Défi MOREST

# Mortalités estivales de l'huître creuse *Crassostrea gigas.*

## Caractérisation des facteurs de risques associés au mortalités estivales

*Synthèse du thème 3*

## Risque associé au stress environnemental

*(La Rochelle 14-15 mars 2006)*

Projet cofinancé par :

# Caractérisation des facteurs de risques associés au mortalités estivales

***Synthèse du thème 3***

# Risque associé au stress environnemental

**2002 - 2005**

**Auteurs**: T. Burgeot, B. Gagnaire, T. Renault, J. Haure, D. Moraga, E. David, I. Boutet, P.G. Sauriau, N. Malet, V. Bouchet , S. Lapègue, K. Bouilly, G. Le Moullac, G. Arzul, J. Knoery, F. Quiniou, C. Bacher, P. Soletchnik

***Contributeurs*** **:** F. Géret, S. Quirion, D. Ménard, S. Rousseau, L. David, A. J. Hécart, P.Y. Communal, A. Van Wormhoudt, C. Pénisson, H. Palvadeau, A. Cozic, E. Bédier, F. Blouin, , JF Bouget, V. Justome, A. Langlade, P. Malestroit, M. Ropert, J.L. Seugnet, C. Simonne

**Coordinateur du programme**

**J.F. Samain**

**1. Introduction** ..... **3**

**2. Etude expérimentale du stress** ..... **5**

2.1. Effet de l'hypoxie ..... 5

2.1.1. Régulation de l'expression de gènes ..... 5

2.1.2. Conséquences physiologiques et métaboliques de l'hypoxie sur la respiration ..... 7

2.1.3. Stress oxydant ..... 11

2.2.Effet des pesticides ..... 12

2.2.1.Stress oxydant ..... 12

2.2.2. Stress génotoxique : aneuploïdie ..... 12

**3. Sources de perturbations et stress environnemental suivant le modèle plat-table** ..... **13**

3.1. Sources potentielles toxiques issues du sédiment ..... 14

3.1.1.Flux et concentrations de substances réduites ..... 14

3.1.2. Embryotoxicité du sédiment et de l'eau ..... 17

3.2. Sources potentielles toxiques dans l'eau et qualité de l'environnement nutritionnel ..... 19

3.2.1.Concentration des herbicides dans les eaux superficielles du site de Marennes-Oléron ..... 19

3.2.2.Effet des pesticides sur des populations naturelles de phytoplancton : Conséquences possibles sur la production secondaire ..... 21

3.2.3. Qualité de l'environnement nutritionnel ..... 25

3.3 Stress des huîtres suivant la distance du sédiment : modèle plat-table ..... 28

3.3.1.Perturbation de la chaîne respiratoire et déficit énergétique sur le site d'Auray ..... 28

3.3.2 Etude du stress environnemental sur le site Atelier de Marennes Oléron ..... 30

**4 Conclusion** ..... **36**

**5. Bibliographie** ..... **38**

# 1. Introduction

Les mortalités d'huîtres observées sur les côtes françaises apparaissent principalement à proximité du sédiment et pendant la gamétogenèse. Les interactions de facteurs environnementaux sur les écosystèmes conchylicoles comme la température, les apports des bassins versants et le compartiment sédimentaire illustrent un risque de mortalité lié à différentes sources de stress (Thème 1). Les variations de la qualité de la ressource trophique pendant l'effort de gamétogenèse favorise une baisse de l'énergie disponible (Thème 2) et contraint l'organisme fragilisé à fournir un effort d'adaptation (Fent 2004). L'apparition d'un stress pendant cette période sensible des huîtres pourrait constituer un facteur aggravant de mortalité. L'objectif de cette étude est donc d'étudier l'apparition d'un stress environnemental dans la période qui précède les mortalités et de relier ce stress à la présence de substances chimiques dans le sédiment (ammonium et sulfures) et l'eau (herbicides).

Les substances chimiques agissent sous forme de toxicité directe (ex : sur les tissus) ou indirecte (réduction de la qualité du régime alimentaire) en fragilisant l'équilibre physiologique des organismes. Le caractère saisonnier des flux d'ammonium et sulfures ainsi que les apports des herbicides dont les périodes d'épandage (domestiques et agricoles) coïncident avec la période de mortalité des huîtres, représentent une source de stress potentielle en zone ostréicole.

L'effort d'adaptation représentatif du stress a été étudié à partir de mécanismes cellulaires comme la chaîne respiratoire mitochondriale car elle joue un rôle capital dans la cellule en étant responsable de la transformation de l'oxygène en molécules d'eau. L'altération de la chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie est une première cause d'augmentation du stress oxydant. Le stress oxydant qui est issu de la présence excessive de radicaux oxygénés toxiques. Le stress oxydant peut être lié à la présence de polluants chimiques mais également de facteurs environnementaux (ex : température). Les cellules utilisent de nombreuses stratégies de défenses antioxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leur niveau d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Les composés chimiques comme les pesticides peuvent provoquer une production excessive de radicaux libres mais ils peuvent également provoquer des dommages à l'ADN (Bouilly *et al* 2004) et perturber le système de défense immunitaire (Gagnaire *et al.*, 2005).

La question posée est donc d'abord de déterminer l'existence d'un stress et la période d'apparition du stress chronique (ou environnemental) puis d'évaluer des sources de stress potentielles apparaissent via le sédiment ou l'eau alors même que la température s'élève au delà de 19 °C et que les huîtres se trouvent dans une phase de préponte.

Cette synthèse présente les travaux réalisés en conditions contrôlées et sur trois sites ateliers (Marennes Oléron, Baie des Veys et Baie de Quiberon). Les travaux réalisés en conditions contrôlées ont pour objectif d'évaluer les effets d'exposition à un stress hypoxique et aux pesticides avec des marqueurs moléculaires et enzymatiques. L'étude de terrain réalisée sur différents sites ateliers a été conduite dans l'objectif de caractériser un stress chronique avant les mortalités. Ce stress chronique est étudié en lien avec différentes sources de perturbations dans l'eau et le sédiment. La diffusion de sulfure et d'ammonium à partir du sédiment a été évaluée ainsi que le potentielle embryotoxique du sédiment et de l'eau. Un plan expérimental visant à identifier un effort d'adaptation physiologique associé à un stress environnemental a été mis en place suivant le modèle d'élevage plat-table. Il permet d'étudier plus précisément un stress lié à la distance du sédiment (15 et 70 cm). Dans ce contexte, l'intensité des échanges benthos-pélagos doit se refléter dans la composition qualitative de la nourriture disponible pour les huîtres. La technique du traçage isotopique naturel qui est discrminante sur l'origine de la matière organique, doit ainsi permettre de tracer la dynamique des apports trophiques et d'estimer les différences de régime alimentaire entre les huîtres placées à 15 et 70 cm du sédiment.

Le stress environnemental a été évalué avec des biomarqueurs caractéristiques d'une activité métabolique d'adaptation. Des indicateurs antioxydants (Catalase, Métallothionéines, Glutamine synthètase, glutahtion-s-transférase, protéines de choc thermique), et des indicateurs génotoxiques (aneuploïdie et adduits à l'ADN). Le diagnostic d'effets précoces apporté par les biomarqueurs a été complété avec une évaluation des conséquences physiologiques de l'hypoxie sur la chaîne respiratoire et les variations des fonctions immunitaires des hémocytes. La réponse dynamique

déterminer au niveau subcellulaire à pour but de caractériser l'effort métabolique d'adaptation des huîtres dans le cas de stress environnemental.

1) La première partie est consacrée aux travaux réalisés en conditions contrôlées afin à caractériser différentes formes de stress (stress respiratoire, génotoxique, expression différentiée de gènes) dans le cas d'exposition à un mélange de pesticides ou une hypoxie.

2) La seconde partie est focalisée sur une approche visant à relier des sources de perturbations à proximité du sédiment et dans la colonne d'eau avec un stress chronique. Le stress est évalué avec l'application des biomarqueurs subcellulaires pertinents étudiés en conditions contrôlées d'hypoxie et pesticides. Un effort particulier a été focalisé sur le site atelier de Marennes Oléron. Il est complété par des travaux ponctuels menés en Baie de Veys et en Baie de Quiberon.

# 2. Etude expérimentale du stress

## 2.1. Effet de l'hypoxie

### *2.1.1. Régulation de l'expression de gènes*

La réponse au stress hypoxique a été appréhendée au niveau du transcriptome sur des huîtres non différenciées génétiquement. L'objectif était d'étudier la cascade de processus moléculaires et physiologiques impliqués dans le métabolisme d'adaptation. Des banques soustractives ont été réalisées après une exposition expérimentale à une hypoxie de 30% de saturation pendant 7-10 jours et 24 heures (David *et al.*, 2005). Le séquençage des clones obtenus a permis d'obtenir 616 séquences partielles d'ADNc correspondant à des gènes dont l'expression s'est trouvée potentiellement régulée par ce type de stress environnemental, gènes associés à 12 fonctions physiologiques majeures : reproduction, protéines de stress, régulation des protéines, régulation des acides nucléiques, chaîne respiratoire, structure, métabolisme des lipides, métabolisme énergétique, métabolisme des acides aminés, communication cellulaire, détoxication et développement (Fig 1). Parmi ces séquences, une majorité correspondait à des gènes codant pour des enzymes ou des protéines impliquées la communication cellulaire, la régulation des protéines ou dans le métabolisme énergétique. Ces résultats sont en accord avec les observations d'Hochachka et collaborateurs (1996) qui décrivaient une cascade de processus moléculaires et physiologiques en réponse à l'hypoxie chez les organismes tolérants à ce stress, avec en premier lieu une mobilisation des systèmes de réception et de transmission de signal induisant des séries de régulations parmi lesquelles la diminution des synthèses protéiques. Dans notre étude, un grand nombre de séquences codant pour des protéines ribosomales a aussi été obtenu. Une validation des résultats de ces banques a ensuite été réalisée par suivi de l'expression de certaines des séquences régulées selon le temps d'exposition à l'hypoxie, par RT-PCR semi-quantitative.

Parmi les gènes impliqués dans le métabolisme énergétique, le gène de la glycogène phosphorylase est apparu comme activé par l'hypoxie après 24 jours d'exposition ce qu'a confirmé le suivi de son expression (Fig 2). Cette enzyme a été couramment observée comme étant activée par l'hypoxie (Mehrani et Storey, 1995 ; Theen *et al.*, 1982). L'activation de la transcription du gène codant pour cette enzyme qui dégrade le glycogène pendant la glycogénolyse semble aider chez l'huître au maintien de la ressource en énergie pendant cette situation de stress. Le catabolisme des glucides et donc le métabolisme anaérobie sont en effet favorisés afin de maintenir la production d'ATP à un niveau suffisant. Les taux de production et d'utilisation de l'ATP sont souvent ensuite limités afin de maintenir l'équilibre apport-demande en énergie (Hochachka *et al.*, 1996).

Plusieurs séquences nucléotidiques obtenues par la méthode des banques soustractives codent pour des enzymes impliquées directement ou indirectement dans le métabolisme oxydatif, en particulier des enzymes anti-oxydantes (glutathion peroxidase, gutathion-s-transferase, superoxide dismutase, métallothionéine), ce qui confirme une relation étroite entre hypoxie et stress oxydatif (Willmore et Storey, 1997 ; Richier *et al.*, 2003). Le gène de la glutathion peroxidase non sélénium s'est par exemple révélé être activé dès 7 jours par une exposition expérimentale à l'hypoxie (Fig 3). La glutathion peroxidase est une des principales enzymes anti-oxydantes. Alors qu'il est souvent considéré que l'hypoxie favorise une diminution du stress oxydatif de part la diminution du substrat de nombreuses réactions d'oxydation qu'est l'oxygène, l'activité de certaines enzymes anti-oxydantes comme la glutathion peroxidase a été décrite alternativement inhibée ou activée par l'hypoxie. Une augmentation de la transcription du gène correspondant telle que nous l'avons observée peut être expliquée par une possible préparation de l'huître à un éventuel stress oxydatif qui surviendrait lors de la réoxygénation du milieu (Hermes-Lima *et al.*, 1998).

Cette étude contribue à améliorer la compréhension des réponses adaptatives de *C. gigas* à des conditions de stress hypoxique, et à la caractérisation de nouveaux marqueurs de stress impliqués dans différentes voies métaboliques chez cette espèce.

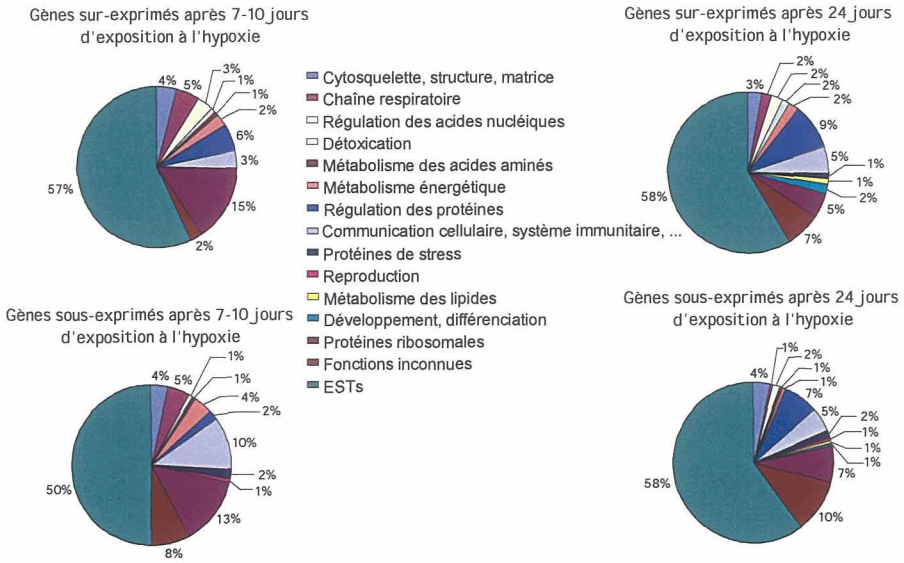



*Figure 1* : Identification de gènes régulés par l'hypoxie (David *et al.*, 2005).

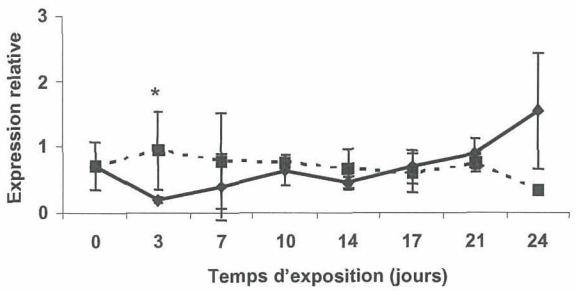



*Figure 2 : Expression différentielle du gène de la glycogène phosphorylase dans la glande digestive chez C. gigas en conditions d'hypoxie. L'expression est présentée en ratio calculé DOgene/DO28S après RT-PCR. La courbe en pointillés représente le contrôle, la ligne continue les échantillons soumis à hypoxie. * : différence significative entre contrôle et échantillons soumis à hypoxie (David et al., 2005).*

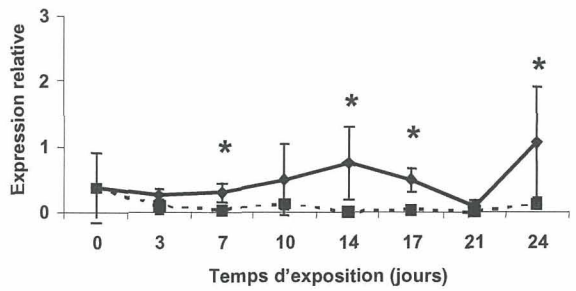



*Figure 3 : Expression différentielle du gène de la glutathion peroxidase dans le manteau chez C. gigasen conditions d'hypoxie. L'expression est présentée en ratio calculé DOgene/DO28S après RT-PCR.*
*La courbe en pointillés représente le contrôle, la ligne continue les échantillons soumis à hypoxie.*
** : différence significative entre contrôle et échantillon soumis à hypoxie (David et al., 2005).*

### *2.1.2. Conséquences physiologiques et métaboliques de l'hypoxie sur la respiration*

L'hypothèse de travail repose sur l'existence d'un problème respiratoire des huîtres en période de reproduction. Il est apparu important de déterminer des marqueurs associés à la respiration pour évaluer le risque *in situ*.

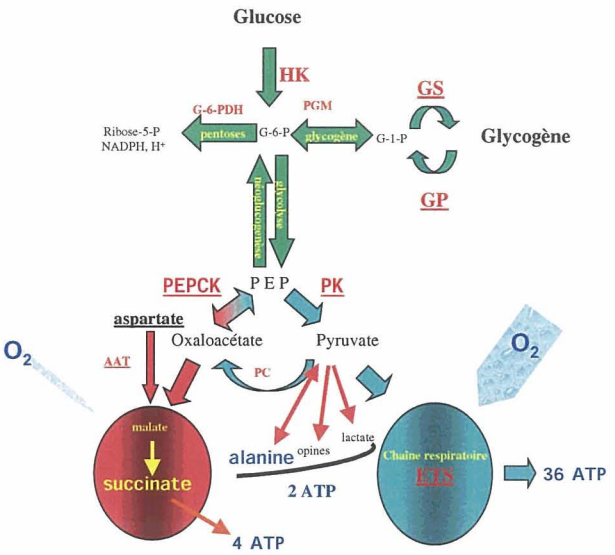



*Figure 4 : Réponse respiratoire et déficit d'énergie).*

L'hypoxie est privilégiée pour révéler les réponses métaboliques. Ceci conduit à la caractérisation ( Fig 4) du carrefour métabolique PhosphoEnol Pyruvate (PEP) géré par les enzymes pyruvate kinase (PK) et phosphoenolpryruvate carboxykinase (PEPCK). D'autres marqueurs sont recherchés au sein des sous-produits de la glycolyse (alanine), du cycle de Krebs (succinate), de la chaîne respiratoire (Système de transport d'électron) et enfin la charge énergétique (CEA). Afin d'évaluer le risque respiratoire et par conséquent énergétique en période de reproduction, trois expérimentations ont été réalisées afin de discerner les différences de réponse selon les étapes du cycle reproducteur, à savoir :: la mise en réserve, la gamétogenèse et la période de réorganisation des gonades. Les températures expérimentales correspondent aux températures du milieu de la période physiologique considérée: 12°C pour la mise en réserves, 19°C pour la gamétogenèse et 15°C pour la réorganisation, en condition trophique saturante. L'hypoxie est maintenue à 2 mg $O_2.L^{-1}$ par un bullage d'azote dans l'eau de renouvellement.

- 2.1.2.1. Bioénergétique

L'ingestion et la respiration des huîtres en normoxie aux 3 périodes physiologiques considérées sont significativement soumis à la température. L'assimilation varie peu entre les 3 périodes. Cependant, le bilan énergétique devient négatif en automne alors que les huîtres en normoxie entrent en régression. La régression est probablement à l'origine de ce bilan négatif, puisque la résorption des gonades procure des métabolites

L'hypoxie réduit considérablement l'ingestion des huîtres quelque soit leur statut reproductif ce qui entraîne une baisse de la consommation d'oxygène. D'autre part, Au cours de cette expérimentation, les résultats montrent que l'assimilation diminue significativement de 20% Le bilan énergétique des huîtres en normoxie baisse entre la période de mise en réserve et la gamétogenèse et devient négatif en automne alors que les huîtres entrent en régression. En hypoxie, le bilan général est significativement plus faible qu'en normoxie mais reste positif pour toutes les périodes testées (tableau 1). L'hypoxie préserve les huîtres de la régression des gonades en automne.

*Tableau 1: bilan bioénergétique populationnel*

| Saisons (Statut physiologique) | Conditions oxyques | Ingestion (cell $h^{-1}$ $kg^{-1}$) | Assimilation (%) | Respiration (mg $O_2$ $h^{-1}$ $kg^{-1}$) | SFG (J $h^{-1}$ $kg^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|---|

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Hiver | normoxie | 1425,1± 990,6[a] | 70±3 [a] | 11,2±5.8 [a] | 8,2±1.2 [a] |
| (réserves) | hypoxie | 510,9±309,5[b] | 52±7 [b] | 2,6±1.5 [b] | 4,1±0.4 [b] |
| Eté | normoxie | 10289,8±1587,9 [a] | 60±11 [a] | 89,4±11.1 [a] | 9,1±4,1 [a] |
| (gamétogenèse) | hypoxie | 3668,0±1801,6 [b] | 35±9 [b] | 22,5±15.1 [b] | 1,5±3,2 [b] |
| Automne | normoxie | 2609,3±64.4 [a] | 59±5 | 33,0±1,32 [a] | -1,1±0,9 [b] |
| (régression) | hypoxie | 1588,8±9.8 [b] | 51±5 | 5,0±1,27 [b] | 3,1±1,2 [a] |

- 2.1.2.2 Métabolique

2.1.2.2..1. Variations des activités Pyruvate Kinase et Phosphoénol Pyruvate Kinase

L'activité de la PK est soumise à l'influence des facteurs testés. Le mode expérimental permet de révéler l'influence du facteur saisonnier traduit par les températures expérimentales (12, 19 et 15°C) et le statut physiologique. L'hypoxie entraîne systématiquement une inhibition significative de l'activité de cette enzyme qui atteint 33% en hiver, 29% en été et 24% en automne (Fig 5). La voie aérobie de production d'énergie est donc fortement perturbée par l'hypoxie. Il n'est pas apparu de changement significatif de l'activité de la PEPCK

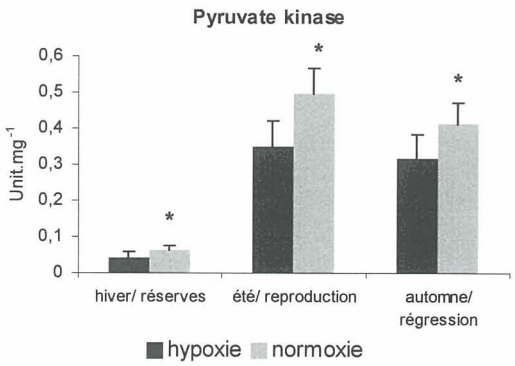



*Figure 5 : Variations de l'activité de la PK.*

2.1.2.2..2. Alanine et succinate

L'alanine est un acide aminé, sous-produit de la glycolyse et précurseur de la néoglucogenèse. L'accumulation de ce métabolite qui indique le ralentissement ou l'arrêt de la néoglucogenèse est aussi un signe de stress des organismes vivants (Monlise *et al.*, 2003). Dans nos expérimentations, une accumulation significative d'alanine est observée (Fig 6) au cours de 2 expérimentations sur 3 : 1/ En hiver, les analyses proximales ont en effet montré qu'il n'y a pas d'accumulation hivernale des glucides chez les huîtres en hypoxie. 2/ En période de régression, une accumulation significative d'alanine est aussi observée chez les huîtres en hypoxie. 3/ En période de gamétogenèse, aucun changement significatif n'est observé en hypoxie.

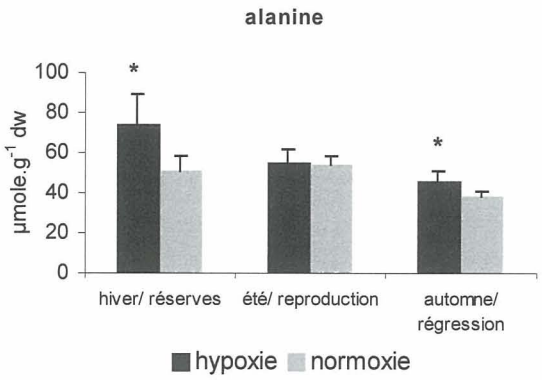



*Figure 6 : Variations de l'alanine.*

Le succinate est un acide organique du cycle de Krebs dont la forte accumulation (10 à 80 fois) résulte du changement d'orientation du carrefour PK-PEPCK : inhibition de la PK et activation de la PEPCK. L'accumulation significative (1.6 fois) du succinate (Fig 7), observée seulement en hiver en hypoxie est relativement faible par rapport aux valeurs attendues en anaérobiose (de Zwann *et al.*, 1991 et Santini *et al.*, 2001).

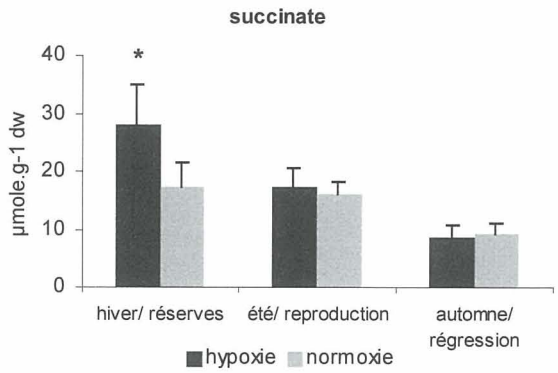



*Figure 7 : Variations du succinate*

2.1.2.2..3. Consommation d'oxygène et charge énergétique

L'activité de la chaîne respiratoire traduisant l'activité du système enzymatique permettant le transport des électrons permet de mesurer le besoin en oxygène au niveau cellulaire. Il apparaît un effet saisonnier/température significatif (Fig 8). Ce changement s'apparente à la consommation en oxygène de l'organisme. Cependant, en hypoxie, le comportement de la chaîne respiratoire n'est plus corrélé à la consommation d'oxygène puisque l'adaptation se fait par une suractivation du système de transport d'électrons (ETS). La fonction est stimulée significativement par le déficit en oxygène pendant les périodes de gamétogenèse et de régression mais pas pendant le néoglucogenèse. Ceci peut paraître étrange mais d'un point de vue enzymatique est envisageable pour l'optimisation de la fonction dont le résultat immédiat est le maintien de la formation d'ATP.

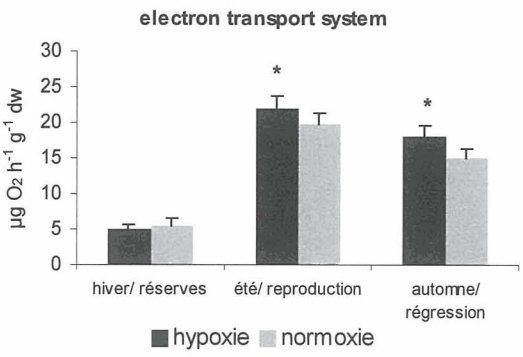



*Figure 8 : Variations de l'ETS*

La charge énergétique des huîtres soumises à l'hypoxie est globalement plus faible qu'en normoxie (Fig 9). Cependant, c'est seulement pendant la période de régression des gonades que le déficit énergétique est significativement mis en évidence. Il faut toutefois noter que la charge énergétique en période hivernale est anormalement faible comparée aux données habituelles (Moal et al, 1991). Les valeurs de CEA n'atteignent toutefois pas les seuils critiques associées à la mortalité (Ivanovici, 1980).

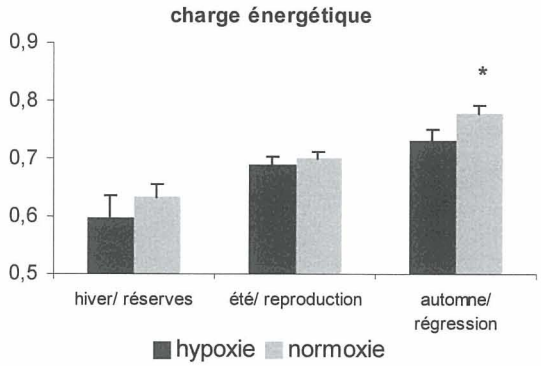



Figure 9 : Charge énergétique

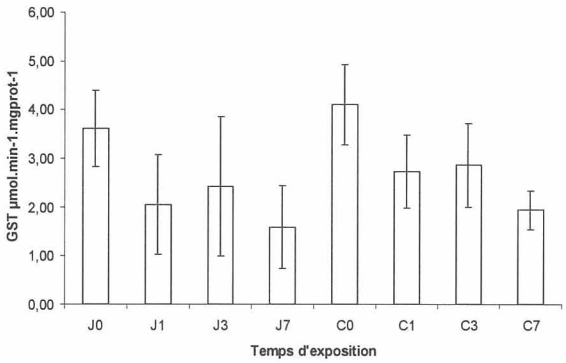
Conclusion : Au cours de ces 3 expérimentations prenant en considération le facteur température et le statut reproductif, l'adaptation à l'hypoxie se manifeste à plusieurs étapes du métabolisme énergétique. En premier lieu, l'organisme réduit ses besoins abaissant l'assimilé (baisse de l'ingestion et de l'efficacité d'absorption) et par conséquent la consommation d'oxygène. Le SFG reste toutefois positif en hypoxie alors qu'il devient négatif chez les huîtres en régression restées en normoxie. Ce bilan négatif provient d'une consommation d'oxygène élevée qui doit permettre de métaboliser ce qui est ingéré et assimilé et les constituants issus de la résorption des gonades. Au plan métabolique, les marqueurs de la glycolyse et mitochondriaux révèlent que l'organisme entier n'est pas engagé sur une voie anaérobie stricte. L'inhibition de l'activité de la PK est une réponse à l'hypoxie (Storey, 1993, Greenway and Storey, 2000).Cette inhibition provoque la réduction du flux métabolique de la glycolyse vers le cycle de Krebs. On constate d'autre part que l'activité de la PEPCK au niveau de l'organisme ne change pas. Lorsque l'on observe les niveaux de succinate dont l'augmentation significative révélée seulement en période hivernale n'est pas dans les proportions indiquées dans la littérature de 10 à 80 fois (de Zwann *et al.*, 1991, Santini *et al.*, 2001). Le modèle de fonctionnement en anaérobiose par l'activation de la PEPCK complété de l'accumulation de succinate ne se met pas en place. En revanche il apparaît une voie intermédiaire qui se traduit donc par l'inhibition de la PK accompagnée de l'accumulation d'alanine (Monlise *et al.*, 2003). Chez les mollusques et les crustacés, ce phénomène est significatif de chocs osmotiques et de l'anoxie (Deaton, 2001, Fujimori and Abe, 2002). D'autre part, l'accumulation d'alanine signifie aussi l'arrêt de la néoglucogenèse, puisque c'est un métabolite précurseur (Schein *et al.*, 2004) au même titre que le lactate chez les vertébrés. En gamétogenèse, on observe pas d'accumulation d'alanine en raison probablement du fait que la néoglucogenèse ne fonctionne pas pendant cette phase critique. Les variations de l'activité ETS observées au cours de nos expérimentations sont de type saisonnier, liées à la température (Fanslow *et al.*, 2001) et sont corrélés à la respiration en

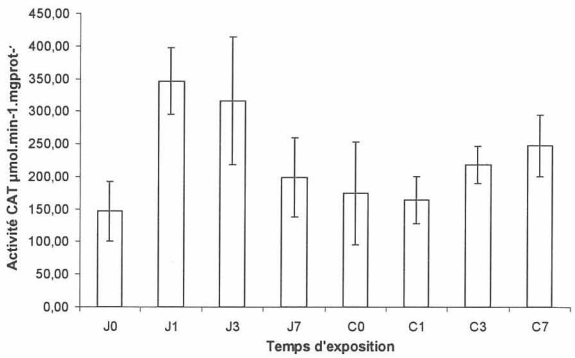
mode normoxique. Mais de manière surprenante, l'hypoxie génère une augmentation significative de l'activité ETS en été et en automne alors que la consommation d'oxygène des huîtres en hypoxie a baissé de 70%. Cette augmentation reste à confirmer à l'aide d'un marqueur représentatif de la chaîne respiratoire telle que la *cytochrome c oxydase*. Le mécanisme de régulation reste à déterminer. Une régulation au niveau du gène est envisageable puisqu'une surrégulation de la sous-unité III de la *cytochrome c oxydase* a été montrée dans la glande digestive d'huîtres soumises à l'hypoxie (David *et al.*, 2005). La suractivation de l'ETS est probablement un mode d'adaptation permettant de maintenir la production d'énergie puisque le stock d'ATP représenté par la charge énergétique est peu différent entre l'hypoxie et la normoxie. Ce n'est qu'en phase de régression que la CEA est significativement plus faible en hypoxie

La période critique que représente la gamétogenèse induit une dépression métabolique chez des huîtres en hypoxie. L'ingestion, l'assimilation et la respiration sont fortement réduits. Les voies métaboliques de gestion de l'énergie sont aussi perturbées mais le modèle de production d'énergie en anaérobiose n'apparaît pas : si la PK est inhibée, la PEPCK ne change pas et le succinate ne s'accumule pas. En revanche l'organisme tente de compenser la faible disponibilité en oxygène par une suractivation de la chaîne respiratoire. Cette adaptation permet parfois de maintenir le niveau de la charge énergétique à un niveau non critique (Ivanovici, 1980).

### *2.1.3. Stress oxydant*

L'étude d'un effet hypoxie (30%) a été conduit en condition contrôlée ( Fig 10) suivant la méthode décrite dans le chapitre 4 « Réponse au stress de souche R et S » du thème 5. Cinq biomarqueurs étudiées dans le cas de stress oxydant (Lau & Wong 2003) ont été mesurés dans la glande digestive ou les branchies. Les activités enzymatiques de la catalase CAT et de la glutamine synthètase GS ont été mesurées dans la glande digestive. L'activité glutathion-s-transférase GST a été déterminée dans les branchies. Les métalothionéines MT et les protéines de choc thermique HSP70 ont été analysées dans les branchies. Les activités enzymatiques CAT et GS augmentent significativement ($p < 0,01$) après un et trois jours d'exposition. Les activités GST décroissent dès le premier jour d'exposition. Les variations des quantités de HSP70 ne présentent pas de variations significatives. Les MT augmentent significativement ($p < 0,001$) à partir du septième jour. Un décalage dans la cinétique d'activation apparaît entre les différents biomarqueurs mais il confirme le potentiel de stress oxydant de l'hypoxie sur des huîtres.



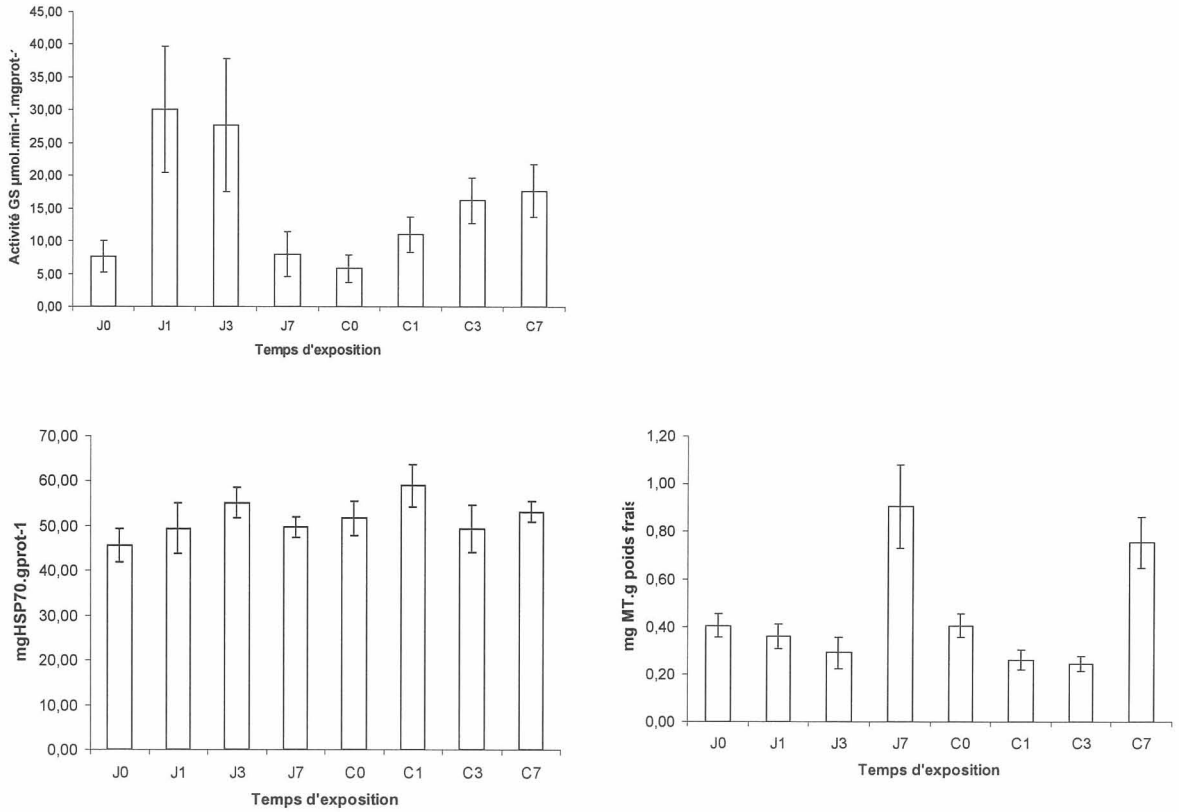



*Figure 10: Variations de biomarqueurs de défense antioxydant (catalase :CAT ; glutathion-s-transférase :GST ; Glutamine synthètase :GS ; Métallothionéine MT ; Protéines de choc thermique : HSP70) dans le cas d'exposition au stress hypoxique 30% (J0 à J7) et dans le cas d'exposition aux pesticides (C0 à C7) pendant 7 jours.*

## 2.2.Effet des pesticides

### *2.2.1.Stress oxydant*

La toxicité d'un mélange de pesticides (Carbaryl, Métalochlore, fosetyl aluminium, glyphosate, alachlore, diuron, atrazine, terbutylazine) a été testée à une concentration environnementale (concentration cumulée 4,5µg.$l^{-1}$) dans le but d'étudier la réponse d'exposition des huîtres. Le détail de cette expérimentation est présenté dans le chapitre 4 « Réponse au stress de souche R et S » du thème 5.

Les biomarqueurs représentatifs du système antioxydant étudiés pour l'effet hypoxie, ont été analysés dans les branchies et la glande digestive (Catalase CAT, glutathion-s-transférase GST, gluthamine synthètase GS, métalothionéine MT, protéines de choc thermique HSP70). L'objectif était de caractériser l'effort métabolique dans le cas d'exposition à des pesticides. Les résultats obtenus dans la figure 10, mettent en évidence un effet pesticide dès le troisième jour d'exposition. Les activités GS et CAT sont significativement ($p<0,01$) plus élevées le troisième jour. Les MT et GST font apparaître une réponse significative ($P<0,01$) mais plus tardive le septième jour d'exposition. Le mélange de pesticides testé présente donc un potentiel de stress oxydant pour les huîtres.

### *2.2.2. Stress génotoxique : aneuploïdie*

Des anomalies cytogénétiques, telles que l'aneuploïdie, sont connues pour être communes chez les bivalves. Chez *C. gigas*, l'aneuploïdie est caractérisée par l'altération du nombre diploïde normal de 20 chromosomes en cellules hypodiploïdes avec 19, 18 ou 17 chromosomes. La non-disjonction des chromosomes pendant la mitose ou la méiose est l'origine principale de l'aneuploïdie

(Bond et Chandley, 1983). Les chromatides d'un chromosome ne se séparent pas correctement et ainsi, le chromosome entier migre à un seul pôle. Cette ségrégation anormale va produire deux cellules descendantes aneuploïdes : une des cellules va avoir un chromosome supplémentaire (cellule hyperploïde), l'autre cellule va avoir un chromosome en moins (cellule hypoploïde). Afin de déterminer un éventuel effet toxique direct de l'atrazine ou du diuron sur des huîtres, des populations ont été étudiées en conditions contrôlées. Différentes doses d'atrazine (10 µg/l et 100 µg/l) ou de diuron (300 ng/l et 3 µg/l) ont été appliquées sur des huîtres adultes pendant leur période de maturation (Fig 11). La descendance des populations adultes a aussi été étudiée (Figure 11). Nos résultats ont montré qu'il existait une corrélation positive entre la présence de polluants tels que l'atrazine ou le diuron et le taux d'aneuploïdie de *C. gigas* (Bouilly et al., 2003 ; Bouilly et al., soumis). Ces résultats ont donc permis pour la première fois de mettre en évidence une cause environnementale pour l'aneuploïdie chez l'huître *C. gigas*. De plus, le taux d'aneuploïdie des descendants a augmenté en fonction du traitement d'atrazine ou de diuron reçu par les parents (Bouilly et al., 2004 ; Bouilly et al., soumis). L'impact de l'atrazine ou du diuron appliqué à des huîtres adultes sur leur taux d'aneuploïdie a donc persisté à la génération suivante. La persistance de l'impact de l'atrazine dans le temps a également été mise en évidence en replaçant des huîtres exposées à l'atrazine dans des conditions normales pendant une période additionnelle (Bouilly et al., 2004). Les pesticides peuvent donc causer des dommages importants sur le génome des huîtres à court et moyen terme.

La génotoxicité d'un mélange de pesticides à également été testée en conditions contrôlée à une concentration cumulée de 24,5 µg.l$^{-1}$. La production d'adduits à l'ADN après 7 jours d'exposition confirme la potentiel génotoxique d'un mélange de pesticides (Carbaryl, Métalochlore, fosetyl aluminium, glyphosate, alachlore, diuron, atrazine, terbutylazine). Le détail de cette expérimentation et les résultats sont présentés dans le chapitre 4 « Réponse au stress de souche R et S » du thème 5.

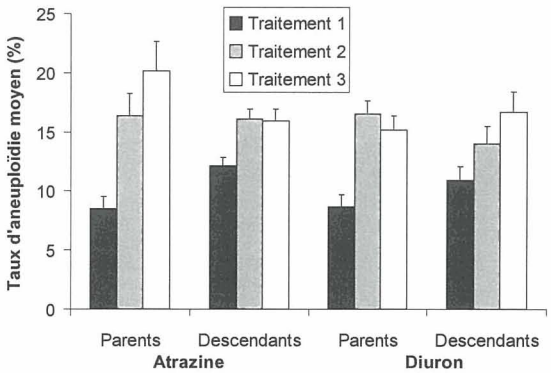



*Figure 11 : Taux d'aneuploïdie moyen d'huîtres Crassostrea gigas exposées à différents traitements d'atrazine ou de diuron et de leurs descendants. Traitement 1 : contrôle, traitement 2 : 10 µg/l d'atrazine ou 300 ng/l de diuron et traitement 3 : 100 µg/l d'atrazine ou 3µg/l de diuron.*

# 3. Sources de perturbations et stress environnemental suivant le modèle plat-table

La question centrale est de déterminer 1) si un stress se produit avant les mortalités et 2) d'évaluer les sources de stress telles que la proximité du sédiment et les flux saisonniers de pesticides.

De multiples stress peuvent provenir du sédiment et/ou de l'eau. Le bassin de Marennes Oléron présente comme première particularité une forte turbidité qui possède à la fois une origine provenant des eaux estuariennes liées aux crues hivernales et printanières de Charente et Gironde mais également aux remises en suspension des sédiments superficiels des estrans vaseux de la

baie (Zurburg et al., 1994). La seconde particularité du bassin est fondée sur des apports importants d'herbicides démontrés via la Charente et des pics de contamination pendant la période de gamétogenèse des huîtres en mai-juin (Munaron *et al.*, 2003, Munschy *et al.*,2004). Le stress environnemental a été étudié suivant le modèle d'élevage plat-table dans le but d'identifier un stress à proximité du sédiment ou dans l'eau. Les flux de substances réduites (ammonium et sulfures) ont été analysés dans les eaux interstitielles. Le stress a été caractérisé avec des biomarqueurs subcellulaires spécifiques d'une activité métabolique d'adaptation. Des indicateurs du système antioxydant (Catalase, Métallothionéines, Glutamine synthètase, glutahtion-s-transférase, protéines de choc thermique), et des indicateurs génotoxiques (aneuploïdie) ont été mesurés. La réponse dynamique déterminée au niveau subcellulaire à pour but de caractériser l'effort métabolique d'adaptation des huîtres dans le cas de stress. Ce stress peut avoir des origines directes ou indirectes qui ont été étudiées suivant le schéma présenté dans la figure 12.

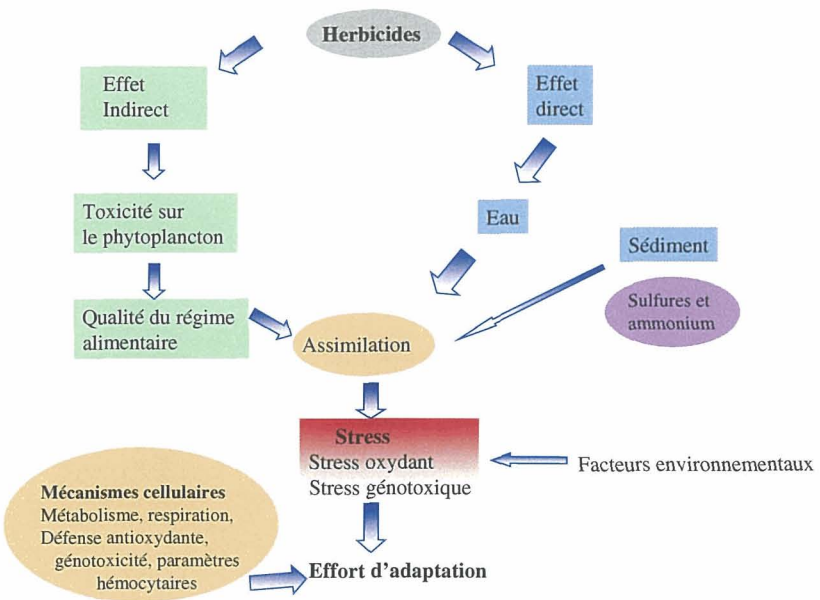



*Figure 12* : Schéma d'étude des effets directes et indirectes des herbicides sur l'effort d'adaptation des huîtres

## 3.1. Sources potentielles toxiques issues du sédiment

### *3.1.1.Flux et concentrations de substances réduites*

L'étude ci-après visait à répondre à la question « Est-ce que la proximité du sédiment est létale pour les huîtres à cause de substances réduites toxiques issues du sédiment. »

Cette étude a tout d'abord testé sur le potentiel de production et d'émission du sédiment de deux substances toxiques, le sulfure d'hydrogène et l'azote ammoniacal dont 8-16% est sous la forme ammoniac (NH3) suivant le pH du milieu. A cette fin, 4 sites conchylicoles ont été échantillonnés pendant les périodes de mortalité. Les eaux interstitielles ont été extraites puis dosées pour déterminer la distribution verticale de la concentration en sulfure et en ammonium.

Pour pouvoir comparer les résultats de cette étude inter site, les différentes équipes participantes partageaient les mêmes techniques de prélèvement sur le terrain et celles d'analyse chimique au laboratoire. En particulier, l'échantillonnage des eaux interstitielles utilisait une méthode de prélèvement adaptée à la réactivité des substances à analyser car elle évitait tout contact avec l'atmosphère. Aussi, l'analyse suivait des protocoles robustes et bien établis (Merck), et donc les données, même si acquises par différents laboratoires, sont directement comparables. Les données obtenues (ci-contre) confirmant que les processus de diagenèse précoce sont les mêmes sur l'ensemble des zones de prélèvement (Fig 13). Par contre, ils s'y produisent avec des intensités variables car on note des concentrations très différentes d'un site à l'autre, liées aux différences quantitatives et qualitatives des apports de matière organique.

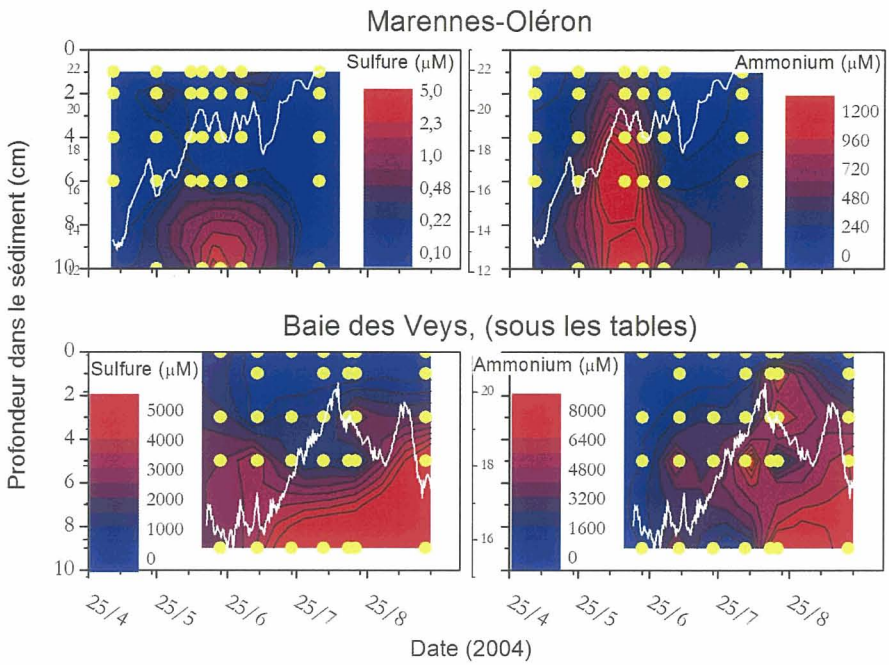



Figure13. Concentrations en produits de dégradation de la matière organique sulfure (à gauche) et ammonium (à droite). Les sites sont ceux du bassin de Marennes-Oléron (en haut) et de baie des Veys (en bas). Les lignes blanches sont les enregistrements de température à pleine mer +/-1h. Le seuil de 19°C est atteint pour la première fois le vers le 10 juin à Marennes Oléron et début août en Baie des Veys. Des résultats similaires obtenus en Morbihan (Fort Espagnol et Baie de Quiberon) ne sont pas montrés pour des raisons de place.

Sur la base de ces résultats, il est donc possible d'affirmer que les substances toxiques sulfure et ammoniac sont produites dans le sédiment, et leur apparition est synchrone avec les périodes de mortalité, et ce aux 4 sites étudiés.

Ces substances intra sédimentaires sont toxiques pour certains foraminifères benthiques dont la distribution est un indicateur de la réduction du sédiment. A Marennes-Oléron et d'avril à juin (Fig 14), il y a une diminution significative de 65 % de la densité d'individus vivants (colorés au Rose Bengale ; effet date significatif, $p < 0.001$). Toutefois, nous pouvons noter que l'augmentation de la densité d'individus morts est plus importante dans les deux couches superficielles que la disparition des individus vivants. Parmi les trente espèces vivantes déterminées, *Ammonia tepida* est l'espèce la plus abondante. Elle représente 80% du peuplement vivant le 22 juin dans la couche 0-0,5 cm. Les effectifs *d'Ammonia tepida* diminuent significativement (effet date, $p < 0.001$) pendant la dégradation temporaire du milieu, mais cette espèce s'avère résistante et capable de régénérer ses effectifs dès que les conditions redeviennent favorables.

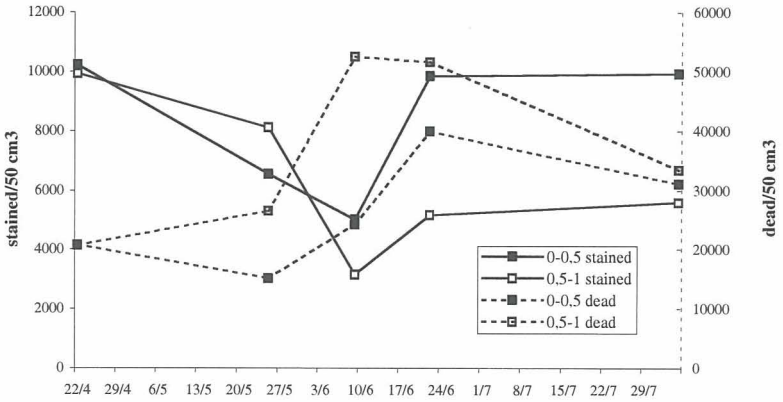



*Figure 14. Abondance d'individus vivants (stained, ligne continue) et morts (pointillés) dans 50cm3 de sédiment de 0-0,5cm de profondeur (symboles pleins) et de 0,5-1,0cm (symboles évidés)*

Pour quantifier les flux diffusifs de ces substances en fonction du temps, il est nécessaire de modéliser les profils verticaux de concentration. En effet, le gradient de concentration à l'interface eau sédiment induit un flux diffusif qui lui est proportionnel. Les données modélisées aux quatre sites sont synthétisées dans la figure 15 qui montre que les flux calculés sont faibles (à par le cas de la baie des Veys) et incapables d'induire des concentrations suffisantes pour être des facteurs de létalité des huîtres. Cependant, il est important de garder à l'esprit que les chiffres obtenus par modélisation sont des minima car ils ne tiennent pas compte de la biorrigation (= advection) qui s'ajoute à la diffusion pour accélérer les transferts entre ces 2 compartiments. La biorrigation n'étant pas évaluée pour les environnements étudiés, la prise en compte de ce paramètre devra être faite avec des valeurs tirées de la littérature. Par conséquent, il est difficile d'affirmer ou d'infirmer sans ambiguïté l'hypothèse de sortie de substances réduites du sédiment sur la seule base des seules données sédimentaires disponibles.

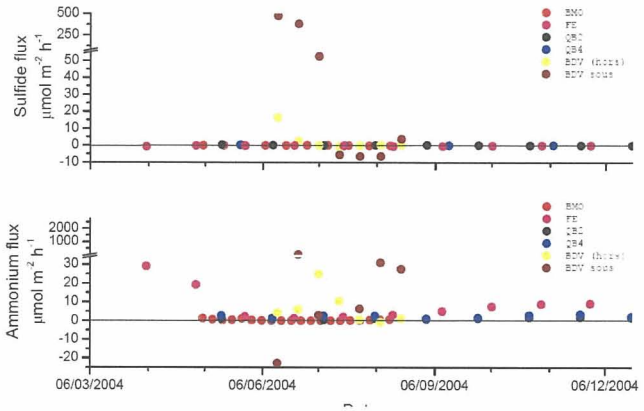



*Figure 15. Flux diffusifs calculés aux différents sites d'étude en fonction de la date. BMO : bassin de Marennes-Oléron ; FE : Fort Espagnol ; QB2 et QB4 : Baie de Quiberon points 2 et 4 ; BDV : Baie des Veys (hors poches et sous poches).*

Afin de pouvoir mettre les substances toxiques en évidence dans le milieu de croissance des huîtres, une étude de la colonne d'eau a ensuite été entreprise. Celle-ci a été effectuée au site modèle de Fort Espagnol et de la baie de Quiberon. Le seul matériel d'analyse chimique très sensible (analyse du sulfure à la nanomole par litre) étant disponible dans le laboratoire d 'Ifremer/Nantes, l'étude a été circonscrite aux sites Morbihannais. En effet, l'analyse de traces de sulfure requiert l'analyse immédiate car elles réagissent avec la matière particulaire en suspension et avec l'oxygène dissous dans le reste de l'échantillon.

En cohérence avec l'étude sédiment, les résultats colonne d'eau montrent la présence d'un gradient positif (sortie du sédiment) pour l'ammonium et le sulfure (Fig 16). Il est important de noter que c'est la première mise en évidence de gradient de ces substances dans la colonne d'eau

d'environnements oxiques. Pour l'ammonium, le gradient a une amplitude plus faible car les teneurs normales de la colonne d'eau sont relativement élevées (3 µM). Ce gradient est encore moins prononcé en baie de Quiberon du fait de la plus grande turbulence de la colonne d'eau qui lisse les gradients. Pour le sulfure, le gradient de concentration est plus important (moins haut dans la colonne d'eau), à cause de la réactivité plus grande qui élimine ce composé plus rapidement, alors qu'il s'éloigne de sa source, le sédiment. Ce gradient est observable en baie de Quiberon en 2004, mais les concentrations de sulfures deviennent non détectables (<1pmol/L) en 2005.

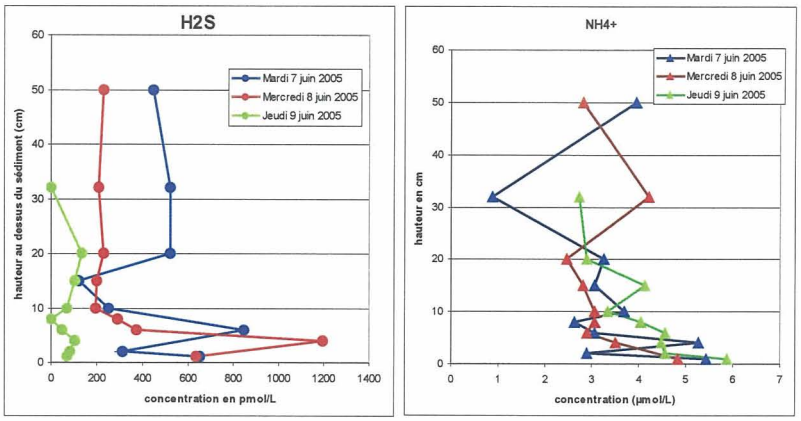



*Figure16: Distribution du sulfure et de l'ammonium dans la colonne d'eau à Fort Espagnol en juin 2005. Les concentrations sont variables en fonction du temps mais montrent un gradient suggérant la sortie de ces substances du sédiment.*

Pour conclure, les données de concentration de sulfure et d'ammonium du sédiment recueillies dans le cadre de cette étude, leur modélisation montrent que le sédiment consolidé possède le potentiel d'émission de substances réduites. Les résultats complémentaires acquis dans la colonne d'eau montrent sans ambiguïté que des substances réduites toxiques s'échappent réellement du sédiment, ce qui est cohérent avec la première observation. Toutefois, le sulfure et l'ammonium n'ont pas été retrouvées dans la colonne d'eau à des concentrations suffisantes pour être toxiques pour les huîtres ; les prélèvements n'étaient pas synchrones avec les mortalités. Les données recueillies permettent donc de conserver ouverte la possibilité d'apports massifs de matière organique liées, par exemple à la chute d'un bloom phytoplanctonique induisant une émission de substances réduites de l'interface eau-sédiment pendant les quelques semaines de leur reminéralisation (par ex., L. S. Hansen and T. H. Blackburn, 1992). Cette hypothèse est cohérente avec les observations d'indicateurs tels que la survie de foraminifères ou l'activité du métabolisme redox (ETS) des huîtres observé dans la colonne d'eau (cf.3.3.1.1.)

### *3.1.2. Embryotoxicité du sédiment et de l'eau*

L'objectif était d'évaluer l'existence et l'évolution temporelle, d'une toxicité des eaux et sédiments au niveau des parcs ostréicoles de quatre sites d'étude : Marennes Oléron, Rivière d'Auray (Fort Espagnol), la baie de Quiberon et la baie des Veys. Cette évaluation de la toxicité potentielle des milieux a été réalisée à l'aide du test d'embryotoxicité de l'huître creuse (Quiniou *et al*, 2005) adapté pour les sédiments ( Quiniou *et al.,* 1997 ; Alzieu *et al*, 2005)

A Marennes Oléron, 2004 présente une moindre toxicité de l'eau et du sédiment qu'en 2003 mais l'apparition d'une toxicité de l'eau combinée à une toxicité du sédiment est observable en juin 2003 et 2004 (Fig 17). Le 26 mai 2003, une toxicité des sédiments de Marennes Oléron (Perquis) apparaît avant les mortalités du 10 juin, avec 60 % d'anomalies embryo-larvaire. Le 23 juin, la toxicité du sédiment apparaît inférieure (37 % d'anomalies larvaires) à celle du 26 mai. Cependant, ce même 23 juin est détectée une toxicité de l'eau (15% d'anomalies larvaires). La combinaison d'une toxicité issue de l'eau et du sédiment présente un risque supplémentaire et pourrait constituer un facteur déclenchant de stress aigu. La toxicité potentielle de l'eau progresse entre mai et septembre pour

atteindre un maximum en septembre en 2003 avec 40 % d'anomalies embryo-larvaires. Cependant, aucune mortalité n'est observée en septembre , période à laquelle l'effort de reproduction est terminé

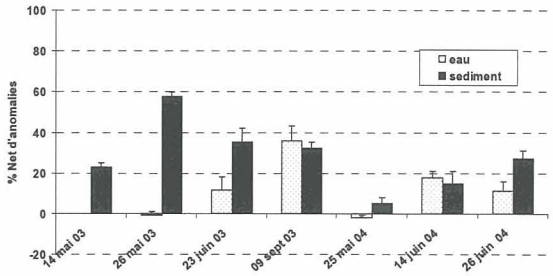



*Figure 17 : Evolution du potentiel toxique de l'eau et du sédiment exprimée en pourcentage net de larves anormales (PNA ± IC 95%), sur le site de Marennes (Perquis) en 2003 et 2004 (Test avec 5 g de sédiment sec/litre) (d'après Quiniou et al. 2004).*

En baie du Quiberon, les sédiments des parcs en eau profonde ne présentent aucune toxicité potentielle, alors que l'eau à proximité du fond présente un effet non négligeable en automne et pour les deux points suivis (Beaumer Sud et Men er Roué).

Les eaux des rivières de la Baie des Veys (Douve, Taute, Vire et Aure) n'ont pas révélé de toxicité significative en 2003 à l'exclusion de l'Aure fin juillet et de la Taute début septembre ; qui toutefois présentent une toxicité modérée. En 2004, l'eau de mer (au niveau du point Morest), ne présentait pas de toxicité en 2003 mais induit une forte toxicité en août et septembre 2004 .

En rivière d'Auray, l'eau prélevée n'a montré aucun effet toxique en 2004, alors que le sédiment (équivalent 5 g/litre) induit 98 % d'anomalies de développement embryo-larvaire le 3 juin (Fig 18). Cette toxicité du sédiment est maintenue jusqu'au 16 juin et confirme un potentiel toxique du sédiment également observé en juin à Marennes Oléron

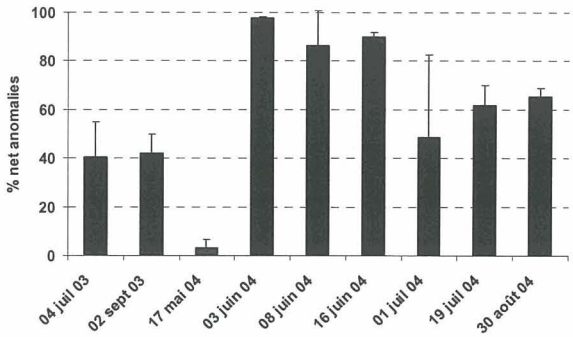



*Figure 18 : Toxicité potentielle des sédiments en rivière d'Auray (Fort Espagnol) exprimée en pourcentage net de larves anormales. (PNA ± IC 95 %) (d'après Quiniou et al. 2004).*

Les test embryo-larvaire réalisé sur les quatre sites atelier révèle que la principale source de toxicité est issue du sédiment. Cette toxicité est principalement exprimée dans la période de mai-juin sur les sites de la rivière d'Auray et de Marennes Oléron.

## 3.2. Sources potentielles toxiques dans l'eau et qualité de l'environnement nutritionnel

### *3.2.1. Concentration des herbicides dans les eaux superficielles du site de Marennes-Oléron*

Les principaux déterminants conditionnant le transfert des herbicides à l'échelle du bassin versant de la Charente ont été mis en évidence (pluviométrie, réserve utile en eau des sols et périodes d'épandages). Des modèles mathématiques des différents processus biologiques et physiques sont développés. Le code de calcul Siam 2D (IFREMER) prend par exemple en compte la remise en suspension des sédiments vaseux (modèle de tassement du sédiment, seuils critiques d'érosion et de sédimentation liée aux courants et au clapot – Le Hir et al., 2000 ; Le Hir et al., 2003). Il est appliqué au couplage production primaire/transport dans le bassin de Marennes-Oléron (Struski, 2005) à partir des travaux de Guarini et al. (1997, 1999). L'influence des activités agricoles sur le bassin versant reste donc réelle et la présence d'au moins un herbicide ou un produit de dégradation est constatée dans les eaux de la Charente (Munaron, 2004). La zone estuarienne constitue une zone tampon pour certains composés à certaines périodes de l'année, et une simple voie de communication pour d'autres herbicides qui sont simplement dilués lors de leur transfert vers le bassin de Marennes-Oléron. Les simulations ont permis de préciser les niveaux de concentration et les durées d'exposition qui découlent de la dispersion de l'atrazine dans le bassin. Elles montrent que ponctuellement, les eaux du bassin de Marennes-Oléron peuvent présenter des teneurs élevées en atrazine. Les périodes à risque sont les périodes d'épandage lorsque le niveau de saturation des sols est faible et hors périodes d'épandages lorsque les niveaux de saturation en eau des sols sont élevés (Munaron, 2004). Dans le bassin Sud de Marennes Oléron, le site atelier de Perquis (Fig 19) est influencé par les apports de l'estuaire de la Seudre et les multiples chenaux drainant les marais voisins qui constituent une zone de confinement des molécules actives d'herbicides. Une toxicité des eaux de marais charentais a ainsi été démontrée par D. Masson (communication personnelle, 2002).

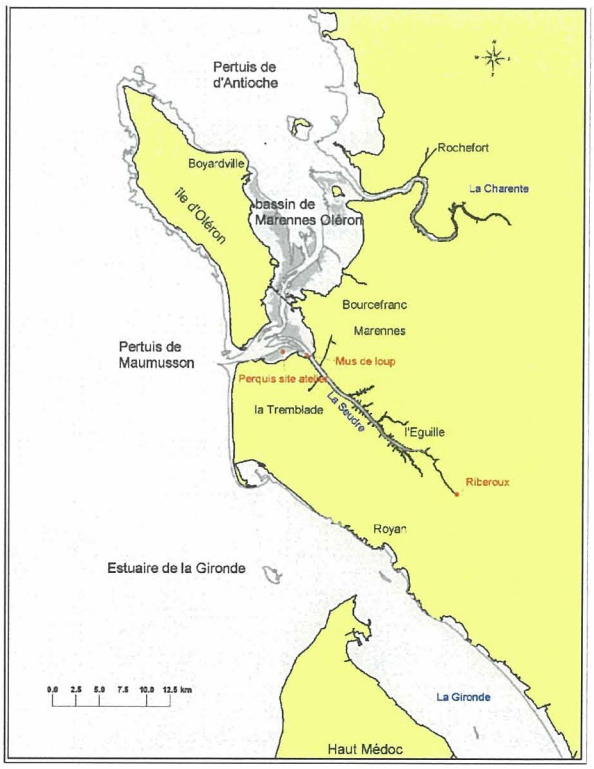



*Figure 19: Site atelier de Marennes-Oléron et stations d'étude symbolisées en rouge. Le suivi des pesticides dans les eaux superficielles a été réalisé sur la station aval de l'estuaire de la Seudre à Mus de loup. La station de Riberoux est la limite de dynamique de marais avec une écluse et un suivi des teneurs en pesticides dans les eaux douces réalisé par le GRAP. Perquis situé au voisinage de Mus de loup est le site atelier d'élevage plat-table des huîtres étudiées pendant notre programme d'étude DYNMAOR en 2003.*

En 2003 (Fig 20) , les concentrations cumulées des matières actives d'herbicides ont été mesurées dans les eaux superficielles à Riberoux (estuaire amont eau douce) et Mus de Loup

(estuaire aval eau marine). A Riberoux, elles montraient des concentrations élevées(>0,5 µg.l$^{-1}$) fin avril-début et fin mai. La période privilégiée pour l'épandage d'herbicides et la pluviométrie enregistrée les semaines du 5-9 mai (19 mm) et 26-30 mai (23 mm) expliquent probablement les concentrations les plus élevées début et fin mai. La présence d'herbicides dans l'estuaire aval à Mus de loup, est beaucoup moins régulière et plus faible. Des teneurs de l'ordre du µg.l$^{-1}$ ont été retrouvées fin avril début mai. Le pic d'herbicides observé la semaine du 9-13 juin (0,5 µg.l$^{-1}$) à Mus de loup apparaît très élevé. Il ne semble pas en relation avec des apports de l'amont de la Seudre qui affiche des teneurs cumulées inférieures à 0,3 µg.l$^{-1}$. Il pourrait refléter des apports de chenaux drainant les marais ou bien des masses d'eaux de la Charente et de la Gironde.

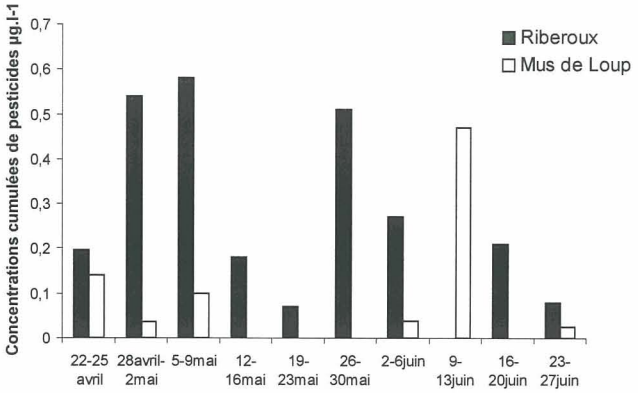



*Figure 20 : Concentrations cumulées de pesticides dans les eaux superficielles à Riberoux et Mus de loup en 2003. (* Absence de résultats le 9-13 juin car bouteille à prélèvement cassée)*

Neuf molécules actives avaient été observées dans les eaux superficielles de la Seudre en 2003et seulement quatre de ses molécules actives (isoproturon, glyphosate, mécoprop et carbaryl) étaient retrouvées dans l'estuaire en zone marine proche de Perquis Fig (21). L'isoproturon présentait la plus forte concentration en juin avec 0,4 µg.l$^{-1}$. Les concentrations maximales pour les autres molécules actives étaient de 0,1 µg.l$^{-1}$ pour le glyphosate en avril, 0,02 µg.l$^{-1}$ pour le mécoprop et 0,057 µg.l$^{-1}$ pour le carbaryl en juin.

Le suivi des matières actives en 2004 dans l'estuaire de la Seudre met en évidence un profil différent entre 2003 et 2004. Plusieurs molécules actives composent le profil de contamination en 2004 tels que le métolachlor (0,015 µg.l$^{-1}$), le diuron (0,015 µg.l$^{-1}$), DEA (0,014 µg.l$^{-1}$), le glyphosate (1,2 µg.l$^{-1}$). Une concentration particulièrement élevée de glyphosate (1,2 µg.l$^{-1}$) a été détectée du 7 au 18 juin 2004.

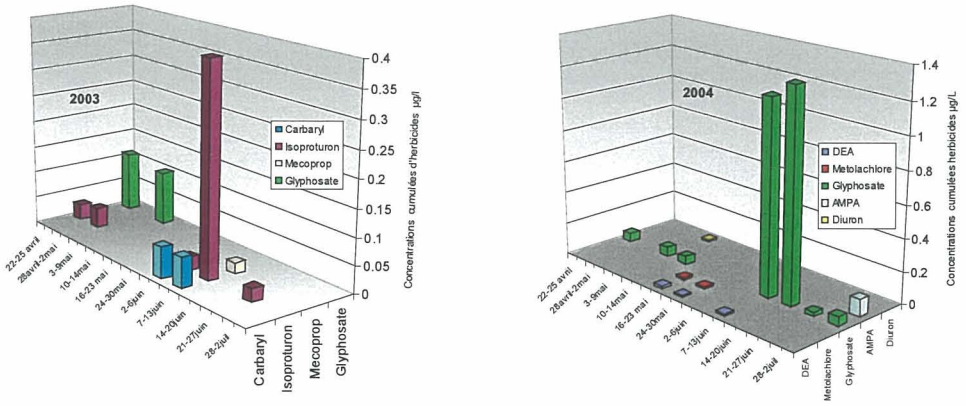



*Figure 21 : Profil de contamination des différentes substances actives d'herbicides dans les eaux superficielles en 2003 et 2004.*

Malgré des profils de matières actives différentes, le suivi réalisé en 2003 et 2004 met en évidence des concentrations maximales en juin (Fig 21). Le risque de toxicité des herbicides apparaît maximal en juin en concordance avec la période active de gamétogenèse et l'apparition des mortalités. En juin 2004 (Fig 22), les concentrations élevées de glyphosate identifiées à Mus de

Loup font apparaître des concentrations de molécules actives cumulées trois fois supérieures à celle de la Charente (Saint Savinien) .

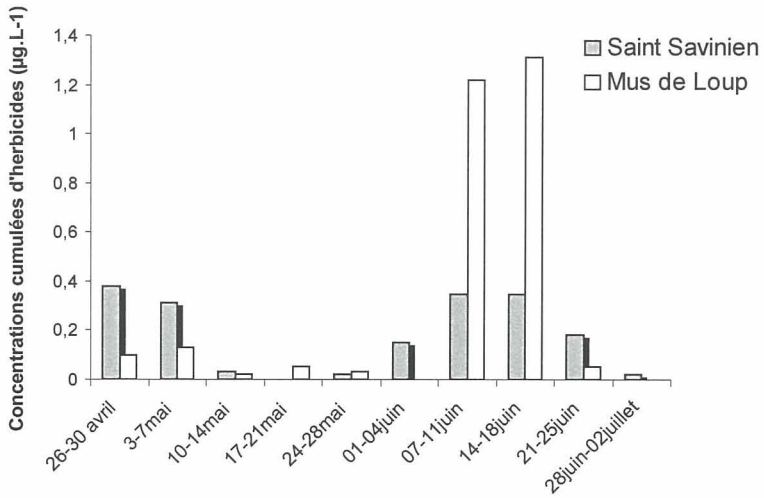



*Figure 22 : Concentrations cumulées d'herbicides analysées dans l'estuaire de la Seudre à mus de loup et dans la Charente à Saint Savinien en 2004.*

Les apports de la Charente en herbicides n'apparaissent pas suffisants pour expliquer des teneurs élevées en estuaire de Seudre au mois de juin. Ce résultat corrobore les travaux de Munaron en 2004, montrant une évolution du panache de la Charente vers le Nord du bassin et de faibles flux d'herbicides dans le bassin Sud de Marennes Oléron. L'élévation de glyphosate dans le bassin Sud ne peut être directement associée à une pluviométrie relativement faible dans la période précédent le 21 juin 2003. L'élévation du glyphosate en juin pourrait-être liée directement à des pratiques domestiques saisonnières locales. Le volume important des masses d'eau oscillante entre les chenaux des marais et les eaux de l'estuaire de la Seudre pourrait également favoriser une contamination par les herbicides. Les échanges en phase ascendante de coefficient se révèlent alors très importants (Lemoine et al., 2005).

**Herbicides dans l'eau interstitielle :** Dans les eaux interstitielles le glyphosate a été détecté le 25 mai, le 9 et 22 juin 2004 à raison de 0,05 $\mu g.l^{-1}$. Le métabolite du glyphosate, l'AMPA est également détecté le 9 et 22 juin à la concentration de 0.122 $\mu g.l^{-1}$. La concentration supérieure de l'AMPA traduit une accumulation temporaire dans l'eau interstitielle. La présence d'AMPA confirme un potentiel d'action toxique différé du glyphosate récemment dégradé en juin.

**Herbicides dans le sédiment :** Dans le sédiment, seule la trifluraline est détectée à raison de 2 à 6 $\mu g.kg^{-1}$. Cette matière active peu dégradable possède un log de Kow de 4,83. Elle présente donc une plus grande capacité d'adsorption sur le particulaire que la majorité des herbicides qui possèdent un log de Kow inférieur. La toxicité de la trifluraline sur le développement du phytoplancton est démontrée pour une concentration dans l'eau de 0,5 $\mu g.l^{-1}$ La présence de trifluraline dans le sédiment durant toute la période d'avril à juin 2004 fait apparaître une contamination chronique du sédiment.

### 3.2.2.Effet des pesticides sur des populations naturelles de phytoplancton : Conséquences possibles sur la production secondaire

La qualité et la quantité de nourriture disponible pour les filtreurs influencent leur état physiologique. Composée d'organismes microscopiques parmi lesquels le phytoplancton prend une place importante, cette nourriture est étudiée par de nombreux auteurs (Moal et al., 1987 ; Dupuy et al., 1999; Powell et al., 2002). D'après leurs résultats certaines espèces phytoplanctoniques sont filtrées préférentiellement tandis que d'autres sont rejetées ou peu profitables au bon développement chez les larves par exemple (Cognie et al., 2001). Les études réalisées sur le phytoplancton naturel montrent que les microalgues sont sélectionnées principalement en fonction de leur taille (Dupuy et al., 2000 ; Cognie et al, 2003 ) tandis que d'autres résultats révèlent une sélection selon l'espèce et la préférence pour les cellules d'origine pélagique par rapport aux benthiques (Bougrier et al. 1997).

La qualité de l'eau côtière est également susceptible de jouer un rôle dans la composition des particules filtrées. La proximité des zones d'activités ostréicoles, agricoles et parfois urbaines, justifie de tester l'influence des pesticides retrouvés dans les rejets côtiers sur la quantité et la composition spécifique des assemblages phytoplanctoniques consommés par les filtreurs. Cette étude était réalisée sur le phytoplancton prélevé à Ronce-les-Bains (Charente maritime) et en estuaire de rivière d'Auray dans le but d'étudier les effets des pesticides sur la biomasse chlorophylienne et les différences de tolérance des microalgues fourrages

Un mélange de pesticides (concentration cumulée 18,2 $\mu g.l^{-1}$ ; tableau 2) est ajouté aux prélèvements d'eau côtière contenant le phytoplancton naturel. Les milieux ainsi constitués sont incubés en volumes de 10 L en laboratoire en conditions contrôlées de température (18±1°C) et de lumière (continue, 60µmol quanta/$m^2$/s). Pour chaque site un prélèvement identique non contaminé est utilisé en témoin. La biomasse chlorophyllienne est mesurée jusqu'au jour 5 à l'aide d'une sonde calibrée (Seapoint chlorophyll fluorometer, Ixsurvey Ltd., Edinburgh Scotland).

*Tableau 2. Composition chimique du mélange de pesticides apporté à dose unique (18,2 $\mu g.L^{-1}$ ).*

| Sites et salinités correspondantes | Pesticides et concentrations en µg/L |
|---|---|
| Ronce-les-Bains, 32.2 | Mélange de: carbaryl 0.2 µg/L; Métolachlore, foséthyl alumine, glyphosate, alachlore 2 µg/L (chaque molécule); |
| Estuaire d'Auray, 34.0 | diuron 4 µg/L; atrazine, terbutylazine 6 µg/L (chaque molécule). |

Le mélange à dose unique (18,2 $\mu g.l^{-1}$ ) produit un effet différent sur les populations micro algales des deux sites. A Ronce les Bains, le mélange de pesticides entraîne un ralentissement de la croissance algale. En estuaire de rivière d'Auray, les contaminants produisent une inhibition totale de la production chlorophyllienne globale (figures 23a et 23b).

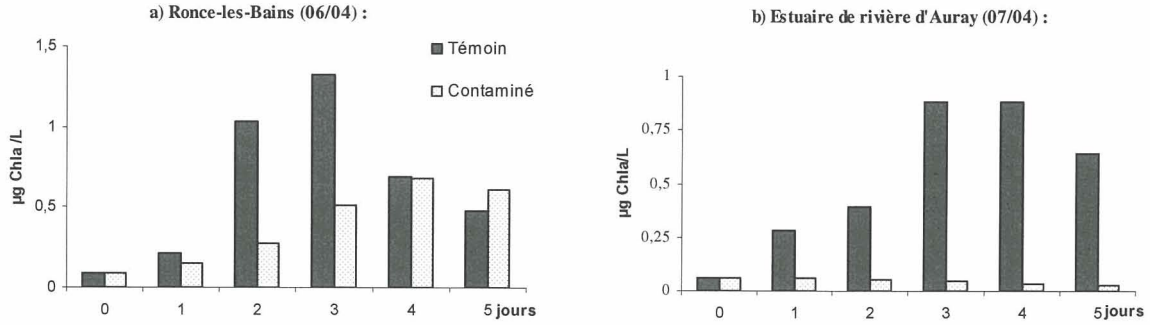


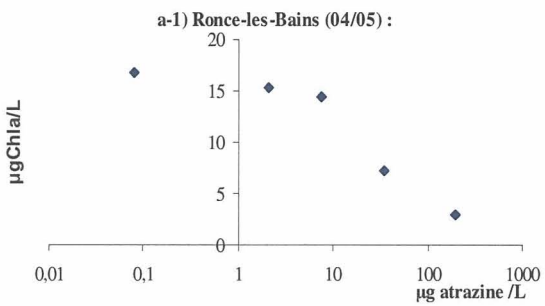

*Figure 23. a) Evolution de la biomasse chlorophyllienne dans le témoin et le prélèvement de Ronce-les-Bains contaminé par une dose unique du mélange de contaminants (composition tableau1). Fig 23b) Evolution de la biomasse chlorophyllienne dans le témoin et le prélèvement en estuaire de Rivière d'Auray contaminé par une dose unique du mélange de contaminants (composition tableau2).*

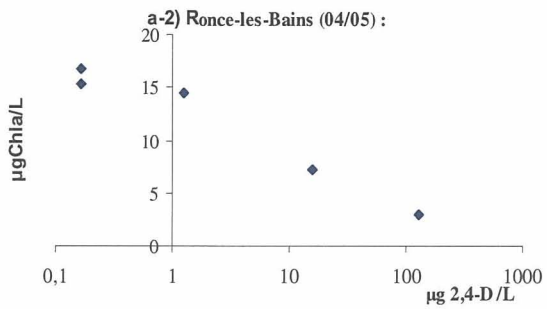
- 3.2.2.1.Effet de l'atrazine et du diuron sur la croissance chlorophylienne

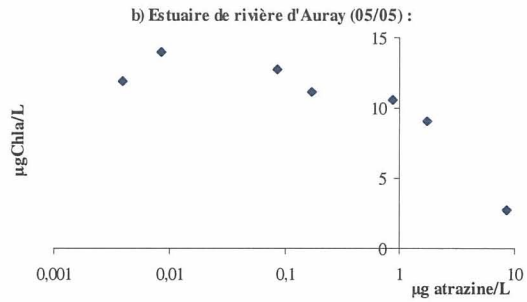
A Ronce les Bains, les pesticides en mélange de formulations commerciales étaient apportés à doses variables (0.005 à 5 µg/L) . Les produits commerciaux et leurs molécules actives étaient : Lasso (480g/L alachlore), Duelor (930g/L métolachlore), Garlon (240g/L triclopyr), Gésaprime (500g/L atrazine), Herbonex (30% en poids diuron), Antiliseron Capiscol (100g/L 2,4-D), Roundup (360g/L glyphosate) , désherbant fraisiers (157g/L phenmédiphane), Aliette (80% en poids fosétyl-Al).

Le mélange produit un effet toxique marqué aux concentrations supérieures à la concentration théorique 0,1 µg/L. La CE50 en 2,4-D dans le mélange testé est 18 µg/L, tandis que la CE50 en atrazine dans le mélange testé est 60 µg/L. Ceci montre que la diminution de chlorophylle apparaît plus influencée par l'élévation de concentration en 2,4-D qu'en atrazine (Fig 24a-1, 24a-2).

En estuaire de rivière d'Auray, quelques unes des molécules secondaires du mélange étaient différentes : apport supplémentaire de deltaméthrine en formulation Decis Protech (15 g/L), et d'isoxaben en formulation Cent 7 (125 g/L).Les résultats confirment la plus grande sensibilité du phytoplancton : 50% de diminution de la chlorophylle est obtenu en présence de 6,5 µg/L d'atrazine (CE50) (Fig 24b).




*Figures 24. Concentration en chla dans les mélanges au jour 2, en fonction des concentrations en :*

*a-1) atrazine,*

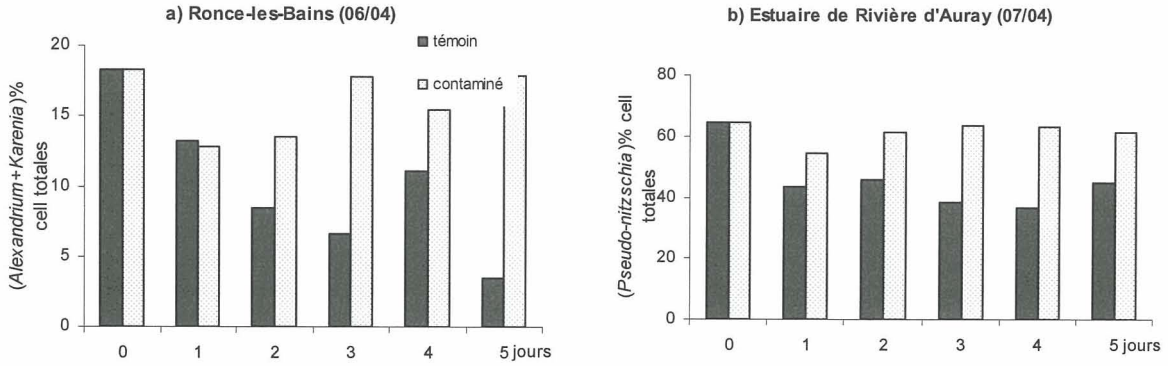
*a-2) 2,4-D dans un prélèvement à Ronce-les-bains*

*b) atrazine en rivière d'Auray au 2ème jour de l'expérience .*

- 3.2.2.2. Effets des pesticides sur les assemblages phytoplanctoniques

Nos analyses spécifiques n'ont pas considéré les ciliés ni les flagellés, ni les tailles cellulaires chez le phytoplancton. L'objectif était la différence de tolérance des genres plus ou moins favorable à la croissance des flitreurs. Les analyses spécifiques montrent qu'en présence de pesticides, le pourcentage des genres potentiellement nuisibles (*Karenia* sp. ichtyotoxique, *Alexandrium* sp.producteur de toxines paralysantes, *Pseudonitzschia* sp.producteur de toxine amnésiante) est plus élevé dans les milieux incubés en présence de pesticides que dans les témoins (Fig 25a et 25b). Les expériences de Parrish et al. (1999), Soudant et al. (1998), D'Souza and Loneragan (1999), Ceballos and Ianora (2003), ont montré l'intérêt nutritionnel de quelques espèces appartenant aux genres *Chaetoceros* et *Prorocentrum,* pour les stades larvaires des filtreurs et la reproduction chez le copépode. Nos résultats montrent que les deux genres sont moins représentées dans les milieux contaminés (Figure 23a), tandis que les autres diatomées moins favorables au succès de la reproduction chez le copépode (Ceballos and Ianora, 2003):

*Thalassiosira* sp., *Navicula* sp., peuvent parfois être beaucoup plus importants que dans les témoins (Fig 26b).




*Figures 25. Variations des pourcentages en a) dinoflagellés potentiellement nuisibles (Alexandrium et Karenia) dans les milieux testés à Ronce-les-Bains, et b)diatomée potentiellement toxique (Pseudo-nitzschia) en estuaire de rivière d'Auray.*

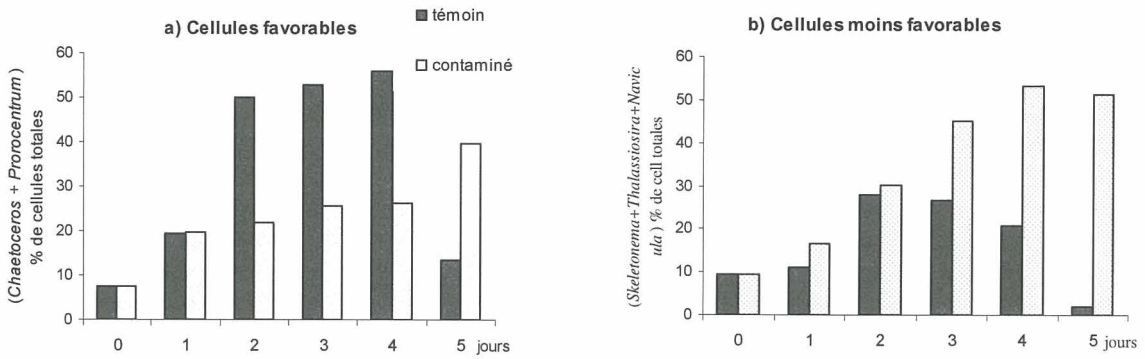



*Figure 26. Variations des pourcentages en microalgues a) potentiellement favorables à la reproduction et au développement larvaire zooplanctonique et b) moins favorable au développement larvaire zooplanctonique en présence de contaminants , dans les milieux testés à Ronce-les-Bains*

## Conclusion

La diminution de chlorophylle causée par la toxicité des contaminants est variable selon les sites. Ceci est attribuable à différents facteurs: les espèces phytoplanctoniques peuvent être naturellement différentes quant à leur tolérance, tandis que les milieux présentent des conditions de développement plus ou moins favorables. Ainsi le milieu estuarien se montre plus sensible à la toxicité des pesticides que le milieu côtier ouvert de Ronce-les-Bains.

La composition du mélange de pesticides est déterminante dans la toxicité observée vis-à-vis des algues. Quand la CE50 est prise en compte, l'effet de l'atrazine est dix fois plus important sur les populations en estuaire d'Auray (CE50= 6,5 µg .$L^{-1}$), qu'à Ronce-les- Bains (CE50=60µg/L). Cependant l'atrazine n'est pas le contaminant le plus toxique: la CE50 pour la biomasse chlorophyllienne est de 18 µg .$L^{-1}$ pour le 2,4-D à Ronce-les-Bains. Cette concentration de 18 µg .$L^{-1}$ est la concentration du mélange à dose unique démontrant (Fig 23 a) un ralentissement de croissance algale à Ronce les bains et une inhibition totale de la production chlorophylienne en rivière d'Auray. Dans le mélange de pesticides sont susceptibles d'interagir des effets synergiques plus toxiques pour les algues.

Comme il est montré ci-dessus, la sélection des microalgues moins sensibles est rarement favorable aux organismes filtreurs. En effet ces espèces appartenant aux genres *Skeletonema*, *Thalassiosira et Navicula* deviennent prédominantes en présence de pesticides à Ronces-les-Bains, tandis qu'en estuaire de rivière d'Auray c'est le genre potentiellement toxique *Pseudonitzschia* qui est favorisé.

Ainsi la présence de pesticides dans le milieu entraîne la sélection des microalgues de morphologie (et par conséquent de composition chimique et de qualité nutritionnelle pour les huîtres) différente de celles rencontrées en milieux naturels non impactés par les contaminants. Ceci laisse supposer que

cette contamination peut être indirectement responsable de la diminution de production naturelle chez les bivalves..

### *3.2.3. Qualité de l'environnement nutritionnel*

Caractériser la qualité d'un environnement nutritionnel en couplant des descripteurs hydrologiques de routine (Héral *et al.*, 1978; Soletchnik *et al.*, 1998) avec la technique du traçage isotopique naturel (Peterson and Fry, 1987) est apparu depuis quelques années comme une approche riche d'enseignements (Richard *et al.*, 1997; Middelburg and Nieuwenhuize, 1998; Savoye *et al.*, 2003). En effet, le traçage isotopique naturel, en particulier par l'utilisation des rapports en isotopes stables du carbone (Michener and Schell, 1994), permet de discriminer l'origine de la matière organique : marine *versus* terrestre et/ou pélagique *versus* benthique. Appliquée à la question des mortalités estivales de l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Thunberg) cette approche doit permettre, outre de caractériser la qualité de la matière organique disponible pour ce suspensivore, de fournir des indications sur son origine. Dans le contexte des expérimentations sur la mortalité estivale de *C. gigas* selon le modèle plat-table du bassin de Marennes-Oléron (Soletchnik *et al.*, 1999; Soletchnik *et al.*, 2005), il est attendu en complément de cette approche des informations sur l'origine de potentielles sources de stress liées à l'environnement nutritionnel.

En première analyse, les suivis hydrologiques réalisés tous les 15 jours de mars à décembre 2002 sur le site expérimental de Ronce-les-Bains Perquis montrent que l'environnement nutritionnel des huîtres est très turbide avec des concentrations en matériel particulaire inorganique > 100 mg $l^{-1}$ presque toute l'année (Fig 26). C'est une caractéristique connue de la baie de Marennes-Oléron (Héral *et al.*, 1978; Zurburg *et al.*, 1994; Soletchnik *et al.*, 1998). Elle a pour conséquence majeure une dilution du bol alimentaire consommé par les huîtres (Barillé *et al.*, 1997). La turbidité des eaux du site expérimental a une double origine 1) les eaux estuariennes liées aux crues hivernales et printanières de la Charente et de la Gironde et 2) les remise en suspension des sédiments superficiels des estrans vaseux de la baie (Zurburg *et al.*, 1994) puisque des corrélations significatives sont détectables hors périodes de crues entre d'une part, les amplitudes de marée et les matières en suspension et, d'autre part, les teneurs en pigments chlorophylliens et les matières inorganiques en suspension (Malet *et al.*, soumis).

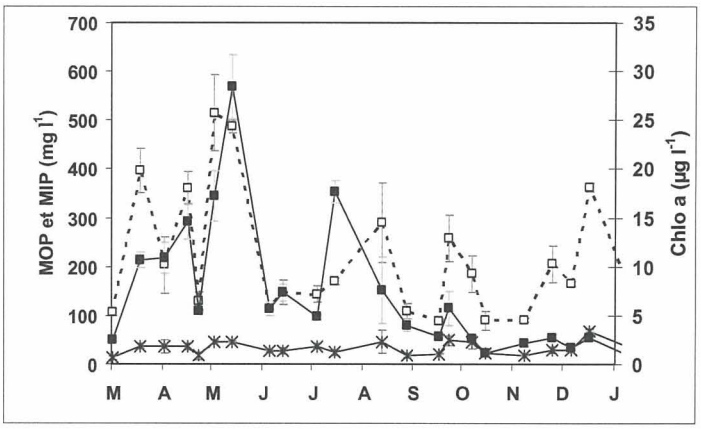



*Figure 27 : variations bi-mensuelles des concentrations en matière organique particulaire (MOP, *), matière inorganique particulaire (MIP, □) et chlorophylle a (Chlo a, ■) de la colonne d'eau sur l'estran du site de Ronce-les-Bains Perquis à Marennes-Oléron lors des expérimentation DYNAMO 2002. Barres d'écart type (n=3).*

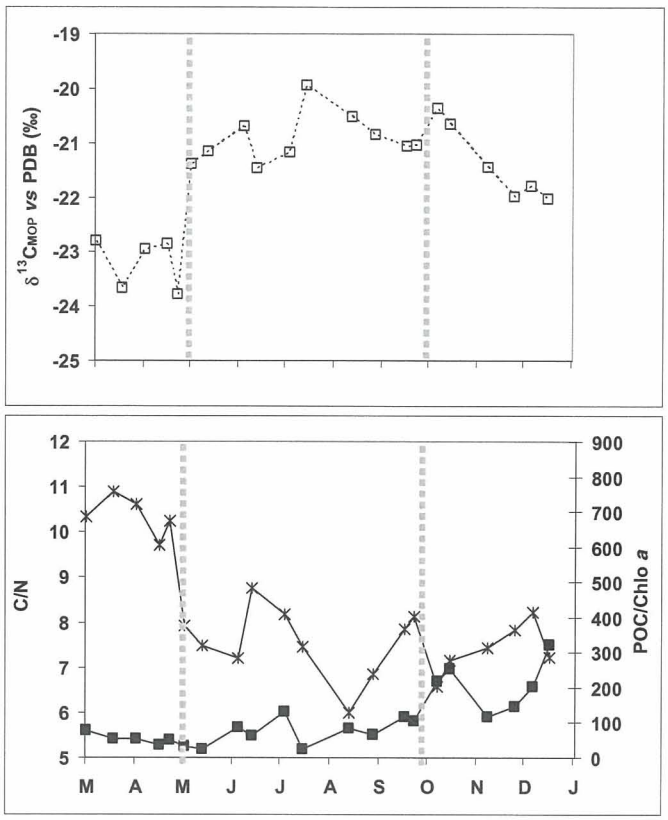



*Figure 28 : Variations bi-mensuelles des □13CMOP (□), C/N (*) et COP/Chlo a (■) de la matière organique particulaire lors de l'expérimentation DYNAMO 2002 sur le site de Ronce-les-Bains Perquis à Marennes-Oléron. Trois phases (pointillés grisés) sont figurées avec en mars - avril des apports néritiques, de mai à octobre des apports locaux mixtes pélagiques et benthiques puis après octobre des apports estuariens détritiques.*

En seconde analyse, les descripteurs qualitatifs comme le rapport carbone sur azote de la matière organique (C/N), le rapport carbone organique particulaire sur chlorophylle *a* (COP/Chlo *a*) et la signature isotopique sur le carbone de la matière organique particulaire (□$^{13}C_{MOP}$) permettent de préciser l'origine des ressources trophiques accessibles aux huîtres. Au cours de l'année 2002, plusieurs types d'environnement nutritionnel se sont succédés avec en particulier de mars à octobre (Fig 27) :

- des apports néritiques en mars – avril, en liaison avec l'advection dans le bassin de Marennes-Oléron de potentiels blooms hivernaux connus pour apparaître précocement sur le plateau continental du golfe de Gascogne (Labry *et al.*, 2001),

- des apports propres au bassin de Marennes-Oléron avec un mélange d'apports pélagiques (mai - juin) puis benthiques (juin – octobre), en liaison avec les occurrences saisonnières de blooms planctoniques (Soletchnik *et al.*, 1998) puis leur remplacement progressif par des apports de microphytobenthos liés aux remises en suspension locales gouvernées par les cycles de marée et régimes de vent (Bassoulet *et al.*, 2000).

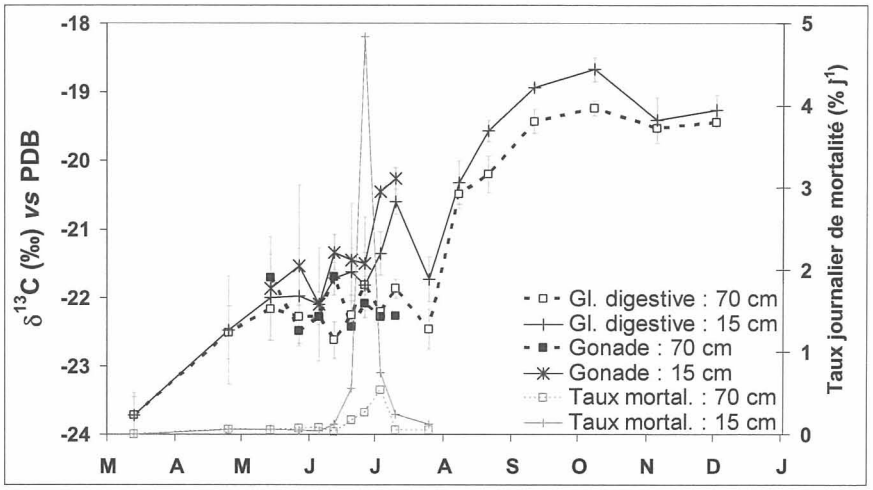



*Figure 29 : Variations de la signature isotopique sur le carbone □13C de la glande digestive (□, +) et des tissus gonadiques (■, *) ainsi que du taux de mortalité journalier (□ grisé, + grisé) d'huîtres diploïdes placées en élevage à 15 cm (ligne) et 70 cm (pointillé) du sol lors de l'expérimentation DYNAMO 2002 sur le site de Ronce-les-Bains Perquis à Marennes-Oléron. Barres d'écart type (n=3).*

L'huître *Crassostrea gigas* comme tout suspensivore placé à la base du réseau trophique intègre la variabilité temporelle des signaux nutritionnels des producteurs primaires. Il est donc attendu que la composition en isotopes stables de ses tissus reflète celle de sa nourriture assimilée (Peterson and Fry, 1987; Post, 2002). Ceci est mis en évidence à partir d'un organe comme la glande digestive, connue pour son turnover rapide, et après avoir déterminé expérimentalement que l'enrichissement trophique ($\Delta^{13}C$ tissus – nourriture) de la glande digestive vis-à-vis de ses ressources nutritionnelles est négligeable (Malet, 2005). Il faut cependant tenir compte que les processus métaboliques liés à la construction des tissus gonadiques interfèrent de façon transitoire les signaux isotopiques tissulaires de la glande digestive et il semble de ce fait intéressant de comparer les variations temporelles du □$^{13}C$ de ces deux tissus. Pour l'année 2002, les variations temporelles du □$^{13}C$ de la glande digestive et des gonades chez des huîtres placées en élevage à 15 cm et 70 cm du sol montrent alors (Fig 29) :

- Une période de variation linéaire (mars – mai) avec des □$^{13}C$ de la glande digestive se stabilisant autour de -22 ‰ à -22,0 ‰ en mai. Les valeurs initiales sont plus négatives car reflet du séjour des huîtres en claires ostréicole préalablement à l'expérimentation avec une incorporation de matière organique d'origine terrestre plus appauvrie en $^{13}C$ (Malet, 2005). La signature isotopique des huîtres s'équilibre rapidement avec celles des ressources incorporées du fait de la forte croissance tissulaire et de l'utilisation préférentielle de phytoplancton néritique en complément de ressources d'origine benthique dont la contribution au régime alimentaire des huîtres va croissante sur la période.

- Un basculement estival du régime trophique à partir d'août c'est-à-dire en période de post-ponte. Les □$^{13}C$ de la glande digestive basculent de -22 à -19 ‰, ce qui traduit des apports prépondérants de ressources d'origine benthique (microphytobenthos) au régime alimentaire des huîtres. La signature isotopique du microphytobenthos est en effet de l'ordre de -17 à -15 ‰ à Marennes-Oléron (Riera and Richard, 1996; Kang *et al.*, 1999). C'est aussi une période de reprise de croissance tissulaire, ce qui explique la rapidité des changements observés à partir d'août sur les □$^{13}C$. Il est notable d'observer que de plus grandes proportions de microphytobenthos sont incorporées par les huîtres situées à 15 cm du sol par rapport aux huîtres placées à 70 cm, traduisant par la même que leur environnement nutritionnel est très largement influencé par les flux d'échange benthos-pélagos réalisés à l'échelle verticale de quelques décimètres.

- Intermédiaire entre les deux périodes précédentes se situe la phase de gamétogenèse active (mai à juillet) au cours de laquelle apparaissent les épisodes de mortalité. Le maximum du taux journalier de mortalité se situe fin juin 2002 et les taux journaliers de mortalité sont très significativement plus élevés pour les huîtres placées à 15 cm du sol. La période de gamétogenèse se caractérise alors par l'utilisation de ressources trophiques locales, tant pélagiques que benthiques. Elle est aussi marquée par de brusques variations sur les □$^{13}C$ de la glande digestive (surtout pour les huîtres placées à 15 cm du sol) qui se répercutent sur celles de la gonade, traduisant bien le double rôle fonctionnel de la glande digestive ; 1) pourvoyeur de métabolites pour les tissus en voie de constitution et 2) intégrateur de la variabilité nutritionnelle de l'environnement. Cette période se

caractérise en effet par la nécessité d'assurer les besoins en métabolites de la gamétogenèse (Gabbott, 1983), en particulier des lipides (Soletchnik *et al.*, 2006) connus pour leurs valeurs de □$^{13}$C plus négatives que celles des protéines et glucides (DeNiro and Epstein, 1977). Il est alors notable d'observer que cette période correspond aux écarts les plus forts sur le □$^{13}$C entre les huîtres placées à 15 et 70 cm du sol. Autant les valeurs de □$^{13}$C que ce soit de la glande digestive que des gonades des huîtres placées à 70 cm du sol semblent se stabiliser autour d'une valeur pivot de -22 à -22,5 ‰ autant celles des huîtres placées à 15 cm du sol présentent de très brusques variations dans une tendance croissante pour atteindre une valeur de -20,5 ‰. Cette divergence d'évolution temporelle peut s'interpréter en première analyse comme une plus grande incorporation de matières organiques d'origine benthique par les huîtres placées à 15 cm du sol au cours des phases les plus actives de la gamétogenèse. L'environnement nutritionnel des huîtres placées à 15 cm du sol pendant cette période de la gamétogenèse et de mortalité apparaît de fait comme beaucoup plus variable dans l'amplitude de ses variations que celui des huîtres placées à 70 cm du sol.

## 3.3 Stress des huîtres suivant la distance du sédiment : modèle plat-table

### *3.3.1.Perturbation de la chaîne respiratoire et déficit énergétique sur le site d'Auray*

L'expérimentation Dynamauray 2004 avait pour objectif de tester l'hypothèse que la proximité du sédiment est un facteur aggravant par l'action de composés re largués dans la colonne d'eau (ex : sulfures, ammonium). qui altèrent l'efficacité du système de production d'énergie Les huîtres issues du captage naturel de 2003 sont placées à la fin mars 2004 sur table à 60 cm de hauteur et à 10 cm de hauteur. Les prélèvements d'huîtres effectués à intervalle régulier ont permis de mesurer des marqueurs du système énergétique permettant de déceler une réponse des épisodes de type hypoxique. L'expérimentation Dynamauray 2004 se caractérise par une mortalité de 40 % simultanément aux 2 niveaux pendant le première quinzaine de juin et un épisode de ponte des huîtres placées à 60 cm révélé le 19 juillet 2004.

- 3.3.1.1.Indices métaboliques révélateurs d'une hypoxie

La pyruvate kinase subit une variation saisonnière associée à l'augmentation de température (Fig 30). L'activité de la PK est maximale lorsque le stock de glucides est au plus bas. La chute de l'activité PK du mois d'août est indépendante de la température qui reste élevée alors que le stock de glucides commence à se reconstituer. L'activité de la PK est plus faible chez les huîtres près du sédiment. Mais l'effet niveau d'élevage sur l'activité de la PK est non significatif malgré une tendance lourde(P=6,3%). Cette tendance pourrait traduire une réponse à l'hypoxie.

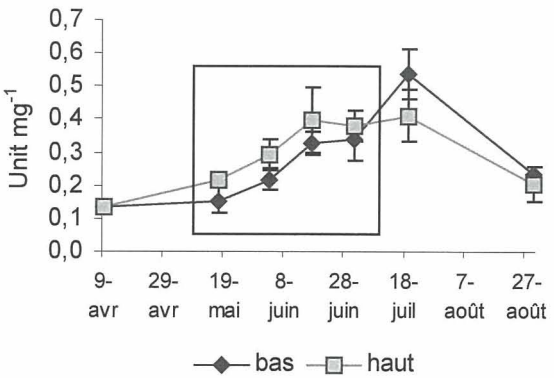



*Figure 30 : Activité PK, effet du niveau de l'élevage (bas : 10 cm et haut :60 cm).*

Une augmentation de l'ETS (Fig 31) est associée à une manifestation environnementale de type hypoxique comme cela a été montré dans la partie hypoxie expérimentale (cf paragraphe). *In situ*, l'ETS est supérieure chez les huîtres près du sédiment mais cette différence avec les huîtres élevées à 70 cm est non significative (P=5,2%) malgré une tendance lourde. Si cette différence n'est

pas significative sur la période considérée, c'est aussi lié à une brusque élévation de l'ETS chez les huîtres à 70 cm début juin. Ce point d'échantillonnage est associé à l'épisode de mortalité de 40 % qui a affecté les huîtres des 2 niveaux d'élevage. L'ETS est stimulée en condition d'hypoxie, ceci peut expliquer que les huîtres près du sédiment perçoivent ces conditions de manière chronique (effet déficit en oxygène ou composés relargués du sédiment, ammonium, sulfures). La réponse transitoire des huîtres à 70 cm indique aussi que ces huîtres ont perçu un épisode de type hypoxique.

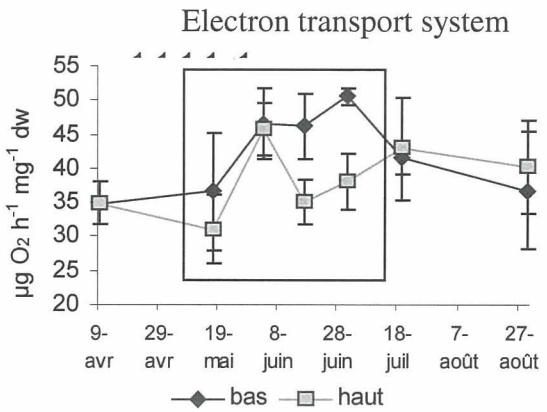



*Figure 31 : Activité ETS, effet du niveau d'élevage (bas : 10 cm et haut :60 cm)..*

La charge énergétique est significativement plus faible (P< 0,05) chez les huîtres près du sédiment (Fig 32). Une baisse est observée au moment de la mortalité (début juin). La ponte détectée le 20/07 n'est pas associée à une variation de la CEA, en revanche les huîtres du niveau bas ont une CEA qui augmente dans la même période sans être associée à la ponte.

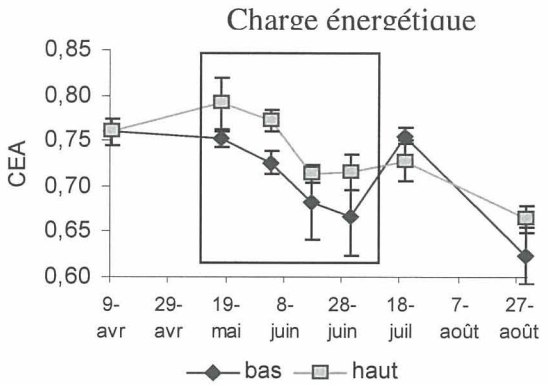



*Figure32: Effet du niveau d'élevage sur la CEA.*

Discussion : Les 3 paramètres (PK, ETS et CEA) permettent de détecter des différences métaboliques chez des huîtres selon le niveau d'élevage pendant la période allant de la mi-mai à la fin juin. Le modèle de réponse pour les huîtres élevées près du sédiment est donc (i) activité de la PK tendance plus faible (ii) tendance à la stimulation de l'ETS conduisant à un déficit énergétique traduit par une (iii) charge énergétique significativement plus faible. Ce modèle de réponse s'apparente à la réponse à l'hypoxie en mode expérimental (décrit en 2.1). Les huîtres élevées près du sédiment pourraient avoir subi un déficit en oxygène et/ou subi les effets de composés re largués du sédiment dans la colonne d'eau. L'hypothèse hypoxique est probable dans la mesure où les températures atteintes dans la zone d'élevage lors de cette période étaient de l'ordre de 18 à 20°C. Expérimentalement, nous avons montré que à 20°C, la baisse de la consommation d'oxygène survient lorsque le déficit en oxygène atteint 50% (données non publiées). En effet à 20°C, la concentration à saturation (100%) d'oxygène dans une eau de mer à 35 ppt de salinité est de 8,2 mg

$O_2$/L. Un déficit en $O_2$ de 50% abaissant la concentration à 4 mg $O_2$/L est envisageable près du sédiment mais reste à vérifier. Situé dans l'estuaire de la rivière d'Auray, le site de Fort Espagnol est susceptible de subir des hypoxies. Les estuaires sont des zones à risques puisque des hypoxies sont à craindre en cas de circonstances climatiques particulières (fort échauffement saisonnier en mortes eaux avec stratification de la colonne d'eau isolant la couche d'eau de fond du contact avec l'atmosphère). En 1982, en baie de Vilaine, c'est l'anoxie qui a provoquée la mortalité d'organismes marins. Depuis 1983 des désoxygénations partielles ont souvent été observées dans les eaux de cet estuaire (Anonyme, 1998). Les enregistrements d'oxygène à Auray en 2004 n'ont pas permis de révéler clairement un déficit en oxygène pendant la période critique ayant fait l'objet de cette étude. Ces enregistrements n'ont pas été réalisés aux 2 niveaux d'élevage des huîtres. Il est possible d'incriminer les composés sédimentaires de type ammonium et sulfures qui sont relargués dans la colonne d'eau. Si dans la littérature, l'ammonium n'est pas évoqué comme facteur d'altération de la respiration, mais il reste à en déterminer l'importance, il est clair que les sulfures ont un impact sur la physiologie respiratoire (Encomio, 1998) et génèrent des mortalités après une exposition prolongée (Theede et al., 1969, Laudien et al, 2002). Le soufre se substitue à l'oxygène comme accepteur d'électron au niveau de la chaîne respiratoire. Certains organismes sont aptes à résister à un environnement riche en sulfures (Oeschger et Storey, 1993) car il bénéficie d'un système de détoxification (Laudien et al., 2002) basé sur l'oxydation des sulfures en composés non toxiques comme le thiosulphate (Jahn and Theede, 1997, Jahn et al., 1997). Une combinaison sulfure/hypoxie augmente encore plus le risque énergétique et le pronostic vital. Il apparaît désormais important de vérifier l'impact des sulfures sur la physiologie respiratoire des huîtres en mode expérimental afin de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse de la sensibilité des huîtres à ce composé sédimentaire.

### *3.3.2 Etude du stress environnemental sur le site Atelier de Marennes Oléron*

Les mortalités observées dans le bassin de Marennes Oléron depuis 1997(Soletchnik et al.,2005) mettent en évidence l'influence de la proximité du sédiment. Nous avons sélectionné un site d'élevage situé à Perquis dans le bassin de Marennes Oléron (Fig 19) sur lequel nous avons étudié les réponses des huîtres au stress oxydant suivant la distance du sédiment. Des huîtres ont été placées à 15 et 70 cm du sédiment. Un suivi de l'effort métabolique d'adaptation des huîtres a été réalisé de la période d'avril à juin 2003. Les variations du métabolisme antioxydant ont été analysées dans la glande digestive et dans les branchies à partir d'une batterie de biomarqueurs qui sont la catalase, métallothionéines, glutamine synthètase, glutahtion-s-transférase, protéines de choc thermique.

#### 3.3.2.1.Métabolisme antioxydant en période de stress chronique sur le site de Marennes Oléron

Des différences significatives du stress oxydant ont été identifiées entre 15 et 70 cm du sédiment (Fig 33). La période située entre le 26 mai et le 2 juin est marquée par une élévation de la température au delà de 19°C et une maturation active. Cette période se traduit également par une activation différente du système de défense antioxydant entre 15 et 70 cm.

La catalase est la principale enzyme capable de détruire le péroxyde d'hydrogène, substance prooxydante produite dans le cas d'un stress. Les travaux d'exposition aux pesticides réalisés en conditions contrôlées mettent en évidence une activation plus rapide des catalases dans la glande digestive. La catalase se révèle être un biomarqueur pertinent du stress oxydant avec une réduction progressive du 26 mai au 16 juin de l'activité enzymatique à 70 cm (Fig 33) . Cette période couvre la période de stress chronique du 26 mai au 10 juin et de la mortalité du 10 au 16 juin. Cette réduction significative ($P>0,01$) de l'activité catalase à 70 cm indique que les huîtres placées à 70 cm du sédiment sont moins stimulées par le stress oxydant que les huîtres placées à 15 cm du sédiment. Pour les huîtres proches du sédiment, l'activité catalase est induite à partir du 2 juin pour atteindre une valeur maximale le 16 juin, date qui correspond à la fin de mortalité et probablement la période de stress oxydant la plus intense.

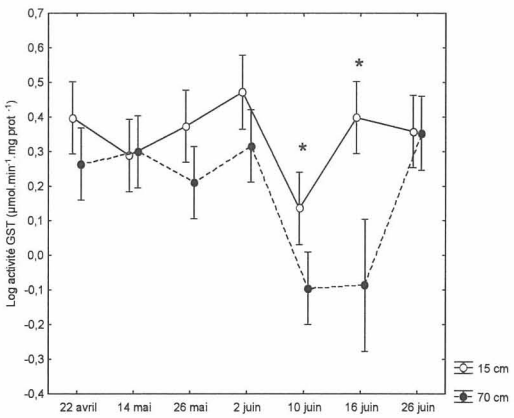
Les métallothionéines (MT) sont impliqués dans la détoxication des métaux lourds mais bien que cela soit encore mal évalué, elles jouent un rôle antioxydant important chez l'huître ( Anderson et al., 1999). La période d'étude montre principalement une réduction progressive des MT à 15 et 70 cm du sédiment en relation avec l'augmentation de la température et de la gamétogenèse (Fig 33) . Une forte induction des MT apparaît pendant la période de stress à 15 cm comme à 70 cm du

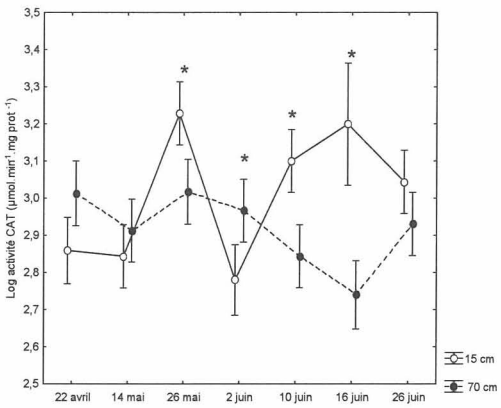
sédiment. Il faut cependant souligner une différence significative des MT (P<0,01) entre 15 et 70 cm le 26 mai, début de période de stress oxydant également observée avec la catalase.

Les protéines de choc thermique (heat shock proteins : HSP) comme les HSP 70 joue un rôle essentiel dans le processus de translocation, de stabilisation et d'assemblage des protéines. Elles interviennent également dans la réparation des dommages oxydatifs induits sur les protéines et ont un rôle fondamental dans le développement de cellules germinales ainsi que dans la régulation du développement des ovocytes chez l'homme (Neuer et al., 1999). Ces protéines permettent aux cellules de résister à un stress en prolongeant leur viabilité jusqu'à disparition du stress. L'implication des HSP 70 dans la réponse d'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycyclique a été décrite chez *Crassostrea gigas* (Boutet *et al.*, 2004) . L'augmentation de la synthèse des HSP70 à partir du 2 juin apparaît donc quelques jours après l'activation de la CAT et des MT (Fig 33). Elle peut être interprété comme une réponse d'adaptation au stress oxydant probablement induit par différents facteurs environnemetaux comme la régulation thermique car la température atteint 19°C. Cependant, cette période coïncide également avec un pic de pesticides (Fig 20). L'augmentation des HSP70 peut également être associée à une déplétion énergétique et une infection virale. Aucune infection virale n'a été démontrée mais il est probable que l'augmentation très significative des HSP70 (P> 0,001) le 2 juin pour les huîtres à 15 cm s'accompagne d'une déplétion énergétique qui fragiliserait les huîtres proches du sédiment.

Les variations de l'activité enzymatique gluthation-s-transférase indiquent une inhibition entre le 2 et 10 juin. La différence significative du GST n'apparaît que pendant le phénomène de mortalité avec une induction significative à 15 cm du sédiment qui confirme un stress oxydant issu du sédiment (Fig 33). La sensibilité du GST qui est également un biomarqueur de la phase II caractérisant la détoxication étudié chez les mollusques bivalves (Willet *et al.*, 2000), apparaît moins réactive au stress oxydant issue du sédiment que la catalase MT et HSP70.

La gluthamine synthètase (GS) est impliquée dans le métabolisme des acides aminés et de manière plus générale dans le métabolisme de l'azote (Saha et al, 2002). La diminution de l'activité GS est également interprétée comme un indicateur de stress oxydant dans l'apparition de pathologie (Cui et al, 2004). Une conséquence directe de la diminution de la GS entraîne une élimination moins efficace du glutamate qui s'accumule et devient plus toxique. La mesure d'une augmentation de l'activité GS chez l'huître permet d'identifier une période de stress à partir du 2 juin. Aucune différence significative n'est décelée avant le 10 juin entre les hauteurs d'élevage de 15 et 70 cm. Le pic d'activité GS le 10 juin coïncide avec le début des mortalités mais également la présence du pic de pesticides (Fig 20) Le stress oxydant plus élevé au niveau du sédiment se manifeste à partir du 16 juin avec une différence significative de la GS suivant la distance du sédiment. L'activité GS chute de manière plus importante à 15 cm du sédiment ce qui traduit un stress plus intense au niveau du sédiment.



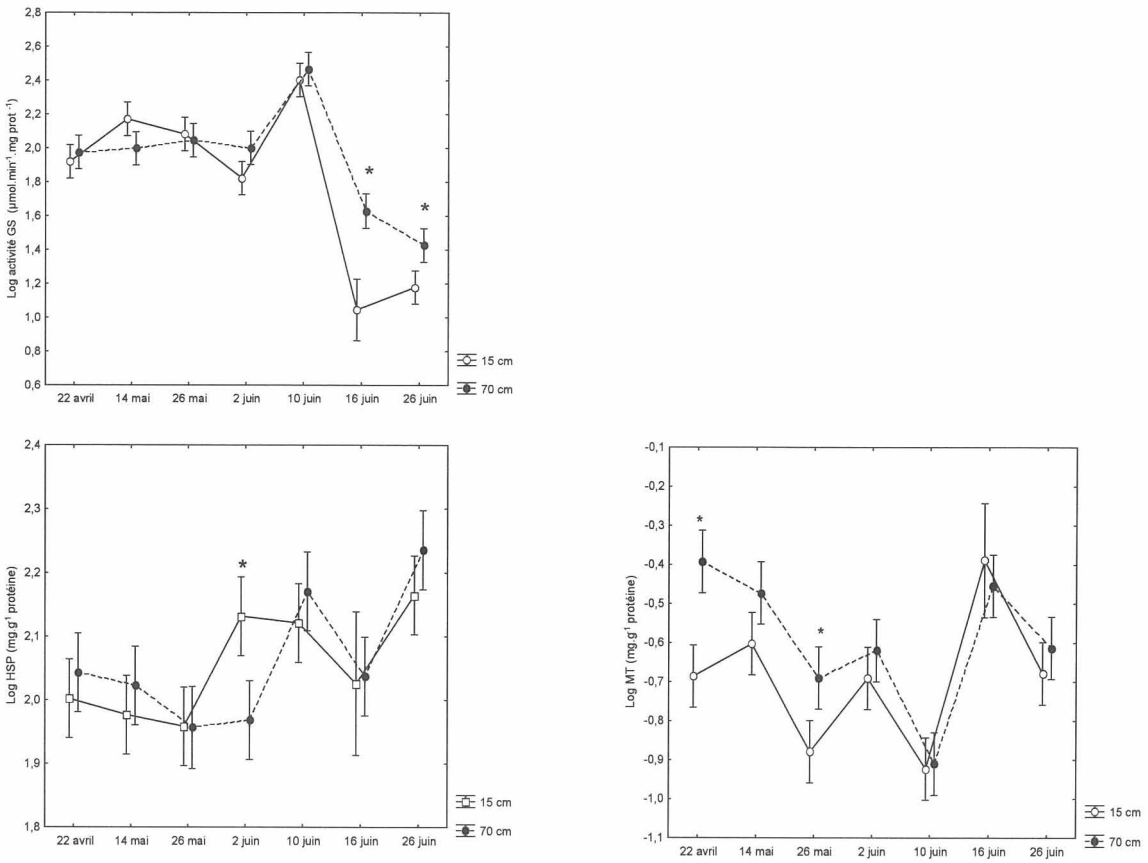



Figure 33: Mesure des activités enzymatiques catalase (CAT) ,gluthamine synthètase (GS), gluthation-s-transférase et des quantités de méthallothionéines et HSP70 pour évaluer le statut antioxydant des huîtres placées à 15 et 70 cm du sédiment.

La modulation métabolique est particulièrement exacerbée au niveau du sédiment (15 cm) et pendant les trois semaines précédent la mortalité (10-16 juin). Une différence du stress oxydant a été observée entre 15 et 70 cm. Elle est significativement différente le 26 mai ( $p<0,01$) pour la catalase et les métallothionéines. La différence significative est maintenue pour la catalase le 2 juin et elle apparaît pour les HSP. La GS et le GST ne font apparaître une différence significative qu'à partir du 10 juin , début de la mortalité.

L'étude du statut de stress oxydant avec les activités enzymatiques met en évidence des différences de sensibilité et de cinétique de réponse des biomarqueurs CAT , MT, HSP, GST et GS suivant la distance du sédiment. Une plus grande réactivité de la catalase est identifiée sur la période du 26 mai au 16 juin qui couvre une période de stress chronique avant la mortalité du 10 au 16 juin. La distance du sédiment marque une réponse plus précoce des MT le 26 mai suivie d'une augmentation des HSP 70. les HSP70 augmentent significativement du 2 au 10 juin de manière concomitante avec une élévation de la température au delà de 19°C. L'activité des GST et GS comme la catalase illustre un stress oxydant plus important à proximité du sédiment pendant la période de mortalité du 10 au 16 juin ce qui confirme un effort métabolique d'adaptation plus élevé au voisinage du sédiment.

L'élévation de la température et la maturation des gonades constituent des facteurs physiologiques qui interagissent sur la réponse antioxydante des huîtres. Cependant, la CAT, les MT et les HSP 70 confirment un stress oxydant à proximité du sédiment entre le 26 et 10 juin. La présence d'herbicides dans la période du 2 au 13 juin avec un pic à partir du 7 juin coïncide avec le stress oxydant. Tout comme l'élévation de température et la maturation des gonades, la coïncidence d'une contamination élevée d'herbicides indique une interaction toxique potentielle sur le stress oxydant.

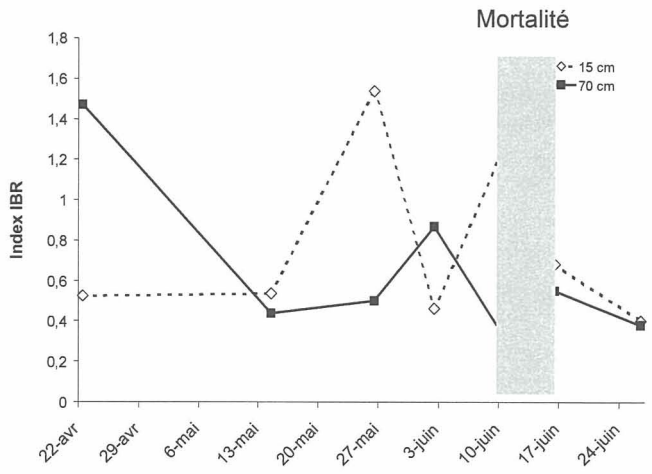



*Figure 34 : Indice composite intégrant les activités enzymatiques CAT, GS, GST et les quantités de MT et HSP70 analysées chez les huîtres placées à 15 et 70 cm du sédiment pendant la période du 22 avril au 26 juin 2003.*

L'application d'un indice composite (Beliaeff et Burgeot, 2003) permet d'illustrer graphiquement l'activation du système antioxydant des huîtres placées à 15 et 70 cm du sédiment (Fig 34). Une chute de l'activité antioxydante apparaît chez les huîtres à 70 cm entre le 22 avril et le 14 mai. Puis l'amplitude de réponse du 14 au 26 juin s'échelonne entre les indices IBR 0,4 et 0,8. Un pic est observé le 2 juin à 70 cm du sédiment. L'amplitude de l'IBR pour les huîtres à 15 cm est beaucoup plus élevée. Des pics apparaissent le 26 mai et le 10 juin. Ces pics illustrent deux périodes de un stress oxydant et un effort d'adaptation plus important fourni par les huîtres vivant à proximité du sédiment. Ces deux pics apparaissent à deux dates clés où précisément un potentiel toxique issu du sédiment le 26 mai et un potentiel toxique issu du sédiment et de l'eau le 10 juin ont été confirmés avec le bio essais d'embryotoxicité (Fig 17)

3.3.2.2. Aneuploïdie et génotoxicité sur le site de Marennes-Oléron

Une corrélation négative entre l'aneuploïdie somatique et le taux de croissance a déjà été décrite dans la descendance d'huîtres cultivées et dans les populations naturelles (Leitão et al., 2001a ; Zouros et al., 1996). De plus, l'hypothèse d'une base génétique dans la détermination de ce caractère a été émise (Leitão et al., 2001b) et il existe une perte préférentielle de certains chromosomes (Leitão et al., 2001c ; Bouilly et al., 2005). Cependant, aucune recherche n'avait été effectuée sur l'influence de facteurs environnementaux sur le taux d'aneuploïdie des huîtres dans le milieu naturel. Notre approche visait donc à étudier des huîtres du bassin de Marennes-Oléron et d'observer d'éventuelles fluctuations du taux d'aneuploïdie au cours du temps selon des conditions environnementales différentes en fonction de la saison.

En 2002, des huîtres du pool de la série 3 G1 en provenance de la nurserie de Bouin ont été soumises à 3 conditions expérimentales sur tables ostréicoles et en poches traditionnelles : 1) élevage sur estran à 15 cm du fond sur le site de Perquis, 2) élevage sur estran à 70 cm du fond sur le site de Perquis et 3) élevage en marais sur le site d'Artouan. Un premier prélèvement a été réalisé avant la mise sur sites (le 13 mars 2002). Un deuxième prélèvement a ensuite été réalisé après plus de deux mois de mise sur sites (le 27 mai 2002 pour Artouan après une période de mortalité et le 28 mai pour Perquis) pour chaque condition environnementale. Un troisième et dernier prélèvement a eu lieu après une période de mortalité dans le milieu naturel (le 3 juillet 2002), et ce, pour chaque site (Fig 35).

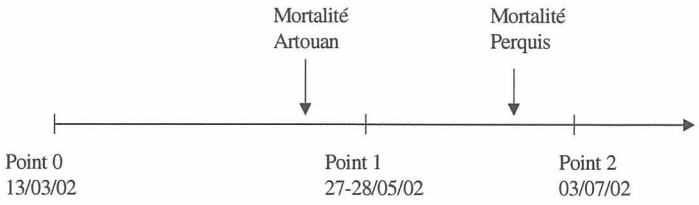



*Figure 35 : Diagramme résumant les différents points de prélèvement.*

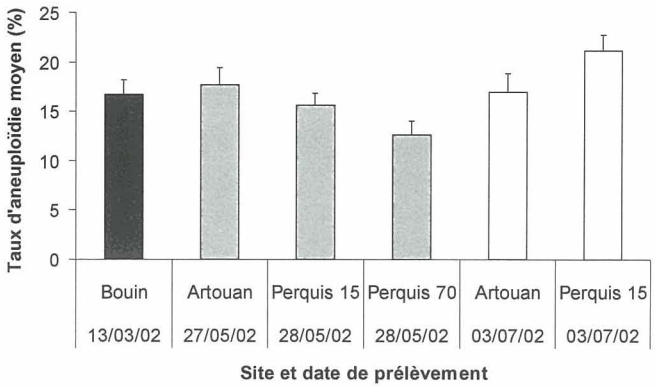



*Figure 36 : Pourcentage d'aneuploïdie d'huîtres creuses Crassostrea gigas pour chaque site en fonction de la date de prélèvement.*

Le plus faible taux d'aneuploïdie observé à Perquis 70 (en comparaison à Perquis 15) confirme que l'élevage en poches sur des tables ostréicoles placées à 70 cm du sol est le meilleur mode de culture. A long terme, le choix du site pourrait donc jouer sur le patrimoine génétique global de la population. En effet, si l'élevage est préférentiellement réalisé sur tables à 70 cm, les huîtres dont le taux d'aneuploïdie est plus faible seront plus nombreuses et participeront davantage aux générations suivantes : il s'agirait là d'une sélection s'apparentant à de la domestication. Il serait intéressant d'utiliser ce paramètre dans le cadre d'un observatoire à long terme de ces populations afin de déterminer si le taux moyen d'aneuploïdie tend à diminuer.

Par ailleurs, le plus faible taux d'aneuploïdie a été obtenu sur le site de Perquis à 70 cm le 28 mai et le plus fort sur le site de Perquis à 15 cm le 3 juillet (Figure 36). Le 28 mai, une différence significative a été observée entre les huîtres d'Artouan et celles de Perquis 70 (le taux d'aneuploïdie des huîtres d'Artouan étant plus élevé que celui de celles de Perquis 70). Ce plus fort taux d'aneuploïdie à Artouan le 27 mai est en relation avec le fort taux de mortalité observé entre le 13 mars et le 27 mai sur le site d'Artouan. En effet, il semblerait que la mortalité des huîtres soit corrélée avec un plus fort taux d'aneuploïdie. Ainsi, le taux d'aneuploïdie des huîtres du site Perquis 15 le 28 mai est significativement plus faible de celui des huîtres du même site le 3 juillet, alors que justement la mortalité sur ce site est apparue entre le 28 mai et le 3 juillet. Après une période de mortalité, il semblerait donc que le taux d'aneuploïdie des huîtres soit plus élevé.

La présence d'HAP démontrée par Miramand et al. ( 2003) dans les huîtres montre qu'il existe des sources de contaminations HAP dans le bassin Marennes-Oléron. Les remises en suspension du sédiment peuvent ainsi être des sources de perturbation des huîtres mais contrairement aux pesticides la contamination par les HAP ne présente pas de saisonnalité. Il s'agit d'une contamination persistante et sans variations importantes au cours d'une année par rapport aux pesticides. L'aneuploïdie apparaît ainsi dans cette étude *in situ* comme un biomarqueur de génotoxicité qui permet de mettre en évidence le potentiel génotoxique du sédiment.

3.3.2..3. Variations de la capacité immunitaire sur le site de Marennes-Oléron

L'évolution du pourcentage de phagocytose à deux hauteurs de table (15 cm et 70 cm) est représentée sur la figure 1. Pour chacune des deux conditions, la phagocytose présente des

variations importantes. Cependant, les deux conditions présentent une diminution de la phagocytose fin juin, une semaine après l'épisode de mortalité (Fig 37). Les valeurs remontent ensuite faiblement.

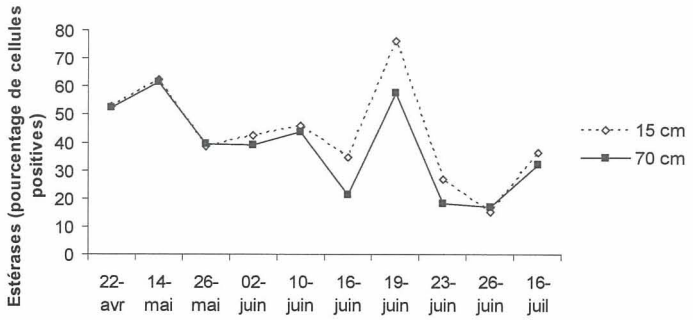



*Figure 37 : évolution du pourcentage de phagocytose pour les huîtres placées sur table à 15 cm et à 70 cm lors de l'expérience DYNAMOR (2003).*

Des analyses complémentaires ont montré que la phagocytose n'était pas significativement différente entre les deux hauteurs ni entre les différents stades de la gamétogénèse (Gagnaire, 2005). Cependant, l'expérience DYNAMOR en 2003 n'a pas permis de suivre les paramètres hémocytaires des huîtres lors de la ponte (août). Pour d'autres paramètres hémocytaires (pourcentage de cellules positives pour les estérases, présence de lysosomes), les valeurs sont supérieures à 15 cm par rapport à 70 cm (Fig 38 et Fig 39), et sont également supérieures en période de gamétogénèse active avant la mortalité en comparaison à la période d'attente de ponte après la mortalité (Gagnaire, 2005)

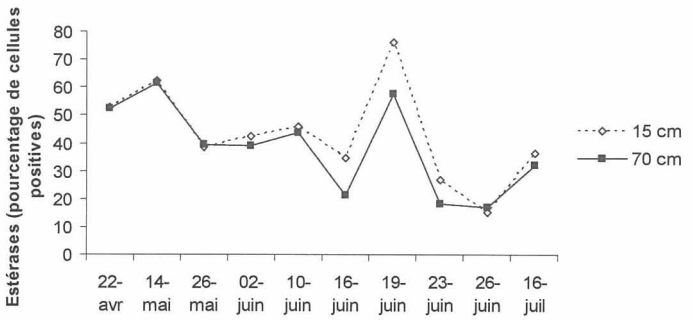



*Figure 38 : Evolution du pourcentage de cellules positives pour les estérases pour les huîtres placées sur table à 15 cm et à 70 cm lors de l'expérience DYNAMOR (2003).*

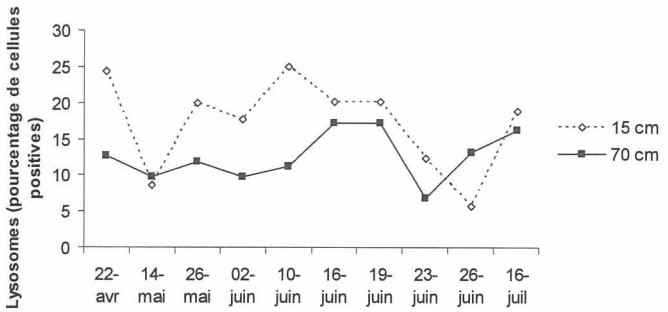



*Figure 39 : Evolution du pourcentage de cellules positives pour les lysosomes pour les huîtres placées sur table à 15 cm et à 70 cm lors de l'expérience DYNAMOR (2003).*

La construction de l'indice composite IBR (Integrated Biological Response : Beliaeff et Burgeot, 2003) utilisant plusieurs biomarqueurs hémocytaires (phagocytose, pourcentage de cellules positives pour les estérases et les Espèces Oxygénées Réactives (EOR), présence de lysosomes), a été réalisée afin de comparer les deux hauteurs de table (15 cm et 70 cm). Les variations sont

importantes pour les deux hauteurs tout au long de la période d'étude (Fig 40). Après une chute des valeurs IBR le 14 mai, un pic d'activation des réponses immunitaires apparaît à 15 cm du sédiment entre le 2 et 10 juin.

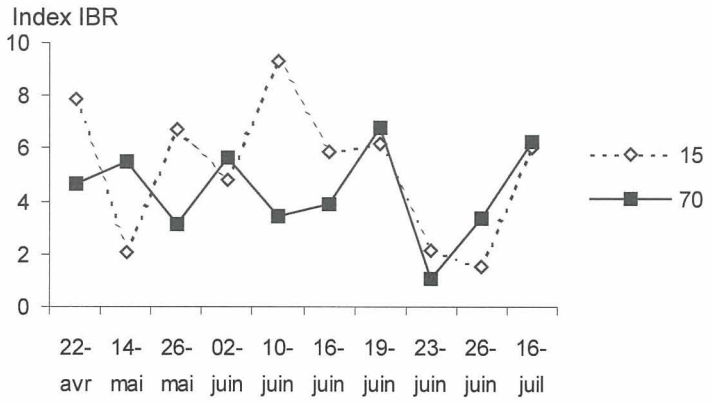



*Figure 40 : évolution de l'IBR construit à partir des biomarqueurs hémocytaires pour les hauteurs 15 cm et 70 cm lors de l'expérience DYNAMOR (2003).*

L'amplitude des variations de l'IBR tend à montrer que la stimulation des paramètres hémocytaires est supérieure à 15 cm. Une chute des valeurs hémocytaires est observable avec l'IBR après les mortalités entre le 19 et 23 juin. Les variations de facteurs physico-chimiques sont plus grandes à proximité du sédiment. La biomasse bactérienne liée à la turbidité peut être plus importante près du sédiment (Lodato, 1997). La turbidité peut devenir un facteur limitant du fait du colmatage des branchies dès 200 $mg.L^{-1}$ (Raillard, 1991). La turbidité entraîne également un développement de la biomasse bactérienne, qui peut augmenter la stimulation des hémocytes.

# 4 Conclusion

Une période de stress est identifiée en mai-juin dans le mois qui précède les mortalités. La proximité du sédiment apparaît comme un facteur aggravant de stress. L'étude du potentiel toxique du sédiment réalisée avec des bioessais d'embryotoxicité chez l'huître montre jusqu'à 98 % d'anomalies larvaires dans les sédiments de la Rivière d'Auray en juin 2004. La manifestation de la toxicité du sédiment peut cependant être différente suivant les sites. Sur le site de Marennes-Oléron, un potentiel toxique du sédiment est mesuré en mai (60% en mai 2003) et un potentiel toxique combiné dans l'eau et le sédiment est détecté en juin. Le potentiel toxique combiné de l'eau et du sédiment est persistant jusqu'en septembre. L'ammonium et les sulfures produits dans le sédiment de manière synchrone avec une élévation de la température au delà de 19°C constituent une première source de stress potentielle. L'émission de substances réduites à l'interface eau sédiment pourrait à cette période être favorisée par des apports massifs de matière organique liées à la chute d'un boom phytoplanctonique. Les concentrations d'ammonium et sulfures dans la colonnes d'eau apparaissent comme un indicateur de perturbation du milieu sédimentaire en mai juin mais celles ci ne sont pas assez élevées pour entraîner à elles seules une mortalité. Le caractère persistant de la contamination du bassin de Marennes-Oléron par le cadmium et les HAP (Miramand et al., 2003; Pigeot et al. ,2006) n'apparaît pas non plus prépondérant dans l'explication des mortalités saisonnières en juin. La trifluraline considérée comme une substance prioritaire dans le cadre de la directive cadre sur l'eau, a également été détectée dans le sédiment à des concentrations de 2 à 6 $\mu g.kg^{-1}$ de sédiment mais elle n'a pas été détectée dans l'eau. Cependant, le potentiel toxique du sédiment révélé par un bioessais d'embryotoxicité complété par une diminution significative de 65% de la densité de foraminifères dans la couche superficielle (0-0,5 cm) de sédiment confirme un effet biologique du sédiment.

L'action de composés relargués dans la colonne d'eau altère l'efficacité du système de production d'énergie. Le modèle plat-table révèle ainsi une activité de la pyruvate kinase plus faible,

une stimulation de l'ETS conduisant à un déficit énergétique traduit par une charge énergétique plus faible. Ce profil de réponse s'apparente à la réponse à l'hypoxie testée en mode expérimental. Les huîtres élevées près du sédiment pourraient avoir subi un déficit en oxygène et/ou subi les effets de composés re largués du sédiment dans la colonne d'eau.

Outre le potentiel toxique du sédiment, la coïncidence de plusieurs sources de stress pendant la période de mai et juin s'affiche comme une source de perturbation en phase de gamétogenèse avancée (pré ponte). Parmi les sources de stress étudiées, la qualité de la matière organique disponible pour l'huître sur le site de Marennes Oléron (en 2002), confirme une dilution du bol alimentaire liée aux fortes turbidités du domaine intertidal mais révèle également en mai-juin, une utilisation différente des ressources trophiques disponibles entre les huîtres placées à 15 et 70 cm du sédiment. En effet, à partir de mai, les rapports en isotopes stables du carbone ($\square^{13}C$) de la glande digestive et de la gonade des huîtres placées à 15 et 70 cm du sol subissent de brusques variations puis divergent significativement montrant que les huîtres placées à 15 cm du sol incorporent de façon accrue mais irrégulière une plus grande proportion de matières organiques d'origine benthique à leur régime alimentaire. Pendant la période de gamétogenèse, l'environnement nutritionnel des huîtres placées à 15 cm du sol apparaît de fait comme beaucoup plus variable dans l'amplitude de ses variations que celui des huîtres placées à 70 cm du sol. La variabilité saisonnière de la qualité de l'environnement nutritionnel se révèle donc comme un indicateur potentiel de stress susceptible de favoriser un déséquilibre énergétique en fin de gamétogenèse.

Parmi les phénomènes synchrones à caractère saisonnier, les apports élevés d'herbicides en période de mai-juin peuvent également interférer sur la qualité de l'environnement nutritionnel et fragiliser de manière indirecte l'équilibre physiologique des huîtres. En effet, les pesticides modifient les assemblages de populations phytoplanctoniques. La quantification d'herbicides dans les eaux superficielles de l'estuaire de la Seudre met en évidence un pic de contamination pendant la première quinzaine de juin en 2003 et 2004. Le profil de contamination chimique varie suivant les années avec la prédominance de l'isoproturon ( 0,4 $\mu g.L^{-1}$) en 2003 et du glyphosate (1,2 $\mu g.L^{-1}$) en 2004. La concentration élevée de glyphosate (1,2 $\mu g.L^{-1}$ ) détectée en juin 2004 souligne un potentiel toxique et illustre des apports ayant des origines domestiques et agricoles. Le faible pluviométrie en juin 2003 ne semble pas le facteur prépondérant de ces apports en estuaire de Seudre. Ces apports ne semblent pas non plus provenir de la Charente. Ils pourraient résulter d'une contamination des masses d'eaux oscillantes entre les marais ( zone de confinement plus contaminés) et l'estuaire de la Seudre. Parmi les stress observés, les herbicides présents dans les eaux exercent une pression de sélection sur les espèces des assemblages de populations phytoplanctoniques qui favorise le développement de diatomées (*Pseudonitzschia* sp., producteur potentiel de toxines amnésiantes en rivière d'Auray) et de dinoflagellés potentiellement nuisibles (*Alexandrium sp.,* et *Karenia sp.,* producteurs potentiels à toxines paralysantes dans le bassin Sud de Marennes-Oléron) potentiellement nuisibles. A Marennes-Oléron, les espèces appartenant à des genres favorables à la croissance larvaire et des filtreurs (*Chaetoceros* et *prorocentrum*) sont plus sensibles à la toxicité des pesticides que les espèces de diatomées (*Navicula* sp., *Thalassiosira* sp.,) par ailleurs moins favorables à la reproduction de copépodes.

La source de stress combinée eau-sédiment en juin apparaît prépondérante au moment des mortalités. L'activation de processus sédimentaires (émission de substances réduites) combinée à des apports ponctuels de pesticides dans l'eau apparaît comme une source de stress. Sur le plan physiologique, deux périodes de stress oxydant sont détectées à Marennes Oléron. Elles concordent avec le potentiel toxique du sédiment le 26 mai et le potentiel combiné eau-sédiment en juin. Le stress oxydant observé en juin apparaît également concordant avec le pic de contamination par les herbicides. Une élévation de certains paramètres hémocytaires (pourcentage de cellules positives pour les estérases, présence de lysosomes) de mi mai à début juin atteste également à proximité du sédiment d'une modification de l'activité des cellules impliquées dans les mécanismes de défense. Cependant, notre étude en conditions contrôlées indique que les concentrations d'herbicides observées ne suffisent pas à elles seules à provoquer une mortalité.

A Marennes-Oléron, la source la plus probable du stress se manifeste dans la démonstration d'un potentiel toxique issu du sédiment le 26 mai (60% d'anomalies larvaires ) puis la combinaison d'un stress eau et sédiment en début de mortalité le 10 juin. L'association de plusieurs événements saisonniers apparaissent comme phénomène d'aggravation du stress. Les apports de pesticides combinés à une élévation de température susceptible d'activer le relargages de substances réduites et une modification de la qualité de l'environnement nutritionnel dans une phase avancée de gamétogenèse sont les principales sources de stress observées dans notre étude.

# 5. Bibliographie


Alzieu, C., Quiniou, F., Delesmont R., 2005. An integrated approach to impact assessment : risk scores, toxicity assays, biotic indices. Chapitre IV In: Dredging and marine environment, Éd. Ifremer, (Coord. C. Alzieu), pp 95 – 108.

Anderson, R.S.,.Patel, K.M., Roesijadi, G., 1999. Oyster metallothionein as an oxyradical scavenger : implications for hemocytes defense responses. Developmental and Comparative Immunology. 23, 443-449.

Anonyme, 1998, Les apports de nitrates aux eaux littorales bretonnes Caractérisation et évolution des flux, rôle dans les proliférations d'algues. Conférence régionale de l'environnement, Bretagne, 24 p.

Barillé, L., Héral, M., Barillé-Boyer, A.-L., 1997. Modélisation de l'écophysiologie de l'huître *Crassostrea gigas* dans un environnement estuarien. Aquat. Living. Resour. 10, 31-48.

Bassoulet, P., Le Hir, P., Gouleau, D., Robert, S., 2000. Sediment transport over an intertidal mudflat: field investigations and estimation of fluxes within the "Baie de Marennes-Oléron" (France). Cont. Shelf Res. 20, 1635-1653.

Beliaeff, B., and Burgeot, T., 2003. Integrated biomarker response (IBR) a useful graphical tool for ecological risk assessment. Envirol Toxicol and Chem.*26* 1316-1322

Bougrier, S., Hawkins, A.J.S., Heral, M., 1997. Preingestive selection of different microalgae mixtures in *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis*, analysed by flow cytometry. Aquaculture 150, 123-134

Bouilly, K., Leitão, A., McCombie, H., Lapègue, S., 2003. Impact of atrazine on aneuploidy in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. Environ. Toxicol. Chem. 22, 229-233.

Bouilly, K., McCombie, H., Leitão, A., Lapègue, S., 2004. Persistence of atrazine impact on aneuploidy in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. Mar. Biol. 145, 699-705.

Bouilly, K., Leitão, A., Chaves, R., Guedes-Pinto, H., Boudry, P., Lapègue, S., 2005. Endonuclease banding reveals that atrazine-induced aneuploidy resembles spontaneous chromosome loss in *Crassostrea gigas*. Genome 48, 177-180.

Bouilly, K., Bonnard, M., Gagnaire, B., Renault, T., Lapègue, S., soumis. Impact of diuron on aneuploidy and hemocyte parameters in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Arch. Environ. Contam. Toxicol.

Bond, D.J., Chandley, A.C., 1983. Aneuploidy. Oxford Monographs on Medical Genetics No. 11. Oxford University Press, Oxford, UK.

Boutet I., Tanguy A., Moraga D ., 2004. response of the pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. Gene 329, 147-157.

Ceballos, S., Ianora A., 2003. Different diatoms induce contrasting effects on the reproductive success of the copepod *Temora stylifera*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 294, 189-202

Cognie, B., Barille, L., Rince, Y., 2001. Selective feeding of the oyster *Crassostrea gigas* fed on a natural microphytobenthos assemblage. Estuaries 24: 126-131

Cognie, B., Barille, L., Masse, G., Beninger P.G., 2003. Selection and processing of large suspended algae in the oyster *Crassostrea gigas*. Mar Ecol Prog Ser 250: 145-152

Cui, K., Luo, X., Xu, K., Ven Murthy, M.R., 2004. Role of the oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. Progr. in Neuro-Psychophar. & Biol. Psy. 40, 22-35

David, E., Tanguy, A., Pichavant, K., Moraga, D.,2005. Response to the pacific oyster to hypoxia exposure under experimental conditions. FEBS Journal, 272, 5635-5652.

Deaton LE, 2001. Hyperosmotic volume regulation in the gills of the ribbed mussel, *Geukensia demissa* : rapid accumulation of betaine and alanine. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 260, 185-197.

DeNiro, M.J., Epstein, S., 1977. Mechanism of carbon isotope fractionation associated with lipid synthesis. Science 197, 261-263.

De Zwann, A, Cortesi, P., van den Thillart, G., Roos, J., Storey, K.B., 1991. Differential sensitivities to hypoxia by two anoxia tolerant marine molluscs: a biochemical analysis. Mar. Biol. 111, 343-351.

Dupuy, C., Le Gall, S., Hartmann H.J., Breret M., 1999. Retention of ciliates and flagellatesby the oyster *Crassostrea gigas* in French Atlantic coastal ponds : protists as a tropic link between bacterioplankton and benthic suspension-feeders. Mar. Ecol. Prog. Ser. 177, 165-175

Dupuy, C., Pastoureaud,A., Ryckaert, M., Sauriau, P.G., Montanie, H., 2000. Impact of the oyster *Crassostrea gigas* on a microbial community in Atlantic coastal ponds near La Rochelle. Aquat. Microb. Ecol. 22, 227-242

D'Souza, F.M.L., Loneragan, N.R., 1999. Effects of monospacific and mixed-algae diets on survival, development and fatty acid composition in penaeid prawn (*Penaeus* spp.) larvae. Mar. Biol. 133: 621-633

Encomio, VG, 1998. Respiratory and metabolic response to sulfide and hypoxia in the marine echiuran worm, *Urechis caupo*. San Francisco University, PhD thesis, 74p.

Fanslow, DL, Nalepa, T.F., Johengen, T.H., 2001. Seasonal changes in the respiratory electron transport system (ETS) and respiration of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha* in Sagnay Bay, lake Huron.,. Hydrobiologia 448, 61-70.

Fent, K., 2004. Ecotoxicological effects at contaminated sites. Toxicology 205, 223-240.

Fujimori, T, Abe, H., 2002. Physiological role of free D- and L- alanine in the crayfish Procambarus clarkii with special reference to osmotic and anoxic stress responses. Comp. Biochem. Physiol., A 131, 893-900.

Gabbott, P.A., 1983. Developmental and seasonal metabolic activities in marine molluscs. In: Hochachka, P.W. (Ed.), The Mollusca. Volume 2. Environmental biochemistry and physiology. Academic Press, New York, pp. 165-217.

Gagnaire, B., 2005. Etude des effets de polluants sur les paramètres hémocytaires de l'huître creuse, *Crassostrea gigas* - interactions entre environnement, mécanismes de défense et maladies infectieuses. Thèse de Doctorat, Université de La Rochelle, La Rochelle, 377 p.

Greenway SC, Storey KB (2000) Seasonal change and prolonged anoxia affect the kinetic properties of phosphofructokinase and pyruvate kinase in oysters. J. Comp. Physiol. B 170, 285-293

Guarini, J.M., Blanchard, G.F., Gros, Ph., Harrison, S.J., 1997. Modelling the mud surface temperature on intertidal flats to investigate the spatio-temporal dynamics of the benthic micro-algal photosynthetic capacity. Mar. Ecol. Prog. Ser., 153 , 25-36.

Guarini, J.M., Gros, Ph., Blanchard, G.F., Bacher, C., 1999. La dynamique à court-terme de la biomasse du microphytobenthos intertidal : formalisation mathématique. C. R. Acad. Sci. Paris. Life Sciences, Paris, Sciences de la vie, 322 : 363-373.

Hansen L. S. and T. H. Blackburn, 1992. Effect of algal bloom deposition on sediment respiration and fluxes Marine Biology (112), pp 147 – 152.

Héral, M., Berthomé, J.-P., Razet, D., Garnier, J., 1978. Etude hydrobiologique du bassin de Marennes-Oléron. Un exemple : la sécheresse de l'été 1976. Rev. Trav. Inst. Pech. Marit. 42, 269-290.

Hermes-Lima, M., Storey, J.M., Storey, K.B., 1998. Anti-oxidant defenses and metabolic depression: the hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. Comp. Biochem. Physiol. 270, 810-818.

Hochachka, P.W., Buck, L.T., Doll, C.J., Land, S.C., 1996. Unifying theory of hypoxia tolerance: molecular/metabolic defence and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. Proc. Nat. Acad. Sci. 93, 9493-9498.

Ivanovici, A.M., 1980. Adenylate energy charge : an evaluation of applicability to assessment of pollution effects and directions for future research. (1980) Rapp. P-v Reun. Cons. Int Explor. Mer, 179, 23-28.

Kang, C.-K., Sauriau, P.-G., Richard, P., Blanchard, G.F., 1999. Food sources of the infaunal suspension-feeding bivalve *Cerastoderma edule* in a muddy sandflat of Marennes-Oléron Bay, as determined by analyses of carbon and nitrogen stable isotopes. Mar. Ecol. Prog. Ser. 187, 147-158.

Labry, C., Herbland, A., Delmas, D., Laborde, P., Lazure, P., Froidefond, J.M., Jegou, A.M., Sautour, B., 2001. Initiation of winter phytoplankton blooms within the Gironde plume waters in the Bay of Biscay. Mar Ecol Prog Ser 212, 117-130.

Lau P.S., and Wong H.L., 2003. Effect of size, tissue parts and location on six biochemical markers in the green-lipped mussel, *Perna viridis*. Marine Pollution Bulletin 46, 1563-1572

Laudien J., Schieck, D., Brey, T ., Portner, H.O., Arntz, W.E., 2002. Survivorship of juvenile clams *Donax serra* (Bivavlvia, Doncidae) exposed to severe hypoxia and hydrogen sulphide. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 271, 9-23.

Le Hir, P., Roberts, W., Cazaillet, O., Christie, M., Bassoullet, P., Bacher, C., 2003. Characterization of intertidal flat hydrodynamics. Continental Shelf Research , 20, 1433-1459.

Le Hir P., P. Bassoullet, and H. Jestin, Sediment exchanges over an intertidal mudflat : field observations, mathematical modeling and process analyses. Conférence Internationale INTERCOH, octobre 2003.

Leitão, A., Boudry, P., Thiriot-Quiévreux, C., 2001a. Negative correlation between aneuploidy and growth in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: ten years of evidence. Aquaculture 193, 39-48.

Leitão, A., Boudry, P., McCombie, H., Gérard, A., Thiriot-Quiévreux, C., 2001b. Experimental evidence for a genetic basis to differences in aneuploidy in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). Aquat. Living Resour. 14, 233-237.

Leitão, A., Boudry, P., Thiriot-Quiévreux, C., 2001c. Evidence of differential chromosome loss in aneuploid karyotypes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Genome 44, 735-737.

Lemoine O., Geairon, P., Stanisière, J.Y., Razet D., 2005. Cartographie de l'usage et de la disponibilité trophique des marais salés ostréicoles. Rapport du contrat de plan Etat-Région Poitou Charente Programme 5 : Gestion durable des activités anthropiques en marais et zone littorale. 25p.

Lodato, M.I., 1997. Mortalité estivale de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, sur les bancs ostréicoles de Perquis et Ronce (bassin de Marennes-Oléron): étude des pratiques culturales et des caractéristiques biologiques et spatiales des élevages. Thèse de Docteur Vétérinaire, Nantes, 127 p.

Malet, N., 2005. Ecologie alimentaire de l'huître *Crassostrea gigas* : dynamique des compositions isotopiques naturelles. Thèse de Doctorat, Université de La Rochelle, 247 pp.

Malet, N., Sauriau, P.-G., Faury, N., Soletchnik, P., soumis. Effect of seasonal variation in trophic conditions and the gametogenetic cycle on □$^{13}$C and □$^{15}$N levels on the body tissues of triploid and diploid Pacific oysters *Crassostrea gigas*. Mar Ecol Prog Ser.

Michener, R.H., Schell, D.M., 1994. Stable isotope ratios as tracers in marine aquatic food webs. In: Lajtha, K., Michener, R.H. (Eds.), Stable isotopes in ecology and environmental science. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 138-157.

Middelburg, J.J., Nieuwenhuize, J., 1998. Carbon and nitrogen stable isotopes in suspended matter and sediments from the Schelde Estuary. Mar. Chem. 60, 217-225.

Mehrani, H., Storey, K.B., 1995. Enzymatic control of glycogenolysis during anoxic submergence in the freshwater turtle *Trachemys scripta*. Int. J. Biochem. Cell Biol. 27, 821-830.

Miramand, P., Pigeot, J., Guyot, T., Bustamante, P., Huet, V., Fichet, D., Budzinski, H., 2004. Etude des polluants métalliques (Cd, Cu, Hg, Pb, Zn), des organochlorés (Lindane , PCB) et des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dans les organismes vivants sur une zone intertidale du bassin de Marennes Oléron( Charente-Maritime). Rapport Agence de l'eau Adour Garonne 290/98/0004. 59p.

Moal, J., Marti-Jezequel, V., Harris, R.P., Samain, J.F., Poulet S.A., 1987. Interspecific and intraspecific variability of the chemical composition of marine phytoplankton. Oceanol Acta 10, 339-346

Monlise, E.BI, Parola, A.H., Kost, D., 2003. Low-frequency electromagnetic fields induce a stress upon higher plant, as evident by the universal stress signal, alanine. Biochem. Biophysic. Res. Com. 302., 427-434.

Munaron, D., Scribe, P, Dubernet, J.F., Kantin R., Vanhoutte, A., Fillon, A. , Bacher, C., 2003. Estimation of herbicide inputs in a sensitive area on the Atlantic coast : Marennes Oléron Bay (France). XII Symposium Pesticide Chemistry june 4-6 2003, Italy.

Munschy, C., 1995, Comportement géochimique des herbicides et de leurs dégradation en milieu estuarien et marin cotier, Thèse de Doctorat, Université de Paris 06, 279

Munschy, C., Arzul, G., Bocquené, G., Claisse, D., Grossel, H., Marchand, M., Tissier, C., Tixier, C., Tronczynski, J., 2004. Stratégies pour la surveillance des produits phytosanitaires en milieu marin côtier. R.INT-DEL/PC/2004.17

Neuer A., Spandorfer S.D., Giraldo P., Jeremias J., Dieterle S., Korneeva I., Liu H.C., Rosenwaks Z., Wtkin S.S., 1999. Heat shock protein expression during gametogenesis and embryogenesis. Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology. 7, 10-16

Parish, CC., Wells, J.S., Yang, Z., Dabinnet, P., 1999. Growth and lipid composition of scallop juveniles, *Placopecten magellanicus*, fed the flagellate *Isochrysis galbana* with varying lipid composition and the diatom *Chaetoceros muelleri*. Mar Biol 133, 461-471

Peterson, B.J., Fry, B., 1987. Stable isotopes in ecosystem studies. Annu. Rev. Ecol. Syst. 18, 293-320.

Pigeot, J., Miramand, P., Guyot, T., Sauriau, P.G., Fichet, D., Le Moine, O., Huet, V., 2006. Cadmium pathways in an exploited intertidal ecosystem with chronic cadmium inputs (Marennes-Oléron, Atlantic coast, France). Mar. Ecol. Prog. Ser., 307, 101–114.

Post, D.M., 2002. Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions. Ecology 83, 703-718.

Powel E.N, Bochenek E.A., Klinck J.M., Hofman, E.E., 2002. Influence of food quality on the growth and development of *Crassostrea gigas* larvae: a modeling approach. Aquaculture 210: 89-117

Quiniou F., His E., Delesmont R et Caisey X., 2005. Bio-indicateur de la toxicité potentielle de milieux aqueux : bio-essai « développement embryo-larvaire de bivalve. Éd. Ifremer, Méthodes d'analyse en milieu marin, 24 p.

Quiniou F., Judas A., Le Squer-André E., 1997. Toxicité potentielle des eaux et des sédiments des principaux estuaires de la rade de Brest évaluée par deux bio-essais. Ann. Inst. Océanogr., Paris, 73 (1), 35-48.

Quiniou, F.,Caisey, X., Breugnot, M., Carrié, C., Klein, B, Moison, M., Delesmont, R., Delesmont, E., 2004. Embryotoxicité des eaux et sédiments sur les sites Morest. *In* :Thème IV : Effet du stress : toxicité potentielle du milieu et effort d'adaptation – Séminaire Morest, Caen, Novembre 2004. (communication orale).

Raillard, O. (1991). Interactions study of the physico-chemical processes in the production of the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) in the Marennes-Oleron basin: modelisations essays. Thèse de Doctorat, Université Pierre et Marie Curie Paris VI, Paris, 216 p.

Richard, P., Riera, P., Galois, R., 1997. Temporal variations in the chemical and carbon isotope compositions of marine and terrestrial organic inputs in the Bay of Marennes-Oléron, France. J. Coast. Res. 13, 879-889.

Richier, S., Merle, P.L., Furla, P., Pigozzi, D., Sola, F., Allemand, D., 2003. Characterization of superoxide dismutase in anoxia- and hyperoxia-tolerant symbiotic cnidarians. Biochem. Biophys. Acta 1621, 84-91.

Riera, P., Richard, P., 1996. Isotopic determination of food sources of *Crassostrea gigas* along a trophic gradient in the estuarine bay of Marennes-Oléron. Estuar. Coast. Shelf Sci. 42, 347-360.

Saha N., Dutta S., Bhattacharjee A., 2002. Role of amino acid metabolism in air-breathing catfish, *Clarias batrachus* in response to exposure to a high concentration of exogenous ammonia. Comp. Biochem. Physiol. *B*. 133, 235-250.

Santini G, Bruschini C., Pazzagli L., Pieraccini G., Moneti ., Chelazi G., 2001. Metabolic responses of the limpet Patella caerulea (L.) to anoxia and dehydratation. Comp. Biochem. Physiol. A 130, 1-8.

Savoye, N., Aminot, A., Tréguer, P., Fontugne, M., Naulet, N., Kérouel, R., 2003. Dynamics of particulate organic matter □$^{15}$N and □$^{13}$C during spring phytoplankton blooms in a macrotidal ecosystem (Bay of Seine, France). Mar Ecol Prog Ser 255, 27-41.

Soletchnik, P., Lambert, C., Costil, K., 2005. Summer mortality of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in relation to environmental rearing conditions. Journal of Shellfish Research 24, 197-207.

Soletchnik, P., Faury, N., Goulletquer, P., 2006. Seasonal changes in carbohydrate metabolism and its relationship with summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Marennes-Oléron bay (France). Aquaculture 252, 328-338.

Soletchnik, P., Faury, N., Razet, D., Goulletquer, P., 1998. Hydrobiology of the Marennes-Oléron bay. Seasonal indices and analysis of trends from 1978 to 1995. Hydrobiologia 386, 131-146.

Soletchnik, P., Le Moine, O., Faury, N., Razet, D., Geairon, P., Goulletquer, P., 1999. Mortalité de l'huître *Crassostrea gigas* dans le bassin de Marennes-Oléron : étude de la variabilité spatiale de son environnement et de sa biologie par un système d'informations géographiques (SIG). Aquat. Living. Resour. 12, 131-143.

Soudant,P., Moal, J., Masski,H., Samain J.F.,1998. Fatty acid composition of polar lipid classes during larval development of scallop *Pecten maximus* (L). Comp Biochem Physiol Part A 121, 279-288

Storey K.B., (1993) Molecular mechanism of metabolic arrest in molluscs. In: Hochachka PW, Lutz PL Sick T, Rosenthal M, van den Thillart G (eds) Surviving Hypoxia : Mechanisms of Control and Adaptation. CRC Press; Boca Raton; 253-269.

Struski C., 2005. Modélisation de la capacité trophique de la baie de Marennes-Oléron: Couplage de lhydrodynamisme, de la production primaire et de la consommation par les huîtres. Thèse de doctorat Université de La Rochelle, 306 pp.

Theen, J., Gilboe, D.P., Nuttall, F.Q., 1982. Liver glycogen synthase and phosphorylase changes in vivo with hypoxia and anesthetics. Am. J. Physiol. 243, 182-187.

Willett, K.L., Wilson, C.,Thomsen, J., Porter, W., 2000. Evidence for and against the presence of polynuclear aromatic hydrocarbon and 2,3,7,8-tetrachloro-*p*-dioxin binding proteins in the marine mussels, *Bathymodiolus* and *Modiolus modiolus*. Aquat. Toxicol. 48, 51-64.

Willmore, W.G., Storey, K.B., 1997. Antioxidant systems and anoxia tolerance in a freshwater turtle, *Trachemys scripta elegans*. Mol. Cell. Biochem. 170, 177-185.

Zouros, E., Thiriot-Quiévreux, C., Kotoulas, G., 1996. The negative correlation between somatic aneuploidy and growth in the oyster *Crassostrea gigas* and implications for the effects of induced polyploidization. Genetic Research 68, 109-116.

Zurburg, W., Smaal, A., Héral, M., Dankers, N., 1994. Seston dynamics and bivalve feeding in the bay of Marennes-Oléron (France). Neth. J. Aquat. Ecol. 28, 459-466.

*Impression : Service IDM/RIC*
*IFREMER – Centre de Brest*
*BP 70 – 29280 Plouzané*
*Tél. : 02 98 22 43 53*