs histologiques : La coquille de chaque organisme est lavée et les individus sont plongés un à un dans un pilulier contenant du formol à 10% (1v tissu : 10v formol 10%). Ces piluliers sont stockés à température ambiante à l'abri de la lumière.

2.2.3. Protocole pour le dosage chimique et la détermination de l'indice de condition

- 30 moules pour les métaux et 30 moules pour les organiques dans deux piluliers différents.
- Mesurer les coquilles pour les indices de condition.
- Conserver à -20°C les échantillons avant de les envoyer aux laboratoires d'analyses chimiques.

2.4. Analyse des échantillons

Les échantillons sont analysés dans différents centres de recherche :

- les indices de condition et de croissance, la salinité, la température et la turbidité au centre IFREMER de Toulon.
- la maturation des gonades, la BPH (Akcha *et al.*, 2000) et l'ACHÉ (Ellman *et al.*, 1961) au Centre IFREMER de Nantes, Département Polluants Chimiques.
- les adduits à l'ADN (Akcha *et al.*, 2000) au laboratoire de Toxicologie et Sécurité Alimentaire, ENSA de Toulouse.
- les MXR à l'Université de Rouen (Minier *et al.*, 2000).
- les dosages chimiques de contaminants organiques à l'Université de Bordeaux (Baumard *et al.*, 1998).
- le dosage chimique des métaux au Laboratoire Municipal de Rouen.
- les altérations tissulaires à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes (Hould, 1984)

3. Analyse histologique de la maturation des gonades

La préparation des coupes histologiques de l'appareil reproducteur nécessite cinq étapes (Gabe, 1968).

3.1. Récupération des pièces de tissus

On prélève une partie de la glande digestive et une partie du manteau de chaque individu à étudier (c'est en périphérie de la glande digestive et sur l'ensemble du manteau que sont réparties les gonades). Chaque couple (glande digestive-manteau) est placé dans une cassette d'inclusion identifiée, numérotée et datée.

3.2. Fixation des tissus, déshydratation et inclusion dans la paraffine

La fixation doit être immédiate. C'est l'opération par laquelle on tente de surprendre, autant que possible, les cellules encore vivante pour les conserver dans leur dernière forme.

Le but de l'inclusion c'est de faire pénétrer de la paraffine à l'intérieur même de la pièce fixée, en remplacement de l'eau des tissus, puis d'emprisonner la pièce imbibée de paraffine dans un bloc de cette même paraffine, de sorte à constituer une masse homogène, facile à couper au microtome.

La paraffine n'étant pas soluble dans l'eau, la déshydratation de la pièce se fait grâce au toluène (solvant de la paraffine).

- préparation du fixateur de Davidson : 300 ml d'eau de mer filtrée

300 ml d'alcool à 95°

200 ml de formol

100 ml de glycérol

100ml d'acide acétique (à ajouter au moment de l'utilisation)

- le carrousel : les cassettes sont plongées successivement dans différents bains :

48 heures dans le fixateur

3 fois 2 heures dans de l'éthanol absolu

temps indéterminé dans le buthanol (ce temps dépend de l'heure à laquelle doit se finir la déshydratation pour ensuite enchaîner sur l'inclusion dans la paraffine)

3 fois 30 minutes dans le toluène

2 fois 2 heures dans la paraffine

Toutes les cassettes sont maintenues dans une cuve de paraffine chaude. Les échantillons sont disposés un par un, suivant leur taille, dans des moules en aluminium en gardant l'ordre d'identification de leur cassette.

On fait alors couler de la paraffine au fond de chaque moule, puis on dispose l'organe en faisant attention à son orientation. On dépose une nouvelle cassette identifiée, numérotée et datée par dessus et on ajoute de la paraffine jusqu'au bord du moule afin de bien souder le tout.

Les échantillons étant inclus dans la paraffine, on peut accélérer le refroidissement en les déposant sur une plaque froide puis démouler les blocs.

Toutes les cassettes sont installées au réfrigérateur pendant 24 heures.

3.3. Confection des lames

Chaque bloc est coupé au microtome de type Minot : pour plus de facilité, on travaille en « épaisseur décroissante » (30µm, 20µm, 5µm). Chaque coupe est déposée sur une lame recouverte d'une goutte d'eau distillée, et elle-même installée sur une platine chauffante (55°C) afin de bien orienter le ruban de paraffine. La lame est égouttée puis stockée verticalement à l'étuve (55°C) pendant au moins 24 heures.

Il est préférable de réaliser deux lames pour chaque bloc (une de secours).

3.4. Déparaffinage, réhydratation et coloration

Le déparaffinage des coupes à colorer se fera à l'aide d'un solvant de la paraffine tel le toluène ; puis ce solvant sera éliminé par des bains d'alcool ; enfin les coupes réhydratées avant la coloration proprement dite. Les colorants utilisés sont l'hématoxyline (coloration violette) et l'éosine (coloration rouge).

Ces quatre étapes se font par les passages successifs des lames dans différents bains. Le déparaffinage et la réhydratation doivent être réalisés sous une hotte aspirante pour plus de sécurité.

- 2 fois 10 minutes dans du toluène
- 2 fois 10 minutes dans de l'éthanol absolu
- 10 minutes dans de l'éthanol 70°C
- 10 minutes dans de l'eau distillée
- 3 minutes dans un bain d'hématoxyline stabilisée
- 5 minutes dans un bain d'eau courante
- 15 secondes dans un bain d'éosine aqueuse 1%
- 1 minute dans un bain d'eau courante

3.5. Déshydratation et montage définitif des coupes

Après la coloration, il faut « monter » la coupe, c'est à dire la préparer pour la rendre permanente et la conserver, entre lame et lamelle de verre, dans une résine synthétique (l'eukitt). Pour cela il faut :

- tout d'abord déshydrater totalement les coupes en les plongeant dans plusieurs bains successifs d'alcool absolu : 3 fois 15 secondes dans de l'alcool absolu
- après la déshydratation, « éclaircir » les coupes en chassant l'alcool qui les imprègne par plusieurs bains d'un solvant du milieu de montage : 3 fois 15 secondes dans du toluène
- Le dessous de la lame est rapidement essuyé, puis elle est posée sur un papier buvard, coupe tournée vers le haut. Sans laisser le toluène s'évaporer, une goutte de résine synthétique est déposée sur la préparation que l'on recouvre ensuite d'une lamelle de verre, en évitant d'emprisonner des bulles d'air

Les lames sont alors stockées horizontalement sur des portoirs pendant une semaine, puis observées au microscope dans le but de déterminer le sexe de l'organisme et le stade de maturation des gonades.

3.6. Complément d'information

Lors de la mise au point du protocole expérimental, une modification a été effectuée pour des raisons de sécurité, mais sans résultat : le toluène, solvant très toxique, a été remplacé par un produit américain « clarify », non toxique et non nauséabonde, ayant à priori les mêmes propriétés. Cependant, lors de l'observation des lames au microscope, on a remarqué que le « clarify » ne permettait ni la pénétration de la paraffine ni des colorants, et aucun résultat exploitable n'a été obtenu. Les échantillons de Méditerranée ont donc été analysés avec une méthode histologique utilisant le toluène comme solvant, malgré ses propriétés toxiques : les manipulations ont été faite sous une hotte aspirante et avec utilisation de gants.

De plus, l'analyse de la maturation des gonades a, tout d'abord, porté sur deux organes différents : le manteau et la glande digestive. Cette dernière présentait l'intérêt de réaliser à la

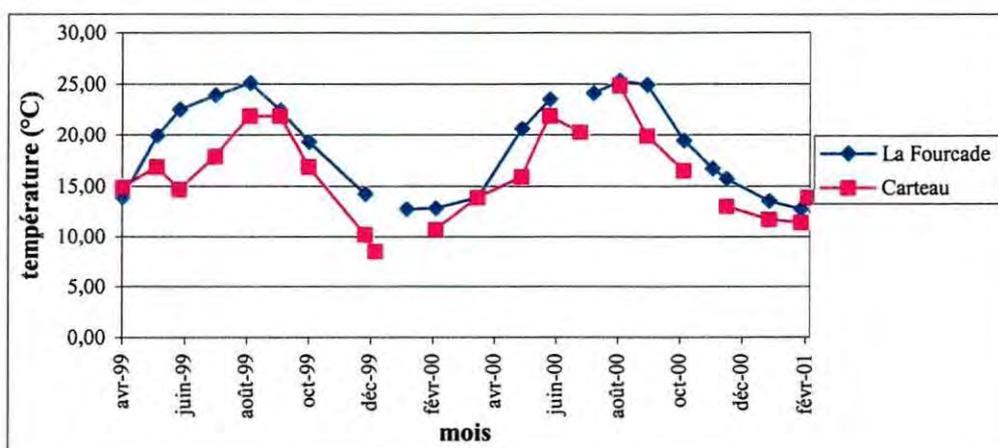
fois une identification de la maturation des gonades et une mesure de biomarqueur, à savoir l'activité BPH (benzo(a)pyrène hydroxylase). Cependant, après une première série de lames, l'observation au microscope a révélé que la lecture était beaucoup plus approximative sur des coupes de glande digestive. En effet, l'observation des gonades dans cet organe n'est possible que lorsque celles-ci sont déjà arrivées à maturité dans le manteau. Ainsi, l'analyse de la maturation des gonades a finalement été effectuée uniquement sur le manteau, celui-ci constituant le lieu prépondérant de la gamétogenèse.

RESULTATS

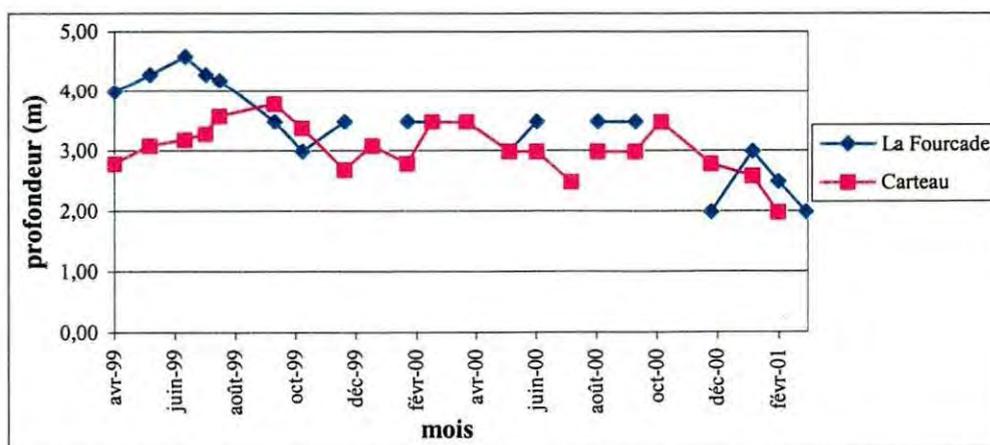
1. Les paramètres physicochimiques (données J.Y. Stanisière, DEL/TL)

Plusieurs paramètres physico-chimiques ont été mesurés pendant la période d'échantillonnage du mois d'avril 1999 au mois de mars 2001 dans le but d'évaluer les variations saisonnières des facteurs environnementaux et de les comparer avec les variations de la maturation des gonades d'une part, et les variations du nombre d'adultes à l'ADN d'autre part.

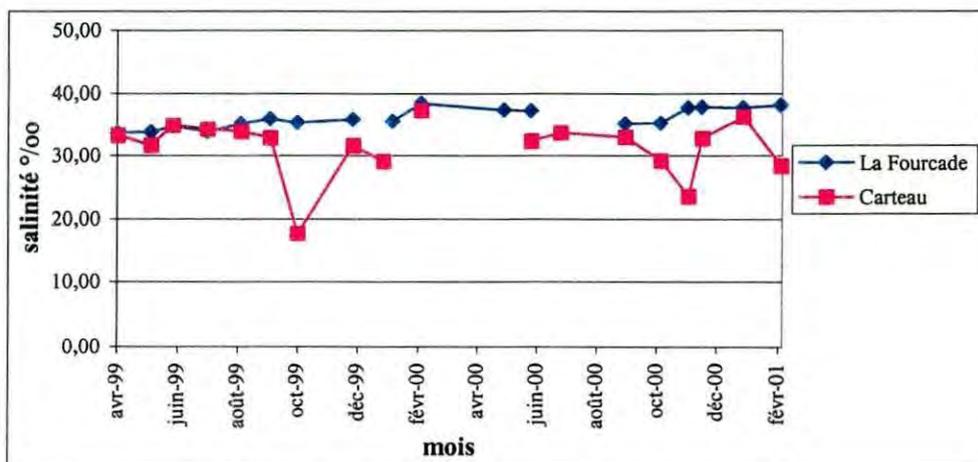
A)



B)



C)



D)

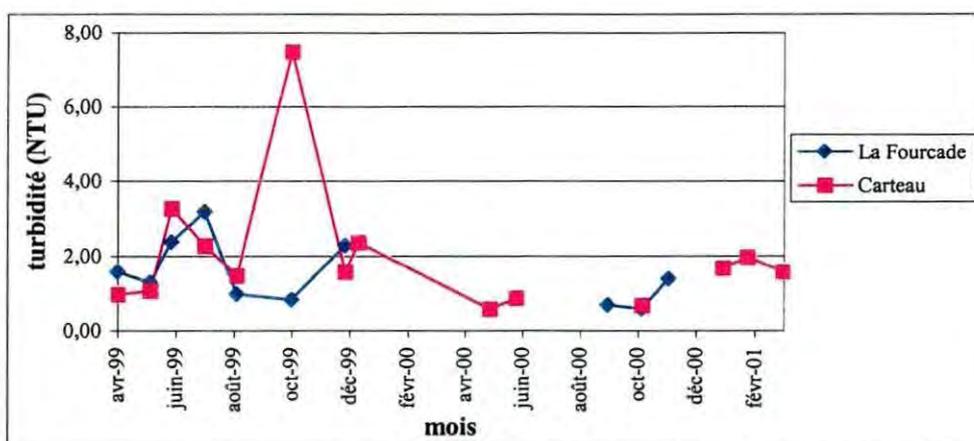


Figure 8 : Variations temporelles de quatre paramètres physico-chimiques sur les sites de Carteau et La Fourcade : la température (A); la profondeur(B) ; la salinité(C) ; la turbidité(D).

Les variations de température, mesurées entre 2 m et 4,60 m sur les deux sites, présentent une amplitude de 8,6°C en décembre à Carteau, à 25,2°C en août à La Fourcade. Sur les deux stations, on remarque des variations similaires de la température, élevée en été mais faible en hiver ; cependant, l'eau est de température toujours supérieure sur le site de La Fourcade.

La salinité présente une plus grande stabilité à La Fourcade, avec une moyenne de 35 ‰ (de 33 ‰ à 38,5 ‰), tandis qu'elle varie de 17,8 ‰ à 37,4 ‰ sur le site de Carteau. On remarque, dans le golfe de Fos, une chute brutale de la salinité aux mois d'octobre 1999 et novembre 2000.

Les variations de turbidité sont similaires sur les deux sites, et s'échelonnent de 0,6 à 3,3 NTU (Unité Néphélométrique de Turbidité). Cependant, sur le site de Carteau, au mois d'octobre 1999, une turbidité très élevée de 7,5 NTU a été mesurée.

L'ensemble des variations des paramètres physico-chimiques tend à démontrer la similarité des profils sur les deux sites d'étude, avec, cependant, une dynamique plus perturbée à Carteau en ce qui concerne la salinité et la turbidité.

2. Indices physiologiques

2.1. L'indice de condition

L'indice de condition correspond au rapport du poids sec lyophilisé sur le poids de la coquille de la moule.

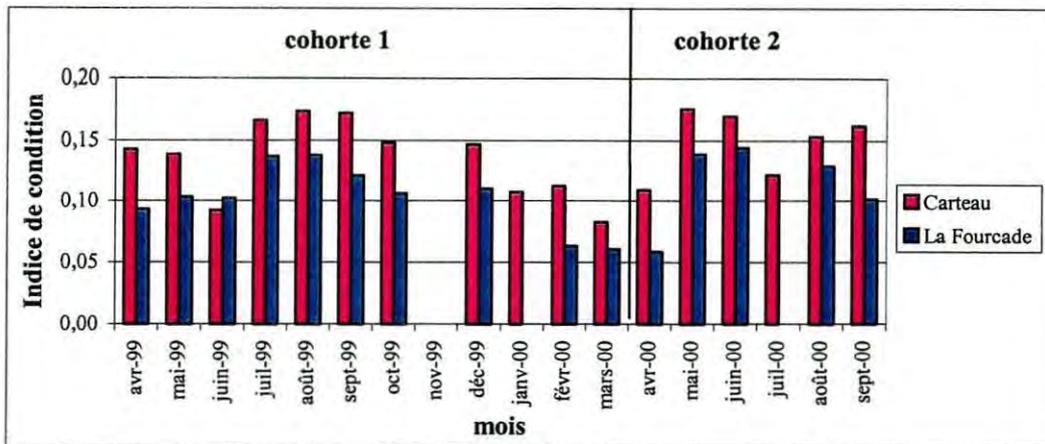


Figure 9 : Evolution temporelle de l'indice de condition des moules, *Mytilus Galloprovincialis*, sur les sites de Carteau et La Fourcade.

L'indice de condition est légèrement supérieur pour les moules collectées sur leur site d'origine (Carteau). Par contre, son évolution temporelle est la même pour les deux stations et pour les deux cohortes, à savoir une augmentation en été et une diminution en hiver. On remarque tout de même une plus grande irrégularité à Carteau : une forte diminution de l'indice de condition est observée aux mois de juin 1999 et juillet 2000.

2.2. L'indice de croissance

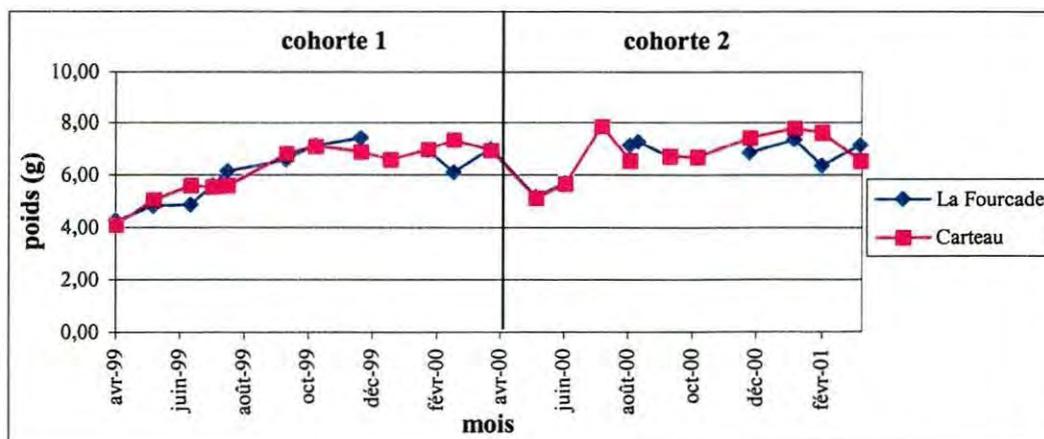


Figure 10 : Evolution temporelle de l'indice de croissance des moules, *Mytilus Galloprovincialis*, sur les sites de Carteau et La Fourcade.

Les moules maintenues en cage à Carteau et celles transplantées en mars 1999 et mars 2000 dans des poches sur le site de la Fourcade étaient âgées de 6 mois et avaient un poids de coquille de 4 g pour la première cohorte et 5 g pour la seconde.

Les deux cohortes ont le même profil de croissance puisque en une année, sur les deux sites, une prise de poids identique de 3 g est observée. Une variation du poids de la coquille des moules de la seconde cohorte à Carteau est cependant notée au mois de juillet 2000.

2.3. La maturation des gonades

Détermination du sexe et de la maturation des gonades :

Le traitement des premiers échantillons a permis d'obtenir différentes coupes histologiques à partir des manteaux. On peut ainsi distinguer les moules mâles des moules femelles, et différencier cinq stades de la maturation des gonades : un stade 0 de repos sexuel, un stade 1 de reprise de l'activité génitale, un stade 2 de gamétogenèse, un stade 3 de maturation génitale et enfin un stade 4 d'émission des gamètes.

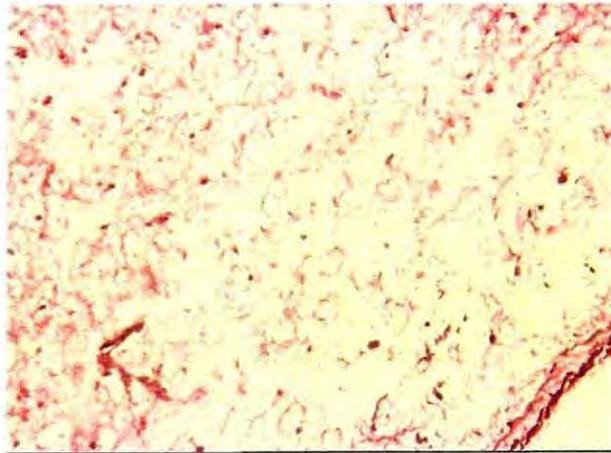


Figure 11 : Stade 0. Cette phase de repos sexuel est caractérisée par l'absence de follicules. Le sexe reste indéterminé.

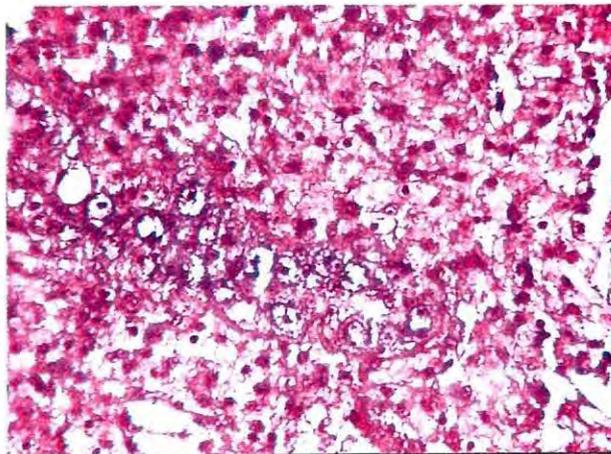


Figure 12 : Stade 1 chez une femelle. Le développement commence par les premiers stades de la gamétogenèse.

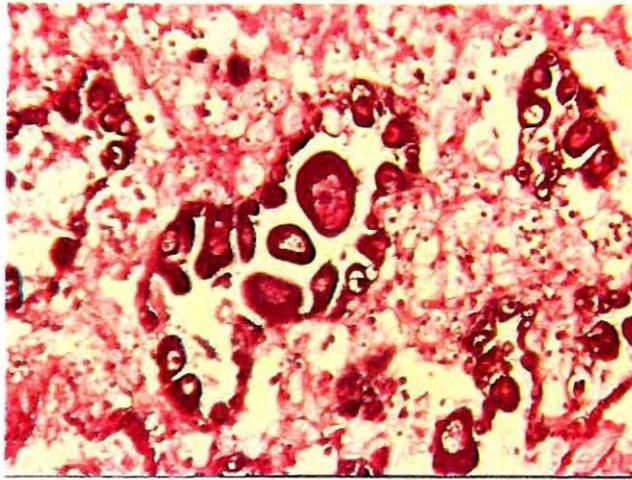


Figure 13 : Stade 2 chez une femelle. Tous les stades de la gamétogenèse sont représentés et occupent une grande partie du manteau.

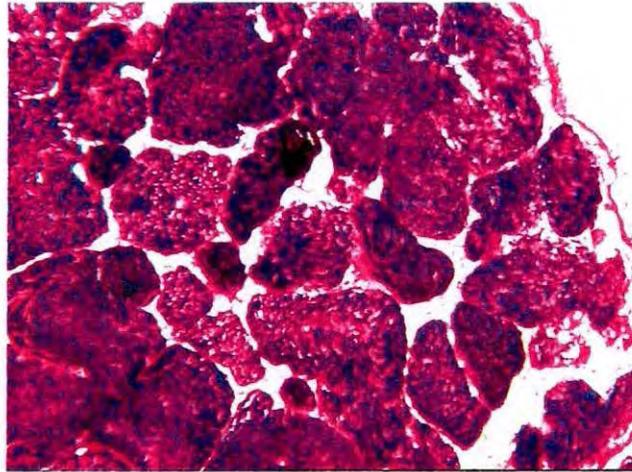


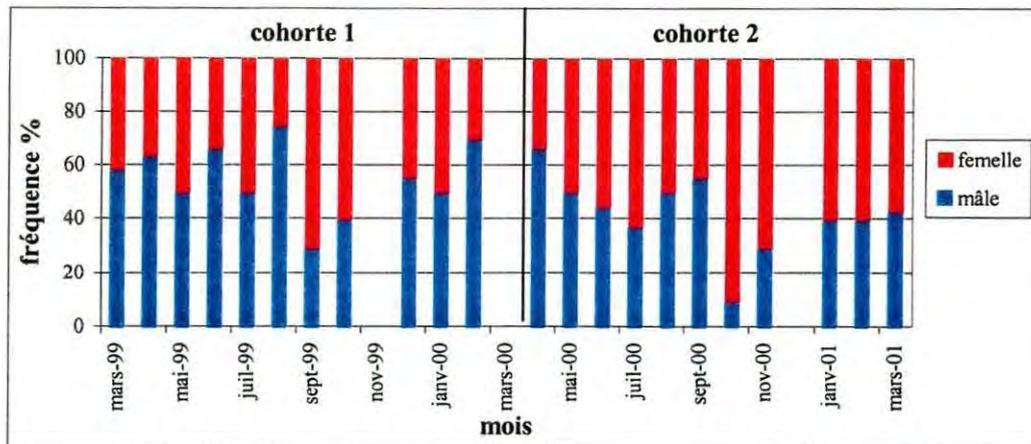
Figure 14 : Stade 3 chez un mâle. Le manteau est envahi par des follicules.



Figure 15 : Stade 4 chez un mâle. La ponte a lieu; un très grand nombre de follicules sont vidés, ne renfermant que des gamètes résiduels

Distribution des mâles et des femelles :

A)



B)

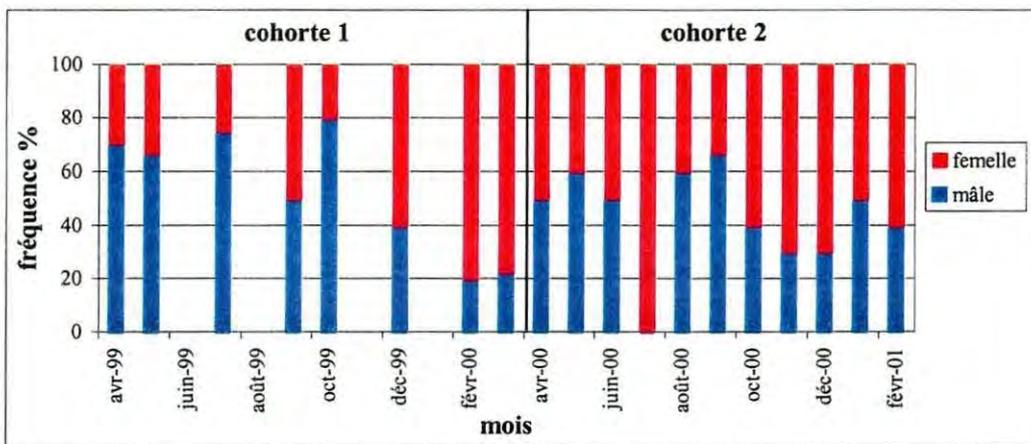


Figure 16 : Distribution par mois des mâles et des femelles sur les sites de Carteau (A) et La Fourcade (B).

	mâle	femelle	sexe-ratio (M/F)
Carteau	48,94	51,06	0,96
La Fourcade	47,43	52,57	0,90

Figure 17 : Proportion des sexes sur les sites de La Fourcade et Carteau ; fréquence moyenne sur les deux années d'échantillonnage.

Les sexes ratio sont comparables sur les deux sites avec, tout de même, une légère supériorité des femelles à La Fourcade.

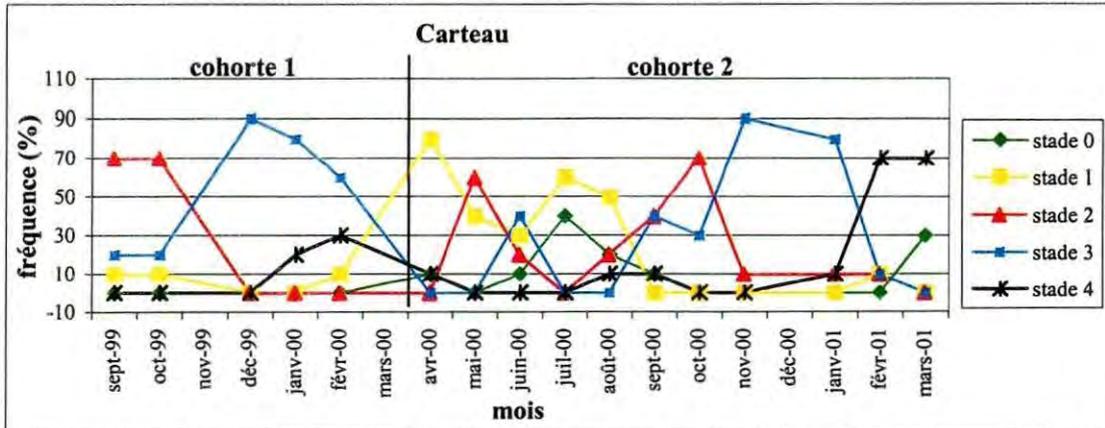
Dans cette étude de distribution des sexes, la proportion de « sexes indéterminés », observés lors des stades 0 de maturation des gonades, n'est pas prise en compte ; ceci explique une fréquence de 100% de femelles à La Fourcade, en juillet 2000, et des pourcentages très élevés (80%) de mâles en octobre 1999 et de femelles en février et mars 2000.

Fréquence des cinq stades de maturation observés entre septembre 1999 et mars 2001 :

Cinq stades de développement gonadique ont été différenciés grâce à la classification de Lubet (1959):

- stade 0 : repos sexuel (= stade IIID et 0)
- stade 1 : reprise de l'activité génitale (= stade I)
- stade 2 : gamétogenèse (= stade II)
- stade 3 : maturation génitale (= stade IIIA)
- stade 4 : émission des gamètes (= stade IIIB et IIIC)

A)



B)

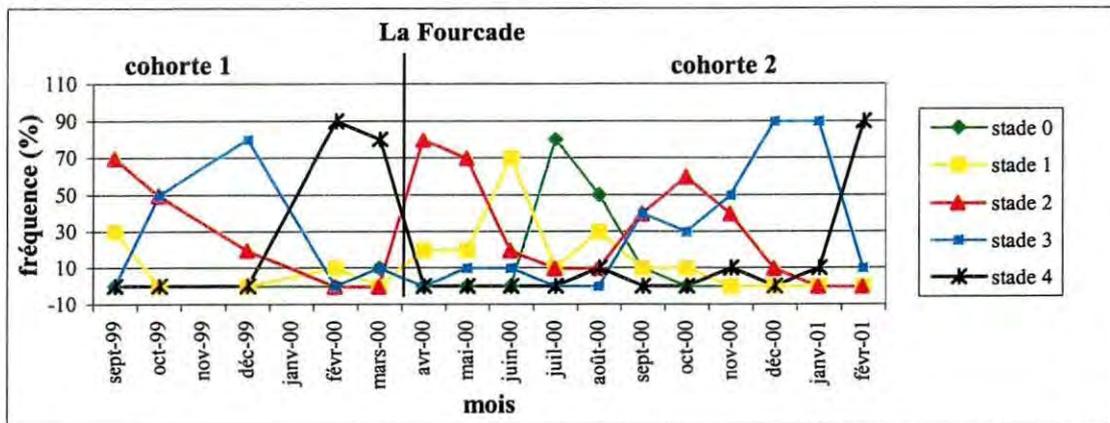


Figure 18 : Evolution temporelle des stades de maturation des gonades de moule, *Mytilus galloprovincialis*, sur les sites de Carteau (A) et La Fourcade (B).

Dans l'ensemble, on remarque une bonne succession des différents stades, sauf pour les étapes 0 et 1 difficilement différenciables lors de la lecture au microscope. Les stades 3 et 4 se succèdent sur les 2 sites, révélant une ponte en fin d'automne de chaque année, pour chaque cohorte (entre novembre et janvier). On peut également supposer qu'une ponte partielle a lieu au printemps (mai-juin), à cause de la forte augmentation des stades 2 en avril 2000 suivie d'une faible proportion en stades 3.

Différences entre les deux stations :

- les stades 0 sont observés à la même période pour Carteau et La Fourcade (juillet), avec, tout de même une plus grande fréquence pour ce dernier.
- des stades 1 ont été identifiés de février à septembre (superposition des deux cohortes) sur les deux sites avec cependant une plus grande variabilité à Carteau qui est, en fait, le résultat d'une détermination plus difficile et aléatoire que pour les autres stades.
- trois pics de stades 2 sont observés à Carteau et La Fourcade : un premier en automne 1999, un second en avril-mai 2000, et enfin un troisième en octobre 2000.

- deux périodes de ponte totale ont été identifiées (stade 3). La première, en décembre 1999 (cohorte 1), est commune pour les deux sites ; la seconde (cohorte 2) est en décalage d'un mois pour Carteau puisque le pic est observé en novembre 2000, alors qu'il se situe en décembre 2000 pour les moules vivant à La Fourcade.
- deux périodes d'émission des gamètes (cohorte 1 et 2) ont également été identifiées (stade 4), mais aucun décalage n'est observé entre les deux sites.

Détermination d'un indice gonadique :

Il est intéressant de calculer l'indice gonadique, après avoir déterminé les différents stades de l'activité gonadique, afin d'établir un profil saisonnier. Cet indice est déterminé tel qu'il est proposé par Wilson et Seed (1974) ; en effet, les différents stades gamétogénétiques décrit par Lubet (1959) sont cotés comme suit :

- Stade 0 = 1
- Stade I et II = 2
- Stade IIIA = 3
- Stade IIIB et IIIC = 2
- Stade IIID = 1

Pour chaque échantillon, le nombre de chaque stade est multiplié par la valeur numérique correspondant à ce stade. Les résultats obtenus sont additionnés et divisés par le nombre total des moules dans l'échantillon : c'est l'indice gonadique.

En général, une augmentation de l'indice gonadique indique la période du développement gamétogénétique, alors que la diminution indique la ponte.

Ne distinguant que cinq stades différents, un regroupement des sept stades définis par Lubet a été effectué pour déterminer l'indice gonadique :

- Stade 0 = 1
- Stade 1 et 2 = 2
- Stade 3 = 3
- Stade 4 = 2

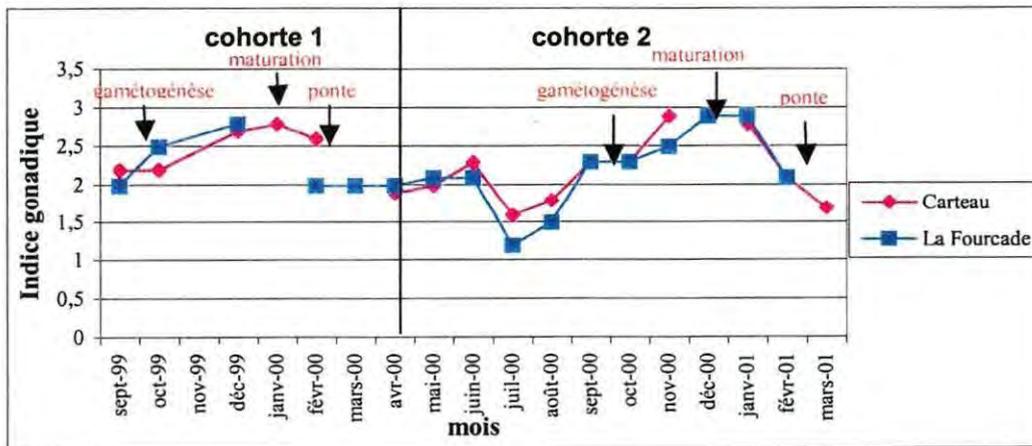


Figure 19 : Evolution temporelle de l'indice gonadique chez la moule, *Mytilus galloprovincialis*, sur les sites de Carteau et La Fourcade.

D'après les variations de l'indice gonadique, *Mytilus galloprovincialis* pondraient deux fois par an : une première fois en janvier-février, et une seconde fois en juillet. Aucun décalage significatif n'est observé entre l'évolution des indices gonadiques des deux stations.

3. La contamination chimique

L'analyse de la contamination chimique a pour but la définition et la distinction des niveaux de pollution de Carteau et La Fourcade. Ainsi, une première approche consiste en la comparaison de la contamination de ces stations avec quelques-unes analysées dans le cadre du Réseau National d'Observation (RNO) ; un suivi temporel d'un an et la détermination d'empreintes chimiques permettent, par la suite, de caractériser les types de pollution rencontrés.

Un test de corrélation entre les variations temporelles des différentes familles de contaminants et celles de l'indice de condition a été effectué. Une relation significative a ainsi été mise en évidence entre cet indicateur physiologique, les PCB et les métaux lourds, mais aucune avec les HAP.

Afin de lisser les variations des teneurs en polluants dues à la physiologie de l'animal, les données des PCB et des métaux lourds ont donc été normalisées par rapport à l'indice physiologique. Ceci facilitera la comparaison des données chimiques, du développement gonadique et des adduits à l'ADN, les variations saisonnières n'étant pas prises en compte.

3.1. Les HAP

3.1.1. Examen des niveaux

De nombreux sites, étudiés dans le cadre du RNO, se situent en Méditerranée et ont fait l'objet d'analyses de la contamination chimique dans les tissus de moules, *Mytilus galloprovincialis*. Il est ainsi intéressant de comparer le niveau de pollution de différentes stations avec ceux de Carteau et la Fourcade.

Les sites choisis sont Cap Couronne, entre le golfe de Fos et Marseille, Centre Darse, dans le golfe de Fos, près de Carteau, et Nice-La Poudrière et le golfe de la Napoule, deux stations proches de la Fourcade. La comparaison est réalisée sur les mois de novembre 1994, 1995, et 1996, aucune donnée plus récente du RNO ne pouvant être exploitée.

L'analyse porte sur la somme de 11 HAP : Phe : phénanthrène ; Fluo : fluoranthène ; Pyr : pyrène ; Chrys : chrysène ; BaA : benzo(a)anthracène ; BbF : benzo(b)fluoranthène ; BkF : benzo(k)fluoranthène ; BaP : benzo(a)pyrène ; DaA : dibenzo(a,h)anthracène ; BP : benzo(g,h,i)pérylène ; IP : indéno(1,2,3-cd)pyrène.

Pour le golfe de Fos et la région de Cannes, à chaque fois un site peu pollué (Cap Couronne et golfe de La Napoule) et un très pollué (Centre Darse et Nice-La Poudrière) ont été choisis.

	Cap Couronne	Centre Darse	Nice-La Poudrière	Golfe de la Napoule
nov-94	108	115	127	324
nov-95	76	197	3863	222
nov-96	13	2982	1414	147
moyenne	66	1093	1801	231

Figure 20 : Concentrations en Σ HAP (en ng/g), présentes dans les tissus de moules *Mytilus galloprovincialis*, sur différentes stations de Méditerranée (données RNO).

En décembre 1999, les teneurs en Σ HAP sur nos sites d'étude étaient de 46,5 ng/g pour La Fourcade et 181,2 ng/g pour Carteau.

Aucune donnée n'ayant été collectée au mois de novembre 1999, nous nous baserons, pour cette analyse, sur les données du mois de décembre. Les moules étant au même stade de développement gonadique au cours de ces deux mois (période de ponte), la comparaison reste possible.

La Fourcade présente une pollution 5 fois inférieure à celle déterminée dans le golfe de La Napoule et 40 fois inférieure à celle de Nice-La Poudrière. La Fourcade est donc un site très peu contaminé. La station de Carteau, quant à elle, est 2 fois plus polluée que Cap Couronne mais 6 fois moins que Centre Darse.

Ainsi, en ce qui concerne la contamination par les HAP, un niveau de pollution très bas caractérise La Fourcade, tandis que Carteau présente un niveau moyen.

3.1.2. Suivi temporel

L'analyse porte sur la somme de 13 HAP : Phe : phénanthrène ; An : anthracène ; Fluo : fluoranthène ; Pyr : pyrène ; Chrys : chrysène ; Per : pérylène ; BaA : benzo(a)anthracène ; BFs : benzo(b+k+j)fluoranthène ; BaP : benzo(a)pyrène ; BeP : benzo(e)pyrène ; DaA : dibenzo(a,h)anthracène ; BP : benzo(g,h,i)pérylène ; IP : indéno(1,2,3-cd)pyrène.

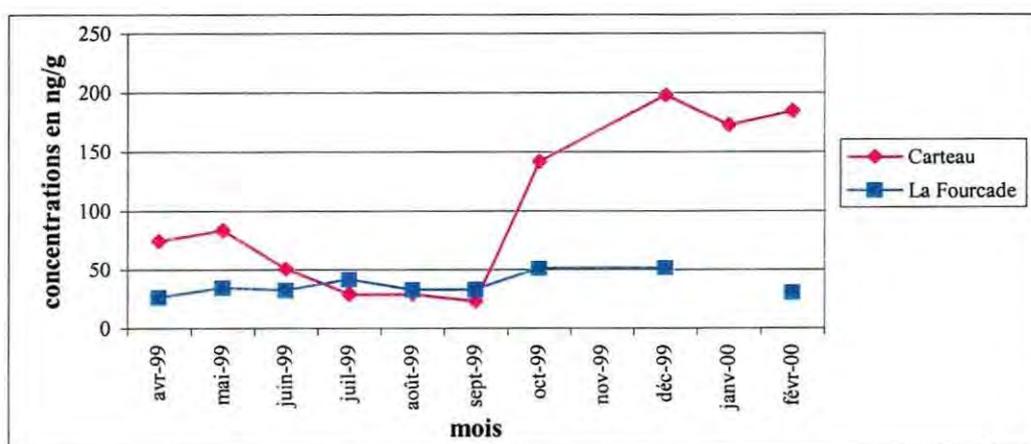


Figure 21 : Comparaison des variations temporelles des teneurs en Σ HAP mesurées dans les tissus de moules (*Mytilus galloprovincialis*) sur les sites de Carteau et de La Fourcade.

Le site de La Fourcade est caractérisé par une pollution faible (de l'ordre de 50 ng/g) et stable en HAP. A l'inverse, la teneur en contaminants à Carteau est très variable, avec un pic jusqu'à 200 ng/g en hiver et des concentrations très faibles en été, de même ordre de grandeur que celles mesurées dans les tissus de moules de La Fourcade.

On remarque, tout de même, une similarité dans l'évolution des concentrations en HAP au cours du temps entre les deux sites. Deux périodes sont à distinguer :

- phase 1 (printemps-été) : une pollution faible et stable entre avril et septembre 1999
- phase 2 (automne-hiver) : une augmentation de la teneur en HAP de septembre à décembre 1999, suivie d'une faible diminution en février.

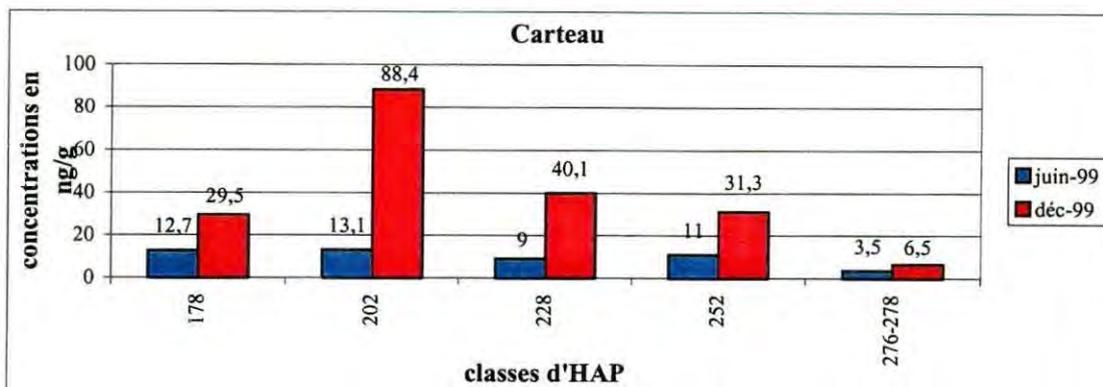
3.1.3. Caractérisation des empreintes chimiques

Afin de distinguer qualitativement la variation temporelle de cette contamination en HAP, des empreintes chimiques ont été réalisées sur les mois de juin 1999 et décembre 1999, tous deux caractéristiques des phases 1 et 2 définies dans le « suivi temporel » (3.1.2).

Pour une étude plus facile, les différents HAP analysés ont été regroupés selon leur poids moléculaire et par classe d'aromaticité :

- phénanthrène (Phe) + anthracène (An) = 178g/mol (tri-aromatique)
- fluoranthène (Fluo) + pyrène (Pyr) = 202g/mol (tétra-aromatique)
- benzo(a)anthracène (BaA) + chrysène (Chrys) = 228g/mol (tétra-aromatique)
- benzo(b+k+j)fluoranthène (BFs) + benzo(e)pyrène (BeP) + benzo(a)pyrène (BaP) = 252g/mol (penta-aromatique)
- indéno(1,2,3-cd)pyrène (IP) + dibenzo(a,h)anthracène (DaA) + benzo(g,h,i)pérylène (BP) = 276-278g/mol (penta et hexa-aromatiques)

A)



B)

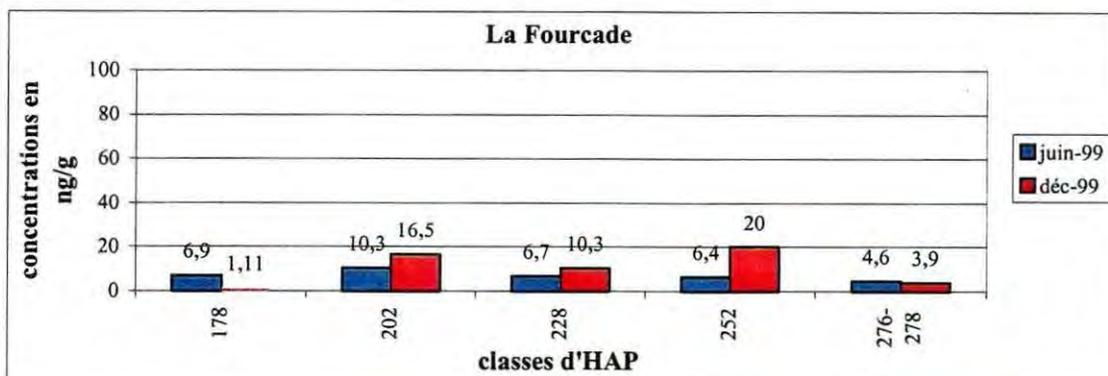


Figure 22: Distribution des classes d'HAP, définies selon leur poids moléculaire, dans les tissus de moules, en juin 1999 et décembre 1999, sur les sites de Carteau (A) et La Fourcade (B).

A Carteau, on distingue très nettement la différence de profil des classes d'HAP entre les mois de juin 1999 et décembre 1999. En effet, au cours de la phase 1 (printemps-été), on remarque une distribution quasi constante des différents HAP, avec tout de même une légère dominance des composés tétra (202) puis tri-aromatique (178). Lors de la phase 2 (automne-hiver), ce sont les tétra-aromatiques (202 puis 228) qui sont majoritaires, suivis des penta-aromatiques (252).

A La Fourcade, les profils de classes d'HAP sont encore plus différents : en juin 1999, ce sont les tétra (202) qui prédominent puis les tri (178) et tétra (228) ; alors qu'en décembre 1999, les penta (252) sont les plus abondants, suivis des tétra-aromatiques (202 et 228).

Les différences de profils, observés à partir des poids moléculaires, permettent d'identifier une grande variabilité temporelle et spatiale pour la contamination par les HAP entre les sites de Carteau et La Fourcade.

3.2. Les PCB

3.1.1. Examen des niveaux

Les sites choisis sont les mêmes que lors de la comparaison des concentrations en HAP, à savoir Cap Couronne, Centre Darse, Nice-La Poudrière et le golfe de la Napoule. La comparaison se fera sur les mois de février 1997 et 1999, aucune donnée plus récente du RNO ne pouvant être exploitée.

L'analyse portera sur la somme de 7 PCB: PCB28, PCB52, PCB101, PCB118, PCB138, PCB153, PCB180. Les données utilisées sont les données brutes, c'est à dire avant la normalisation par rapport à l'indice de condition.

Date	Cap Couronne	Centre Darse	Nice - La Poudrière	Golfe de la Napoule
nov-94	84	97	282	228
nov-95	58	147	778	80
nov-96	86	108		13
moyenne	76	117	530	107

Figure 23 : Concentrations en Σ PCB (en ng/g), présentes dans les tissus de moules *Mytilus galloprovincialis*, sur différentes stations de Méditerranée (données RNO).

En décembre 1999, les teneurs en Σ PCB étaient de 37,8 ng/g pour La Fourcade et 127,9 ng/g pour Carteau.

De même que pour l'étude des HAP, la comparaison entre novembre et décembre reste valable, puisque les moules sont en période de ponte au cours de ces deux mois.

La Fourcade présente une pollution 3 fois inférieure à celle déterminée dans le golfe de La Napoule et 15 fois inférieure à celle de Nice-La Poudrière. La Fourcade est donc un site très peu contaminé. La station de Carteau, quant à elle, est 2 fois plus polluée que Cap Couronne, et de même ordre de grandeur que Centre Darse.

Ainsi, en ce qui concerne la contamination par les PCB, un niveau de pollution très bas caractérise La Fourcade, tandis que Carteau présente un niveau moyen.

3.1.2. Suivi temporel

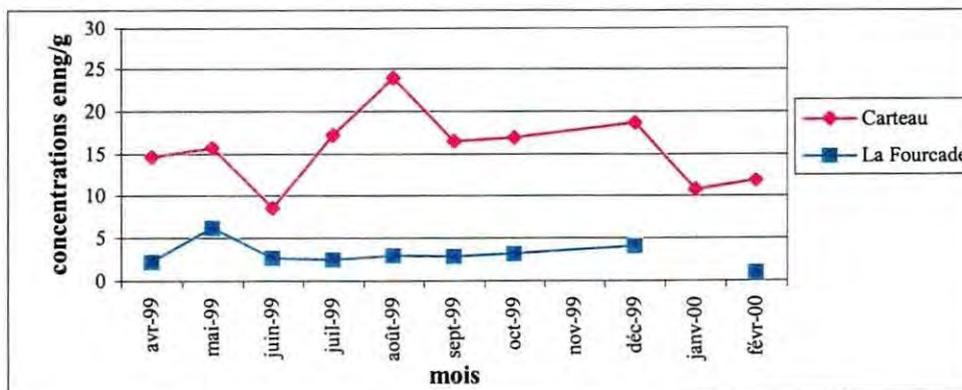


Figure 24: Comparaison des variations temporelles des teneurs normalisées en Σ PCB, mesurées dans les tissus de moules (*Mytilus galloprovincialis*) sur les sites de Carteau et de La Fourcade. Les concentrations PCB ont été normalisées par rapport à l'indice de condition.

L'analyse porte sur la somme de 9 PCB : PCB28, PCB52, PCB101+90, PCB118, PCB138+160, PCB153, PCB180.

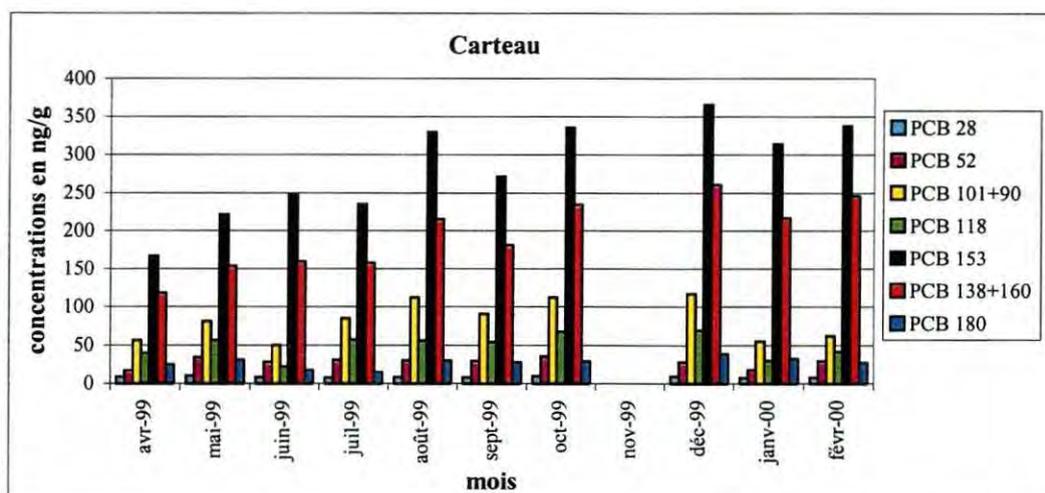
La concentration en PCB totaux dans les tissus de moules est forte et variable sur le site de Carteau ; elle oscille de 8,6 ng/g en juin à 24 ng/g en août. A l'inverse, les moules situées à La Fourcade présentent des teneurs en PCB constantes et plus faibles (environ 4,5 ng/g), avec tout de même une légère diminution en juin 1999 et février 1999.

Les PCB étant des composés lipophiles, on peut supposer que ces variations sont reliées aux variations des teneurs en lipides chez la moule, lors de la ponte. Cette hypothèse ne peut être testée à cause d'un manque de données.

3.1.3. Caractérisation des empreintes chimiques

Des empreintes chimiques ont été réalisées sur les mois de avril 1999 à février 2000, sur l'ensemble des PCB analysés.

A)



B)

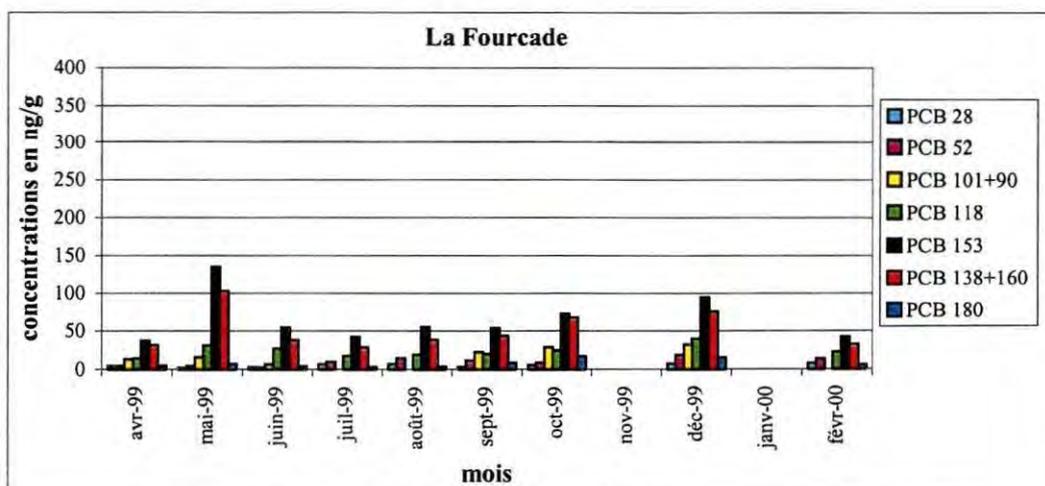


Figure 25: Comparaison des variations temporelles des teneurs normalisées des différents PCB, mesurées dans les tissus de moules (*Mytilus galloprovincialis*) sur les sites de Carteau (A) et de La Fourcade (B). Les concentrations PCB ont été normalisées par rapport à l'indice de condition.

Sur les deux sites, le même profil de PCB est retrouvé chaque mois, à savoir la dominance des PCB 153 puis des PCB 138+160. Cependant, on remarque qu'à Carreau, le PCB 101+90 est le troisième majoritaire, tandis qu'à La Fourcade, c'est le PCB 118.

3.3. Les métaux lourds

3.1.1. Examen des niveaux

Les sites choisis sont les mêmes que lors de la comparaison des concentrations en HAP, à savoir Cap Couronne, Centre Darse, Nice-La Poudrière et le golfe de la Napoule. La comparaison se fera sur les mois de mai 1997, 1998 et 1999, aucune donnée plus récente du RNO ne pouvant être exploitée.

L'analyse portera sur la somme de 5 métaux lourds: plomb (Pb), cadmium (Cd), mercure (Hg), zinc (Zn) et cuivre (Cu). Les données utilisées sont les données brutes, c'est à dire avant la normalisation par rapport à l'indice de condition.

Date	Cap Couronne	Centre Darse	Nice - La Poudrière	Golfe de la Napoule
nov-94	125	145	138	147
nov-95	215	163	211	168
nov-96	168	253	267	136
moyenne	169	187	205	150

Figure 26 : Concentrations en métaux lourds totaux (en mg/kg), présentes dans les tissus de moules *Mytilus galloprovincialis*, sur différentes stations de Méditerranée (données RNO).

En décembre 1999, les teneurs en métaux lourds totaux sur nos sites d'étude étaient de 180,31 mg/kg pour La Fourcade et 217,3 mg/kg pour Carreau.

De même que pour l'étude des HAP, la comparaison entre novembre et décembre reste valable, puisque les moules sont en période de ponte au cours de ces deux mois.

La contamination par les métaux lourds est de même ordre de grandeur sur tous les sites étudiés : en automne, elle est comprise entre 150 et 220 mg/kg. On remarque tout de même que les valeurs mesurées à Carreau et la Fourcade sont plus proches de celles trouvées à Nice-La Poudrière et Centre Darse. Les deux stations étudiées présentent donc un niveau de pollution en métaux lourds situé dans la fourchette des valeurs observées en Méditerranée.

3.1.2. Suivi temporel

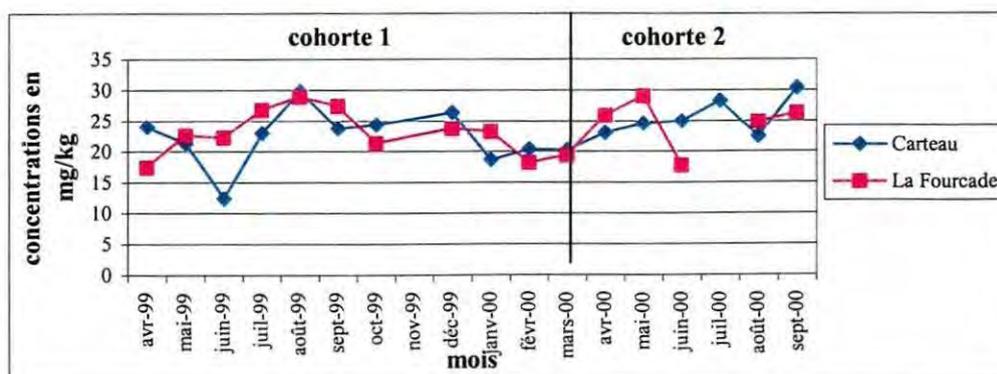


Figure 27: Comparaison des variations temporelles des teneurs en métaux lourds totaux, mesurées dans les tissus de moules (*Mytilus galloprovincialis*) sur les sites de Carreau et de La Fourcade. Les concentrations en métaux lourds ont été normalisées par rapport à l'indice de condition

L'analyse porte sur la somme 8 métaux lourds : plomb (Pb), cadmium (Cd), mercure (Hg), zinc (Zn), cuivre (Cu), nickel (Ni), arsenic (As) et chrome total (Cr).

Les variations des teneurs en métaux lourds dans les tissus de moules suivent la même tendance et les concentrations sont du même ordre de grandeur sur les deux sites et dans les deux cohortes. On remarque tout de même une baisse plus importante en juin 1999 dans les moules de cohorte 1 issues du site de Carteau.

3.1.3. Caractérisation des empreintes chimiques

Un profil de variations temporelles a été réalisé pour chaque métal analysé. Les données utilisées (figures 28 et 29 ci-après) sont les données brutes, c'est à dire avant la normalisation par rapport à l'indice de condition.

Sur le site de La Fourcade, on remarque une hausse des concentrations de plusieurs métaux sur la même période ; en effet, les teneurs en plomb, en cadmium et en zinc augmentent de février à mars 2000. De même, à Carteau, des concentrations supérieures en nickel, chrome, cadmium, sont observées de janvier à avril 2000. Ces phénomènes pourraient être liés à une pluviosité plus abondante à cette époque de l'année

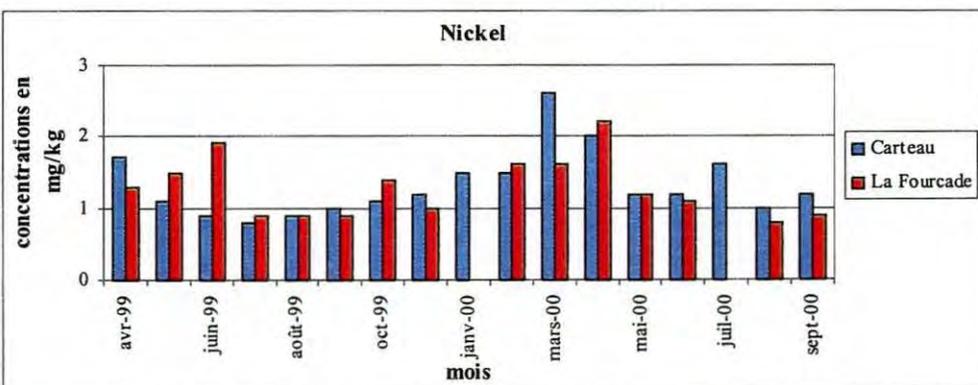
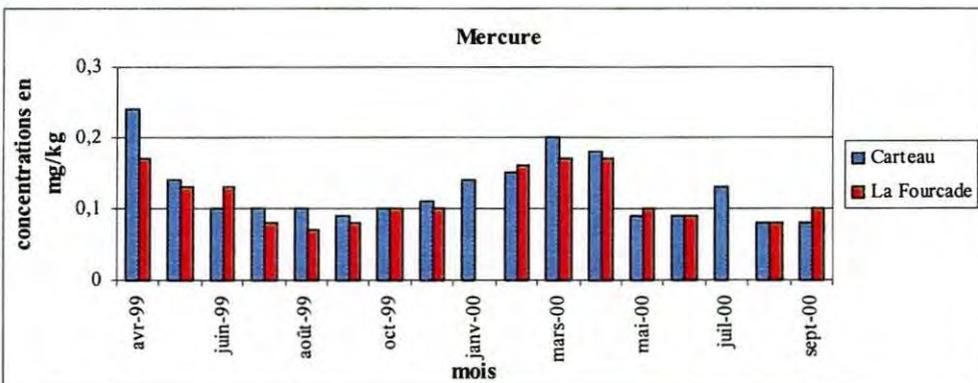
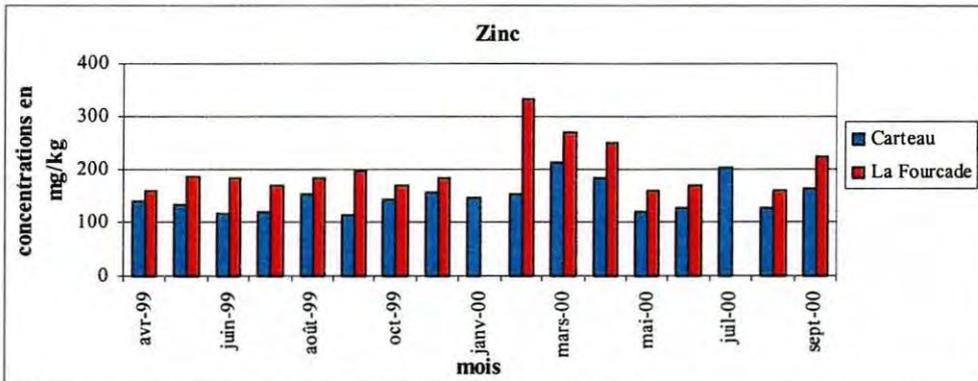
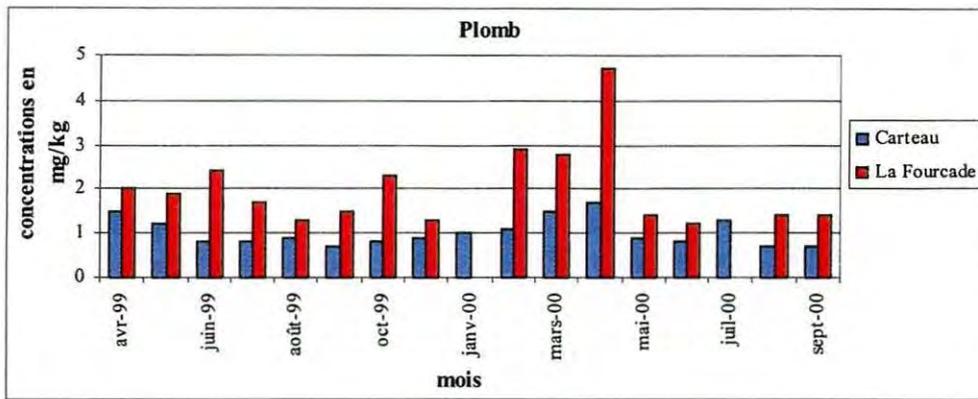


Figure 28a : Comparaison des empreintes des différents métaux lourds dans la moule.

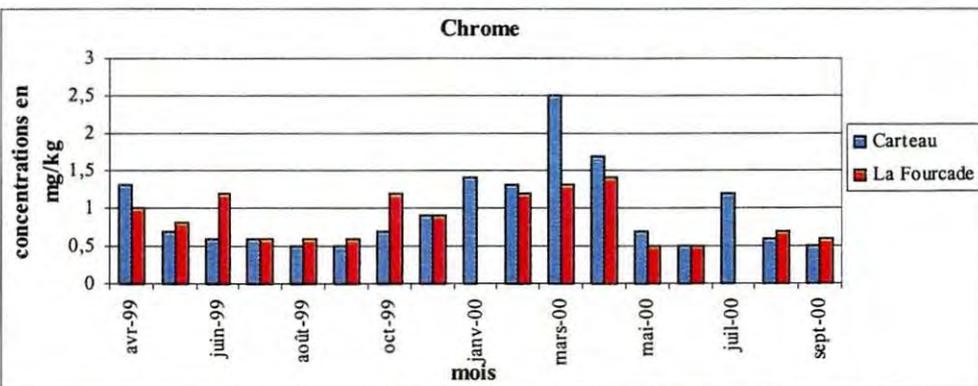
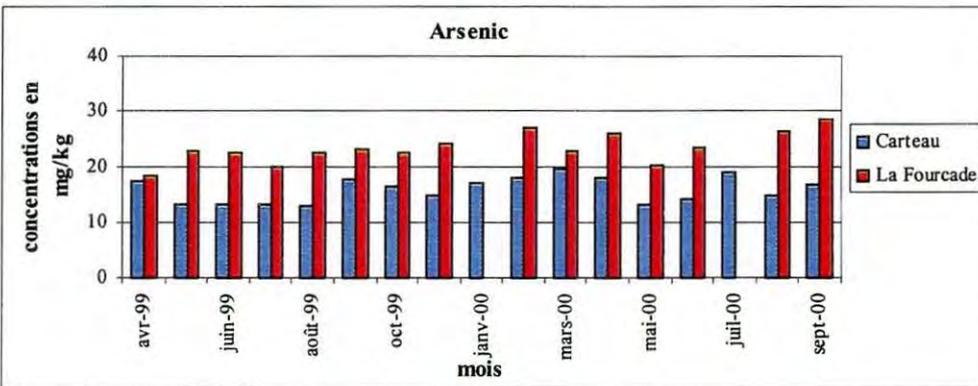
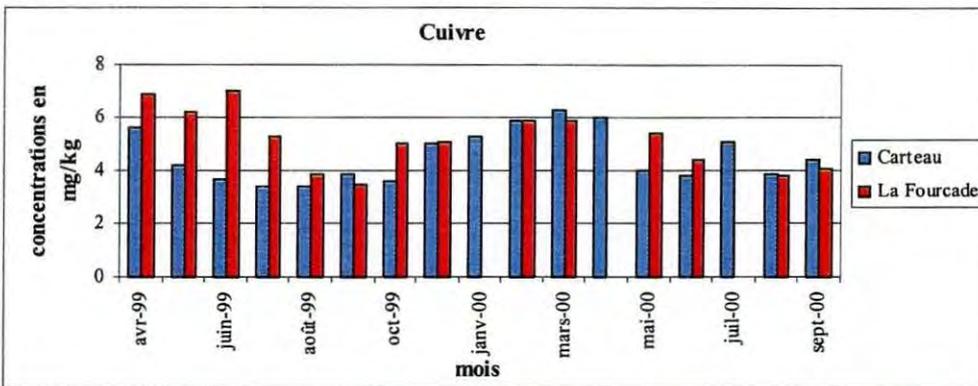
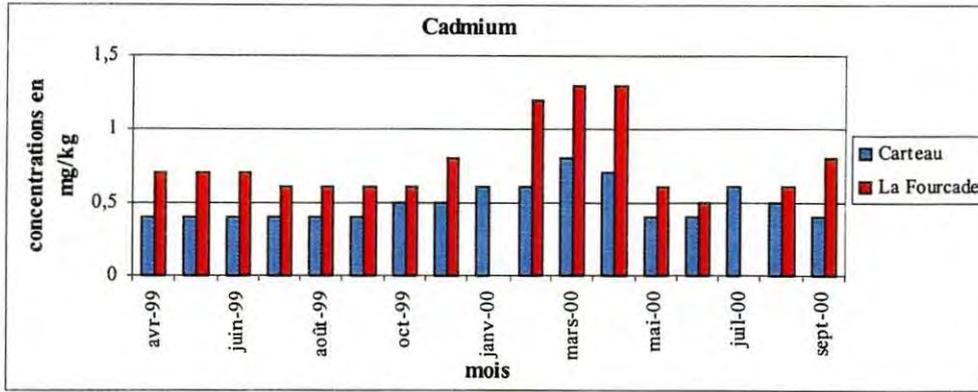
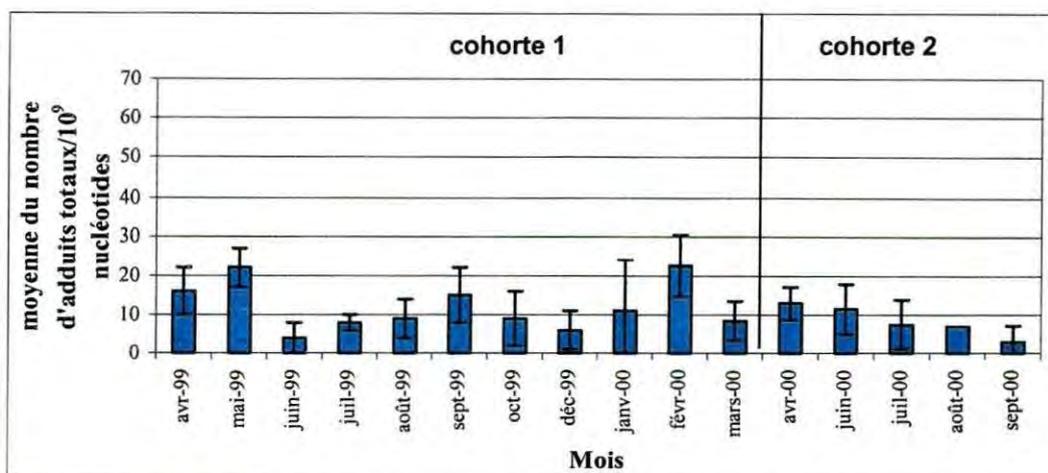


Figure 28b: Comparaison des empreintes des différents métaux lourds dans la moule.

4. Un biomarqueur : les adduits à l'ADN

A)



B)

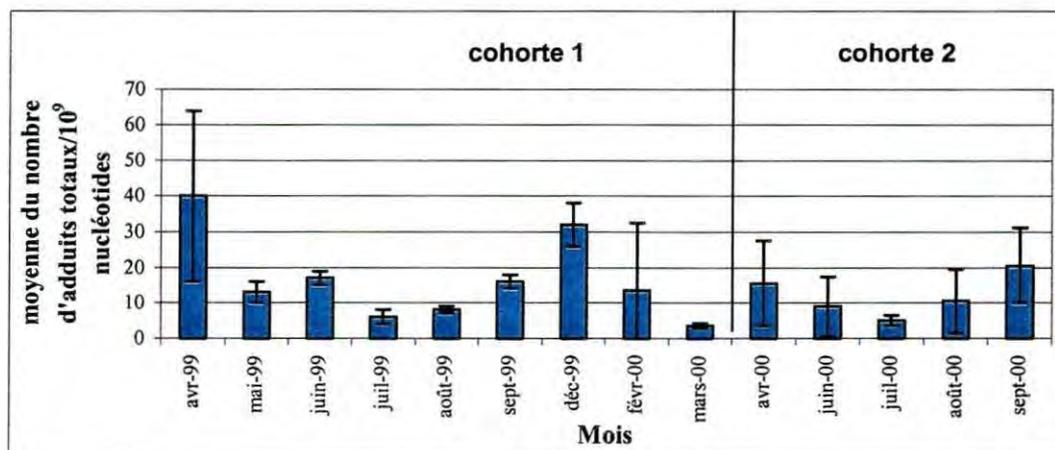


Figure 29: Evolution temporelle du nombre d'adduits à l'ADN pour 10^9 nucléotides, présents chez la moule *Mytilus galloprovincialis*, sur les sites de Carteau (A) et La Fourcade (B).

A Carteau, le nombre d'adduits à l'ADN des moules prélevées oscille de 4 à 22 adduits/ 10^9 nucléotides. La cohorte 1 est caractérisée par une grande variabilité sur l'année, avec des augmentations en mai 1999, en septembre 1999 et en février 2000. La cohorte 2, quant à elle, présente une diminution constante du nombre d'adduits pendant la période d'analyse.

A La Fourcade, une grande hétérogénéité est observée, avec des valeurs plus étalées que sur le site de Carteau allant jusqu'à 40 adduits/ 10^9 nucléotides au mois d'avril 1999. De même, les deux cohortes présentent une grande variabilité : pour la cohorte 1, des maxima sont observés au mois d'avril 1999 et décembre 1999, tandis que la cohorte 2 présente une plus faible variabilité avec un minimum en septembre 2000.

Cependant, d'après les tests statistiques de Student réalisés (entre les deux stations à la fois sur la période d'étude entière, soit 2 ans, et mois par mois), aucune différence significative entre les deux sites n'a été mise en évidence. De même, aucune corrélation entre le niveau d'adduits à l'ADN et les concentrations tissulaires en PCB et HAP n'a été observée.

Il est à noter, tout de même la présence de forts écarts types sur les moyennes d'adduits calculées sur les pools de chaque mois à Carteau et La Fourcade, ce qui indique une forte

variabilité inter-individuelle dans un même lot de moules, représentatif d'une même station (variabilité maximale de 60% en avril 1999, à La Fourcade).

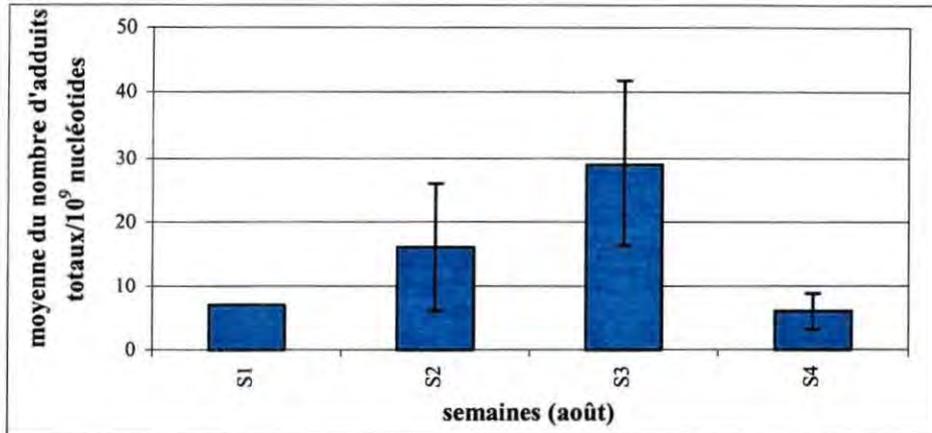


Figure 30 : Variations hebdomadaires du nombre d'adduits à l'ADN pour 10^9 nucléotides, présents chez la moule *Mytilus galloprovincialis*, sur le sites de Carteau, au cours du mois d'août 1999.

Les variations hebdomadaires du nombre d'adduits à l'ADN expliquent les forts écarts types observés sur les figures 27A et 27B. En effet, sur 4 semaines, les valeurs oscillent de 7 à 29 adduits/ 10^9 nucléotides, soit une échelle de variation plus importante que celle définie sur le site de Carteau pour une période de 18 mois. De plus, de fortes variations inter-individuelles pour un même lot sont mises en évidence (variabilité maximale de 62% la seconde semaine du mois d'août 1999).

DISCUSSION

Cette étude, réalisée à partir de moules transplantées sur deux sites de typologies différentes, a pour objectif : (1) d'évaluer les variations saisonnières d'un biomarqueur (les adduits à l'ADN) sur une période de 18 mois pour identifier les niveaux de base des biomarqueurs , (2) de les comparer à des facteurs environnementaux (température, salinité, turbidité, profondeur) et des indicateurs physiologiques (maturation des gonades, indice de croissance et de condition) afin de discriminer les variations liées aux contaminants chimiques

1. Typologies des stations : facteurs environnementaux et contamination chimique

L'étude porte sur deux sites de typologies différentes : la station de Carteau se situe dans le golfe de Fos ; c'est une zone semi-fermée, alimentée par l'étang de Berg, un canal du Rhône, et soumis à la pénétration d'eaux marines sous l'effet des vents d'Est Sud-Est. Ce site est caractérisé par une forte pollution industrielle (pétrochimie essentiellement), tandis que la station de La Fourcade, se situant près de Cannes, est essentiellement soumise à une faible pollution domestique, favorisant ainsi l'implantation d'une ferme d'élevage de poissons.

1.1. Les facteurs environnementaux

L'ensemble des variations des paramètres physico-chimiques tend à démontrer la similarité des profils sur les deux sites d'étude, avec, cependant, une dynamique plus perturbée à Carteau en ce qui concerne la salinité et la turbidité (forte diminution de la salinité et forte augmentation de la turbidité aux mois d'octobre 1999 et novembre-décembre 2000). Ces phénomènes pourraient être le résultat des apports d'eau douce, chargés en matière en suspension contaminées, du Rhône et de l'étang de Berg.

1.2. La contamination chimique

Comparaison des niveaux de pollution avec des stations du RNO de Méditerranée:

Pour évaluer le niveau de contamination des stations pilotes de carteau et La fourcade, une comparaison avec des stations très contaminées et faiblement contaminées du RNO a été réalisée. A chaque fois, un site peu pollué (Cap Couronne et golfe de La Napoule) et un très pollué (Centre Darse et Nice-La Poudrière) voisins de nos sites d'étude ont été sélectionnés pour la comparaison. Les sites choisis sont Cap Couronne, entre le golfe de Fos et Marseille, Centre Darse, dans le golfe de Fos, près de Carteau, et Nice-La Poudrière et le golfe de la Napoule, deux stations proches de la Fourcade.

La comparaison des niveaux de pollution entre ces différents sites montre que La Fourcade présente une faible teneur en HAP et PCB, tandis que Carteau est caractérisé par une contamination moyenne par ces composés. Une importante différence de degrés de pollution en HAP entre Carteau et Centre Darse, deux sites pourtant très proches, est observée. Ceci laisse donc supposer une grande variabilité géographique de la teneur en HAP dans le golfe de Fos. Cette variabilité pourrait également être liée à la position spécifique des cage de moules dans la colonne d'eau qui entraîne des expositions différentes aux contaminants. Le cas de moules proches du sédiment et de moule proches de la surface et éloignées du sédiment a montré des contaminations différentes (Baumard ,1997). Il est ainsi important de noter que, dans le cadre de notre étude, les mesures ont été réalisées à une

profondeur d'environ 2m50, et non sur les sédiments, ce qui pourrait expliquer la différence de contamination entre Carreau (site pilote) et Centre Darse (site RNO, moules proches du sédiment).

En ce qui concerne les métaux lourds, on retrouve des teneurs comparables entre les deux sites étudiés et les stations Centre Darse et Nice-La Poudrière ; Carreau et la Fourcade peuvent donc être considérés comme des lieux moyennement contaminés en polluants inorganiques. Les écarts de concentration en métaux lourds entre les deux stations pilotes sont faibles, contrairement aux PCB et HAP.

La contamination par les HAP :

Le site de La Fourcade est caractérisé par une pollution faible et stable en HAP. A l'inverse, la teneur en HAP à Carreau est variable : forte en hiver et faible en été.

Une évolution similaire des concentrations en HAP au cours du temps entre les deux sites est tout de même observée. Deux périodes ont été définies, la première présentant une faible pollution (printemps et été), la seconde caractérisée, au contraire, par une augmentation des concentrations en HAP (automne et hiver).

En mer Baltique, Baumard (1997) a montré que les concentrations en HAP totaux (13 HAP : phénanthrène ; anthracène ; fluoranthène ; pyrène ; chrysène ; pérylène ; benzo(a)anthracène ; benzo(b+k+j)fluoranthène ; benzo(a)pyrène ; benzo(e)pyrène ; dibenzo(a,h)anthracène ; benzo(g,h,i)pérylène ; indéno(1,2,3-cd)pyrène ;), dans les tissus de moules (*Mytilus edulis*), variaient de 90 à 3900 ng/g sur les différents sites d'études. En Méditerranée, sur les sites de Le planier, près de Marseille, et Toulon, les concentrations en Σ HAP sont respectivement de 130 et 285 ng/g (Baumard, 1997). Pour les mêmes Σ HAP, à Carreau et La Fourcade, les teneurs oscillent de 25 à 200 ng/g (fig 21), donc des valeurs du même ordre de grandeur sur les différents sites de Méditerranée, mais beaucoup plus faibles et moins variables qu'en mer Baltique.

Les empreintes chimiques réalisées ont permis la mise en évidence, en plus d'une variation temporelle au sein de chaque station, d'une variabilité spatiale. En effet, selon le site considéré, la composition en éléments majoritaires n'est pas la même et les variations des concentrations de chaque type d'HAP sont différentes (fig 22).

Les variations saisonnières de la concentration en HAP totaux ont été étudiées en comparaison avec les variations du développement gonadique, et des indices de condition et de croissance . Aucune relation n'a pu être observée.

En mer Baltique, Baumard (1997) montre que les plus fortes concentrations en HAP ont été mesurée en mars 1995 (870 ng/g en moyenne sur les différents sites étudiés), puis en octobre 1995 (250 ng/g) et enfin en août 1995 (190 ng/g) . Aucune corrélation entre ces résultats et les variations de la teneur en lipides chez les moules n'a été mise en évidence. Cependant, une relation pourrait exister avec le comportement de filtration des moules. En effet, leurs besoins nutritifs sont beaucoup plus important vers la fin de l'hiver, et plus particulièrement en mars, ce qui constitue une source d'assimilation plus importante des polluants présents dans la colonne d'eau et adsorbés sur la nourriture.

La contamination par les PCB :

D'une manière générale, les empreintes de contamination sont semblables pour l'ensemble des moules échantillonnées dans les deux sites et aux diverses périodes. Elles sont caractérisées par la prédominance des congénères PCB153, 138+160. Jaouen-Madoulet (2000) a observé la même tendance sur les dreissènes prélevées sur différents sites de l'estuaire de Seine. Cependant, dans cette zone, le troisième composé majoritaire serait le

PCB180, tandis que, dans notre cas, il présente des concentrations inférieures aux PCB101+90 et 118.

D'un point de vue quantitatif, les concentrations en PCB totaux varient entre 20 et 140 ng/g dans les moules prélevés en 1999 et début 2000 en deux sites différents (fig 24 et 25). Ces valeurs sont supérieures à celles mesurées dans les sédiments du littoral méditerranéen, dont les Σ PCB (avec la même somme de congénères) sont comprises entre 0,9 à 65 ng/g (Pierard, 1995). De plus, Pierard (1995) met en évidence, outre des teneurs globales variées, une grande diversité dans la composition des profils de PCB. Le Planier, près de Marseille, présente une distribution dominée, dans l'ordre, par les congénères 153, 138 et 180. La station de Fourmigues, près de Cannes, est plutôt caractérisée par des teneurs abondantes en PCB180, puis 153 et 138.

Des variations spatiales des teneurs en PCB totaux entre Carreau et La Fourcade, ainsi que des variations mensuelles ont donc été mise en évidence. Cependant aucune différence significative des empreintes chimiques n'a été observé entre les différentes périodes de prélèvement et entre les stations.

Les PCB étant des composés lipophiles très largement bioaccumulés et peu biotransformés, on peut supposer que ces variations sont reliées aux variations des teneurs en lipides chez la moule, lors de la ponte. Il serait donc intéressant de corrélérer les variations des concentrations en PCB totaux dans les tissus de moules et l'indice gonadique. Ceci sera réalisé pendant mon DEA, lorsque toutes les données de mars 1999 à mars 2001, seront récoltées.

La contamination par les métaux lourds :

Les variations des teneurs en métaux lourds dans les tissus de moules suivent la même tendance sur les deux sites, et les concentrations sont du même ordre de grandeur. Aucune différence entre Carreau et La Fourcade n'est donc relevée.

Développé sur la base du Réseau Littoral Méditerranéen (RLM), le Réseau « Intégrateurs Biologiques » (RINBIO, 1998) avait pour objectif d'évaluer la qualité des eaux littorales du bassin méditerranéen. Selon le concept de biosurveillance active basée sur l'utilisation de la moule comme organisme « sentinelle », cette étude de terrain a été réalisée grâce à des transplants d'individus provenant d'un site de référence (moules de filières des Aresquiers) le long des côtes méditerranéennes françaises. Basée sur une stratégie similaire de maintien en cages pour l'étude RINBIO et notre étude, une analyse comparative des concentrations des différents métaux entre Carreau, La Fourcade, et les sites de RINBIO est réalisée. Les concentrations sont mesurées dans les tissus de moules et exprimées en mg/kg.

Sites	Années	cadmium	mercure	zinc	cuivre	plomb	nickel	chrome	arsenic
RINBIO	1998	0,3 à 3,1	0,005 à 0,4	88 à 190	3,3 à 16,4	0,6 à 2,2	2 (moyenne)	1,7 (moyenne)	18 (moyenne)
Carreau	1999-2001	0,4 à 0,8	0,08 à 0,24	114 à 213	3,4 à 6,3	0,7 à 1,7	0,8 à 2,6	0,5 à 2,5	12,7 à 19,6
La Fourcade	1999-2001	0,5 à 1,3	0,07 à 0,17	159 à 332	3,5 à 7	1,2 à 4,7	0,8 à 2,2	0,5 à 1,4	18,3 à 28,6

Figure 31 : Comparaison de concentrations en métaux lourds sur différents sites de Méditerranée.

Mise à part des concentrations en zinc supérieures sur nos deux sites d'étude, les teneurs des différents métaux sont du même ordre de grandeur que celles mesurées sur les stations RINBIO.

1.3. Conclusion

A partir d'une première série d'analyse même incomplète, il est semble possible de différencier les deux stations étudiées à la fois grâce aux paramètres physico-chimiques et la

contamination chimique des sites pilotes. En effet, une plus forte variabilité de l'ensemble des paramètres et une pollution chimique globale plus élevée ont été évalués sur le site de Carteau dans le golfe de Fos.

2. Les indicateurs physiologiques et écotoxicologiques

2.1. Les indicateurs physiologiques

2.1.1. Les indices de croissance et de condition

La croissance des moules et les variations de l'indice de condition suivent la même tendance pour les deux stations et pour les deux pools de moules (Carteau et la Fourcade) issues d'une même cohorte. Aucune différence importante entre le poids de la coquille des moules sur les deux sites n'a été relevée. Or, il faut noter que les conditions de croissance des moules interviennent sur la bioaccumulation des contaminants (Cossa, 1998).

Carteau est un site riche en nutriments (zone de type mésotrophe) pour les organismes, et caractérisé par une forte dynamique hydrosédimentaire liée en partie aux apports du Rhône et à la pénétration des eaux du large par vent d'Est-Sud Est. Cette station est considérée comme une station à fort potentiel de croissance (Andral, 1999). Le site de la Fourcade présente des profils de température, salinité et turbidité beaucoup plus stables ce qui reflète une situation moins exposée aux variations environnementales. Bien que dans une zone de nature oligotrophe à faible potentiel de croissance (Andral, 1999), le site de la Fourcade présente une particularité locale car une ferme aquacole est implantée sur ce site et pourrait être à l'origine d'un apport régulier en nourriture pour les moules en poches. Ce dernier point pourrait expliquer une augmentation similaire des poids de coquille entre Carteau et La Fourcade.

2.1.2. Le développement gonadique

*Le cycle de reproduction de *Mytilus galloprovincialis* :*

L'étude des variations saisonnières de la maturation des gonades chez la moule, *Mytilus galloprovincialis*, a pour objectif la validation d'un indicateur physiologique du stress subit par les organismes. En effet, des facteurs chimiques ou naturels peuvent inhiber ou au contraire accélérer ces processus, induisant alors des perturbations au niveau de la fonction de reproduction chez ces individus. Les travaux de Regoli (2001) concerne l'impact des organoétains (tributylétain TBT, et triphénylétain TPT) sur le développement gonadique chez les moules zèbrées, *Dreissena polymorpha*, vivant dans le port de la ville de Québec le long du Saint Laurent. L'étude portant sur 9 sites différents, il a été démontré que le développement gonadique varie d'un site à l'autre, cette variabilité inter-sites étant certainement le résultat de stress locaux subit par les moules, et notamment de l'exposition aux organoétains.

Au cours de notre étude, les résultats obtenus confirment sur nos deux sites pilotes, ceux publiés par Cossa (1998), à savoir que les moules de Méditerranée pondent deux fois par an, une ponte totale en automne suivie d'une ponte partielle au printemps. De plus, la distribution des mâles et des femelles est identique sur les deux sites. Ceci confirme les précédentes observations, puisque, d'après Lubet (1959), pour différentes populations de *Mytilus edulis* et *Mytilus galloprovincialis* et quel que soit l'âge des animaux, la proportion des sexes est en gros la même pour une station donnée. Nous n'avons pas observé de variations du sexe ratio en relation avec la typologie ou la contamination chimique comme cela a été démontré par F. Gagné *et al.*, 2001.

On remarque que les pontes ont lieu en même temps sur les deux stations, à savoir en janvier-février lorsque la température de l'eau est inférieure à 15°C, et malgré une forte baisse de la salinité en octobre 1999 et 2000 sur le site de Carteau. Il a pourtant été démontré par Lubet (1959) que *Mytilus galloprovincialis* pond en Méditerranée pour des températures de l'eau de 10-11°C, et que des baisses automnales et hivernales de salinité retardaient la gamétogenèse des jeunes individus de *Mytilus edulis*.

D'après le calcul de l'indice gonadique, les individus prélevés à Carteau et La Fourcade suivent la même évolution temporelle de maturation des gonades. La différence de degré de pollution de ces deux sites ne semble donc pas avoir d'influence sur le développement gonadique. Cependant, la figure 18 (Partie Résultats-2.3) sur l'évolution temporelle des stades de développement gonadique montre un léger décalage de la maturation des gonades, chez les moules de la seconde cohorte issues de Carteau par rapport à celles de La Fourcade. Idhalla (1997) a montré que, dans la baie d'Agadir, le cycle de reproduction des moules, situées dans une zone polluée, connaît un déphasage des activités génitales par rapport à celles situées dans une station de référence.

Au cours de cette étude, un décalage d'environ un mois a été décelé entre l'interprétation des variations de l'indice gonadique et celle de l'évolution des différents stades de maturation des gonades chez la moule *Mytilus galloprovincialis*, concernant les phases de maturation et d'émission des gamètes. Cette différence peut être attribuée à l'imprécision du calcul de l'indice gonadique, plus exactement au regroupement des sept stades effectué précédemment.

L'analyse histologique de la maturation des gonades :

Des difficultés dans la lecture des lames histologiques ont été rencontrées. Elles pourraient être diminuées avec une préparation des échantillons et une analyse plus précises :

- tout d'abord, pour un souci d'homogénéité des coupes histologiques, il serait plus judicieux de prélever des morceaux de manteau tous de la même taille lors de la dissection. En effet, ceci permettrait de réaliser des niveaux de coupes identiques pour tous les individus.

- de plus, la détermination des stades de maturation des gonades au microscope est trop approximative. Il serait intéressant, par exemple, de pouvoir mesurer la taille des gamétocytes chez les individus, d'une part pour une définition plus exacte du stade, d'autre part pour déceler un éventuel effet de la contamination sur le développement des ovocytes et spermatozoaires.

2.1.3. Conclusion

Les individus étudiés, malgré une différence de localisation, d'apports nutritifs, et de contamination chimique sur les sites de Carteau et La Fourcade, ne présentent donc aucune perturbation physiologique aussi bien au niveau de la croissance, qu'au niveau de la reproduction et des sexes ratio.

2.2. Les variations spatio-temporelles du biomarqueur adduits à l'ADN

La mise en évidence d'adduits à l'ADN chez les moules étudiées révèlent la présence de contaminants génotoxiques dans le milieu. Il a été démontré que, chez les poissons et les bivalves, les polluants organiques comme les PCB et les HAP sont des inducteurs de la formation d'adduits (Scilderman et al., 1999 ; Akcha et al., 1999). Le dosage des adduits à l'ADN permet d'évaluer les effets doses d'exposition aux polluants chimiques et une discrimination des expositions sur différents sites (Burgeot *et al.*, 1994). Néanmoins, la

technique de dosage par post-marquage au phosphore 32 ne permet pas de caractériser l'origine exacte de ces altérations.

Aucune différence significative inter-stations n'a été mise en évidence. Cependant les fortes variations des écarts types observées sur le site de La Fourcade (variabilité de 60% pour le mois d'avril 1999 et de 12% pour le mois de août 1999), pourraient expliquer cette absence de signification statistique. En effet, on remarque tout de même, visuellement, des variations d'amplitudes au sein d'une même station (variation intra-station) et entre les deux stations (fig 29) : sur le site de La Fourcade, le nombre d'adduits à l'ADN varie beaucoup d'un mois à l'autre, avec des valeurs maximales en avril 1999 (40 adduits/10⁹ nucléotides) et décembre 1999 (32 adduits/10⁹ nucléotides). A Carteau, par contre, le nombre d'adduits à l'ADN est plus stable, les valeurs ne dépassant pas 22 adduits/10⁹ nucléotides (en mai 1999 et février 2000).

Ceci pourrait être expliqué par la transplantation du lot de moules de Carteau à La Fourcade. Les organismes stressés sont plus sensibles à tout phénomène externe, et notamment développent plus de lésions à l'ADN suite à l'influence de différents facteurs autres que le niveau de contamination en polluants organiques.

Cependant, les variations hebdomadaires, observées sur le site de Carteau au mois d'août 2000 (variabilité de 0 à 62%), laissent supposer la sensibilité des mécanismes de régulation aux variations environnementales, entre chaque semaine. En effet, la diversité des profils d'HAP et surtout la variabilité des concentrations en HAP au niveau spatial et temporel à Carteau pourraient expliquer des variations de niveau d'adduits à l'ADN entre chaque semaine, induisant alors très rapidement (à l'échelle de la semaine) la formation d'adduits. Ceux-ci seraient ensuite en partie éliminés la semaine suivante par des mécanismes de régulation biologique. Ainsi, il serait intéressant, à l'avenir, de comparer la variabilité des concentrations en HAP dans les tissus de moules, et d'adduits à l'ADN formés sur au moins 4 semaines. Cela permettrait d'estimer la sensibilité des altérations à l'ADN aux variations éventuelles de la composition spécifiques de la contamination par les HAP.

Il est à noter que les variations seules d'un biomarqueur comme les adduits à l'ADN ne permet pas un diagnostic de l'effet de mélanges complexes. C'est la comparaison des variations saisonnières de l'ensemble des biomarqueurs étudiés (la Benzo[a]Pyrène Hydroxylase BPH, l'Acétylcholine estérase AChE, les Adduits à ADN, et les protéines de résistance MXR) qui pourra donner une tendance évolutive en relation avec la contamination chimique des tissus des organismes par les PCB, HAP, et les métaux lourds.

2.3. Conclusion

Les adduits à l'ADN présentent une très forte variabilité inter-individuelle pour un même lot de moule. L'étude du développement gonadique montre également cette source de variation, puisque, pour un même mois, tous les individus ne sont pas à un stade de maturation des gonades identique.

De plus, aucune analyse qualitative de ce biomarqueur n'a été réalisée. Il serait donc intéressant de connaître les profils d'adduits à l'ADN sur chacun des deux sites pilotes et leur variabilité entre chaque semaine d'un même mois afin de distinguer une éventuelle différence entre Carteau et La Fourcade, notamment en ce qui concerne la toxicité et la biodisponibilité des différents polluants. Les variations des profils d'adduits observées pourraient également être comparées aux variations des empreintes d'HAP mesurées sur des échelles de temps d'une semaine, un mois et un an. (Ce travail sera réalisé pendant mon DEA)

Enfin, seuls quelques composés de la famille des HAP, et des PCB ont été mesurés, or de nombreuses molécules autres peuvent provoquer des altérations au niveau de l'ADN.

3. Conclusion et perspectives

Suite à ce travail, une exploitation plus poussée sera réalisée lorsque toutes les données (de mars 1999 à mars 2001 pour tous les paramètres) seront rassemblées dans le but final de valider l'application en surveillance de biomarqueurs spécifiques d'altération chez la moule (P450, AChE, Adduits, MXR, lésions des tissus). Car seule l'utilisation de plusieurs biomarqueurs, situés à différents niveaux d'organisation biologique au sein de l'individu (moléculaire, cellulaire, tissulaire) ou au niveau de l'individu (biomarqueurs physiologiques) permet la détection des effets des polluants dans l'environnement.

La poursuite de cette étude, au cours d'un stage de DEA, permettra de comparer statistiquement les trois indices physiologiques (indice de condition, indice de croissance et maturation des gonades) avec les variations saisonnières de quatre biomarqueurs, révélateurs d'effets précoces (la Benzo[a]Pyrène Hydroxylase BPH, l'Acétylcholine estérase AChE, les Adduits à ADN, et les protéines de résistance MXR) et la contamination chimique des tissus par les PCB, HAP, et les métaux lourds. Les quatre biomarqueurs choisis, respectivement représentatifs d'effets de détoxification, de neurotoxicité, de génotoxicité et de mécanismes de résistance, ont été sélectionnés pour répondre à un large spectre d'effets précoces liés à différents polluants. L'application de la méthode décrite par Beliaeff & Burgeot 2001 pour l'intégration de plusieurs biomarqueurs sous un indice composite sera également étudiée dans mon sujet de DEA. L'analyse de résultats histo-pathologiques permettront également de déceler des perturbations éventuelles, chez *Mytilus galloprovincialis*, liés aux effets à plus long terme. Une estimation des variations des niveaux de base des biomarqueurs sur chaque site pilotes pourra être réalisée et proposée comme référence des études futures sur les biomarqueurs.

Enfin, l'ensemble des résultats obtenus au cours de cette étude en maîtrise et au cours de mon DEA, sera interprété en relation avec les données obtenues sur les cinétiques de bioaccumulation des métaux dans le cadre du programme RINBIO.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Akcha F., Burgeot T., Leskowitz A., Budzinski H., Narbonne J.F. (2000). Induction and removal B[a]P-related DNA adducts and 8-oxodGuo in mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed in vivo to B[a]P-contaminated feed. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 205, 195-206.

Akcha F., Izuel C., Venier P., Budzinski H., Burgeot T., Narbonne J.F. (2000). Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in B[a]P-contaminated mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.* 49, 4, 269-287.

Akcha F., Ruiz S., Zamperon C., Venier P., Burgeot T., Cadet J., Narbonne J.F. (1999). Benzo[a]Pyrène-induced DNA damage in *Mytilus galloprovincialis*. Measurement of bulky DNA adducts and DNA oxidative damage in term of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine. *Biomarkers*, 5, 355-367.

Amiard J.C., Caquet T., Lagadic L. (1998). Les biomarqueurs parmi les méthodes d'évaluation de la qualité de l'environnement. In : *Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement*. Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C., Ramade F. (Eds), Lavoisier Tec & Doc, Paris, XXI-XXXI.

Andral B. (1999). Mise en œuvre du réseau RINBIO et résultats 1998. In : *Rapport interne, DEL TL IFREMER*, 7-37.

Baumard (1997). Biogéochimie des composés aromatiques dans l'environnement marin. *Thèse de Doctorat. Université de Bordeaux I, Bordeaux, France.*

Baumard P., Budzinski P., Garrigues P., Sorbe J.C., Burgeot T., Bellocq J. (1998). Concentrations of PAHs (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) in various marine organisms in relation to those in sediments and to trophic level. *Mar. Poll. Bull.*, 12, 951-960.

Beliaeff B. and T. Burgeot, (2001). Integrated biomarker response (IBR) a useful graphical tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*. (acceptée)

Brouwer A., Murk A.J., Koeman J.H. (1990). Biochemical and physiological approaches in ecotoxicology. *Funct. Ecol.*, 4, 275-281.

Burgeot T. (1994) L'éthoxyresorufine-O-dééthylase, les adduits à l'ADN et les micronucléi dans les organismes marins. Application à la surveillance des effets biologiques sur les côtes françaises. *Thèse de Doctorat, Université de Nantes, Facultés des Sciences et des Techniques, Nantes, France.*

Burgeot T., Minier C., Bocquené G., Vincent F., Cachot J., Loizeau V., Jaouen A., Miramand P., Guyot T., Lesueur P., Rochard E., Boet P. (1999). Des organismes sous stress. Programme scientifique Seine-Aval, fascicule n°14, 8-32.

Calow P. et Sibly R.M. (1990) A physiological basis of population processes: ecotoxicological implications. *Funct. Ecol.* 4, 283-288.

Chappuis J.G., Lubet P. (1966). Etude du débit palléal et de la filtration de l'eau par une méthode directe chez *Mytilus edulis* L. et *Mytilus galloprovincialis* LMK. *Bull. Soc. Linnéenne Normandie*, 10^e série, 7, 210-216.

Claisse D., Joanny M., Quintin J.Y. (1992). Le réseau national d'observation de la qualité du milieu marin (RNO). *Analysis*, 20, 19-22.

Cole H.A., Hepper B.T. (1954). The use of neutral red solution for the comparative study of filtration rates by Lamellibranches. *J. Cons. Int. Expl. Mer Copenhague*, 20, 117-203.

Cossa D. (1989). A review of the use of *Mytilus* sp as quantitative indicators of cadmium and mercury contamination in coastal waters. *Oceanol. Acta.*, 12, 417-432.

Cossa D., Abarnou A., Andral B., Bougrier S., Buestel D., Claisse D., Hatt P.J. et Stanisière J.Y. (1998). De l'usage de la méthode des transplants de moules pour le suivi de la contamination chimique le long des côtes méditerranéennes françaises. *CR. et Rec. de l'atelier RINBIO tenu au Centre de Nantes les 19 et 20 janvier 1997*.

Depledge M.H. (1994). The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. *In: Nondestructive Biomarkers in Vertebrates. Fossi & Leonzio(Eds), Lewis Publishers, Boca Raton*, 261-285.

Ellman G.L., Courtney K.O., Andres V., Featherstone R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, 7, 88-95.

Gabe M. (1968). Techniques histologiques. *Masson & Cie (Eds), Paris*, 43, 1033-1046.

Gagné F, Marcogliese D.J., Blaise C., Gendron A.D. (2001). Occurrence of compounds estrogenic to freshwater mussels in surface waters in an urban area. *Environmental Toxicology*, 260-268.

Goldberg E.D. (1975). The mussel watch. A first step in global marine biomonitoring. *Mar. Poll. Bull.*, 6, 111.

Guelorget O., Perthuisot J.P. (1984). Indicateurs biologiques et diagnose écologique dans le domaine paralique. *Bull. Ecol.*, 15, 67-76.

Hould R. (1984). Techniques d'histopathologie et de cytopathologie. *Maloine (Ed), Paris*, 11, 153-154.

Idhalla M., Bouhaimi A., Zekhnini A., Narbonne J.F., Mathieu M., Moukrim A. (1997). Etude du cycle de reproduction de deux espèces de moules *Perna perna* (Linné, 1758) et *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) dans la baie d'agadir (Sud du Maroc) ; *Haliotis*, 26, 51-62.

Jaouen-Madoulet A. (2000). Distribution et effets biologiques des PCB et des HAP dans les organismes de l'estuaire de Seine. *Thèse de Doctorat, Université du Havre, Le Havre, France*.

- Kolkwitz R., Marson M. (1908). Ökologie der pflanzlichen Saprobien. *Ber. Dt. Bot. Ges.*, 26, 505-519.
- Kolkwitz R., Marson M. (1909). Ökologie der tierischen Saprobien. *Intern. Rev. Hydrobiol.*, 2, 126-152.
- Lagadic L., Caquet T., Ramade F., (1994). The role of biomarkers in environmental assessment (5). Invertebrate populations and communities. *Ecotoxicolgy*, 3, 193-208.
- Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C. (1997). Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions. In : *Biomarqueur en écotoxicologie. Aspects fondamentaux*, Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C. Ramade F. (Eds), Masson, Paris, 1-9.
- Le Dantec J. (1968). Ecologie et reproduction de l'huître portugaise (*Crassostrea angulata* LMK) dans le bassin d'Arcachon et sur la rive gauche de la Gironde. *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit. Paris*, 32, 1-126 et thèse Sciences Bordeaux n°51.
- Lower W.R., Kendall R.J. (1990). Sentinel species and sentinel bioassay. In *Mc Carthy J.F., Shugart L.R. (Eds), Biomarkers of Environmental Contamination. Lewis Publishers, Boca Raton*, 309-331.
- Lubet P. (1959). Recherches sur le cycle sexuel et l'émission des gamètes chez les Mytilidae et les Pectinidae (Moll. Bivalves). *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.*, 23 (4), 387-548.
- Lubet P., Bourcart C. (1963). Nouvelles observations sur la physiologie sexuelle de *Mytilus galloprovincialis* LMK. *C.R. Soc. Biol. Paris*, 157 (2), 1966-1968.
- Lubet P., Le Gall P. (1967). Cycle sexuel de *Mytilus edulis* L. dans la baie de Seine (Calvados). *Bull. Soc. Linnéenne de Normandie*, 10, 303-314.
- Miller E.C., Miller J.A. (1981). Searches for ultimate chemical carcinogens and their reactions with cellular macromolecules. *Cancer*, 47, 2327-2345.
- Minier C, Borghi V.V., Moore M.N., Porte C. (2000). Seasonal variation of MXR and stress proteins in the common mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicol*, 50 (3), 167-176.
- N.A.S. (National Academy of Sciences) (1980). The International Mussel Watch. Report of the Environmental Study Board. *Office of Publication NAS, Washington*, 248.
- Orton J.H. (1933). Observations and experiment a sex change in the European Cyster (*Ostrea edulis*). *J. Mar. Biol. Ass. U. K.*, 16, 1-54.
- Peakall D.B. (1994) Biomarkers : the way forward in environmental assessment. *Toxicol. Ecotoxicol. News*, 1, 55-60.
- Phillips D.J.H. (1980). Quantitative aquatic biological indicators. *Applied Sci. Pub. London*, 488.
- Phillips D.J.H., Segar D.A. (1986). Use of bioindicators in monitoring conservative contaminants: Programmes Design Imperatives. *Mar. Poll. Bull.*, 17, 10-17.

Pierard C. (1995). Détermination des composés polychlorobiphényles dans l'environnement sédimentaire marin et estuarien. *Thèse de Doctorat, Université de Bordeaux I, Bordeaux, France.*

Regoli L., Man Chan H., De Lafontaine Y., Mikaelian I. (2001). Organotins in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and sediments of the Quebec City Harbour area of the St. Lawrence River. *Aquatic Toxicology*, 53, 115-126.

Schilderman P.A., Moonen E.J., Maas L.M., Welle I., Kleinjans J.C. (1999). Use of crayfish in biomonitoring studies of environmental pollution of river Meuse. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 44(3), 241-252.

Sheffield S.R., Kendall R.J (1997). Wildlife species as sentinels of environmental health hazards. *Environ. Health Persp.*, 278-301.

Weeks J.M. (1995). The value of biomarkers for ecological risk assessment : academic toys or legislative tools? *Appl. Soil Ecol.* 2, 215-216.

Wilson J.H., Seed R. (1974). Reproduction in *Mytilus galloprovincialis* LMK (Mollusca: Bivalvia) in Carlinh Ford Lough, Northern Ireland. *Irish Fisheries Investigation, Series B (Marine)*, 15, 30.