

Proposition d'un programme de surveillance (biomonitoring) pour la Réserve Naturelle de la baie de Saint-Brieuc



Claudie LE GOFF

Laurent DABOUINEAU



U.C.O. Bretagne Nord
Campus de la Tour d'Auvergne BP90431
22200 Guingamp
02.96.44.46.46



Réserve Naturelle
BAIE DE SAINT-BRIEUC

Site de l'étoile
22120 Hillion
02.96.32.31.40

Octobre 2009

Remerciements

Nous tenons à remercier :

Catherine Moureyrac pour son regard critique sur les biomarqueurs pertinents.

Alain Ponsero pour nous avoir confié cette étude et pour les discussions enthousiastes autour de ce projet.

Alise Ponsero et Antoine Dujon pour leur aide technique lors de prélèvements sur le terrain ainsi que lors d'évaluation technique de certains biomarqueurs au laboratoire de l'UCO.

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
1. BIOMARQUEURS	4
1.1. Biomarqueurs reconnus (Core biomarkers).....	4
1.1.1. Activité Acétylcholinestérase (AChE)	4
1.1.2. Activité des glutathion S-tranférases (GSTs)	5
1.1.3. Activité EROD (EthoxyRésorufine-O-Dééthylase)	5
1.1.4. Activité Catlase (CAT).....	5
1.1.5. Substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS)	6
1.1.6. Test Comet.....	6
1.1.7. Métallothionéines (MT).....	6
1.1.8. Immunotoxicité	6
1.1.9. Embryotoxicologie	7
1.1.10. Indices biologiques	7
1.1.11. Dosages des réserves énergétiques	7
1.2. Pour évaluer quels types de pollutions	8
1.2.1. Bassin versant du Gouessant.....	8
1.2.2. Bassin versant de l'Urne.....	9
1.2.3. Bassin versant du Gouët	10
1.3. Choix des modèles biologiques, des biomarqueurs pertinents et plan d'échantillonnage	11
1.3.1. Modèles biologiques.....	11
1.3.2. Méthodes et échantillonnage	12
1.3.3. Fréquence des prélèvements et sites d'étude:	13
2. PARASITISME.....	15
2.1. Indicateur de quoi ?.....	16
2.2. Proposition d'étude pour la Baie de Saint Brieuc	18
2.2.1. Analyse des communautés.....	18
2.2.2. Analyse de certaines populations cibles	19
CONCLUSION	21
ANNEXE 1 : Activité Acétylcholinestérase	23
ANNEXE 2 : Activité Glutathion S transférase.....	25
ANNEXE 3 : Test Comet	26
ANNEXE 4 : Embryotoxicologie	29
BIBLIOGRAPHIE	30

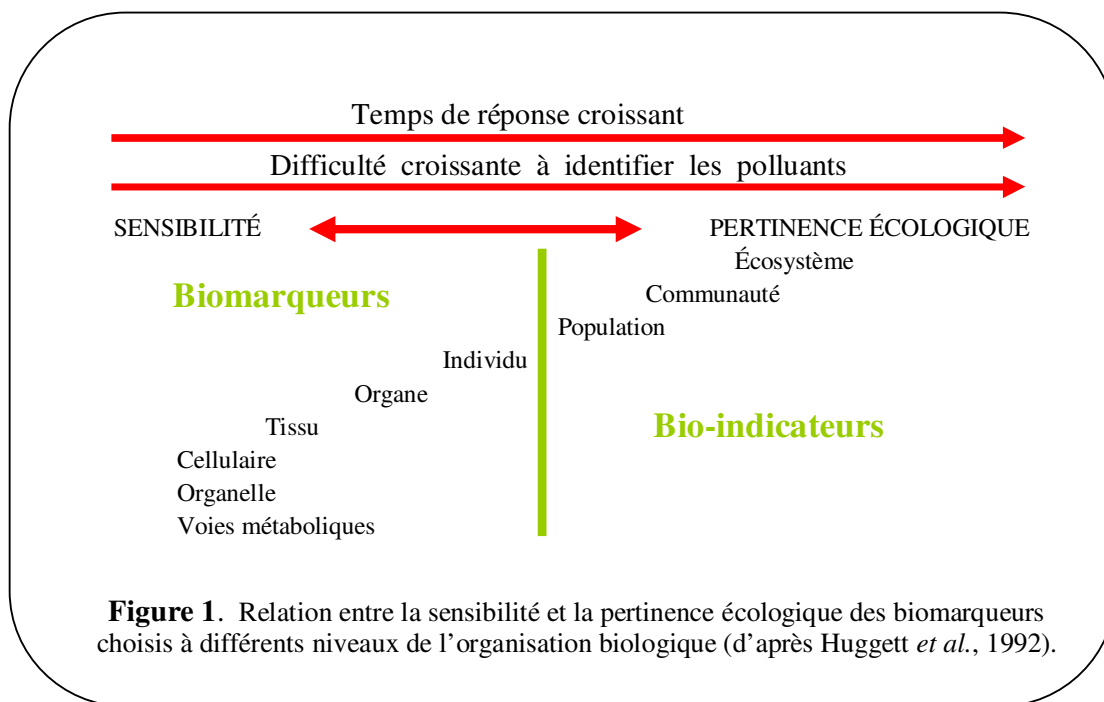
INTRODUCTION

Les études scientifiques constituent un outil indispensable pour une politique à la fois de protection et de gestion du littoral. Dans le cas de la Baie de Saint-Brieuc, l'étude des peuplements benthiques du fond de Baie est fondamentale pour en caractériser « l'état de santé », mais aussi pour estimer les ressources trophiques disponibles pour les producteurs secondaires et les prédateurs tels que les oiseaux. En effet, le fait que le benthos soit à la base de nombreuses chaînes alimentaires et la relative sédentarité des espèces endogées font de ces peuplements de bons indicateurs de l'état d'un écosystème. Leur caractérisation doit permettre aux gestionnaires de cette zone littorale de déterminer le degré de dégradation ou de remédiation éventuelle du site.

La réponse des communautés benthiques aux perturbations limitées mais chroniques peut être différée et révèle l'état de santé global d'un écosystème. Il est donc impératif de mener des recherches pluridisciplinaires pour appréhender les conséquences de pollutions diffuses à un niveau fin de la biologie des espèces. Le plan de gestion 2009-2013 de la Réserve Naturelle, dans son chapitre sur les objectifs liés aux acquisitions de connaissances, propose de « développer les connaissances sur les méthodologies d'analyse des perturbations anthropiques des écosystèmes. Avec la mise en place du Schéma d'Aménagement et de Gestion des Eaux (SAGE) en Baie de Saint-Brieuc, la Réserve Naturelle a pour objectif à court terme d'établir un diagnostic écologique et de développer des outils de suivi de la qualité biologique des eaux et des indicateurs fiables, traduisant son état de santé » (Ponsero *et al.*, 2008). C'est dans ce contexte que les gestionnaires de la Réserve Naturelle nous ont confié une étude portant sur la pertinence de mesures d'indicateurs biologiques (biomarqueurs ou bioindicateurs).

Les indicateurs de perturbation du milieu peuvent être considérés à différents niveaux de l'organisation biologique, allant du niveau le plus fin (niveau moléculaire), et par conséquent le plus sensible, au niveau le plus représentatif du point de vue écologique, car il révèle les modifications aux niveaux les plus élevés des structures de la communauté. Chaque niveau d'observation présente donc des points faibles et des avantages quant au diagnostic global. Ainsi, une étude portant sur l'observation d'indicateurs au niveau de la communauté montre souvent une irréversibilité des dommages et une impossibilité de prise de décision

quant à une éventuelle gestion. A l'inverse, des activités enzymatiques et d'autres composants sub-cellulaires sont communément utilisés comme biomarqueurs (Jemec *et al.*, 2009) car ils ont la capacité d'identifier les mécanismes potentiellement responsables d'effet à des niveaux d'organisation plus élevés, ce qui en a fait des outils prometteurs pour des applications en écotoxicologie (Figure 1).



Les mélanges complexes de contaminants présents sur les zones côtières et estuariennes recèlent des substances pour lesquelles des analyses chimiques ne sont pas encore disponibles, sont encore coûteuses ou nécessitent du matériel de précision. Il existe donc un besoin de développer des stratégies permettant d'estimer si un milieu donné est en état de stress dû à des pollutions ou non. Dans ce cas, comme le montrent des études depuis 30 ans, l'approche par une batterie de biomarqueurs semble être la plus efficace dans l'estimation de l'action de ces mélanges complexes de polluants et l'évaluation de l'état de santé de l'écosystème (Amiard & Amiard-Triquet, 2008 ; Jha, 2008 ; Ait Alla *et al.*, 2006). En effet, la mesure d'une batterie de variables biologiques est nécessaire car il n'existe pas de biomarqueur idéal, ni informatif sur toutes les molécules chimiques, ni prédictif quant aux effets à tous les niveaux d'intégration biologique (Flammarion *et al.*, 2000). Ainsi, le couplage de différents types de biomarqueurs entre eux lors d'une étude permet d'avoir une meilleure vue d'ensemble de l'impact d'une pollution sur un écosystème (Amiard-Triquet & Rainbow, 2009 ; Jha, 2008). Contrairement à une donnée chimique, la réponse faite par les biomarqueurs traduit l'état de santé physiologique réel dans lequel se trouve l'organisme étudié, que ce soit au niveau moléculaire, cellulaire ou individuel de l'organisation biologique (Amiard-Triquet & Amiard, 2008).

C'est pourquoi cette approche a été privilégiée au cours de ce travail, dont l'objectif est de recenser la batterie de biomarqueurs qui serait la plus pertinente dans le contexte de la Baie de Saint-Brieuc. Les réponses complémentaires de ces biomarqueurs pourront servir à la prise de décisions par les gestionnaires de la Réserve de la Baie de Saint-Brieuc. Ainsi, dans un premier chapitre nous évoquerons différents biomarqueurs susceptibles d'être employés, avec une proposition de plan d'expérience envisageable. D'autre part nous avons souhaité proposer aux gestionnaires dans le cadre de ce monitoring d'utiliser en complément le parasitisme comme bioindicateur. Nous analyserons donc dans un deuxième chapitre la façon dont le parasitisme peut être un bioindicateur intégratif et pertinent dans le contexte de la Réserve. Enfin, nous concluons sur l'intérêt d'employer une batterie d'indicateurs aux différents niveaux d'intégration du vivant en complément des études déjà effectuées par les gestionnaires de la Réserve.

1. BIOMARQUEURS

1.1. Biomarqueurs reconnus (Core biomarkers)

Depledge donne en 1993 une définition générale d'un biomarqueur comme étant « un changement biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental qui peut être mesuré dans des tissus ou des fluides corporels ou au niveau de l'organisme entier qui met en évidence l'exposition à/ou les effets d'un ou plusieurs polluants chimiques. »

Parmi les biomarqueurs, De Lafontaine *et al.* (2000) ont identifié différentes catégories, reconnaissant ainsi les biomarqueurs de défense et les biomarqueurs de dommage. Les **biomarqueurs de défense** sont des activités de détoxification de xénobiotiques. Ces mécanismes ont potentiellement un impact positif sur la santé des organismes, dans la mesure où ils vont leur permettre de faire face et de survivre dans des zones contaminées. Les **biomarqueurs de dommage** quant à eux vont révéler une atteinte plus ou moins importante du métabolisme des organismes, pouvant les affecter dans leur capacité à se reproduire, voire à survivre.

Plusieurs biomarqueurs, de défense ou de dommage, entrant dans la catégorie des « core biomarkers », c'est-à-dire ceux qui ont fait l'objet à la fois d'une validation en laboratoire et sur le terrain (Amiard & Amiard-Triquet, 2008), sont intéressants dans le cadre de la mise en place d'un biomonitoring en Baie de Saint-Brieuc.

1.1.1. *Activité Acétylcholinestérase (AChE)*

L'activité des cholinestérases entre dans la catégorie des biomarqueurs de dommage. L'AChE étant une enzyme essentielle à la transmission correcte des informations nerveuses, leur inhibition est utilisée depuis des décennies en médecine humaine en tant qu'indice d'exposition aux neurotoxiques.

Pour cela, c'est un des premiers biomarqueurs qui fut proposé en surveillance. En effet, il apparaît pour de nombreux auteurs que la mesure de l'activité de l'acétylcholinestérase est le meilleur révélateur de contamination du milieu, notamment du milieu marin, par les pesticides organophosphorés et les carbamates (Galgani & Bocquéné, 1990 ; Amiard & Amiard-Triquet, 2008), composés qui se retrouvent dans le contexte écologique de la Baie de Saint-Brieuc.

Toutefois, d'autres contaminants (métaux lourds, détergents, toxines algales) peuvent également jouer sur l'inhibition de l'AChE, de même que l'amplitude de la réponse des organismes à l'exposition aux inhibiteurs est fonction de l'espèce animale (Bocquéné & Galgani, 2004). L'activité de cette enzyme reflète l'état de stress général de l'organisme ainsi que la neurotoxicité des xénobiotiques. Le protocole est détaillé en ANNEXE 1.

1.1.2. *Activité des glutathion S-tranférases (GSTs)*

Les Glutathion S-Tranférases sont une famille de multi-enzymes impliquées dans la phase II des processus de détoxification de xénobiotiques. Les réactions de phase II consistent à lier les métabolites à des composés hydrosolubles, augmentant ainsi l'hydrophilie des contaminants, et, de fait, leur taux d'excrétion (Bocquené *et al.*, 2004). Les GSTs augmentent le taux de conjugaison du glutathion par une déprotonation de la GSH, ce qui en fait un biomarqueur de défense. En effet, ces enzymes de biotransformation permettent la survie d'espèces dans un milieu détérioré. Les produits de conjugaison formés dans le foie peuvent être excrétés intacts dans la bile (chez les vertébrés), ou bien ils peuvent ensuite être métabolisés en acides mercapturiques et excrétés dans l'urine (Pecore, 2001).

La mesure de leur activité est la plus utilisée pour la détection de substances organiques (pesticides organochlorés et PCBs), en particulier chez les invertébrés, pour lesquels l'activité de l'enzyme EROD (éthoxyrésorufine-*O*-dééthylase), autre biomarqueur de défense, ne peut pas être mesurée (Amiard & Amiard-Triquet, 2008). Cette enzyme joue également un rôle dans la protection cellulaire contre le stress oxydatif (Durou *et al.*, 2007 (a)). Le protocole est détaillé en ANNEXE 2.

1.1.3. *Activité EROD (EthoxyRésorufine-O-Dééthylase)*

L'activité EROD est le biomarqueur le plus étudié jusqu'à présent chez le poisson et est celui qui a eu le premier une « audience internationale » (Amiard & Amiard-Triquet, 2008).

L'activité de cette enzyme mono-oxygénase permet la biotransformation de polluants majeurs hydrophobes (HAPs, PCBs, organochlorés, dioxines) en composés hydrosolubles. Il s'agit donc d'un biomarqueur de défense car elle limite les interactions des polluants avec les composants cellulaires, interactions qui pourraient s'avérer dangereuses pour la survie de l'organisme. Son induction est catalysée spécifiquement par le cytochrome P450 1A, particulièrement au niveau du foie des animaux (Flammarion *et al.*, 2000). Ce biomarqueur est davantage utilisé chez les poissons que chez les invertébrés, pour qui les réponses aux xénobiotiques ne sont pas satisfaisantes.

1.1.4. *Activité Catalase (CAT)*

La catalase est une enzyme largement distribuée dans la nature puisqu'on la retrouve aussi bien chez les microorganismes aérobies, que dans les plantes ou les cellules animales. Son activité traduit une biotransformation des polluants, mais également une lutte contre un stress oxydant, conjointement à la GST. En effet, l'une de ses multiples fonctions physiologiques consiste à réguler les niveaux d'H₂O₂ en le décomposant en H₂O et O₂. Ceci explique qu'elle soit utilisée comme marqueur impliqué dans la défense primaire contre les dommages oxydatifs (Pellerin-Massicote, 1997).

Ainsi, l'activité catalase peut être évaluée en suivant la décomposition de H_2O_2 par spectrophotométrie à 240 nm, à une température recommandée de 20°C, les températures plus élevées pouvant inhiber la CAT, à pH 7 (Aebi, 1983). Sa détermination est directement liée à une diminution de l'absorbance de l'échantillon.

1.1.5. *Substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS)*

Les marqueurs de stress oxydatif que sont les acides thiobarbituriques, nommés TBARS, reflètent le stade de peroxydation des lipides membranaires. Ils traduisent le taux de malonaldehydes libres, qui correspondent au plus étudié et au majeur produit de dégradation des acides gras polyinsaturés, (Amiard & Amiard-Triquet, 2008). Ait Alla *et al.* (2006) ont montré que les niveaux de peroxydation lipidique en milieu marin peuvent être soumis à l'action de polluants environnementaux de différentes natures.

La détermination des valeurs de TBARS se fait par HPLC, selon la méthode décrite par Csallany *et al.* (1984). Ce marqueur de dommage est surtout utilisé chez de nombreuses espèces d'invertébrés et de vertébrés marins, mais aussi chez des espèces dulçaquicoles.

1.1.6. *Test Comet*

Les apports anthropiques entraînent chez les organismes des dysfonctionnements cellulaires et des dommages à l'ADN. Le test Comet en conditions alcalines, ou SCGE (Single Cell Gel Electrophoresis) est une technique quantitative rapide et visuelle permettant la détection des cassures simple et double brin ainsi que des sites alcali-labiles de l'ADN des cellules eucaryotes (Amiard & Amiard-Triquet, 2008). Cela traduit la réponse de l'organisme face aux messages reçus de son environnement, faisant du test Comet un biomarqueur de dommage. Le protocole est détaillé en ANNEXE 3.

1.1.7. *Métallothionéines (MT)*

Les métallothionéines sont des protéines de stress de faible poids moléculaire que l'on trouve dans le cytosol.

Elles révèlent une exposition des organismes aux métaux. Ces biomarqueurs ont été mis en place récemment. Les études menées *in situ* ou en laboratoire ont montré qu'elles sont induites par une contamination métallique dans de nombreux taxons, dont les mammifères, les poissons et les invertébrés marins (Geffard *et al.*, 2002).

1.1.8. *Immunotoxicité*

L'état général du système immunitaire peut être évalué, notamment par le biais de l'observation de plusieurs immuno-pathologies ou la mesure de paramètres de l'immunocompétence. Ainsi, l'altération du nombre total d'hémocytes, la stabilité lysosomale et la phagocytose sont autant d'effets pouvant être mis en évidence dans des sites pollués. Ils

suggèrent des conditions immuno-répressives, notamment chez les moules (Auffret *et al.*, 2005) induites par des contaminants chimiques.

1.1.9. *Embryotoxicologie*

Les mécanismes du cycle cellulaire sont largement conservés dans l'organisation biologique, des cellules unicellulaires eucaryotes aux métazoaires complexes, dont les hommes font partie. Des anomalies dans la régulation du cycle cellulaire conduisent les individus à la mort, ou à des maladies graves comme le cancer.

Le développement larvaire des oursins est connu pour être un bon modèle, simple, permettant les études de divisions cellulaires (Marc *et al.*, 2002 ; Marc *et al.*, 2003 ; Marc *et al.*, 2004). La quantification des anomalies de développement de la larve *pluteus* d'oursin constitue le biomarqueur d'embryotoxicité. Le protocole est détaillé en ANNEXE 4.

1.1.10. *Indices biologiques*

Les indices biologiques que sont l'indice de condition (IC), l'indice Gonado-Somatique (IGS) et l'indice Hépat-Somatique (IHS) sont d'un intérêt non négligeable car ils permettent d'obtenir des informations complémentaires révélant la condition générale des animaux étudiés. Ils possèdent un intérêt intégratif.

Pour ce qui est de bivalves, après avoir ôté les coquilles, l'IC ([poids total des tissus frais / poids total]) (Mouneyrac *et al.*, 2008), est calculé pour chaque individu.

Chez les poissons, l'IC ([poids total des tissus frais / volume ou longueur]), l'IGS ([poids humide des gonades / poids total éviscéré] * 100) et l'IHS ([poids humide de l'hépatopancréas / poids total éviscéré] * 100) (Gómez-Márquez *et al.*, 2008) sont calculés pour chaque individu.

1.1.11. *Dosages des réserves énergétiques*

De nombreux stress pouvant entraîner la mobilisation des réserves énergétiques, il est intéressant de pouvoir doser les lipides totaux et le glycogène. En effet, lorsque l'assimilation d'énergie est supérieure à la demande, elle se trouve stockée sous forme de lipides et/ou de glucides. Ce sont ces deux types de réserves qui seront utilisées en premier par l'organisme, les protéines ne servant de sources d'énergie qu'en cas de stress grave (Amiard & Amiard-Triquet, 2008).

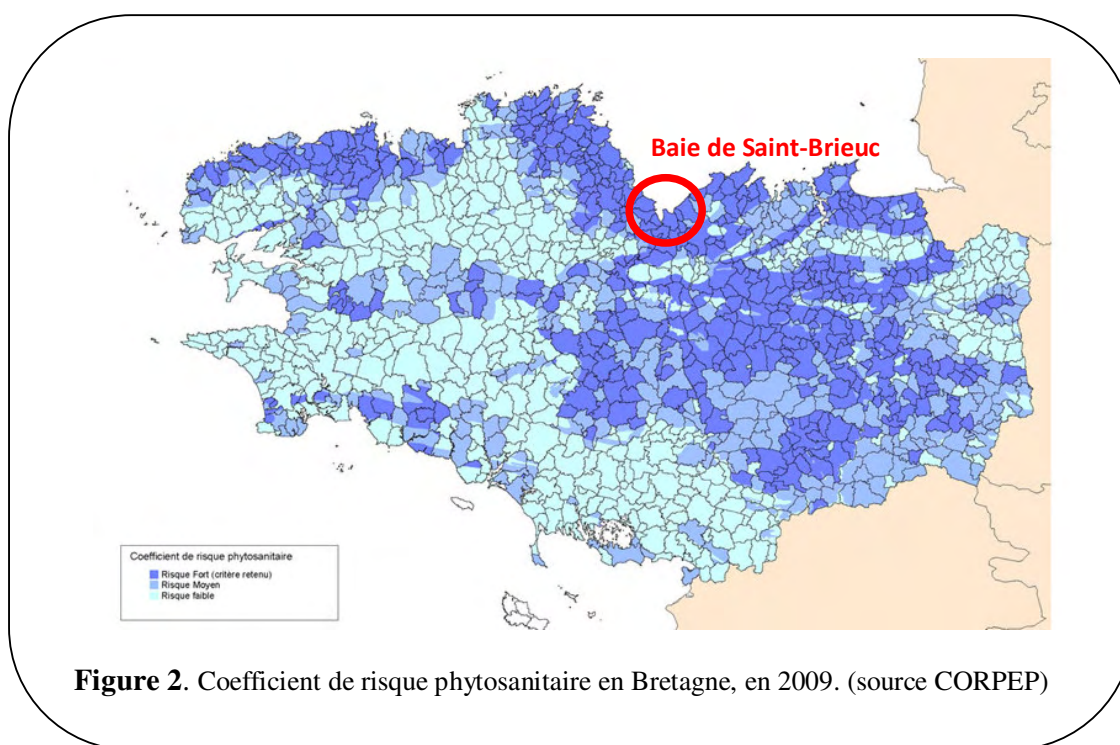
Le dosage des lipides totaux est réalisé selon la technique élaborée par Frings *et al.* (1972). Il s'agit d'un dosage colorimétrique, pour des concentrations en lipides allant de 0 à 10 mg/ml.

Le glycogène est dosé selon la méthode décrite par Scott & Neff (1984). Il s'agit également d'une réaction colorimétrique, par oxydation du glucose. Le glucose est dosé dans l'homogénat et dans une partie de l'homogénat soumis à l'action d'une amyloglucosidase.

1.2. Pour évaluer quels types de pollutions

On sait que la toxicité due aux polluants se manifeste d'abord au niveau subcellulaire avant d'être observée aux niveaux individuels ou populationnels. L'utilisation pertinente des biomarqueurs repose donc sur leur faisabilité dans le cadre d'études *in situ*, ainsi que sur une bonne connaissance des risques de contamination encourus par l'écosystème étudié (Flammarion *et al.*, 2000).

Il se trouve que la Réserve de la Baie de Saint-Brieuc est le réceptacle de divers types de pollutions, qu'elles soient d'origine industrielle ou urbaine. Mais ce qui caractérise particulièrement les bassins versants de la Baie de Saint-Brieuc est une très forte pression agricole (Figure 2), ce qui se répercute sur la qualité des eaux de surface.



1.2.1. Bassin versant du Gouessant

L'anse de Morieux est l'une des trois entités sous l'influence d'un fleuve côtier : le Gouessant. Il prend sa source à 307 m d'altitude sur la commune de Trebry, parcourt 48 km avant de se déverser dans l'anse de Morieux. Il draine les eaux d'un bassin versant d'environ 426 km².

Le débit moyen du Gouessant, relevé par la Cellule Qualité des Eaux Littorales (CQEL) de la Direction Départementale des Côtes d'Armor (DDE22), sur une période de 10 ans au niveau du barrage de Pont Rolland, est de 1,752 m³/s.

Le bassin versant du Gouessant subit l'influence de l'élevage intensif, en particulier celui de l'élevage porcin hors sol. En effet, la région aval de Lamballe est la région de France où la densité de porcs d'élevage est la plus forte. Par ailleurs, la ville elle-même est le siège de plusieurs établissements agroalimentaires importants, dont le premier abattoir de porcs français. D'autre part, le Gouessant reçoit les effluents de la station d'épuration de la ville de Lamballe, d'une capacité de 100 000 équivalents-habitants (Lagarde, 2002).

Ce paysage, très marqué par l'agriculture intensive, dominée par la culture du maïs, du blé et l'industrie agroalimentaire impacte donc en divers polluants le fond de l'anse de Morieux. L'épandage hivernal de lisier quand à lui, est à l'origine d'apports importants de matières organiques et de nutriments dans le milieu marin, dont l'une des conséquences est la multiplication des marées vertes (concentrations en azote dissous supérieures à 150 µmol.L⁻¹ en 2006 CEVA). Les produits issus de la décomposition des algues échouées constituent une source de méthane, d'hydrogène sulfuré, d'ammoniac... pouvant impacter sérieusement les organismes benthiques en provoquant un stress oxydatif.

1.2.2. *Bassin versant de l'Urne*

La rivière de l'Urne se déverse au fond de l'anse d'Yffiniac. Cette rivière, longue de 30 km, prend sa source à 220 m d'altitude et a une pente moyenne de 7,5‰. L'Urne draine un bassin versant d'environ 118 km² (SOGREAH, 2008).

Le bassin versant de l'Urne est une zone d'agriculture intensive et de maraîchage. Quelques industries agroalimentaires y sont également représentées. De plus, les villes de Plaintel (3700 habitants), Plédran (5600 habitants), Trégueux (7200 habitants) et d'Yffiniac (4500 habitants) impactent la qualité des eaux de l'Urne d'amont en aval, la station d'épuration mixte d'Yffiniac rejetant ses effluents dans l'Urne (Lagarde, 2002).

Le débit moyen, relevé par la CQEL de la DDE22 sur une période de 10 ans au niveau de la filière de l'Urne, est de 0,714 m³/s.

L'Urne est donc sujette à des pollutions en matières nutritives (plus de 150 µmol.L⁻¹ d'azote dissous en 2006), bactériologiques (7.10³E.Coli/100ml en moyenne géométrique des résultats entre 2000 et 2006 selon SOGREAH, 2008) et aux pesticides issus de l'agriculture.

1.2.3. *Bassin versant du Gouët*

Le port du Légué, à la sortie de la ville de Saint-Brieuc est l'exutoire du Gouët, rivière de 50 km de long, qui prend sa source à 255 m d'altitude sur la commune du Haut Corlay et draine un bassin versant de 250 km². Sa pente moyenne est d'environ 5‰.

Le Gouët, sur ses 20 premiers kilomètres est un ruisseau qui reçoit quelques petits affluents. Par la suite, la vallée s'encaisse et s'élargit progressivement pour finir en forme de « U » au niveau du barrage de Saint-Barthélemy. Cette retenue d'eau possède une superficie de 85 ha et a une tendance à l'eutrophisation. A l'aval du barrage, le Gouët reçoit son dernier affluent, le Gouédic, sur la commune de Saint-Brieuc, avant de pénétrer dans l'estuaire, linéaire sur 5 km (SOGREAH, 2008).

Le débit moyen du Gouët, relevé par la CQEL de la DDE22 sur une période de 10 ans au niveau du déversoir du port du Légué, est de 2,042 m³/s.

Ce bassin versant est impacté de différentes manières. En effet, une agriculture intensive est pratiquée sur l'ensemble du bassin versant, excepté à l'approche du barrage de Saint-Barthélemy, où des périmètres de protection sont mis en place afin de préserver la réserve en eau. Sur le cours moyen du Gouët se situe la ville de Quintin (2600 habitants) qui possède une station mixte, c'est-à-dire qu'elle reçoit non seulement des effluents domestiques, mais également ceux provenant d'industries agroalimentaires (abattoir et laiterie). Par la suite, les rejets de 3 villages, allant de 800 à 1700 habitants, ainsi que les rejets d'une pisciculture et d'une carrière se rencontrent. Les effluents de la station d'épuration de la ville de Saint-Brieuc, d'une capacité d'environ 110 000 équivalent-habitants sont rejetés dans le Gouédic. Cette station est elle aussi mixte, recevant par conséquent les effluents des nombreux établissements agroalimentaires de Saint-Brieuc (pour une valeur de 40 000 équivalent-habitants) et les effluents urbains générés par l'agglomération (Lagarde, 2002).

Par ailleurs, la ville de Saint-Brieuc possède une activité portuaire. En effet, le port du Légué représente le principal port de commerce des Côtes d'Armor (371 395 tonnes de marchandises en 2008). C'est également un port de plaisance (230 places pour des bateaux de plaisance pouvant atteindre les 18 mètres) et un site de réparation navale, comportant une aire de carénage de 8 à 10 places et une cabine de peinture. Un projet de mise à flot du port du Légué est actuellement à l'étude. Les travaux, potentiellement entrepris après 2010, devraient permettre d'accueillir des navires plus importants et d'augmenter le trafic.

Le Gouët est donc soumis à des pollutions d'origine agricole, urbaine, portuaire et agroalimentaire, ce qui se traduit par des flux de matière organique, de bactéries ($2,5 \cdot 10^4$ E.Coli/100ml en moyenne géométrique pour la période allant de 2000 à 2006, SOGREAH, 2008), de matières nutritives (nitrates, ammonium et phosphates), de pesticides et divers hydrocarbures et peintures antisalissure.

1.3. Choix des modèles biologiques, des biomarqueurs pertinents et plan d'échantillonnage

L'essentiel des contaminants de l'environnement aquatique induits par les activités humaines se retrouvent dans les sédiments. Pour être le plus pertinent possible, le biomonitoring doit donc s'orienter vers l'utilisation de modèles biologiques les plus représentatifs de ce compartiment (Durou *et al.*, 2007 (a)).

C'est dans cette optique que 5 espèces benthiques ont été retenues pour faire l'objet du monitoring en Baie de Saint-Brieuc. Après une première série d'essais (étude préliminaire), 3 d'entre elles seront retenues pour le suivi à long terme afin d'en diminuer les coûts. Trois mollusques bivalves sont pertinents dans le contexte (*Scrobicularia plana*, *Cerastoderma edule* et *Mytilus edulis*), un annélide polychète (*Nereis diversicolor*), et un poisson benthique (*Pomatoschistus microps*). De plus, ces espèces ont déjà fait l'objet de diverses études de biomarqueurs (Durou *et al.*, 2007 (a) ; Durou & Mouneyrac, 2007 (b) ; Durou *et al.*, 2007 (b) ; Durou *et al.*, 2008 ; Mouneyrac *et al.*, 2008 ; Bergayou *et al.*, 2009 ; Bocquené *et al.*, 2004 (b) ; Vieira *et al.*, 2008).

1.3.1. Modèles biologiques

1.3.1.1. *Scrobicularia plana*

Le mollusque bivalve *S. plana* est une espèce benthique intertidale qui vit enfouie dans les sédiments, et que l'on retrouve des côtes africaines du Sénégal jusqu'en Scandinavie. Son régime alimentaire de dépositivore fait que la scrobiculaire est en contact direct avec les particules sédimentaires et en fait donc un indicateur approprié des associations sédiments-polluants, en particulier en ce qui concerne les métaux et certains perturbateurs endocriniens. Enfin, *S. plana* entre pour une grande part dans le régime alimentaire d'oiseaux limicoles, de crabes et de poissons benthiques (Hughes, 1969). Il apparaît donc que cette espèce est d'importance au niveau des écosystèmes marins côtiers, ce qui justifie aussi ce choix.

1.3.1.2. *Cerastoderma edule*

La coque (*C. edule*) est un mollusque bivalve fouisseur, intertidal, affectionnant particulièrement les estuaires et les zones sableuses. Sa répartition est large car elle est présente principalement du Sénégal jusqu'en Norvège. C'est le mollusque bivalve le plus abondant des baies et des estuaires en Europe (Rueda *et al.*, 2005 ; Beukema & Dekker, 2006 ; Kater *et al.*, 2006). Elle vit de façon grégaire, ce qui explique le fait que les densités peuvent varier de 0 à 2750 individus/m² (Ponsero *et al.*, 2009). Du fait de son mode d'alimentation, suspensivore actif, la coque filtre et retient le phytoplancton, le zooplancton et les particules organiques. De plus, comme la scrobiculaire, elle fait partie du régime alimentaire de nombreux poissons benthiques et d'oiseaux marins, ce qui explique son intérêt écologique. Enfin, grâce au suivi annuel du gisement en Baie de Saint-Brieuc réalisé depuis 2001 par la Réserve Naturelle, on a une très bonne connaissance de l'évolution de nombreux paramètres

populationnels (répartition spatiale, densités, recrutement, mortalité, production...), autant d'éléments très utiles à l'interprétation des biomarqueurs.

1.3.1.3. *Nereis diversicolor*

De nombreuses études ont montré que l'annélide polychète *N. diversicolor* est un bon candidat pour l'utilisation de biomarqueurs. En effet, il s'agit d'un vers fouisseur que l'on retrouve sur les côtes et dans les estuaires, du Maroc jusqu'en Scandinavie (Gillet & Torresani, 2003), à des densités variant de 35 à 3700 individus/m² (Scaps, 2002) et dont la biologie est abondamment documentée. La bioturbation qu'entraîne cet annélide affecte grandement les cycles biogéochimiques des polluants et des nutriments. De plus, cet espèce représente une importante source alimentaire, tant chez des espèces de poissons que d'oiseaux. Tous ces éléments en font une espèce clé dans le fonctionnement des écosystèmes côtiers et estuariens (Durou *et al.*, 2007 (a) ; Durou *et al.*, 2008).

1.3.1.4. *Mytilus edulis*

La moule est utilisée comme indicateur d'accumulation par IFREMER notamment dans le cadre du Réseau National d'Observation. Elle semble pertinente dans le suivi de biomarqueurs des pollutions par des métaux (Geffard *et al.*, 2005) et d'autres pollutions chimiques (Damiens *et al.*, 2007 ; Baussant *et al.*, 2009). Sa position sur l'estran rocheux en médiolittoral supérieur en fond de baie la distingue des 3 autres espèces fouisseuses et la rend pertinente dans ce type de monitoring.

1.3.1.5. *Pomatoschistus microps*

Le gobie tacheté est un poisson benthique très présent en Baie de Saint-Brieuc. On le trouvera notamment à toutes les saisons dans les filières à marée basse, et particulièrement au printemps et en été lors de la ponte. Elle représente une espèce de poisson facile d'accès et probablement impactée par les apports des fleuves côtiers. Il se nourrit de crustacés benthiques, mais aussi d'annélides (Le Mao, 1986 ; Pasquaud *et al.*, 2004) et même de très jeunes coques. Il est consommé par de nombreux prédateurs (oiseaux et poissons).

1.3.2. Méthodes et échantillonnage

Les prélèvements des espèces retenues sont à réaliser sur la zone intertidale, à marée basse. Les bivalves peuvent être prélevés à la main, dans des sédiments jusqu'à 20 cm de profondeur pour la scrobiculaire. Leur transport jusqu'au laboratoire s'effectue dans des bacs contenant de l'eau de mer provenant du site d'échantillonnage. On prélèvera 40 individus de tailles équivalentes (longueur des coquilles de *S. plana* variant de 30 à 35 mm ; longueur des coquilles de *C. edule* variant de 20 à 30 mm ; hauteur de la coquille de *M. edulis* de 40 à 50 mm).

Les vers sont prélevés doucement à la main afin d'éviter de les abîmer. Ils sont transportés au laboratoire dans des bacs contenant des algues humides (poids humide des *N. diversicolor* variant de 0,16 à 0,22 g).

Les gobies peuvent être prélevés directement dans les filières à marée basse au haveneau à mailles de 5 mm. De par leur durée de vie en Manche de 2 ans, la population est constituée de 2 cohortes (Bouchereau & Guelorget, 1998). Les mesures seront faites sur le groupe d'âge 1 an, où les individus seront de taille homogène (40 à 55mm). Les biomarqueurs pouvant être mesurés sur cette espèce sont : AChE, EROD, IC, indice gonadosomatique, Comet. L'indice hépatosomatique pour le gobie sera mis en relation avec l'infestation parasitaire du foie (cf. chapitre 2).

Taille optimale des échantillons par biomarqueur par site :

Espèce	IC IGS IHS	Glycogène Lipides	AChE	GST	EROD	Catalase	TBARS	Test Comet
<i>C. edule</i>	n = 100	n = 30	n = 30	n = 30		n = 30	n = 30	n = 12
<i>S. plana</i>	n = 100	n = 30	n = 30	n = 30		n = 30	n = 30	n = 12
<i>M. edulis</i>	n = 100	n = 30	n = 30	n = 30		n = 30	n = 30	n = 12
<i>N. diversicolor</i>	n = 100	n = 30	n = 30	n = 30		n = 30	n = 30	
<i>P. microps</i>	n = 100		n = 30		n = 30	n = 30	n = 30	n = 12

Trois biomarqueurs décrits plus haut n'ont pas été retenus pour différentes raisons :

- L'embryotoxicité pour des raisons de fiabilité
- Le dosage des métallothionéines du fait d'une problématique « métaux lourds » très limitée en Baie de Saint-Brieuc.
- Immunotoxicité ; si ce biomarqueur est retenu seul le LEMAR pourra le mettre en œuvre dans toute sa complexité.

1.3.3. *Fréquence des prélèvements et sites d'étude:*

Les prélèvements des espèces retenues sont à réaliser sur la zone intertidale 4 fois par an, ceci afin de tenir compte des fluctuations naturelles du biomarqueur lui-même en fonction de la saison.

Dans l'idéal, afin de suivre les impacts différentiels des 3 bassins versants (Gouet, Urne et Gouessant), 3 sites de prélèvements à la sortie des estuaires sont à envisager. Les sites de prélèvement pour une espèce donnée doivent être de même niveau bathymétrique et à une distance comparable de la filière.

Il est à noter qu'après la fermeture du port du Légué les scrobiculaires et *Nereis* ne pourront plus faire l'objet du monitoring pour le Gouet. En ce qui concerne le site en sortie du

Gouessant la densité et la taille des coques est variable en fonction des années. L'étude des biomarqueurs de coque pourra donc être suspendue les années à faible densité.

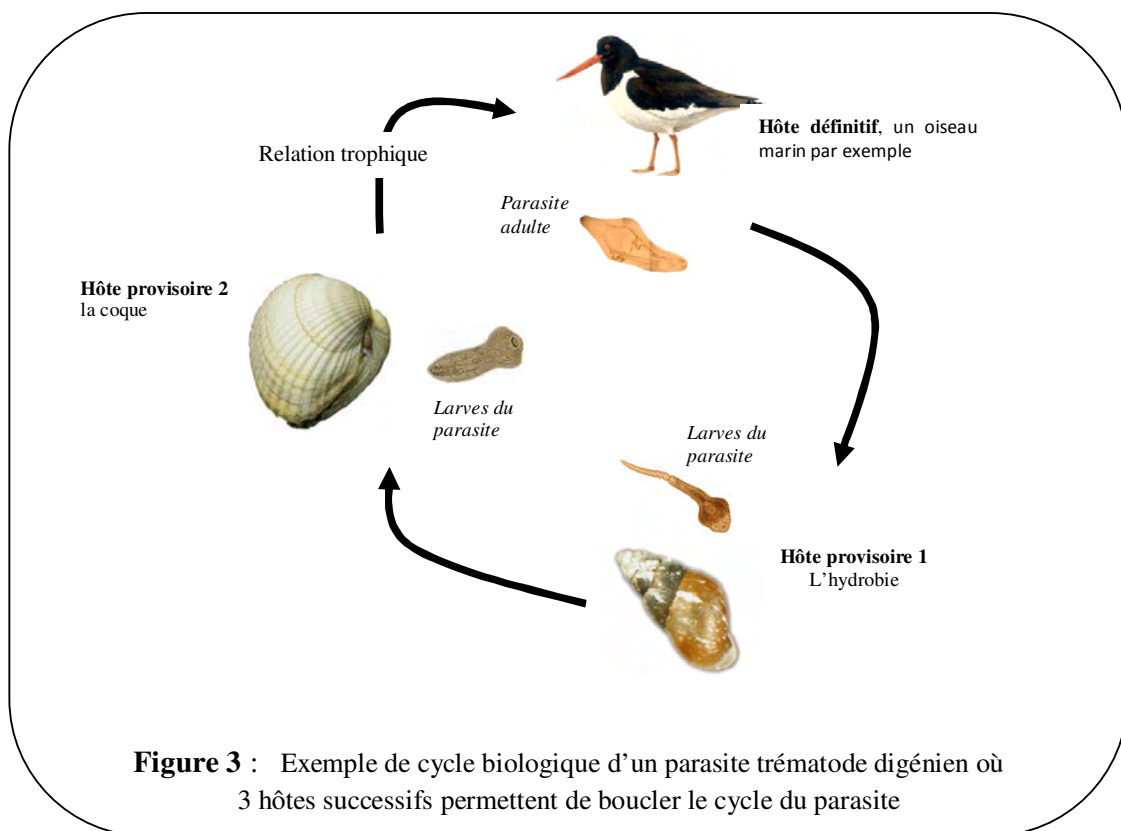
Compte tenu de ces deux dernières remarques, et en fonction de l'effort de surveillance souhaitée par les gestionnaires de la Réserve, et du nombre de biomarqueurs retenus, le monitoring pourrait être mené sur un seul site. Dans ce cas l'anse d'Yffiniac constitue le site le plus pertinent à retenir.

Un site de référence doit être retenu comme « site propre » afin de comparer les résultats obtenus. Il doit avoir certaines caractéristiques comme : être un fond de Baie, avoir la présence d'un estuaire, avoir la présence des espèces retenues, avoir des données de biomarqueurs d'études précédentes. Dans ce cadre nous avons retenu l'estuaire du Goyen, en Baie d'Audierne, qui a déjà fait l'objet d'études (Mouneyrac et al., 2009 in Press).

2. PARASITISME

Le parasitisme est considéré comme le mode de vie le plus commun puisque chaque organisme libre est l'hôte de plusieurs espèces qui vivent à ses dépens (Price, 1980). De par la difficulté d'étude de ces organismes, c'est un point jusque là négligé dans les études de fonctionnement des écosystèmes (Lafferty *et al.*, 2008).

Les parasites peuvent affecter les comportements, la physiologie, la morphologie ou la reproduction de leurs hôtes (Marcogliese, 2004). Au niveau de l'hôte, il y a donc un impact au niveau individuel et populationnel. Les macroparasites (les trématodes digéniens notamment) utilisent très souvent 3 hôtes et l'interaction trophique entre 2 hôtes pour la transmission des stades larvaires (Figure 3). Les parasites sont présents à tous les niveaux trophiques et donc dans tous les réseaux trophiques des écosystèmes marins (Marcogliese, 2003, 2004).



Chaque espèce de parasite reflète donc la présence de différents organismes qui participent à son cycle de vie. Le cortège de parasites présents chez une espèce (la coque par

exemple) est donc révélateur de la présence de nombreux organismes et de leurs relations trophiques (Marcogliese, 2005).

A cause de ces relations trophiques (entres hôtes) obligatoires pour le parasite, il peut fournir des informations sur l'écologie de ces hôtes. En effet, ces relations se sont mises en place selon un long processus de coévolution prédateurs/proies et hôtes/parasites et peuvent être considérées comme un révélateur d'une certaine stabilité de l'écosystème (George-Nascimento, 1987 ; Marcogliese & Cone, 1997). La stabilité des maladies parasitaires dépend donc de la stabilité et de la complexité des réseaux trophiques dans lesquels ils sont « véhiculés ». On considère d'une manière générale qu'un écosystème complexe supportera une communauté de parasites diversifiée (Hudson *et al.*, 2006).

Si une perturbation anthropique locale ou un changement global (température, acidification...) affecte les populations ou les communautés d'organismes, elle affectera donc la structure des réseaux trophiques. Les parasites peuvent donc être utilisés comme révélateurs de santé de l'écosystème (Marcogliese, 2005) et peuvent donc servir de bioindicateurs (Sures, 2004).

2.1. Indicateur de quoi ?

La réponse des parasites aux agents stressant est variable. Certaines espèces ont des stades de vie larvaires libres et pourront donc être affectés directement par des polluants. Ces polluants peuvent aussi atteindre certaines populations d'hôtes intermédiaires. On peut s'attendre dans ces deux cas à une diminution de la diversité ou de la prévalence des parasites. A contrario certains hôtes, affaiblis au niveau de leur système immunitaires ou perturbés dans leur comportements pourront entraîner une augmentation de la pression parasitaire (MacKenzie, 1999 ; Poulin, 1992 ; Overstreet, 1997 ; Lafferty, 1997).

La littérature récente sur l'interaction entre parasites et pollutions environnementales pointe un double intérêt à ce genre d'étude (Sures, 2004 ; Minguez *et al.*, 2009) :

1 - la présence de parasites chez les modèles biologiques utilisés en monitoring (bivalves, annélides) peut modifier la physiologie ou le comportement de l'hôte et donc interférer (en positif ou négatif) avec les réponses des biomarqueurs. Le suivi des parasites facilitera donc l'interprétation du monitoring.

2 - Les parasites eux-mêmes sont utilisés comme indicateurs d'effet ou d'accumulation

Interactions biomarqueurs/parasites :

Les espèces hôtes infestées de parasites peuvent réagir de différentes manières :

- Les parasites peuvent augmenter la susceptibilité aux polluants de l'hôte (Minguez *et al.*, 2009). Pour des poissons notamment, Sures (2004) et Marcogliese *et al.* (2005) observent un effet d'interaction des parasites sur les biomarqueurs biochimiques.
- D'autre part, la présence de polluants peut entraîner une fragilisation (immunologique notamment) favorisant les infestations parasitaires sans effet d'amplification des réponses des biomarqueurs au stress oxydatif par exemple.

Les parasites comme bioindicateurs :

Contrairement à ce qu'on pourrait penser sur l'état de santé d'un écosystème, la concentration en trématodes digéniens est en général plus élevée dans un écosystème en bonne santé. A contrario elle est souvent plus faible en dans les habitats dégradés (Hudson *et al.*, 2006).

Les parasites semblent donc constituer un bon moyen pour estimer l'état de santé d'un écosystème. Par exemple, en estuaire, l'abondance et la diversité en oiseaux est hautement corrélée à l'abondance et à la diversité en trématodes des gastéropodes qui servent de premier hôte intermédiaire pour ces parasites d'oiseau (Hechinger & Lafferty, 2005). Les trichodines (protozoaires) se transmettent directement et se reproduisent vite, ils ont tendance à proliférer si les conditions sont stressantes pour l'hôte (Yeomans *et al.*, 1997).

Lorsque les apports en contaminants sont modérés, l'étude de la richesse spécifique de la communauté de parasites sera peu informative en tant qu'indicateur de pollution. Dans ce cas, les paramètres devront être mesurés à un niveau populationnel (prévalence, intensité parasitaire, dynamique de la contamination, mortalité des formes larvaires...). Le choix des taxons étudiés a aussi son importance. Selon Lafferty (1997), les ciliés et les nématodes seraient plus sensibles à l'eutrophisation alors que les digéniens seraient plus sensibles aux métaux lourds, à l'acidification et aux autres perturbations humaines.

Indicateurs d'effets : on peut tester l'effet de toxiques sur les stades libres des parasites (miracidium ou cercaires) ou sur les phénomènes de transmission vers l'hôte aval. Ces effets auront pour conséquence une modification des communautés de parasites. L'analyse des modifications de ces communautés de parasites en lien direct avec des pollutions (revus par MacKenzie *et al.*, 1995) est pour l'instant pour certains auteurs peu révélateur (Sures, 2004). La raison est que les pollutions vont affecter aussi bien les cortèges de parasites (directement par mortalité des formes larvaires) mais surtout les populations des hôtes intermédiaires ou définitifs. La difficulté en surveillance réside alors dans l'évaluation du degré et de la nature de la pollution. Par contre, l'ensemble des auteurs (MacKenzie, 1999 ; Sures, 2004 ; Hudson *et al.*, 2006 ; Marcogliese, 2005) confirme qu'il s'agit d'un bon indicateur de perturbation des communautés.

Indicateur d'accumulation : certains organismes aquatiques vont concentrer les polluants dans leurs tissus et pourront éventuellement être considérés comme « organismes sentinelles ». Des études ont montré que les métaux lourds étaient souvent accumulés par les

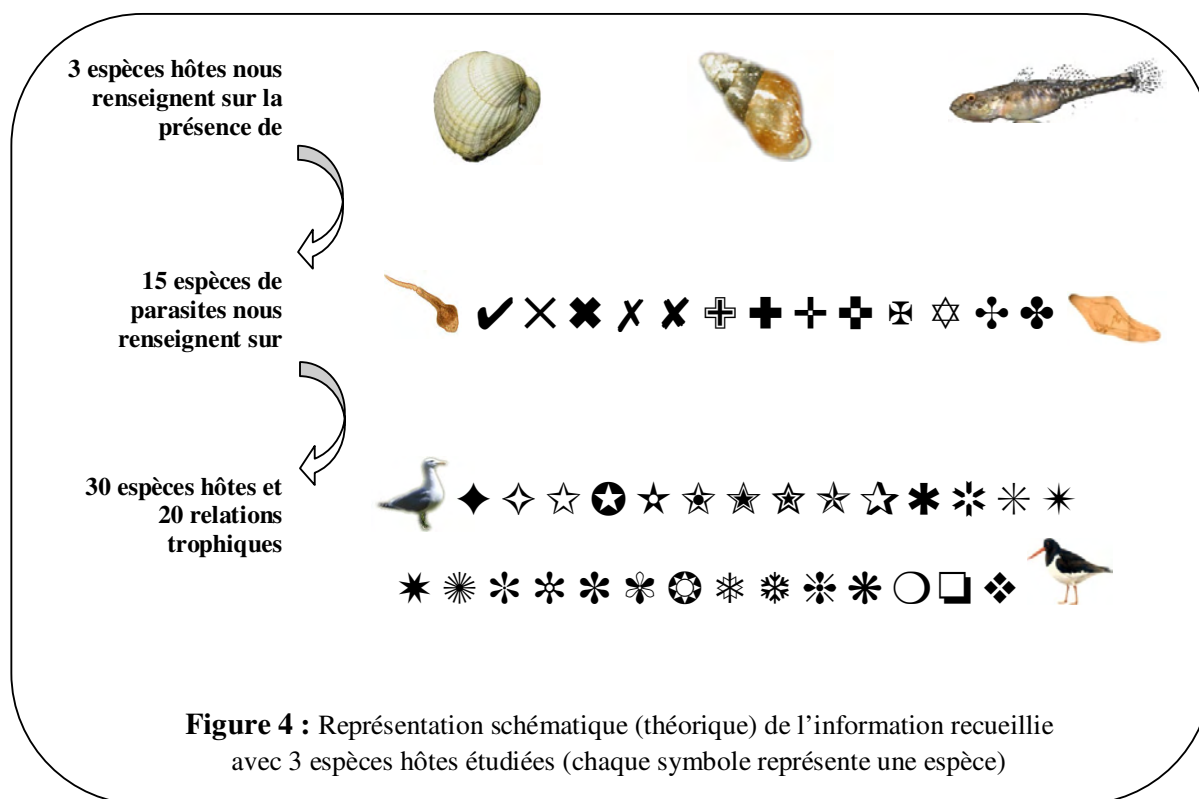
parasites (acanthocéphales particulièrement) dans des concentrations bien supérieures à celles de leur hôte. Cela n'a pas été montré pour des contaminants organiques pour l'instant. Actuellement, la problématique « métaux lourds » est limitée en Baie de Saint-Brieuc et rend cet indicateur non pertinent.

2.2. Proposition d'étude pour la Baie de Saint Brieuc

2.2.1. Analyse des communautés

Compte tenu de la complexité des cycles des parasites (3 hôtes pour les digéniens), en étudiant 3 espèces hôtes (par exemple la coque, l'hydrobie et le gobie, Figure 4), on aura une certaine représentation d'une part :

- de la diversité spécifique d'un nombre important de parasites (de l'ordre d'une quinzaine) et de leur stabilité dans le temps.
- de l'ensemble des hôtes de ces parasites (de l'ordre d'une trentaine d'espèces de mollusques ou vertébrés essentiellement) et de leur stabilité dans le temps.



Le choix des systèmes hôtes/parasites pertinent se fera par rapport aux critères suivants :

- Espèces hôtes intertidales et benthiques
- Espèces hôtes stables au niveau de la Baie de Saint-Brieuc

- Espèces hôtes faciles à collecter sans gros moyens (bateaux, filets...)
- Espèces hôtes ayant des parasites « faciles » à identifier et notamment sans espèces jumelles sur le secteur
- De préférence : espèces hôtes faisant l'objet de suivi écologique ou écotoxicologique

Dans ce cadre on pourra retenir comme candidats dans un premier temps :

- La coque dont un certain nombre de connaissances sur leurs parasites sont déjà acquises sur le site (Montaudouin *et al.*, 2009). Cette espèce fait aussi l'objet d'un suivi annuel par la Réserve Naturelle (Ponsero *et al.*, 2009). De plus, elle peut être candidate pour la mesure de certains biomarqueurs
- Le gastéropode du genre *Hydrobia* connu comme hôte primaire ou secondaire de très nombreux digéniens (Delbock, 1980)
- Les gastéropodes du genre *Littorina*
- La nasse, gastéropode du genre *Nassarius reticulatus*
- La moule sauvage prise sur les rochers (les moules de bouchots sont considérées comme populations non stables et non autochtones à cause des pratiques d'élevage)
- Les Gobies tachetés (*Pomatoschistus microps*) présents dans les filières à marée basse et constituant un second hôte intermédiaire intéressant
- Le flet (*Platichthys flesus*) présent en fond de baie dans ses jeunes stades de développement (second hôte intermédiaire intéressant)
- L'annélide polychète (*Nereis diversicolor*) (second hôte intermédiaire intéressant)

La première étape consiste donc en une étude préliminaire sur les espèces les plus pertinentes à retenir. Dans un second temps, 3 ou 4 espèces hôtes seulement pourront faire l'objet du suivi à long terme dont obligatoirement celles choisies pour l'étude des biomarqueurs biochimiques.

Un suivi annuel est nécessaire sur 2 ou 3 sites de la Baie de Saint-Brieuc, idéalement les mêmes ou à proximité de ceux retenus pour les biomarqueurs. L'échantillonnage comprendra 100 spécimens au minimum.

2.2.2. Analyse de certaines populations cibles

Certains parasites présents en grande quantité pourront subir des variations quantitatives après perturbation ou remédiation. Il sera intéressant de suivre les espèces les plus pertinentes par rapport à ce critère. D'autres espèces pourront être choisies pour leur sensibilité connue à certains polluants (dès que des études auront montré clairement une relation de cause à effet).

Les mesures les plus communes de l'ampleur des infestations parasitaires dans des hôtes sont la prévalence, l'abondance moyenne et l'intensité moyenne (Bush *et al.*, 1997). La prévalence est le pourcentage des organismes affectés par une espèce particulière de parasite. L'abondance moyenne est le nombre de parasites d'une espèce donnée, par hôte inspecté,

qu'il soit infecté ou non. L'intensité moyenne est le nombre moyen de parasites d'une espèce donnée par hôte infecté.

Le choix des systèmes hôtes/parasites pertinent se fera par rapport aux critères suivants :

- Les mêmes que précédemment
- Espèces hôtes ayant plutôt un haut niveau d'infestation (prévalence ou intensité) afin de plus facilement détecter des variations

Citons par exemple *Bucephalus (Labratrema) minimus* très présent en baie de Saint-Brieuc dont le premier hôte intermédiaire est la coque (prévalence d'environ 5 à 10%), le second hôte intermédiaire le Gobie (prévalence 100%), et l'hôte définitif le Bar.

Citons aussi *Himasthla quissetensis* très présent aussi en baie de Saint-Brieuc dont le premier hôte intermédiaire est la nasse, le second hôte intermédiaire la coque (prévalence 100%), et l'hôte définitif un laridé.

Citons enfin *Meiogymnophalus minutus* dont 100% des coques (premier hôte intermédiaire) sont infestées avec des intensités très élevées (de l'ordre de plusieurs centaines), l'hôte définitif étant l'Huitrier pie.

Les espèces seront choisies après une étude préliminaire.

CONCLUSION

L'évaluation du risque basé sur les biomarqueurs n'est pas envisagée dans la mise en œuvre de la Directive cadre sur l'eau (DCE, 2000 ; Marine Pollution Bulletin, 2007). Pourtant, lors du congrès annuel de la SETAC (Society of Environmental Toxicology and Chemistry) Europe de 2006 à 2009, une session consacrée à l'évaluation du bon état chimique et écologique des masses d'eau a souligné l'intérêt d'utiliser les biomarqueurs dans cette démarche. Dans une revue réalisée par des chercheurs britanniques et français, les biomarqueurs font partie de la « boîte à outils » proposée pour mener à bien la surveillance chimique et biologique dans le cadre de la DCE (Allan *et al.*, 2006). Cela signifie aussi qu'il n'y a aucune norme Européenne ni aucune validation internationale pour ces indicateurs. Au niveau européens certains biomarqueurs sont en cours de validation et d'intercalibration (programme BEQUALM « effects quality assurance in monitoring programmes » coordonné par le Norwegian Institute for Water Research). C'est le cas notamment pour les biomarqueurs EROD et AChE.

Cette étude met en évidence la nécessité de développer un suivi à long terme. Il doit être basé sur une investigation multidisciplinaire en lien avec les suivis en cours effectués par la Réserve Naturelle (benthos, oiseaux...). Les différentes approches moléculaires, physiologiques, populationnelles seront complémentaires et permettront de déterminer si des variations sont dues à des pollutions ou des variations d'autres facteurs écologiques, naturels ou anthropiques (variations de paramètres physico-chimiques mais aussi changement climatique, espèces introduites, pratiques des pêches, mytiliculture...).

Par contre, ce système de surveillance ne renseignera pas sur le polluant impliqué. Seul des dosages de contaminants chimiques apporteront la confirmation irréfutable de l'implication d'un polluant précis.

Si les acteurs impliqués dans la gestion de la réserve décident de lancer ce type de projet il reste à :

- valider le principe au sein du conseil scientifique
- trouver les laboratoires partenaires
- effectuer des études préliminaires afin de valider le choix :
 - des Biomarqueurs et/ou bioindicateurs retenus
 - des modèles biologiques retenus
 - des modalités expérimentales : pression d'échantillonnage, sites...
- trouver les financements

Pour terminer, la recherche actuelle travaille sur l'amélioration des biomarqueurs existants, les fait évoluer en permanence et en développe de nouveaux. Nous n'avons donc

pas abordé l'ensemble de l'offre qui existe aujourd'hui (ce n'était pas l'objectif) ni bien évidemment l'ensemble des perspectives d'avenir comme les « OMICS ». Il existe, en effet, une « coévolution » entre les biomarqueurs et le développement des nouveaux contaminants mis sur le marché comme les nanomatériaux, les perfluorocarbures (PFCs)... Enfin, la recherche sur l'évaluation des risques environnementaux prend en compte la dimension éthique et doit aller dans le sens d'une alternative à l'utilisation/expérimentation animale en écotoxicologie.

Pour un monitoring à long terme les indicateurs choisis seront donc amenés à évoluer.

“Protecting ecosystem health requires the understanding of the complex effect of combined multiple stressors, of the complex interactions between natural environmental agents and anthropogenic factors, as well as among the components of ecosystems. Bridging the gap between reductionistic tools and an holistic ecological view is a difficult challenge”

Kevin Thomas

Norwegian Institute for Water Research (NIVA), Oslo 2009

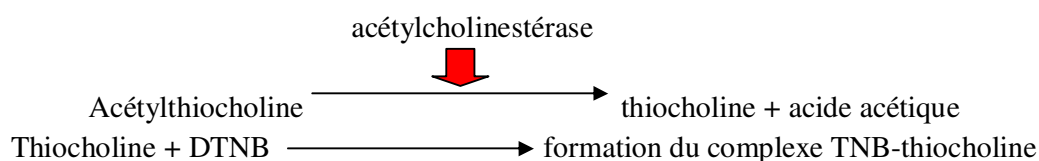
ANNEXE 1 : Activité Acétylcholinestérase

Concernant les bivalves, les échantillons sont prélevés sur les branchies, en prenant soin que la masse totale de l'échantillon ne soit pas inférieure à 50 mg, comme le recommande Bocquené & Galgani (2004). Pour ce qui est de l'annélide, c'est sur l'individu entier qu'est extrait l'AChE. Ces extractions sont faites dans un délai maximal de 24h après prélèvement des individus dans le milieu.

L'extraction des cholinestérases est la première étape de la mesure de l'activité. La chaîne du froid à 4°C doit être maintenue tout au long de cette opération. Après prélèvement, les tissus sont broyés à l'aide d'un ultra-turax dans du tampon (0,02M de phosphate de sodium, 0,1% de Triton X100 à 4°C, v/v). L'ajout de Triton X100 est indispensable car, étant un tensioactif non ionique, il solubilise les formes majoritaires des cholinestérases. Il permet donc la solubilisation de toutes les isoformes moléculaires d'AChE. Le rapport poids/volume admis de tampon pour les mollusques est de ½ (Bocquené & Galgani, 2004). Ce ratio est conservé pour les annélides.

Suit une étape de centrifugation à 9000 g durant 20 minutes, à 4°C. C'est dans le surnageant, nommé fraction S9, que se trouvent les cholinestérases solubilisées. La fraction S9 est donc considérée comme la source d'AChE.

La méthode à suivre pour le dosage de l'activité AChE reprend la méthode spectrophotométrique décrite par Ellman *et al.* en 1961. Elle consiste à mesurer l'hydrolyse d'un substrat synthétique, l'acétylthiocholine, selon la cinétique suivante :



Dans des conditions d'excès du substrat, l'apparition de la thiocholine est proportionnelle à l'activité enzymatique. La formation du complexe TNB-thiocholine, résultant de la fixation de l'ion dithiobisnitrobenzoate (DTNB) sur les groupements thiols (SH) de la thiocholine, provoque l'apparition d'une coloration jaune dont l'intensité est fonction de l'activité AChE. Cette technique est très sensible et est applicable aussi bien à de faibles quantités de tissu qu'à de faibles concentrations d'enzymes.

La lecture de cette coloration jaune se fait dans des cuves spectrophotométriques à 412 nm. Chaque cuve contient 3 ml de tampon phosphate 0,1M, pH 8,0 ; 0,1 ml de DTNB 0,01M dans du tampon phosphate 0,1M, pH 7,0 ; 50 µL d'enzymes ; 20 µL de substrat acétylthiocholine (concentration finale de $5 \cdot 10^{-4}$ M). La lecture de l'activité AChE se fait contre un blanc ne contenant pas d'acétylthiocholine.

Parallèlement au suivi de cette activité enzymatique, le dosage des protéines de la fraction S9 est réalisé suivant la méthode de Bradford. Cette mesure de la concentration en protéines va permettre de déterminer la valeur de l'activité enzymatique de l'AChE, exprimée en nmol/min/mg de protéines, selon l'équation suivante :

$$AE (AChE) = \frac{\Delta DO \times \text{volume réactionnel}}{\varepsilon \times l \times [\text{protéines}] \times \text{volume enzymatique} \times 10^{-4}} \times \text{facteur de dilution}$$

ε = coefficient d'extinction molaire du DTNB (13,6 mM.cm⁻¹)

l = longueur de la cuve de spectrophotométrie (1 cm)

ANNEXE 2 : Activité Glutathion S transférase

Les manipulations concernant l'extraction de l'enzyme se font à 4°C. Après prélèvement, les tissus de l'animal entier sont broyés à l'ultra-turax dans du tampon (Tris 0,05M, NaCl 0,15M, pH 7,4 ; 1 mM DTT ; 0,1% de cocktail inhibiteur de protéase, v/v), dans un ratio de ¼ (poids/volume) pour chaque espèce (Durou *et al.*, 2007 (a)).

L'homogénat est ensuite centrifugé à 4°C durant 30 minutes, à 9000 g. Le surnageant, la fraction S9, servira à réaliser le dosage de l'activité enzymatique.

La méthode décrite par Habig *et al.* (1974) consiste à suivre à 25°C la cinétique de la réaction par spectrophotométrie à 340 nm. Le glutathion réduit forme alors un conjugué avec un substrat modèle, le 1-chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB), connu pour réagir avec les 4 isoformes de GST (alpha, mu, pi et theta).

La cuve spectrophotométrique contient 2,92 ml de tampon non isotonique de phosphate de potassium 0,1M, pH 6,5 ; 30 µL de CNDNB 100 mM ; 20 µL d'enzymes et 30 µL de GSH 100 mM.

Parallèlement au suivi de cette activité enzymatique, le dosage des protéines de la fraction S9 est réalisé suivant la méthode de Bradford. Cette mesure de la concentration en protéines va permettre de déterminer la valeur de l'activité enzymatique de la GST, exprimée en nmol/min/mg de protéines, selon l'équation suivante :

$$AE (GST) = \frac{\Delta DO \times \text{volume réactionnel}}{\varepsilon \times l \times [\text{protéines}] \times \text{volume enzymatique} \times 10^{-4}} \times \text{facteur de dilution}$$

ε = coefficient d'extinction molaire du CNDNB (9,6 mM.cm⁻¹)

l = longueur de la cuve de spectrophotométrie (1 cm)

ANNEXE 3 : Test Comet

Cette technique s'applique à des cellules isolées incluses dans un gel d'agarose et est basée sur le principe de l'électrophorèse chargée négativement. Après migration l'ADN intègre apparaîtra comme une sphère fluorescente tandis que l'ADN endommagé, à partir du noyau, formera une image de type comète, la tête correspondant au noyau cellulaire composé de l'ADN intact, la queue correspondant quant à elle aux brins d'ADN fragmentés (Figure 5). La taille de la queue de la comète reflète alors l'étendue des dommages à l'ADN.

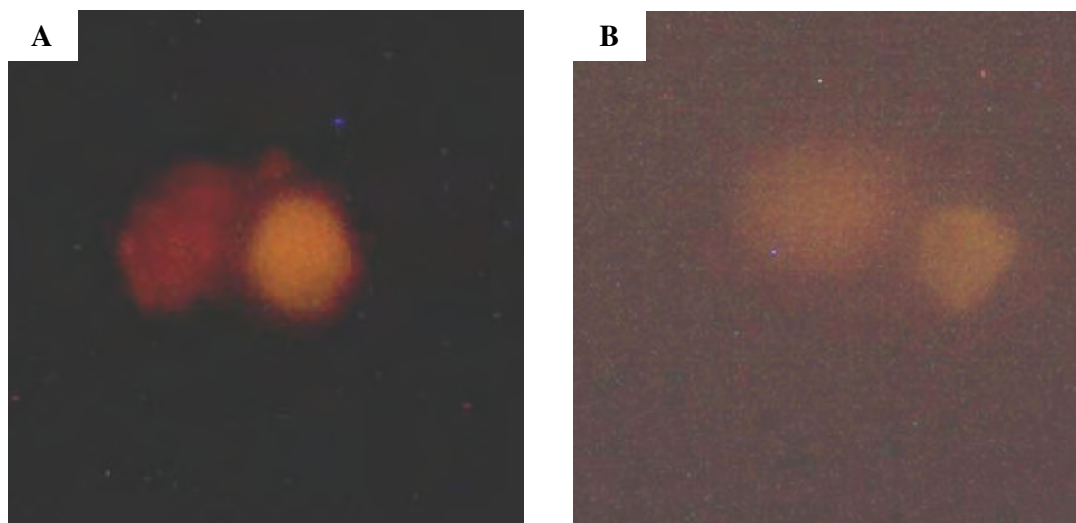
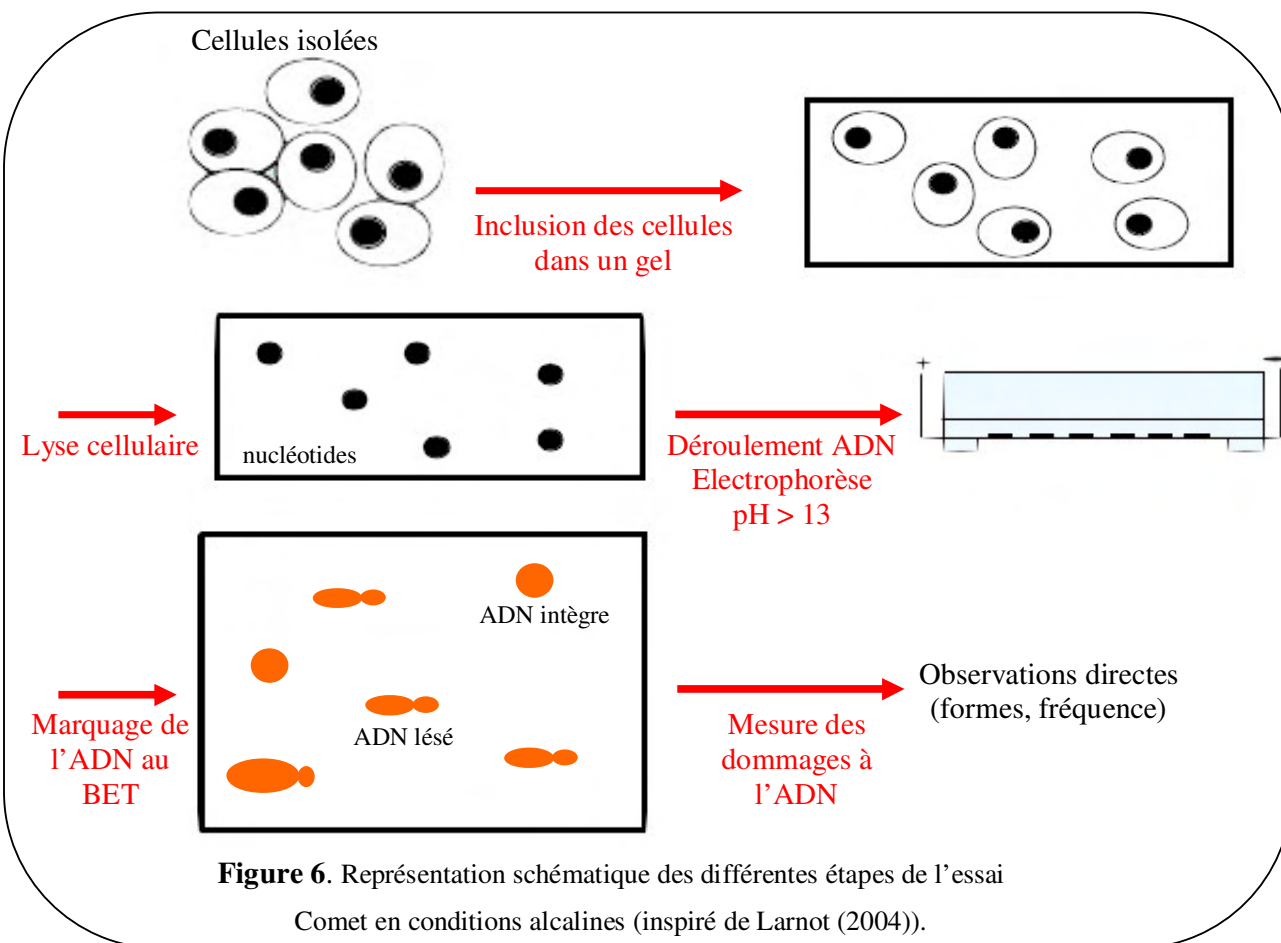


Figure 5. Photomicrographie en épifluorescence de cellules d'hémolymphes de coques.

(A) ADN peu endommagé, (B) ADN très endommagé (X400). (Photos UCO)

Le protocole à suivre (Figure 6) est celui décrit par Singh *et al.* (1988) et modifié par Devaux *et al.* en 1997. Il s'applique ici à l'hémolymphes de coques et de scrobiculaires, prélevées moins de 24h après le prélèvement des animaux.

Les lames de microscope (76X26, Menzel-Glaser) sont recouvertes d'une première couche de gel d'agarose normal à 0,8% (m/v dans du tampon PBS à 0,01 M dépourvu d'ions calcium et magnésium). Les lames sont entièrement plongées verticalement dans cet agarose à 80°C fraîchement préparé. L'une des faces est ensuite essuyée et les lames sont placées sur une surface plane, à température ambiante, afin de permettre la polymérisation uniforme sur toute la surface de la lame du gel d'agarose. Cette étape est nécessaire car cette première couche permettra l'ancrage ferme et uniforme des deuxième et troisième couches de gel.



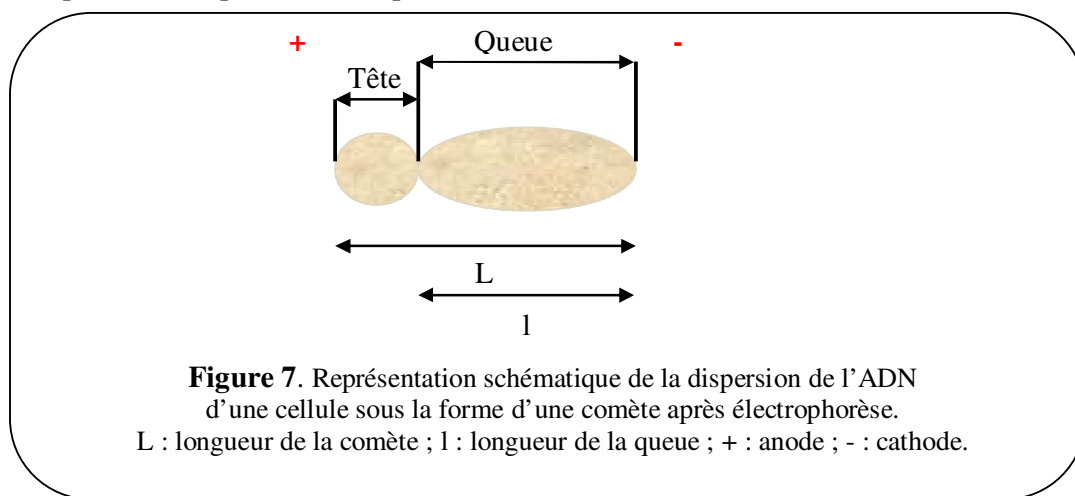
Un volume de 20 μL de la solution d'hémolymphe est prélevé et ajouté à 100 μL d'agarose à faible point de fusion (37°C) à 1% (m/v dans du PBS). Deux gouttes de ce mélange de 75 μL chacune sont rapidement déposées sur une lame et étalées à l'aide d'une lamelle de verre (24x60, VWR). Le dépôt de deux gouttes permet d'obtenir une densité de cellules optimale sur la lame, facilitant ainsi la dernière étape du protocole, à savoir la quantification des dommages. La polymérisation de cette seconde couche de gel contenant les cellules s'effectue à 4°C durant 5 minutes. Une troisième couche d'agarose à 0,5% (m/V ; 90 μL) à 37°C est étalée avec une lamelle de verre. Elle est polymérisée 5 minutes à 4°C . Les cellules sont donc protégées de part et d'autre par une couche d'agarose, ce qui les préserve de la dessiccation. L'ADN étant sensible aux rayonnements lumineux, les étapes de lyse, d'électrophorèse et de neutralisation doivent être effectuées à l'obscurité.

Dans un premier temps, les lames sont immergées 60 minutes dans un tampon de lyse à 4°C (2,5M NaCl, 0,1M Na_2EDTA , 0,01M Tris, pH 10 ; avec 1% de Triton X100 (v/v), 10% de DMSO (v/v) ajoutés juste avant utilisation). L'importante force ionique des sels et de détergent du tampon va permettre la lyse et la dénaturation des membranes plasmique et nucléaire, des organites du cytoplasme ainsi que des protéines liées à l'ADN (histones et non histones).

Les lames sont ensuite séchées et placées dans une cuve électrophorétique horizontale. Elles sont submergées par environ 20 mm de tampon d'électrophorèse alcalin à 4°C fraîchement préparé (0,3M NaOH, 1mM Na₂EDTA, pH>13). Les lames sont laissées 40 minutes dans ce tampon alcalin afin de permettre le déroulement de l'ADN ainsi que sa dénaturation, nécessaire à la visualisation des dommages à l'ADN. Ainsi, l'essai comète en conditions alcalines permet non seulement de mettre en évidence les cassures double brin (révélées en pH neutre) mais également les lésions simple brin et les sites alcali-labiles générés par la plupart des agents génotoxiques. L'essai est donc plus sensible dans ces conditions.

La migration des fragments d'ADN a lieu sous l'influence d'un champ électrophorétique de 20 Volts et d'intensité 300 mA durant 25 minutes. Suite à cela, les lames sont retirées du tampon, rincées et égouttées. Une période de séchage de 10 minutes à une température inférieure à 45°C (ici 21°C) permet d'amener les cellules sur un seul plan, ce qui facilite par la suite les observations. 1 ml de solution de neutralisation (Tris-HCl 0,4M, pH 7,5) est déposé avec précaution sur la lame et agit durant 5 minutes. L'opération est renouvelée une fois afin de parfaire la neutralisation. Cette étape est nécessaire pour rendre l'ADN bicaténaire et permettre l'intercalation du fluorochrome utilisé pour le marquage de l'ADN, le bromure d'éthidium (20 µg/ml) préparé extemporanément dans de l'eau distillée.

Le marquage par une goutte de 100 µL se réalise avant l'observation des lames. Celle-ci s'effectue avec un microscope à épifluorescence, en lumière bleue à 400X. Les cellules sont répertoriées selon la classification donnée par Rigonato *et al.* (2005). Celle-ci repose sur la taille de la queue de la comète : classe 0, pas de queue ; classe 1, une petite queue inférieure à la taille de la tête (nucleus) ; classe 2, taille égale ou le double du diamètre de la tête ; classe 3, longueur de la queue correspondant à plus du double du diamètre de la tête (Figure 7). Pour chaque individu, le taux de dommage est calculé en additionnant le nombre de cellules par classe puis en multipliant ce total par la valeur de la classe (0-3).



Pour chacun des 12 individus, 100 cellules sont analysées. L'observation se réalise au hasard sur la lame et dans la partie centrale de la lame pour éviter les effets de bordure.

ANNEXE 4 : Embryotoxicologie

La technique utilisée pour récolter les gamètes consiste à induire la ponte des oursins. Pour cela, 0,5 ml de KCl à 0,5 M sont injectés au niveau de la membrane péristomiale (1 ml pour les gros oursins), puis l'animal est retourné.

- Si la ponte est orange, il s'agit d'une femelle. La face aborale est alors déposée vers le bas, sur un bécher rempli à ras bord d'eau de mer synthétique stérile. La concentration en gamètes femelles est ajustée à 2000 ovotides/ml.
- Si la ponte est blanche, c'est un mâle. La face aborale est déposée sur une boîte de Pétri placée sur un lit de glace. Une dilution de sperme sera indispensable au moment de la fécondation. Elle sera faite à la dernière minute car sinon elle entraîne une mortalité des spermatozoïdes. 2 gouttes de sperme visqueux dans 20 ml d'eau de mer (1 goutte = 50 μ L).

Chaque mâle et femelle seront individualisés (numérotés) afin de pouvoir réaliser différents croisements.

Deux manipulations sont menées en parallèle. L'une portant sur le taux de fécondation, l'autre sur les anomalies du développement.

Chaque essai (expérimentaux et témoins) se déroule dans des boîtes de culture stériles dans lesquelles à 50 ml d'eau de mer stérile, sont inoculés 12 ml de solution d'ovotides homogénéisée et 3 ml de sperme dilué sont inoculés dans chacune des boîtes. Le milieu de culture est ensuite mis en incubation, à température ambiante. Cette étape est commune aux deux manipulations effectuées.

Dans le cas de l'expérimentation portant sur le taux de fécondation, l'observation du taux de réussite de la fécondation s'effectue 1 heure après la mise en contact des gamètes. Le prélèvement dans la boîte de culture se fait à l'aide d'une micropipette équipée d'un embout stérile. Le comptage se fait sur 100 cellules par boîte, à l'aide d'une cellule de Malassez. Ce comptage est fait deux fois de suite.

En ce qui concerne l'observation des anomalies de développement, au bout de 5 jours d'incubation, pour 100 larves *Pluteus*, les développements normaux et anormaux sont comptabilisés.

BIBLIOGRAPHIE

- Aebi H., 1983. Catalase. In : Bergmeyer H.U., Methods of enzymatic analysis, vol. 3. Academic Press, New-York, 237-286.
- Ait Alla A., Mouneyrac C., Durou C., Moukrim A., Pellerin J., 2006. Tolerance and biomarkers as useful tools for assessing environmental quality in the Oued Souss estuary (Bay of Agadir, Morocco). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. 143, 23-29.
- Allan I.J., Greenwood R., Mills G.A., Roig B., Gonzalez C., 2006. A “toolbox” for biological and chemical monitoring requirements for the European Union’s Water Framework Directive. *Talanta*. 69, 302-322.
- Amiard J.C., Amiard-Triquet C., 2008. Les biomarqueurs dans l’évaluation de l’état écologique des milieux aquatiques. Paris, Lavoisier. 375 p.
- Amiard-Triquet J.C., Rainbow P.S., 2009. Environmental assessment of estuarine ecosystems : a case study. New-York, CRC Press. 355 p.
- Auffret M., Rousseau S., Boutet I., Tanguy A., Baron J., Moraga D., Duchemin M., 2005. A multiparametric approach for monitoring immunotoxic responses in mussels from contaminated sites in Western Mediterranean. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 63 (3), 393-405.
- Baessant T., Auffret M., Lambert C., Le Floch S., Bigne J., 2009. Response means to chemicals spilled at sea and environmental damage. *RESPIL*. 49p.
- Bergayou H., Mouneyrac C., Pellerin J., Moukrim A., 2009. Oxidative stress responses in bivalves (*Scrobicularia plana*, *Cerastoderma edule*) from the Oued Souss estuary (Morocco). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 72, 765-769.
- Beukema J.J., Dekker R., 2006. Annual cockle *Cerastoderma edule* production in the Wadden Sea usually fails to sustain both wintering birds and a commercial fishery. *Mar Ecol Prog Ser*. 309, 189–204.
- Bocquené G., Galgani F., 2004. Les marqueurs biologiques des effets des polluants : l’acétylcholinestérase. France, IFREMER. 27 p.
- Bocquené G., Chantereau S., Clérendeau C., Beausir E., Ménard D., Raffin B., Minier C., Burgeot T., Pfohl Leszkowicz A., Narbonne J.F., 2004. Biological effects of the « Erika » oil spill on the common mussel (*Mytilus edulis*). *Aquat. Living Resour.* 17, 309-316.
- Bouchereu J.L., Guelorget O., 1998. Comparison of three Gobiidae (Teleostei) life history strategies over their geographical range. *Oceanol Acta*. 21, 503–517.
- Bush A.O., Lafferty K.D., Lotz J.M., Shostak A.W., 1997. Parasitology Meets Ecology on Its Own Terms: Margolis et al. Revisited. *Journal of parasitology*. 83, 575-583.
- Csallany A.S., Der Guan M., Manwaring J.D., Addis P.B., 1984. Free malonaldehyde determination in tissues by high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*. 142, 277-283.

- Damiens G., Gnassia-Barelli M., Loques F., Romeo M., Salbert V., 2007. Integrated biomarker response index as a useful tool for environmental assessment evaluated using transplanted mussels. *Chemosphere*. 66 (3), 574-583.
- De Lafontaine Y., Gagné F., Blaise C., Costan G., Gagnon P., Chan H.M., 2000. Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aquatic Toxicol.* 50, 51-71.
- Deblock S. 1980 Inventaire des trématodes larvaires parasites des mollusques Hydrobia (Prosobranches) des côtes de France. *Parassitologia* XXII, 1-105
- Delplède M.H., 1993. The rational Basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. In : Fossi M.C., Leonzio C., Nondestructive biomarkers in vertebrates. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, 271-295.
- Devaux A., Pesonen M., Monod G., 1997. Alkaline comet assay in rainbow trout hepatocytes. *Toxicology In Vitro*. 11, 71-79.
- Durou C., Poirier L., Amiard J.C., Budzinsky H., Gnassia-Barelli M., Lemenach K., Peluhet L., Mouneyrac C., Roméo M., Amiard-Triquet C., 2007 (a). Biomonitoring in a clean and a multi-contaminated estuary based on biomarkers and chemical analyses in the endobenthic worm *Nereis diversicolor*. *Environmental Pollution*. 148, 445-458.
- Durou C., Smith B.D., Roméo M., Rainbow P.S., Mouneyrac C., Mouloud M., Gnassia-Barelli M., Gillet P., Deutch B., Amiard-Triquet C., 2007 (b). From biomarkers to population responses in *Nereis diversicolor* : Assessment of stress in estuarine ecosystems. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 66, 402-411.
- Durou C., Mouneyrac C., 2007. Linking steroid hormone levels to sexual maturity index and energy reserves in *Nereis diversicolor* from clean and polluted estuaries. *General and Comparative Endocrinology*. 150, 106-113.
- Durou C., Mouneyrac C., Amiard-Triquet C., 2008. Environmental quality assessment in estuarine ecosystems : Use of biometric measurements and fecundity of the ragworm *Nereis diversicolor* (Polychaeta, Nereididae). *Water Research*. 42, 2157-2165.
- Ellman G.L., Courtney K.D., Andreas V., Featherstone R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of AChE activity. *Biochemistry and Pharmacology*. 7, 88-95.
- Flammarion P., Devaux A., Garric J., 2000. Marqueurs biochimiques de pollution dans les écosystèmes aquatiques continentaux. Exemples d'utilisation et perspectives pour le gestionnaire. *Bull. Fr. Pêche Pisci.* 357/358, 209-226.
- Frings S., Fendley T.W., Dunn R.T., Queen C.A., 1972. Improved determination of total serum lipids by the sulfo-phospho-vanillin reaction. *Clinical Chemistry*. 18, 673-674.
- Galgani F., Bocquené G., 1990. In vitro inhibition of acetylcholinesterase of four marine species by organophosphate and carbamates. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 45, 243-249.
- Geffard A., Geffard O., His E., Amiard J.C., 2002. Relationship between metal bioaccumulation and metallothionein levels in larvae of *Mytilus galloprovincialis* exposed to contaminated estuarine sediment elutriate. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 233, 131-142.

- Geffard A., Amiard-Triquet C., Amiard J.C., 2005. Do seasonal changes affect metallothionein induction by metals in mussels, *Mytilus edulis*? *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 61(2), 209-220.
- George-Nascimento M., 1987. Ecological helminthology of wildlife animal hosts from South America: a literature review and a search for patterns in marine food . *Rev. Chil. Hist. Nat.* 60, 181-202.
- Gillet P., Torresani S., 2003. Structure of the population and secondary production of *Hediste diversicolor* (O.F. Müller, 1776), (Polychaeta, Nereidae) in the Loire estuary, Atlantic Coast, France. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 56, 621-628.
- Gómez-Márquez J.L., Peña-Mendoza B., Salgado-Ugarte I.H., Sánchez-Herrera A.K., Sastré-Baez L., 2008. Reproduction of the fish *Poeciliopsis gracilis* (Cyprinodontiforme : Poeciliidae) in Coatetelco, a tropical shallow lake in Mexico. *Rev. Biol. Trop.* 56 (4), 1801-1812.
- Habig W.H., Pabst M.J., Jakobi W.B., 1974. Glutathione S-transferases : the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*. 249, 713-7139.
- Hechinger R.F., Lafferty K.D. 2005 Host diversity begets parasite diversity: bird final hosts and trematodes in snail intermediate hosts. *Proc. R. Soc. B.* 272, 1059-1066.
- Hudson P.J., Dobson A.P., Lafferty K.D., 2006. Is a healthy ecosystem one that is rich in parasites? *Trends in Ecology & Evolution* 21, 81-385.
- Hughes R.N., 1969. A study of feeding in *Scrobicularia plana*. *J. Mar. Biol. Assoc. UK.* 49, 805-823.
- Huggett R.J., Kimerle R.A., Mehrle P.M., Bergman H.L., 1992. Biomarkers. Biochemicals, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress. Boca Raton, Lewis Publisher. 347 p.
- Jha A.N., 2008. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis*. 23, 207-211.
- Jemec A., Drobne D., Tišler T., Sepčić K., 2009. Biochemical biomarkers in environmental studies – lessons learnt from enzymes catalase, glutathione S-Transferase and cholinesterase in two crustacean species. *Environ Sci Pollut Res.* DOI : 10.1007/s11356-009-0112-x.
- Kater B.J., Geuts van Kessel A.J.M., Baars J.J., 2006. Distribution of cockles *Cerastoderma edule* in the Eastern Scheldt : habitat mapping with abiotic variables. *Mar Ecol Prog Ser.* 318, 221–227.
- Lafferty K. D., 1997. Environmental parasitology: What can parasites tell us about human impacts on the environment? *Parasitology Today*. 13, 251-255.
- Lafferty K.D., Allesina S., Arim M., Briggs C.H., De Leo G., Dobson A.P., Dunne J.A., Johnson P.T., Kuris A.M., Marcogliese D.J., Martinez N.D., Marquet P.A., McLaughlin J.P., Mordecai E.A., Pascual M., Poulin R., Thielges D.W., 2008. Parasites in food webs: the ultimate missing links. *Ecol Lett.* 2008 11(6), 533–546.
- Lagarde F., 2002. Qualité des eaux littorales terrestres et marines de la Baie de Saint-Brieuc : bilan et propositions de suivis complémentaires. DESS Environnement : sols, eaux continentales et marines. Univ. Caen, 94 p.
- Le Mao P., 1986. - Feeding relationships between the benthic infauna and the dominant benthic fish of the Rance estuary (France). *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 66, 391-401.

- Larnot V., 2004. *Réponses génétiques et physiologiques de populations de Chevaine (Leuciscus cephalus) à la contamination chimique dans le bassin du Rhône*. Rapport de Doctorat. Université Claude Bernard – LYON 1. 257 p.
- Mackenzie K., 1999. Parasites as Pollution Indicators in Marine Ecosystems: a Proposed Early Warning System. *Marine Pollution Bulletin*. 38, 955-959.
- MacKenzie K., Williams H.H., Williams B., McVicar A.H., Siddall R., 1995. Parasites as Indicators of Water Quality and the Potential Use of Helminth Transmission in Marine Pollution Studies. *Advances in Parasitology*. 35, 85-144.
- Marc J., Mulner-Lorillon O., Boulben S., Hureau D., Durand G., Bellé R., 2002. Pesticide Roundup provokes cell division dysfunction at the level of CDK1/Cyclin B activation. *Chem. Res. Toxicol.* 15, 326-331.
- Marc J., Mulner-Lorillon O., Durand G., Bellé R., 2003. Embryonic cell cycle for risk assessment of pesticides at molecular level. *Environ. Chem. Lett.* 1, 8-12.
- Marc J., Mulner-Lorillon O., Bellé R., 2004. Glyphosate-based pesticides affect cell cycle regulation. *Biology of the cell*. 96, 245-249.
- Marcogliese D.J., 2003. Food webs and biodiversity: are parasites the missing link. *Journal of Parasitology*. 89, 106-113.
- Marcogliese D.J., 2004. Parasites: small players with crucial roles in the ecological theater. *EcoHealth*. 1, 151-164.
- Marcogliese D.J., 2005. Parasites of the superorganism: Are they indicators of ecosystem health? *International Journal for Parasitology*. 35, 705-716.
- Marcogliese D.J., Cone D.K., 1997. Food webs: a plea for parasites. *Trends. Ecology & Evolution*. 12, 320-325.
- Marcogliese D.J., Brambilla L.G., Gagné F., Gendron A.D., 2005. Joint effects of parasitism and pollution on oxidative stress biomarkers in yellow perch *Perca flavescens*. *Diseases of aquatic organisms*. 63, 77-84.
- Minguez L., Meyer A., Molloy D.P., Giambérini L., 2009. Interactions between parasitism and biological responses in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*): Importance in ecotoxicological studies. *Environmental Research*. 109, 843-850.
- Montaudouin X. de, Thieltges D.W., Gam M., Krakau M., Pina S., Bazairi H., Dabouineau L., Russell-Pinto F. & Jensen K.T., 2009. Digenean trematode species in the cockle *Cerastoderma edule*: identification key and distribution along the north-eastern Atlantic shoreline. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 89, 543-556.
- Mouneyrac C., Linot, S., Amiard J.C., Amiard-Triquet C., Métais I., Durou C., Minier C., Pellerin J., 2008. Biological indices, energy reserves, steroid hormones and sexual maturity in the infaunal bivalve *Scrobicularia plana* from three sites differing by their level of contamination. *General and Comparative Endocrinology*. 157, 133-141.
- Mouneyrac C., Perrein-Ettajani H., Amiard-Triquet C. Influence of anthropogenic stress on fitness and behaviour of a key-species of estuarine ecosystems, the ragworm *Nereis diversicolor*. *Environmental Pollution*. in Press. doi:10.1016/j.envpol.2009.07.028
- Overstreet R.M., 1997. Parasitological data as monitors of environmental health. *Parassitologia*. 39, 169-75.

- Pecore R.G., 2001. Whole system perspective : Steelhead, *Onchorhynchus mykiss*, glutathione S-Transferase as a biomarker of chlorpyrifos exposure. Bachelor of Science. Oregon State University. 45 p.
- Pasquaud S., Girardin M., Elie P., 2004. Etude du régime alimentaire des gobies du genre *Pomatoschistus* (*P. microps* et *P. minutus*) dans l'estuaire de la Gironde (France). *Cybium*. 28(1), 99–106
- Pellerin Massicote J., 1997. Influence of elevated temperature and air-exposure on MDA levels and catalase activities in digestive glands of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.). *J. Rech. Océanogr.* 22, 91-98.
- Ponsero A., Allain J., Roubichou E., 2008, Plan de gestion de la réserve naturelle de la baie de Saint- Brieuc - 2009-2013 - vol.B., Réserve Naturelle de la baie de Saint-Brieuc, 74p.
- Ponsero A., Dabouineau L., Allain J., 2009. Modelling of the Cockle (*Cerastoderma edule* L.) fishing grounds in a purpose of sustainable management of traditional harvesting. *Fisheries Science*. 75, 839-850.
- Price, P.W., 1980. Evolutionary biology of parasites. Princeton University Press, Princeton.
- Poulin R., 1992. Toxic pollution and parasitism in freshwater fish. *Parasitology Today*. 8, 58-61.
- Rigonato J., Mantovani M.S., Jordão B.Q., 2005. Comet assay comparison of different *Corbicula fluminea* (Mollusca) tissues for the detection of genotoxicity. *Genetics and Molecular Biology*. 28, 3, 464-468.
- Rueda J.L., Smaal A.C., Scholten H., 2005. A growth model of the cockle (*Cerastoderma edule* L.) tested in the Oosterschelde estuary (The Netherlands). *Neth J Sea Res*. 54, 276–298
- Scaps P., 2002. A review of the biology, ecology and potential use of the ragworm *Hediste diversicolor* (O.F. Müller) (Annelida : Polychaeta). *Hydrobiologia*. 470, 203-218.
- Scott C.R., Neff J.M., 1984. Quantitative semi-automated enzymatic assay for tissue glycogen. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Vol. 77B. 3, 447-449.
- Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., L.S.E., 1988. A sample technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*. 175, 184-191.
- SOGREAH, 2008. Schéma d'Aménagement et de Gestion des Eaux (SAGE) de la Baie de Saint-Brieuc. Réalisation de l'état des lieux et des usages, détermination des manques et diagnostic. 284 p.
- Sures B., 2004. Environmental parasitology: relevancy of parasites in monitoring environmental pollution. *Trends in Parasitology*. 20, 170-177.
- Vieira L.R., Sousa A., Frasco M.F., Lima I., Morgado F., Guilhermino L., 2008. Acute effects of benzo[a]pyrene, anthracene and fuel oil on biomarkers of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). *Science of the total environment*. 395, 87-100.
- Yeomans W.E., Chubb J.C., Sweeting R.A. 1997 Use of protozoan communities for pollution monitoring. *Parassitologia*, 39(3):201-12.

Référence de cette étude :

LE GOFF C., DABOUINEAU L., 2009. Proposition d'un biomonitoring pour la réserve de la Baie de Saint-Brieuc. Université U.C.O. Bretagne Nord Guingamp - Réserve Naturelle Baie de St-Brieuc, 35 pages

Email des auteurs :

claudie.le.goff@uco.fr

laurent.dabouineau@uco.fr

Gestionnaires de la Réserve :



Saint-Brieuc Agglomération

3 place de la résistance
BP 4402
22044 St-Brieuc
Téléphone : 02 96 77 20 00
Télécopie : 02 96 77 20 01
Site : <http://www.cabri22.com>
Email : accueil@cabri22.com

VivarmorNature

10 Boulevard Sévigné
22000 St-Brieuc
Téléphone/fax : 02 96 33 10 57
Site : <http://pagesperso-orange.fr/vivarmor>
Email : vivarmor@orange.fr