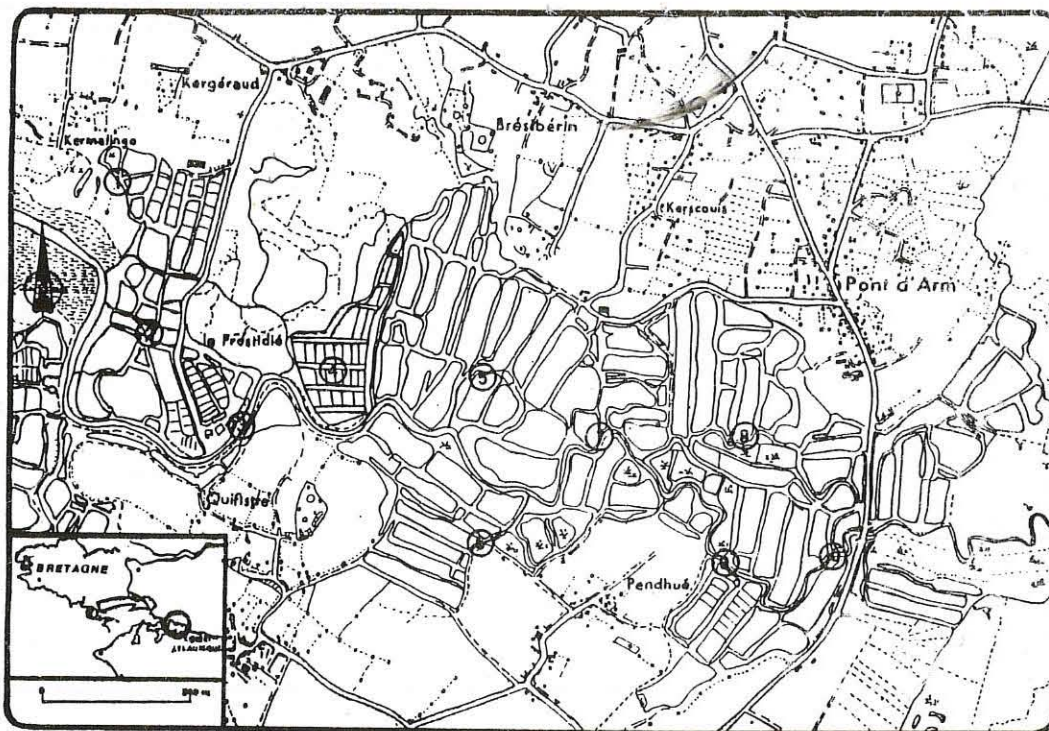


MEMOIRE
PRESENTE POUR LE PASSAGE CADRE
par Martial CATHERINE

METHODOLOGIE DES ETUDES BACTERIOLOGIQUES
DE ZONES CONCHYLICOLES



IFREMER

Adresse :

IFREMER
Centre de Nantes
B.P. 1049
44037 NANTES CEDEX 01

DIRECTION DE L'ENVIRONNEMENT ET DE L'AMENAGEMENT LITTORAL

SERVICE

LABORATOIRE : DEL/NANTES

AUTEUR(S) Martial CATHERINE		CODE : N° : R.INT.DEL/92.01-Nantes
TITRE Méthodologie des études bactériologiques de zones conchylicoles		date : février 1992 tirage nb : 65 Nb pages : 134 Nb figures : 14 Nb photos :
CONTRAT (intitulé) N° _____		DIFFUSION libre <input checked="" type="checkbox"/> restreinte <input type="checkbox"/> confidentielle <input type="checkbox"/>

RESUME

L'évolution des conditions de contrôle de la qualité des eaux conchylicoles, a abouti, à partir de 1979, à la mise en place progressive d'une réglementation européenne relative aux conditions sanitaires des zones de production et à la mise en marché de mollusques bivalves vivants (directive du Conseil (CEE) du 15 juillet 1991).

Cette directive impose la mise en place d'un système de surveillance périodique. Le choix de la stratégie d'échantillonnage est laissé à l'initiative de l'autorité compétente de chaque Etat, en fonction des normes définies.

L'imprécision des mesures de densité bactérienne, la variabilité des contaminations dans l'espace et le temps, le degré de représentativité de l'échantillonnage montre l'étendue des difficultés rencontrées lors des études bactériologiques des zones conchylicoles.

Le choix d'un plan de sondage probabiliste, associé au plan d'analyses des données, a pour but de résoudre tout ou partie de ces difficultés. L'échantillonnage systématique semble le plus intéressant pour la répartition spatio-temporelle des stations de prélèvements afin d'étudier une zone donnée.

L'expérience acquise par les laboratoires d'IFREMER/DEL, est donc rassembler en vue de la préparation d'un guide méthodologique d'études des zones conchylicoles.

mots-clés : eaux conchylicoles, pollution, coliformes fécaux, normes, stratégie d'échantillonnage, plan de sondage, statistique, guide méthodologique

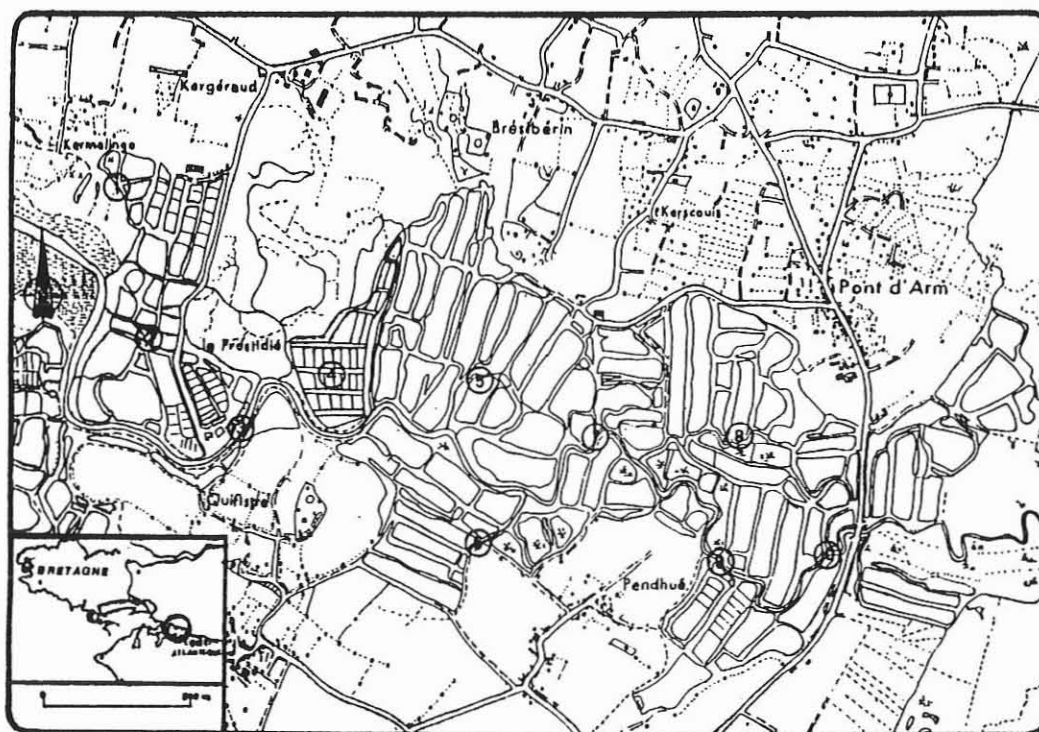
key words :

© IFREMER - Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer 1992



MEMOIRE
PRESENTE POUR LE PASSAGE CADRE
par Martial CATHERINE

METHODOLOGIE DES ETUDES BACTERIOLOGIQUES
DE ZONES CONCHYLICOLES



SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
PREMIERE PARTIE: LES ASPECTS REGLEMENTAIRES ET SANITAIRES	
1. HISTORIQUE DU CLASSEMENT SANITAIRE DES ZONES CONCHYLICOLES.....	3
1.1 PERIODE 1900-1939.....	3
1.2 PERIODE 1939-1976.....	3
1.3 PERIODE 1976-1991.....	5
1.4 CONCLUSION.....	6
2. ETUDE DE LA REGLEMENTATION.....	8
2.1 LE DECRET DU 20 AOUT 1939.....	8
2.2 L'ARRETE DU 12 OCTOBRE 1976.....	8
2.3 LA DIRECTIVE DU CONSEIL (CEE) DU 30 OCTOBRE 1979.....	9
2.4 LA DIRECTIVE DU CONSEIL (CEE) DU 15 JUILLET 1991.....	9
2.5 DISCUSSION.....	10
2.5.1 La stratégie d'échantillonnage.....	11
2.5.2 Origine des valeurs seuils.....	12
2.5.3 Les normes de salubrité.....	12
2.6 CONCLUSION.....	16

3. LES RISQUES LIES A LA CONSOMMATION DE COQUILLAGES	17
3.1 PATHOLOGIES BACTERIENNES	17
3.2 PATHOLOGIES VIRALES	17
3.3 LES INDICATEURS	19
3.4 EPIDEMIOLOGIE	22
3.5 CONCLUSION	23

DEUXIEME PARTIE: LA METHODOLOGIE

4. BILAN DES ETUDES DE ZONES CONCHYLICOLES	25
4.1 REFERENCES ET ENVIRONNEMENT ETUDIE	26
4.2 ECHANTILLONNAGE ET RESULTATS DISCUTES	26
4.3 DONNEES BRUTES ET TRAITEMENTS STATISTIQUES	29
4.3.1 Les données brutes.....	29
4.3.2 Les traitements statistiques.....	31
4.4 CONCLUSION	34
5. STRATEGIE D'ECHANTILLONNAGE.....	36
5.1 INTRODUCTION	36
5.2 PROBLEMATIQUE DE L'ETUDE	39
5.3 CHOIX ET CONTRAINTES DE L'ECHANTILLONNAGE.....	39
5.3.1 Les variables	39
5.3.2 Les échelles d'observations	39

5.3.3 Le traitement des données	41
5.3.3.1 Place du traitement dans la planification d'une étude	41
5.3.3.2 Optimisation du rendement de l'échantillonnage	41
5.3.4 Contraintes liées à l'hétérogénéité de la distribution des résultats obtenus aux stations de prélèvements.....	42
5.3.5 Différentes contraintes techniques.....	42
5.3.6 Contraintes liées au traitement des données.....	44
5.3.6.1 Précisions des données et traitement	44
5.4 THEORIE ET PLANIFICATION DE L'ECHANTILLONNAGE.....	45
5.4.1 Choix des plans de sondage.....	45
5.4.1.1 Echantillonnage Aléatoire Simple (E.A.S.)	45
5.4.1.2 Echantillonnage systématique	46
5.4.1.3 Echantillonnage stratifié	49
5.4.2 Les estimateurs.....	51
5.4.2.1 Echantillonnage Aléatoire Simple (E.A.S.)	51
5.4.2.2 Echantillonnage systématique et stratifié	52
5.4.3 Fonction de coût	52
5.5 ANALYSE ET INTERPRETATION DES DONNEES	53
5.6 CONCLUSION	55
6. ETUDE BACTERIOLOGIQUE D'UNE ZONE DE PRODUCTION EN MARAIS ...	58
6.1 OBJECTIFS.....	58
6. 2 MATERIEL ET METHODE.....	58
6.2.1 Méthode d'analyse bactériologique.....	58
6.2.1.1 Principe et résultats obtenus par la technique de mesure de la conductance.	58
6.2.1.2 Mode opératoire.....	61
6.2.2 Positionnement des stations de prélèvements	61
6.2.3 Prélèvements.....	63

6.3 TRAITEMENT DES DONNEES	64
6.4 RESULTATS – DISCUSSION	65
6.4.1 Variabilité inter–mesures dans les broyats.....	65
6.4.2 Variabilité inter–prélèvements aux stations	66
6.4.3 Etude de l'évolution des niveaux de contaminations.....	66
6.5 CONCLUSION	70
7. PREMIERS ELEMENTS D'UN GUIDE METHODOLOGIQUE POUR LES ETUDES DE ZONES CONCHYLICOLES	72
7.1 DETERMINATION DE LA ZONE ETUDIEE	73
7.2 DESCRIPTION DE LA ZONE	73
7.2.1 Description de la partie terrestre du littoral.....	74
7.2.2 Description des eaux littorales.....	74
7.3 RAPPORT INITIAL SUR L'ETAT DE LA ZONE LITTORALE ET DU BASSIN VERSANT	75
7.3.1 Environnement physique	75
7.3.2 Environnement sanitaire.....	76
7.3.3 Productions conchylicoles	77
7.3.4.Etudes de salubrité antérieures.....	77
7.4 PROTOCOLE D'ECHANTILLONNAGE	77
7.4.1 Choix des variables à étudier.....	77
7.4.2 Choix du coquillage de référence	78
7.4.3 Sélection des unités d'échantillonnage.....	78
7.4.4 Exemples de plans de sondage systématique.....	82
7.4.4.1 Baie ouverte	82
7.4.4.2 Littoral rectiligne	82
7.4.4.3 Zone de marais.....	85
7.4.5 Stratégies à adopter en fonction des objectifs.....	87
7.4.6 Méthode d'analyse bactériologique.....	88
7.4.7 Plan d'analyse des données	88
7.5 CONCLUSION	89

8. CONCLUSION GENERALE.....	90
9. BIBLIOGRAPHIE	93
10. LISTE DES ANNEXES.....	96

REMERCIEMENTS

J'ai le plaisir de remercier:

– Georges RAVOUX pour sa confiance, ses conseils et son soutien en diverses occasions tant sur le plan professionnel que personnel, durant ces quinze années d'activité à l'ISTPM puis à l'IFREMER.

– Michel LEGLISE, qui m'a confié différentes études en me faisant pleinement confiance pour les conduire de bout en bout. Il m'a ainsi permis d'exercer de plus grandes responsabilités et d'acquérir peu à peu une plus grande maîtrise professionnelle.

– Joseph MAZURIE et Claude LE BEC, qui m'ont initié à la conduite d'études et à l'utilisation de logiciel statistique. Leur aide m'a été très précieuse. Je remercie Joseph Mazurié pour le temps qu'il a bien voulu me consacrer et les remarques dont j'ai bénéficié dans le cadre de ce mémoire.

– Benoît BELIAEFF avec qui j'ai eu le plaisir de travailler sur les études de zones conchyliques, et à qui je dois l'essentiel de mes connaissances sur le traitement statistique des données en bactériologie. Je le remercie vivement de son soutien, de ses conseils et de la pertinence de ses remarques pour la conception et la préparation de ce mémoire, et notamment concernant la stratégie d'échantillonnage.

– Robert CHEVALIER qui m'a fait bénéficier de son expérience, dans ce domaine d'activité qu'il connaît bien pour y avoir exercé à ses débuts, et pour ses remarques concernant la rédaction de ce mémoire. Je le remercie pour les précieux conseils qu'il m'a donnés sur la théorie de l'échantillonnage et le traitement statistique, jusque dans l'heure précédant son départ en retraite.

– Laurence MIOSSEC pour le soutien qu'elle m'a apporté tout au long de la préparation de ce mémoire et pour ses conseils et remarques, dont j'ai tenu le plus grand compte.

– Monique POMMEPUY qui a bien voulu se rendre disponible et pour les remarques pertinentes qu'elle m'a faites dans l'exploitation des résultats et la rédaction du document.

– Jacques DUPONT qui a bien voulu m'accueillir en mettant les moyens du Laboratoire Central de Méthodologie Analytique à ma disposition.

– Dominique MENARD à qui je dois l'apprentissage du fonctionnement de l'analyseur Malthus. Je le remercie de ses conseils et pour avoir suivi mon travail pendant cette période de trois semaines.

– Bernadette MINIER dont l'efficacité et la gentillesse ont permis le bon fonctionnement du laboratoire, malgré l'important surcroît de travail occasionné.

– Christine LE PAUL pour sa grande disponibilité. Je la remercie pour avoir assuré la formation informatique en traitement de texte de Francine BOCQUENE durant l'été, et de l'aide apportée dans la préparation de certaines figures de ce mémoire.

– Francine BOCQUENE pour les efforts importants consacrés à l'apprentissage des méthodes de traitement de texte, nécessaire à la réalisation matérielle de ce mémoire. Je la remercie pour la qualité du travail réalisé.

Je remercie tous ceux que je n'ai pas cités, et à qui je dois beaucoup pour m'avoir soutenu et conseillé ces dernières années.

INTRODUCTION

La nécessité de protéger les consommateurs et donc d'éviter de récolter ou de produire des coquillages dans des zones insalubres est apparue dès le début du siècle. Cependant la mise en place de la réglementation et des moyens nécessaires à la protection de la santé publique n'a été que très progressive. Aujourd'hui encore, des zones classées insalubres il y a 50 ans, le demeurent. D'autres, au contraire, sont victimes de pollutions plus récentes, entraînées par le développement des villes littorales et parfois des élevages agricoles, au moment où apparaît une volonté d'accroître la production en créant de nouvelles zones pour la culture des moules et palourdes.

La France est l'un des premiers pays producteurs de coquillages. La production nationale de 1986 à 1989, estimée par le Comité Central des Pêches Maritimes, toutes productions confondues, pêche et conchyliculture, est en moyenne sur ces quatre années de 155 000 tonnes. Selon les mêmes sources, le déficit du commerce extérieur concernant les moules, pour cette période, est d'environ 36 000 tonnes. Le flux import/export des autres coquillages étant négligeable, la consommation nationale des coquillages se situe donc, en moyenne, aux alentours de 191 000 tonnes par an. Les habitudes alimentaires françaises font qu'une très grande partie d'entre eux est consommée crue (huîtres, palourdes, ...), ou peu cuites (moules, coques). De ce fait, l'ingestion de coquillages bivalves provenant de zones de production contaminées, où ils concentrent en grande quantité les germes pathogènes présents dans l'eau, peut avoir des effets néfastes sur la santé des consommateurs.

L'harmonisation, au sein de la communauté européenne, des conditions de mise en marché des coquillages bivalves vivants conduit à recenser et à désigner les zones à vocation conchylicole, et en premier lieu, celles dont la salubrité permet l'expédition directe à la consommation humaine des coquillages récoltés ou produits. Un très grand nombre de secteurs conchylicoles sont soumis à des pollutions épisodiques, d'autres à des pollutions chroniques, dont l'origine est mal connue. Hier, il s'agissait d'interdire la récolte et la production de coquillages dans des zones notoirement insalubres, aujourd'hui il s'agit de maintenir la salubrité des eaux à vocation conchylicole, de rechercher les causes des pollutions éventuelles et de proposer les mesures destinées à protéger la qualité des eaux littorales et à améliorer l'assainissement.

Les normes de salubrité actuelles, basées sur le dénombrement des coliformes fécaux, germes tests de la contamination bactérienne fécale, ne renseignent pas sur la présence de bactéries pathogènes ni sur la contamination d'origine virale. Or il semble, ces dernières années, que les épidémies d'origine virale apparaissent plus nombreuses que celles d'origine bactérienne. Par ailleurs, la définition des normes de salubrité n'est pas basée sur la mesure des risques liés à la consommation des coquillages.

La complexité du milieu marin, la diversité des modes d'élevage, des biotopes et des espèces cultivées, ainsi que les imperfections des techniques de mesure analytique, contribuent à rendre difficile la connaissance de l'état de salubrité d'un secteur donné. La conduite d'études de zones conchylicoles, plus approfondies, sur l'ensemble des côtes françaises devient possible

aujourd'hui grâce au développement de moyens analytiques nouveaux, associé à l'introduction de l'informatique et du traitement statistique des données recueillies.

L'importance des demandes d'études en vue de développer de nouvelles zones de production de coquillages, la nécessité d'une meilleure connaissance des phénomènes de pollution en fonction des différents types d'élevage et d'espèces de coquillages, renforcent l'intérêt de la mise au point d'une méthode propre à répondre aux besoins dans le domaine des études bactériologiques des zones conchylicoles. Le but de ce mémoire est donc d'apporter une première contribution à cet objectif ambitieux.

Il s'organise en deux parties : les aspects réglementaires et sanitaires, puis la méthodologie :

La première partie comprend trois chapitres :

- un bref historique montre l'évolution du traitement des problèmes de santé publique, liés à la consommation des coquillages, vers le choix des normes de qualité des eaux conchylicoles.
- la réglementation française et européenne est étudiée dans ses aspects concernant la qualité du milieu marin et des produits sur la zone de production, et notamment la stratégie d'échantillonnage nécessaire à la mise en évidence des contaminations bactériologiques.
- les problèmes sanitaires liés à la consommation des coquillages sont abordés, ainsi que l'importance du choix d'indicateurs fiables de pollution d'origine bactérienne et virale, et la nécessité d'études épidémiologiques en vue d'établir des normes satisfaisantes pour la protection de zones conchylicoles.

La deuxième partie comprend quatre chapitres :

- le bilan critique des études de salubrité réalisées par les laboratoires côtiers d'IFREMER, permet de tirer partie de l'expérience passée, et aborde la plupart des problèmes rencontrés par ce type d'étude en l'absence d'une véritable planification de l'échantillonnage associant le traitement statistique et le plan d'analyse des données.
- la stratégie d'échantillonnage étudie le processus décisionnel aboutissant au choix d'un plan d'échantillonnage, tenant compte des problèmes posés et des contraintes naturelles, techniques ou mathématiques, liées au choix des variables à étudier, des échelles spatio-temporelles et des méthodes de traitement et d'analyse des données. La théorie des plans de sondage est discutée et des recommandations sont faites.
- l'étude bactériologique de différentes échelles de variabilité spatio-temporelle dans une zone de production de palourdes est faite au moyen de l'analyseur Malthus.
- le dernier chapitre jette les premières bases d'un guide méthodologique pour l'étude bactériologique des zones conchylicoles.

PREMIERE PARTIE : LES ASPECTS REGLEMENTAIRES ET SANITAIRES

1. HISTORIQUE DU CLASSEMENT SANITAIRE DES ZONES CONCHYLICOLES

1.1 PERIODE 1900–1939

A la suite d'accidents infectieux graves attribués à la consommation d'huîtres, une enquête générale menée de 1898 à 1900 par le docteur Mosny, à la demande du Ministre de la Marine, montra la présence de parcs d'élevage dans des ports ou des estuaires contaminés. Les premiers contrôles sanitaires ont débuté en 1913 à l'initiative de commerçants parisiens qui organisèrent une surveillance rendue nécessaire dans les principaux centres ostréicoles (La Tremblade, Marennes, Arcachon) chez des exploitants de bonne volonté (Mazières, 1963).

Les décrets du 21 décembre 1915 et du 28 mars 1919 relatifs au régime des concessions exigent la réalisation d'une enquête avant l'octroi de toute nouvelle concession d'élevage. Le contrôle des huîtres, les autres coquillages n'étant pas concernés, est rendu obligatoire par le décret du 31 juillet 1923 dont l'application est confiée à l'Office Scientifique et Technique des Pêches Maritimes (O.S.T.P.M.), établissement public créé par la loi du 31 décembre 1918. Ce décret est repris et complété par celui du 20 août 1939 relatif à la salubrité des huîtres, moules et autres coquillages, dont le champ d'application s'étend de la production, y compris les gisements naturels, à la consommation. Il concerne tous les coquillages susceptibles d'être consommés crus, y compris les oursins et les violets.

1.2 PERIODE 1939–1976

Le décret du 20 août 1939, mis en application par une circulaire ministérielle du 22 mars 1941, permet le classement des secteurs d'élevage de coquillages en zone salubre et insalubre, de même que celui des bancs et gisements naturels coquilliers. Dès 1941, 110 zones sont classées insalubres: 43 correspondent aux limites administratives des ports et à leurs dépendances, 67 aux gisements naturels coquilliers et aux zones situées à proximité de rejets importants d'origine urbaine ou industrielle.

L'inventaire cartographique réalisé par l'ISTPM en novembre 1982 montre que l'essentiel des classements de zone (69%) a été fait de 1941 à 1950 (Tab.1). Lambert (1943) indique que 238 zones insalubres, dont 128 gisements insalubres, sont délimitées et classées. Un tel chiffre ne semble pouvoir être atteint qu'à la condition de diviser une zone, qui s'y prête, en sous-ensembles. Ces classements provoquèrent de vives réactions de la part des usagers. Des zones salubres, au nombre de 46, ont également été définies lorsque les délimitations ont paru nécessaires. Par ailleurs, toutes les zones non classées sont considérées comme salubres, exception faite des enceintes portuaires qui sont toujours considérés insalubres.

Date	Lieu	Limites des ports et dépendances	Zones d'élevage gisements naturels	TOTAL
1941-1950		54	130	184
1951-1960		5	30	35
1961-1970		3	9	12
1971-1980		9	27	36
TOTAL		71	196	267

Tab.1: Classements des zones insalubres (Inventaire cartographique de l'ISTPM, 1982).

En l'absence de norme de salubrité l'Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes (ISTPM) n'appliqua pas de méthode rigide et uniforme pour le classement des zones. Il attacha une grande importance à l'enquête topographique et aux variations de la colimétrie en vue de dépister les contaminations éventuelles et de comparer les conditions de salubrité des diverses zones.

L'examen des classements des zones insalubres indique qu'initialement les décisions étaient basées sur la présence d'exutoires urbains ou de rejets industriels à proximité des lieux d'élevage des coquillages ou des gisements naturels. Poggi (1988) souligne que le recensement et le classement des zones littorales salubres et insalubres réalisés entre 1941 et 1976 l'ont été avec une bonne "dose" d'empirisme et de pragmatisme.

Mazières (1963) pose la question: "où commence l'insalubrité ?", et propose une "échelle d'appréciation bactériologique" de la qualité des huîtres (Tab.2), afin de permettre à l'hygiéniste d'orienter sa décision, à l'occasion d'études sanitaires littorales, de classement de zones ostréicoles ou de gisements coquilliers.

CLASSES	Colimétrie : E. Coli / 100 ml	
	Eaux	Huîtres
Classe 1 : Résultats satisfaisants	0	0
Classe 2 : Résultats acceptables	1 à 60	1 à 250
Classe 3 : Résultats suspects	61 à 120	251 à 500
Classe 4 : Résultats défavorables	> 120	> 500

Tab. 2 : Echelle d'appréciation bactériologique des eaux et des huîtres (Mazières, 1963)

1.3 PERIODE 1976–1991

Les premières normes de salubrité des zones conchylicoles sont publiées par l'arrêté du 12 octobre 1976. Paradoxalement, après cette date, 4 classements de zones insalubres seulement sont répertoriés dans l'inventaire cartographique de novembre 1982. Ensuite seul le gisement naturel de coques de La Baule – Le Pouliguen a fait l'objet d'un classement insalubre en 1988. Quelques études de salubrité ont été entreprises de 1982 à 1990 en vue d'un reclassement en zone salubre, mais les résultats ont confirmé leur classement insalubre.

Historiquement, depuis la création de l'OSTPM puis de l'ISTPM, le décret du 14 octobre 1953 transformant l'OSTPM en ISTPM, l'objectif principal de la surveillance bactériologique est la salubrité des coquillages destinés à la consommation humaine. Cet impératif en matière de santé publique a donc prévalu dans le choix des stratégies de contrôle de la salubrité des coquillages jusqu'en 1988. Le suivi s'organise selon deux schémas (Poggi, 1986).

– *Cas des zones non exploitées:*

Ces zones, salubres ou insalubres, ne font l'objet d'aucun suivi car elles sont sans intérêt pour la pêche ou la conchyliculture.

– *Cas des zones exploitées:*

Celles reconnues salubres font l'objet d'un suivi permanent de la qualité des produits, essentiellement lors de la préparation des expéditions des colis de coquillages dans les établissements.

Dans les zones classées insalubres, dont l'exploitation est sévèrement règlementée, le suivi de la qualité des produits a lieu pendant les périodes d'exploitation de la zone en cause, puis au moment des expéditions après un rechargement en zone salubre ou un traitement en station de purification.

Certaines zones insalubres "de fait" ne sont pas reconnues officiellement comme telles pour des raisons d'ordre socio-économique. Ce sont elles qui, en pratique, font l'objet du suivi le plus intensif. Ces types de zones sont parfois qualifiés de "suspects", reconnus officiellement sur le plan local, ils sont assortis d'une réglementation spécifique. Cela a été le cas du Grand Traict du Croisic (Loire-Atlantique) jusqu'en 1985. Les normes réglementaires relatives au milieu ne sont plus parfaitement respectées dans plusieurs zones mytilicoles, notamment en Bretagne Nord. Une application stricte de l'arrêté du 12 octobre 1976 conduirait au classement insalubre de ces zones (Poggi, 1986).

La directive du Conseil des Communautés Européennes du 30 octobre 1979 demande à chaque Etat membre de désigner ses zones conchylicoles dans un délai de 2 ans, d'établir des programmes en vue de réduire la pollution et d'assurer que les eaux soient conformes dans un délai de 6 ans après leur désignation, celles-ci devant répondre à des critères de qualité correspondant à un certain nombre de paramètres dont les coliformes fécaux. La circulaire ministérielle du 10 mai 1982 demande aux préfets des départements littoraux de mettre en

pratique les mesures demandées. La France a donc fait parvenir, en mars 1990, un document de référence (Inventaire des secteurs conchylicoles du littoral français, IFREMER, 1984) au Conseil des Communautés Européennes, désignant ainsi officiellement les sites à vocation conchylicole.

L'ensemble des zones conchylicoles est regroupé en 82 secteurs numérotés, y compris la Corse. Cet inventaire reprend les zones classées administrativement insalubres, sans étude préalable au sens de l'arrêté du 12 octobre 1976 (Inventaire cartographique des zones littorales classées insalubres, 1982, ISTPM). Les secteurs n'ayant pas fait l'objet d'un classement insalubre sont salubres de fait au plan administratif. Cette directive a pour but d'éviter des conditions de concurrence inégales basées sur des dispositions différentes dans les Etats membres quant à la qualité requise des eaux conchylicoles dans l'attente d'un règlement CEE relatif aux conditions sanitaires des zones de production et la mise sur le marché de mollusques bivalves vivants.

La création de l'IFREMER en juin 1984, né de la fusion de l'ISTPM et du CNEXO, a permis d'orienter progressivement les activités vers la surveillance de la qualité du milieu et des cheptels, les Services Vétérinaires d'Hygiène Alimentaire assurant le contrôle des établissements d'expédition et des produits destinés à la consommation directe.

Un réseau de surveillance microbiologique du littoral français concernant la bactériologie est mis en place en 1989 (Miossec, 1990). Ce réseau a un double objectif:

- *Environnemental*: le but est l'évaluation des niveaux et des tendances de la contamination bactériologique du milieu marin. Le coquillage est considéré comme intégrateur de la qualité bactériologique des eaux littorales.
- *Santé publique*: il s'agit de protéger le consommateur et donc de garantir la salubrité des coquillages au sortir du milieu.

En toute première action la révision du découpage du littoral en zones salubres et insalubres est à revoir pour une définition plus précise de la qualité sanitaire des différents secteurs, en fonction des modalités d'application, en droit français, du règlement européen. Ces études permettraient de mettre en évidence les sources de pollution, les niveaux de contamination, et de juger des fluctuations spatio-temporelles des apports. A terme, un nouveau classement des zones conchylicoles serait proposé.

1.4 CONCLUSION

Dès le début du siècle, à la suite d'accidents infectieux graves attribués la consommation d'huîtres contaminées, a lieu une prise de conscience conduisant à la nécessité d'organiser des contrôles sanitaires des coquillages issus des principaux centres ostréicoles.

Néanmoins il a fallu attendre le décret du 20 août 1939, qui 40 ans plus tard, jeta les bases d'un contrôle sanitaire des eaux conchylicoles, concernant l'élevage et les gisements coquilliers naturels, interdisant l'exploitation des zones notoirement insalubres, malgré les vives réactions des usagers.

Trente cinq ans plus tard environ, les premières normes de salubrité des zones conchylicoles sont publiées par l'arrêté du 12 octobre 1976. Jusqu'à cette date, le classement des zones de production est soumis à beaucoup d'empirisme et de pragmatisme, tenant compte semble-t-il, en priorité, de l'importance de l'enjeu économique. C'est l'une des raisons pour lesquelles, aujourd'hui encore, les normes ne sont pas respectées dans plusieurs centres mytilicoles importants.

Très récemment la surveillance sanitaire des eaux conchylicoles s'est considérablement améliorée:

- par la mise en place progressive des instructions de la directive du Conseil (CEE) du 30 octobre 1979, dont la désignation des eaux à vocation conchylicole soumises à une surveillance périodique,
- et surtout, par la mise en place du réseau de surveillance microbiologique (REMI) du littoral français concernant la bactériologie, par l'IFREMER en 1989, avec un double objectif, environnemental et santé publique.

2. LA REGLEMENTATION

Cette réglementation est ici étudiée dans ses conséquences sur les études bactériologiques de zones.

2.1 LE DECRET DU 20 AOUT 1939

Ce décret relatif à la salubrité des huîtres, moules et autres coquillages, qui est toujours en vigueur, dit que pour son application: "il est procédé au classement du littoral en zones salubres et insalubres" (Annexe 1). Les décisions de classement sont prises par le Directeur des Affaires Maritimes sur proposition du représentant local du Directeur de l'ISTPM.

2.2 L'ARRETE DU 12 OCTOBRE 1976

Cet arrêté précise les normes de salubrité, la méthode d'évaluation de la contamination bactériologique, les conditions dans lesquelles les zones sont classées salubres et insalubres (Annexe 2).

La salubrité des eaux conchylicoles est déterminée sur la base du dénombrement de germes tests de contamination fécale présents dans les coquillages vivants au lieu considéré. L'échantillon de coquillages analysé doit comprendre un nombre de spécimens de même espèce au moins égal à quatre. Le dénombrement des germes se fait en milieu liquide par la méthode de dilution des tubes dont l'interprétation numérique est donnée par la méthode du "Nombre le Plus Probable" (NPP) de coliformes fécaux trouvés dans 100 millilitres de chair de coquillages et de liquide intervalvaire, en ensemençant 5 ml dans 3 tubes avec l'échantillon, 3 tubes avec une dilution de celui-ci au 1/10 ème et 3 tubes avec une dilution au 1/100 ème. Seuls les germes cultivables sont pris en compte par cette méthode.

Afin de tenir compte des fluctuations naturelles dans la charge microbienne des eaux marines, l'évaluation de la contamination s'effectue sur 26 prélèvements échelonnés sur 12 mois consécutifs.

Les normes sont considérées comme respectées, et la zone est classée salubre, si l'on obtient les résultats suivants:

- 21 mesures inférieures ou égales à 300 C.F./100 ml (80,8 %)
- 3 mesures comprises entre 300 et 1 000 C.F./100 ml (11,5 %)
- 2 mesures comprises entre 1 000 et 3 000 C.F./100 ml (7,7 %)
- 0 mesure supérieure à 3 000 C.F./100 ml.

Les zones ne répondant pas aux conditions précédentes sont classées insalubres. La récolte des coquillages y est interdite, et a fortiori, l'élevage. Dans les zones classées insalubres, seule la récolte des coquillages, qui doivent faire ensuite l'objet d'une purification ou d'un reparcage, peut être autorisée par le Directeur des Affaires Maritimes après avis du Directeur de l'ISTPM. Toutefois, lorsque la teneur en coliformes fécaux dépasse 10 000/100 ml dans 25 % des échantillons, l'autorisation requiert en outre l'avis conforme du Directeur de la DDASS.

2.3 LA DIRECTIVE DU CONSEIL (CEE) DU 30 OCTOBRE 1979

Elle précise les conditions relatives à la qualité des eaux conchylicoles afin d'éviter des disparités pouvant créer des conditions de concurrence inégales ayant une incidence directe sur le fonctionnement du marché commun.

La concentration en germes tests de contamination fécale dans les coquillages doit être inférieure ou égale à 300 C.F./100 ml de chair de coquillages et de liquide intervalvaire sur 75 % des échantillons prélevés. Le non-respect des valeurs n'est pas pris en considération dans le calcul de cette valeur lorsqu'elle est la conséquence d'une "catastrophe". Toutefois en attendant l'adoption d'une directive relative à la protection des consommateurs de produits conchylicoles, cette valeur devrait être impérativement respectée dans les eaux où vivent les coquillages directement comestibles par l'homme. La méthode de dénombrement est celle du NPP. Des méthodes donnant des résultats équivalents ou comparables peuvent être utilisées.

La fréquence minimale des prélèvements est trimestrielle et la période d'observation est de 12 mois. La stratégie d'échantillonnage est définie par l'autorité compétente de chaque Etat membre en fonction des conditions locales du milieu. Si la qualité des eaux désignées est sensiblement supérieure à celle résultant de l'application de la valeur guide de la directive (300 C.F./100 ml), la fréquence des prélèvements peut être réduite. En cas d'absence de pollution et s'il n'y a aucun risque de détérioration de la qualité des eaux, l'autorité compétente peut décider qu'aucun prélèvement n'est nécessaire. A l'inverse, si la valeur indiquée n'est pas respectée, elle recherche si cette situation est due à une pollution exceptionnelle et adopte les mesures appropriées.

En cas de circonstances météorologiques ou géographiques exceptionnelles, il est possible de déroger à la directive.

2.4 LA DIRECTIVE DU CONSEIL (CEE) DU 15 JUILLET 1991

Cette récente directive arrête les règles sanitaires régissant la production et la mise sur le marché des mollusques bivalves vivants (Annexe 3).

L'emplacement et les limites de zones de production et de reparcage doivent être fixés en vue d'identifier les zones dans lesquelles les mollusques bivalves vivants peuvent être récoltés:

- a- Pour la consommation humaine directe s'ils contiennent moins de 300 C.F./100 ml de chair de mollusque et de liquide intervalvaire dans des analyses faites en milieu liquide

par la méthode de dilution des tubes (5 tubes et 3 dilutions), dont l'interprétation numérique est donnée par la méthode du "Nombre le Plus Probable" (NPP), ou tout autre procédé bactériologique dont l'équivalence soit démontrée en niveau de précision, et absence de salmonelle dans 25 g de chair.

- b- Pour la consommation humaine, mais après avoir subi un traitement dans un centre de purification, ou après reparcage, s'ils ne dépassent pas les limites de 6 000 C.F./100 g de chair dans 90 % des échantillons. Après purification ou reparcage, les coquillages doivent contenir moins de 300 C.F./100 g de chair avec absence de salmonelle.
- c- Pour la consommation humaine, mais ne peuvent être mis sur le marché qu'après un reparcage portant sur une longue période (minimum 2 mois) associé ou non à une purification, ou après une purification intensive pendant une période à fixer en vue de satisfaire les mêmes exigences qu'en -a, s'ils ne dépassent pas les limites de 60 000 C.F./100 g de chair.

Cette directive impose la mise en place d'un système de surveillance périodique des zones de production et de reparcage des mollusques bivalves vivants en vue de contrôler leur qualité bactériologique en relation avec la zone de récolte et de reparcage.

L'autorité compétente doit établir des plans d'échantillonnage, à des intervalles réguliers ou au cas par cas si la récolte a lieu à des périodes irrégulières, en tenant compte:

- des variations probables dans la contamination fécale de chaque zone de production et de reparcage.
- de la contamination possible des mollusques dans la zone de production et de reparcage. Lorsque le résultat du plan d'échantillonnage montre que la mise sur le marché de mollusques bivalves vivants peut constituer un risque pour la santé humaine, la zone de production concernée doit être fermée jusqu'à ce que la situation soit rétablie.

2.5 DISCUSSION

Le décret du 20 août 1939 permet de classer les zones conchylicoles, mais ne dit pas comment procéder. Il ne prévoit ni stratégie d'échantillonnage, ni méthode d'évaluation de la salubrité.

L'arrêté du 12 octobre 1976 ainsi que les directives européennes, bien que de finalités différentes, ont en commun de définir une méthode d'évaluation de la salubrité et d'indiquer une méthode analytique de référence : le dénombrement par la méthode du N.P.P. de coliformes fécaux trouvés dans 100 ml de chair de coquillages et de liquide intervalvaire. La directive du 15 juillet 1991 donne pour référence la méthode à 5 tubes et 3 dilutions. Les laboratoires IFREMER utilisent actuellement la méthode à 3 tubes et 3 dilutions, qui a l'inconvénient d'être moins précise, et l'avantage d'être meilleur marché.

2.5.1 LA STRATEGIE D'ECHANTILLONNAGE

Elle est peu abordée, les directives laissant une grande liberté pour l'organiser en fonction des conditions locales du milieu (variations et taux de contamination, proximité de rejets polluants...). Celle d'octobre 1979 fixe une périodicité minimale trimestrielle. La directive "PRODUITS" du Conseil (CEE) du 15 juillet 1991 doit, en pratique, conduire à la suppression des critères microbiologiques pris en compte dans la directive "EAUX CONCHYLICOLES" de 1979.

Les directives européennes n'étant pas encore applicables en droit français, c'est l'arrêté du 12 octobre 1976 qui permet réglementairement le classement du littoral en zones salubres et insalubres. Il comporte de nombreuses insuffisances: le nombre de prélèvements est fixé à 26 sans référence à l'étendue et à l'hétérogénéité des zones conchylicoles. Cet arrêté n'indique pas le choix d'un véritable plan de sondage. Cela peut conduire à utiliser la moyenne géométrique des résultats ou la médiane par date de prélèvements afin de ne garder que 26 données pour interpréter la norme si plusieurs lieux de prélèvements sont définis.

Ces différentes statistiques ont en commun le fait qu'elles lissent fortement les pics de contamination, qui témoignent du véritable danger pour la santé publique en signalant de fortes pollutions. Néanmoins cette affirmation est à nuancer: les pics observés dans les données brutes peuvent ne représenter que la manifestation de la variabilité du dénombrement des coliformes fécaux au moyen de la mesure du NPP. Par exemple, lorsque l'on obtient 1 440 C.F./100 ml, ceci ne représente qu'une estimation ponctuelle. La vraie valeur a 95% de chances de se trouver entre les limites 240 et 5 940 (De Man, 1983), et donc entre une limite à gauche de 300 C.F. et une limite à droite de 3 000 C.F, valeur impérative!

L'échantillonnage temporel est peu précisé dans la mesure où le texte n'indique pas clairement que le pas doit être rigoureusement de 14 jours pour les 26 séries de prélèvements. Néanmoins, en raison de contraintes opérationnelles, ou bien pour être en concordance avec les périodes d'exploitation, les laboratoires peuvent être conduits à échelonner les prélèvements aussi régulièrement. Le choix d'un tel plan systématique peut présenter un inconvénient majeur si le descripteur observé, ici le niveau de contamination, est en phase avec un autre phénomène (Scherrer, 1983), ce qui est le cas avec la périodicité de la marée. Les coquillages peuvent être systématiquement prélevés soit aux mortes eaux, soit aux vives eaux. Cette concordance peut introduire un biais dans la mesure de salubrité. Une étude sur l'Elorn (Pommepey et al., 1987) montre que de forts coefficients induisent une remise en suspension des sédiments, pièges à bactéries surtout s'ils sont vaseux, entraînant une élévation importante de la densité bactérienne dans les eaux.

Il est clair que, sans information préalable suffisante, l'échantillonnage doit couvrir la totalité de l'aire concernée par l'étude de zone. Ceci implique la définition d'un certain nombre de stations de prélèvements et un plan d'échantillonnage adapté au problème posé en fonction des caractéristiques de la zone étudiée. Une couverture systématique de la zone permet la détermination éventuelle de sous-zones plus homogènes dans le cas d'un secteur complexe ou hétérogène.

2.5.2. ORIGINE DES VALEURS SEUILS

La distribution des concentrations bactériennes est supposée classiquement suivre une loi de Galton (ou loi lognormale). Cette hypothèse faite, on peut obtenir des estimations des deux paramètres de la loi, moyenne et écart-type, compte tenu des fréquences admissibles indiquées par la norme: sur 26 valeurs, le nombre des valeurs supérieures à 300 coliformes fécaux pour 100 ml de suspension ne doit pas excéder 5 et, parmi celles-ci le nombre de valeurs comprises entre 1 000 et 3 000 ne doit pas excéder 2. A partir de la moyenne et de l'écart-type calculés, il est remarquable que la valeur centrée et réduite correspondant au logarithme de 3 000 coliformes fécaux pour 100 ml de suspension soit égale à 1.96 (R. Chevalier, Com. pers.). En se référant à la table de la loi normale réduite fournie dans la plupart des manuels de statistique, cette valeur n'a que 2,5% de chances d'être dépassée.

Il semblerait donc qu'à l'origine des valeurs seuils existe une base probabiliste, mais ce raisonnement n'a pas été mené à bon terme. En effet, l'arrêté devrait être formulé en termes de pourcentages admissibles pour chaque classe de contamination; tel qu'il est écrit, une valeur supérieure à 3 000 C.F. suffit à émettre un avis de classement en zone insalubre. Dès lors qu'on multiplie les mesures de façon légitime à appréhender la variabilité spatiale, on se résigne à augmenter le nombre de mesures supérieures à la limite précitée; par exemple $26 \times 2,5\% = 0,65$ que nous admettrons proche du zéro. Mais avec 12 stations de prélèvements : $26 \times 12 \times 2,5 = 7,85$ proche de 8. Donc 8 mesures supérieures à 3 000 C.F./100 ml seraient autorisées dans ce cas. L'arrêté aurait dû être formulé en termes de pourcentages admissibles, soit faire uniquement mention d'une valeur maximale à ne pas dépasser (par exemple 3 000 C.F./100 ml).

2.5.3. LES NORMES DE SALUBRITE

L'un des buts des directives européennes est d'harmoniser ces normes de salubrité dans les états membres (Tab.3). Certains pays, n'en ont pas pour l'eau, c'est le cas de la France, mais pour la production, tandis que l'Espagne, par exemple, préfère imposer le passage de tous les produits en station de traitement en appliquant une valeur impérative de 50 C.F./100 ml. Neuf ans après sa publication, la directive européenne de 1979 est peu appliquée: Pinot et al. (1988) signalent que les seules données disponibles concernent la Grande-Bretagne, l'Espagne et la France.

LES NORMES			
SEUILS	MILIEU		MILIEU/PRODUITS
C.F./100 ml	Arreté du 12/10/76	Directive CEE du 30/10/79	Directive CEE du 15/07/91
60 000	Reparcage ou purification soumis à l'avis de la DDASS si 25% des résultats > 10 000 sans limite supérieure	25 % résultats tolérés sans limite supérieure	Limite inaccessible pour tout traitement
10 000			Reparcage de longue durée ou purification intensive, si les résultats après reparcage deviennent <6000 dans 90% des échantillons
6 000	Résultats non acceptables	25 % résultats tolérés sans limite supérieure	Reparcage ou purification, si les résultats <6 000 dans 90% des échantillons
3 000	Reparcage ou purification		
1 000	7,7% résultats tolérés		
300	11,5% résultats tolérés	Qualité respectée	Qualité respectée avec absence de salmonelle dans 25 g de chair
0	80,8% résultats acceptables ou satisfaisants		
Observations	Limites supérieures en % des normes de salubrité		Aucun dépassement toléré pour la consommation directe

Tab. 3 : Réglementations françaises et européennes en fonction des valeurs seuils de contamination.

SEUILS	LES NORMES PRODUITS	
C.F./ 100 ml	Arrêté du 21/12/79	Circulaire ministérielle du 28/04/88
300 000	Produits réputés toxiques ou corrompus	Seuil de toxicité
100 000	Qualité non satisfaisante	
9 000	Qualité non satisfaisante si plus des 3/5 des résultats sont compris entre 3 000 et 9 000	Résultats inacceptables
3 000	Qualité acceptable si moins de 3/5 des résultats sont compris entre 3 000 et 9 000	
1 000	Résultats non satisfaisants Seuil limite d'acceptabilité	Résultats non satisfaisants, Seuil limite d'acceptabilité
300		Résultats satisfaisants
0	Résultats satisfaisants	
Observations	Ces valeurs seuils tiennent compte de la variabilité du NPP et concernent un lot de 5 échantillons	Ces valeurs seuils concernent le contrôle des produits dans les établissements

Tab. 4: Réglementation française pour le contrôle des produits et des établissements d'expédition.

En France, des différences importantes existent également sur le plan réglementaire (Tab.4). L'arrêté du 21 décembre 1979 sur les critères microbiologiques auxquels doivent satisfaire certaines denrées animales ou d'origine animale admet un seuil d'acceptabilité élevé (3 000 C.F./100 ml). C'est le seul qui tienne compte de la variabilité du NPP dans l'interprétation des résultats: "le dénombrement microbien n'est pas absolu, il est généralement admis que la variabilité peut atteindre un logarithme avec les milieux liquides".

La circulaire ministérielle du 28 avril 1988, relative à l'harmonisation du contrôle bactériologique, donne des valeurs seuils de 1 000 C.F./100 ml pour des résultats satisfaisants, et de 3 000 C.F./100 ml pour la limite d'acceptabilité. Elle est destinée à la surveillance des produits dans les établissements conchylicoles. En cas d'intoxications alimentaires par consommation de coquillages, la recherche des germes est étendue aux germes pathogènes et notamment aux salmonelles et, en outre, en période estivale, à *Vibrio parahaemolyticus*.

De toute évidence les valeurs seuils ainsi que les germes de références, retenus ne paraissent pas pleinement satisfaisants dans les différentes réglementations. La complexité du milieu marin et du comportement des coquillages vis-à-vis des différents contaminants, n'a pas encore permis de fixer des critères satisfaisants et définitifs de qualité des eaux conchylicoles (Poggi, 1986).

Maul et al. (1989) précisent que "le manque de données épidémiologiques fiables et la connaissance relativement imparfaite de l'incidence pathologique sur la population, (...), ont contraint les autorités responsables en santé publique à fixer des normes de salubrité sur des bases caractérisées par un manque d'objectivité".

A défaut d'enquête épidémiologique, il est difficile de savoir si les normes actuelles sont trop sévères ou trop laxistes. En l'absence de risque réellement mesuré, des normes sévères peuvent avoir pour conséquence de restreindre les zones de production et de diminuer l'activité économique qui en dépend. La définition de normes de salubrité passe par une estimation du risque pour le consommateur.

D'autre part les germes témoins de contamination fécale ne sont pas reconnus comme parfaitement significatifs de la contamination des eaux conchylicoles, et la recherche de germes pathogènes est donc prévue dans la réglementation concernant les produits mis sur le marché. Dans le cadre d'un suivi de routine, celle-ci n'est pas possible techniquement, ni financièrement selon les germes considérés. Or, la présence de virus de l'hépatite a pu être observée sans que celle de germes témoins (coliformes fécaux, streptocoques fécaux ou salmonelles) ait été mise en évidence. Il en est de même pour la relation existant entre coliformes fécaux et salmonelles (Poggi, 1986).

2.6 CONCLUSION

Le but essentiel de la réglementation mise en place jusqu'à présent est, tout d'abord, de protéger la santé publique, puis de définir les eaux à vocation conchylicole. Son évolution a été la suivante:

- a*– classement du littoral en zones salubres et insalubres (Décret du 20 août 1939).
- b*– définition des normes de salubrité des eaux conchylicoles assortie de la méthode d'évaluation de la contamination bactériologique (Arrêté du 12 octobre 1976).
- c*– harmonisation, entre les Etats européens, des contrôles de la qualité des eaux conchylicoles désignées, la valeur guide retenue étant de 300 C.F./100 ml (Directive CEE du 30 octobre 1979). La fréquence minimale de prélèvements préconisée est trimestrielle, chaque Etat définit la stratégie d'échantillonnage à mettre en place.
- d*– identification des zones dans lesquelles les mollusques bivalves vivants peuvent être récoltés, et mise en place d'un système de surveillance périodique des zones de production et de reparcage avec un plan d'échantillonnage adéquat (Directive CEE du 15 juillet 1991).

L'arrêté du 12 octobre 1976, seul document en droit français qui permet actuellement le classement des zones conchylicoles, comporte de nombreuses insuffisances. Il ne fait pas référence à l'étendue et à l'hétérogénéité des zones conchylicoles. Il ne prend pas en compte les fluctuations spatiales, ni les différentes sources de variabilité des mesures bactériologiques dans le milieu. Cet arrêté ne définit donc pas de véritable plan de sondage, et, de plus, il ne permet pas une interprétation satisfaisante des données dès lors que les 26 mesures sont dépassées. Il aurait dû être formulé soit en terme de pourcentages admissibles, soit faire uniquement mention d'une valeur maximale à ne pas dépasser en vue de protéger au mieux la santé publique.

L'examen des différentes normes, "milieu" et "produits", montre qu'elles ne sont pas satisfaisantes, tant sur les seuils de contamination qui sont différents, que sur la fiabilité des germes tests de la contamination fécale qui sont peu représentatifs de la présence des bactéries pathogènes et à plus forte raison des virus.

Une estimation du risque pour le consommateur est nécessaire pour la définition de normes de salubrité.

3 LES RISQUES LIES A LA CONSOMMATION DE COQUILLAGES

3.1 PATHOLOGIES BACTERIENNES

Jusqu'à la mise en application de programmes de surveillance sanitaire, de nombreuses épidémies sont rapportées de temps à autre, y compris en Europe et en Amérique du Nord, dans des pays modernes et industrialisés où la notion d'hygiène est importante. Les coquillages incriminés le plus souvent, huîtres et moules, provenaient de zones insalubres. Parmi les épidémies les plus récentes en Europe, on peut citer: des gastro-entérites à *Vibrio parahaemolyticus* dans le Nord de l'Allemagne (1970), 911 cas de choléra à Naples (Italie) en 1973, dûs à des moules de Tunisie où sévissait une épidémie, 2 467 cas de choléra confirmés bactériologiquement et 48 décès au Portugal en 1974, dûs à des coques crues ou peu cuites, 20 cas de gastro-entérites à non-o-group-1 *Vibrio cholerae* (dont la présence dans le milieu marin n'est pas liée à la pollution fécale) en Italie en 1984, 9 cas de typhoïde en France en 1985 ont été attribués à l'ingestion de coquillages (Pinot et al., 1988).

La fréquence et l'importance des épidémies de choléra, de typhoïde et autres salmonelloses ont régressé, voire même disparu, ces dernières années dans les pays appliquant les normes sanitaires. Les dernières épidémies de salmonelloses d'origine coquillière certifiée en France (Finistère) datent de plus de 20 ans. Les données du ministère de la Santé font état de 611 foyers de toxi-infections alimentaires collectives (T.I.A.C.) déclarées en 1989 pour 11146 malades recensés. Les produits de la mer seraient responsables de 6,7% de ces T.I.A.C., avec moins de 3% pour lesquels l'agent causal serait les salmonelles (Poggi, 1990).

3.2 PATHOLOGIES VIRALES

La consommation de coquillages contaminés par des virus peut être à l'origine de nombreux cas de gastro-entérites et d'hépatites (Tab. 5), comme le montrent les enquêtes épidémiologiques (Schwartzbrod, 1990). Plus de 130 types de virus pathogènes pour l'homme, excrétés par des individus infectés, sont susceptibles d'être isolés des eaux. Regroupés sous le nom de virus entériques, ils appartiennent à plusieurs familles et genres capables de provoquer chez l'homme des manifestations pathologiques allant de l'atteinte du système nerveux aux gastro-entérites.

En Grande-Bretagne, 172 cas d'hépatite A ont été déclarés et vérifiés à la suite d'ingestion de coques fraîches ou congelées, de moules fraîches ou marinées et d'huîtres, ainsi que plusieurs épidémies de gastro-entérites à "virus Norwalk" et apparentés dues à la consommation de coques et d'huîtres. Dans ce même pays des épidémies "type Norwalk" ont été mises en évidence à la suite de consommation d'huîtres crues purifiées pendant 15 jours aux rayons U.V., après reparcage préalable de 72 heures (Pinot et al., 1988).

Des cas d'épidémies virales ont également été mis en évidence depuis 1980 en Australie et aux U.S.A. à la suite d'ingestion de coquillages provenant de zones bactériologiquement salubres ou après traitement en station de purification. De plus, ces faits soulignent l'insuffisance des procédés de purification en station, avec ou sans reparcage en eau saine, pour éliminer les virus pathogènes des coquillages contaminés. Si les normes bactériologiques paraissent efficaces pour prévenir les maladies d'origine bactérienne aussi graves que le choléra, la typhoïde ou les autres salmonelloses, elles sont insuffisantes pour prévenir les maladies virales comme l'hépatite A et les gastro-entérites à virus Norwalk et apparentés (Pinot et al., 1988). Outre l'impact des phytotoxines, notamment D.S.P. (Diarrhéc Shellfish Poison), les pathologies virales semblent constituer le principal problème de santé publique posé par la consommation de coquillages bivalves filtreurs.

ANNEE	COQUILLAGE	LIEU	NOMBRE D'INDIVIDUS MALADES	NOMBRE D'EPIDEMIES	VIRUS
1980	Huitre	Floride, USA	6	1	Norwalk
1980	Huître	Philippines	7	1	Hépatite A
1980	Coque	Sud-est Angleterre	424		Hépatite A
1982	Clam	New-York, USA	150	14	Norwalk apparentés Hépatite A
1982	Clam	New-York, USA	813	103	Norwalk
1982	Huître	New-York, USA	204		Norwalk
1983	Huître	Londres	181	1	Norwalk
1983	Clam	New-Jersey, USA	136	6	Gastro-entérite Norwalk apparentés
1985	Huître	Angleterre	13		Gastro-entérite Norwalk
1985	Clam	New-York, USA	5	1	Gastro-entérite
1988	Palourde	Shangai, Chine	292 301	1	Hépatite A

Tab. 5 : Epidémies liées à la consommation des fruits de mer (Schwartzbrod, 1990).

3.3 LES INDICATEURS

Les coliformes fécaux sont les germes tests de la contamination fécale dans les coquillages et les eaux conchylicoles. Lors de la mise en marché des coquillages les germes suivants sont dénombrés: coliformes fécaux, streptocoques fécaux et salmonelles (présence ou absence). La recherche des streptocoques fécaux n'a pas été retenue pour le contrôle des produits dans les établissements conchylicoles lors des expéditions vers les marchés.

Des travaux ont fait apparaître que *Streptococcus faecalis* semble nettement plus résistant en milieu marin, avec un temps de survie plus marqué, que *Escherichia coli*. Plusquellec (1984) indique que le dénombrement des streptocoques D dans les bivalves constitue un test bien adapté à l'étude de la contamination bactérienne des eaux littorales, en raison de l'augmentation de sensibilité et de la diminution de variabilité qu'il procure. Leur persistance, mesurée dans les moules, peut permettre d'intégrer les variations rapides des contaminations dans l'eau. Ce dénombrement pourrait être assimilé à une valeur moyenne, pendant une durée qui reste à préciser, et non une valeur ponctuelle. Block et Prieur, (1988), considèrent que la recherche de ce germe semble donc plus significatif pour estimer la salubrité des coquillages.

Dans l'état actuel des connaissances, le choix des indicateurs est un problème qui reste entier, tant sur le plan bactérien que viral.

En effet, l'évolution récente des techniques de numération des bactéries, qui a permis le dénombrement direct des cellules viables, dont les cellules stressées, a conduit à une révision profonde du concept du devenir des bactéries en mer. Sur le plan des techniques analytiques, les méthodes sélectives actuellement utilisées par les laboratoires ne permettent pas aux micro-organismes de récupérer après les blessures subies lors de leur séjour dans le milieu marin, et donnent ainsi des résultats par défaut optimistes. Cette révolution technique remet totalement en question les notions auparavant bien arrêtées de "mortalité" des bactéries telluriques en mer et de "pouvoir auto-épurateur" de ce milieu (Gauthier et Pietri, 1989).

Les cellules stressées sont des cellules qui évoluent vers un état de dormance ou de mortalité apparente, ne permettant pas la culture sur les milieux habituellement utilisés. L'état de dormance de ces bactéries, qui sont toujours viables, leur permet de maintenir une vie ralentie dans l'attente de conditions favorables. *E. coli* évolue vers l'état non cultivable en 1 à 4 jours, tandis que *V. cholerae* a une survie apparente moyenne de 7 à 8 jours. Certains résultats expérimentaux suggèrent en outre que les bactéries stressées devenues non cultivables conservent leur pouvoir pathogène.

D'un point de vue épidémiologique, afin d'évaluer le danger de la contamination bactérienne, le problème est:

- d'une part quantitatif: il paraît clair que l'existence dans le milieu marin de formes viables non cultivables de bactéries entériques pathogènes non décelables par les méthodes habituelles, modifie radicalement les valeurs prédictives des normes de salubrité des eaux conchylicoles. D'où l'intérêt de poursuivre les recherches visant à améliorer les dénombrements bactériens.

- d'autre part qualitatif: il semble nécessaire d'analyser plus précisément les modifications structurales et métaboliques des bactéries pendant leur séjour en mer. Elles pourraient perdre certaines propriétés impliquées dans l'expression de la virulence ou à l'inverse les accentuer, ou acquérir d'autres caractères aggravant leur pouvoir pathogène pour l'homme.

Delattre (1988) suggère la prise en compte des germes stressés dans le dénombrement des bactéries. L'absence de données suffisantes ne permet pas de répondre aux questions suivantes:

- Quelle importance accordée aux indicateurs stressés et quelle signification ont-ils du point de vue santé publique ?
- Le stress des indicateurs est-il représentatif du stress des pathogènes ?
- Les germes pathogènes stressés conservent-ils leur pouvoir pathogène ?

Des comparaisons entre le taux de stress et la dose minimale infectante seraient nécessaires. Actuellement les techniques considérées, dans la législation, comme équivalentes (NPP avec revivification d'une part, et directement sélective à 44,5°C d'autre part) conduisent à des résultats inégaux et non comparables, en ce sens qu'il n'est pas possible de trouver un coefficient de conversion constant pour passer de l'un à l'autre.

Les épidémies d'origine virale coquillière, les plus nombreuses dans les 20 dernières années par rapport à celles d'origine bactérienne, montrent que le risque potentiel lié à la présence des virus dans le milieu marin n'est pas à négliger, y compris dans les pays développés. Le choix du virus de l'hépatite A comme indicateur de pollution virale paraît présenter un intérêt majeur dans le cas des eaux conchylicoles. Sa recherche nécessite la mise au point d'une méthode de détection rapide. Trop d'incertitudes demeurent dans le domaine de la pollution d'origine virale (Gauthier et Pietri, 1989):

- La contamination virale réelle est sous-estimée du fait des contraintes techniques et des phénomènes de masquage des virus.
- Les données sur les doses minimales infectantes pour l'homme font défaut. Elles sont mieux connues pour les bactéries (Tab. 6)
- L'évolution réelle du pouvoir pathogène des souches virales au contact du milieu marin est peu connue.

Les difficultés techniques et les coûts ne permettent pas la recherche systématique des virus pathogènes pour l'homme dans les coquillages bivalves filtreurs. Plusieurs voies de recherche ont donc été menées (Pinot et al., 1988):

- La recherche d'un indicateur bactérien: jusqu'à ce jour aucune corrélation réellement significative n'a pu être mise en évidence entre la charge bactérienne fécale et la charge virale dans les coquillages.

- La recherche d'indicateurs viraux par des virus pathogènes: les recherches conduites ne s'avèrent guère concluantes du fait des difficultés techniques pour isoler les rotavirus, ainsi que de l'impossibilité actuelle de pratiquer des cultures cellulaires avec des sérotypes sauvages. Le recours aux entérovirus comme indicateurs de contamination fécale et de présence de virus pathogènes est peu fiable notamment à propos des poliovirus, malgré l'existence de techniques permettant l'isolement et l'identification des entérovirus.

La cinétique d'élimination des entérovirus dans les coquillages est un axe de recherche qui semble prometteur. Des expériences menées sur les huîtres montrent l'importance de la température de l'eau et du taux de contamination initial. L'élimination des entérovirus dans des eaux non contaminées, aisée au-dessus de 25°C, devient très difficile aux abords de 10°C.

L'isolement du virus de l'hépatite A à partir des mollusques incriminés, n'a jamais pu être fait par manque de méthodologie adéquate. A l'heure actuelle, des techniques immunologiques appliquées à la mise en évidence du virus dans des huîtres expérimentalement contaminées semblent prometteuses (Gauthier et Pietri, 1989).

BACTERIES	HABITAT HABITUEL			Dose minimale infectante	Température Minimale de Croissance °C
	Eau de mer	Hommes et animaux	Environnement		
<i>E. coli enterotoxique</i>		X		10 ⁴ à 10 ¹⁰	15
<i>Salmonella</i>		X		10 ² à 10 ⁵	5
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	X			10 ⁵ à 10 ⁷	8
<i>Vibrio cholerae</i> 01	X		X		
<i>Vibrio cholerae</i> non 01	X		X	10 ⁶ à 10 ⁹	
<i>Vibrio vulnificus</i>	X		X	10 ⁶ à 10 ⁹	environ 8
<i>Shigelles</i>	X			10 ¹ à 10 ²	
<i>Staphylocoques</i>		X			10
<i>Aeromonas</i>	X		X		0
<i>C. perfingens</i>			X		15
<i>C. botulinum</i>	X		X		3,2

Tab. 6 : Caractéristiques des principales bactéries pathogènes (Poggi, 1990).

3.4 EPIDEMIOLOGIE

Une définition de l'épidémiologie moderne est donnée par Yach et Botha (1986) : "Etude de la distribution et des causes de l'altération de la santé dans les populations humaines et évaluation des actions entreprises afin d'améliorer la santé". Les épidémiologistes enregistrent les informations sur des comportements humains qui ont été correctement rapportés par les sujets eux-mêmes. Ils rapportent des "expériences naturelles" concernant les comportements humains qu'il n'est probablement pas possible d'étudier de manière parfaitement scientifique (B. Gregg, 1988). Cette science n'est donc pas pure, les résultats seront toujours controversés, et dans la pratique il y aura des exceptions aux règles générales établies.

On ne peut se faire une idée précise de l'importance des pathologies liées à l'ingestion des coquillages bivalves filtreurs que si l'on est capable de mesurer leur fréquence réelle. Cette mesure difficile suppose l'existence d'un système d'information permanent et représentatif de l'ensemble du territoire étudié et capable de faire la distinction entre les infections liées aux coquillages et les autres. Actuellement seuls les systèmes anglais et américains semblent avoir la qualité suffisante pour permettre une telle interprétation, sauf pour des pathologies graves soumises à déclaration, telles que la typhoïde ou le choléra pour lesquelles le système français semble suffisant (Pinot et al., 1988).

Malgré certaines initiatives, dont celle d'IFREMER, l'organisation et le financement de recherches sur les relations entre les quantités de germes tests et les risques épidémiologiques n'ont pas encore abouti.

Une étude récente a été menée dans l'Etat de Virginie (E.U.), avec des consommateurs, par les services de la N.O.A.A. (National Oceanic and Atmospheric Administration) et l'E.P.A. (Environmental Protection Agency), sur deux groupes de volontaires (White, 1989):

- 521 personnes ont consommé des huîtres provenant d'une zone reconnue salubre mais en limite de zone insalubre dans la James River.
- 545 personnes ont consommé des huîtres provenant d'une zone parfaitement saine à l'abri de toute pollution dans le Rappahannock River.
- 327 personnes ont constitué un groupe de témoins non-consommateurs d'huîtres.

Les 1393 personnes furent rigoureusement suivies pendant la semaine postérieure à l'ingestion et soumises à un questionnaire, 60 jours après chaque opération. Les malades (diarrhées, nausées, vomissements, douleurs abdominales) furent examinés par un médecin. Les observations montrent que les consommateurs d'huîtres crues provenant de la zone de la James River (soumises à des contaminations) sont significativement plus affectés que les témoins non-consommateurs d'huîtres (3 à 4 fois plus de malades), et que les consommateurs d'huîtres de la Rappahannock River, dont le risque d'être affecté reste significativement élevé

(Fig. 1). Les données obtenues lors de cette étude nécessitent un réexamen afin d'étudier la part de l'impact due au facteur "saison".

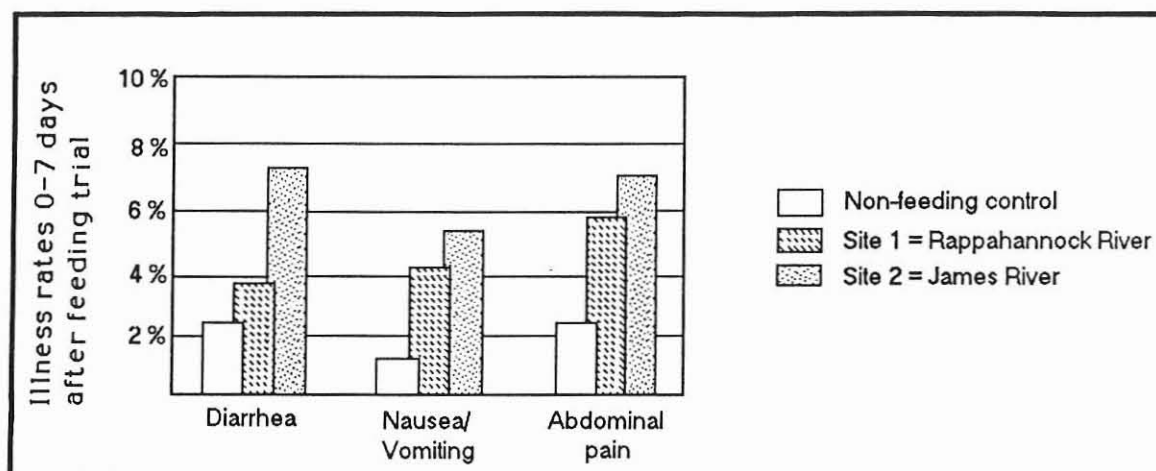


Fig.1: Taux d'affectations après consommation d'huîtres crues (d'après White, 1989)

Cette étude est la preuve que l'on peut entreprendre une telle approche épidémiologique, mais que celle-ci est extrêmement complexe et nécessite la compétence de microbiologistes et de statisticiens chevronnés (Poggi, 1990). De plus les zones conchylicoles considérées doivent être soumises à des contaminations urbaines suffisantes en provenance d'agglomérations de l'ordre de 250 000 habitants ou plus. La seule zone conchylicole française se trouvant proche d'une agglomération de plus de 250 000 habitants est celle de la rade de Toulon (plus de 420 000 habitants). Mais, une telle étude pose un problème d'éthique, et ne serait sans doute pas autorisée en France.

Poggi (1986) signale que l'absence de statistiques françaises fiables, régionales ou nationales, interdit toute approche épidémiologique des risques présentés par la consommation de fruits de mer. Cela est encore vrai aujourd'hui.

3.5 CONCLUSION

Les épidémies de salmonelloses d'origine coquillière certifiée ont régressé, voire même disparu, ces dernières années dans les pays appliquant les normes sanitaires. En France, les salmonelles seraient responsables de moins de 3% des cas recensés lors de toxi-infections alimentaires collectives (T.I.A.C.) en 1989, après consommation de produits de la mer.

Ces dernières années, des cas d'épidémies d'origine virale (hépatites, gastro-entérites à virus Norwalk et apparentés) ont été mis en évidence en Australie, aux U.S.A. et en Grande-Bretagne, à la suite d'ingestion de coquillages, y compris en provenance de zones bactériologiquement salubres ou après traitement en station de purification.

Dans l'état actuel des connaissances le choix des indicateurs de contamination fécale est un problème qui reste entier. Sur le plan bactérien, certains auteurs considèrent que la recherche de *Streptococcus faecalis* est plus significative que celle d'*Escherichia coli* pour estimer la salubrité des coquillages, compte tenu de sa plus grande résistance en milieu marin et d'un temps de survie plus marqué. Sur le plan viral, il n'y a pas actuellement d'indicateur de la présence de virus pathogènes dans les coquillages, et d'autre part les difficultés techniques et les coûts ne permettent pas la recherche de virus pathogènes dans les coquillages. Dans ces domaines les recherches menées n'ont pas encore abouti. L'évolution réelle du pouvoir pathogène des souches virales au contact du milieu marin est peu connue. Il en est de même des doses minimales infectantes pour l'homme.

L'évolution récente des techniques de numération des bactéries a permis le dénombrement direct des cellules viables, dont les cellules stressées évoluant vers un état de dormance. Ces cellules stressées ne sont pas actuellement dénombrées par les techniques de laboratoires utilisées en routine, d'où des résultats par défaut optimistes. De plus ces bactéries conserveraient leur pouvoir pathogène. Cette découverte remet donc en cause la valeur prédictive des normes actuelles de salubrité des eaux conchylicoles et incite à développer les connaissances sur la virulence des bactéries dans le milieu marin.

La définition de normes de salubrité des eaux conchylicoles et des coquillages passe par des études épidémiologiques, c'est-à-dire par la mesure de la fréquence réelle des pathologies liées à l'ingestion des coquillages. Cela suppose également une bonne connaissance de la contamination des zones de production au moyen de méthodes plus précises que celles actuellement en usage. Une étude récente menée aux U.S.A. dans l'Etat de Virginie sur deux groupes de volontaires (au total 1393 personnes), concluant que les personnes ayant consommé des huîtres en provenance d'un secteur en limite de zone salubre/insalubre sont significativement plus affectées que celles du groupe témoin, montre qu'une étude épidémiologique est possible.

Les objectifs de la protection des consommateurs et du maintien de l'activité économique ne seront atteints qu'avec la poursuite de recherches axées à la fois sur l'épidémiologie et la méthodologie. Sur ce plan, la poursuite de la recherche pour la mise en oeuvre de techniques rapides, fiables et bon marché pour augmenter l'efficacité des moyens analytiques existants est indispensable.

DEUXIEME PARTIE : LA METHODOLOGIE

4. BILAN DES ETUDES DES ZONES CONCHYLICOLES

Au nombre de 21 (annexe 5), les études réalisées par les laboratoires côtiers IFREMER/DEL dans le but d'évaluer la qualité sanitaire des eaux conchylicoles sont abordées selon des plans relativement différents entre les laboratoires, et y compris au sein d'un même laboratoire. Deux d'entre elles étudient également la qualité biotique des sites conchylicoles et concernent le littoral du Nord/Pas-de-Calais et picard; deux autres, réalisées en collaboration avec la DDASS de La Manche, présentent la qualité sanitaire des eaux de baignade et des eaux conchylicoles.

Un certain nombre d'études, environ un tiers, a été réalisé sous la forme de bilan de résultats acquis lors de la surveillance de secteurs critiques soumis à des contaminations régulières, dans le but de fournir des arguments motivés face aux professionnels et aux administrations, et d'éviter l'exploitation des données brutes par des organismes extérieurs. Quelques-unes avaient pour but de mesurer la salubrité de gisements naturels à la suite d'améliorations réalisées sur les réseaux d'assainissement, d'affiner le choix de la répartition des stations de prélèvements du réseau bactériologique (REMI), ou de faire le bilan d'une année de fonctionnement de ce réseau.

Les différents rapports d'étude sont analysés au moyen de 3 grilles d'analyses, présentées sous forme de tableaux, en prenant pour modèle une étude approfondie "type" comprenant l'examen des références et des normes, les aspects environnementaux ayant une influence sur la contamination du milieu, la production conchylicole, le plan d'échantillonnage et d'analyses des données, le traitement statistique et la discussion des résultats. Cette manière d'opérer est relativement sévère dans la mesure où la plupart des études avait un objectif moins ambitieux, et certaines un objectif en partie différent.

Avant d'analyser les différentes études, il est bon de rappeler le rôle et les objectifs d'IFREMER dans ce domaine particulier. Concernant la salubrité des eaux conchylicoles et des coquillages, l'IFREMER intervient comme conseiller scientifique auprès des administrations afin de proposer, le cas échéant, les solutions techniques nécessaires en vue de garantir la qualité des produits destinés à la consommation, et de rechercher les causes de contamination. La meilleure façon de garantir la salubrité des coquillages consiste à agir sur les sources de contamination, et donc, en premier lieu, de les mettre en évidence (Miossec, 1990). D'où la nécessité de développer des programmes d'études approfondies, y compris ceux concernant la qualité bactériologique des eaux conchylicoles, dont les objectifs seront de déceler les causes des pollutions et de déboucher sur des propositions concrètes dans l'aménagement des zones littorales et l'amélioration de l'assainissement.

4.1 REFERENCES ET ENVIRONNEMENT ETUDIE

La plupart des études sanitaires (16) font référence à l'arrêté du 12 octobre 1976 (Tab. 7), notamment pour exprimer la salubrité du secteur étudié, puis à la directive CEE de 1979 (4). Une seule fait le bilan d'une année de suivi du réseau bactériologique d'IFREMER (REMI), mis en place en 1989 dans sa version définitive.

L'environnement des zones conchylicoles, au sens large, est abordé dans plus de la moitié des cas (bassin versant: 7 fois, types de pollution: 11 fois, courantologie: 3 fois, production: 11 fois), 7 se contentant de présenter, pour l'essentiel, les résultats bruts et de donner une brève conclusion sur le niveau de salubrité. Généralement, l'étude des différents facteurs de l'environnement, y compris les sources de pollution et l'influence des courants marins, reste trop superficielle, excepté dans l'un des rapports.

Ce bref aperçu montre que les études réalisées ne peuvent répondre à une partie essentielle des objectifs d'IFREMER, notamment ceux concernant la compréhension des phénomènes de pollution et des propositions concrètes pour un meilleur aménagement du littoral.

4.2 ECHANTILLONNAGE ET RESULTATS DISCUTES

L'examen des différents plans d'échantillonnage montre qu'un seul est de nature probabiliste, 15 sont de type non probabiliste, c'est-à-dire ne comportant pas la description d'une méthode aléatoire d'implantation des stations de prélèvements (Tab. 8).

Quelques études (5) sont considérées comme n'ayant pas de plan d'échantillonnage, car elles portent sur un certain nombre de stations de prélèvements (une par secteur) réparties sur un linéaire de côte parfois très important (un ou deux départements), sans choix particulier. Le principal intérêt de ces études est de mettre en évidence l'existence d'éventuels pics de contamination, et par là, de déceler si le secteur concerné est soumis à des contaminations importantes ou non, qui, suivant le cas, nécessiteront une étude approfondie.

Les principaux résultats discutés concernent la variabilité saisonnière des niveaux de contamination bactériologique (9 fois), leur répartition spatiale (7 fois), et les corrélations avec les facteurs météorologiques (6 fois). La présentation des résultats sous forme de diagrammes de classes de contamination suffit généralement à montrer les contaminations significatives entre les saisons ou les stations de prélèvements. Par contre, la mise en évidence des corrélations avec les facteurs météorologiques nécessitent l'utilisation de tests statistiques.

Peu de rapports ont fait l'objet d'un traitement statistique approfondi des données, qui est cependant abordé dans 8 d'entre eux, essentiellement au moyen de l'analyse de variance paramétrique.

ETUDE DE SALUBRITE	REFERENCES ET NORMES			ENVIRONNEMENT DE L'ETUDE			
	ARRETE 1976	DIRECTIVE CEE 1979	RESEAU IFREMER	BASSIN VERSANT	TYPES DE POLLUTION	COURANTOLOGIE	PRODUCTION
N°1		X					
N°2		X					
N°3	X						X
N°4	X				X		
N°5	X			X	X		
N°6		X					
N°7	X				X		
N°8	X						X
N°9			X	X	X		X
N°10	X						X
N°11	X				X		X
N°12	X			X	X	X	X
N°13	X				X		X
N°14	X			X	X	X	X
N°15	X			X	X		X
N°16		X					
N°17	X			X	X		X
N°18	X						
N°19	X						
N°20	X						
N°21	X			X	X	X	X
TOTAL	16	4	1	7	11	3	11

Tab. 7 : Grille d'analyse "Références-Environnement" des études de salubrité des laboratoires côtiers IFREMER/DEL

ETUDE DE SALUBRITÉ	PLAN D'ECHANTILLONNAGE		PLAN D'ANALYSE DES DONNEES	TRAITEMENT STATISTIQUE	RESULTATS DISCUTES		
	PROBABILISTE	AUTRE			REPARTITION SPATIALE	CORRELATION PLUVIOMETRIE	VARIATION SAISONNIERE
N°1							
N°2							
N°3		X		X	X	X	
N°4						X	
N°5							
N°6							
N°7		X				X	X
N°8		X					
N°9		X					
N°10		X					
N°11		X		X	X		X
N°12		X		X	X	X	X
N°13		X		X	X		X
N°14		X		X	X		X
N°15		X		X	X		X
N°16		X					X
N°17		X		X			X
N°18		X					
N°19		X					
N°20		X					
N°21	X		X	X	X	X	X
TOTAL	1	15	1	8	7	5	9

Tab. 8 : Grille d'analyse "Echantillonnage-Résultats discutés" des études de salubrité des laboratoires côtiers IFREMER/DEL.

4.3 DONNEES BRUTES ET TRAITEMENTS STATISTIQUES

4.3.1 LES DONNEES BRUTES

L'examen des caractéristiques des données brutes (tab. 9) montre de grandes différences dans l'approche des études qui comportent un traitement statistique. Leur durée varie d'un an à deux ans le plus souvent, 3 ans pour deux d'entre elles. Le nombre de séries de prélèvements (de 12 à 38) et la périodicité (de 2 fois par mois environ, à un pas de temps de 1, 2, 3, exceptionnellement 4 ou 5 mois) varie essentiellement en fonction de la norme de référence (arrêté du 12 octobre 1976 ou directive CEE de 1979), qui préconise soit 26 prélèvements échantillonnés sur 12 mois, soit un échantillonnage trimestriel, au minimum. Plusieurs études ont, tout d'abord, adopté un pas de temps irrégulier, sans véritable justification, allant de 2 à 3 mois généralement, puis ont été reprises avec un pas de temps mensuel ou bimensuel.

Plusieurs espèces de coquillages sont parfois utilisées, y compris à la même station de prélèvements, les résultats étant traités globalement comme s'il s'agissait d'une même espèce. Des données sont manquantes, parfois en assez grand nombre, dans 5 des 7 études concernées. Ceci peut être lié à l'insuffisance de la prise en compte des contraintes de prélèvements lors des marées de faible amplitude. Cette hétérogénéité dans la collecte des données est particulièrement gênante lors du traitement statistique des données car aucune conclusion ne peut être tirée à l'issue des tests.

CARACTERISTIQUES DES DONNES BRUTES								
ETUDE DE SALUBRITE	N°3	N°11	N°12	N°13	N°14	N°15	N°17	N°21
DUREE DE L'ETUDE EN MOIS	12	35	33	26	16	27	12	12
NOMBRE DE SERIES DE PRELEVEMENT	26	16	26	18	13	21	12	26
NOMBRE DE STATIONS	7	5	7	5	8	10	4	11
PERIODICITE	4 à 19 jours	1,2,3,4,5, mois	4 à 18 jours	1 ou 2 mois	1 ou 2 mois	1, 2 ou 5 mois	1 mois	7 à 28 jours
COQUILLAGES	coques	moules	huîtres	huîtres moules	huîtres moules coques	moules donax	huîtres	coques
DONNEES MANQUANTES	non	oui	oui	oui	oui	oui	non	non
ANALYSES DE VARIANCE								
STATIONS		X	X	X	X	X	X	
SAISONS		X	X	X	X	X	X	
MOIS			X					
ANNEES		X						
ESPECES DE COQUILLAGES					X			
TYPE DE TRAITEMENT STATION D'EPURATION				X				

Tab. 9 : Données brutes et analyses de variances pratiquées dans les études de salubrité des laboratoires côtiers IFREMER/DEL.

4.3.2 LES TRAITEMENTS STATISTIQUES

L'examen du tableau 8 montre qu'un traitement statistique a été effectué sur des données recueillies alors qu'initialement le plan d'échantillonnage ne prévoyait pas un tel traitement, excepté dans l'un des cas. Ceci ne va pas sans poser de nombreux problèmes dans le traitement et l'analyse des données. Afin de les réduire au maximum, l'expérimentateur doit d'abord organiser l'étude, puis analyser et interpréter les résultats (Schwartz, 1963). L'interprétation des résultats est absolument conditionnée par l'organisation de l'expérience, c'est-à-dire, concernant une étude de zone, par la stratégie d'échantillonnage adoptée. Ces différents sujets feront l'objet du chapitre 7.

Si le statisticien n'a pas été consulté suffisamment tôt, l'on s'expose à recueillir des données inutilisables à la suite de fautes de raisonnement dans la conduite de l'expérience. Des exemples concrets pris dans les études sanitaires des eaux conchylicoles permettent d'illustrer des erreurs fréquemment commises, dans une telle situation, et relatées par Schwartz (1963):

a – Erreur dans l'organisation de l'expérience: une répartition spatiale et temporelle insuffisante ne permet pas de mettre en évidence des mesures satisfaisantes de l'impact et de l'évolution des flux de pollution. L'interprétation statistique est dépendante de la stratégie d'échantillonnage initialement définie, et notamment de la répartition aléatoire, ou selon un plan équivalent, des stations de prélèvements.

b – Erreur dans l'analyse et l'interprétation des données: la mesure de la salubrité d'une zone d'élevage en fonction des saisons, par exemple, ne peut se faire qu'en comparant des mesures concernant une espèce donnée de coquillages, à moins que les résultats obtenus ne diffèrent pas de manière significative suivant les coquillages, mais ceci doit être vérifié dans la zone considérée. L'interprétation causale nécessite la constitution de groupes comparables. Les erreurs d'interprétation sont d'autant plus graves qu'elles font suite à une organisation plus méthodique de l'enquête, et à un test de signification plus élaboré, s'abritant ainsi derrière une apparence de garantie statistique.

Underwood (1981) a examiné les analyses de variance décrites dans un ensemble de publications concernant des sujets très divers de l'écologie marine (Tab. 10), puis les a classé en fonction des types d'erreurs rencontrés. Un petit nombre d'articles (8), n'a pu être analysé, faute d'informations suffisantes sur la nature de l'analyse de variance utilisée. Certains articles présentaient plusieurs analyses de variance, soit en tout 314 pour 143 publications étudiées, dont seulement 18 étaient corrects (12 %), ainsi que 13 autres au bénéfice du doute (9%), car les hypothèses de l'homogénéité de la variance avaient peut-être été ignorées. La proportion d'analyses complètes, décrites et interprétées correctement, au regard des hypothèses et des modèles examinés dans ces publications est faible. Underwood conclut que l'analyse de variance est très largement utilisée en biologie marine et en recherche écologique mais que les erreurs sont fréquentes, et cite d'autres auteurs qui ont fait la même constatation.

TITRE	VOLUMES	Nb ARTICLES
Biological Bulletin, Marine Biological Laboratory, Woods Hole	136-154	25
Ecological Monographs	39-48	8
Ecology	50-59	12
Journal of experimental marine Biology and Ecology	1-35	42
Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom	49-58	14
Marine Biology	2-49	39
Oecologia (Berlin)	3-37	11
TOTAL		151

Tab. 10 : Liste des publications utilisée pour la critique des analyses de variance (Underwood, 1981).

Les conditions d'application de l'analyse de variance utilisée pour la comparaison des moyennes des résultats des dénombrements des bactéries (NPP), obtenues lors de l'échantillonnage des stations de prélèvements sont:

- la mesure d'une variable continue,
- l'indépendance des observations,
- la normalité de la variable mesurée pour chaque modalité des facteurs étudiés et l'homogénéité des variances.

L'approximation normale de la loi de probabilité parente de la distribution de la moyenne des mesures de densité bactérienne à la normalité, est d'autant meilleure que le nombre de mesures est grand et que la loi de probabilité est proche de la normale.

Ces conditions ne peuvent donc être respectées puisque la méthode indirecte utilisée pour le dénombrement des bactéries ne donne que des mesures discontinues.

Les 6 études sanitaires des laboratoires côtiers d'IFREMER utilisant l'analyse des variances pour le traitement des données obtenues à partir d'un plan d'échantillonnage non aléatoire, conduisent aux mêmes types d'erreurs:

- a- Le choix de l'analyse de variance ne respecte pas les conditions d'application, car la normalité des données après transformation logarithmique n'est pas vérifiée.
- b- Le regroupement des données, de deux ou trois ans, réalisées dans 5 études sur 6, avec des nombres d'analyses inférieurs à 30 et inégaux (12 fois sur 14), revient à faire des comparaisons de moyennes sur des groupes non comparables. Cette erreur est également faite dans deux études qui utilisent, dans l'une des espèces différentes de coquillages, comme si les résultats obtenus étaient identiques, et dans l'autre, des données, mesurées lors de saisons et d'années différentes en fonction de types de traitement d'une station d'épuration, comme si les flux de pollution étaient homogènes. De plus les effectifs des analyses (de 10 à 69 ou de 22 à 34) sont très différents dans chaque cas.

Les auteurs de ces études ont utilisé l'analyse de variance en se basant sur le fait qu'en biologie les grandeurs mesurables étudiées (taille, poids, taux d'urée sanguine, etc.) sont généralement réparties dans la population selon des lois pas trop éloignées de la normalité (Schwartz, 1963). Dans ces conditions, la moyenne de n valeurs suit très correctement la loi normale quand n n'est pas très grand. Si les données brutes ne sont pas suffisamment proches de la normalité une transformation des mesures peut permettre de s'en approcher si n est proche de 30. Or dans le cas présent il ne s'agit pas de mesures directes continues faites avec précision, mais de mesures discontinues (Nombre le Plus Probable).

Deux études des laboratoires côtiers ont utilisé des méthodes descriptives pour mettre en évidence des regroupements entre les stations de prélèvements ou des corrélations avec les paramètres météorologiques.

Le plan d'échantillonnage de la première étude est constitué de 7 stations de prélèvements réparties sur 2 radiales (5 + 2 stations). La classification hiérarchique en arbre ou dendrogramme permet de décrire de manière satisfaisante les regroupements de stations. La seconde méthode utilisée, c'est-à-dire une matrice de corrélation totale pour le traitement des variables de contamination (coliformes et streptocoques fécaux) et des paramètres météorologiques (pluviométrie, vitesse du vent, pression atmosphérique), ainsi que les coefficients de marée, souffre de l'insuffisance de la résolution spatiale.

La seconde étude utilise un plan d'échantillonnage systématique répartissant 11 stations de prélèvements sur l'ensemble du gisement naturel. Les données recueillies (26 dates x 11 stations = 286 observations) sont traitées au moyen de 2 méthodes descriptives et d'un test non paramétrique:

1- La classification hiérarchique ascendante a montré 4 regroupements de 2 stations voisines, deux autres, les plus polluées, étant isolées. L'étude de la courantologie et l'observation des sédiments ont, ensuite, donné l'explication de ces résultats.

2- L'analyse factorielle des correspondances fournit une représentation synthétique sous la forme d'un tableau de contingence de la variable indicatrice (colimétrie) et des variables météorologiques descriptives (pluviométrie, vitesse et force du vent). Malgré le petit nombre de classes de données, le traitement réalisé pour deux stations, situées à proximité de l'étier responsable des flux de pollution, indique que les fortes contaminations sont concomitantes aux forts vents de sud-ouest ainsi qu'aux précipitations importantes.

3- Le test de Friedman décrivant l'homogénéité spatiale, qui est l'équivalent non paramétrique de l'analyse de variance à deux facteurs croisés, s'est révélé non significatif.

Dans cette étude, les deux premiers chapitres, qui fournissent une bonne description de la zone étudiée, et notamment des informations indispensables sur l'origine des pollutions et les facteurs déterminant leur devenir (marée, vents et courants associés), permettent de tirer le meilleur parti des méthodes de traitement utilisées.

4.4 CONCLUSIONS

La publication, sous forme de rapports de laboratoires ou de rapports internes, des études de salubrité est récente. A l'origine les études sanitaires des zones conchylicoles avaient pour principal objectif de définir leur état de salubrité en vue de proposer aux Affaires Maritimes les solutions techniques nécessaires pour garantir les produits destinés à la consommation. Depuis deux ou trois ans, elles s'orientent de plus en plus vers la recherche des causes de pollution, et donc la prise en compte des bassins versants, afin d'agir sur les sources de contamination et de déboucher sur des propositions d'améliorations de l'assainissement dans l'aménagement des zones littorales. Cependant un grand nombre d'entre elles ne permet que de répondre à l'objectif de santé publique.

D'autre part, les études sont réalisées selon des plans relativement différents, avec une très grande hétérogénéité dans la récolte d'informations, concernant l'origine des pollutions et les facteurs déterminant leur devenir, et dans la récolte des données. Ceci pose de grands problèmes dans le traitement des données.

Peu de rapports ont donc fait l'objet d'un traitement statistique, et la quasi totalité d'entre eux, utilisant l'analyse des variances des moyennes, comporte de nombreuses erreurs, notamment dans l'analyse et l'interprétation des données. Des tests sont effectués sur des groupes de données non comparables, avec des effectifs parfois très différents et souvent trop faibles. Ces erreurs sont dues, en partie, à l'absence d'une réelle stratégie d'échantillonnage, et au fait qu'au départ de l'étude un tel traitement n'était pas envisagé. En biologie marine et en recherche écologique les erreurs dans l'utilisation des tests statistiques sont fréquentes. L'usage de la statistique dans ces domaines est d'ailleurs relativement récente.

Le problème de la représentativité de l'échantillonnage n'est pratiquement jamais posé, ni ce que recouvre la notion d'échantillon dans une zone conchylicole. Un avis fondé sur un plan de sondage non représentatif n'a que peu de valeur, y compris en ce qui concerne l'interprétation des normes de salubrité ou d'insalubrité en fonction de l'arrêté du 12 octobre 1976. Nous avons vu que cet arrêté comporte de nombreuses imperfections.

Il faut retenir, cependant, que le fait de ne pas avoir utilisé un plan probabiliste ne clôt pas toute discussion, ni ne condamne définitivement l'enquêteur (Chevalier, et al., 1988). Deux questions doivent auparavant être posées:

- l'enquêteur peut-il se permettre, en fonction de diverses contraintes pratiques ou financières, de réaliser un échantillonnage probabiliste ?
- le risque de biais attaché au plan non-probabiliste est-il faible ?

La situation est plus ou moins grave selon les réponses données à ces deux questions.

5. STRATEGIE D'ECHANTILLONNAGE

5.1. INTRODUCTION

Très peu de travaux de microbiologie marine ont eu pour but l'étude et la mise en place de stratégies d'échantillonnage. Cette lacune actuelle dans les travaux de bactériologie marine est imputable, au moins en partie, à sa position dans la priorité des choix des études océanographiques (Trousselier, 1989). La plupart des travaux disponibles sont presque exclusivement des études sur les bactéries dans les eaux de mer. Celles concernant les eaux conchylicoles, qui utilise le coquillage comme intégrateur de la contamination des eaux littorales, commencent à peine. Des travaux très récents, à l'IFREMER, abordent les problèmes posés:

- Mazurié (1988) analyse la situation des mesures de surveillance de la salubrité des eaux et des produits conchylicoles et propose plusieurs programmes et stratégies d'échantillonnage en conchyliculture, dont la définition d'une stratégie optimale pour le suivi de la salubrité du littoral.
- Miossec (1990) décrit les différentes étapes qui ont conduit à la mise en place d'un réseau de surveillance (REMI) basé sur un double objectif: connaissance de la contamination bactériologique du milieu marin et protection du consommateur. Les stratégies d'échantillonnage correspondantes y sont exposées.

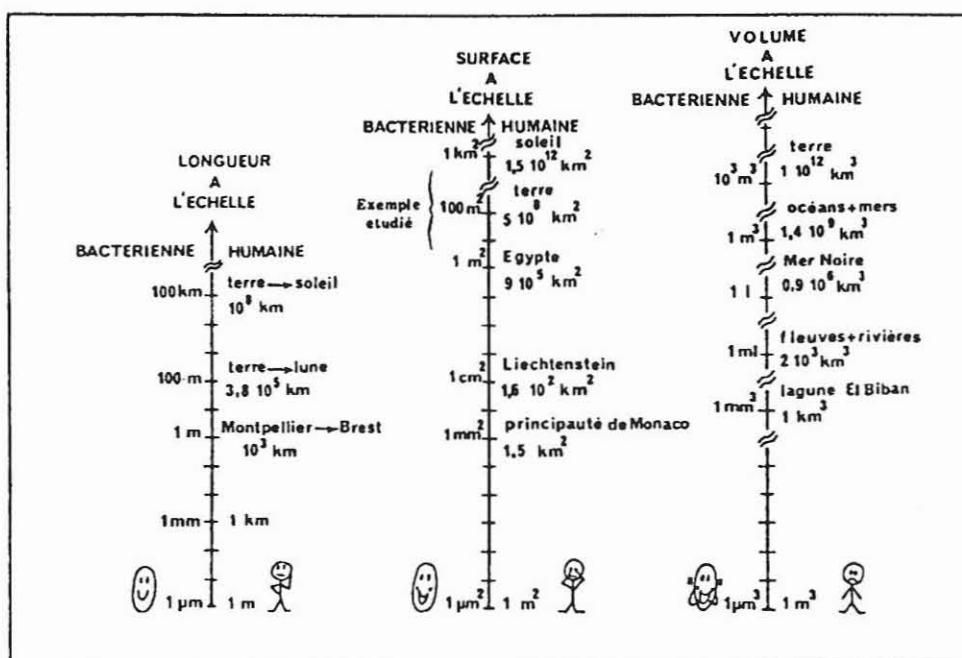


Fig.2: Echelles comparées des longueurs, surfaces, volumes du "monde bactérien" et du "monde humain" d'après Trousselier in GERBAM (1986).

Les données de base en écologie bactérienne du milieu marin, consistent essentiellement en une estimation de la concentration d'une population bactérienne. Malgré ce caractère conceptuel très simple, ce type d'évaluation quantitative se heurte à de nombreuses difficultés souvent ignorées ou rarement prises en compte, dont les principales sont:

a– L'imprécision des mesures de dénombrement en bactériologie. Elle est fonction de la méthode utilisée, mais aussi et surtout de l'hétérogénéité de la distribution des bactéries à l'échelle de la fraction de l'échantillon réellement analysée.

b– Le degré de représentativité de l'échantillon analysé, qui sera fonction de l'hétérogénéité de la distribution des bactéries à l'échelle de la zone étudiée.

c– L'étendue et la diversité des échelles d'observations spatiales et temporelles potentielles dans le domaine de l'écologie bactérienne constituent une autre source de difficultés, dans la résolution de la problématique (Fig. 2).

La mise en place d'un plan d'échantillonnage, aura pour but de résoudre tout ou partie de ces difficultés rencontrées lors des études bactériologiques des zones conchylicoles, en tenant compte à la fois des buts de l'étude envisagée, des contraintes matérielles initiales et de méthodes de traitement de données prévues.

Le processus aboutissant au plan d'échantillonnage est dans l'ordre (Fig. 3):

- la problématique de l'étude: problèmes posés et choix des objectifs.
- Le choix des variables à étudier, des échelles spatio-temporelles, et des méthodes de traitement des données, en tenant compte des contraintes qui y sont liées.
- Le plan d'analyse et d'interprétation des résultats, et simultanément,
- les différentes techniques d'échantillonnage et leur planification.

La panoplie de techniques de sondages disponibles ne peut résoudre tous les problèmes en écologie, mais elle offre certains avantages directs et indirects appréciables. Elle oblige en outre le chercheur à élaborer un protocole d'échantillonnage avant de collecter ses données et l'incite donc à se pencher sur les conditions d'applications et sur la fonction des différents instruments statistiques (Scherrer, 1983).

Avant tout, il est primordial de dresser un état provisoire de la situation, à partir d'observations faites sur place si nécessaire, et de rechercher avec soin toutes les études antérieures, y compris celles décrivant la partie terrestre du littoral (géomorphologie, hydrographie, activités, assainissement, sources de pollution, etc.), puis les eaux littorales (vents, précipitations, courants, activités, etc.).

Un protocole d'échantillonnage est essentiel et indispensable pour définir une stratégie d'échantillonnage et surtout pour l'optimiser. Cette phase de travail permettra en outre de localiser avec précision les limites de la zone étudiée et les stations de prélèvements, de tester l'efficacité du système de prélèvement en temps réel, de mesurer les efforts et les coûts réels de

l'échantillonnage. En cas de nécessité, c'est-à-dire en l'absence d'informations suffisantes sur d'éventuelles variations spatio-temporelles, c'est l'occasion de réaliser un pré-échantillonnage.

Nous allons donc étudier successivement les différentes phases du protocole d'échantillonnage.

Avant d'aborder les techniques de sondages, souvent appelées plans d'échantillonnage, il peut être utile de se familiariser avec la terminologie en usage et le sens précis du vocabulaire utilisé par la plupart des spécialistes (Scherrer, 1983; Frontier, 1983; Trousselier et al., 1989), que l'on trouvera dans l'annexe 6.

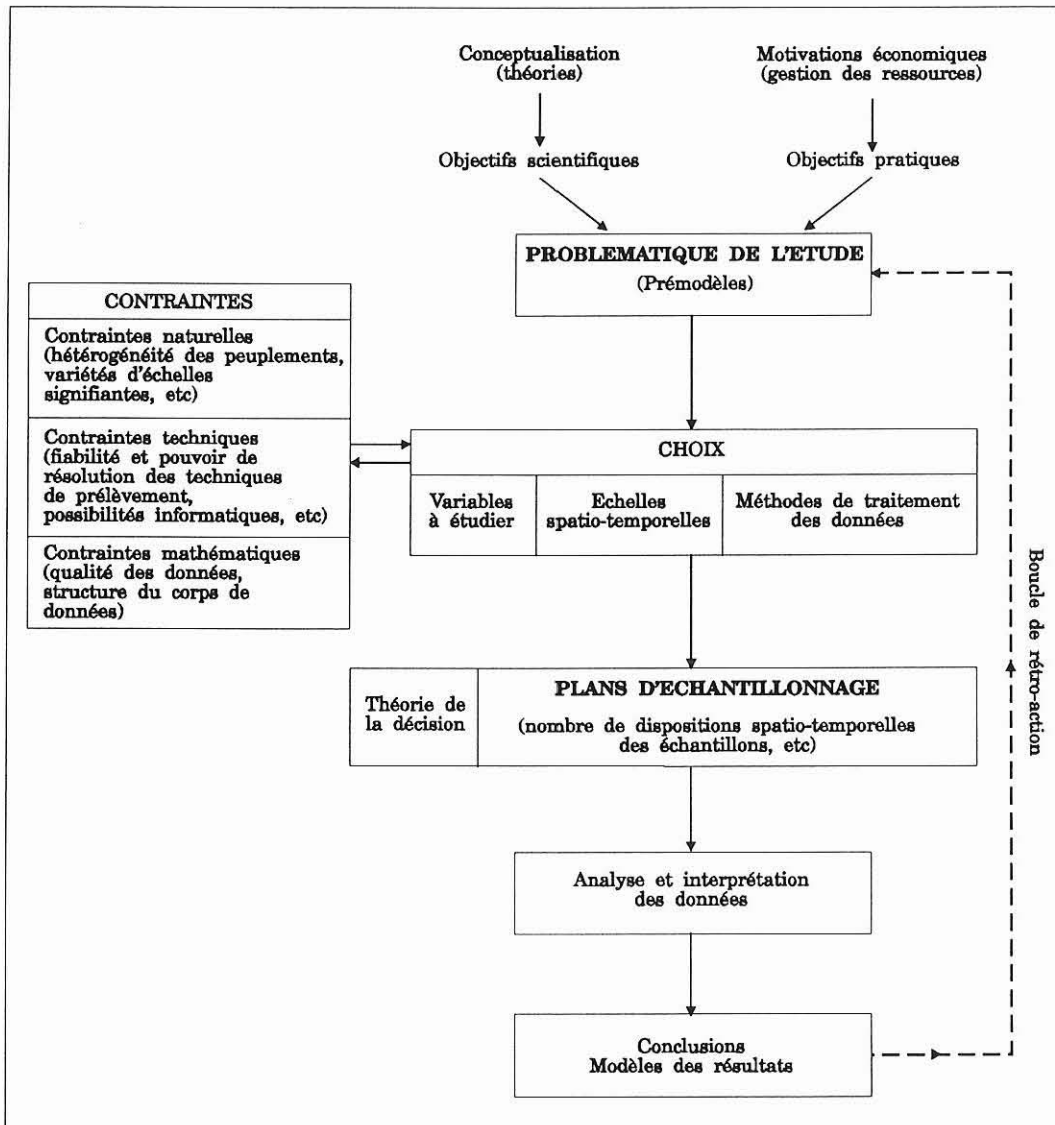


Fig.3: Schéma du processus décisionnel aboutissant au choix d'un plan d'échantillonnage (d'après Frontier, 1983).

5.2 PROBLEMATIQUE DE L'ETUDE

Pour résoudre les problèmes posés, et tenant compte d'un ensemble d'hypothèses et de son intuition, le chercheur établit une problématique qui détermine le plan d'échantillonnage.

Les objectifs d'une étude de salubrité, d'un gisement naturel coquillier, d'un secteur d'élevage ou d'affinage, sont de disposer de données permettant :

- d'une part, d'estimer le niveau de contamination bactériologique pour le classement des zones conchylicoles en fonction des normes en vigueur (objectif santé publique).
- d'autre part, de décrire la répartition spatiale de la contamination, puis de comprendre le fonctionnement du système naturel analysé, c'est-à-dire l'origine des flux de pollution et leur devenir dans le milieu marin (objectif environnemental).

5.3.CHOIX ET CONTRAINTES DE L'ECHANTILLONNAGE

5.3.1 LES VARIABLES

Les germes tests de la contamination fécale, actuellement retenus par les laboratoires IFREMER/DEL pour l'étude des zones conchylicoles et mesurés dans les coquillages, sont des bactéries: les coliformes fécaux et les salmonelles. Dans le premier cas, il s'agit d'un dénombrement et la variable mesurée, ou descripteur quantitatif, est le nombre le plus probable (NPP) de coliformes fécaux dans 100 millilitres de chair de coquillage et de liquide intervalvaire. La recherche des salmonelles est actuellement pratiquée sous une forme qualitative (présence/absence et détermination du sérotype), dans le but d'évaluer la fréquence de leur présence dans le milieu marin.

5.3.2 LES ECHELLES D'OBSERVATIONS

La définition d'une échelle d'observation comporte deux éléments distincts: l'amplitude du domaine échantillonné ou la taille de l'objet analysé, et la densité ou la finesse des observations sur ce domaine (Frontier, 1983). L'appréciation des échelles significatives est généralement laissée à l'intuition du chercheur, qui s'en tient aux échelles auxquelles les phénomènes lui paraissent émerger. Les résultats obtenus dans les études suivantes, concernant les eaux marines et les coquillages, montrent l'intérêt de travailler sur différentes échelles, tant spatiales que temporelles.

Trousselier et al. (1986) dans une étude sur les eaux marines de l'étang de Thau comprenant 3 sources de variabilité spatiale (mesures, prélèvements et stations), donnent un exemple des niveaux de variabilité de la distribution des densités bactériennes. Les résultats de l'analyse de variance hiérarchisée, à partir des dénombrements de bactéries hétérotrophes cultivant sur Marine agar, montrent une variance inter-mesures faible, et une différence entre un niveau supérieur de variations et son niveau inférieur toujours significative, La variance inter-stations étant la plus élevée.

Baleux et al. (1988), dans une étude sur le devenir de la pollution bactérienne introduite par le rejet des eaux usées épurées par lagunage dans l'étang de Thau, complémentaire à la précédente et comprenant le dénombrement des coliformes et des streptocoques fécaux au sein des composantes : eau, sédiments et moules, montrent les résultats suivants:

- l'existence d'un cycle annuel de la contamination des eaux avec de fortes fluctuations temporelles,
- une contamination rapide (48 heures), forte (supérieure à 10^4 C.F./100 ml de broyat) et constante des moules situées près de la source polluante,
- une contamination ponctuelle avec alternance contamination/décontamination si les moules sont éloignées de la source de pollution.

Plusquellec (1984), dans une étude réalisée en baie de Concarneau, dans le but de comparer la contamination de l'eau et des moules d'un même site naturel par le dénombrement des coliformes fécaux et des streptocoques fécaux, montre:

- que les variations journalières sont importantes pour les quatre séries de résultats, avec un certain parallélisme entre les variations dans les eaux et dans les moules, surtout pour les coliformes fécaux,
- que la contamination mesurée dans les bivalves est en relation avec celle de l'eau prélevée au même moment, dans le cas de prélèvements espacés d'au moins 24 heures,
- qu'il n'existe aucune liaison entre la contamination des moules et celle de l'eau prélevée 24 heures plus tôt,
- que la contamination des moules par les coliformes fécaux suit de manière fidèle celle de l'eau au cours d'un cycle de marée de vive eau (coefficient 80). Les prélèvements ont été réalisés entre basse mer moins 3 h 30 et pleine mer plus 0 h 20.

Dans les conditions de l'étude de la baie de Concarneau, le caractère intégrateur des moules concernant la pollution bactériologique, est limité et bien inférieur à 24 heures. Ces résultats témoignent de la variabilité spatio-temporelle de la contamination des bivalves. Ils peuvent varier suivant le type de coquillages et les caractéristiques de la zone étudiée.

5.3.3 LE TRAITEMENT DES DONNEES

5.3.3.1 Place du traitement dans la planification d'une étude

Le plan d'analyse des données doit être établi parallèlement au choix du plan de sondage et de la planification de l'échantillonnage. Car une fois l'échantillonnage réalisé, l'inférence de conclusions *via* l'analyse des données est en bonne partie déterministe, quoique l'expérience et l'intuition du chercheur aient un rôle non négligeable (Legendre et Legendre, 1983). Par rapport à la problématique, le plan d'échantillonnage et le plan d'analyse des données sont des moyens qui permettent d'arriver à des conclusions se rapportant aux questions posées au départ. Ceci situe bien la place du traitement des données dans la planification d'une étude et son importance.

Les premiers résultats mettent parfois en évidence une carence dans le plan d'échantillonnage qu'il est nécessaire de corriger immédiatement aux moyens de mesures complémentaires. Cette perspective conduit à un ensemble d'interactions, notées par une boucle de rétroaction (Fig. 3), reliant l'interprétation des résultats à la problématique initiale de la recherche, la planification de l'échantillonnage et l'analyse des données (Frontier, 1983). L'analyse des données doit donc suivre de près leur collecte afin que les réajustements éventuels puissent être faits sans retard.

5.3.3.2 Optimisation du rendement de l'échantillonnage

Le rendement d'une étude est l'augmentation des informations et/ou de la compréhension du milieu ou des écosystèmes qui résulte de l'effort de la recherche de l'écologiste (Legendre et Legendre, 1983). L'optimisation du rendement d'une étude exige donc que toutes ses composantes soient optimisées, notamment l'échantillonnage et l'analyse des données.

L'optimisation du rendement de l'échantillonnage exige qu'on ne récolte d'échantillons que dans le cas d'un futur plan de traitement. Les données inutiles seront éliminées. Il doit y avoir correspondance entre plan d'échantillonnage, forme des données et leur analyse numérique.

L'optimisation du rendement de l'analyse des données comporte plusieurs aspects complémentaires:

- il est nécessaire de connaître les méthodes d'analyses, leurs conditions d'application et leurs limites,
- la forme des données doit être en relation avec les types d'analyses pratiquées,
- l'accès aisé aux moyens de calcul nécessaires est indispensable. La généralisation des micro-ordinateurs et l'étendue des programmes disponibles permettent de tirer une information maximale des données.

5.3.4 CONTRAINTES LIEES A L'HETEROGENEITE DE LA DISTRIBUTION DES RESULTATS OBTENUS AUX STATIONS DE PRELEVEMENTS

Quels que soient les organismes concernés, il existe en théorie trois modes de répartition spatiale (Trousselier et al., 1989):

- la répartition au hasard ou aléatoire: la position dans l'espace des individus entre eux est indépendante. La distribution des abondances bactériennes suit une loi de Poisson. Le champ d'application de cette loi est le plus souvent limité aux faibles volumes de liquide parfaitement homogénéisés.

- la répartition contagieuse ou agrégative: les individus ont tendance à se grouper entre eux, et une hétérogénéité apparaît dans la répartition des bactéries. La variance des dénombrements de bactéries devient supérieure à leur moyenne. La loi de Poisson n'est plus adaptée et c'est une loi binomiale négative qui décrit le mieux cette distribution. Dans l'environnement, les distributions d'abondances des bactéries apparaissent le plus souvent comme contagieuse, aussi bien dans les eaux douces ou marines que dans les sédiments.

- la répartition régulière: les individus ont tendance à se tenir à égale distance les uns des autres. La variance des dénombrements de bactéries devient significativement inférieure à leur moyenne. La distribution des abondances peut alors être approchée par la loi binomiale positive. Ce type de distribution spatiale est le moins fréquemment rencontré.

Les bivalves, en filtrant les microorganismes présents dans les eaux marines, conservent, du moins en partie, une certaine image de leur répartition dans le milieu marin étudié. L'étude de la microrépartition, des microstructures, est une étape indispensable de l'échantillonnage d'un écosystème.

Il est important de mesurer, dans les coquillages, la part relative de la variance des résultats (NPP) obtenus, due à la variabilité des mesures dans un même broyat et à la variabilité des mesures entre prélèvements à la même station. Ces variances, considérées comme étant des erreurs, gommant des différences dans l'expression des niveaux de contamination entre stations. Toute enquête approfondie doit donc commencer par un bilan des différentes sources de variabilité, aux différentes échelles de perception: la planification ultérieure de l'échantillonnage en fonction des structures de la zone étudiée l'impose (Frontier, 1983).

5.3.5 DIFFERENTES CONTRAINTES TECHNIQUES

ZONE ETUDIEE

Les zones conchylicoles ont des différences géomorphologiques et dimensionnelles très importantes, et chacune est un cas particulier. Certaines sont soumises au régime des marées (littoral de l'Atlantique et de la Manche) et d'autres non (littoral de la Méditerranée). Elles peuvent être mixtes (estran découvrant et marais) et comporter plusieurs espèces de coquillages et différents modes de culture. Contrairement aux concessions sur le domaine public maritime et au domaine terrestre, les gisements non-découvrants sont difficiles à délimiter et à échantillonner. Les conditions climatiques peuvent perturber le plan d'échantillonnage en

rendant la zone moins accessible, d'autant plus en fonction de faibles coefficients de marée : tempête en mer, visibilité, vent contrariant la baisse des eaux, marais boueux, etc.

CHOIX DU COQUILLAGE ET MODE DE CULTURE

En secteur conchylicole concédé il est fréquent de rencontrer plusieurs types d'élevage et de mode de culture, associés à un ou plusieurs gisements naturels. Le niveau de contamination des coquillages peut être différent suivant l'espèce et le mode de culture.

L'exploitation d'une zone concédée ou d'un gisement naturel ou des mortalités naturelles peuvent modifier le plan de prélèvements. A l'inverse, dans une zone peu ou pas exploitée un stock suffisant de coquillages devra être déposé à chaque station en temps voulu.

TECHNIQUE DE PRELEVEMENT

Celle-ci ne pose pas de problème particulier en zone découvrante, par contre dans un étier ou en eau profonde il n'en va pas de même. L'usage de techniques de prélèvement de sédiments, nécessitant des moyens nautiques, est indispensable en eau profonde. Mais l'étude de la variabilité spatiale à la station peut se révéler difficile. Cela est également vrai dans un étier, car le fait de ramener la poche plastique sur la berge mélange les coquillages.

L'itinéraire de prélèvement crée une liaison entre l'espace et le temps ; le trajet correspond à une radiale dans l'espace-temps et non dans l'espace seul (Frontier, 1983). Cette notion peut avoir plus ou moins d'importance en fonction de la durée du trajet, ou de la modification du trajet, et de la zone étudiée. Différents itinéraires possibles seront définis, puis l'un sera tiré au sort avant chaque série de prélèvements, ou programmer systématiquement en début de campagne. Dans le cas contraire une erreur systématique est commise.

TECHNIQUE ANALYTIQUE ET POUVOIR DE RESOLUTION

La densité des observations spatiale et temporelle (nombre de stations et de séries de prélèvements à différentes échelles) déterminera le pouvoir de résolution du plan d'échantillonnage et le niveau de perfection du modèle qui en découlera.

Le pouvoir de résolution sera limité, en premier lieu, par la capacité en analyse du laboratoire en fonction de la technique utilisée et de l'effectif du personnel. L'usage de la méthode de dilution des séries de tubes nécessite quatre jours pour obtenir des résultats. Elle ne permet pas, excepté en cas de mise à disposition de moyens importants, des mesures journalières, parfois rendues nécessaires. Pour les mêmes raisons, elle ne permet pas un grand nombre d'analyses, ce qui limite le nombre de stations de prélèvements, la plupart du temps.

L'analyseur Malthus permet un grand nombre d'analyses journalières et donc de proposer différentes études en fonction du pouvoir de résolution recherché.

BUREAUTIQUE

Les moyens disponibles sur le marché ne sont pas un facteur limitant, notamment pour les logiciels de traitement de données. Cependant, afin d'optimiser le rendement des études, les possibilités de traitement et d'analyses des données des laboratoires d'IFREMER doivent suivre les progrès réalisés en amont.

5.3.6 CONTRAINTES LIEES AU TRAITEMENT DES DONNEES

La presque totalité des variables échantillonnées en océanographie présentent une forte hétérogénéité dans leur répartition spatio-temporelle, laquelle est une conséquence de l'hétérogénéité spatio-temporelle des apports énergétiques dans le milieu marin (Legendre et Legendre, 1990). La structuration spatio-temporelle du milieu physique conduit à une organisation, tant spatiale que temporelle, des être vivants ainsi que des processus biologiques. Même en dehors des zones d'interfaces, qui comme les marais et les zones littorales, sont le siège d'une intense activité biologique, on observe souvent une répartition spatiale contagieuse des organismes marins. Il s'ensuit que la plupart, sinon la totalité, des variables océanographiques montrent une forte autocorrélation spatio-temporelle, c'est-à-dire qu'une valeur mesurée en un point et/ou à un moment donné permet de prévoir approximativement les valeurs de la même variable en d'autres points de l'espace et/ou du temps, la forme de la fonction d'autocorrélation étant connue (par exemple un gradient).

Les phénomènes naturels étudiés en océanographie ne sont donc pas *a priori* répartis de façon aléatoire dans l'espace temps. Cette particularité a son importance pour le traitement des données, car quelle que soit la stratégie d'échantillonnage retenue, l'hypothèse d'indépendance des observations, base de l'utilisation des tests statistiques classiques, n'est donc plus respectée (Legendre et Legendre, 1990). Avant d'échantillonner, il faut savoir ce que l'on va faire des données et dans quel but on les récolte. Il est donc essentiel de se pencher sur les problèmes de traitement et d'analyse des données, en fonction de leurs caractéristiques.

5.3.6.1 Précisions des données et traitements

Les dénombrements bactériens (NPP) sont des mesures imprécises, qui n'imposent pas de contraintes particulières concernant la précision pour le traitement mathématique des données. Il existe des méthodes adaptées au niveau de précision dont on dispose.

D'une manière générale, une augmentation de la précision des données exige une augmentation proportionnellement plus grande de l'effort d'échantillonnage. La relation exacte entre la précision et l'effort d'échantillonnage est difficile à établir. Une autre façon d'aborder le problème repose sur le nombre de prélèvements et de stations de prélèvements nécessaires pour décrire une structure hétérogène (Legendre et Legendre, 1983). Dans le cas hypothétique où cette structure spatiale ou temporelle serait connue à l'avance, un seul prélèvement suffirait par domaine homogène. Dans la pratique, il faut un nombre plus élevé que ce minimum. Le rendement d'une étude, par rapport à la précision des mesures, sera souvent supérieur si l'on dispose d'un grand nombre de données, même peu précises, surtout lorsque la zone étudiée est hétérogène.

L'engouement pour les données d'un niveau de précision élevé, traitées au moyen de statistiques paramétriques, s'estompe maintenant qu'il est démontré que des analyses, fussent-elles d'un haut niveau de complexité, peuvent très bien ne mettre en évidence qu'une structure d'artéfact (Legendre et Legendre, 1983). Il est nécessaire de recourir aux tests non-paramétriques dans tous les cas où les données quantitatives ne respectent pas les conditions d'application très restrictives de la statistique paramétrique. Différents tests permettent de vérifier la normalité et l'homogénéité des variances des groupes de données, conditions nécessaires à l'utilisation des tests paramétriques.

Les données quantitatives ne peuvent être soumises aux tests paramétriques que si elles satisfont à des critères précis, qui ne sont pas réalisés pour le descripteur NPP, même après une transformation normalisant les données. La majorité des méthodes pour descripteurs quantitatifs ont leurs équivalents semi-quantitatifs ou qualitatifs, lesquelles permettent dans la plupart des cas d'obtenir des résultats analogues. C'est la raison pour laquelle l'analyse de variance n'est qu'exceptionnellement employée en écologie, notamment pour des problèmes de sous-échantillonnage (Frontier, 1983). Dans ce cas il s'agit d'une analyse de variance hiérarchisée, destinée à estimer les différentes parties de la variance globale.

5.4 THEORIE ET PLANIFICATION DE L'ECHANTILLONNAGE

5.4.1 CHOIX DES PLANS DE SONDRAGE

5.4.1.1 Echantillonnage Aleatoire Simple (E.A.S.)

DEFINITION

L'échantillonnage aléatoire simple est une méthode qui consiste à prélever, ou à localiser, au hasard et de façon indépendante n unités d'échantillonnage d'une population de N éléments. Ainsi, chaque élément de la population possède la même probabilité de faire partie d'un échantillon de n unités et chacun des échantillons possibles de tailles n , possède la même probabilité d'être constitué (Scherrer, 1983).

Un échantillonnage est représentatif d'une strate donnée s'il donne des estimations non biaisées des paramètres de distribution des descripteurs.

SELECTION DES UNITES D'ECHANTILLONNAGE

Il est difficile en écologie d'effectuer un échantillonnage aléatoire simple qui se conforme scrupuleusement à la définition. Les conditions suivantes doivent être respectées pour qu'aucun biais ne soit introduit dans l'estimation ultérieure des paramètres statistiques de l'échantillon:

- délimiter la strate échantillonnée,
- dresser la liste complète et sans répétition des n unités, ou n stations, d'échantillonnage accessibles,
- les numéroter de 1 à n ,

- procéder, à l'aide d'une table de nombres aléatoires, au tirage au sort de n unités différentes,
- prélever des échantillons de même taille.

INTERETS ET INCONVENIENTS DU PLAN

Les principaux avantages de ce plan sont les suivants:

- a- Il est le seul qui permette l'utilisation immédiate de la plupart des analyses statistiques (tests d'hypothèse paramétriques ou non-paramétriques, les techniques multidimensionnelles). Les estimateurs ne sont pas biaisés, mis à part les quotients, et leur calcul s'avère facile, la majorité des banques de programmes informatiques se prêtant à ce plan. De plus les différentes estimations peuvent être directement calculées à partir des données recueillies sur l'échantillon.
- b- Il peut échantillonner plusieurs échelles de variabilité, mais sans que l'on puisse déterminer *a priori* lesquelles.
- c- Il ne nécessite pas d'information préalable, notamment sur la structure et le comportement de la population.

Un tel plan d'échantillonnage pose plus de problèmes qu'il n'y paraît dans le cas d'une étude de salubrité:

- Il n'utilise pas les informations existantes et donc son efficacité s'avère très médiocre.
- Il n'est pas approprié à l'étude de phénomènes stratifiés ou présentant une structure linéaire, ou auto-corrélés. Un échantillonnage régulier sur une région présentant une contagion spatiale n'équivaut pas à un échantillonnage aléatoire simple car les résultats des prélèvements successifs ne sont plus indépendants.
- Il est impossible d'établir la liste exhaustive des unités d'échantillonnage ou stations de prélèvements, même en se limitant à celles qui sont accessibles, puisque la répartition des abondances bactériennes est hétérogène dans un milieu qui est lui-même très hétérogène, le plus souvent. La localisation des stations de prélèvements en secteur non-découvrant ou sans marée peut s'avérer très délicate. De plus si la position des stations est aléatoire, il faut aussi pour un E.A.S., que ces stations soient visitées dans un ordre aléatoire et non selon un trajet régulier, qui a pour effet d'introduire une liaison entre l'espace et le temps.

Le plan d'échantillonnage aléatoire simple ne convient donc pas dans le cas d'une étude de salubrité des eaux conchylicoles.

5.4.1.2 Echantillonnage systématique

DEFINITION

L'échantillonnage systématique est une technique qui consiste à tirer au hasard un ⁱ^{ème} élément, situé entre le premier et le pⁱ^{ème} de la population puis à prélever

systématiquement le $(i + p)^{i\text{ème}}$, $(i + 2p)^{i\text{ème}}$, ..., $(i + (n - 1)p)^{i\text{ème}}$ élément de la population. Les rangs des n unités sont ainsi en progression arithmétique dont la base est un nombre aléatoire i et la raison un nombre p calculé de telle sorte que l'échantillon se répartisse uniformément sur toute la population. Contrairement à l'E.A.S., les unités ne sont pas prélevées de façon indépendante puisque le choix du premier élément détermine la composition de tout l'échantillon (Scherrer, 1983).

SELECTION DES UNITES D'ECHANTILLONNAGE

La répartition d'un ensemble d'unités d'échantillonnage ou de stations de prélèvements au sein d'une population linéaire, comme le lit d'un étier ou d'un réseau d'étiers, se réalise très facilement à l'aide de l'échantillonnage systématique. A partir du nombre de stations projeté n et de l'intervalle I de distance à étudier, on définit la période $p = I/n$. Du début de l'intervalle I à la valeur p , un point i , qui servira de base à la progression arithmétique, est alors choisi aléatoirement. Si l'étier principal possède plusieurs ramifications secondaires ou tertiaires, l'intervalle de distance I est la somme de l'ensemble des distances à étudier. Le nombre n de stations de prélèvements devra être suffisant pour permettre d'échantillonner l'ensemble de la zone délimitée par le réseau des étiers et ses ramifications.

La répartition spatiale de stations d'échantillonnage dans un site donné se fera de la même façon en calculant la période $p = \sqrt{\frac{S}{n}}$ et en fixant alléatoirement la base i dans un premier carré de côté égal à p . Tous les autres points sont équidistants.

Il est absolument nécessaire de savoir comment s'agencent les éléments de la population. Les conditions d'application du plan sont les suivantes:

- a- Si les unités sont agencées dans un ordre aléatoire, l'échantillonnage systématique est équivalent à l'échantillonnage aléatoire simple.
- b- Si les éléments de la population apparaissent selon une séquence qui engendrent des variations périodiques du descripteur étudié, l'échantillonnage est moins efficace que l'aléatoire simple. En effet, dès que la période p de prélèvements des unités s'approche de la longueur d'onde des variations du descripteur étudié, ou d'un multiple entier de celui-ci, une importante erreur systématique peut entacher les résultats. Dans ce cas, le choix d'une période p très inférieure à la longueur d'onde des variations ou cycles, dont on veut étudier l'influence, est indispensable.
- c- Les éléments de la population peuvent présenter des phénomènes d'autocorrélation. Les observations y_i et y_j sont alors d'autant plus semblables que les éléments i et j sont proches l'un de l'autre. Dans ce cas, l'échantillonnage systématique est préférable à l'aléatoire simple, car ce plan impose une distance minimale entre les éléments et évite, par conséquent, la collecte d'informations redondantes. La position spatiale de stations d'échantillonnage autocorrélées positivement en quinconce maximise la distance entre les stations de prélèvements.

- d– Un inventaire de tous les éléments de la population doit être possible afin d'en retenir un seul par période p .

INTERETS ET INCONVENIENTS DU PLAN

Les principaux avantages du plan d'échantillonnage systématique sont:

- Il est fortement recommandé pour répartir uniformément dans l'espace et dans le temps des stations d'échantillonnage ponctuelles. Mais il faut tenir compte du choix de la période p , qui doit être égale à celle des cycles dont on désire éliminer l'effet et nettement inférieure à celle des cycles dont on veut étudier l'influence,
- Bien qu'il soit employé et défini par rapport à la conception préalable que l'on peut avoir d'un phénomène, l'échantillonnage systématique reste un mode de sélection "aveugle" comme l'aléatoire simple puisque une fois défini, il peut déboucher sur la sélection d'unités d'échantillonnage ou de stations de recueil peu représentatives d'une partie de la population ou du phénomène à étudier (Trousselier, 1989).
- Il est équivalent à l'aléatoire simple, si les éléments sont distribués dans un ordre aléatoire. Il cumule alors ses propres avantages à ceux de ce dernier concernant le traitement statistique des données recueillies.
- Il est plus efficace que l'aléatoire simple si la population présente des phénomènes d'autocorrélation, car il limite le recueil d'informations redondantes, que ce soit linéaire ou non.

Les principaux inconvénients du plan d'échantillonnage systématique sont les suivants:

- Il impose une énumération de tous les éléments de la population afin d'en retenir un tous les p , ce qui est impossible car le choix des éléments ou des stations d'échantillonnage reste une donnée du problème, même si les informations disponibles pour les études de salubrité permettent d'en retenir l'essentiel,
- Il n'existe pas de méthode fiable permettant d'estimer la variance des estimateurs d'une population à partir d'un seul échantillon. La variance des estimateurs peut être connue quand plusieurs échantillonnages systématiques sont réalisés (Mazurié, 1988). Dans le cas d'une étude de salubrité en zone conchylicole, l'objectif principal est de mettre en évidence un niveau de contamination bactériologique et d'analyser le fonctionnement du système naturel plutôt que d'estimer des paramètres de tendance et de dispersion d'une population, même s'il est indispensable de faire ces mesures. Ce handicap théorique n'est donc pas un réel inconvénient dans le cas présent.

5.4.1.3 Echantillonnage stratifié

DEFINITION

L'échantillonnage stratifié est une technique qui consiste à subdiviser une population hétérogène en sous-populations ou strates plus homogènes, mutuellement exclusives et collectivement exhaustives. La population hétérogène d'effectif N est ainsi découpé en k strates plus homogènes d'effectif N_h de telle sorte que $N = N_1 + N_2 + \dots + N_k$. Un échantillon indépendant est par la suite prélevé au sein de chacune des strates en appliquant un plan d'échantillonnage au choix de l'écologiste (Scherrer, 1983).

SELECTION DES UNITES D'ECHANTILLONNAGE

L'application de l'échantillonnage stratifié soulève deux questions principales: comment construire les strates, et quels efforts et plans d'échantillonnage adopter dans chacune des strates pour obtenir la meilleure efficacité de la stratification ?

CONSTRUCTION DES STRATES

La première étape consiste à choisir un critère de stratification. Le meilleur critère est la variable, appelée "stratificateur", qui réduit la variance intra-strates et augmente, par le fait même, l'homogénéité au sein des strates. Cette variable, quantitative ou qualitative, doit être en corrélation aussi étroite que possible avec le descripteur étudié. En effet, plus la corrélation est étroite, plus le gain de précision apporté par la stratification est élevé. La possibilité de choisir un stratificateur de nature qualitative ouvre la porte à toute une série d'applications du plan car le découpage en strates peut correspondre à des divisions diverses, dont les divisions naturelles (bassin versant primaire ou secondaire, espèces de coquillages, mode d'élevage,...). Ceci est particulièrement intéressant dans le cas qui nous préoccupe.

Les étapes suivantes consistent à fixer le nombre de strates, leurs limites précises, puis à dénombrer les éléments d'échantillonnage de chacune d'elles.

DETERMINATION DE L'EFFECTIF DES ECHANTILLONS

L'effort d'échantillonnage peut varier d'une strate à l'autre, en fonction de leurs caractéristiques (hétérogénéité, dimension, etc.). Trois stratégies sont possibles:

- une allocation proportionnelle, en conservant la même fraction d'échantillonnage dans chaque strate, l'effectif n_h de l'échantillon est directement proportionnel à l'effectif N_h de la strate,
- une allocation optimale, consistant à moduler l'effort d'échantillonnage afin de minimiser le coût total de l'opération pour une précision donnée,
- ou une allocation optimale, consistant à maximiser la précision de l'échantillonnage pour un coût total fixé.

L'effectif n_h d'un échantillon est alors d'autant plus élevé que la variance de la strate est grande, que son effectif N_h est élevé et que le coût unitaire d'échantillonnage d'une strate c_h est faible. Des formules permettent le calcul du nombre d'éléments de la strate h pour un coût total donné ou pour une précision donnée.

CHOIX DU PLAN D'ECHANTILLONNAGE A L'INTERIEUR DES STRATES

L'échantillonnage d'une strate étant totalement indépendant, le choix de plans différents est possible. Mais il est préférable d'éviter les complications afin de ne pas diminuer l'éventail des techniques appropriées d'analyse statistique ou de réduire les possibilités d'utilisation des données brutes à des fins non envisagées initialement. Le choix d'un échantillonnage systématique dans chacune des strates se révèle le plus judicieux.

INTERETS ET INCONVENIENTS

Les conditions d'application du plan sont simples: il suffit, dans le cas d'une variable qualitative, de connaître le nombre des unités d'échantillonnage par strates.

Le plan d'échantillonnage stratifié présente plusieurs avantages:

- il offre une multitude de combinaisons avec les autres plans,
- il permet de tirer profit d'une série de situations particulières, chaque situation s'identifiant à une strate (bassin versant, principal ou secondaire). Il s'impose quand différents plans d'échantillonnage doivent être appliqués dans diverses catégories de la population (plusieurs espèces de coquillages, plusieurs modes d'élevage),
- il constitue une solution avantageuse aux problèmes de variations de l'effort d'échantillonnage, pour des raisons techniques, financières ou autres.
- Ce plan s'impose si l'on désire maximiser la variance d'un descripteur pour étudier la structure d'une population.

Les inconvénients du plan, sont peu nombreux:

- une erreur d'évaluation du poids de la strate W_h ($W_h = N_h/N$) entraîne un biais,
- il faut prêter attention aux principes de construction des tests d'hypothèse car certains d'entre eux ne sont plus directement applicables, et peu de programmes informatiques de traitement statistique sont conçus pour ce plan.

L'inconvénient majeur, qui rend ce plan de sondage impropre à l'étude des zones conchylicoles, est le grand nombre de stations de prélèvements et la durée du trajet nécessaires pour couvrir un secteur composé de plusieurs strates. La notion de taille de l'échantillon est relative. En bactériologie, compte tenu des contraintes opérationnelles actuelles un effectif d'environ 15 stations correspond à un grand échantillon, ce qui n'est, généralement, pas le cas en statistique.

5.4.2 LES ESTIMATEURS

5.4.2.1 Echantillonnage Aleatoire Simple (E.A.S.)

a – La moyenne de l'échantillon ou moyenne empirique

L'effectif n des résultats de l'échantillon est une population finie de caractéristiques :

$$y_1, y_2, \dots, y_{n-1}, y_n.$$

La moyenne arithmétique (ou moyenne empirique) est définie par: $\bar{y} = \sum_{i=1}^n y_i/n$

La croissance bactérienne étant exponentielle, il convient d'utiliser une transformation logarithmique pour calculer les estimateurs

L'estimateur \bar{y} , qui prend une valeur différente pour chaque échantillon, est une variable aléatoire dont la distribution est dite distribution d'échantillonnage.

b – La variance de l'échantillon ou variance empirique

La variance est définie par: $s^2 = \bar{y} = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2/n-1$

La variance est également une variable aléatoire, car elle prend une valeur différente pour chaque échantillon.

Une estimation de la variance de \bar{y} est définie par: $v(\bar{y}) = (N-n)/nN \cdot s^2$

Le facteur $(N-n)/N$ est appelé facteur de correction (pour population finie). Il peut s'écrire $1-n/N = 1-f$, où f représente le taux d'échantillonnage, d'où il vient:

$$v(\bar{y}) = s^2/n \cdot (1-f)$$

Dans le cas d'étude bactériologique, le nombre de stations de prélèvement N est infini et $(1-f)$ peu différent de un, d'où :

$$v(\bar{y}) = \frac{s^2}{n}$$

c – Intervalle de confiance liée à l'estimation d'une moyenne

L'estimateur \bar{y} est une variable aléatoire dont la valeur est fonction des observations incluses dans l'échantillon prélevé et qui dépend de l'ensemble des échantillons possibles de taille n .

Dans la mesure où la loi de distribution de la variable y est connue, on peut déterminer les limites d'un intervalle à l'intérieur duquel on puisse affirmer, avec un risque d'erreur α fixé à l'avance, que la vraie valeur du paramètre est comprise. Ces limites définissent un intervalle aléatoire ou intervalle de confiance qui varie avec chaque échantillon.

Les fonctions définissant les bornes de l'intervalle de confiance sont choisies de façon à ce qu'il y ait une probabilité $1 - \alpha$ (niveau de confiance) de couvrir la vraie valeur, inconnue, μ . En affirmant qu'un tel intervalle comprend le paramètre à estimer, on ne se trompe à la longue que dans $100 \alpha \%$ des cas (Chevalier et al., 1988).

Quand n est suffisamment grand, l'estimateur d'une caractéristique se distribue généralement suivant une loi voisine de la loi normale, même si la loi de distribution des observations ne l'est pas. Cette propriété fondamentale, souvent désignée sous le nom de théorème central limite, autorise l'utilisation de la loi normale et de sa dérivée, la distribution de Student, pour définir un intervalle de confiance de la moyenne correspondant à une probabilité.

Le rapport $t = \frac{\bar{y} - \mu}{s/\sqrt{n}}$ suit une loi de Student, dite loi de Student-Fischer, à $n-1$ degré de liberté.

Il existe des tables de la distribution de Student, ou table de t , qui permettent de déterminer les valeurs de cette distribution.

La probabilité pour que l'intervalle aléatoire recouvre la valeur inconnue μ ou \bar{Y} est égal à $1 - \alpha$. Elle est donnée par la formule:

$$\Pr [\bar{y} - t_{\alpha/2} \sqrt{v(\bar{y})} < \bar{Y} < \bar{y} + t_{\alpha/2} \sqrt{v(\bar{y})}] = 1 - \alpha$$

Si $n > 30$, $t_{\alpha/2}$ est remplacé par $z_{\alpha/2}$ qui obéit à la loi normale.

5.4.2.2 Echantillonnage systématique et stratifié

Dans la mesure où le type de plan de sondage pratiqué pour l'échantillonnage systématique est équivalent à l'E.A.S., les estimateurs sont équivalents à ceux de l'E.A.S. Il en est de même si un échantillonnage systématique est pratiqué au cours d'un échantillonnage stratifié, dans chacune des strates, mais à la condition qu'elles soient traitées séparément. Dans ce cas l'échantillonnage stratifié n'est pas traité en tant que tel.

5.4.3 FONCTION DE COUT

La fonction de coût associée à un échantillonnage correspondant à une strate (Scherrer, 1983) peut s'écrire sous une forme linéaire:

$$C = C_0 + \sum n_h c_h$$

La signification des symboles est la suivante:

C : coût total de l'opération.

C_0 : frais généraux ou frais fixes indépendants de l'effectif n , comprenant: outre certains achats de petits matériels, le coût de la phase de définition du programme d'étude, sa conduite, le traitement et l'interprétation des données acquises.

n_h : nombre de stations échantillonnées.

c_h : coût par station des séries de prélèvements comprenant les coûts d'analyses (tarifs dégressifs inclus) et l'ensemble des coûts de prélèvement.

Dans le cas d'étude de la variabilité inter-mesures (réplicats) ou inter-prélèvements à la même station, la fonction de coût peut s'écrire:

$$C = C_0 + \sum n_h c_h + \sum n_i c_i$$

n_i : nombres d'échantillons analysés.

c_i : coût unitaire d'une analyse de laboratoire (tarif dégressif inclus) inter-mesures ou inter-prélèvements, le prix à payer concerne essentiellement le dépouillement des échantillons en laboratoire.

5.5 ANALYSE ET INTERPRETATION DES DONNEES

Legendre et Legendre (1983) donnent un ensemble de méthodes d'analyse avec les équivalences suivant le niveau de précision des descripteurs. Les descripteurs d'un niveau de précision élevé peuvent être analysés au moyen des méthodes pour données moins précises, ainsi les descripteurs quantitatifs peuvent aussi être traités comme des descripteurs semi-quantitatifs ou qualitatifs. Dans le cas de données mixtes, le choix de la méthode est basé sur le type de données le moins précis.

TESTS DES DIFFERENCES ENTRE GROUPES

Un seul descripteur est échantillonné lors d'une étude bactériologique de zone. Des analyses unidimensionnelles (à une seule variable) permettent de vérifier s'il y a une différence significative entre deux ou plusieurs groupes d'échantillons: tests H de Kruskal- Wallis (semi-quantitatif) ou χ^2 (qualitatif), etc. Les hypothèses d'utilisation de l'analyse de variance paramétrique ne sont pas respectées pour le descripteur NPP (méthode de dilution des tubes).

Lorsque des échantillons quantitatifs se correspondent d'un groupe à l'autre, comme dans les études de zone où les stations sont toutes échantillonnées à plusieurs reprises, on peut diviser la variance en composantes liées aux deux critères de classification (stations et dates d'échantillonnage) et à leur interaction. L'utilisation de cette analyse de variance à deux critères

de classification peut se faire sous réserve que les conditions de normalité et d'homogénéité des variances soient réunies. Un équivalent non-paramétrique pour descripteur semi-quantitatif est le test de Friedman.

Dans le cas de multivariées (descripteur NPP et variables météorologiques) ne correspondant pas aux conditions d'application des tests paramétriques multidimensionnels, de nombreuses méthodes sont disponibles: χ^2 multidimensionnel, tableau de contingence et de correspondance, groupement, ordination. Tous les descripteurs de la multivariée doivent être du même niveau de précision, ou éventuellement recodés au niveau de précision le plus faible.

STRUCTURES DES DONNEES ECOLOGIQUES

Différentes méthodes existent pour mettre en évidence des regroupements de données sur une zone étudiée en fonction d'une ou plusieurs variables.

Les données sont rassemblées dans un tableau dont l'analyse a pour but d'en dégager la structure et de l'interpréter. On entend par structure d'une matrice de données: l'organisation de l'ensemble des descripteurs en gradients dans un continuum, ou encore sous-ensembles, cette organisation étant une caractéristique de la matrice des données et découlant d'elle (Legendre et Legendre, 1983). La structure en sous-ensemble s'obtient par diverses méthodes de groupement qui permettent l'agglomération hiérarchique d'échantillons ou des stations d'échantillonnage.

Catherine et al. (1991), lors de l'étude de salubrité du gisement naturel de coques de La Baule, utilise une méthode de classification hiérarchique ascendante afin de décrire d'éventuels regroupements de stations d'échantillonnage, et l'analyse factorielle des correspondances dans le but de mettre en évidence les corrélations éventuelles du descripteur (NPP) avec les variables pluie et vent (direction et force). Cette méthode permet une représentation synthétique d'un ensemble de valeurs numériques sous la forme d'un tableau de contingence. L'analyse des correspondances est l'une des méthodes d'ordination dite en espace réduit. C'est une technique de réduction du nombre de lignes (ou colonnes) d'un ensemble de données trouvant des combinaisons linéaires de ces lignes (ou colonnes) qui expliquent la majeure partie de la variabilité. Elle nécessite une bonne répartition des fréquences entre les différentes modalités des variables.

Des méthodes nouvelles pour l'écologiste, issues pour certaines du domaine de la géostatistique, deviennent disponibles pour tenir compte et intégrer le cadre spatial et/ou temporel de l'échantillonnage, pour analyser la répartition ou la dynamique des variables biologiques, et pour étudier les relations avec les variables environnementales (Trousselier et al, 1989).

D'autres méthodes, permettant de traiter explicitement la structure spatio-temporelle lors de l'analyse de données, peuvent servir à tester la présence d'autocorrélation spatiale: le test de Mantel, le corrélogramme spatial (univariable) et le corrélogramme de Mantel (multivariable) (Legendre et Legendre, 1990).

La méthode employée pour mettre en évidence la structure doit être choisie en fonction de la nature des données ainsi que du problème à résoudre. La structure du corps des données peut fort bien résulter du plan d'échantillonnage lui-même structuré dans l'espace et le temps. La prudence est de règle lors de l'interprétation.

L'interprétation de la structure synthétisée à partir de données multidimensionnelles constitue une partie essentielle de la recherche: sans elle le travail n'est que descriptif et ne permet pas d'établir la validité des hypothèses écologiques quant aux relations fonctionnelles entre des catégories de descripteurs de l'écosystème (Legendre et Legendre, 1983).

L'hétérogénéité des phénomènes naturels en milieu marin étant généralement la règle, il est illusoire d'espérer lever cette contrainte, qui est une caractéristique des processus structurant le milieu marin, en modifiant la stratégie d'échantillonnage. Il s'ensuit, selon Legendre et Legendre (1990), que les caractéristiques spatio-temporelles de l'échantillonnage constituent une variable, qui doit intervenir dans l'analyse des données océanographiques.

5.6 CONCLUSION

L'étude bactériologique d'une zone conchylicole et de la répartition de la contamination est une tâche particulièrement difficile compte tenu de l'hétérogénéité du milieu marin, dans l'espace et dans le temps.

Un protocole d'échantillonnage est essentiel et indispensable pour définir une stratégie d'échantillonnage et surtout pour l'optimiser. Cette phase de travail permet, en fonction des différentes contraintes (hétérogénéité du milieu, possibilités d'analyses ou de traitement des données), de localiser avec précision les limites de la zone étudiée et les stations de prélèvements, de tester l'efficacité du système de prélèvement en temps réel, de mesurer les efforts et les coûts réels du programme d'échantillonnage. Il est essentiel de définir avec précision la taille de la station de prélèvement (une poche ostréicole, un mètre carré, un bouchot).

Parmi les différentes techniques de sondage utilisées en écologie, seules celles paraissant le plus adaptées aux études de zones ont été examinées: l'échantillonnage aléatoire simple, l'échantillonnage systématique et l'échantillonnage stratifié.

L'échantillonnage aléatoire simple a l'avantage de permettre l'utilisation immédiate de la plupart des analyses statistiques et notamment des tests d'hypothèses paramétriques, et ne nécessite pas d'information préalable sur la structure et le comportement de la population. Il a l'inconvénient de ne pas être approprié à l'étude de phénomènes stratifiés ou présentant une structure linéaire ou autocorrélée, c'est-à-dire non aléatoire. De ce fait, il est généralement peu adapté aux études de salubrité des zones conchylicoles.

L'échantillonnage systématique a l'inconvénient d'imposer une énumération de toutes les stations de prélèvements possibles afin d'en retenir une en fonction de la période calculée pour leur répartition spatiale. Or, elles sont en nombre infini, et ne peuvent donc être recensées.

Par contre ce plan présente beaucoup d'avantages, dont principalement les suivants:

- il est recommandé pour répartir uniformément dans l'espace et dans le temps des stations de prélèvements qui permettront de mettre en évidence les niveaux de contamination, les structures spatiales et de comprendre les phénomènes de pollution dans le secteur étudié, ce qui est l'objectif recherché, plutôt que la mesure précise des paramètres,
- il reste un mode de sélection "aveugle" comme l'aléatoire simple, puisque une fois défini, il peut déboucher sur la sélection d'unités d'échantillonnage peu représentatives du phénomène à étudier,
- il est plus adapté que l'aléatoire simple si la distribution des résultats obtenus à l'échelle des stations de prélèvements présente des phénomènes d'autocorrélation, car il limite le recueil d'informations redondantes.

L'échantillonnage stratifié, en fonction d'une variable qualitative comme le bassin versant, l'espèce de coquillage, le mode de culture, semble particulièrement intéressant:

- il s'impose quand différents plans de sondage doivent être appliqués dans diverses catégories de la population (espèces ou modes d'élevage différents),
- il constitue une solution avantageuse aux problèmes de variation de l'effort, pour des raisons techniques (taille du bassin versant principal, nombre d'analyses en laboratoire), ou financières.

Le plan de sondage stratifié se révèle généralement peu utilisable pour l'étude bactériologique des zones conchylicoles car, plusieurs strates étant échantillonnées simultanément, il nécessite un trop grand nombre de prélèvements sur un domaine trop vaste, compte tenu des contraintes opérationnelles actuelles. En revanche la notion de strates ou de sous-zones est à retenir pour le choix d'un plan de sondage systématique.

L'inférence de conclusions, *via* l'analyse de données, est en bonne partie déterminée par le plan d'échantillonnage, c'est dire l'importance de ce choix dans la planification d'une étude. L'étendue des programmes informatiques disponibles permet de tirer une information maximale des données, sur laquelle fonder les conclusions de l'étude. Mais à la condition qu'une correspondance soit établie entre le plan d'échantillonnage et le traitement prévu des données en fonction de leur niveau de précision.

Les méthodes actuellement utilisées en routine pour le dénombrement des coliformes fécaux dans les coquillages, y compris l'analyseur Malthus qui est corrélé avec la méthode de la dilution des tubes, ne donnent pas de résultats précis. La définition d'un rendement optimal de l'étude ou celle du niveau de précision optimal repose donc en priorité sur le nombre des stations et des séries de prélèvements nécessaires pour décrire la structure spatio-temporelle de la zone soumise à des flux de pollution. Le niveau de précision repose également sur la qualité de la définition des stations et de la représentativité des prélèvements durant la période de l'étude.

Un niveau élevé de précision pour les données brutes n'est pas requis dès lors que la majorité des méthodes pour descripteurs quantitatifs ont leurs équivalents semi-quantitatifs ou qualitatifs, lesquels permettent dans la plupart des cas d'obtenir des résultats analogues.

Parmi de nombreuses méthodes de traitement statistique pouvant être utilisées dans le cadre des études bactériologiques de zones conchylicoles, citons:

- l'analyse de variance hiérarchisée qui permet de mesurer la variance relative entre plusieurs niveaux de variabilité spatiale, bien que les hypothèses de cet analyse paramétrique ne soient pas respectées,
- le test de Friedman (non-paramétrique) destiné à révéler la présence d'une structure spatiale,
- l'analyse factorielle des correspondances qui permet de mettre en évidence les éventuelles corrélations du descripteur avec les variables météorologiques,
- et une méthode de groupement, la classification hiérarchique ascendante qui regroupe les stations de prélèvements en fonction de leur niveau de contamination.

L'intérêt des traitements statistiques, qui ne constituent pas une fin en soi, est de permettre de mieux appréhender la réalité complexe du milieu naturel. Les conclusions finales d'une étude peuvent jeter une lumière nouvelle sur les hypothèses de départ et permettre de résoudre les problèmes posés, ce qui peut engendrer un nouveau cycle d'étude.

6. ETUDE BACTERIOLOGIQUE D'UNE ZONE DE PRODUCTION EN MARAIS

6.1 OBJECTIFS

Lors des études de salubrité des eaux conchylicoles, la périodicité des 26 séries de prélèvements recommandées par l'arrêté du 12 octobre 1976, est habituellement de 14 jours. En fait, en fonction des contraintes de laboratoire, elle peut varier de 7, 14, 21, à 28 jours.

En raison des contraintes opérationnelles, la méthode analytique de la dilution des séries de tubes, utilisée par l'ensemble des laboratoires côtiers d'IFREMER, ne permet pas d'étudier les variations des cycles de contamination/décontamination des coquillages inférieurs à la semaine, alors que Plusquellec (1984) montre que ces variations peuvent être inférieures à la journée. D'où l'intérêt d'étudier l'évolution des contaminations, au moyen de l'analyseur Malthus qui permet ces mesures, sur un cycle de marée comprenant des séries de prélèvements journaliers sur 2 périodes de 5 jours en vives eaux et mortes eaux.

Les résultats obtenus permettront de mieux comprendre le devenir des flux de pollutions dans la zone concernée, c'est-à-dire les marais salants du Mes en Loire-Atlantique, où se développe l'élevage de la palourde. L'étude de l'ensemble de ces marais, d'octobre 1990 à octobre 1993, est financée par le Conseil Général de Loire-Atlantique.

Les différentes sources de variabilité spatiale étudiées sont celles inter-stations et inter-mesures dans un même broyat. Les conditions de prélèvement ne permettent pas d'étudier la variabilité spatiale à la station de prélèvement. Néanmoins la variabilité inter-prélèvements aux stations est étudiée.

6.2 MATERIEL ET METHODE

6.2.1 METHODE D'ANALYSE BACTERIOLOGIQUE

6.2.1.1 Principe et résultats obtenus par la technique de mesure de la conductance

La méthode de mesure de la conductance, au moyen de l'analyseur microbiologique Malthus, a été mise au point par le Laboratoire Central de Méthodologie Analytique d'IFREMER à Nantes (Fig.4). Le principe de la méthode est basé sur la mesure de la conductance dans le milieu de culture. Introduites dans un milieu de culture approprié, les bactéries utilisent pour leur croissance les substances nutritives présentes et libèrent des métabolites dont certains jouent le rôle de dipôles électriques. Il s'ensuit une augmentation de la conductance du milieu qui peut être mesurée en faisant passer entre deux électrodes un courant alternatif d'une fréquence de 10 KHz (Dupont et al., 1989).

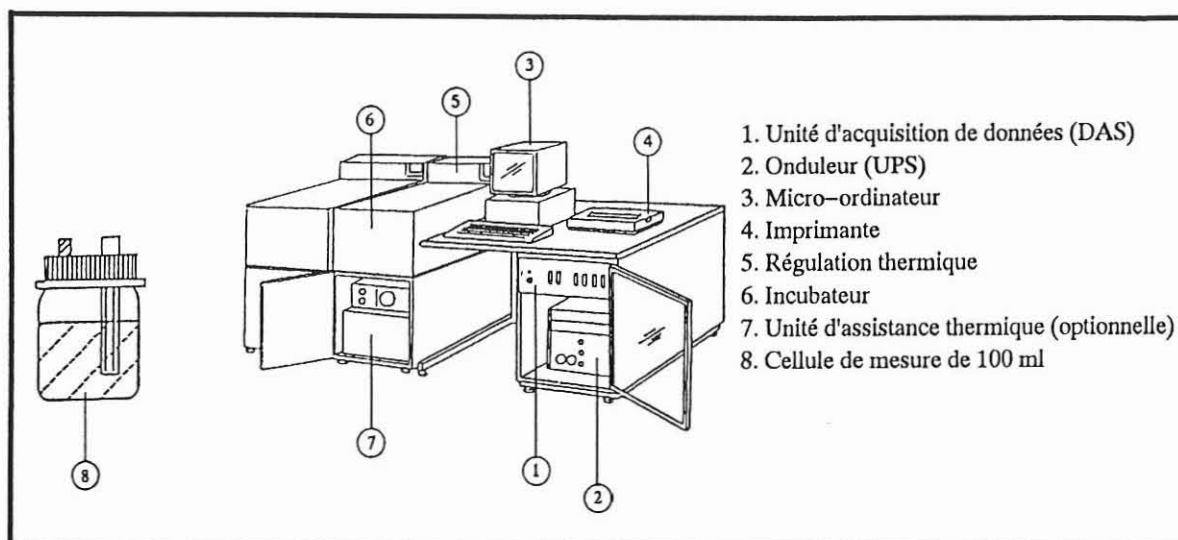


Fig. 4: Analyseur microbiologique Malthus (Dupont et al., 1989).

La mesure de la conductance du milieu de culture en fonction du temps donne une courbe comparable à celle de la croissance microbienne classique. Elle présente une brusque augmentation de conductance qui constitue le signal de détection d'une croissance, précédée par une phase de latence pendant laquelle la conductance est en général constante. Le temps de latence expérimental qui sépare le moment de l'inoculation de celui de l'apparition du signal, appelé temps de détection, est une fonction linéaire décroissante du logarithme de la concentration bactérienne initiale. Les mesures de conductance sont donc facilement étalonnables en dénombrements bactériens.

La mise au point de la méthode conductimétrique, appliquée à la colimétrie des coquillages, s'est faite en deux étapes:

1- Détermination du mode de préparation de l'échantillon, des conditions d'ensemencement et de culture sur milieu sélectif des coliformes, et des paramètres de détection optimaux pour obtenir une variation significative de conductance dans les cellules de mesure et un temps de détection fiable avec une bonne répétabilité.

2- Calibration des résultats des analyses obtenus par la méthode conductimétrique, exprimés en temps de détection, et ceux obtenus par la méthode classique (méthode à 3 tubes et 3 dilutions), exprimés en logarithme décimal du Nombre le Plus Probable (NPP) de coliformes fécaux dans 100 ml de broyat de chair de coquillages et de liquide intervalvaire. Les résultats sont donc du niveau de précision de la méthode à 3 tubes et 3 dilutions. Les essais sont réalisés sur quatre espèces de coquillages: huîtres, moules, coques et palourdes. La formule de la droite de régression correspondante est calculée sur l'ensemble de ces résultats.

Les principaux résultats obtenus par Dupont et al. (1989), et depuis (publication en cours), montrent:

- a- Une bonne répétabilité de la méthode conductimétrique: les mesures effectuées sur 10 temps de détection à partir d'un même broyat de chair et de liquide intervalvaire d'huîtres (NPP proche de 500 C.F./100 ml), le mode opératoire et les paramètres de détection étant fixés, donnent un écart-type de 0,24 pour une moyenne de 7,63.
- b- La fiabilité de la méthode conductimétrique : la présence d'*E. coli* présumée dans 96,4 % des cultures, traduite par un signal de détection dans un délai de 10 heures, et le faible pourcentage de faux-négatifs (< 4 %) rendent compte de la fiabilité de ce signal. Cependant, on observe une variabilité plus importante de la réponse analytique pour des contaminations inférieures à 100 C.F./100 ml, vraisemblablement liée à l'hétérogénéité du broyat, quelque soit la méthode utilisée. Cela rend difficile l'étalonnage dans cette gamme de concentrations bactériennes. A l'inverse pour des contaminations plus fortes, de l'ordre de 500 C.F./100 ml, la répétabilité des résultats obtenus par cette méthode est excellente, avec un coefficient de variation de 3 %. Le délai de réponse varie de 4 à 10 heures en fonction du degré de contamination des coquillages.
- c- Une capacité à rechercher les bactéries comparable avec la méthode classique, particulièrement pour un signal de détection apparaissant dans un délai maximum de 9,5 heures après l'ensemencement, et l'absence d'influence néfaste d'une incubation directe à 44°C dans la méthode conductimétrique.

6.2.1.2 Mode opératoire

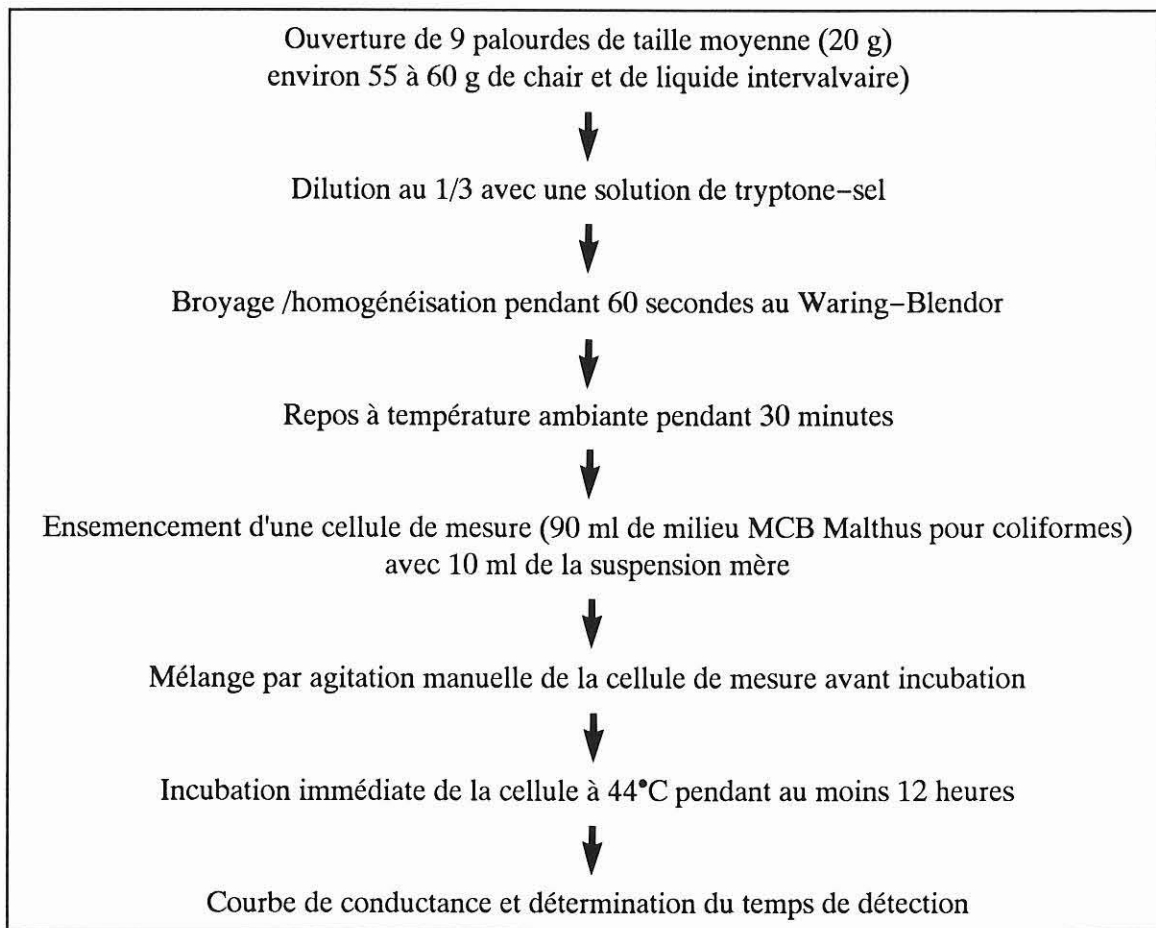


Fig. 5 : Schéma du mode opératoire.

Chaque prélèvement est traité indépendamment selon le schéma ci dessus (fig. 5), et dès que le temps de repos de chacun d'entre eux est atteint, la cellule estensemencée immédiatement, et ainsi de suite. Le système informatique de l'analyseur Malthus prend en charge toutes les opérations analytiques, récupère et traite les données stockées dans l'unité d'acquisition, et édite les résultats. L'appareil, muni de deux incubateurs de 28 cellules chacun, fonctionne automatiquement en continu sans intervention.

6.2.2 POSITIONNEMENT DES STATIONS DE PRELEVEMENTS

La zone de marais concernée par l'étude, à usage aquacole et salicole, a été délimitée avec précision, sur une carte au 1/25 000, lors de plusieurs visites de terrain. L'usage de chaque portion de marais a été noté (élevage de palourdes, claire à huîtres, marais salicole, friche). Le relevé des niveaux atteints par l'eau, lors des plus faibles coefficients de pleine mer, a été effectué.

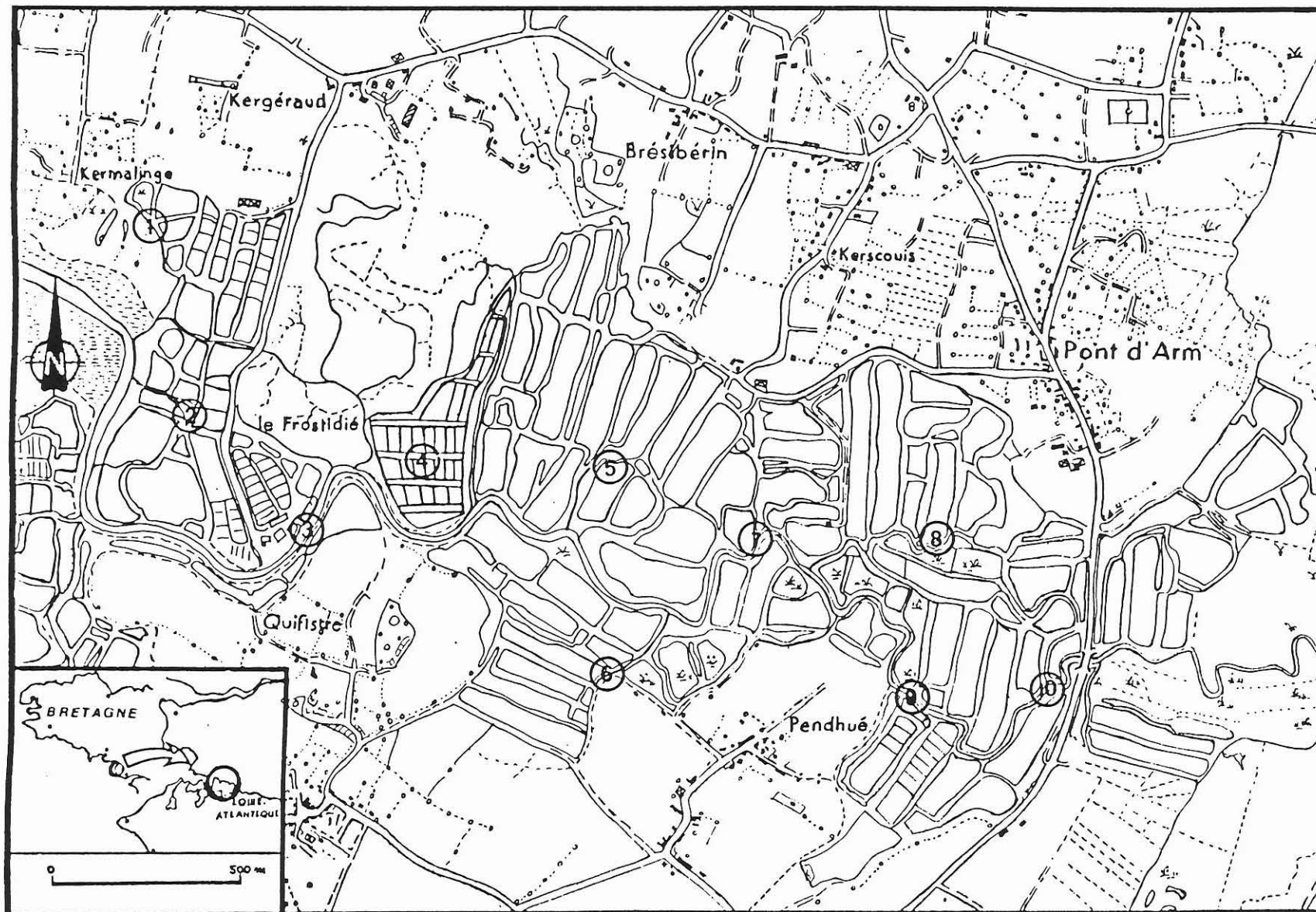


Fig.6 : Plan de situation, et localisation des stations de prélèvements dans les marais du Mes - Assérac (Loire-Atlantique).

Le secteur concerné, qui ne représente qu'une portion de bassin versant ou strate, s'inscrit dans une surface de 1 000 m x 2625 m soit 262,50 ha. Le choix du plan de sondage est un échantillonnage systématique. Le nombre de stations de prélèvements retenu, dix, est un compromis réalisé entre les zones déjà exploitées, les possibilités futures d'extension en fonction des prises d'eau possibles par les étiers secondaires. La répartition spatiale des stations

est faite en calculant la maille $p = \sqrt{\frac{S}{n}}$ soit 512 m arrondis à 500 m. Un quadrillage sur une carte des marais au 1/25 000^{ème} permet de fixer une station dans un premier carré de côté égal à p . Toutes les autres stations sont équidistantes, elles sont numérotées de 1 à 10 (Fig. 6). Pour la présente étude, environ 3 kg de palourdes ont été déposés sur la vase au fond de l'étier, dans un filet plastique fixé à un piquet et de surface unitaire voisine de 0,15 m², 10 jours avant les premiers prélèvements. Le choix d'une répartition systématique linéaire des stations de prélèvements dans les étiers aurait été préférable. Mais la répartition spatiale a été conservée afin de comparer ces résultats avec ceux obtenus à la même date sur les palourdes déposées aux mêmes stations dans les marais et les claires pour l'étude de salubrité des marais du Mes.

6.2.3 PRELEVEMENTS

Les séries de prélèvements sont effectuées, chaque après-midi, dans l'ordre suivant: 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 9, 6.

Les mesures de salinité et de température de l'eau sont faites, *in situ*, au moment du prélèvement à titre indicatif, si le niveau de la marée le permet. Toutes les références des prélèvements sont notées sur une fiche de renseignements.

Les prélèvements de palourdes (12 palourdes par unité, soigneusement lavées sur place et placées dans un sachet numéroté) sont stockés en glacière isotherme avec accumulateur de froid, puis immédiatement acheminés au laboratoire. Les analyses sont effectuées dès le lendemain matin.

Le schéma retenu pour l'étude des sources de variabilité de la densité bactérienne est composé de 10 stations (variabilité à l'échelle des marais ou inter-stations), de 3 séries de 3 prélèvements aux stations 8, 9, 10 (variabilité inter-prélèvements), de 3 séries de 3 mesures dans un broyat aux stations 7, 8, 9 (variabilité intra-broyats) (Fig. 7). Il s'agit d'une première approche dont la portée est limitée en raison de contraintes de laboratoire ne permettant pas de multiplier les prélèvements sur ces stations, ni le nombre de mesures un même broyat.

ECHELLE D'OBSERVATION CROISSANTE			
Niveau d'observation	Marais	Stations	Prélèvements
Source de variabilité	Inter-stations	Inter-prélèvements	Intra-broyats
Nombre de répétitions	11 x 10 stations	3 x 3 p. à 3 stations	3 x 3 mesures à 3 stations

Fig 7 : Schéma d'études des sources de variabilité

La variabilité inter-stations est mesurée aux cours de 11 séries de prélèvements comprenant 5 séries en vives-eaux, séparées par 3 jours, puis 5 séries en mortes-eaux, séparées par 3 jours, puis une dernière série en vives-eaux, permettant de noter la variabilité journalière des résultats et à l'échelle de la semaine (Fig. 8).

DATE	COEFFICIENTS DE MAREE	HEURES B. MERS	HEURES P. MERS
D 08.09.91	101	11.46	5.16
L 09.09.91	108	12.29	18.10
M 10.09.91	105	13.09	18.44
M 11.09.91	97	13.46	19.17
J 12.09.91	84	14.23	19.50
D 15.09.91	39	16.25	21.45
L 16.09.91	30	17.26	23.28
M 17.09.91	28	18.51	12.47
M 18.09.91	32	20.18	14.29
J 19.09.91	43	21.22	15.25
L 23.09.91	89	11.37	05.11

Fig. 8 : Programme des prélèvements

6.3 TRAITEMENT DES DONNEES

Les résultats des analyses bactériologiques obtenus au moyen de l'analyseur Malthus sont exprimés en temps de détection. Le temps de détection est une fonction linéaire décroissante du logarithme décimal de la densité bactérienne (Nombre le Plus Probable): $\log NPP = ax + b$. Les valeurs de a et b calculées par Dupont et al. (1989), avec des échantillons de différents coquillages contaminés naturellement, donnent la formule suivante:

$$\log NPP = - 1,03 TD + 11.$$

Afin de mesurer les sources de variabilité retenues, les calculs suivants sont effectués, sur les données exprimées en logarithme décimaux : moyenne, écart-type et coefficient de variation. Un graphique montre l'évolution journalière des niveaux de contamination des stations de prélèvements en fonction des coefficients de marée.

6.4 RESULTATS – DISCUSSION

6.4.1 VARIABILITE INTER-MESURES DANS LES BROYATS

Les mesures de la variabilité liée à la répétition des mesures d'abondance de bactéries dans un même broyat de palourdes sont généralement faibles (Tab. 11).

DATE	N° STATION	\bar{x}	s	C.V.
16/09	7	2.45	0.27	11.02
	8	2.66	0.27	10.15
	9	2.52	0.43	17.06
17.09	7	2.66	0.10	3.76
	8	3.07	0.27	8.79
	9	2.35	0.54	22.98
18.09	7	2.24	0.47	20.98
	8	1.49	0.84	56.37
	9	2.69	0.31	11.52

Tab. 11 : Moyennes (\bar{x}), écarts-types (s) et coefficients de variation (C.V.) des 3 séries de mesures effectuées sur le broyat d'un prélèvement de palourdes aux stations 7, 8 et 9 des marais du Mes-Assérac (Loire-Atlantique).

Les mesures deviennent imprécises, du fait de la méthode d'évaluation du NPP, quand la densité bactérienne devient faible et que l'on se rapproche du seuil de détection, car de ce fait la répartition des bactéries dans le broyat est très hétérogène. Les valeurs obtenues sont alors dispersées, comme par exemple à la station 8 le 18 septembre et le coefficient de variation devient élevé.

A l'inverse à cette même station, le jour précédent, où la contamination est nettement plus élevée et donc les mesures plus précises, le coefficient de variation devient très faible.

L'intérêt d'une étude est de mesurer avec une bonne précision les niveaux de contamination élevés, sur lesquels nous sommes amenés à nous prononcer, et non ceux approchant les seuils de détection où la précision n'est pas utile. Ces résultats, obtenus sur des coquillages peu contaminés, indiquent qu'une seule mesure dans le broyat suffit dès que l'on approche de 300 CF/100 ml soit 2,48 (après transformation logarithmique).

6.4.2 VARIABILITE INTER-PRELEVEMENTS AUX STATIONS

Les prélèvements ont été réalisés de la manière suivante : le filet contenant les palourdes, d'une surface de 0,15 m², est directement lavé dans l'étier, puis ramené sur la berge. Les coquillages sont mélangés et 3 prélèvements de 10 palourdes sont effectués au hasard.

Les coefficients de variation des mesures de la densité bactérienne dans 3 prélèvements de palourdes aux stations 8, 9 et 10 sont très faibles, ce qui indique que les 3 prélèvements ont un niveau de contamination voisin à chaque station pour une date donnée (Tab. 12). Ces coefficients de variation sont nettement inférieurs à ceux mesurés dans les broyats (Tab.11). Ces résultats, qui paraissent contradictoires puisque les coefficients de variation comprennent ceux mesurés dans les broyats, peuvent s'expliquer en partie par le fait que les coefficients de variation inter-mesures dans les broyats ont été calculés sur des densités bactériennes très faibles, ce qui entraîne une grande imprécision, et à des dates différentes.

DATE	N° STATION	\bar{x}	s	C.V.
10/09	8	5.09	0.16	3.14
	9	4.00	0.10	2.50
	10	4.13	0.39	9.44
11.09	8	3.58	0.00	0.00
	9	3.89	0.10	2.57
	10	4.17	0.21	5.03
12.09	8	2.86	0.18	6.29
	9	3.51	0.21	5.98
	10	3.62	0.12	3.31

Tab. 12: Moyennes (\bar{x}), écarts-types (s) et coefficients de variation (C.V.) des 3 séries de mesures effectuées sur 3 prélèvements de palourdes aux stations 8, 9 et 10 des marais du Mes-Assérac (Loire-Atlantique).

D'autre part, les coefficients de variation obtenus indiquent que les palourdes prélevées à chaque station ont un niveau de contamination très voisin. Le nombre de palourdes analysé est donc largement suffisant, mais nécessaire pour atteindre les 50 grammes de chair et de liquide intervalvaire préconisés par la méthode.

6.4.3 ETUDE DE L'EVOLUTION DES NIVEAUX DE CONTAMINATION

La variabilité des résultats dans les broyats et les prélèvements entraînent des erreurs de mesure dans l'appréciation du niveau de contamination des stations de prélèvements, qu'il est nécessaire de connaître, avant d'analyser les résultats d'une étude de zone.

VARIABILITE DES RESULTATS ENTRE STATIONS

Les coefficients de variation indiquent le degré de variabilité des résultats entre les stations par date de prélèvement. Ils sont nettement plus élevés en période de mortes-eaux où l'hétérogénéité spatiale du secteur étudié apparaît plus nettement (Tab. 13).

En l'absence de mesure permettant une analyse de variance hiérarchisée, il est intéressant de comparer les coefficients de variation des tableaux 12 et 13, les 10, 11 et 12 septembre. Cette comparaison montre que la variabilité due aux erreurs de mesures est faible par rapport à la variabilité des résultats entre stations, dans les conditions où les coquillages ont été prélevés.

DATE	COEF. MAREE	N PRELEVEMENTS	\bar{x}	s	C.V.
08.09	101	6	3.29	0.91	27.66
09.09	108	8	4.03	0.44	10.92
10.09	105	8	4.03	0.65	16.13
11.09	97	9	4.05	0.54	13.13
12.09	84	9	3.46	1.08	31.21
15.09	39	9	2.11	1.26	59.71
16.09	30	9	2.39	0.98	41.00
17.09	28	9	1.82	1.39	76.37
18.09	32	9	2.14	0.92	42.99
19.09	43	9	2.01	0.97	48.26
23.09	84	9	4.11	0.37	9.00

Tab 13 : Moyennes (\bar{x}), écarts-types (s) et coefficients de variations des mesures des 11 séries de prélèvements aux 9 stations des marais du Mes-Assérac (Loire-Atlantique).

VARIABILITE TEMPORELLE DES RESULTATS

Les moyennes journalières des contaminations, calculées sur l'ensemble des stations de prélèvements sont voisines de 4 en vives-eaux et de 2 en mortes-eaux (Tab. 13). Ces résultats, obtenus au cours de 11 séries de prélèvements, montrent une certaine stabilité en vives-eaux avec une moyenne élevée, et une stabilité en mortes-eaux avec une moyenne faible, puis un retour à une moyenne de contamination élevée dès le premier coefficient de vives-eaux. Ces moyennes lissent des pics de contamination très élevés à certaines stations (annexe 7). Les coefficients de variation montrent une variabilité importante des résultats, notamment en période de mortes-eaux, où les niveaux de contamination deviennent très faibles.

La moyenne des résultats à chaque station est élevée par rapport aux normes admises (2,48) et le plus souvent supérieure à 3 (Tab. 14). Les coefficients de variation sont élevés et varient de 21 à 108 %, ce qui indique une grande variabilité des résultats à chaque station, notamment aux stations 2, 5 et 6, qui est due aux grandes différences de résultats entre la période de mortes-eaux et de vives-eaux. Cette variabilité temporelle est du même niveau que la variabilité inter-stations, excepté à la station 6, où elle est particulièrement élevée (108 %). Les stations 5 et 6, baignées très peu de temps par les eaux marines aux mortes-eaux sont moins polluées en moyenne.

STATION	\bar{x}	s	C.V.	N PRELEVEMENTS
1	3.48	0.90	25.86	11
2	2.94	1.28	43.53	11
3	3.11	0.66	21.22	11
5	2.82	1.57	55.67	11
6	1.94	2.10	108.25	11
7	3.17	1.00	31.54	9
8	3.29	1.19	36.17	11
9	3.13	0.92	29.39	9
10	3.30	0.86	26.06	10

Tab. 14: Moyennes (\bar{x}), écarts-types (s) et coefficients de variation des mesures effectuées sur les 9 stations de prélèvements des marais du Mes- Assérac (Loire-Atlantique).

L'examen du tableau 14 montre qu'un certain nombre d'échantillons n'a pu être prélevé sur 3 stations. La raison en est due à une forte marée de vives-eaux empêchant le repérage des lieux ainsi qu'à un courant très fort les deux premiers jours. D'autre part la station 4 n'a pu être échantillonnée, le filet de palourdes ayant été dérobé.

L'examen du graphique des résultats journaliers sur l'ensemble des stations en fonction des coefficients de marée montre une forte contamination en vives-eaux, suivi d'une nette diminution de la contamination en mortes-eaux, puis d'une forte recontamination au retour des vives-eaux (Fig. 9). Mis à part quelques prélèvements non effectués les deux premiers jours, certaines valeurs n'apparaissent pas dans le graphique car elles sont confondues, les temps de détection mesurés toutes les six minutes sont identiques. Les baisses de niveau de contamination sont plus ou moins marquées suivant les stations, et la station 6 est exempte de toute contamination en mortes-eaux, car elle est alors baignée par des eaux très salées, provenant des écoulement des marais salants, qui ne permettent pas la survie des coliformes fécaux (Annexe 6).

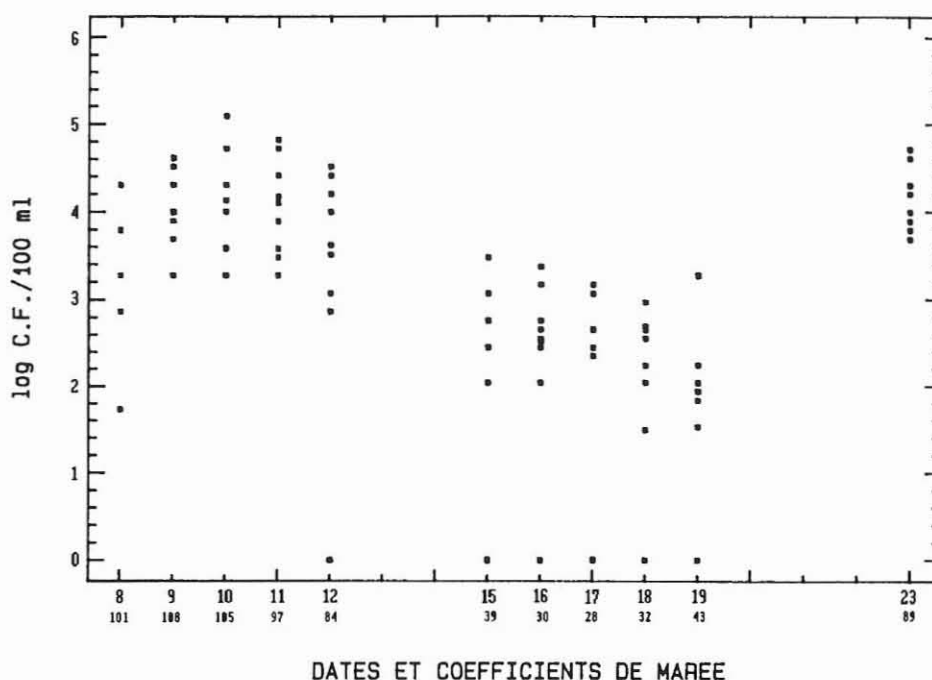


Fig. 9 : Evolution journalière des niveaux de contamination (log C.F./100 ml) aux 9 stations de prélèvements des marais du Mes-Assérac (Loire-Atlantique).

La connaissance du secteur géographique entourant les marais et des conditions météorologiques particulières avant et pendant la durée de l'étude permet d'expliquer ces résultats. Une importante averse de pluie est tombée le samedi 31 août, durant une à deux heures, soit 8 jours avant les premiers prélèvements. La période qui a suivi, jusqu'au 23 septembre, a été marquée par des journées chaudes et ensoleillées et l'absence de pluies. Bien que cette averse fut intense, la quantité de pluie tombée, trop faible pour atteindre le principal cours d'eau ou étier du Mes, fut suffisante pour remplir les nombreux fossés de drainage, présents aux alentours des fermes d'élevage et des hameaux et se déversant dans les marais. La sécheresse, en cours depuis la fin juillet, maintenait les flux de pollution à l'écart de cette zone sensible.

La forte montée des eaux marines lors de la grande marée de vives-eaux sur une partie des terres et dans les fossés pollués a entraîné une importante contamination des coquillages dans l'ensemble des étiers, qui est favorisée par la turbidité des eaux et la présence de sédiments vaseux. Cette contamination a fortement régressé ensuite, après dilution au cours des marées de mortes-eaux, puis a repris dès la première marée à fort coefficient qui a suivi, alors que les conditions météorologiques étaient identiques.

6.5 CONCLUSION

Les principaux avantages de l'analyseur microbiologique Malthus sont une bonne répétabilité et une bonne fiabilité de la méthode conductimétrique, excepté pour des contaminations inférieures à 100 C.F./100 ml où la variabilité importante de la réponse analytique semble liée à l'hétérogénéité du broyat et au comportement contagieux des colonies bactériennes. La capacité à rechercher les bactéries est comparable à la méthode classique de dilutions des tubes, et le seuil de détection est du même ordre de grandeur.

D'autres avantages, tout aussi importants, sont la possibilité d'obtenir les résultats en 4 ou 10 heures, suivant le degré de contamination, et d'effectuer un grand nombre d'analyses à la fois, chaque jour de la semaine. La présente étude n'aurait pu être menée sans la méthode Malthus.

Les résultats obtenus sur les différentes sources d'erreurs montrent que:

- La variabilité inter-mesures dans un même broyat, calculée sur trois réplicats, n'est pas négligeable et devient forte pour de faibles taux de contamination (C.V. = 10 à 20 % environ, et plus si les moyennes sont très faibles). La méthode de dénombrement est imprécise pour des contaminations inférieures à 100 C.F./100 ml.
- La variabilité inter-prélèvements (ou intra-station), calculée sur trois prélèvements de palourdes fortement polluées, est faible (C.V. = 3 à 9 %). Ceci s'explique par l'homogénéité de réponse des différents individus palourdes à l'échelle de la station (0,15 m²).

L'étude des variabilités inter-mesures dans les broyats et inter-prélèvements aux stations, bien que faite sur un nombre de réplicats limités montre :

- qu'une seule mesure par broyat suffit dès que le niveau de contamination approche 300 C.F./100 ml,
- qu'un seul échantillon aléatoire suffit par station de prélèvement pour mettre en évidence les flux de contamination du secteur concerné.

L'hétérogénéité spatiale du secteur étudié apparaît plus nettement en période de mortes-eaux où les coefficients de variation deviennent très élevés (41 à 76 %). En vives-eaux, ils évoluent de 11 à 31 %. La variabilité temporelle des résultats par station est également forte (C.V. = 21 à 55 %) et sensiblement du même niveau que la variabilité inter-stations, excepté à la station 6 qui est soumise à des apports d'eaux très salées (C.V. = 108 %).

Durant la période de l'étude le cycle de contamination/décontamination est très fortement marquée par l'influence de la marée. La contamination est homogène en moyenne pendant les 2 séries de 5 jours de prélèvements, mais à des niveaux différents, respectivement élevés ou faibles, selon que l'on est en période de vives-eaux et de mortes-eaux. L'examen des résultats journaliers par station de prélèvements confirment cette tendance générale.

Des conditions météorologiques particulières, une importante averse en période de grande sécheresse 8 jours avant les premiers prélèvements, suivie de journées chaudes et ensoleillées, peuvent expliquer la stabilité des moyennes des résultats. Seules les grandes marées de vives-eaux pouvaient, en inondant les fossés pollués puis en se retirant, contaminer le réseau des étiers et les coquillages déposés. L'ouverture systématique des prises d'eau à partir d'un coefficient de 80, pour l'alimentation des marais destinés à l'élevage des coquillages, ne peut se faire sans tenir compte des conditions météorologiques particulières agissant sur les flux de pollution bactériologique.

Les résultats obtenus concernant l'évolution journalière des niveaux de contamination sont représentatifs de la période de l'étude, où une seule et forte averse de pluie tomba durant une période de sécheresse. A l'inverse, une longue période pluvieuse amenant des flux de pollution réguliers, mais dilués, pourrait conduire à une série de résultats bactériologiques satisfaisant aux normes.

Il est donc nécessaire de bien comprendre les flux de contamination dans le milieu avant de faire des recommandations aux professionnels, notamment pour la conception des prises d'eau. Il est habituel de conseiller de pomper de l'eau à partir d'un coefficient de marée de 80. Or, nous venons de voir, que dans les conditions de l'étude, le niveau de pollution est très élevé à partir de ce coefficient. La nécessité de mieux définir les conditions de prise d'eau apparaît plus nettement, ainsi que l'usage d'une réserve permettant la décantation préalable des eaux pompées. Une bonne gestion de l'eau conditionne le développement de la vénériculture dans les zones de marais du littoral atlantique.

Cette étude montre l'intérêt de suivre, à certaines périodes caractéristiques, l'évolution des niveaux de contamination journalière en fonction des cycles de marée, et de poursuivre des mesures afin de hiérarchiser la part de variance de chaque niveau de variabilité, malgré l'imprécision des mesures de la densité bactérienne.

7. PREMIERS ELEMENTS D'UN GUIDE METHODOLOGIQUE POUR LES ETUDES DE ZONES CONCHYLICOLES

L'examen critique d'un certain nombre d'études récentes, ayant trait à la salubrité des secteurs d'élevage de coquillages ou de gisements naturels fait apparaître des insuffisances et des erreurs de conception. Il s'agit donc, dorénavant, de se donner les moyens d'en éviter le plus grand nombre.

Lors de ces études, il s'agissait, le plus souvent jusqu'à une période récente, d'effectuer un classement insalubre en cas de résultats dépassant régulièrement les normes, notamment en ce qui concerne les gisements naturels. Un petit nombre de résultats particulièrement défectueux, acquis au cours d'un échantillonnage limité à quelques stations, suffisait. S'agissant d'un secteur d'élevage concernant une activité économique relativement importante, l'affaire était plus délicate. De toute évidence une décision de classement insalubre prise sur la base de quelques résultats hors normes, plus ou moins épars, ne serait pas acceptable, ni acceptée. D'où la nécessité, dans ce cas, de produire une étude la plus solidement étayée possible.

Une étude de salubrité sur un secteur donné, comportant de 6 à 12 stations de prélèvements échantillonnées 2 fois par mois, au minimum, est extrêmement contraignante à mener sur 12 mois consécutifs. De plus le coût global d'une telle étude, prélèvements, analyses de laboratoire, exploitations des données et rapport final, est élevé. Dans le passé des programmes de surveillance de zones non reconnues insalubres pour des raisons économiques, sur de très longues années, se sont révélés coûteux sans pour autant permettre de comprendre avec précision les phénomènes de pollution, et de faire des propositions destinées à protéger les zones de production et à améliorer l'assainissement littoral.

Les zones conchylicoles sont officiellement désignées, malgré des résultats d'analyses supérieurs aux normes imposées par la directive (CEE) du 15 juillet 1991, pour un certain nombre d'entre elles. Il s'agit de proposer les solutions nécessaires à la poursuite des activités économiques dans les secteurs concernés, s'appuyant sur des études adéquates.

Le but du présent chapitre est de jeter les premières bases d'un guide pour la définition d'un protocole d'étude des zones conchylicoles en fonction des caractéristiques particulières de celles-ci. Il est inspiré d'un rapport sur les directives applicables à la surveillance sanitaire de la qualité des eaux littorales (O.M.S., 1977) et d'un guide pour l'étude du milieu marin concernant les rejets en mer (SOGREAH, 1983). Il a bénéficié d'une étude sur l'aménagement de la Baie du Mont Saint-Michel (Berthomé et al., 1987) et d'une étude sur la salubrité du gisement naturel de coques de la baie du Pouliguen (Catherine et al., 1991).

7.1 DETERMINATION DE LA ZONE ETUDIEE

Le choix de la zone d'étude découle des priorités locales qui tiennent compte de l'acuité des problèmes, de l'importance économique des zones d'élevage et des gisements naturels, ou de la protection des consommateurs (pêche récréative). Lors d'une étude de la contamination bactériologique d'une zone conchylicole ou d'un gisement naturel de coquillages, il s'agit:

- de mesurer la densité des germes tests de la contamination fécale sur un certain nombre de stations de prélèvements en fonction des coquillages produits ou dans l'optique d'élever une nouvelle espèce,
- de décrire la répartition spatiale et temporelle de la contamination,
- d'étudier les relations de cette contamination avec les variables environnementales (marines et météorologiques),
- de faire des propositions destinées à résoudre les problèmes soulevés concernant la salubrité des coquillages, et donc à améliorer l'assainissement de ces zones littorales.

Une telle étude répond à deux objectifs:

- a* – Environnemental: comprendre et décrire le fonctionnement du système naturel soumis aux flux de pollution dans l'espace et dans le temps, en vue de proposer des solutions pour un meilleur assainissement du littoral.
- b* – Santé publique: proposer les solutions techniques nécessaires aux prises de décisions afin de garantir la salubrité des coquillages au sortir du milieu, de reviser le classement du littoral en zones salubres et insalubres, pour la protection du consommateur.

Dans le premier cas, le coquillage est considéré comme intégrateur de la qualité bactériologique des eaux littorales, dans le but de protéger le milieu marin. Dans le deuxième cas, la qualité bactériologique des coquillages, en tant que produits, est mesurée par rapport à des normes avec recherche des germes pathogènes, dans le but de protéger le consommateur. Ces objectifs se rejoignent dans la mesure où un milieu marin salubre produit des coquillages sains, d'où l'intérêt d'agir en priorité sur les sources de pollution.

7.2 DESCRIPTION DE LA ZONE

Avant d'entreprendre toute recherche il est utile de réunir toutes les informations relatives au secteur concerné. Des informations intéressantes existent fréquemment dans des études antérieures, réalisées:

- par différents organismes publics (Université, Région, Département, Collectivités locales et syndicats intercommunaux, Agence de Bassin, Délégation Régionale à l'Architecture et à l'Environnement, Services Régionaux d'Aménagement des Eaux, Services

Maritimes/Cellule Qualité des Eaux, D.D.E., D.D.A.S.S./Service Hygiène du Milieu, D.D.A.),

- ou par des sociétés privées (Cabinet d'études pour l'assainissement et l'environnement, Cabinet d'architectes, etc...) dont les documents sont disponibles auprès des collectivités locales, qui, en général, les financent. Les sociétés gestionnaires des réseaux d'assainissement disposent de données très utiles sur les populations et les taux de raccordements.

7.2.1 DESCRIPTION DE LA PARTIE TERRESTRE DU LITTORAL

Utilisation des terrains

Distinguer les catégories d'utilisation des terrains dans la zone considérée: industries, habitations, agriculture, zone naturelle, décharges, ports de plaisance et de commerce.

Hydrographie

Identifier les cours d'eau: relevés cartographiques et débits.

Rejets polluants

Identifier les exutoires et les porter sur une carte, évaluer les débits et les flux bactériens (variations saisonnières), distinguer les divers types de décharges (industrielles, ménagères).

Assainissement

Reporter les emplacements des installations de traitement (capacité et type de traitement), et des émissaires de rejets sur une carte.

Géologie et sédimentologie

Carte et état descriptif indiquant la nature des terrains.

Cartes géodésiques et IGN

Chaque carte doit être identifiée clairement par l'emplacement qu'elle représente en notant le nom de villes connues, ses coordonnées, son échelle (échelle linéaire par tranche de 100 mètres ou kilomètres afin de garder l'échelle si la carte est réduite ou agrandie) et son orientation.

7.2.2 DESCRIPTION DES EAUX LITTORALES

Les renseignements obtenus doivent être reportés sur des états descriptifs et sur des cartes de la façon suivante:

Cultures marines et gisements naturels

Indiquer l'emplacement des concessions et des gisements, les quantités produites, l'importance économique des activités. Les monographies des Affaires Maritimes comportent des données socio-économiques intéressantes.

Facteurs météorologiques

Des enregistrements sur disquettes sont disponibles auprès des services locaux de la météorologie nationale (pluviométrie, température, direction et force des vents), ainsi que la rose des vents sur certaines stations.

Courants et marée

Certains courants littoraux très caractéristiques ont une grande importance dans la distribution spatiale et temporelle des flux de polluants. Ces conditions sont à déterminer aussi précisément que possible. Certaines études de modélisation deviennent disponibles. D'autres, plus nombreuses, faisant appel à des techniques plus classiques, ont été réalisées à l'occasion d'études pour la construction d'émissaires de rejets en mer, de ports de plaisance, de digues de protection.

Salinité, température et turbidité de l'eau

Des renseignements sur les variations des paramètres physico-chimiques de l'eau peuvent figurer dans des études antérieures, des travaux universitaires.

Cartes marines et cartes IGN

Les cartes marines indiquent la bathymétrie (courbes isobathes), et les cartes IGN situent avec une bonne précision la localisation du secteur étudié. Les cartes des concessions, parfois disponibles en format A4 sont très précieuses.

7.3 RAPPORT INITIAL SUR L'ETAT DE LA ZONE LITTORALE ET DU BASSIN VERSANT

Le rapport initial de l'état et des problèmes de la zone doit être aussi objectif et concis que possible. Il constitue la première partie du rapport final. Les points suivants sont à aborder en fonction des caractéristiques du secteur étudié:

7.3.1 ENVIRONNEMENT PHYSIQUE

Les informations sont condensées et illustrées, autant que possible, par une carte, une figure, un tableau.

Situation géographique

L'entité et la situation géographique sont précisées, indiquant le lieu dans le site environnant.

Géologie

La structure géologique du bassin versant peut expliquer certains problèmes rencontrés lors de l'assainissement, ainsi que la présence de nappes phréatiques.

Géomorphologie

La forme du relief terrestre renseigne sur les risques de pollutions par lessivage de la partie terrestre environnante ou, à l'inverse, sur l'impact de la montée des eaux lors des grandes marées.

Sédimentologie

Les caractéristiques des sédiments peuvent influencer sur la répartition des coquillages fousseurs dans le biotope ainsi que sur leur qualité bactériologique.

Hydrologie

Les caractéristiques physico-chimiques des eaux marines ou saumâtres disponibles (température, salinité, turbidité), sont utiles à comparer avec celles à mesurer durant l'étude. En effet, des données obtenues dans des conditions climatologiques particulières peuvent se révéler peu représentatives des valeurs habituelles.

Hydrographie - Qualité des eaux

Le réseau hydrographique et la qualité des eaux douces ont une influence déterminante dans la pollution des eaux marines.

Courantologie

Les différents types de courants marins, soumis notamment à l'influence des vents et des cours d'eau, suivant leur importance, peuvent expliquer la répartition spatiale des niveaux de contamination.

7.3.2 ENVIRONNEMENT SANITAIRE

Vocation et utilisation du milieu

L'importance respective des activités en présence (cultures marines et agricoles, artisanat ou industrie), permet de mieux comprendre le degré de protection du milieu naturel ou les types de pollutions dont il pourrait être victime.

Population - Urbanisation

L'intérêt principal est de mesurer l'importance des écarts entre les effectifs de résidents permanents et ceux de la population estivale. Les conséquences sont généralement très importantes sur le fonctionnement des réseaux d'assainissement et des stations d'épuration.

Assainissement

La connaissance des éléments suivants est essentielle dans une étude de la qualité bactériologique du milieu: importance et capacité des réseaux d'assainissement, types de traitement effectués à la station d'épuration, taux effectif des raccordements des abonnés, situation de l'émissaire de rejet, problèmes de fonctionnement du couple réseau d'assainissement/station d'épuration en fonction des données climatologiques et de la population.

Types de pollution

Le recensement des différents types de pollutions en fonction de leur origine (industrielle et artisanale, agricole, urbaine, ports de plaisance), de leur flux et de leur impact est important. Les observations faites sur le terrain pendant la durée de l'étude sont primordiales car souvent déterminantes pour expliquer les résultats de l'étude.

7.3.3 PRODUCTIONS CONCHYLICOLES

Un bref historique, la description des types et des techniques de production (pêches ou cultures marines), des structures d'exploitations (concessions) et des entreprises situent l'évolution et l'importance du secteur étudié dans ses aspects socio-économiques.

7.3.4 ETUDES DE SALUBRITE ANTERIEURES

Un court résumé présentera les principaux résultats obtenus, étayés par des tableaux, diagrammes ou graphiques, condensant les faits observés, et les principaux résultats obtenus.

7.4 PROTOCOLE D'ECHANTILLONNAGE

L'élaboration d'un protocole d'échantillonnage incite à se pencher sur l'ensemble des conditions de réalisation de l'étude: choix des variables et du coquillage de référence, plan de sondage et échelles d'observations spatio-temporelles, analyses en laboratoire, traitement des données. Cette phase de travail permet de tester l'efficacité du système de prélèvements en temps réel, de mesurer les efforts et les coûts de l'échantillonnage.

Il s'agit, en premier lieu de définir les problèmes posés, puis de choisir les objectifs, qui sont théoriques (compréhension d'un système et de son fonctionnement) ou pratiques (classement d'une zone en fonction de normes de salubrité) en fonction des buts recherchés (cf. paragraphe 7.1).

7.4.1 CHOIX DES VARIABLES A ETUDIER

Dans l'état actuel des connaissances, les germes tests à retenir sont des bactéries: les coliformes fécaux et les salmonelles. Le descripteur est la variable quantitative mesurée "Nombre le Plus Probable" de coliformes fécaux dans 100 ml de chair de coquillage et de liquide intervalvaire, si la méthode utilisée est celle de la dilution de séries de tubes. Dans le cas de l'analyseur Malthus la mesure quantitative obtenue est un temps de détection, qui est une

fonction linéaire décroissante du logarithme décimal de la densité bactérienne ($\log \text{NPP} = a \text{TD} + b$). Les valeurs NPP obtenues par l'analyseur Malthus sont corrélées avec celles de la méthode de dilution à 3 tubes.

La recherche des salmonelles, ainsi que la détermination du sérotype, en l'absence de technique quantitative adéquate, est pratiquée sous une forme qualitative (présence/absence), dans le but d'évaluer la fréquence de leur présence dans le milieu marin.

7.4.2 CHOIX DU COQUILLAGE DE REFERENCE

Le choix du coquillage dépend de l'objectif de l'étude. L'espèce et le mode de culture sont des variables appelées "stratificateurs". Les résultats obtenus varient suivant les espèces de coquillages, leur mode de culture, les caractéristiques des biotopes. Des espèces de coquillages différents et des modes de culture différents donnent des résultats très hétérogènes. Ces données acquises dans des conditions différentes (espèces, modes de culture) réduisent les possibilités de traitement et d'interprétation des résultats. Dans ce cas les données recueillies devront permettre leur traitement de manière séparée.

Objectif santé publique

Il est fréquent de rencontrer plusieurs espèces de coquillages en élevage sur le même site, huîtres et moules le plus souvent, parfois associées à des palourdes et plus rarement à des coques, contrairement aux gisements naturels où les espèces se développent sur des zones individualisées. L'étude devra alors porter sur les différentes espèces de coquillages en tenant compte de leur mode de culture.

L'intérêt d'un pré-échantillonnage est particulièrement évident dans une telle situation. Les résultats obtenus renseignent sur la conduite à tenir concernant la stratégie d'échantillonnage à adopter, et notamment sur l'opportunité de retenir telle ou telle espèce de coquillages ou mode de culture en fonction du niveau de contamination de la zone étudiée.

Objectif environnemental

Le choix de la moule, qui est un bon intégrateur des flux de pollution, sera généralement le plus judicieux. En zone de marais, où les fluctuations saisonnières de la salinité des eaux marines sont particulièrement importantes, la palourde semble plus intéressante. Elle résiste bien aux fortes et aux faibles salinités si les variations sont progressives.

7.4.3 SELECTION DES UNITES D'ECHANTILLONNAGE

L'effort d'échantillonnage spatio-temporelle est défini, respectivement, par le nombre d'unités d'échantillonnage ou stations de prélèvement, et par le nombre de séries d'échantillons prélevés pendant la période de l'étude. Cet effort dépend de la connaissance préalable du secteur concerné, des conclusions tirées du pré-échantillonnage, et de la profondeur de vue du chercheur, y compris pendant le déroulement de l'étude, afin de saisir l'opportunité d'étudier certaines échelles de variabilités temporelles, à l'occasion de facteurs météorologiques particuliers, notamment si l'objectif est environnemental. Les premières séries de prélèvement

peuvent, éventuellement, servir de pré-échantillonnage, afin d'affiner le nombre de stations de prélèvements à échantillonner durant l'étude. L'effort d'échantillonnage dépendra ensuite de contraintes telles que les possibilités de prélèvements sur le terrain, d'analyses au laboratoire et les éventuels impératifs financiers.

Stations de prélèvement: taille et nombre

La taille de la station d'échantillonnage a une conséquence sur la précision des résultats et sur l'appréciation du degré d'hétérogénéité de la zone étudiée. Il est donc préférable, sinon indispensable, de choisir une surface de petite taille identique à chaque station, afin que les prélèvements soient effectués de manière la plus homogène possible.

Chaque station sera localisée et signalée par un repère, s'il s'agit d'une concession, ou le plus précisément possible s'il s'agit d'un gisement naturel. Dans le premier cas, il est pratique de retenir pour surface unitaire: une poche à huîtres, un mètre carré (huîtres et moules à plat), un ou deux mètres carrés pour les coquillages fousseurs (palourdes et coques), un ou deux bouchots ou cordes de moules, etc.

Les limites de la zone étudiée doivent être localisées avec précision, et l'accès à toutes les stations doit être possible, pendant la durée de l'étude, afin d'effectuer les prélèvements nécessaires. Les cartes des zones concédées et des gisements naturels classés, disponibles aux Affaires Maritimes, facilitent cette délimitation. Cependant, une ou plusieurs visites de terrain s'impose pour noter les zones réellement exploitées, vérifier la présence des coquillages aux stations prévues, et identifier toutes les contraintes opérationnelles (niveau des basses mers de mortes-eaux, durée des prélèvements, etc.).

La finesse de résolution spatiale recherchée, qui est fonction de l'hétérogénéité apparente de la zone et de sa taille, permet de définir, *a priori*, le nombre de stations de prélèvements. En l'absence d'informations suffisantes un pré-échantillonnage est indispensable. Quelques exemples concrets permettent d'illustrer le nombre de stations à retenir (cf. paragraphe 7.4.4).

Prélèvements: mode et nombre de coquillages

Le mode de prélèvement ainsi que le nombre de coquillages prélevé ont des conséquences sur la précision des résultats. Choisir un échantillon représentatif de la station consiste à prélever au hasard dans une poche, un filet, un mètre carré, etc., un certain nombre de coquillages parmi un nombre plus important de coquillages de taille voisine, récolté en différents endroits de la station prédéfinie. Cette technique devra être identique à chaque station pendant la durée de l'étude, afin de ne pas introduire de nouvelles sources de variabilité, c'est-à-dire d'erreurs supplémentaires. Il est intéressant de noter à l'occasion des prélèvements les caractéristiques physico-chimiques de l'eau (température, salinité, turbidité), qui peuvent être utiles lors de l'interprétation des résultats.

Le protocole d'analyse fixe la quantité nécessaire de chair et de liquide intervalvaire à environ 50 grammes. Le nombre de coquillages de taille voisine devra être identique pendant la durée de l'étude et permettre, au minimum, de recueillir 50 grammes de broyat, quelles que

soient les variations saisonnières. En pratique, ce poids sera obtenu avec 5 huîtres, 7 ou 8 moules, 9 à 12 palourdes de taille moyenne, 10 à 12 coques d'environ 30 millimètres. Il est préférable, en cas de besoin, de disposer des échantillons aux stations afin de prélever des coquillages de taille moyenne, ou petite pour les huîtres, dans le but d'en analyser un nombre suffisant et plus représentatif.

Choix des sous-zones ou strates

La nécessité d'un découpage en sous-zones apparaît d'emblée dans un secteur très hétérogène et de grande dimension. Le découpage en strates peut correspondre à des divisions naturelles comme les bassins versants, ou certaines zones identifiables sur estran. Il permet de varier l'effort d'échantillonnage en fonction de la dimension et de l'hétérogénéité apparente des strates, et le choix de plans de sondage différents suivant les strates. Il augmente la précision des résultats et permet de mettre en évidence des zones ou sous-zones homogènes. Un bassin versant principal peut donc être divisé en un ou plusieurs bassins secondaires (cas des marais), de même qu'une zone sur estran en fonction des étiers, ou de grands secteurs de concessions (baies du Mont Saint-Michel, de Quiberon ou de Bourgneuf-en-Retz, bassin d'Arcachon, étang de Thau).

La surface des zones concédées sur les côtes (Inventaire des secteurs conchylicoles du littoral français, IFREMER, 1984), varie de 50 à 1000 hectares, et celles des gisements naturels de 25 à 400 hectares. La plupart de ces zones ont une dimension, comprise entre 50 et 200 hectares, qui facilite le déroulement de l'étude sur le plan opérationnel. En cas de besoin, les secteurs de dimension plus importante peuvent être divisés en sous-zones.

Choix des échelles d'observations

La définition d'une échelle d'observation comporte deux éléments distincts: l'amplitude du domaine échantillonné et la finesse spatio-temporelle des observations, celle-ci étant fonction des hétérogénéités des flux de pollution dans l'espace et le temps. L'appréciation des échelles significatives est laissée à l'intuition du chercheur.

La périodicité des séries de prélèvements ne doit pas être systématiquement en phase avec le phénomène des marées afin de ne pas biaiser l'étude annuelle des flux de pollution. Une solution est d'échantillonner à une semaine d'intervalle dans chaque mois (09/01, 16/01, 9/02, 16/02, ..., 9/12, 16/12).

Le choix d'une période p de prélèvements, très inférieure aux cycles de marée, dont on veut étudier l'influence, du moins à certaines périodes caractéristiques sur le plan climatologique ou de l'affluence touristique estivale, est indispensable. Un prélèvement bimensuel est donc un minimum, associé à un certain nombre de séries hebdomadaires, ou tous les 48 ou 72 heures par exemple.

Choix du plan de sondage

La population de stations de prélèvement étant très élevée (10^6 pour 100 hectares, si la station définie mesure un m^2), il est impossible de les recenser matériellement et techniquement, et de pratiquer un échantillonnage aléatoire.

L'échantillonnage systématique est recommandé pour répartir régulièrement dans l'espace ou dans le temps un nombre défini de stations de prélèvement. Il permet de couvrir la totalité de la surface étudiée par une grille de stations équidistantes, ou de les répartir dans le lit d'un étier.

La répartition des stations de prélèvements dans le lit d'un étier ou d'un réseau d'étiérs se calcule de la manière suivante. A partir du nombre de stations projeté n et de l'intervalle I de distance à étudier, on définit la période $p = I/n$. Du début de l'intervalle I à la valeur p , un point i , qui servira de base à la progression arithmétique, est alors choisi aléatoirement. Si l'étier principal possède plusieurs ramifications secondaires ou tertiaires, l'intervalle de distance I est la somme de l'ensemble des distances à étudier.

La répartition spatiale des stations de prélèvements se fera de la même façon en calculant la période $p = \sqrt{\frac{S}{n}}$ et en fixant aléatoirement la base i dans un premier carré de côté égal à p . Tous les autres points sont équidistants. La disposition en quinconce maximise les distances entre les stations.

Dans le cas où le secteur étudié est divisé en sous-zones ou strates, un échantillonnage systématique différent peut être pratiqué dans chaque strate.

7.4.4 EXEMPLES DE PLANS DE SONDAGE SYSTEMATIQUE

7.4.4.1 Baie ouverte

Le gisement naturel émergent de coques de la plage Benoît s'inscrit dans une surface d'environ 160 hectares (Fig.10). Le nombre de stations de prélèvements est fixé à 10, *a priori*, compte tenu des résultats du pré-échantillonnage et de l'importance du gisement. La formule $a = \sqrt{S/n}$ ($S = 160$ ha, $n = 10$) donne, pour un carré, un côté $a = 400$ mètres. Un quadrillage du gisement est réalisé en prenant pour axe central le secteur le plus productif, puis une station est déterminée dans chaque carré, dans la limite du gisement.

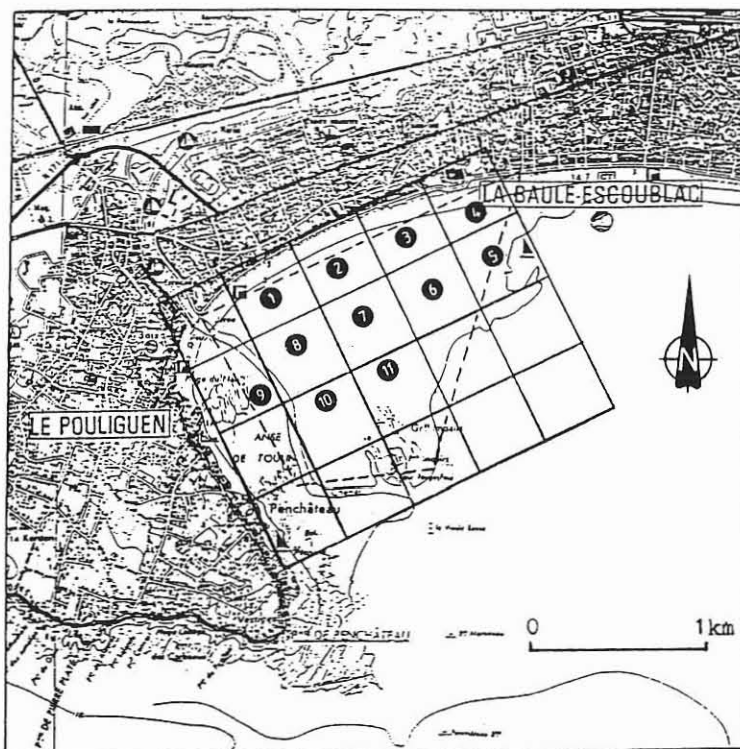


Fig. 10: Localisation des stations de prélèvements sur le gisement naturel de coques de la plage Benoît en baie du Pouliguen – Loire-Atlantique (Catherine et al., 1991).

7.4.4.2 Littoral rectiligne

ZONE DE BOUCHOTS

Dans une étude sur l'application de la géostatistique à la cartographie de la pollution fécale de la zone de bouchots du Havre de la Vanlée (Normandie), Beliaeff et Cocharde (publication en cours) ont utilisé un maillage très fin dans l'échantillonnage systématique. Les bouchots s'étendent sur environ 7 kilomètres de long et un kilomètre de large, face à l'embouchure de la Vanlée. A partir des cartes des concessions, 62 stations équidistantes de 250 mètres ont été déterminées sur les lignes de bouchots (Fig. 11).

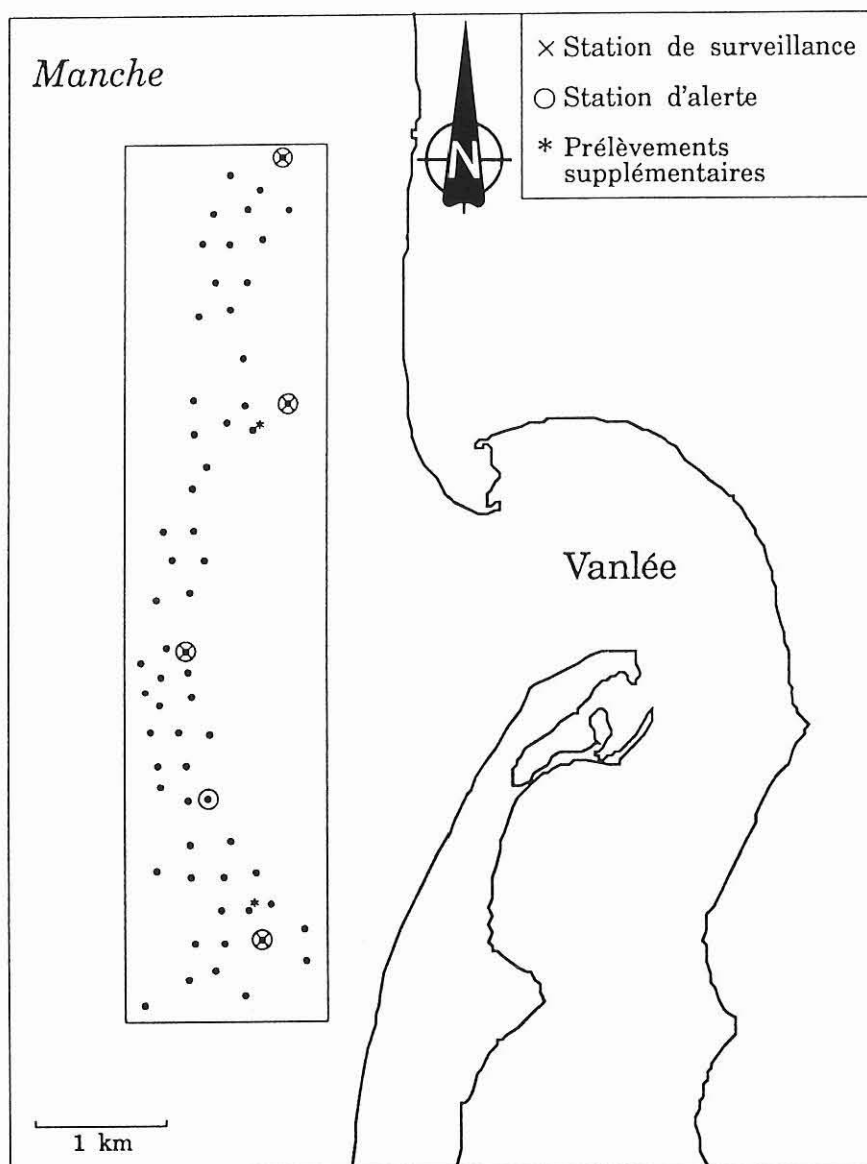


Fig. 11: Localisation des stations de prélèvements sur la zone de bouchots de la Vanlée – Normandie (Beliaeff et Cochard, publication en cours).

ZONE OSTREICOLE

La zone ostréicole de La Bernerie-en-Retz et des Moutiers-en-Retz s'étend sur deux kilomètres de côte. Elle est constituée de deux parcelles distinctes, mais proches, d'une surface totale de 80 hectares. Il s'agit d'une zone d'élevage d'huîtres en poches sur des tables, dont le niveau de contamination est faible.

La couverture systématique de la zone conduit à disposer un nombre minimum de stations de prélèvements, approximativement, sur deux lignes, soit 7 stations équidistantes de 450 mètres (Fig. 12). Ce nombre pourrait être réduit à 5 stations sur un transect en fonction des premiers résultats ou d'un pré-échantillonnage.

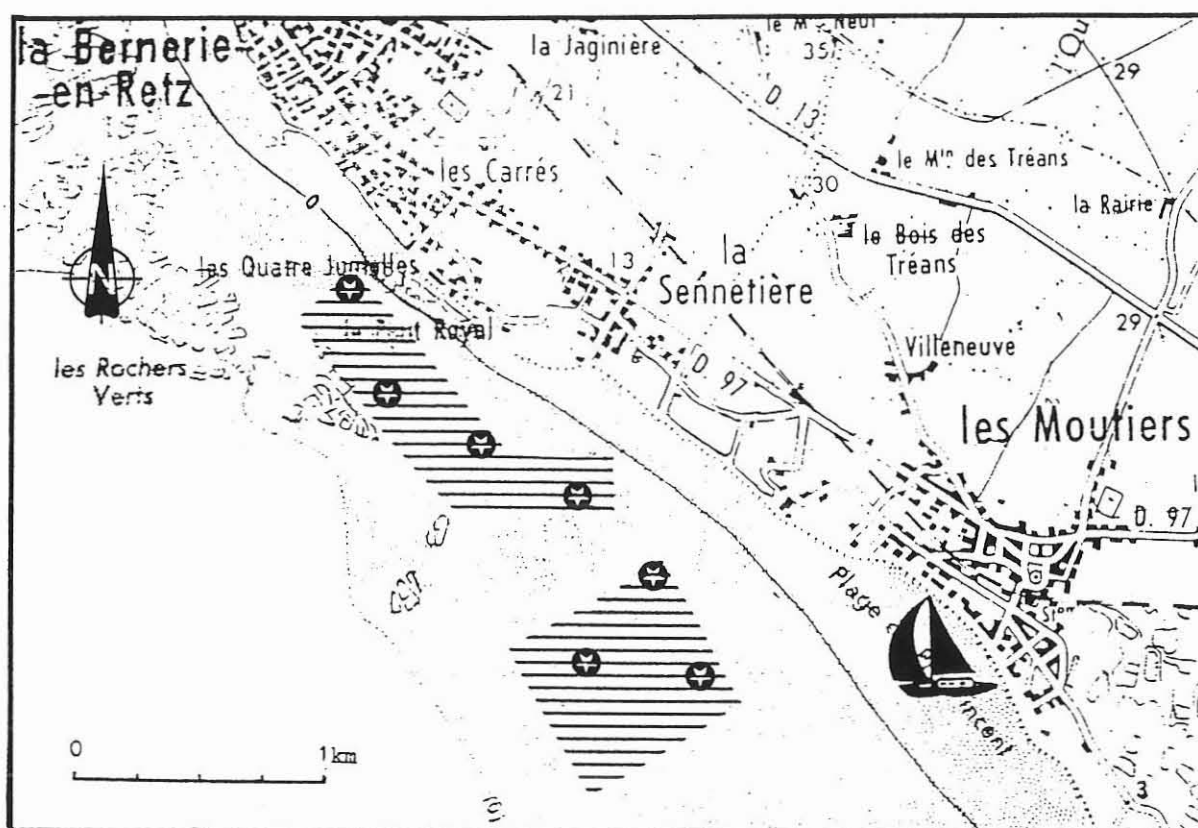


Fig. 12: Localisation des stations de prélèvements sur la zone ostréicole de La Bernerie – Les Moutiers (Loire-Atlantique).

7.4.4.3 Zone de marais

Les marais salants du bassin du Mes – Loire-Atlantique, d'une superficie totale d'environ 650 hectares, sont constitués de trois parties distinctes géographiquement: les marais d'Assérac (1): 350 ha, de Saint Molf (2): 200 ha, de Mesquer (3): 100 ha, qui entourent une baie fermée, le secteur ostréicole de Pen Bé/Mesquer (4), qui comprend 90 hectares de concessions (Fig. 13).

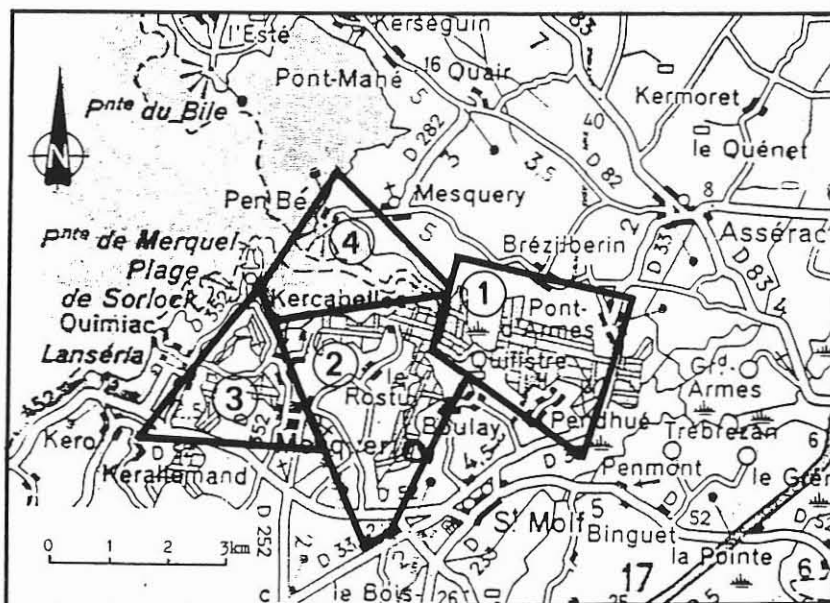


Fig. 13: Plan de situation des marais salants du bassin du Mes et de la zone ostréicole de Pen Bé/Mesquer (Loire-Atlantique).

Un échantillonnage systématique a été réalisé dans les marais d'Assérac, avec une répartition des stations de prélèvements basée sur la surface, tenant compte des élevages de coquillages et des possibilités futures des prises d'eau dans les étiers secondaires (Catherine et al., publication en cours). L'objectif était de mesurer la salubrité des palourdes en élevage dans les conditions d'exploitation actuelles. Le plan de localisation des stations est représenté page 62 (Fig. 6).

Un échantillonnage systématique linéaire est réalisé pour l'étude de salubrité des marais de Mesquer, dans la partie permettant le développement de la vénéiculture. Le nombre de stations de prélèvements est fixé en fonction des ramifications secondaires des étiers, pouvant apporter des pollutions, et la nécessité d'une répartition régulière de ces stations.

La longueur des étiers principaux est ensuite mesurée au curvimètre sur une carte au $1/25\,000^{\text{ème}}$. La période $p = L/n$, calculée en fonction du nombre de stations défini ($n = 8$), est de 500 mètres. La première station est fixée en aval, puis les autres sont ensuite reportées tous les 500 mètres (Fig. 14).



Fig. 14: Localisation des stations de prélèvements dans les étiers des marais salants de Mesquer (Loire-Atlantique).

7.4.5 STRATEGIES A ADOPTER EN FONCTION DES OBJECTIFS

Objectif environnemental

Le choix d'un plan de sondage systématique permet de comprendre et de décrire la répartition spatiale des flux de pollution. Leur évolution dans le temps sera connue en choisissant un petit nombre de situations caractéristiques de l'incidence des facteurs météorologiques et de l'affluence touristique. Un tel plan de sondage, systématique sur le plan spatial, et dit à "choix raisonné" sur le plan temporel, est peu contraignant car on l'arrête dès que l'objectif recherché est atteint.

En pratique, quelques séries de prélèvements, espacées de 24 ou 48 heures en mortes-eaux et vives-eaux après une période de pluie, de sécheresse, d'affluence touristique, devraient suffire. La difficulté consiste à définir les périodes réellement défavorables, afin d'échantillonner au moment voulu. Or, cette recherche fait partie des hypothèses de l'étude. En réalité, le nombre de séries de prélèvements sera plus important que celui prévu initialement.

Objectif santé publique

La stratégie à adopter est liée à l'application nationale de la directive du Conseil (CEE) du 15 juillet 1991, dont l'échéance est fixée au 1er janvier 1993. Les conséquences de cette réglementation sont lourdes de conséquence pour l'avenir des professionnels, car elle définit les zones permettant l'expédition des coquillages pour la consommation humaine directe, comme étant celles où la contamination est inférieure à 300 C.F./100 ml, sans dépassement de cette valeur. L'imprécision des mesures de densité bactérienne pose un problème pour les conséquences d'une telle décision.

Il est fort probable que le choix fait pour la réglementation nationale conduise à mesurer les fluctuations annuelles, en vue du classement des zones conchylicoles dans les trois catégories définies et dans le but de localiser les emplacements et les limites de production et de reparcage:

- catégorie A: contamination inférieure à 300 C.F./100 ml,
- catégorie B: contamination inférieure à 6 000 C.F./100 ml dans 90% des échantillons,
- catégorie C: contamination inférieure à 60 000 C.F./100 ml.

Une telle décision conduit au choix d'un échantillonnage systématique sur le plan spatial et temporel. Plusieurs cas types sont à examiner:

Zone en catégorie A

Les résultats obtenus par le réseau microbiologique d'IFREMER (REMI) depuis 1989, permettent de déterminer les secteurs conchylicoles dont la contamination est inférieure à 300 C.F./100 ml. Une étude plus fine ne semble pas utile.

Zone en catégorie B ou C

Le choix des limites s'impose, et deux cas se présentent, suivant que le secteur est suffisamment grand pour qu'il puisse être divisé en deux zones, A et B par exemple. Le classement actuel des secteurs conchylicoles en zones salubres et insalubres, sur la base de l'arrêté de 1976, permet de considérer que le choix de la limite à déterminer réside essentiellement entre ces deux zones.

L'importance de la délimitation des zones sur le plan de la santé publique et de l'économie, a pour conséquence le choix d'une résolution plus fine dans la répartition spatiale des stations de prélèvements, afin d'augmenter la précision des résultats.

Dans le cas d'une zone contaminée au-delà de 300 C.F./100 ml, trop petite pour être divisée, les résultats obtenus par le réseau microbiologique devraient permettre un classement en catégorie B. Mais, il est à craindre qu'une telle proposition, basée sur un petit nombre de résultats mensuels, serait fortement contestée, ainsi qu'un plan de sondage systématique à choix raisonné sur le plan temporel.

Les conséquences du classement de zone en catégorie B sont également très importantes, car les coquillages provenant de telles zones sont soumises, soit à un reparcage en zone A, mais à l'écart des zones d'élevage, soit à un traitement en station de purification.

Outre ces considérations, le nombre élevé de zones conchylicoles contaminées au-delà de 300 C.F./100 ml, notamment les zones d'élevage et les gisements moulières et celles concernant les coquillages fousseurs, souligne l'importance des études à mener dans ce domaine.

7.4.6 METHODE D'ANALYSE BACTERIOLOGIQUE

La méthode de référence est le dénombrement des coliformes fécaux, pour 100 grammes de chair de coquillage et de liquide intervalvaire, en milieu liquide par la méthode de dilution des séries de tubes, dont l'interprétation numérique est donnée par la méthode du Nombre le Plus Probable (NPP). La directive CEE du 15 juillet 1991 recommande la méthode de dilution à 5 tubes ou tout autre méthode reconnue au moins équivalente. L'analyseur Malthus, prochainement disponible à l'IFREMER, est étalonné sur la méthode de dilution à 3 tubes, dont la précision est moindre que la précédente.

7.4.7 PLAN D'ANALYSE DES DONNEES

Recueillir des données sans se préoccuper de leur traitement ultérieur peut conduire à une impasse, car l'inférence statistique *via* l'analyse des données est en bonne partie déterministe. En un mot, le choix du plan d'échantillonnage détermine le choix des traitements de données.

Le plan d'analyse des données découle du plan d'étude des différentes sources de variabilité étudiées. Celles-ci seront donc définies préalablement au choix du plan de sondage.

Le plan d'analyse des données comportera le calcul des estimateurs, et l'indication des tests non-paramétriques retenus, en relation avec les logiciels de traitement disponibles. C'est le moment de s'assurer de l'accès aux moyens de calcul nécessaires et des connaissances d'un statisticien, en cas de besoin.

7.5 CONCLUSION

Avant d'entreprendre toute étude, la recherche de toutes les informations relatives au secteur concerné permet:

- de rassembler les connaissances nécessaires à la rédaction d'un rapport initial complet et documenté, et surtout,
- d'entreprendre dans les meilleures conditions la phase de travail essentielle qui est la préparation du protocole d'échantillonnage définissant la stratégie pour la collecte des données et leur traitement ultérieur.

Chaque étape s'enchaîne alors logiquement, rendant plus aisée la rédaction du rapport final, et présentant une étude de qualité:

- détermination et description de la zone d'étude,
- rapport initial sur l'état de la zone littorale et du bassin versant
- protocole d'échantillonnage: plans de sondage et de traitement des données,
- analyse et interprétation des résultats.

L'intérêt d'un guide ou d'une méthode est en général de faire bénéficier chacun de l'expérience acquise, de conseils pratiques. Dans le cas présent, il devrait permettre de contribuer à l'amélioration des connaissances et des techniques pour les études bactériologiques des zones conchylicoles, d'établir des bases plus scientifiques nécessaires à établir des propositions pour la protection du milieu marin et de la santé publique (activités professionnelles et pêche récréative).

8. CONCLUSION GENERALE

Une prise de conscience conduisant à la nécessité de contrôler la qualité des produits et des eaux conchylicoles a eu lieu dès le début du siècle, mais il a fallu attendre le décret du 20 août 1939, qui jeta les premières bases de la réglementation, puis l'arrêté du 12 octobre 1976 pour définir les premières normes de salubrité. La prise en compte des instructions des directives européennes a abouti à la mise en place du réseau de surveillance microbiologique (REMI) des eaux conchylicoles, concernant la bactériologie, par l'IFREMER en 1989.

Le but essentiel de la réglementation a été, tout d'abord de protéger la santé publique, puis de définir les eaux à vocation conchylicole. Il s'agit aujourd'hui d'établir des programmes d'études en vue de réduire la pollution et d'assurer la qualité des eaux conchylicoles en fonction des normes retenues par la toute récente directive du conseil (CEE) du 15 juillet 1991.

L'examen des différentes normes, "MILIEUX" et "PRODUITS", montrent qu'elles ne sont pas satisfaisantes, tant sur les seuils de contamination que sur la fiabilité des germes tests de la contamination fécale qui sont peu représentatifs de la présence des bactéries pathogènes.

Les épidémies de salmonelloses, attribuées à la consommation des coquillages, ont régressé, ces dernières années dans les pays appliquant les normes sanitaires. Au contraire, celles d'origine virale ont été mises en évidence en Australie, aux U.S.A. et en Grande-Bretagne, y compris en provenance de zones bactériologiquement salubres ou après traitement en station de purification.

Le choix des indicateurs de contamination fécale est donc un problème qui reste entier dans l'état actuel des connaissances et des techniques de numération. L'évolution récente de ces techniques, permettant le dénombrement direct des cellules viables, a mis en évidence de très nombreuses cellules stressées, non dénombrées par les techniques utilisées en routine, et qui conserveraient leur pouvoir pathogène. De plus, sur le plan bactérien, certains auteurs considèrent que la recherche de *Streptococcus faecalis* est plus significative que celle d'*Escherichia coli* pour estimer la salubrité des coquillages, du fait d'un temps de survie plus important en milieu marin. Sur le plan viral, les recherches menées n'ont pas encore abouti à la mise en évidence des virus pathogènes dans les coquillages, ni au choix d'un indicateur.

Des programmes de recherche en épidémiologie sont reconnus indispensables pour définir les seuils de contamination à ne pas dépasser dans les zones conchylicoles. Une étude épidémiologique récente menée aux U.S.A., dans l'Etat de Virginie sur deux groupes de volontaires, montre que de telles études sont possibles et donnent des résultats dans certaines conditions.

Un bref aperçu des problèmes soulevés, dont l'imprécision des mesures de densité bactérienne, pour établir des normes de salubrité plus fiables montre l'étendue des recherches à mener sur le pouvoir pathogène en milieu marin des germes tests de la contamination fécale, d'origine bactérienne et virale, et pour la mise en oeuvre de techniques rapides fiables de dénombrement. Les techniques actuelles, même si elles ne donnent pas toute satisfaction,

permettent de mener des études sur la qualité bactériologique des eaux conchylicoles en utilisant les coquillages comme intégrateur de la pollution marine.

L'analyse critique d'une vingtaine de rapports d'études réalisés par les laboratoires côtiers d'IFREMER/DEL, avec des objectifs plus ou moins différents, montre:

- qu'ils s'orientent de plus en plus vers la recherche des causes de pollution et la proposition en vue d'améliorer l'assainissement des zones littorales,
- que seul un petit nombre a fait l'objet d'un traitement statistique. L'absence de choix d'un plan de sondage probabiliste, sauf exception, a entraîné un certain nombre d'erreur dans l'utilisation des tests statistiques et l'interprétation des données, soulignant l'importance de consulter un statisticien dès la conception de l'étude et les besoins de formation en ce domaine

Très peu de travaux de microbiologie marine ont eu pour but l'étude et la mise en place de stratégies d'échantillonnage. Ceux d'IFREMER concernant la conchyliculture sont très récents (Mazurié, 1988; Miossec, 1990). La mise en évidence des niveaux de contamination bactériologique sur l'ensemble d'une zone conchylicole, la description de sa répartition spatiale et la compréhension du fonctionnement du système naturel analysé nécessite la mise en place d'une stratégie d'échantillonnage adaptée aux problèmes posés, et conduisant à établir le modèle du plan de sondage.

L'examen de différents plans de sondage montre que l'échantillonnage systématique est celui qui apparaît le plus adapté aux études bactériologiques des zones conchylicoles. Il reste un mode de sélection "aveugle" comme l'échantillonnage aléatoire simple, et il est recommandé pour répartir uniformément des stations de prélèvements dans l'espace, le lit d'un étier ou sur une surface, et dans le temps.

L'inférence de conclusions, *via* l'analyse de données, est en bonne partie, déterminée par le plan de sondage. Il doit donc y avoir correspondance entre le plan d'échantillonnage et le traitement prévu des données.

L'étude de différentes sources de variabilité spatiale dans le dénombrement des coliformes fécaux et de l'évolution des contaminations d'une zone de production de palourdes en marais, en fonction des marées, montrent:

- l'intérêt de l'analyseur Malthus quant à la fiabilité et la rapidité de la méthode,
- l'importance de l'étude des différents niveaux de variabilité spatiale des résultats,
- la nécessité d'étudier l'évolution journalière des niveaux de contamination qui est fortement marquée par l'influence de la marée, notamment en fonction de certaines périodes climatiques caractéristiques.

L'examen critique d'un certain nombre d'études de salubrité réalisé par les laboratoires côtiers d'IFREMER/DEL, et l'étude de la théorie de la stratégie d'échantillonnage ont permis de jeter les premières bases d'un guide méthodologique pour les études de la qualité des zones à vocation conchylicole.

L'analyse des différentes stratégies d'échantillonnage à adopter en matière de santé publique, en fonction d'hypothèses concernant l'application nationale de la directive du Conseil (CEE) du 15 juillet 1991, met en évidence la nécessité d'une planification des études de zones conchylicoles sur l'ensemble du littoral français.

9. BIBLIOGRAPHIE

Berthomé J.P., P. Le Mao, H. Rey, D. Nguyen, 1987. Aménagement de la baie du Mont Saint-Michel. Les possibilités de développement de la vénériculture. R. Int. IFREMER DRV-87.011-CSRU/Nantes.

Baleux B., M. Trousselier, P. Got, P. Montfort, J. Alibou, N.-E. Mezrioui, 1988. Devenir des bactéries "témoins de contamination" et des germes pathogènes d'origine continentale dans les eaux, les sédiments et les productions conchylicoles d'un étang saumâtre. *Océanis*, **14**, 61-70.

Block J.C., D. Prieur, 1988. Microbiologie et virologie marines. *Océanis*, **14**, 113-116.

Catherine M., B. Beliaeff, A. Pezeron, 1991. Etude de salubrité du gisement naturel de coques (*Cerastoderma edule*) de la plage Benoît en baie du Pouliguen - Loire-Atlantique (1989-1990). R. Int. IFREMER DEL/91.04- Nantes.

C.C.P.M., 1986, 1987, 1988, 1989. Rapport sur la production de l'industrie des pêches maritimes.

C.C.P.M., 1986, 1987, 1988, 1989. Rapport sur le commerce extérieur des produits de la pêche.

Chevalier R., E. Gondeaux, C. Koutsikopoulos, B. Mesnil, 1988. Séminaire d'initiation à la théorie et à la pratique des sondages. Recueil des exposés. R. Int. IFREMER DRV-88.027-RH/Nantes.

Delattre J.M., 1988. Indicateurs fécaux et stress en milieu marin: étude des variations à court terme. *Oceanis*, **14**, 89-95

De Man J.C., 1983. MPN Tables, corrected. *Eur. J. Appl. Microbiol.*, **17**, 301-305.

Dupont J., D. Menard, C. Hervé, F. Chevalier, B. Minier, 1989. Application de la mesure de la conductance à la colimétrie des coquillages marins vivants. Premiers résultats. R. Lab. LCMA IFREMER/DRV/CSRU/Nantes.

Frontier S., 1983 a. Introduction. *In*: Stratégies d'échantillonnage en écologie, edited by S. Frontier, Masson, Paris, 1-11.

Frontier S., 1983 b. Choix et contraintes de l'échantillonnage écologique. *In*: Stratégies d'échantillonnage en écologie, edited by S. Frontier, Masson, Paris, 15-62.

Gauthier M., C. Pietri, 1989. Devenir des bactéries et virus entériques en mer. *In*: Micro-organismes dans les écosystèmes océaniques. Masson, Paris, 319-342.

Gregg M. B., 1989. Le pouvoir de l'épidémiologie dans la pratique de la santé publique. B.E.H. – Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire n°14.

IFREMER, 1984. Inventaire des secteurs conchylicoles du littoral français.

ISTPM, 1982. Inventaire cartographique des zones littorales classées insalubres.

Lambert L., 1943. Le contrôle de la salubrité des coquillages: l'application du décret du 20 août 1939. – *Rev. Trav. Off. Pêch. Marit.*, **13**, 565–76.

Legendre P., L. Legendre, 1990. Structure spatio-temporelle des variables en océanographie. Problèmes d'analyse numérique et méthodes d'analyse spatiale. IFREMER, Actes de Colloques, **10**, 1990, 7–12.

Legendre P., L. Legendre, 1983. Echantillonnage et traitement des données. *In*: Stratégies d'échantillonnage en écologie, edited by S. Frontier, Masson, Paris, 163–216.

Maul A., D. Vagot, J.C. Block, 1989. Stratégies d'échantillonnage pour analyse microbiologique sur réseaux de distribution d'eau. Techniques et documentation Lavoisier, Paris, 112 p.

Mazières J., 1963. Les coliformes dans les eaux marines et les huîtres. Application à l'hygiène ostréicole. *Rev. Trav. Inst. Pêch. Marit.*, **27**, 111 p.

Mazurié J., 1988. Stratégie d'échantillonnage en conchyliculture. R. Int. IFREMER/DRV-88-001-RA/La Tremblade.

Miossec L., 1990. Mise en place d'un réseau de surveillance microbiologique du littoral français. R. Int. IFREMER DRV-90.03 – CSRU/Nantes.

O.M.S., 1977. Directives applicables à la surveillance sanitaire de la qualité des eaux littorales.

Pinot M., F. Riou, J. Chaperon, 1988. Impact sanitaire de la consommation de coquillages bivalves filtreurs. Rapport de l'Université de Rennes I.

Plusquellec A., 1984. Contribution à l'étude de la pollution bactérienne des eaux littorales. Cas particulier de la Baie de Concarneau – La Forêt. Thèse 3e cycle. Université de Bretagne Occidentale.

Poggi R., 1986. Epidémiologie en zone littorale conchylicole. *Oceanis*, **13**, 439–448.

Poggi R., 1986. Qualités requises des eaux conchylicoles et organisation de leur surveillance. TSM, L'eau, n° 11, 530–538

Poggi R., 1988. La qualité des eaux du littoral et technologie d'exploitation des marais (cultures marines et environnement). Les premières rencontres interrégionales "Recherche appliquée à la gestion des ressources vivantes marines".

Poggi R., 1990. Impacts sanitaires des contaminations microbiologiques. IFREMER. Actes de colloques, **11**, 115–132. Bendor, 13–15 juin 1990.

Pommepuy M., M. Cormier, L. Brunel, M. Breton, 1987. Etude de la flore bactérienne d'un estuaire breton (Elorn, Rade de Brest, France). *Oceanologica acta*, **10**, 187–196.

Scherrer B., 1983. Techniques de sondage en écologie. *In*: Stratégies d'échantillonnage en écologie, edited by S. Frontier, Masson, Paris, 63–162.

Schwartz D., 1963. Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes. Flammarion Médecine Sciences, 318 p.

Schwartzbrod L., 1990. Les contaminations par les virus. La Mer et les Rejets Urbains. Bendor, 13–15 juin 1990. IFREMER, Actes de colloques, **11**, 101–114.

SOGREAH Ingénieurs Conseils, 1983. Rejets en mer par émissaire. Guide pour l'étude du milieu marin.

Trousselier M., A. Maul, B. Baleux 1989. Stratégies d'échantillonnage. *In*: Micro-organismes dans les écosystèmes océaniques. Masson, Paris, 27–62.

Trousselier M., B. Baleux, P. André, 1986. Echantillonnage de variables bactériologiques dans les milieux aquatiques. *In*: GERBAM. IFREMER, Actes de Colloques, **3**, 23–33.

Underwood A. J., 1981. Techniques of analysis of variance in experimental marine biology and ecology. *In*: *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, **19**, 513–605. Margaret Barnes, Ed., Aberdeen University Press.] *

White H., 1989. Relationship of growing water quality to incidence of gastroenteritis in consumers of raw shellfish. Interstate Seafood Quality Seminar Ocean City, Maryland, October 18, 1989.

Yach D., J.L. Botha, 1986. Epidemiological research methods. Part I., Why epidemiology ? *SAMJ*, **70**, 267–270.

10. LISTE DES ANNEXES

ANNEXE 1 : Décret du 20 août 1939

ANNEXE 2 : Arrêté du 12 octobre 1976

ANNEXE 3 : Directive du Conseil (CEE) du 30 octobre 1979

ANNEXE 4 : Directive du Conseil (CEE) du 15 juillet 1991 (extraits)

ANNEXE 5 : Liste des rapports internes IFREMER/DEL

ANNEXE 6 : Notions et définitions en échantillonnage

ANNEXE 7 : Résultats bruts

ANNEXE 1

DECRET DU 20 AOUT 1939

DECRET DU 20 AOUT 1939 (EXTRAITS)

J.O. DU 13.09.1939

SALUBRITE DES HUITRES, MOULES ET AUTRES COQUILLAGES

Art. 1er

Les huîtres, moules et autres coquillages susceptibles d'être consommés crus, les oursins et les violets ne peuvent être livrés à la consommation que suivant les conditions prescrites au présent règlement.

Le contrôle est assuré, dans l'intérêt de la santé publique, sous l'autorité du Ministre de la Marine Marchande, par l'Office Scientifique et Technique des Pêches Maritimes, en collaboration avec les organismes sanitaires locaux ou régionaux désignés par le Ministre de la Santé Publique.

En cas de désaccord entre l'Office Scientifique et Technique des Pêches Maritimes et les organismes sanitaires : locaux ou régionaux ci-dessus visés, il est statué par le Ministre de la Marine Marchande après avis du Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France, les représentants de l'Office entendus.

Les dispositions des deux alinéas précédents sont applicables notamment aux opérations prévues aux articles 2, 3, 5, 7, 10, 15, 18 et 22 ci-après.

TITRE 1er – Production

Art. 2

Pour l'application du présent décret il est procédé au classement du littoral en zones salubres et insalubres. Ce classement est réalisé par voie de décisions du Ministre de la Marine Marchande, prises sur la proposition du Directeur de l'Office Scientifique et Technique des Pêches Maritimes après consultation des ingénieurs en chef des Ponts et Chaussées du service maritime.

Art. 3

Seuls peuvent expédier ou vendre directement pour la consommation : 1) les établissements dits d'expédition situés dans une zone reconnue salubre et spécialement aménagée à cet effet ; 2) les établissements dits d'élevage situés dans une zone reconnue salubre et justifiant de la salubrité des produits qui y sont traités ; 3) les établissements d'épuration.

La liste de ces établissements est arrêtée par le Ministre de la Marine Marchande sur la proposition du Directeur de l'Office Scientifique et Technique des Pêches Maritimes. Constamment tenue à jour, elle est mise à la disposition du public par l'Office.

Il est délivré par l'Office un certificat à l'exploitant de tout établissement figurant sur cette liste.

Art. 4

Les établissements non inscrits sur la liste visée à l'article 3 ne peuvent contenir de produits ayant atteint la taille marchande qu'avec l'autorisation du Directeur de l'Office Scientifique et Technique des Pêches Maritimes et sous la condition que les dits produits ne soient livrés à la consommation qu'après avoir subi un reparcage ou une épuration.

Art. 5

Il est procédé, dans les conditions prévues par l'article 2 ci-dessus, au classement comme salubres et insalubres des bancs et gisements naturels coquilliers.

Les produits provenant des bancs et gisements naturels reconnus salubres peuvent être livrés directement à la consommation, sous réserve que leurs manipulations soient effectuées dans des conditions définies et sur des emplacements désignés par des décisions du Ministre de la Marine Marchande prises sur la proposition du Directeur de l'Office Scientifique et Technique des Pêches Maritimes.

La pêche des produits visés à l'article 1er est interdite sur les bancs et les gisements naturels reconnus insalubres. Toutefois, elle peut être autorisée, après avis du Directeur de l'Office, par le Ministre de la Marine Marchande qui fixera, dans chaque cas particulier, les conditions dans lesquelles les produits pourront être utilisés (reparcage, épuration, etc.).

Art. 6

Dans chaque quartier d'inscription maritime les dates d'ouverture et de fermeture de la pêche des produits visés à l'article 1er sont fixées par les autorités compétentes de telle sorte qu'il ne puisse y avoir exploitation simultanée des bancs et gisements naturels reconnus salubres et des bancs et gisements naturels reconnus insalubres.

Art. 7

Le Directeur de l'Office Scientifique et Technique des Pêches Maritimes détermine, pour chaque établissement, les conditions dans lesquelles doivent s'effectuer les opérations de reparcage et d'épuration. Les produits soumis aux dites opérations ne peuvent être livrés à la consommation qu'avec son autorisation.

Art.8

Les exploitants des établissements inscrits ou non sur la liste prévue à l'article 3 sont tenus de se soumettre aux inspections nécessitées par l'exécution du présent décret ainsi qu'aux prélèvements effectués en vue du contrôle de la salubrité des eaux et des produits

Art. 9

Le Ministre de la Santé Publique se concerte avec le Ministre de la Marine Marchande sur les mesures nécessaires pour faire cesser les causes d'insalubrité des établissements ostréicoles et coquilliers provenant du faits des tiers.

Art. 10

1 - Tout établissement porté sur la liste visée à l'article 3 qui, en raison de modifications survenues du fait de l'exploitant ou de tiers, ne présente plus les garanties de salubrité auxquelles son maintien sur la liste est subordonné, peut faire l'objet de prescriptions nouvelles.

2. Le Directeur de l'Office Scientifique et Technique des Pêches Maritimes notifie ces prescriptions, par lettre recommandée, à l'exploitant, en lui fixant un délai pour y satisfaire. Dans la huitaine de cette notification, l'exploitant peut former une réclamation devant la Commission instituée par l'article 21.

3. La Commission, convoquée à la diligence de l'Administrateur de l'Inscription Maritime chef du Quartier, se prononce par une délibération motivée qui est notifiée comme ci-dessus à l'exploitant.

4. Si la Commission estime que les prescriptions du Directeur de l'Office sont justifiées, elle fixe à l'exploitant, pour s'y conformer, un nouveau délai qui court du jour de la notification de sa délibération.

5. Faute par l'exploitant d'avoir exécuté les prescriptions ci-dessus visées dans le délai fixé par le Directeur de l'Office ou, en cas de réclamation, par la Commission, le Ministre de la Marine Marchande peut, sur la proposition du Directeur de l'Office Scientifique et Technique des Pêches Maritimes, rayer l'établissement de la liste prévue à l'article 3.

ANNEXE 2

ARRETE DU 12 OCTOBRE 1976

ARRETE DU 12 OCTOBRE 1976

fixant les normes de salubrité des zones conchylicoles.

(Journal officiel du 23 novembre 1976.)

Le ministre de la santé et le secrétaire d'Etat auprès du ministre de l'équipement (Transports),

Vu le décret du 20 août 1939, modifié par les décrets n° 48-1324 du 25 août 1948 et n° 69-578 du 12 juin 1969 ;

Vu l'avis émis par le conseil supérieur d'hygiène publique de France au cours de sa séance du 26 avril 1976,

Arrêtent :

Article 1^{er}.

La salubrité des eaux conchylicoles est déterminée sur la base d'isolement des germes tests de contamination fécale présents dans les coquillages vivant au lieu considéré.

Article 2.

L'évaluation de la contamination est exprimée par les nombres les plus probables de coliformes fécaux trouvés dans 100 millilitres de chair de coquillages broyée et diluée dans les conditions fixées à l'annexe technique au présent arrêté.

Pour tenir compte des fluctuations naturelles dans la charge microbienne des eaux marines, l'évaluation s'effectue sur vingt-six prélèvements échelonnés sur douze mois consécutifs.

Article 3.

Remplissent les conditions nécessaires pour être classées salubres les zones dans lesquelles le nombre de coliformes fécaux par 100 millilitres de chair de coquillages ainsi déterminé est inférieur ou égal à 300.

Les normes sont considérées comme respectées si le nombre des résultats en dépassement n'excède pas cinq en douze mois consécutifs, les teneurs en coliformes pour 100 millilitres de chair restant dans ce cas inférieures à 1 000 pour trois des prélèvements et à 3 000 pour les deux autres.

Article 4.

Les zones ne répondant pas aux conditions fixées dans l'article 3 font l'objet de la procédure de classement en zone insalubre. La récolte des coquillages y est interdite, sauf autorisations données dans les conditions fixées à l'article 5.

Article 5.

Dans les zones classées insalubres, seule la récolte des coquillages, qui doivent faire ensuite l'objet d'une épuration ou d'un reparcage, peut être autorisée par le directeur des affaires maritimes après avis conforme du directeur de l'institut scientifique et technique des pêches maritimes.

Toutefois, lorsque la teneur en coliformes fécaux dépasse 10 000 par 100 millilitres de chair de coquillages dans 25 p. 100 des échantillons, l'autorisation requiert en outre l'avis conforme du directeur départemental de l'action sanitaire et sociale.

Article 6.

Le directeur général de la santé, le directeur des pêches maritimes et le directeur de l'institut scientifique et technique des pêches maritimes sont chargés, chacun en ce qui le concerne, de l'application du présent arrêté, qui sera publié au *Journal officiel* de la République française et au *Bulletin officiel* de la marine marchande.

Fait à Paris, le 12 octobre 1976.

Le ministre de la santé,

Pour le ministre et par délégation :

Le directeur général de la santé,

PIERRE DENOIX.

Le secrétaire d'Etat

auprès du ministre de l'équipement (Transports),

Pour le secrétaire d'Etat et par délégation :

Le secrétaire général de la marine marchande,

JEAN CRAPON.

ANNEXE 3

DIRECTIVE DU CONSEIL (CEE) du 30.10.1979

DIRECTIVE DU CONSEIL

du 30 octobre 1979

relative à la qualité requise des eaux conchylicoles

(79/923/CEE)

LE CONSEIL DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES,

vu le traité instituant la Communauté économique européenne, et notamment ses articles 100 et 235,

vu la proposition de la Commission (1),

vu l'avis de l'Assemblée (2),

vu l'avis du Comité économique et social (3),

considérant que la protection et l'amélioration de l'environnement rendent nécessaires des mesures concrètes destinées à protéger les eaux contre la pollution, y compris les eaux conchylicoles;

considérant qu'il est nécessaire de sauvegarder certaines populations conchylicoles des différentes conséquences néfastes résultant du rejet dans les eaux de mer de substances polluantes;

considérant que les programmes d'action des Communautés européennes en matière d'environnement de 1973 (4) et de 1977 (5) prévoient l'établissement en commun d'objectifs de qualité fixant les différentes exigences auxquelles un milieu doit satisfaire, et notamment la définition des paramètres valables pour l'eau, y compris les eaux conchylicoles;

considérant qu'une disparité entre les dispositions déjà applicables ou en cours de préparation dans les différents États membres en ce qui concerne la qualité requise des eaux conchylicoles peut créer des conditions de concurrence inégales et avoir, de ce fait, une incidence directe sur le fonctionnement du marché commun; qu'il convient donc de procéder, dans ce domaine, au rapprochement des législations prévu à l'article 100 du traité;

considérant qu'il apparaît nécessaire d'assortir ce rapprochement des législations d'une action de la Communauté visant à réaliser, par une réglementation plus ample, l'un des objectifs de la Communauté dans le domaine de la protection du milieu et de l'amélioration de la qualité de la vie; qu'il convient de prévoir à

ce titre certaines dispositions spécifiques; que, les pouvoirs d'action spécifiques requis à cet effet n'ayant pas été prévus par le traité, il convient de recourir à l'article 235;

considérant que, afin d'atteindre les objectifs de la présente directive, les États membres devront désigner les eaux auxquelles elle s'applique et fixer les valeurs limites correspondant à certains paramètres; que les eaux désignées devront être rendues conformes à ces valeurs dans un délai de six ans après la désignation;

considérant que, pour assurer le contrôle de la qualité requise des eaux conchylicoles, il y a lieu de procéder à un nombre minimal de prélèvements d'échantillons et d'effectuer les mesures des paramètres spécifiés à l'annexe; que ces prélèvements pourront être réduits en nombre ou supprimés en fonction des résultats des mesures;

considérant que certaines circonstances naturelles échappent au contrôle des États membres et que, de ce fait, il faut prévoir la possibilité de déroger dans certains cas à la présente directive;

considérant que le progrès technique et scientifique peut rendre nécessaire une adaptation rapide de certaines des dispositions figurant en annexe; qu'il convient, pour faciliter la mise en œuvre des mesures nécessaires à cet effet, de prévoir une procédure instaurant une coopération étroite entre les États membres et la Commission; que cette coopération doit se faire au sein du comité pour l'adaptation au progrès technique et scientifique, institué par l'article 13 de la directive 78/659/CEE du Conseil, du 18 juillet 1978, concernant la qualité des eaux douces ayant besoin d'être protégées ou améliorées pour être aptes à la vie des poissons (6).

considérant que la présente directive ne peut pas, à elle seule, assurer la protection des consommateurs de produits conchylicoles et que, en conséquence, il convient que la Commission présente, dans les meilleurs délais, des propositions à cet égard,

(1) JO n° C 283 du 30. 11. 1976, p. 3.

(2) JO n° C 133 du 6. 6. 1977, p. 48.

(3) JO n° C 114 du 11. 5. 1977, p. 29.

(4) JO n° C 112 du 20. 12. 1973, p. 3.

(5) JO n° C 139 du 13. 6. 1977, p. 3.

(6) JO n° L 222 du 14. 8. 1978, p. 1.

A ARRÊTÉ LA PRÉSENTE DIRECTIVE :

Article premier

La présente directive concerne la qualité des eaux conchylicoles et s'applique aux eaux côtières et aux eaux saumâtres désignées par les États membres comme ayant besoin d'être protégées ou améliorées pour permettre la vie et la croissance des coquillages (mollusques bivalves et gastéropodes) et pour contribuer ainsi à la bonne qualité des produits conchylicoles directement comestibles par l'homme.

Article 2

Les paramètres applicables aux eaux désignées par les États membres figurent à l'annexe.

Article 3

1. Les États membres fixent, pour les eaux désignées, des valeurs pour les paramètres indiqués à l'annexe, dans la mesure où des valeurs apparaissent dans la colonne G ou dans la colonne I. Ils se conforment aux remarques figurant dans ces deux colonnes.

2. Les États membres ne fixent pas de valeurs moins sévères que celles figurant dans la colonne I de l'annexe et s'efforcent de respecter les valeurs figurant dans la colonne G, compte tenu du principe énoncé à l'article 8.

3. En ce qui concerne les rejets des substances relevant des paramètres « substances organo-halogénées » et « métaux », les normes d'émission établies par les États membres en application de la directive 76/464/CEE du Conseil, du 4 mai 1976, concernant la pollution causée par certaines substances déversées dans le milieu aquatique de la Communauté⁽¹⁾ sont appliquées en même temps que les objectifs de qualité ainsi que les autres obligations découlant de la présente directive, notamment celles relatives à l'échantillonnage.

Article 4

1. Les États membres procèdent à une première désignation d'eaux conchylicoles dans un délai de deux ans à compter de la notification de la présente directive.

2. Les États membres peuvent par la suite effectuer des désignations supplémentaires.

3. Les États membres peuvent procéder à la révision de la désignation de certaines eaux en raison notamment de l'existence de facteurs non prévus à la date de la désignation, en tenant compte du principe énoncé à l'article 8.

Article 5

Les États membres établissent des programmes en vue de réduire la pollution et d'assurer que les eaux dési-

gnées soient conformes, dans un délai de six ans à compter de la désignation effectuée conformément à l'article 4, aux valeurs fixées par les États membres conformément à l'article 3 ainsi qu'aux remarques figurant dans les colonnes G et I de l'annexe.

Article 6

1. Pour l'application de l'article 5, les eaux désignées sont censées être conformes à la présente directive si des échantillons de ces eaux prélevés selon la fréquence minimale prévue à l'annexe, en un même lieu de prélèvement et pendant une période de douze mois, montrent qu'elles respectent les valeurs fixées par les États membres conformément à l'article 3 ainsi que les remarques figurant dans les colonnes G et I de l'annexe, en ce qui concerne :

- 100 % des échantillons pour les paramètres « substances organo-halogénées » et « métaux »,
- 95 % des échantillons pour les paramètres « salinité » et « oxygène dissous »,
- 75 % des échantillons pour les autres paramètres figurant à l'annexe.

Si, conformément à l'article 7 paragraphe 2, la fréquence des prélèvements, pour tous les paramètres figurant à l'annexe à l'exception des paramètres « substances organo-halogénées » et « métaux », est inférieure à celle indiquée à l'annexe, les valeurs et remarques susmentionnées doivent être respectées pour tous les échantillons.

2. Le non-respect des valeurs fixées par les États membres conformément à l'article 3 ou des remarques figurant dans les colonnes G et I de l'annexe n'est pas pris en considération dans le calcul des pourcentages prévus au paragraphe 1 lorsqu'il est la conséquence d'une catastrophe.

Article 7

1. Les autorités compétentes des États membres effectuent les échantillonnages dont la fréquence minimale est fixée à l'annexe.

2. Lorsque l'autorité compétente constate que la qualité des eaux désignées est sensiblement supérieure à celle qui résulterait de l'application des valeurs fixées conformément à l'article 3 et des remarques figurant dans les colonnes G et I de l'annexe, la fréquence des prélèvements peut être réduite. S'il n'y a aucune pollution et aucun risque de détérioration de la qualité des eaux, l'autorité compétente concernée peut décider qu'aucun prélèvement n'est nécessaire.

3. S'il se révèle, à la suite d'un prélèvement, qu'une valeur fixée conformément à l'article 3 ou une remarque figurant dans les colonnes G ou I de l'annexe n'est pas respectée, l'autorité compétente détermine si cette situation est le fait du hasard, la

(1) JO n° L 129 du 18. 5. 1976, p. 23.

conséquence d'un phénomène naturel ou est due à une pollution, et adopte les mesures appropriées.

4. Le lieu exact de prélèvement des échantillons, la distance de celui-ci au point de rejet de polluants le plus proche, ainsi que la profondeur à laquelle les échantillons doivent être prélevés sont définis par l'autorité compétente de chaque État membre en fonction, notamment, des conditions locales du milieu.

5. Les méthodes d'analyse de référence à utiliser pour le calcul de la valeur des paramètres concernés sont spécifiées à l'annexe. Les laboratoires qui utilisent d'autres méthodes doivent s'assurer que les résultats obtenus sont équivalents ou comparables à ceux indiqués dans l'annexe.

Article 8

L'application des mesures prises en vertu de la présente directive ne peut en aucun cas avoir pour effet d'accroître, directement ou indirectement, la pollution des eaux côtières ou des eaux saumâtres.

Article 9

Les États membres peuvent, à tout moment, fixer pour les eaux désignées des valeurs plus sévères que celles prévues par la présente directive. Ils peuvent également arrêter des dispositions relatives à des paramètres autres que ceux prévus par la présente directive.

Article 10

Lorsqu'un État membre envisage de désigner des eaux conchylicoles à proximité immédiate de la frontière d'un autre État membre, ces États se consultent pour définir la partie de ces eaux à laquelle la présente directive pourrait s'appliquer ainsi que les conséquences à tirer des objectifs de qualité communs qui seront déterminés après concertation par chaque État membre concerné. La Commission peut participer à ces délibérations.

Article 11

Les États membres peuvent déroger à la présente directive en cas de circonstances météorologiques ou géographiques exceptionnelles.

Article 12

Les modifications nécessaires pour adapter au progrès technique et scientifique les valeurs G des paramètres et les méthodes d'analyse figurant à l'annexe sont arrêtées par le comité institué par l'article 13 de la directive 78/659/CEE et conformément à la procédure prévue à l'article 14 de ladite directive.

Article 13

Aux fins de l'application de la présente directive, les États membres fournissent à la Commission les informations concernant :

- les eaux désignées conformément à l'article 4 paragraphes 1 et 2, sous une forme synthétique.
- la révision de la désignation de certaines eaux conformément à l'article 4 paragraphe 3,
- les dispositions prises en vue de fixer de nouveaux paramètres conformément à l'article 9.

Lorsqu'un État membre a recours à l'article 11, il en informe immédiatement la Commission, en précisant les motifs et les délais.

Plus généralement, les États membres fournissent à la Commission, sur demande motivée de sa part, les informations nécessaires à l'application de la présente directive.

Article 14

1. Les États membres communiquent à la Commission régulièrement, et pour la première fois six ans après la désignation initiale effectuée conformément à l'article 4 paragraphe 1, un rapport détaillé sur les eaux désignées et leurs caractéristiques essentielles.

2. La Commission publie, avec l'accord préalable de l'État membre concerné, les informations obtenues en la matière.

Article 15

1. Les États membres mettent en vigueur les dispositions législatives, réglementaires et administratives nécessaires pour se conformer à la présente directive dans un délai de deux ans à compter de sa notification. Ils en informent immédiatement la Commission.

2. Les États membres communiquent à la Commission le texte des dispositions essentielles de droit interne qu'ils adoptent dans le domaine régi par la présente directive.

Article 16

Les États membres sont destinataires de la présente directive.

Fait à Luxembourg, le 30 octobre 1979.

Par le Conseil

Le président

M. O'KENNEDY

ANNEXE
QUALITÉ REQUISE DES EAUX CONCHYLICOLES

Paramètre	G	I	Méthodes d'analyse de référence	Fréquence nominale d'échantillonnage et de mesure
1. pH unité pH		7 — 9	— Electrométrie La mesure s'effectue <i>in situ</i> en même temps que l'échantillonnage	Trimestrielle
2. Température °C	L'écart de température provoqué par un rejet ne doit pas, dans les eaux conchylocoles influencées par ce rejet, excéder de plus de 2°C la température mesurée dans les eaux non influencées		— Thermométrie La mesure s'effectue <i>in situ</i> en même temps que l'échantillonnage	Trimestrielle
3. Coloration (après filtration) (mg Pt/l)		La couleur de l'eau après filtration, provoquée par un rejet, ne doit pas, dans les eaux conchylocoles influencées par ce rejet, s'élever de plus de 160 mg Pt/l de la couleur mesurée dans les eaux non influencées	— Filtration sur membrane filtrante de 0,45 µm de porosité Méthode photométrique, aux étalons de l'échelle platine-cobalt	Trimestrielle
4. Matières en suspension (mg/l)		L'accroissement de la teneur en matières en suspension provoqué par un rejet ne doit pas, dans les eaux conchylocoles influencées par ce rejet, excéder de plus de 30 % celle mesurée dans les eaux non influencées	— Filtration sur membrane filtrante de 0,45 µm de porosité, séchage à 105 °C et pesée — Centrifugation (temps minimal 5 minutes, accélération moyenne 2.800 à 3.200 g), séchage à 105 °C et pesée	Trimestrielle
5. Salinité (‰)	12 — 38 ‰	— 4; 40 ‰ — La variation de la salinité provoquée par un rejet ne doit pas, dans les eaux conchylocoles influencées par ce rejet, excéder de plus de 10 % la salinité mesurée dans les eaux non influencées	Conductimétrie	Mensuelle

Paramètre	G	Méthodes d'analyse de référence	Fréquence minimale d'échantillonnage et de mesure
6. Oxygène dissout (% de saturation)	≥ 80 %	— Méthode de Winkler — Méthode électrochimique	Mensuelle, avec au moins un échantillon représentatif des faibles teneurs en oxygène se présentant le jour du prélèvement. Toutefois, s'il y a présomption de variations diurnes significatives, au moins deux prélèvements par jour seront effectués
7. Hydrocarbures d'origine pétrolière		Examen visuel	Trimestrielle
8. Substances organohalogénées	La limitation de la concentration de chaque substance dans la chair de coquillage doit être telle qu'elle contribue, conformément à l'article 10, à une bonne qualité des produits conchylicoles	Les hydrocarbures ne doivent pas être présents dans l'eau conchylicole en quantité telle : — qu'ils produisent à la surface de l'eau un film visible et/ou un dépôt sur les coquillages — qu'ils provoquent des effets nocifs pour les coquillages	Semestrielle
9. Métaux Argent Arsenic Cadmium Chrome Cobalt Cuivre Mercure Nickel Plomb Zinc mg/l	La limitation de la concentration de chaque substance dans la chair de coquillage doit être telle qu'elle contribue, conformément à l'article 10, à une bonne qualité des produits conchylicoles	La concentration de chaque substance dans l'eau conchylicole ou dans la chair de coquillage ne doit pas dépasser un niveau qui provoque des effets nocifs sur les coquillages et leur larves	Semestrielle
	La concentration de chaque substance dans l'eau conchylicole ou dans la chair de coquillage ne doit pas dépasser un niveau qui provoque des effets nocifs sur les coquillages et leurs larves Les effets de synergie de ces métaux doivent être pris en considération	Chromatographie en phase gazeuse après extraction par solvants appropriés et purification	Semestrielle
		Spectrométrie d'absorption atomique, éventuellement précédée d'une concentration et/ou d'une extraction	Semestrielle

Paramètre	G		Méthodes d'analyse de référence	Fréquence minimale d'échantillonnage et de mesure
10 Coliformes fécaux/100 ml	≤ 300 dans la chair de coquillage et le liquide intervalvaire (*)		Méthode de dilution avec fermentation en substrats liquides dans au moins trois tubes dans trois dilutions. Recupage des tubes positifs sur milieu de confirmation. Dénombrement selon NPP (nombre le plus probable). Température d'incubation 44 ± 0,5 °C	Trimestrielle
11 Substances influençant le goût du coquillage		Concentration inférieure à celle susceptible de détériorer le goût du coquillage	Examen gustatif des coquillages, lorsque la présence d'une telle substance est présumée	
12 Saxitoxine (produite par les dinoflagellés)				

Abbréviations: G = guide
I = indicative

(*) Toutefois, en attendant l'adoption d'une directive relative à la protection des consommateurs de produits conchyliques, cette valeur devrait être impérativement respectée dans les eaux où vivent les coquillages directement comestibles par l'homme.

ANNEXE 4

DIRECTIVE DU CONSEIL (CEE) DU 15 JUILLET 1991 (EXTRAITS)

II

(Actes dont la publication n'est pas une condition de leur applicabilité)

CONSEIL

DIRECTIVE DU CONSEIL

du 15 juillet 1991

fixant les règles sanitaires régissant la production et la mise sur le marché de mollusques bivalves vivants

(91/492/CEE)

LE CONSEIL DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES,

vu le traité instituant la Communauté économique européenne, et notamment son article 43,

vu la proposition de la Commission⁽¹⁾,

vu l'avis du Parlement européen⁽²⁾,

vu l'avis du Comité économique et social⁽³⁾,

considérant que, en vue de réaliser la mise en place du marché intérieur et d'assurer plus particulièrement le fonctionnement harmonieux de l'organisation commune de marché dans le secteur des produits de la pêche, instituée par le règlement (CEE) n° 3796/81⁽⁴⁾, modifié en dernier lieu par le règlement (CEE) n° 2886/89⁽⁵⁾, il importe que la mise sur le marché des mollusques bivalves vivants ne soit plus entravée par des disparités existant entre les États membres en matière de prescriptions sanitaires; que ceci permettra une meilleure harmonisation de la production et de la mise sur le marché et l'égalité des conditions de concurrence, tout en assurant au consommateur un produit de qualité;

considérant que la directive 79/923/CEE du Conseil, du 30 octobre 1979, relative à la qualité requise des eaux conchylicoles⁽⁶⁾ prévoit qu'il est nécessaire de fixer les exigences sanitaires auxquelles doivent répondre des produits conchylicoles;

considérant que ces exigences doivent être fixées pour tous les stades de la récolte, de la manipulation, de l'entreposage, du transport et de la distribution de mollusques bivalves vivants

en vue de la protection de la santé publique des consommateurs; qu'elles s'appliquent également aux échinodermes, aux tuniciers et aux gastéropodes marins;

considérant qu'il importe, si un problème sanitaire survient après la mise sur le marché de mollusques bivalves vivants, de pouvoir retrouver l'établissement expéditeur et la zone de récolte d'origine; qu'il y a donc lieu d'instaurer un système d'enregistrement et de marquage qui permette d'identifier le trajet d'un lot après la récolte;

considérant qu'il est important que les normes de santé publique pour le produit final soient déterminées; que, cependant, la connaissance scientifique et technique n'est pas encore suffisamment avancée pour que certains problèmes sanitaires puissent recevoir des solutions définitives, et qu'il est donc nécessaire, en vue de garantir la protection optimale de la santé publique, d'établir un système communautaire permettant d'assurer une adoption rapide et, si nécessaire, un renforcement des normes sanitaires visant à prévenir la contamination virale ou d'autres risques pour la santé humaine;

considérant que les mollusques bivalves vivants issus de zones de récolte qui ne permettent pas une consommation directe et sans danger peuvent être rendus salubres si on les soumet à un procédé de purification ou par reparcage en eau propre pour une assez longue période; qu'il est donc nécessaire de recenser les zones de production en provenance desquelles les mollusques peuvent être collectés pour la consommation humaine directe ainsi que celles en provenance desquelles ils doivent être purifiés ou reparqués;

considérant qu'il appartient au producteur en premier lieu de s'assurer que les mollusques bivalves sont produits et mis sur le marché conformément aux prescriptions sanitaires; qu'il revient aux autorités compétentes des États membres de veiller, par des contrôles et des inspections, à ce que le producteur respecte ces prescriptions; qu'il revient notam-

(1) JO n° C 84 du 2. 4. 1990, p. 29.

(2) JO n° C 183 du 15. 7. 1991.

(3) JO n° C 332 du 31. 12. 1990, p. 1.

(4) JO n° L 379 du 31. 12. 1981, p. 1.

(5) JO n° L 282 du 2. 10. 1989, p. 1.

(6) JO n° L 281 du 10. 11. 1979, p. 47.

ment aux autorités compétentes de soumettre les zones de récolte à un contrôle régulier pour s'assurer que les mollusques de ces zones de récolte ne contiennent pas de micro-organismes ni de substances toxiques en quantités considérées comme dangereuses pour la santé humaine;

considérant qu'il convient d'instaurer des mesures de contrôle communautaire pour garantir l'application uniforme dans tous les États membres des normes énoncées dans la présente directive;

considérant que les règles, principes et mesures de sauvegarde établis par la directive 90/675/CEE du Conseil, du 10 décembre 1990, fixant les principes relatifs à l'organisation des contrôles vétérinaires pour les produits en provenance des pays tiers introduits dans la Communauté⁽¹⁾, doivent s'appliquer en l'espèce;

considérant, dans le contexte des échanges intracommunautaires, que les règles fixées par la directive 89/662/CEE du Conseil, du 11 décembre 1989, relative aux contrôles vétérinaires dans les échanges intracommunautaires dans la perspective de la réalisation du marché intérieur⁽²⁾, modifiée par la directive 90/675/CEE, doivent également s'appliquer;

considérant que les mollusques bivalves vivants produits dans un pays tiers et destinés à la mise sur le marché sur le territoire de la Communauté ne doivent pas bénéficier d'un régime plus favorable que celui pratiqué dans la Communauté; qu'il convient de prévoir une procédure communautaire d'inspection pour le contrôle des conditions de production et de mise sur le marché dans les pays tiers, en vue de permettre dans la Communauté l'application d'un régime commun d'importation fondé sur des conditions d'équivalence;

considérant qu'il convient, pour tenir compte de situations particulières, d'accorder des dérogations à certains établissements en fonction avant le 1^{er} janvier 1993 afin de leur permettre de s'adapter à l'ensemble des exigences énoncées dans la présente directive;

considérant que, dans le cas de animaux vivants consommables tant qu'ils sont vivants, il convient de déroger, en ce qui concerne la date de durabilité, aux règles de la directive 79/112/CEE du Conseil, du 18 décembre 1978, relative au rapprochement des législations des États membres concernant l'étiquetage et la présentation des denrées alimentaires ainsi que la publicité faite à leur égard⁽³⁾, modifiée en dernier lieu par la directive 91/72/CEE⁽⁴⁾;

considérant qu'il convient de prévoir la possibilité d'arrêter des mesures transitoires pour faire face à l'absence de certaines règles d'application;

considérant qu'il est opportun de confier à la Commission le soin de prendre certaines mesures d'application de la présente directive; que, à cette fin, il convient de prévoir des procédures instaurant une coopération étroite et efficace entre la Commission et les États membres au sein du comité vétérinaire permanent,

(1) JO n° L 373 du 31. 12. 1990, p. 1.

(2) JO n° L 395 du 30. 12. 1989, p. 13.

(3) JO n° L 33 du 8. 2. 1979, p. 1.

(4) JO n° L 42 du 16. 1. 1991, p. 27.

A ARRÊTÉ LA PRÉSENTE DIRECTIVE:

CHAPITRE PREMIER

Prescriptions générales

Article premier

La présente directive fixe les règles sanitaires régissant la production et la mise sur le marché des mollusques bivalves vivants qui sont destinés à la consommation humaine directe ou à la transformation avant consommation.

Hormis ses dispositions relatives à la purification, la présente directive s'applique aux échinodermes, aux tuniciers et aux gastéropodes marins.

Article 2

Aux fins de la présente directive, on entend par:

- 1) *mollusques bivalves*: les mollusques lamellibranches filtreurs;
- 2) *biotoxines marines*: les substances toxiques accumulées par les mollusques bivalves quand ils se nourrissent de plancton contenant ces toxines;
- 3) *eau de mer propre*: l'eau de mer ou l'eau saumâtre, à utiliser dans les conditions énoncées dans la présente directive, exempte de contamination microbiologique et de composés toxiques ou nocifs d'origine naturelle ou rejetés dans l'environnement, tels que ceux mentionnés à l'annexe de la directive 79/923/CEE, en quantités susceptibles d'avoir une incidence néfaste sur la qualité sanitaire des mollusques bivalves ou d'en détériorer le goût;
- 4) *autorité compétente*: l'autorité centrale d'un État membre compétente pour effectuer les contrôles vétérinaires, ou toute autorité à qui elle aura délégué cette compétence;
- 5) *finition*: l'entreposage de mollusques bivalves vivants dont la qualité indique qu'ils ne nécessitent pas un reparcage ou un traitement dans un établissement de purification, dans des bassins ou dans toute autre installation contenant de l'eau de mer propre ou des sites naturels pour les débarrasser du sable, de la vase ou du mucus;
- 6) *producteur*: toute personne physique ou morale qui collecte des mollusques bivalves vivants par tous les moyens dans une zone de récolte, en vue d'une manipulation et de la mise sur le marché;
- 7) *zone de production*: toute partie de territoire maritime, lagunaire ou d'estuaire où se trouvent soit des bancs naturels de mollusques bivalves, soit des sites employés pour la culture de mollusques bivalves, à partir desquels les mollusques bivalves vivants sont récoltés;
- 8) *zone de reparcage*: toute partie de territoire maritime, lagunaire ou d'estuaire agréée par l'autorité compétente, clairement délimitée et signalisée par des bouées, des piquets ou tout autre matériel fixe et consacrée exclusivement à la purification naturelle des mollusques bivalves vivants;

- 9) *centre d'expédition*: toute installation terrestre ou flottante agréée, réservée à la réception, à la finition, au lavage, au nettoyage, au calibrage et au conditionnement des mollusques bivalves vivants aptes à la consommation humaine;
- 10) *centre de purification*: tout établissement agréé comportant des bassins alimentés en eau de mer naturellement propre ou rendue propre par un traitement approprié, dans lesquels les mollusques bivalves vivants sont placés pendant le temps nécessaire pour leur permettre d'éliminer les contaminants microbiologiques afin de devenir aptes à la consommation humaine;
- 11) *reparcage*: l'opération consistant à transférer des mollusques bivalves vivants dans des zones maritimes ou lagunaires agréées ou des zones d'estuaires agréées, sous la surveillance de l'autorité compétente, pendant le temps nécessaire à l'élimination des contaminants. Ceci n'inclut pas l'opération spécifique de transfert de mollusques bivalves dans des zones mieux adaptées à une croissance ou à un engraissement ultérieur;
- 12) *moyens de transport*: les parties réservées au chargement dans les véhicules automobiles, les véhicules circulant sur rails, les aéronefs, ainsi que les cales des bateaux ou les conteneurs pour le transport par terre, mer ou air;
- 13) *conditionnement*: l'opération par laquelle les mollusques bivalves vivants sont placés dans des matériels d'emballage adaptés à cet usage;
- 14) *envoi*: quantité de mollusques bivalves vivants manipulés dans un centre d'expédition ou traités dans un centre de purification, destinés à un ou plusieurs preneurs;
- 15) *lot*: quantité de mollusques bivalves vivants collectés dans une zone de production et destinés à être envoyés dans un centre d'expédition agréé, un centre de purification, une zone de reparcage ou un établissement de transformation;
- 16) *mise sur le marché*: La détention ou l'exposition en vue de la vente, la mise en vente, la vente, la livraison ou toute autre manière de mise sur le marché de mollusques bivalves vivants pour la consommation humaine à l'état cru ou à des fins de transformation dans la Communauté, à l'exclusion de la cession directe sur le marché local en petites quantités par le pêcheur côtier au détaillant ou au consommateur qui doivent être soumises aux contrôles sanitaires prescrits par les réglementations nationales pour le contrôle du commerce de détail;
- 17) *importation*: introduction dans le territoire de la Communauté de mollusques bivalves vivants en provenance de pays tiers;
- 18) *coliforme fécal*: bactérie en bâtonnet, aérobique facultative, Gram négative ne sporulant pas, cytochrome oxydase négative, qui fermente le lactose avec production de gaz en présence de sels biliaires ou d'autres agents tensio-actifs ayant des propriétés analogues inhibant la croissance, à $44^{\circ} \pm 0,2^{\circ} \text{C}$ en 24 heures au moins;
- 19) *E. coli*: coliforme fécal qui produit de l'indole à partir du tryptophane à $44^{\circ} \pm 0,2^{\circ} \text{C}$ en 24 heures.

CHAPITRE II

Prescriptions pour la production communautaire

Article 3

1. La mise sur le marché des mollusques bivalves vivants pour la consommation humaine directe est soumise aux conditions suivantes:

- ils doivent provenir de zones de production qui satisfont aux exigences fixées au chapitre I de l'annexe. Toutefois, en ce qui concerne les pectinidés, cette disposition ne s'applique qu'aux produits d'aquaculture tels que définis à l'article 2 point 2 de la directive 91/493/CEE du Conseil, du 22 juillet 1991, fixant les règles sanitaires régissant la production et la mise sur le marché des produits de la pêche ⁽¹⁾;
- ils doivent avoir été récoltés et transportés de la zone de production à un centre d'expédition, un centre de purification, une zone de reparcage ou un établissement de transformation, dans les conditions définies au chapitre II de l'annexe;
- dans les cas prévus par la présente directive, ils doivent avoir été reparqués dans des zones agréées pour cet usage et remplissant les conditions définies au chapitre III de l'annexe;
- ils doivent avoir été manipulés hygiéniquement et, quand c'est nécessaire, avoir été purifiés dans des établissements agréés pour cet usage et satisfaisant aux exigences du chapitre IV de l'annexe;
- ils doivent satisfaire aux prescriptions énoncées au chapitre V de l'annexe;
- un contrôle sanitaire doit avoir été effectué selon les exigences du chapitre VI de l'annexe;
- ils doivent avoir été conditionnés de manière appropriée, conformément au chapitre VII de l'annexe;
- ils doivent avoir été entreposés et transportés dans des conditions sanitaires satisfaisantes, conformément aux chapitres VIII et IX de l'annexe;
- ils doivent être munis d'une marque prévue au chapitre X de l'annexe.

2. Les mollusques bivalves vivants destinés à une transformation ultérieure doivent satisfaire aux exigences pertinentes du paragraphe 1 et être traités conformément aux exigences de la directive 91/493/CEE.

Article 4

Les États membres veillent à ce que les personnes qui manipulent des mollusques bivalves vivants pendant leur production et leur mise sur le marché prennent toutes les mesures nécessaires pour se conformer aux prescriptions de la présente directive.

⁽¹⁾ Voir page 15 du présent Journal officiel.

Les responsables des centres d'expédition et de purification doivent notamment s'assurer que:

- des quantités représentatives d'échantillons destinés à des examens de laboratoire sont régulièrement prélevés et analysés en vue d'établir un état chronologique, en fonction des zones d'origine des lots, de la qualité sanitaire des mollusques bivalves vivants avant et après manipulation dans le centre d'expédition ou dans le centre de purification,
- un registre dans lequel sont enregistrés les résultats des contrôles est tenu et conservé pour pouvoir être présenté à l'autorité compétente.

Article 5

1. a) L'autorité compétente procède à l'agrément des centres d'expédition et des centres de purification après s'être assurée qu'ils satisfont aux dispositions de la présente directive. L'autorité compétente prend les mesures nécessaires si les conditions d'agrément cessent d'être remplies. À cet effet, elle tient compte notamment des conclusions d'un éventuel contrôle effectué conformément à l'article 6 paragraphe 1.

Toutefois, à la condition expresse que les mollusques vivants provenant de tels centres satisfassent aux normes d'hygiène fixées par la présente directive, les États membres peuvent, pour les exigences d'équipements et de structures prévues au chapitre IV de l'annexe, à préciser avant le 1^{er} octobre 1991, selon la procédure prévue à l'article 12, accorder aux centres d'expédition et de purification un délai supplémentaire expirant le 31 décembre 1995 pour se conformer aux conditions d'agrément énoncées au chapitre précité. Ne pourront obtenir de telles dérogations que les établissements qui, exerçant leur activité à la date du 31 décembre 1991, auront soumis à l'autorité nationale compétente, avant le 1^{er} juillet 1992, une demande dûment justifiée à cet effet. Cette demande doit être assortie d'un plan et d'un programme de travaux précisant les délais dans lesquels les établissements pourront se conformer auxdites exigences. Dans le cas où un concours financier est sollicité auprès de la Communauté, seuls les projets conformes aux exigences de la présente directive pourront être acceptés.

L'autorité compétente établit une liste des centres d'expédition et des centres de purification agréés, chacun d'eux possédant un numéro officiel.

La liste des centres d'expédition et des centres de purification agréés et toute modification ultérieure doivent être communiquées par chaque États membre à la Commission. La Commission communique ces informations aux autres États membres.

- b) L'inspection et le contrôle de ces établissements sont effectués régulièrement sous la responsabilité de l'autorité compétente qui doit avoir libre accès à toutes les parties des établissements en vue de s'assurer du respect des dispositions de la présente directive.

Si ces inspections et ces contrôles révèlent que les exigences de la présente directive ne sont pas respectées, l'autorité compétente prend les mesures appropriées.

2. a) L'autorité compétente établit une liste des zones de production et de reparcage, avec l'indication de leur emplacement et de leurs limites, dans lesquelles les mollusques bivalves vivants peuvent être pris conformément aux prescriptions de la présente directive, et notamment, celles du chapitre I de l'annexe.

Cette liste est communiquée aux professionnels concernés par la présente directive, notamment aux producteurs et aux responsables des centres de purification et des centres d'expédition.

- b) La surveillance des zones de production et de reparcage est effectuée sous la responsabilité de l'autorité compétente conformément aux exigences de la présente directive.

Au cas où cette surveillance révèle que les exigences de la présente directive ne sont plus satisfaites, l'autorité compétente ferme la zone de production ou de reparcage concernée jusqu'à ce que la situation redevienne normale.

3. L'autorité compétente peut interdire toute production et toute récolte de mollusques bivalves dans des zones considérées comme inaptées à cet usage pour des raisons sanitaires.

Article 6

1. Des experts de la Commission peuvent, dans la mesure où cela est nécessaire à l'application uniforme de la présente directive, effectuer, en collaboration avec les autorités compétentes des États membres, des contrôles sur place. Ils peuvent notamment vérifier si les centres et les zones de production et de reparcage observent effectivement les dispositions de la présente directive. L'État membre sur le territoire duquel est effectué un contrôle apporte toute l'aide nécessaire aux experts pour l'accomplissement de leur mission. La Commission informe les États membres du résultat des contrôles effectués.

2. Les modalités d'application du paragraphe 1 sont arrêtées selon la procédure prévue à l'article 12.

3. La Commission peut établir des recommandations assorties de lignes directrices relatives à de bonnes pratiques de fabrication applicables aux divers stades de la production et de la mise sur le marché.

Article 7

1. Les règles prévues par la directive 89/662/CEE pour les mollusques bivalves, les échinodermes, tuniciers et gastéropodes marins vivants destinés à la consommation humaine s'appliquent, notamment en ce qui concerne l'organisation et les suites à donner aux contrôles à effectuer par l'État membre de destination et les mesures de sauvegarde à mettre en œuvre.

2. La directive 89/662/CEE est modifiée comme suit:

a) à l'annexe A, le tiret suivant est ajouté:

«— directive n° 90/492/CEE du Conseil, du 15 juillet 1991, fixant les règles sanitaires régissant la production et la mise sur le marché de mollusques bivalves vivants (JO n° L 268 du 24. 9. 1991, p. 1.)»;

b) à l'annexe B, le tiret suivant est supprimé:

«— mollusques bivalves vivants destinés à la consommation humaine».

CHAPITRE III

Importations à partir des pays tiers

Article 8

Les dispositions appliquées aux importations de mollusques bivalves vivants en provenance de pays tiers doivent être au moins équivalentes à celles concernant la production et la mise sur le marché des produits communautaires.

Article 9

En vue de s'assurer de l'application uniforme de l'exigence prévue à l'article 8, la procédure suivante s'applique:

1) des contrôles sont effectués sur place par des experts de la Commission et des États membres pour vérifier si les conditions de production et de mise sur le marché peuvent être considérées comme équivalentes à celles qui sont appliquées dans la Communauté.

Les experts des États membres chargés de ces contrôles sont désignés par la Commission sur proposition des États membres.

Ces contrôles sont effectués pour le compte de la Communauté qui prend en charge les frais correspondants.

La périodicité et les modalités de ces contrôles sont déterminées selon la procédure prévue à l'article 12;

2) pour décider si les conditions de production et de mise sur le marché des mollusques bivalves vivants dans un pays tiers peuvent être considérées comme étant équivalentes à celles de la Communauté, il sera tenu compte notamment:

a) de la législation du pays tiers;

b) de l'organisation de l'autorité compétente du pays tiers et de ses services d'inspection, des pouvoirs de ces services et de la surveillance dont ils font l'objet, aussi bien que des possibilités qu'ont ces services de vérifier de manière efficace l'application de leur législation en vigueur;

c) des conditions sanitaires appliquées en pratique pour la production et la mise sur le marché des mollusques bivalves vivants, et notamment pour la surveillance des zones de récolte en relation avec la contamination microbiologique et celle de l'environnement, ainsi qu'avec la présence de biotoxines marines;

d) de la régularité et de la rapidité des informations fournies par le pays tiers sur la présence de plancton contenant des toxines dans les zones de récolte, et notamment d'espèces n'existant pas dans les eaux communautaires, ainsi que des risques que peut représenter cette présence pour la Communauté;

e) des assurances que peuvent donner les pays tiers quant au respect des règles énoncées au chapitre V de l'annexe;

3) la Commission arrête, selon la procédure prévue à l'article 12:

a) la liste des pays tiers qui remplissent les conditions d'équivalence visées au paragraphe 2;

b) pour chaque pays tiers, les conditions particulières d'importation applicables aux mollusques bivalves vivants. Ces conditions doivent comprendre:

i) les modalités de certification sanitaire qui doivent accompagner tout envoi destiné à la Communauté;

ii) une délimitation des zones de production dans lesquelles les mollusques bivalves vivants peuvent être récoltés et à partir desquelles ils peuvent être importés;

iii) l'obligation d'une information de la Communauté sur tout changement possible de l'agrément des zones de production;

iv) la purification éventuelle après l'arrivée sur le territoire de la Communauté;

c) la liste des établissements en provenance desquels l'importation de mollusques bivalves vivants est autorisée. Dans ce but, une ou plusieurs listes de ces établissements doivent être établies. Un établissement ne peut figurer sur une liste que s'il est agréé officiellement par l'autorité compétente du pays tiers exportant dans la Communauté. Un tel agrément doit être soumis à l'observation des conditions suivantes:

— respect d'exigences équivalentes à celles prévues par la présente directive,

— surveillance par un service officiel de contrôle du pays tiers;

4) les décisions visées au point 3 peuvent être modifiées selon la procédure prévue à l'article 12.

Ces décisions et les modifications s'y rapportant sont publiées au *Journal officiel des Communautés européennes*, série L;

5) dans l'attente des décisions visées au point 3, les États membres appliquent aux importations des mollusques bivalves vivants en provenance des pays tiers des conditions qui sont au moins équivalentes à celles concernant la production et la mise sur le marché des produits communautaires.

Article 10

Les règles et principes prévus par la directive 90/675/CEE s'appliquent notamment en ce qui concerne l'organisation et les suites à donner aux contrôles à effectuer par les États membres et les mesures de sauvegarde à mettre en œuvre.

Sans préjudice du respect des règles et principes visés au premier alinéa du présent article et dans l'attente de la mise en œuvre des décisions prévues à l'article 8 point 3 et à l'article 30 de la directive 90/675/CEE, les modalités nationales pertinentes d'application de l'article 8 points 1 et 2 de ladite directive restent applicables.

CHAPITRE IV

Dispositions finales

Article 11

Les chapitres de l'annexe peuvent être modifiés par le Conseil, statuant à la majorité qualifiée sur proposition de la Commission.

Avant le 1^{er} janvier 1994, la Commission soumet au Conseil, après avis du comité vétérinaire scientifique, un rapport sur le contenu des chapitres I et V de l'annexe, assorti d'éventuelles propositions de modifications de ces chapitres.

Article 12

1. En cas d'application de la procédure définie au présent article, le comité vétérinaire permanent, ci-après dénommé «comité», est saisi sans délai par son président, soit à l'initiative de celui-ci, soit à la demande d'un État membre.

2. Le représentant de la Commission soumet au comité un projet des mesures à prendre. Le comité émet son avis sur ces mesures dans un délai que le président peut fixer en fonction de l'urgence de la question en cause. L'avis est émis à la majorité prévue à l'article 148 paragraphe 2 du traité pour l'adoption des décisions que le Conseil est appelé à prendre sur proposition de la Commission. Lors des votes au sein du comité, les voix des représentants des États membres sont affectées de la pondération définie à l'article précité. Le président ne prend pas part au vote.

3. a) La Commission arrête les mesures envisagées lorsqu'elles sont conformes à l'avis du comité.

b) Lorsque les mesures envisagées ne sont pas conformes à l'avis du comité, ou en l'absence d'avis, la

Commission soumet sans tarder au Conseil une proposition relative aux mesures à prendre. Le Conseil statue à la majorité qualifiée.

Si, à l'expiration d'un délai de trois mois à compter de la date à laquelle il a été saisi, le Conseil n'a pas statué, les mesures proposées sont arrêtées par la Commission, sauf dans le cas où le Conseil s'est prononcé à la majorité simple contre lesdites mesures.

Article 13

Pour tenir compte d'une éventuelle absence de décision concernant les modalités d'application de la présente directive à la date du 1^{er} janvier 1993, des mesures transitoires nécessaires peuvent être arrêtées, selon la procédure prévue à l'article 12, pour une période de deux ans.

Article 14

La Commission, après consultation des États membres, soumet au Conseil, avant le 1^{er} juillet 1992, un rapport concernant les exigences minimales en matière de structure et d'équipement à respecter par les petits centres d'expédition ou les petits établissements assurant la distribution sur le marché local et situés dans des régions soumises à des contraintes particulières quant à leur approvisionnement, assorti d'éventuelles propositions sur lesquelles le Conseil, statuant selon la procédure de vote prévue à l'article 43 du traité, se prononcera avant le 31 décembre 1992.

Les dispositions de la présente directive feront, avant le 1^{er} janvier 1998, l'objet d'un réexamen par le Conseil, statuant sur des propositions de la Commission fondées sur l'expérience acquise.

Article 15

Les États membres mettent en vigueur les dispositions législatives, réglementaires ou administratives nécessaires pour se conformer à la présente directive avant le 1^{er} janvier 1993. Ils en informent la Commission.

Lorsque les États membres adoptent ces dispositions, celles-ci contiennent une référence à la présente directive ou sont accompagnées d'une telle référence lors de leur publication officielle. Les modalités de cette référence sont arrêtées par les États membres.

Article 16

Les États membres sont destinataires de la présente directive.

Fait à Bruxelles, le 15 juillet 1991.

Par le Conseil

Le président

P. BUKMAN

ANNEXE

CHAPITRE PREMIER

CONDITIONS POUR LES ZONES DE PRODUCTION

1. L'emplacement et les limites des zones de production doivent être fixés par l'autorité compétente en vue de l'identification des zones dans lesquelles les mollusques bivalves vivants:
 - a) peuvent être récoltés pour la consommation humaine directe. Les mollusques bivalves vivants provenant de ces zones doivent satisfaire aux exigences du chapitre V de la présente annexe;
 - b) peuvent être récoltés, mais ne peuvent être mis sur le marché pour la consommation humaine qu'après avoir subi un traitement dans un centre de purification ou après avoir subi un traitement dans un centre de purification ou après reparcage. Les mollusques bivalves vivants de ces zones ne doivent pas dépasser les limites, basées sur un test MPN (NPP) à 5 tubes et 3 dilutions, de 6 000 coliformes fécaux pour 100 g de chair ou 4 600 E. coli pour 100 g de chair dans 90 % des échantillons.
Après purification ou reparcage toutes les exigences du chapitre V de la présente annexe doivent être satisfaites;
 - c) peuvent être récoltés, mais ne peuvent être mis sur le marché qu'après un reparcage portant sur une longue période (minimum deux mois), associé ou non à une purification, ou après une purification intensive pendant une période et selon des modalités à fixer selon la procédure prévue à l'article 12 de la présente directive en vue de satisfaire les mêmes exigences que celles du point a). Les mollusques bivalves vivants de ces zones ne doivent pas dépasser les limites, fondées sur un test MPN (NPP) à 5 tubes et 3 dilutions, de 60 000 coliformes fécaux pour 100 g de chair.
2. Tout changement dans la délimitation des zones de production ainsi que la fermeture temporaire ou définitive de celles-ci doivent être annoncés immédiatement par l'autorité compétente aux professionnels concernés par la présente directive, notamment aux producteurs et aux responsables des centres de purification et des centres d'expédition.

CHAPITRE II

NORMES POUR LA RÉCOLTE ET LE TRANSPORT DES LOTS VERS UN CENTRE D'EXPÉDITION
OU DE PURIFICATION, UNE ZONE DE REPARCAGE OU UN ÉTABLISSEMENT DE
TRANSFORMATION

1. Les techniques de récolte ne doivent pas causer de dommage excessif aux coquilles ou aux tissus des mollusques bivalves vivants.
2. Les mollusques bivalves vivants doivent être protégés de manière appropriée contre l'écrasement, l'abrasion et les vibrations après leur récolte et ne doivent pas être soumis à des températures extrêmes chaudes ou froides.
3. Les techniques pour la récolte, le transport, le débarquement et la manipulation des mollusques bivalves vivants ne doivent pas entraîner une contamination supplémentaire du produit, une baisse importante de sa qualité ou un changement significatif affectant leur aptitude à être traités par purification, transformation ou reparcage.
4. Les mollusques bivalves vivants ne doivent pas être réimmergés dans une eau susceptible de causer une contamination supplémentaire entre la récolte et le débarquement à terre.
5. Les moyens utilisés pour le transport des mollusques bivalves vivants doivent être employés dans des conditions qui les protègent contre toute contamination supplémentaire et contre l'écrasement des coquilles. Ils doivent permettre un drainage et un nettoyage satisfaisants.
Dans le cas d'un transport en vrac, sur une longue distance, de mollusques bivalves vivants vers un centre d'expédition, un centre de purification, une zone de reparcage ou un établissement de transformation, les moyens de transport doivent être équipés de façon à leur assurer les meilleures conditions de survie et ils doivent, notamment, répondre aux prescriptions du chapitre IX point 2 de la présente annexe.
6. Un document d'enregistrement pour l'identification des lots de mollusques bivalves vivants doit accompagner chaque lot durant le transport de la zone de production à un centre d'expédition, un centre de purification, une zone de reparcage ou un établissement de transformation. Le document est délivré par l'autorité compétente à la demande du producteur. Pour chaque lot, le producteur doit compléter, lisiblement et de manière indélébile, les parties concernées du document d'enregistrement, qui doivent comporter les informations suivantes:
 - l'identité du producteur et sa signature,
 - la date de la récolte,
 - la localisation de la zone de production, aussi détaillée que possible,

- l'espèce de coquillages et leur quantité, indiquées de façon aussi précise que possible,
- le numéro d'agrément et l'endroit de destination pour le conditionnement, le reparcage, la purification ou la transformation.

Les documents d'enregistrement doivent être numérotés de façon continue et séquentielle. L'autorité compétente tient un registre indiquant le nombre de documents d'enregistrement ainsi que les noms des personnes collectant les mollusques bivalves vivants et auxquelles ils ont été délivrés. Le document d'enregistrement pour chaque lot de mollusques bivalves vivants doit être daté pour la livraison de chaque lot à un centre d'expédition, à un centre de purification, à une zone de reparcage ou à un établissement de transformation et il doit être conservé par les responsables de ces centres, zones ou établissements au moins soixante jours.

Toutefois, si la récolte est effectuée par le personnel appartenant au centre d'expédition, au centre de purification, à la zone de reparcage ou à l'établissement de transformation de destination, le document d'enregistrement peut être remplacé par une autorisation permanente de transport accordée par l'autorité compétente.

7. Au cas où une zone de production et de reparcage est temporairement fermée, l'autorité compétente ne délivre plus de documents d'enregistrement pour cette zone et suspend immédiatement la validité de tous les documents d'enregistrement déjà délivrés.

CHAPITRE III

CONDITIONS POUR LE REPARCAGE DE MOLLUSQUES BIVALVES VIVANTS

Pour le reparcage de mollusques bivalves vivants, les conditions suivantes doivent être réunies:

- 1) les mollusques bivalves vivants doivent avoir été récoltés et transportés selon les prescriptions du chapitre II de la présente annexe;
- 2) les techniques pour la manipulation des mollusques bivalves vivants destinés au reparcage doivent permettre la reprise de l'activité d'alimentation par filtration après immersion dans les eaux naturelles;
- 3) les mollusques bivalves vivants ne doivent pas être reparqués à une densité ne permettant pas la purification;
- 4) les mollusques bivalves vivants doivent être immergés en eau de mer sur la zone de reparcage pendant une durée appropriée qui doit dépasser le temps mis par le taux de bactéries fécales pour être réduit aux niveaux admis par la présente directive et compte tenu du fait que les normes du chapitre V de la présente annexe doivent être respectées;
- 5) la température minimale de l'eau pour le reparcage effectif doit, quand cela est nécessaire, être déterminée et annoncée par l'autorité compétente pour chaque espèce de mollusques bivalves vivants et pour chaque zone de reparcage agréée;
- 6) les zones de reparcage des mollusques bivalves vivants doivent être agréées par l'autorité compétente. Les limites de ces zones doivent être clairement balisées par des bouées, des perches ou d'autres matériels fixes; une distance minimale de 300 mètres doit séparer les zones de reparcage entre elles, ainsi que les zones de reparcage des zones de production;
- 7) les emplacements dans une zone de reparcage doivent être bien séparés pour éviter le mélange des lots; le système «tout dedans tout dehors» doit être utilisé, de façon à ne pas permettre l'introduction d'un nouveau lot avant que la totalité du lot précédant soit enlevée;
- 8) un enregistrement permanent de l'origine des mollusques bivalves vivants, des périodes de reparcage, emplacements de reparcage et destination ultérieure de chaque lot après reparcage doit être tenu à la disposition de l'autorité compétente par les responsables des zones de reparcage;
- 9) après la récolte sur la zone de reparcage, les lots doivent, pendant leur transport de la zone de reparcage vers le centre d'expédition, le centre de purification ou l'établissement de transformation agréés, être accompagnés du document d'enregistrement prévu au chapitre II point 6 de la présente annexe, sauf dans le cas où le même personnel intervient aussi bien sur la zone de reparcage que dans le centre d'expédition, le centre de purification ou l'établissement de transformation.

CHAPITRE V

PRESCRIPTIONS CONCERNANT LES MOLLUSQUES BIVALVES VIVANTS

Les mollusques bivalves vivants destinés à la consommation humaine immédiate doivent remplir les conditions suivantes:

- 1) ils doivent posséder des caractéristiques visuelles associées à la fraîcheur et à la viabilité, incluant l'absence de souillure sur la coquille, une réponse à la percussion et une quantité normale de liquide intervalvaire;
- 2) ils doivent contenir moins de 300 coliformes fécaux ou moins de 230 E. coli pour 100 g de chair de mollusque et de liquide intervalvaire sur la base d'un test MPN (NPP) à 5 tubes et 3 dilutions ou de tout autre procédé bactériologique dont l'équivalence est démontrée en niveau de précision;
- 3) ils ne doivent pas contenir de salmonelles dans 25 g de chair de mollusque;
- 4) ils ne doivent pas contenir de composés toxiques ou nocifs d'origine naturelle ou rejetés dans l'environnement, tels que ceux mentionnés à l'annexe de la directive 79/923/CEE, à un taux tel que l'absorption alimentaire calculée dépasse les doses journalières admissibles (DJA) pour l'homme ou qu'ils soient susceptibles de détériorer le goût des coquillages.

Selon la procédure prévue à l'article 12 de la présente directive, la Commission définit les méthodes d'analyse applicables pour le contrôle des critères chimiques, ainsi que les valeurs limites à respecter;

- 5) les limites supérieures du taux de radionucléides ne doivent pas dépasser celles fixées par la Communauté pour les denrées alimentaires;
- 6) le taux de «Paralytic Shellfish Poison» (PSP) dans les parties comestibles des mollusques (corps entier ou toute partie consommable séparément) ne doit pas dépasser 80 µg pour 100 g, d'après la méthode d'analyse biologique — le cas échéant associée avec une méthode chimique de recherche de la saxitoxine — ou toute autre méthode reconnue selon la procédure prévue à l'article 12 de la présente directive.

En cas de contestation sur les résultats, la méthode de référence doit être la méthode biologique;

- 7) les méthodes d'analyse biologiques habituelles ne doivent pas donner de réaction positive en ce qui concerne la présence de «Diarrhetic Shellfish Poison» (DSP) dans les parties comestibles des mollusques (corps entier ou toute partie consommable séparément);
- 8) en l'absence de techniques de routine pour la recherche de virus et de la fixation de normes virologiques, le contrôle sanitaire se fonde sur des comptages de bactéries fécales.

Les examens visant à contrôler le respect des exigences du présent chapitre doivent s'effectuer selon des méthodes scientifiquement reconnues et pratiquement éprouvées.

Pour l'application uniforme de la présente directive, les plans d'échantillonnage ainsi que les méthodes et les tolérances analytiques à appliquer en vue du contrôle du respect des exigences du présent chapitre sont établis selon la procédure prévue à l'article 12 de la présente directive.

L'efficacité des bactéries en tant qu'indicateur fécal et leurs limites numériques, ainsi que les autres paramètres indiqués dans le présent chapitre, sont constamment suivis de près et, quand l'évidence scientifique en montre le besoin, ils sont révisés selon la procédure prévue à l'article 12 de la présente directive.

Lorsque l'évidence scientifique montre le besoin d'introduire d'autres contrôles sanitaires ou de modifier les paramètres indiqués dans le présent chapitre afin de sauvegarder la santé publique, ces mesures sont arrêtées selon la procédure prévue à l'article 12.

CHAPITRE VI

CONTRÔLE DE SANTÉ PUBLIQUE ET SURVEILLANCE DE LA PRODUCTION

Un système de contrôle de la santé publique est établi par l'autorité compétente en vue de la vérification du respect des exigences à la présente directive. Ce système doit comprendre:

- 1) une surveillance périodique des zones de production et de repavage des mollusques bivalves vivants, destinée à:
 - a) éviter tout abus sur l'origine et la destination de mollusques bivalves vivants;
 - b) contrôler la qualité microbiologique des mollusques bivalves vivants en relation avec la zone de production et de repavage;
 - c) contrôler la présence possible de plancton toxique dans les eaux de production et de repavage et de biotoxines dans les mollusques bivalves vivants;
 - d) contrôler la présence possible de contaminants chimiques, dont les teneurs maximales autorisées seront fixées, selon la procédure prévue à l'article 12 de la présente directive, le 31 décembre 1992.

Aux fins des points c) et d), des plans d'échantillonnage doivent être établis par l'autorité compétente pour contrôler cette présence possible à des intervalles réguliers ou cas par cas si la récolte a lieu à des périodes irrégulières;

- 2) les plans d'échantillonnage tels que prévus au point 1, qui doivent notamment tenir compte:
 - a) des variations probables dans la contamination fécale de chaque zone de production et de repavage;
 - b) des variations possibles, dans les zones de production et de repavage, de la présence de plancton contenant des biotoxines marines. L'échantillonnage doit s'effectuer comme suit:
 - i) surveillance: échantillonnage périodique organisé visant à détecter les changements de la composition du plancton contenant des toxines et sa répartition géographique. Tout résultat entraînant une suspicion d'accumulation de toxines dans la chair des mollusques doit être suivi par un échantillonnage intensif;

ii) échantillonnage intensif:

- contrôle du plancton dans les eaux d'élevage et de pêche, le nombre de points de prélèvements et le nombre des échantillons étant augmentés,
- et
- tests de toxicité au moyen des mollusques de la zone affectée qui sont les plus sensibles à la contamination.

La mise sur le marché de mollusques de cette zone ne pourra de nouveau être autorisée qu'après qu'un nouvel échantillonnage aura donné des résultats de tests de toxicité satisfaisants;

c) de la contamination possible des mollusques dans la zone de production et de reparcage.

Lorsque le résultat d'un plan d'échantillonnage montre que la mise sur le marché de mollusques bivalves vivants peut constituer un risque pour la santé humaine, l'autorité compétente doit fermer la zone de production, pour ce qui est des mollusques concernés, jusqu'à ce que la situation soit rétablie;

- 3) des examens de laboratoire destinés à contrôler le respect des exigences du chapitre V de la présente annexe pour le produit fini. Un système de contrôle doit être mis en œuvre pour vérifier que le niveau de biotoxines marines ne dépasse pas les limites de sécurité;
- 4) une inspection des établissements à intervalles réguliers. Cette inspection inclut notamment des contrôles:
 - a) destinés à vérifier que les conditions d'agrément sont toujours respectées;
 - b) portant sur le nettoyage des locaux, des installations, du matériel, ainsi que sur l'hygiène du personnel;
 - c) destinés à vérifier que les mollusques bivalves vivants sont manipulés et traités correctement;
 - d) portant sur l'utilisation correcte et le bon fonctionnement des systèmes de purification ou de finition;
 - e) portant sur le registre visé au chapitre IV point III. 12 de la présente annexe;
 - f) portant sur l'emploi correct des marques sanitaires.

Ces contrôles peuvent comprendre la prise d'échantillons pour examens de laboratoire; les résultats de ces examens sont communiqués aux responsables des établissements;

- 5) des contrôles portant sur les conditions d'entreposage et de transport des envois de mollusques bivalves vivants.

ANNEXE 5

LISTE DES RAPPORTS INTERNES IFREMER/DEL

- N° 1. Morel M., F. Ruelle, N. Cuvelier, B. Hitier, 1988. Qualité sanitaire et biotique des sites potentiels de développement de la mytiliculture sur le littoral Nord/Pas-de-Calais. Rapport de laboratoire IFREMER CSRU/Boulogne.
- N° 2. Morel M., R. Olivesi, 1989. Qualité sanitaire et biotique des zones conchylicoles du littoral picard. Rapport de laboratoire IFREMER CSRU/Boulogne.
- N° 3. Olivesi R., M. Morel, H. Rybarczik, 1991. Etude de la salubrité des gisements de coques de la baie de Somme. R. Int. IFREMER DEL/91.08- Boulogne.
- N° 4. DDASS, IFREMER, 1987. Surveillance sanitaire des eaux littorales du département de La Manche. Baignade, conchyliculture, pêche à pied. Saison 1986.
- N° 5. DDASS, IFREMER, 1988. Surveillance sanitaire des eaux littorales du département de La Manche. Baignade, conchyliculture, pêche à pied. Bilan de la surveillance sanitaire 1987.
- N° 6. Thillaye du Boulay H., J.P. Joly, 1989. Etude relative à la qualité des eaux conchylicoles: La Basse-Normandie. R. Int. IFREMER DRV-89.003-CSRU/Ouistreham.
- N° 7. Gerla D., P. Le Mao, 1990. Etude de la salubrité de la partie est de la baie du Mont St Michel. R. Int. IFREMER DRV-90.01-CSRU/St-Malo.
- N° 8. Mouillard G., P. Le Mao, 1990. Qualité bactériologique des coquillages sur les zones de production et les gisements naturels du quartier maritime de Paimpol (Côtes d'Armor) (Bilan de l'année 1988). R. Int. IFREMER DRV-90.17-CSRU/St Malo.
- N° 9. Rougerie M., P. Le Mao, 1990. Qualité bactériologique des coquillages sur les zones de production et les gisements naturels du quartier maritime de St Briec (Côtes d'Armor). (Bilan de l'année 1988). R. Int. IFREMER DRV-90.18-CSRU/St Malo.
- N° 10. Gerla D., P. Le Mao, 1990. Qualité bactériologique des coquillages sur les zones de production et les gisements naturels du département d'Ille et Vilaine (Bilan de l'année 1988). R. Int. IFREMER DRV-90.26-CSRU/St Malo.
- N° 11. Fleury P.G., J. Chauvin, 1988. Etude sanitaire (1984-1986) des moulières de Damgan - Ambon - Billiers (Morbihan). R. Int. IFREMER DRV-88.019-CSRU/La Trinité-sur-Mer.
- N° 12. Chauvin J., P.G. Fleury, 1988. Etude sanitaire (1984-1986) de la rivière de Peneff (Morbihan). R. Int. IFREMER DRV-88.007-CSRU/La Trinité-sur-Mer.

- N° 13. Lamour K., 1988. Etude sanitaire (1986-1988) de la zone de Kerjean en rivièrre de Crac'h (Morbihan). R. Int. IFREMER DRV-88.020-CSRU/La Trinité-sur-Mer.
- N° 14. Fleury P. G., J.C. Le Gars, 1989. Etude sanitaire (1986-1987) de la Petite Mer de Gavres (Morbihan). R. Int. IFREMER DRV-89.002-CSRU/La Trinité-sur-Mer.
- N° 15. Le Gars J.C., P.G. Fleury, 1989. Etude sanitaire (1987-1988) de la côte de Guidel - Larmor-Plage (Morbihan). R. Int. IFREMER DRV-89.007-CSRU/La Trinité-sur-Mer.
- N° 16. Camus P., C. Tréguier, J.C. Le Gars, 1990. Salubrité des coquillages de pêche de la Petite Mer de Gavres. Rapport de laboratoire IFREMER/La Trinité-sur-Mer.
- N° 17. Allenou J.P., 1990. Etude sanitaire des eaux conchyliques de la Baie de Plouharnel (Morbihan). R. Int. IFREMER DRV-90.44-CSRU/La Trinité-sur-Mer.
- N° 18. Etude de salubrité des zones d'élevage de coquillages alimentées en eau de mer sur le littoral des Pays de la loire. Rapport de laboratoire IFREMER CSRU/Nantes.
- N° 19. Etude de salubrité des marais de Bourgneuf alimentés en eau de mer par l'étier du Collet, 1990. Rapport de laboratoire IFREMER CSRU/Nantes.
- N° 20. Etude de salubrité des marais de la Guittière, 1990. Rapport de laboratoire IFREMER CSRU/Nantes.
- N° 21. Catherine M., B. Beliaeff, A. Pezeron, 1991. Etude de salubrité du gisement naturel de coques (*Cerastoderma edule*) de la plage Benoît en baie du Pouliguen - Loire-Atlantique (1989-1990). R. Int. IFREMER DEL/91.04-Nantes.

ANNEXE 6

NOTIONS ET DEFINITIONS EN ECHANTILLONNAGE

NOTIONS ET DEFINITIONS EN ECHANTILLONNAGE

Une stratégie d'échantillonnage peut être définie comme étant la réponse à la question suivante: combien faut-il obtenir d'unités d'échantillonnage d'une taille déterminée et où (quand) les situer pour une ou plusieurs échelles d'observation afin de répondre au(x) but(s) de l'étude?

Un élément ou une unité d'échantillonnage est la fraction accessible du milieu (le prélèvement ou le volume analysé) sur laquelle portera la mesure ou l'observation de la variable analysée (dénombrement ou présence/absence des bactéries, virus etc...). L'ensemble des unités d'échantillonnage constitue un échantillon du phénomène à analyser.

Un échantillon est une collection d'éléments prélevés dans la population statistique selon un processus aléatoire ou une méthode dite à choix raisonné. Un échantillon est qualifié d'aléatoire ou de représentatif de la population statistique lorsque chaque élément de la population a une probabilité connue et différente de zéro d'appartenir à l'échantillon. Il sera à choix raisonné lorsque les unités seront sélectionnées en fonction de critères pré-établis par l'expérimentateur.

Un plan d'échantillonnage est un protocole de sélection des éléments de la population statistique en vue d'obtenir un échantillon aléatoire (ou représentatif). Il est conçu pour estimer avec le maximum de précision et le minimum d'effort un ou plusieurs paramètres de la population. Un plan d'échantillonnage apparaît comme "une question posée au milieu marin". Son aboutissement est une certaine image du système analysé, ou modèle devant être considéré comme un outil, toujours provisoire, que l'objectif soit théorique ou appliqué. Un plan d'échantillonnage implique le choix d'un certain sous-système comme objet de l'étude, partie intégrante de l'écosystème total mais possédant néanmoins sa dynamique propre. C'est donc un sous-système, constitué du descripteur et de son milieu ambiant, que l'on échantillonne. Compte tenu de la complexité de l'écosystème, il serait vain de réduire la description d'un peuplement et de son milieu ambiant à celle d'une répartition spatiale statique ou spatio-temporelle par l'intermédiaire de quelques estimateurs.

Un modèle, au sens le plus général du terme, est une image approximative limitée à une ou à un petit nombre d'échelles d'observation. La forme *a priori* de description recherchée, en fonction de laquelle est décidé le plan d'échantillonnage est nommée prémodèle.

Une population statistique est une collection d'éléments, possédant au moins une caractéristique commune, permettant de la définir, de laquelle on extrait un échantillon représentatif et sur laquelle portent les inférences ou conclusions statistiques.

Une population-cible est une entité généralement composite, par exemple la population des germes témoins de la contamination fécale, sur laquelle doivent porter les conclusions d'une étude.

Un paramètre est une caractéristique quantitative (moyenne, médiane, mode, variance, coefficient de corrélation) qui permet une représentation condensée de l'information contenue dans un ou plusieurs ensembles de données.

Un estimateur est une expression mathématique qui mesure, à partir des données de l'échantillon, un paramètre de la population statistique. Une estimation correspond à la valeur prise par un estimateur pour un échantillon particulier.

Le terme distribution désigne, au sens statistique, les distributions de probabilités, de fréquence, de moyenne etc...

Les formes prises par les dispersions spatio-temporelles des organismes ou des descripteurs écologiques sont appelées répartitions

Les variables échantillonnées sont appelées descripteurs écologiques. Le descripteur "dénombrement de bactéries" est une variable quantitative. En fin de compte on n'échantillonne que des descripteurs. Les descripteurs quantitatifs sont définis comme des quantités véritables (abondance, fréquence, quantités d'informations, taux...) pour lesquelles on peut déterminer des rapports. Deux notions fondamentales se rattachent à la mesure d'un descripteur quantitatif: la métrique (arithmétique, logarithmique, etc...) et l'échelle de mesure (ou unité de mesure). On passe d'une métrique à une autre par une transformation non linéaire et d'une échelle de mesure à une autre par une transformation linéaire.

ANNEXE 7

RESULTATS BRUTS

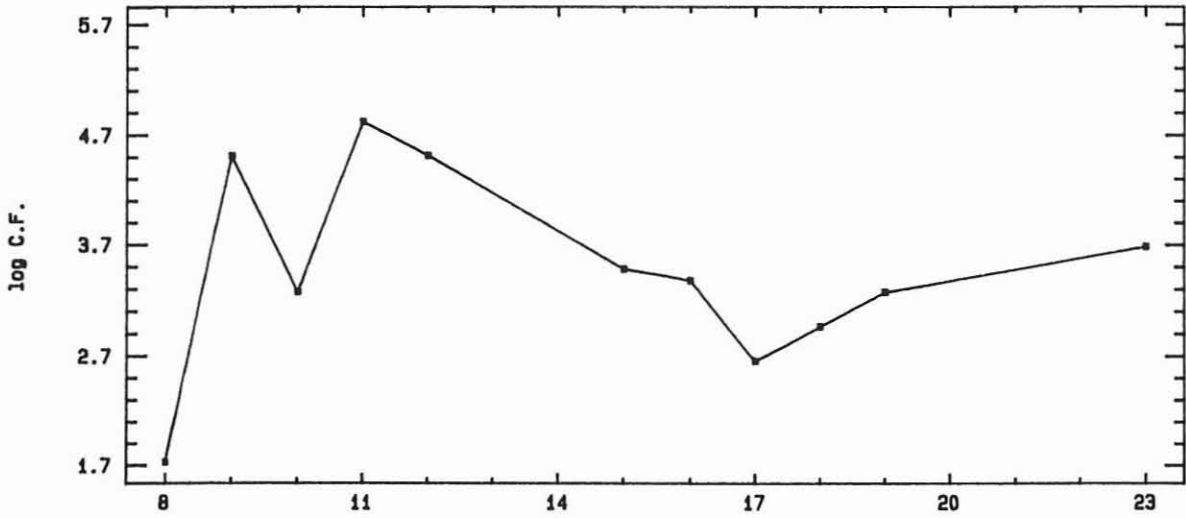
DATE	STATION 8			STATION 9			STATION 10		
	TD	Log CF	x	TD	Log CF	x	TD	Log CF	x
10.09.91	5.7	5.13		6.7	4.10		7.1	3.69	
	5.6	5.23	5.09	6.9	3.89	4.00	6.4	4.41	4.13
	5.9	4.92		6.8	4.00		6.5	4.30	
11.09.91	7.2	3.58		7.0	3.79		6.7	4.10	
	7.2	3.58	3.58	6.8	4.00	3.89	6.4	4.41	4.17
	7.2	3.58		6.9	3.89		6.8	4.00	
12.09.91	8.1	2.66		7.2	3.58		7.1	3.69	
	7.8	2.97	2.86	7.5	3.27	3.51	7.3	3.48	3.62
	7.8	2.97		7.1	3.69		7.1	3.69	
	STATION 7			STATION 8			STATION 9		
16.09.91	8.1	2.66		8.3	2.45		8.1	2.66	
	8.2	2.55	2.45	7.8	2.97	2.66	7.9	2.86	2.52
	8.6	2.76		8.2	2.55		8.7	2.04	
17.09.91	8.1	2.66		7.4	3.38		8.8	1.94	
	8.2	2.55	2.66	7.8	2.97	3.07	8.6	2.14	2.35
	8.0	2.76		7.9	2.86		7.8	2.97	
18.09.91	8.1	2.66		8.3	2.45		8.4	2.35	
	9.0	1.73	2.24	9.8	0.91	1.49	8.0	2.76	2.69
	8.4	2.35		9.6	1.11		7.8	2.97	

Tab A1 : Temps de détection (TD), logarithmes décimaux des coliformes fécaux (log CF) et leurs moyennes (\bar{x}) inter-prélèvements aux stations 8, 9 et 10, et inter-mesures dans les broyats aux stations 7, 8 et 9 du marais du Mes-Assérac (Loire-Atlantique).

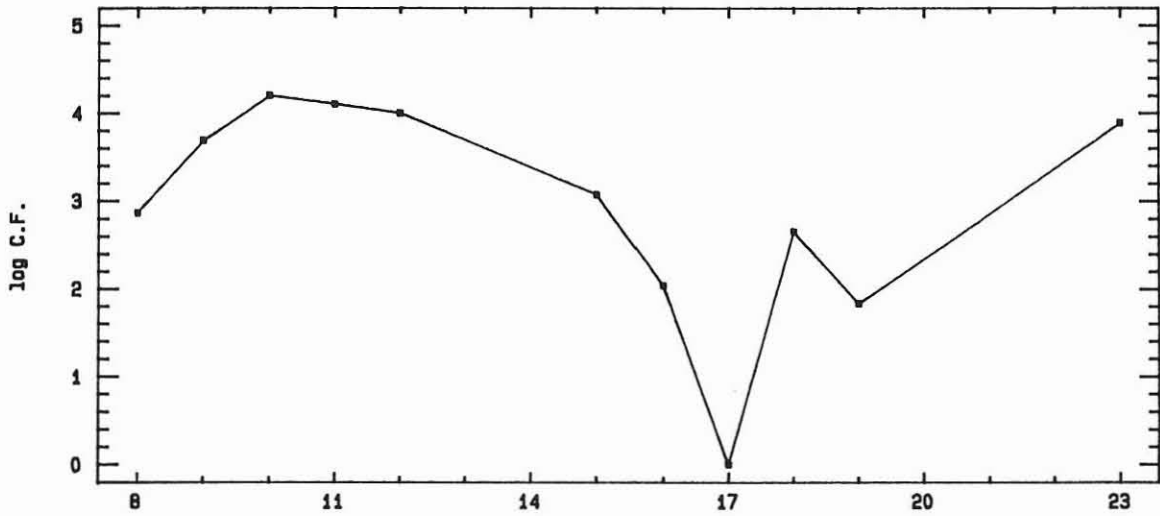
STATIONS	1		2		3		5		6		7		8		9		10	
DATE	TD	Log CF	TD	Log CF	TD	Log CF	TD	Log CF	TD	Log CF	TD	Log CF	TD	Log CF	TD	Log CF	TD	Log CF
08.09.91	9.0	1.73	7.9	2.86	7.0	3.79	7.0	3.79	7.5	3.27	-		6.5	4.30	-		-	
09.09.91	6.3	4.51	7.1	3.69	6.8	4.00	6.5	4.30	6.9	3.89	7.5	3.27	6.2	4.61	-		6.8	4.00
10.09.91	7.5	3.27	6.6	4.20	7.2	3.58	7.5	3.27	6.1	4.71	-		-	5.09	-	4.00	-	4.13
11.09.91	6.0	4.82	6.7	4.10	7.5	3.27	7.3	3.48	6.1	4.72	6.4	4.41	-	3.58	-	3.89	-	4.17
12.09.91	6.3	4.51	6.8	4.00	7.7	3.07	6.4	4.41	9.7	1.01	6.6	4.20	-	2.86	-	3.51	-	3.62
15.09.91	7.3	3.48	7.7	3.07	8.3	2.45	0.0	11.00	0.0	11.00	8.0	2.76	8	2.76	8.3	2.45	8.7	2.04
16.09.91	7.4	3.38	8.7	2.04	8.2	2.55	7.6	3.17	0.0	11.00	-	2.45	-	2.66	-	2.52	8.0	2.76
17.09.91	8.1	2.66	0.0	11.00	8.3	2.45	0.0	11.00	0.0	11.00	-	2.66	-	3.07	-	2.35	7.6	3.17
18.09.91	7.8	2.97	8.1	2.66	8.7	2.04	7.1	2.66	0.0	11.00	-	2.24	-	1.49	-	2.69	8.2	2.55
19.09.91	7.5	3.27	8.9	1.83	7.5	3.27	8.8	1.94	0.0	11.00	8.8	1.94	9.2	1.52	8.7	2.04	8.5	2.24
23.09.91	7.1	3.69	6.9	3.89	7.0	3.79	6.8	4.00	7.0	3.79	6.2	4.61	6.6	4.20	6.1	4.72	6.5	4.30

Tab. A2 : Temps de détection (TD), logarithmes décimaux des coliformes fécaux (log CF) des 11 séries de mesures aux 9 stations de prélèvements du marais du Mes-Assérac (loire-Atlantique).

STATION N° 1



STATION N° 2



STATION N° 3

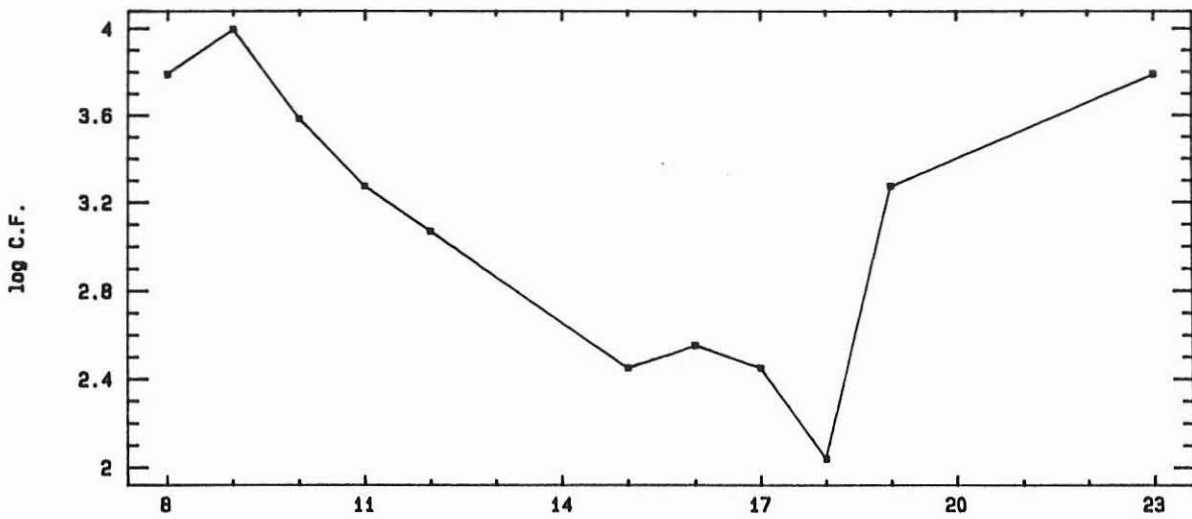
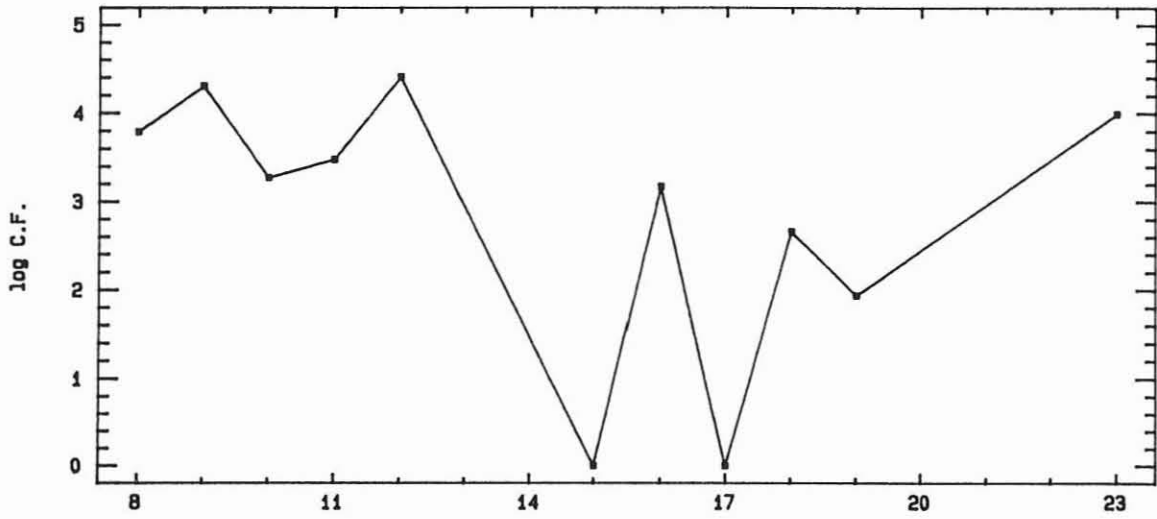
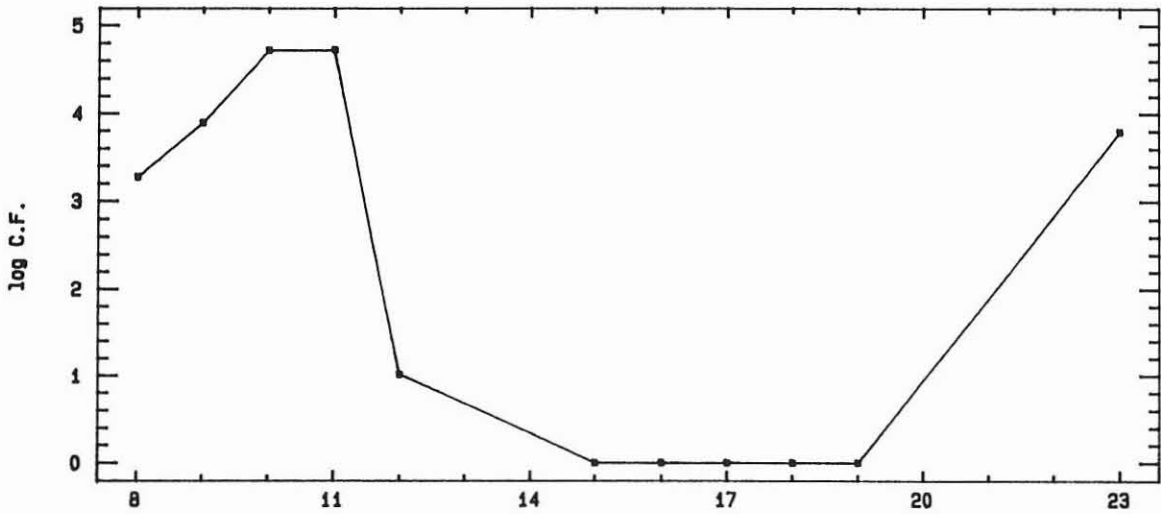


Fig. A1 : Evolutions journalières des niveaux de contamination (log. C.F./100ml) aux stations de prélèvements 1, 2 et 3 des marais du Mes-Assérac (Loire-Atlantique).

STATION N° 5



STATION N° 6



STATION N° 7

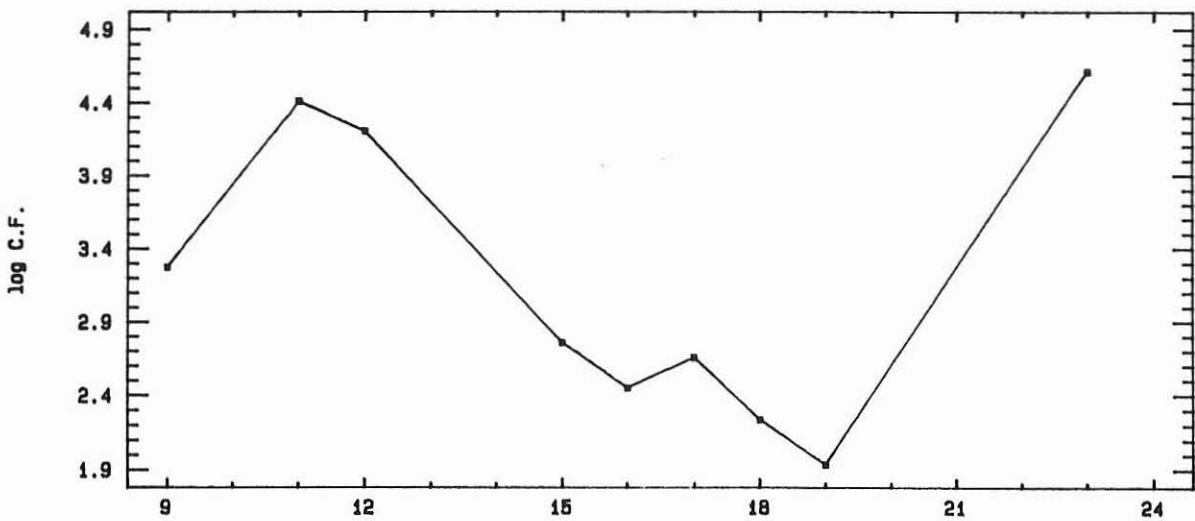
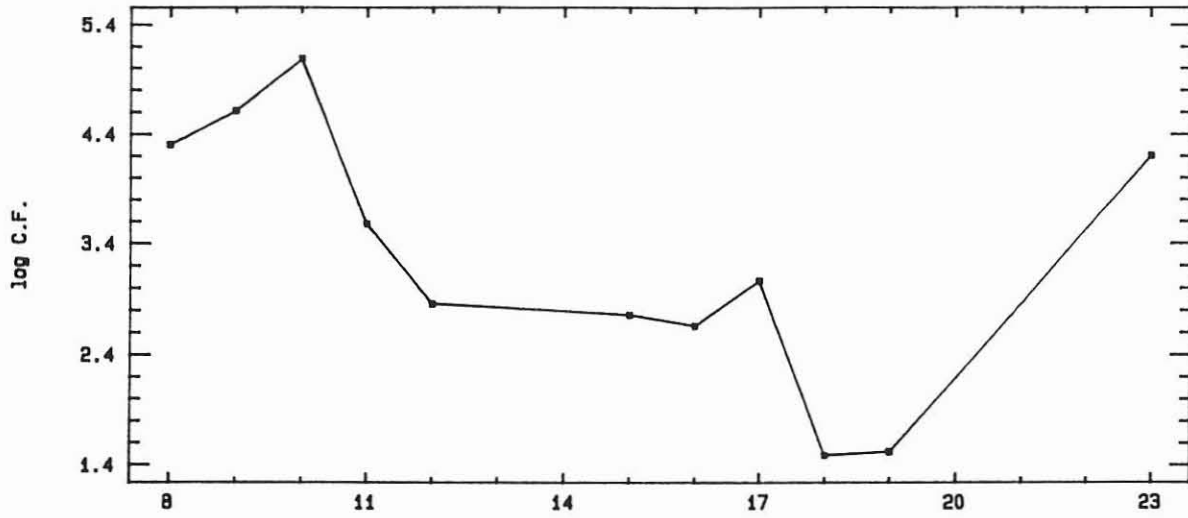
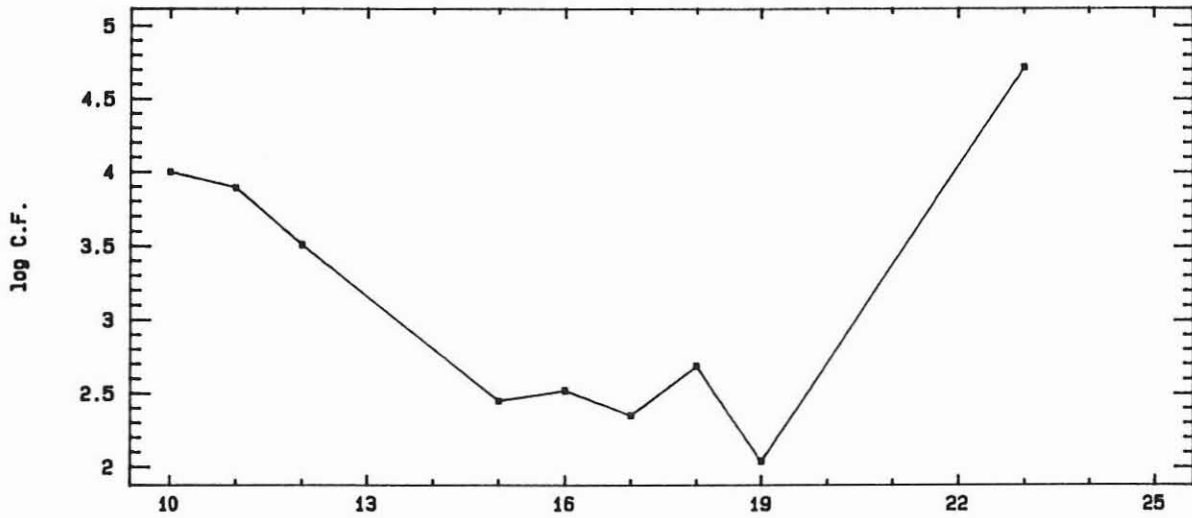


Fig. A2 : Evolutions journalières des niveaux de contamination (log. C.F./100 ml) aux stations de prélèvements 5, 6 et 7 des marais du Mes-Assérac (Loire-Atlantique).

STATION N° 8



STATION N° 9



STATION N° 10

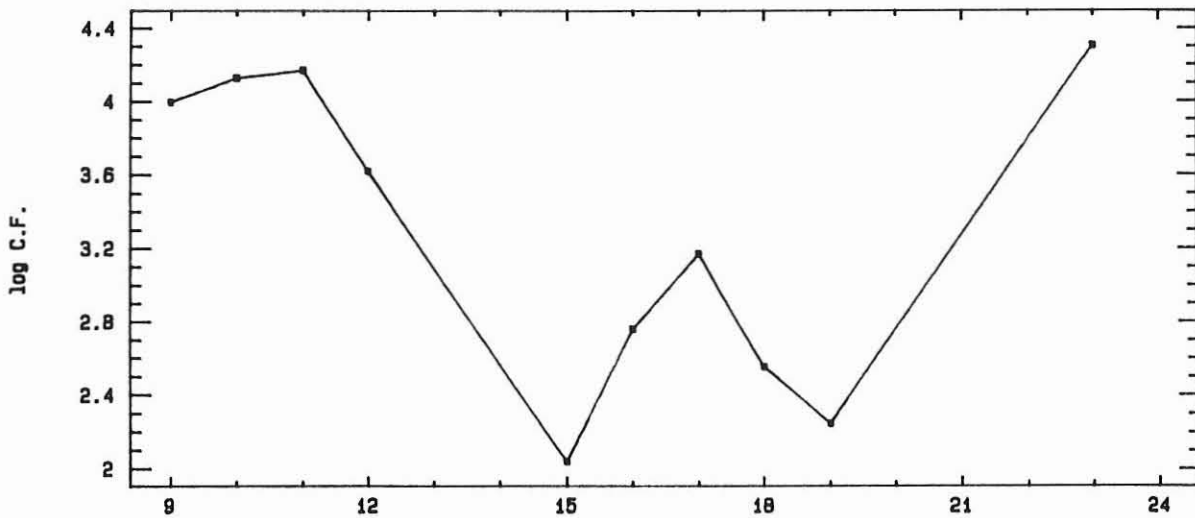


Fig. A3 : Evolutions journalières des niveaux de contamination (log. C.F./100 ml) aux stations de prélèvements 8, 9 et 10 des marais du Mes-Assérac (Loire-Atlantique).

STATIONS	1		2		3		5		6		7		8		9		10	
DATE	T°C	S‰	T°C	S‰	T°C	S‰	T°C	S‰	T°C	S‰	T°C	S‰	T°C	S‰	T°C	S‰	T°C	S‰
08.09.91	23.0	37.7	22.5	37.5	20.1	35.3	20.3	36.7	20.7	35.5	19.5	36.4	21.2	35.7				
08.09.91*															20.5	35.4		
09.09.91	24.6	44.8			22.7	36.3			22.7	37.6	22.7	37.6	22.8	36.3			22.7	38.9
09.09.91*	24.6	51.4			23.1	35.4					23.3	36.5			22.7	36.3		
10.09.91	24.7	40.9			22.7	36.3			22.7	36.3	22.7	36.3						
11.09.91	24.0	39.4			22.0	36.0					22.6	36.2						
12.09.91	25.0	38.5			22.5	36.2			27.5	55.0	23.1	36.4			23.5	36.6		
15.09.91	24.1	36.8							23.4	54.0	23.1	39.0			23.0	39.0		
16.09.91	22.1	34.7	22.5	36.2	22.2	36.0			25.1	42.4	22.5	37.5			22.7	37.6		
16.09.91*	23.1	41.7			22.5	37.5					23.4	40.5			23.5	37.9		
17.09.91	20.3	34.1																
18.09.91	22.9	36.3	22.9	37.6	21.9	35.9					21.9	37.2			21.8	38.5		
19.09.91	22.7	36.3	22.0	36.0	21.3	35.7	21.7	35.9	22.5	37.5	21.7	35.9	21.7	35.9				
23.09.91	16.4	34.1			17.4	37.0					17.9	37.1			18.5	37.4		
23.09.91*	16.4	43.2			17.4	35.7					17.1	42.1			18.1	35.9		

Tab. 3 : Températures et salinités relevées occasionnellement aux 9 stations de prélèvements dans les étiers du marais du Mes – Assérac (Loire –Atlantique).

(*) mesures faites aux mêmes stations dans les claires voisines.