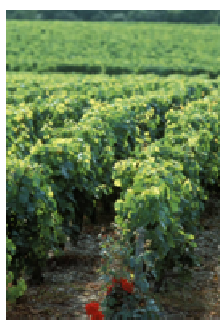


*Réseau de Recherche Littorale Aquitain*



**ASCOBAR**



Apports scientifiques face à la  
problématique conchylicole du Bassin  
d'Arcachon

---

Restitution Année 1

---





*Ce document présente les actions menées et résultats acquis en année 1 du programme « Apports scientifiques à la problématique conchylicole dans le Bassin d’Arcachon » (ASCOBAR).*

*L’avancée des travaux a fait par ailleurs l’objet de restitutions ponctuelles devant le Comité Scientifique Ostréicole Aquitain (CSOA) et d’une restitution globale de fin d’année 1 lors d’une journée d’échange Chercheurs/Société civile au Conseil Régional (3 Mars 2009).*

## Sommaire

---

VOLET APPORTS MARINS.....	6
1 - Contexte et objectifs .....	6
2 - Campagnes de mesures Arcadino .....	6
3 - Liens entre les communautés phytoplanctoniques du Bassin d’Arcachon et du Golfe de Gascogne .....	8
3.1. Etude des communautés phytoplanctoniques du Bassin d’Arcachon et du proche plateau continental : Campagnes 2006.....	8
3.2 Lien entre les structures hydrobiologiques et les communautés phytoplanctoniques du plateau continental aquitain : Campagnes Arcadino 2007 .....	9
4 - Caractérisation des processus physiques pouvant contrôler les épisodes à Dinophysis dans le Bassin d’Arcachon. Première étape de la mise en place d’une approche de modélisation numérique.....	11
4.1 Observations de Dinophysis à la côte .....	12
4.1.1 REPHY .....	12
4.1.2 DCE.....	14
4.2 Observations de Dinophysis au large .....	15
4.2.1 PELGAS.....	15
4.2.2 ARCADINO Avril 2008 .....	16
4.2.3 Comparaison entre les deux campagnes.....	18
4.3 Océanographie de la zone .....	19
4.4 Approche de modélisation .....	20
5 Conclusions et perspectives .....	20
VOLET « APPORTS CONTINENTAUX ».....	21
1. Introduction .....	21
2. Etude de la contamination chimique .....	21
2.1. Approche multi-résidus .....	22
2.1.1. Contexte .....	22
2.1.2. Objectifs .....	22
2.1.3. Résultats .....	22
2.1.3.1. Couplage Chimie Biologie .....	22
a. Taille des coquilles et indices de condition .....	22
b. Analyses des contaminants métalliques et organométalliques.....	23
c. Dosage des métaux et quantification des métallothionéines (MTs).....	23
d. Analyse génétique .....	24

e. Suivi des dommages à l'ADN : Analyse des cassures de l'ADN .....	25
f. Analyse histologique et métabolisme hormonal .....	25
2.1.3.2. Approche multicontaminants .....	26
a. Analyses des contaminants organiques .....	26
b. Analyses des contaminants métalliques et organométalliques .....	27
2.1.3.3. Echantillonnage passif (POCIS, SPMD, SBSE, SPME) .....	27
2.2. Développement d'une méthode "Toxicity Identification Evaluation (TIE) " .....	28
2.2.1. Contexte .....	28
2.2.2. Objectifs .....	28
2.2.3. Résultats .....	28
2.3. Etude des pesticides .....	29
2.3.1. Contexte .....	29
2.3.2. Objectifs .....	29
2.3.3. Résultats .....	29
2.3.3.1. Caractérisation des apports par les tributaires .....	29
Echantillonnage passif de la colonne d'eau .....	29
Analyse des sédiments des cours d'eau : .....	30
2.3.3.2. Caractérisation des niveaux de contamination intrabassin .....	31
3. Etude des éléments biogènes .....	31
3.1. Contexte .....	31
3.2. Objectifs .....	31
3.3. Résultats .....	32
3.3.1. Point 1 .....	32
3.3.2. Point 2 .....	32
3.3.3. Point 3 .....	33
3.3.4. Point 4 .....	33
4. Etude des apports microbiologiques .....	34
4.1. Contexte .....	34
4.2. Objectifs .....	34
4.3. Résultats .....	34
4.3.1. Analyse spatiale .....	35
4.3.2. Analyse temporelle .....	35
5. Conclusion .....	36
 VOLET « L'HUITRE DANS SON ENVIRONNEMENT » .....	38
1. Impact de l'environnement physico-chimique et biologique sur l'huître et action en retour de l'huître sur son environnement .....	38
1.1. Effets des conditions environnementales sur l'évolution annuelle de l'état physiologique des huîtres .....	39
1.2. Quantification de l'impact des huîtres sur le pool nutritif présent dans la colonne d'eau et évaluation des flux trophiques entre huîtres et colonne d'eau .....	40
1.3. Impact de la présence d'huîtres sur les communautés benthiques .....	42
2. Etude du comportement valvaire de l'huître : modélisation et analyse de l'influence du milieu .....	43
2.1. Acquisition et prétraitements des données .....	44
2.1.1. Le modèle biologique : huître .....	44
2.1.2. Protocoles expérimentaux .....	44
2.1.3. Les données .....	44

2.2. <i>Modélisation et traitements des données</i> .....	45
2.3. <i>Conclusion</i> .....	47
3. Les substances phénoliques chez <i>Zostera noltii</i> et <i>Zostera marina</i> : inhibiteurs potentiels du développement de microphytes .....	47
VOLET OBSERVATION .....	51
1. Descripteurs de l'évolution des écosystèmes .....	51
1.1. <i>EVOLUTION DES CARACTERISTIQUES ENVIRONNEMENTALES (BASSE FREQUENCE)</i> : .....	51
1.1.1. Paramètres .....	51
1.1.2. Echantillonnage : Sites et acquisition .....	52
1.1.3. Analyses et mesures .....	52
1.1.4. Accès / utilisation des données .....	52
1.2. <i>BILAN DES ACQUISITIONS COMPLEMENTAIRES RECENTES (BASSE FREQUENCE)</i> : .....	55
1.2.1. Caractérisation des apports de matériel particulaire .....	55
1.2.2. Caractérisation des communautés Phytoplanctoniques .....	56
1.2.3. Caractérisation des communautés benthiques .....	57
2. Métabolisme de l'écosystème .....	58
2.1. <i>Rappel de la problématique générale</i> .....	58
2.2. Actions en cours .....	59
3. Outils de gestion du milieu .....	60
3.1. <i>Transport sédimentaire dans le bassin d'arcachon</i> .....	60
3.2. <i>Vers un dispositif de surveillance participatif</i> .....	63
VOLET MICROCAPTEURS .....	65
1. Introduction .....	65
2. Plateforme à ondes de Love .....	65
2.1. <i>Géométries Ligne à retard</i> .....	66
2.2. <i>Conditionnement électronique: montage oscillateur</i> .....	66
2.3. <i>Cellule de mesure pour milieux liquides</i> .....	68
2.4. <i>Techniques de fabrication de dispositifs PDMS</i> .....	68
2.5. <i>Géométries des puces microfluidiques (1° et 2° générations)</i> .....	69
2.6. <i>Caractérisations Electriques (analyseurs de réseaux)</i> .....	71
2.8. <i>Banc de mesure microfluidique</i> .....	73
3. Haptènes et synthèses chimiques .....	73
3.1. <i>Choix de la structure de l'haptène et stratégie de synthèse</i> .....	73
3.2. <i>Synthèse de l'haptène</i> .....	75
3.3. <i>Couplage à la BSA</i> .....	76
3.4. <i>Immunologie</i> .....	77
4. Conclusion .....	78
5. Perspectives .....	79
PRODUCTION SCIENTIFIQUE .....	80
VALORISATION - FORMATION .....	81

## VOLET APPORTS MARINS

### LIEN PHYTOPLANCTON - HYDRODYNAMIQUE

Coordination Danièle Maurer, Philippe Bonneton

#### 1 - Contexte et objectifs

Depuis les années 70, une augmentation du phénomène d'algues toxiques ou nuisibles est observée au niveau mondial (Anderson, 1995). Différentes hypothèses ont été formulées pour expliquer cette expansion: (1) la dispersion de ces algues par les courants, les tempêtes ou les eaux de ballast, (2) le transport des produits aquacoles, (3) la pression anthropique croissante sur le littoral menant à un enrichissement en nutriments des eaux côtières, (4) les changements climatiques à long terme (température, ensoleillement, vents), (5) une surveillance accrue des eaux côtières et des produits de la mer ainsi qu'une amélioration des méthodes de détections des toxines. Dans le Bassin d'Arcachon, la présence de phytoplancton toxique du genre *Dinophysis* (producteur de toxines diarrhéiques, DSP) affecte périodiquement l'exploitation des moules depuis plus d'une dizaine d'années. Les huîtres n'ont été concernées que récemment par des épisodes de toxicité, en 2002 et en 2005. L'Ifremer assure, dans le cadre du réseau REPHY (REseau de surveillance du PHYtoplancton et des phytotoxines), la surveillance de la toxicité des coquillages.

Compte tenu du caractère récent des contaminations des huîtres, une étude approfondie de l'origine des algues toxiques et de leur pénétration dans le Bassin d'Arcachon n'avait jamais été menée au niveau local. Dans ce contexte il est essentiel d'acquérir des connaissances concernant la répartition spatio-temporelle des algues toxiques sur le proche plateau continental et leur origine (locale ou éloignée) et les modalités de leur entrée dans le Bassin d'Arcachon en fonction des conditions de courants sur le plateau, de vent/pression et de marée.

Dans le cadre de ce projet, deux axes de recherches complémentaires sont proposés :

- la poursuite de l'identification des espèces toxiques, en complément de la surveillance du REPHY (IFREMER), de leur répartition spatio-temporelle et de la caractérisation des paramètres environnementaux associés ;
- la modélisation de l'hydrodynamique du plateau continental aquitain pour déterminer l'origine des espèces toxiques présentes devant le Bassin d'Arcachon et tenter de prévoir leur apparition. Le genre *Dinophysis* sera utilisé comme modèle biologique pour répondre à ces questions, sachant que les résultats obtenus seront applicables ultérieurement à d'autres espèces de Dinoflagellés.

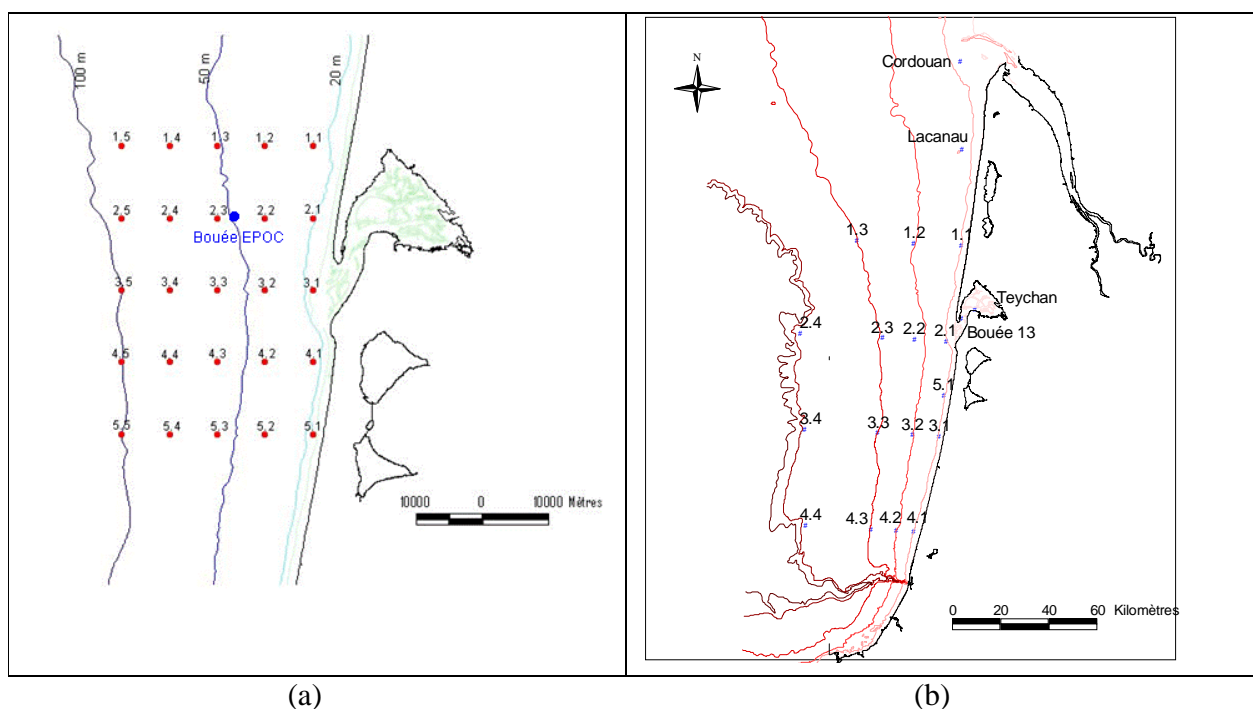
Nous présentons dans ce document les campagnes de mesures Arcadino, ainsi que les premières analyses concernant les données obtenues pendant Arcadino, ainsi que lors de campagnes antérieures ou dans le cadre de réseaux d'observation (DCE, REPHY).

#### 2 - Campagnes de mesures Arcadino

L'objectif principal des campagnes Arcadino est l'acquisition de données qui permettent de:

- déterminer la répartition et la variabilité spatio-temporelle du phytoplancton, et plus particulièrement des espèces toxiques (*Dinophysis*), à l'extérieur du Bassin d'Arcachon, sur le proche plateau continental,
- caractériser les conditions environnementales et hydrodynamiques qui y sont associées,
- définir les modalités d'arrivée du phytoplancton devant le Bassin d'Arcachon en fonction des conditions de courants sur le plateau, de vent/pression et de marée.

La stratégie d'échantillonnage consiste en une acquisition à une fréquence mensuelle, au cours des périodes à risque de toxicité des coquillages soit d'avril à août (5 mois), sur une zone du proche plateau (Figure 1).



**Figure 1 :** la zone d'échantillonnage couvre la partie extérieure du Bassin d'Arcachon sur le proche plateau continental, (a) campagne 2007 (b) campagne 2008.

Pour chaque mission, il a été échantillonné au plus une quarantaine de stations. A chaque station, une analyse de la structure verticale de la colonne d'eau a été réalisée grâce à :

- un profileur de courants ADCP (Acoustic Doppler Current Profiler)
- une sonde CTD (SBE Seabird) permettant de réaliser des profils verticaux des paramètres environnementaux (température, salinité, turbidité, PAR) et biologiques (fluorescence).
- des prélèvements d'eau à l'aide de bouteilles NISKIN effectués en surface, au fond et au niveau du maximum de fluorescence déterminé à partir des profils verticaux.

Les prélèvements d'eau ont permis de caractériser:

(1) le compartiment phytoplanctonique :

- biomasse phytoplanctonique (dosage de chlorophylle par fluorimétrie),
- déterminations spécifiques (microscope inversé). L'identification et le dénombrement se limitent aux espèces phytoplanctoniques dont la taille est supérieure à 20  $\mu\text{m}$ .

(2) l'environnement nutritif associé :

- dosage des sels nutritifs,
- dosage du carbone et azote organiques dissous et particulaires, matière en suspension,
- Dosage de la matière organique dissoute.

Le profileur ADCP a aussi permis d'obtenir en continu sur l'ensemble de la trajectoire du bateau, et en particulier sur les radiales, le profil vertical de courant.

Un second courantomètre ADCP a été mouillé en 2008 à 15km au large du Cap Ferret afin de mesurer sur l'ensemble de la période des campagnes c'est-à-dire d'avril à août, le profil vertical de courant en continu.

Pendant les campagnes ARCADINO 2009, des lâchers de flotteurs seront effectués devant le Bassin d'Arcachon. Les flotteurs, cofinancés à 60% par la Région, seront positionnés par GPS et

transmettront leur position par Argos. Ils comportent une ancre flottante qui permet au flotteur de surface de marquer le déplacement induit par les courants à l'immersion de l'ancre. On se propose de larguer durant la période d'intérêt, un ensemble de 24 flotteurs : des flotteurs drogués à 15 m sur les isobathes 30, 50 et 100 m et un flotteur drogué à 50 m sur l'isobathe 100 m. Leur durée de vie théorique étant de 1,5 an, il sera possible de récupérer certaines de ces flotteurs en mer lors des campagnes suivantes.

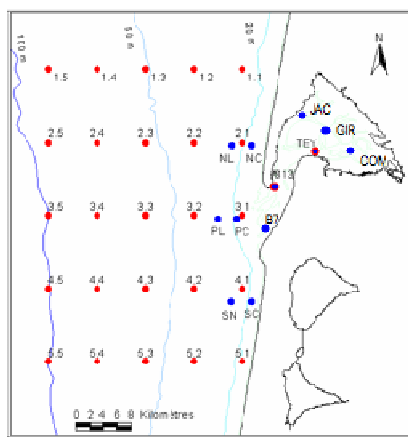
Alors que les flotteurs explorent la variabilité spatiale des courants, les mesures par mouillage au point fixe permettent de décrire la variabilité temporelle. Le positionnement d'un profileur de courant ADCP, ayant fait l'objet d'une demande d'emprunt au parc d'instrumentation INSU, permettra d'étudier cette variabilité.

### **3 - Liens entre les communautés phytoplanctoniques du Bassin d'Arcachon et du Golfe de Gascogne**

Afin d'acquérir des connaissances sur la distribution spatio-temporelle des communautés phytoplanctoniques (espèces toxiques et accompagnatrices) du Bassin d'Arcachon et des eaux océaniques adjacentes, l'étude s'est déclinée en deux temps.

D'une part, il est apparu essentiel d'acquérir des données permettant (1) d'identifier les populations phytoplanctoniques du Bassin d'Arcachon et du proche plateau continental, (2) de caractériser leur distribution en relation avec les conditions environnementales et (3) d'explicitier leurs modalités d'entrée dans le Bassin d'Arcachon en fonction des conditions de courants, de vent et de marée. Une stratégie d'échantillonnage a donc été mise en œuvre de mai à septembre 2006 comprenant des observations régulières (bi-mensuelles) dans le Bassin et dans le secteur océanique proche (i.e. panache externe des eaux lagunaires, Figure 2).

D'autre part, il est apparu important d'améliorer les connaissances sur l'origine et le développement d'algues toxiques (*Dinophysis* spp.) dans le Bassin d'Arcachon en fonction des conditions environnementales et hydrodynamiques observées sur le plateau continental aquitain. Des campagnes (ARCADINO, Figure 2) ont été menées d'avril à août 2007 à une fréquence mensuelle afin d'acquérir des données biologiques et hydrologiques sur le proche plateau continental avec une emprise spatiale plus importante qu'en 2006.



**Figure 2.** Localisation des stations de prélèvements des campagnes spécifiques effectuées en 2006 (●) et des campagnes ARCADINO effectuées en 2007 (●) dans le Bassin d'Arcachon et sur le proche plateau continental.

#### **3.1. Etude des communautés phytoplanctoniques du Bassin d'Arcachon et du proche plateau continental : Campagnes 2006**

L'identification et le dénombrement de toutes les espèces phytoplanctoniques ( $> 20 \mu\text{m}$ ) ont été effectués pour 4 campagnes réalisées avec un jour d'intervalle dans les eaux océaniques et lagunaires (juillet, août et septembre 2006).

La représentation par la méthode d'ordination (MDS) des prélèvements phytoplanctoniques est similaire pour les deux sites d'étude (distance et trajectoire entre prélèvements, Figure 3) : les abondances des principales classes phytoplanctoniques identifiées ainsi que la diversité spécifique présentent les



mêmes tendances dans les deux masses d'eau. Ces résultats montrent que les changements de la structure des communautés phytoplanctoniques dans les eaux lagunaires et les eaux océaniques adjacentes sont identiques au cours du temps. Le vent (force et direction) et le marnage sont les principaux facteurs explicatifs de la similarité entre les communautés phytoplanctoniques du Bassin et du proche plateau continental.

Néanmoins, la comparaison des assemblages phytoplanctoniques des 8 campagnes met en évidence des différences significatives entre les assemblages phytoplanctoniques du proche plateau continental et du Bassin d'Arcachon. Elles sont liées, non pas à une différence de composition spécifique, mais à des abondances phytoplanctoniques plus fortes dans les eaux du Bassin que dans les eaux océaniques. Les principaux taxons responsables de cette dissimilarité appartiennent à la classe des diatomées.

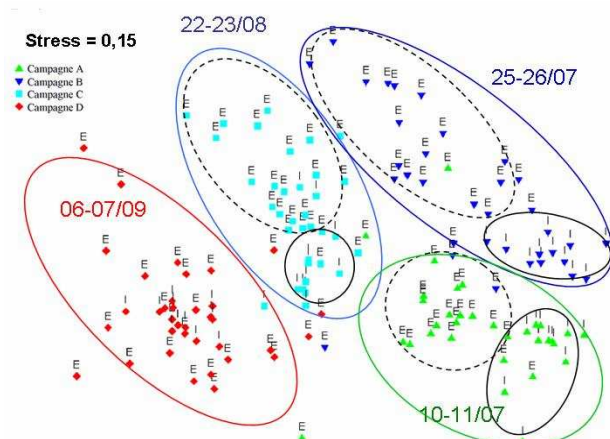


Figure 3.

MDS réalisée à partir de la matrice d'abondances des espèces phytoplanctoniques dénombrées pour l'ensemble des campagnes analysées. La valeur de stress de 0,15 indique une représentation satisfaisante de l'ensemble des stations.

E (extérieur) : Plateau continental  
I (intérieur) : Bassin d'Arcachon

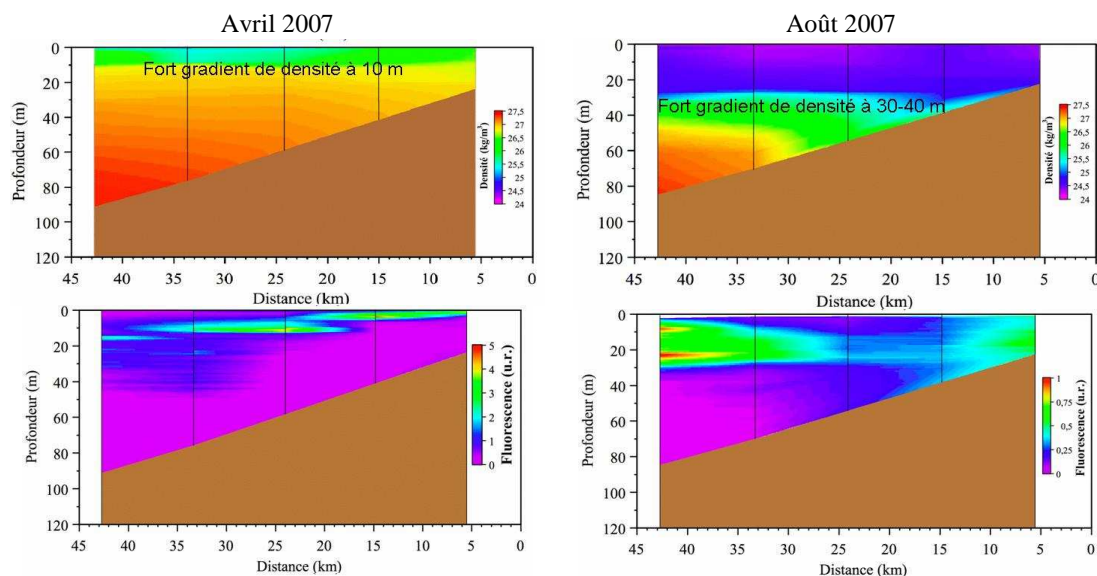
Campagne A : 10-11 juillet 2006  
Campagne B : 25-26 juillet 2006  
Campagne C : 22-23 août 2006  
Campagne D : 6-7 septembre 2006

Les abondances totales de *Dinophysis* spp. sont faibles ( $<200$  cellules.l<sup>-1</sup>) tout au long de l'été. Les variations verticales d'abondance de ce genre sont comparables à celle de la biomasse phytoplanctonique (i.e. homogène dans le Bassin d'Arcachon et présence d'un maximum en profondeur dans les eaux océaniques).

Les abondances maximales de *Dinophysis* spp. sont observées systématiquement sur le proche plateau continental et décroissent vers les eaux internes du Bassin d'Arcachon. Les variations spatio-temporelles sont liées à la dynamique des masses d'eau océaniques et lagunaires : la pénétration des algues toxiques semble s'effectuer principalement par les Passes Nord pour atteindre les eaux internes avec un décalage dans le temps de plusieurs jours. L'ensemble de ces résultats confirme ainsi l'origine océanique du genre *Dinophysis* et sa pénétration dans le Bassin d'Arcachon en fonction des conditions de vent et de marée.

### 3.2 Lien entre les structures hydrobiologiques et les communautés phytoplanctoniques du plateau continental aquitain : Campagnes Arcadino 2007

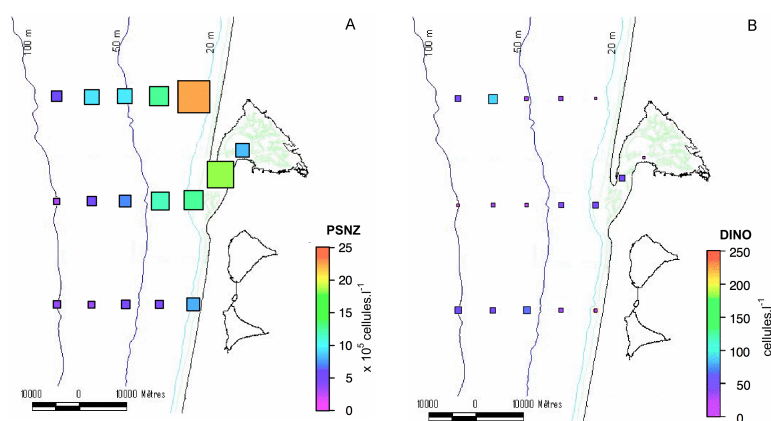
Les campagnes Arcadino ont permis d'étudier pour la première fois l'évolution spatio-temporelle des structures hydrologiques sur le proche plateau continental aquitain. Les mesures ont montré qu'en avril, la température est homogène autour de 13°C et que les eaux sont stratifiées du fait de la salinité avec une halocline située à 10 m de profondeur (Figure 4). Sous cette halocline, la salinité est de 35,5. D'avril à août, la profondeur de l'halocline augmente au cours de l'été et une thermocline s'installe, atteignant une profondeur de 40 m en août (Figure 4).



**Figure 4.** Profils verticaux de la densité (calculée à partir des mesures de température et de salinité) et de la fluorescence observés à la radiale 1 sur le plateau continental en avril et août 2007.

La distribution verticale phytoplanctonique est apparue étroitement liée à la stratification thermo-haline (Figure 4). D'avril à août, la biomasse phytoplanctonique s'est accumulée au niveau ou au dessus de la stratification (de 5 à 10 m en avril et de 10 à 30 m en août). Les biomasses maximales ont fortement diminué au cours de l'été (de 2 à 6  $\mu\text{gChl } a.l^{-1}$  en avril et de 0,5 à 1  $\mu\text{gChl } a.l^{-1}$  en août). Les populations phytoplanctoniques sont numériquement dominées par des diatomées (*Pseudonitzschia*, *Leptocylindrus danicus*), excepté en août où un silicoflagellé a dominé (*Dictyocha fibula*).

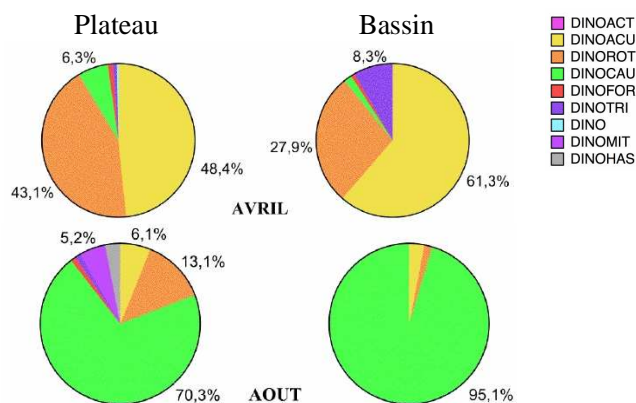
La distribution spatio-temporelle des populations phytoplanctoniques, en termes de biomasse et d'abondance, sur le plateau continental est généralement caractérisée par un double gradient décroissant : selon l'axe nord-sud et de la côte vers le large (Figure 5). Selon les espèces phytoplanctoniques dominantes, leur distribution est apparue associée (*Leptocylindrus danicus*) ou non (*Pseudonitzschia*, *Dictyocha fibula*) aux structures thermo-halines s'établissant sur le plateau continental au cours de l'été.



**Figure 5.** Abondances moyennes de *Pseudo-nitzschia* sp. (A : PSNZ) et de *Dinophysis* spp. (B : DINO) dans le Bassin d'Arcachon et sur le plateau continental en avril 2007.

Au cours des 4 campagnes, 8 espèces de *Dinophysis* ont été recensés sur le plateau continental et dans le Bassin d'Arcachon. L'importance relative des différentes espèces est comparable dans les eaux lagunaires et les eaux océaniques adjacentes (Figure 6). Les analyses de *Dinophysis* n'ont pas montré de fortes concentrations de ce genre ( $<400 \text{ cellules.l}^{-1}$ ). La distribution spatiale diffère de celles des taxons dominant la communauté phytoplanctonique, comme en avril où les abondances les plus fortes sont localisées au nord, où les eaux de surface sont les plus dessalées et où la stratification thermohaline est la

plus marquée (Figure 5).



**Figure 6.** Importance relative des espèces de de *Dinophysis* dans le Bassin d'Arcachon et sur le plateau continental en avril 2007.

En avril et juin, *D. acuminata* et *D. rotundata* sont les espèces dominantes représentant 90 % des abondances totales du genre *Dinophysis*.

En juillet et août, *D. caudata* est l'espèce dominante (>60 %).

De manière similaire aux observations faites en 2006, les analyses multivariées mettent en évidence que les variations des assemblages phytoplanctoniques, en termes d'abondances et de taxons dominants, au cours du temps (4 campagnes Arcadino) sont plus importantes que les variations spatiales (Bassin d'Arcachon et plateau continental). En particulier, les prélèvements effectués dans le Bassin sont associés systématiquement aux prélèvements effectués sur le plateau continental durant le même mois. Les changements de la structure des communautés phytoplanctoniques (évolution des abondances et des taxons dominants) dans les eaux lagunaires et sur le plateau continental aquitain apparaissent ainsi comparables dans le temps.

#### **4 - Caractérisation des processus physiques pouvant contrôler les épisodes à *Dinophysis* dans le Bassin d'Arcachon. Première étape de la mise en place d'une approche de modélisation numérique.**

*Dinophysis* est le genre phytoplanctonique toxique le plus néfaste sur les côtes françaises en termes d'impact économique et sanitaire. Dans le Bassin d'Arcachon, *Dinophysis* a affecté périodiquement l'exploitation des fruits de mer ces dix dernières années. *Dinophysis* a délivré peu d'éléments sur son écologie. Son taux de croissance et son environnement biogéochimique sont encore méconnus. Les observations montrent que son développement est favorisé quand la colonne d'eau est stratifiée. Il peut donc apparaître en toute saison puisque cette stratification peut être haline ou thermique.

L'objectif de cette étude est d'analyser les liens entre l'hydrodynamique du plateau continental du Golfe de Gascogne et la présence d'espèces phytoplanctoniques toxiques devant le Bassin d'Arcachon et de définir les conditions hydrométéorologiques et océanographiques propices à l'entrée du *Dinophysis* dans le bassin. Plus spécifiquement, la présence de *Dinophysis* est-elle due à une croissance locale au large du bassin (favorisée par la présence d'éventuelles structures de rétention) ou à une croissance dans des secteurs où *Dinophysis* a déjà été identifié (Pays Basque ou estuaire de la Gironde) puis à un transport par les courants devant le Bassin ?

La difficulté principale dans cette étude est l'observation. En effet *Dinophysis* est toujours minoritaire. Les images satellites ne peuvent donc pas nous renseigner sur la répartition spatiale des blooms, seules les mesures *in situ* le peuvent. Ces mesures qui peuvent être des réseaux de surveillance (ex : REPHY) ou des mesures en mer (ex : ARCADINO) sont lourdes en termes de moyens humains et matériels. Cependant, elles ne donnent que des informations ponctuelles et pas un suivi temporel biologique au large.

Le traitement de mesures de *Dinophysis* par des réseaux de surveillance (REPHY et DCE) ainsi que des résultats de campagnes en mer (PELGAS 2005 et ARCADINO avril 2008) nous a permis d'estimer la répartition de *Dinophysis* sur le plateau continental. L'hydrodynamique du plateau continental, susceptible de transporter *Dinophysis*, est mal connue. Des mesures ADCP effectuées au large du Cap Ferret nous ont apporté les premiers résultats sur le fonctionnement hydrodynamique de la zone. Une approche de

modélisation de l'hydrodynamique basée sur le code MARS 3D de l'IFREMER a été mise en place. Sa capacité de simulation devra être validée en comparant ses résultats aux mesures ADCP.

Afin d'étudier les apparitions de *Dinophysis* à la côte, nous avons traité les données des réseaux de surveillance du REPHY et de la DCE.

## 4.1 Observations de *Dinophysis* à la côte

### 4.1.1 REPHY

Le REPHY est un réseau national assuré par douze laboratoires côtiers de l'IFREMER sur le littoral français depuis 1984. Son objectif principal la surveillance régulière de l'ensemble des espèces phytoplanctoniques des eaux côtières. Il consiste en quatre stations dans le Bassin d'Arcachon: "Bouée 7" (échantillonné depuis 1995), "Teychan" (échantillonné depuis 1987), "Jacquets" et "Comprian" (Figure 7). Ce réseau fournit des séries temporelles de concentrations en *Dinophysis* sur ces quatre stations du bassin.

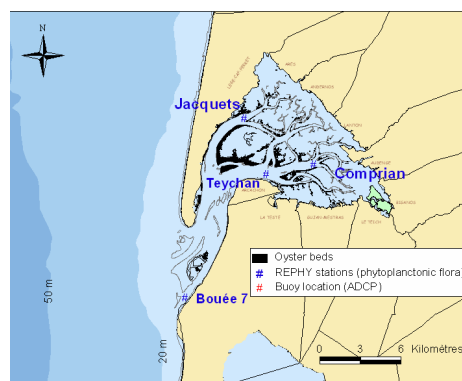


Figure 7 : Réseau REPHY.

Le réseau du REPHY montre que les concentrations en *Dinophysis* sont plus importantes à Bouée 7 qu'aux stations plus internes du bassin et que *Dinophysis* est détecté généralement d'abord à Bouée 7 puis aux autres stations. De ces deux résultats, on peut conclure que *Dinophysis* est advecté de l'océan vers le Bassin d'Arcachon.

Le suivi temporel permet de définir des événements à *Dinophysis* (Tableau 1). On définit un événement comme une série de concentrations en *Dinophysis* atteignant au moins 400 cellules/l. Ainsi 19 événements ont été déterminés, sur lesquels on dispose des conditions météorologiques. On remarque que 74% de ces événements ont lieu au printemps.

Tableau 1 : Événements à *Dinophysis*.

Evènement	Date	Concentration maximale en <i>Dinophysis</i> par litre
1	23/04/1996	1000
2	07/06/1996	400
3	19/09/1996	800
4	02/05/1997	800
5	16/07/1997	600
6	27/04/2000	600
7	20/03/2001	1100
8	12/06/2001	500
9	30/04/2002	1000
10	12/11/2002	700
11	24/04/2003	800
12	18/12/2003	400
13	27/04/2004	400
14	27/05/2004	480
15	29/03/2005	500
16	02/05/2005	1900

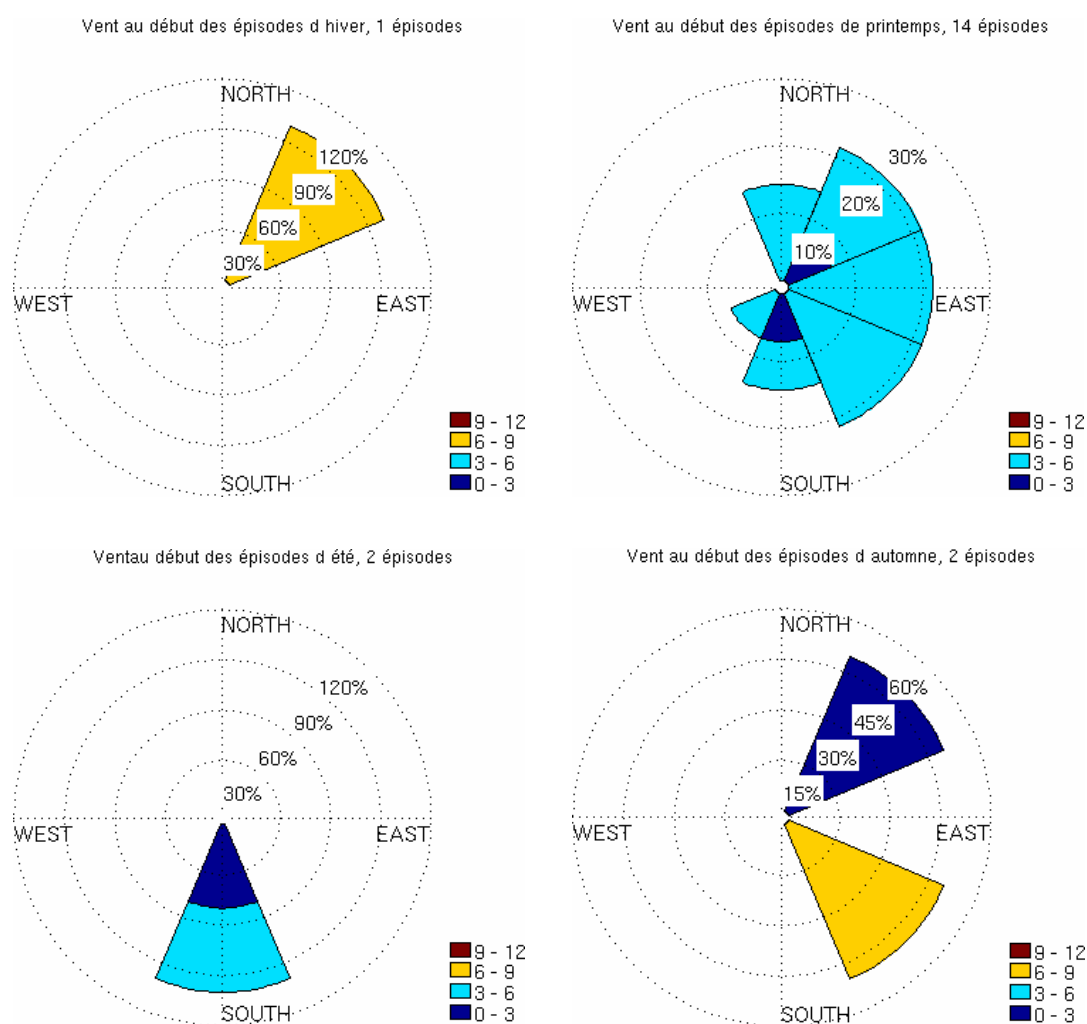
17	03/04/2006	480
18	24/04/2007	620
19	28/04/2008	460

### Conditions météorologiques:

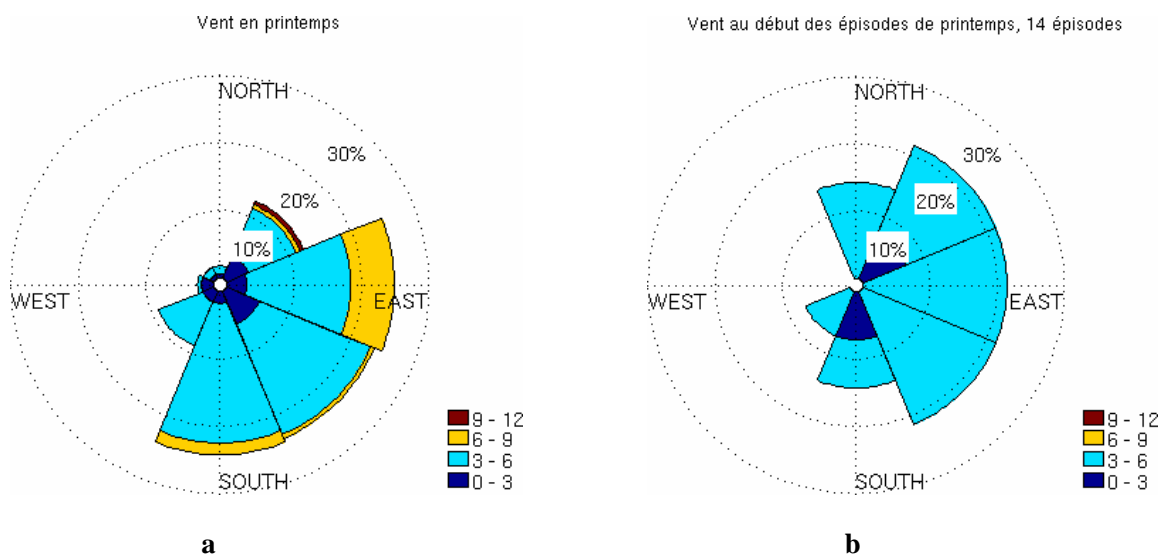
Le vent étant à priori le forçage majeur de l'hydrodynamique sur le plateau Aquitain, nous nous sommes intéressés au vent qui a précédé ces épisodes (cf Figure 8).

Etant donné le très faible nombre d'événements en hiver, en été et en automne, il n'est pas possible d'étudier la direction privilégiée des vents à ces saisons. En revanche, au printemps on dispose de 14 événements. Les vents précédents les événements à cette saison sont des vents de Nord-Ouest à Sud-Ouest relativement modérés. En comparant ces vents à une climatologie de vents faite avec des données de 1995 à 2008, on s'aperçoit que ces vents sont relativement communs à cette saison (Figure 9).

Il n'est donc pas possible de conclure sur une direction particulière du vent précédant les épisodes à *Dinophysis*.



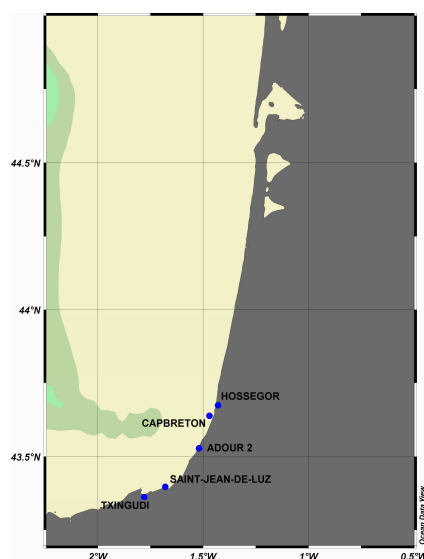
**Figure 8 :** Vent précédant les épisodes à Dinophysis identifiés dans le REPHY (répartis par saison), moyenne sur une semaine.



**Figure 9 :** a. Climatologie des vents au printemps calculée sur des données de 1995 à 2008, moyennées sur une semaine ; b. Vent précédent les épisodes à *Dinophysis* du printemps.

#### 4.1.2 DCE

Le réseau de la DCE est mis en place depuis 2007. Il est constitué de 5 stations: Hossegor, Capbreton, Adour, Saint-Jean-de-Luz, Txingudi (cf (Figure 10). L'échantillonnage étant mensuel, cette fréquence est trop faible pour pouvoir définir le début d'un épisode et étudier les conditions météorologiques le précédant. Il permet cependant de mettre en évidence des blooms importants de *Dinophysis* sur les côtes du Sud de l'Aquitaine et du Pays Basque (Tableau 2).



**Figure 10 :** Réseau de la DCE.

**Tableau 2 :** Evénements importants de la DCE.

Lieu	Date	Niveau	Concentration en <i>Dinophysis</i>
StJean	28/03/2007	Surface	3040
Txingudi	13/05/2008	Surface	7760
Adour	14/05/2008	Surface	400
Capbreton	16/05/2008	Surface	1800
Hossegor	16/05/2008	Surface	10540

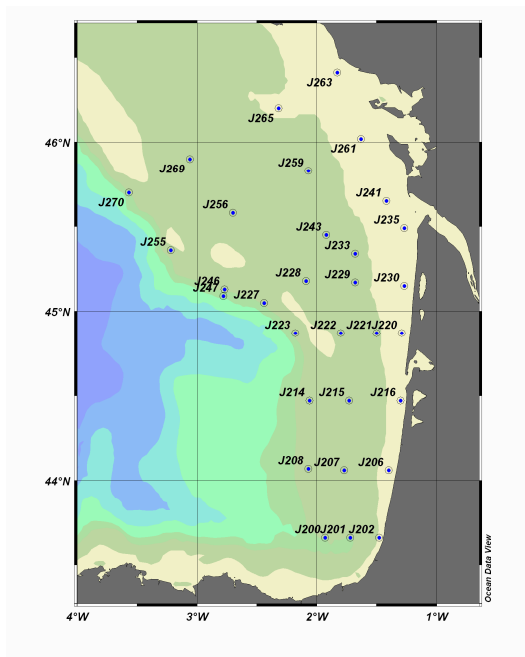


## 4.2 Observations de *Dinophysis* au large

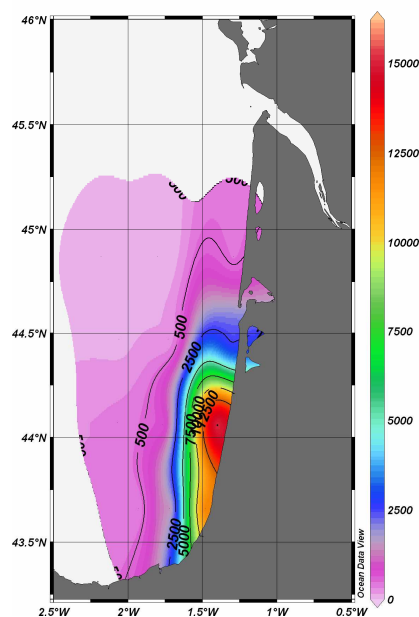
### 4.2.1 PELGAS

Les campagnes PELGAS sont des campagnes annuelles d'évaluation des stocks des petits pélagiques. L'emprise spatiale (cf Figure 11) est très importante puisqu'elle concerne tout le plateau du Golfe de Gascogne. Trois prélèvements sont réalisés par stations: au fond, au maximum de fluorescence et en surface.

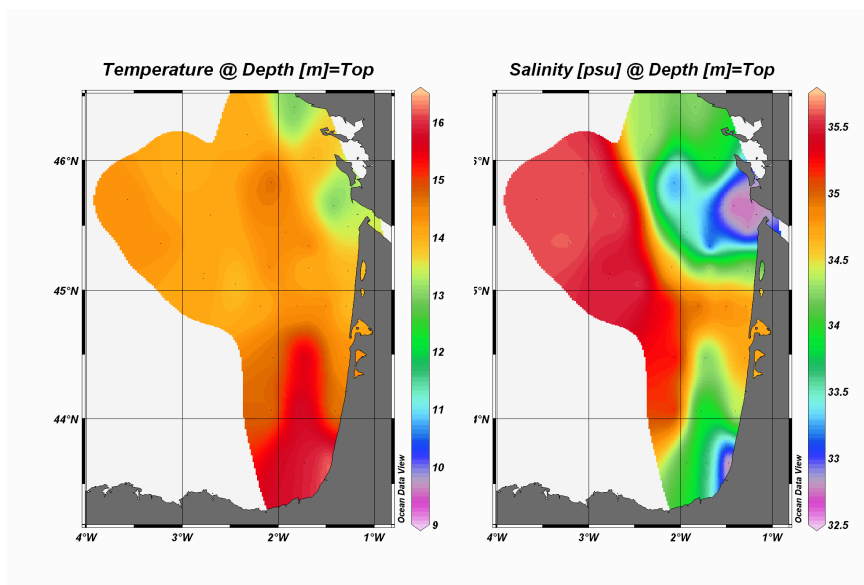
De très fortes concentrations en *Dinophysis* ont été mesurées sur les stations côtières au sud du bassin d'Arcachon. *Dinophysis* était présent dans les prélèvements de profondeur intermédiaire et au fond.



**Figure 11** : Plan d'échantillonnage des campagnes PELGAS.



**Figure 12** : Concentration en *Dinophysis* (somme sur les 3 profondeurs de prélèvements).



Les variations de température et de salinité en surface montrent les signatures de l'Adour et de la Gironde, avec des eaux dessalées. Les eaux du panache de l'Adour sont un peu plus chaudes que les eaux du reste du plateau alors que celles de la Gironde sont plus froides.

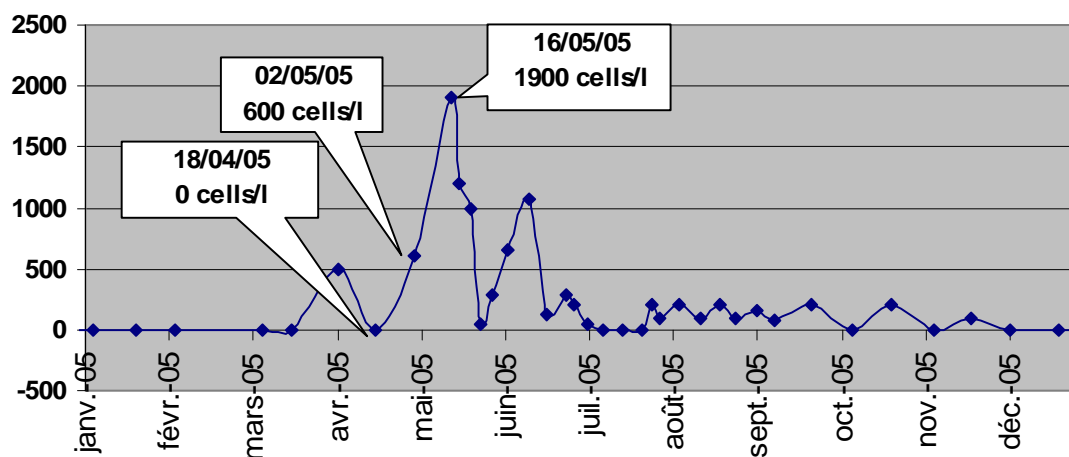
Les concentrations les plus importantes sont sous le panache de l'Adour et dans son voisinage

**Figure 13 :** Isothermes de surface.

**Figure 14 :** Isohalines de surface.

Les stations qui correspondent aux fortes concentrations ont été échantillonnées du 5 au 7 mai 2005. Cela correspond à un des épisodes les plus importants du REPHY qui débute le 2 mai 2005 (cf. Figure 15).

Le 06/05/05, 500 cellules ont été mesurées devant le Bassin d’Arcachon lors de la campagne PELGAS. Le 02/05/05, 600 cellules ont été mesurées à Bouée7 par le REPHY. Ces deux observations correspondent au même épisode. On peut donc conclure que pendant la crise de 2005, *Dinophysis* était présent sur toute la côte aquitaine.



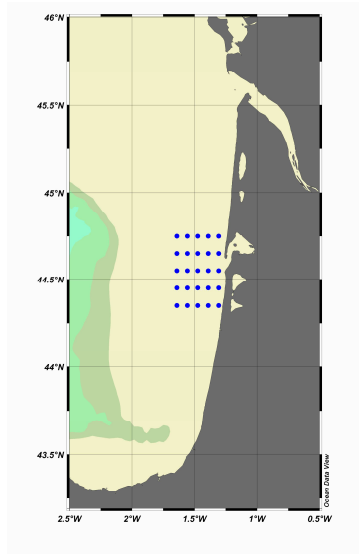
**Figure 15 :** Concentrations en *Dinophysis* mesurées à la station Bouée 7 du réseau REPHY.

#### 4.2.2 ARCADINO Avril 2008

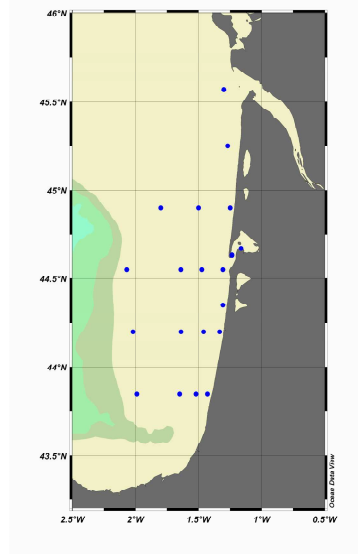
La distribution spatiale très étendue de *Dinophysis* pendant la campagne PELGAS 2005 nous a amené à élargir le réseau d'échantillonnage des campagnes ARCADINO (cf. Figure 16).



## RESEAU ARCADINO 2007

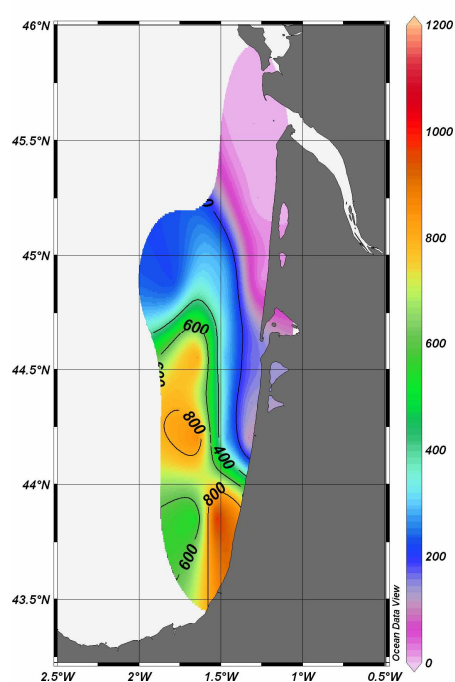


## RESEAU ARCADINO 2008

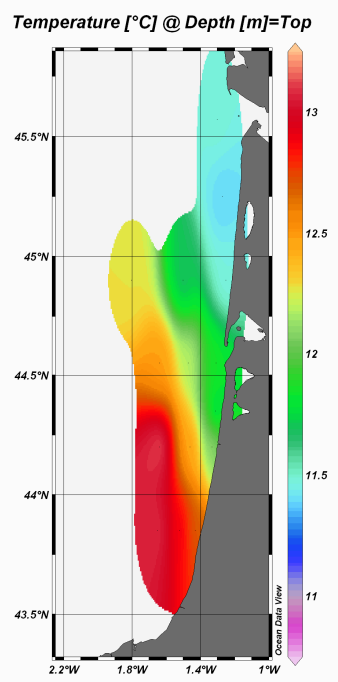


**Figure 16 :** réseaux ARCADINO 2007 et 2008.

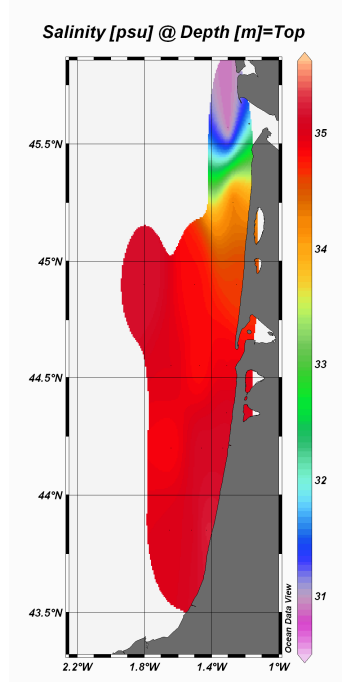
En chaque station, trois prélèvements sont réalisés : un en surface, un au maximum de fluorescence et un à proximité du fond.



**Figure 17 :** Concentration en Dinophysis (somme sur les 3 profondeurs de prélèvements).



**Figure 18 :** Isothermes de surface.



**Figure 19 :** Isohalines de surface.

Cette mission a eu lieu du 11 au 13 avril 2008. Des concentrations significatives en *Dinophysis* (jusqu'à 800 cellules) ont été trouvées aux stations sud et au large (cf. Figures 17 à 19) et uniquement dans les prélèvements jusqu'à 10m de profondeur. Les variations de température et de salinité en surface montrent la signature visible du panache de la Gironde (eaux froides et dessalées) mais pas de l'Adour. Les concentrations les plus importantes correspondent aux eaux les plus chaudes.

A cette période il n'y avait pas de *Dinophysis* dans le bassin d'Arcachon d'après le REPHY (le 14/04/08 80 cellules/l à Bouée 7, 0 cellules/l à Teychan) ce qui correspond à ce qu'on a observé pendant ARCADINO, en effet *Dinophysis* était plus au large.

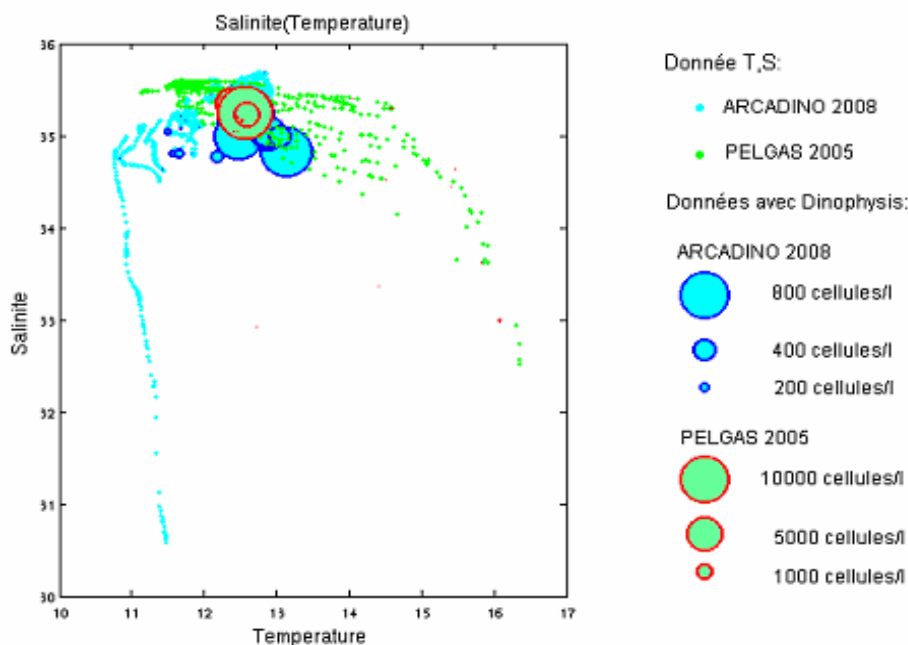
Cependant des vents de Sud-Ouest de 4 à 6m/s qui ont soufflé pendant les 3 semaines consécutives à la mission sont susceptibles d'avoir amené *Dinophysis* à la côte puisque le 28/04/08 460 cellules ont été mesurées à Bouée7 et 480 cellules/l à Teychan.

#### 4.2.3 Comparaison entre les deux campagnes

Différence: *Dinophysis* était en surface pendant ARCADINO 2008 et au fond pendant PELGAS 2005.

Points communs : Les concentrations les plus importantes ont été trouvées :

- dans des eaux avec des caractéristiques T, S proches (cf. Figure 20): T= [12.1 13.1] et S= [34.7 35.5]
- au sud du bassin d'Arcachon
- aux maximums de fluorescence



**Figure 20 :** Salinité en fonction de la température, données PELGAS 2005 et ARCADINO 2008.

En conclusion, ces deux missions montrent une répartition spatiale très large puisqu'elle concerne tout le plateau continental aquitain. Deux hypothèses émergent de ces observations :

- *Dinophysis* s'est développé plus au Sud et a été transporté jusque devant le Bassin d'Arcachon,
- le long des côtes aquitaines, entre le Bassin Arcachon et Mimizan, des conditions similaires des eaux ont permis à *Dinophysis* de se développer dans toute cette zone.

*Dinophysis* et le reste de la communauté phytoplanctonique, d'après les données de fluorescence, s'est développé dans des eaux aux caractéristiques de température et de salinité proches. Si les conditions de développement sont favorisées dans ce type d'eau, cela pourrait expliquer pourquoi on a trouvé *Dinophysis* une fois en surface et une fois au fond. Ces observations vont dans le sens de l'hypothèse selon laquelle *Dinophysis* se développerait en même temps, dans des eaux aux caractéristiques proches. Cependant les deux langues dans lesquelles *Dinophysis* s'est développé semblent naître au sud, ceci va plus dans le sens de l'hypothèse d'un transport. On ne peut donc pas pour l'instant valider une des hypothèses, la fin du dépouillement des campagnes ARCADINO 2008 et des campagnes 2009 à venir nous donnera certainement plus d'indices.

### 4.3 Océanographie de la zone

L'hydrodynamique du plateau continental aquitain est relativement peu connue, en effet il y a eu jusqu'à maintenant peu d'études sur la zone.

Les processus connus sont :

- les upwellings : processus dus à des vents de Nord qui poussent les eaux de surface au large et laissent place à des eaux qui remontent du fond et qui sont plus froides et chargées en nutriments,
- les panaches de la Gironde et de l'Adour,
- les courants de marées faibles.

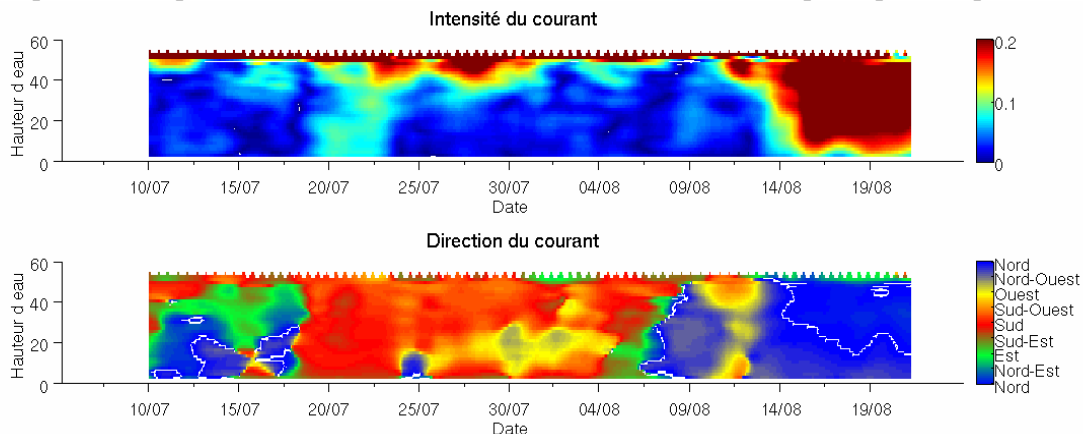
En revanche, on ne connaît pas l'influence de la circulation à grande échelle sur la dynamique du plateau.

Les seules données de mesures de courants sur une longue échelle de temps sont des données mesurées par un ADCP mouillé au large du Cap Ferret par 60 mètres de fond à deux périodes :

- 3 mois de avril à juin 2002,
- 1 mois et demi de mi juillet à août 2008 (missions ARCADINO).

L'étude de ces données montre que les courants filtrés de la marée (cf. Figure 21) sont relativement barotropes (uniformes sur la profondeur) et orientés Nord ou Sud. Il y a très peu de périodes où le courant est orienté vers l'Est ou l'Ouest. L'orientation Nord ou Sud du courant est liée à la direction et à l'intensité du vent. Pour des vents de Sud et d'Ouest, la circulation est vers le Nord, pour des vents de Nord, la circulation est vers le Sud.

Il y a cependant des périodes où l'intensité du courant est très forte et n'est pas explicable par le seul vent.

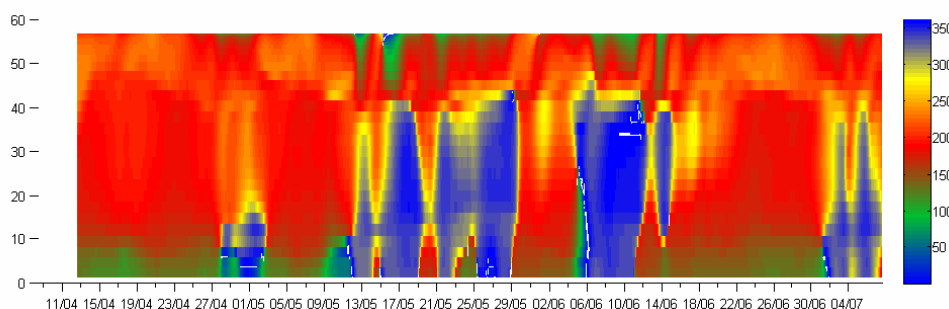


**Figure 21 :** Données ADCP de 2008 en intensité et direction sur la profondeur

Ces mesures confirment que les courants de marée sont faibles, entre 5 et 10cm/s. Elles ont également permis de mettre en évidence des ondes internes qui sont des oscillations de la stratification générées par la marée au bord du plateau continental. Les courants de ces ondes sont très importants, de l'ordre de 25cm/s, et sont susceptibles de générer du mélange.

#### 4.4 Approche de modélisation

Un travail de modélisation est en cours visant à généraliser les observations par la modélisation schématique issue de scénarios et la modélisation réaliste. Ce travail est en cours et effectué avec le modèle hydrodynamique MARS 3D de l'IFREMER. Dans un premier temps, le modèle va être calibré en faisant des simulations schématiques (par exemple un vent de Nord) afin que la circulation obtenue dans le modèle soit cohérente en direction et en intensité avec les mesures de courants ADCP. Dans un second temps, nous pourrons faire des simulations réalistes et simuler les périodes où les ADCP ont été mouillés afin de poursuivre la calibration (exemple Figure 22). Ensuite, nous pourrons, avec ce modèle calibré, rejouer les périodes précédant les épisodes à *Dinophysis* afin d'en étudier l'hydrodynamique. Ces résultats nous permettront de tester l'hypothèse d'un transport de *Dinophysis* dans des eaux venant du Sud.



**Figure 22 :** Résultat de MARS 3D de la direction du courant d'une simulation rejouant l'hydrodynamique du mouillage de 2002.

### 5 Conclusions et perspectives

Le vent est un des forçages les plus importants de l'hydrodynamique du plateau aquitain. Cependant, l'étude du vent précédant les épisodes à *Dinophysis* montre qu'*a priori*, il n'y a pas de relation simple entre le début des événements et les conditions de vent.

Les campagnes en mer PELGAS 2005 et ARCADINO d'avril 2008 ainsi que le réseau de la DCE ont montré que *Dinophysis* concerne tout le plateau continental aquitain. PELGAS 2005 et ARCADINO d'avril 2008 ont montré que *Dinophysis* se trouvait dans des eaux aux caractéristiques proches, ceci reste à confirmer avec d'autres missions.

Les résultats des campagnes en mer sont en accord avec les mesures du REPHY.

Les analyses des campagnes passées (Arcadino 2008) nous donneront sûrement d'autres indices sur la répartition du *Dinophysis* puisque les mesures de la DCE montrent qu'en mai 2008 de fortes concentrations ont été enregistrées au Pays Basque. Les nouvelles campagnes 2009 nous donneront également d'autres indices sur la répartition de *Dinophysis* mais aussi sur l'hydrodynamique puisque un ADCP sera de nouveau mouillé cette année.

Une fois le modèle MARS 3D calibré, nous pourrons y intégrer un modèle biologique simplifié. A terme, il sera appliqué aux situations où les algues toxiques sont observées afin d'évaluer l'origine de *Dinophysis* mis en évidence par les réseaux de surveillance dans le Bassin d'Arcachon.

## VOLET « APPORTS CONTINENTAUX »

Coordination Hélène Budzinski, Pierre Anschutz

### 1. Introduction

Le Bassin d’Arcachon est le siège de nombreuses pressions anthropiques de par le développement tant économique que touristique de la région. Ces pressions sont de différents types : touristique avec notamment le nautisme, domestique avec l’augmentation de l’urbanisation, agricole avec les activités de son bassin versant, et industrielle. Les apports de contaminants générés potentiellement par ces activités peuvent être à la fois d’origine continentale, interne, atmosphérique et même océanique. La vulnérabilité environnementale du Bassin d’Arcachon et les enjeux qu’implique la qualité de ses eaux justifient une attention particulière quant aux risques de pollution tant microbiologiques que chimiques, notamment par les pesticides, les hydrocarbures, les éléments biogènes ou encore les métaux traces et les composés organométalliques. En effet, l’ensemble de ces contaminants va se retrouver dans la colonne d’eau associé à la phase dissoute ou particulaire.

En fonction de leurs caractéristiques et affinités chimiques et du principe selon lequel s’exerce leur activité xénobiotique, ces polluants sont de nature à impacter le milieu naturel et la filière conchylicole par les 2 voies suivantes, qui peuvent être plus ou moins découplées ou se combiner selon la substance toxique :

- Action toxique directe sur un ou plusieurs maillons de l’édifice trophique (principe de toxicité aiguë, sub-aiguë et chronique). Par exemple, des molécules herbicides risquent d’influer plus directement sur le maillon végétal des producteurs primaires, micro-algal comme macrophytique, et peuvent exercer une altération se répercutant en chaîne sur tous les niveaux de l’édifice trophique, pouvant *in fine* venir restreindre ou altérer qualitativement la ressource alimentaire de l’huître. Des produits toxiques sur le règne vivant animal (par exemple les métaux lourds comme cadmium ou produits organo-stanniques, produits phytosanitaires insecticides-nématicides) peuvent provoquer une toxicité, une atteinte métabolique et/ou une mortalité directe d’invertébrés benthiques, de poissons et de l’huître.
- Bioaccumulation (cas des produits organiques persistants, comme les HAP, PCB, insecticides organochlorés...). De tels produits contaminent durablement des écosystèmes dans leur globalité. Ils s’accumulent dans les tissus des organismes et peuvent contaminer en cascade les différents niveaux de l’édifice trophique, le plus souvent avec bioamplification. Outre leur effet toxique direct plus ou moins important, ces polluants présentent un danger pour la qualité alimentaire (normes de salubrité) des ressources naturelles exploitées et en tout premier lieu de la ressource ostréicole.

Ce volet a donc été construit pour mettre en œuvre une approche intégrée permettant :

- une meilleure connaissance et une caractérisation tant qualitative que quantitative des apports chimiques et microbiologiques dans le Bassin d’Arcachon,
- une meilleure compréhension de la dynamique des contaminants dans le milieu et dans l’édifice trophique, ainsi que de leur impact toxique potentiel.

Il s’articule donc autour de 3 grands axes :

- Etude de la contamination chimique (responsable : H. Budzinski)
- Etude des éléments biogènes (responsable : P. Anschutz)
- Etude des apports microbiologiques (responsable : F. Jude)

### 2. Etude de la contamination chimique

Cet axe a pour but d’arriver à une meilleure compréhension de la dynamique des contaminants dans le milieu et dans l’édifice trophique, ainsi que de définir leur impact toxique vis-à-vis de l’huître. L’animation de cet axe est assurée par H. Budzinski, il s’articule autour de 3 approches :

- Approches multirésidus (co-responsable : M. Baudrimont)

- Développement d'une méthode "Toxicity Identification Evaluation" (co-responsable : J. Cachot)
- Etude des pesticides (co-responsable : F. Delmas)

## **2.1. Approche multi-résidus**

### **2.1.1. Contexte**

Comme tous les milieux côtiers soumis à des impacts anthropiques, le Bassin d'Arcachon subit des contaminations liées aux activités qui s'exercent dans la Baie elle-même ou sur son bassin versant. Les différentes activités anthropiques urbaines, agricoles, industrielles et domestiques engendrent des apports de contaminants chimiques multiples et variés (métaux et composés organométalliques, composés organiques dont les hydrocarbures, les pesticides, les retardateurs de flamme, les détergents, les plastifiants, ...) qui ne sont pas sans conséquence sur l'environnement marin tant sur les cycles biogéochimiques naturels que sur les organismes eux-mêmes et sur l'homme *in fine* par transfert dans la chaîne alimentaire. En conséquence, la caractérisation de la contamination chimique du Bassin a été amorcée par un screening multi-résidus le plus large possible de contaminants organiques, organométalliques et inorganiques en se focalisant sur une approche multi-compartiments (phase dissoute, phase particulaire, sédiment, huîtres sauvages et cultivées).

### **2.1.2. Objectifs**

Le but de cette approche est de dresser une cartographie des niveaux de contaminations organiques, inorganiques et organométalliques dans les différents compartiments du système (dissous, particules, sédiments, organismes) et de leurs éventuels impacts toxique sur l'huître. Plusieurs axes ont été développés :

- Axe "Couplage Chimie/Biologie" s'est concentré sur le suivi de la contamination et ses conséquences sur des huîtres cultivées transplantées en différents points du bassin.
- Axe "Multicontaminants" vise à caractériser les niveaux de contamination dans les différents compartiments du système (dissous, particules, sédiments, huîtres sauvages)
- Axe "Echantillonnage passif" vise à développer de nouveaux outils d'échantillonnage intégratifs pour caractériser les niveaux de contamination dans la phase dissoute.

### **2.1.3. Résultats**

#### **2.1.3.1. Couplage Chimie Biologie**

Au cours de cette première année, 16 poches contenant chacune 80 huîtres calibrées ont été placées, dès la fin mars 2008, sur chacun des 6 sites d'étude (Arguin (Ar), Bélisaire (Be), Grand banc (Gb), Ile aux Oiseaux (Io), Eyrac (Ey), Le Tès (Lt)). Tous les 45 jours, deux de ces poches ont été prélevées sur chaque site. Les échantillons biologiques ont été mutualisés entre les différents partenaires du projet afin de réaliser les analyses. A ce jour sept prélèvements ont été réalisés, hormis pour les sites d'Arguin et d'Eyrac dont les prélèvements se sont arrêtés en décembre (prélèvement N°6), suite à la tempête de fin Janvier ayant arraché sur ces deux sites les tables sur lesquelles les poches d'huîtres étaient attachées.

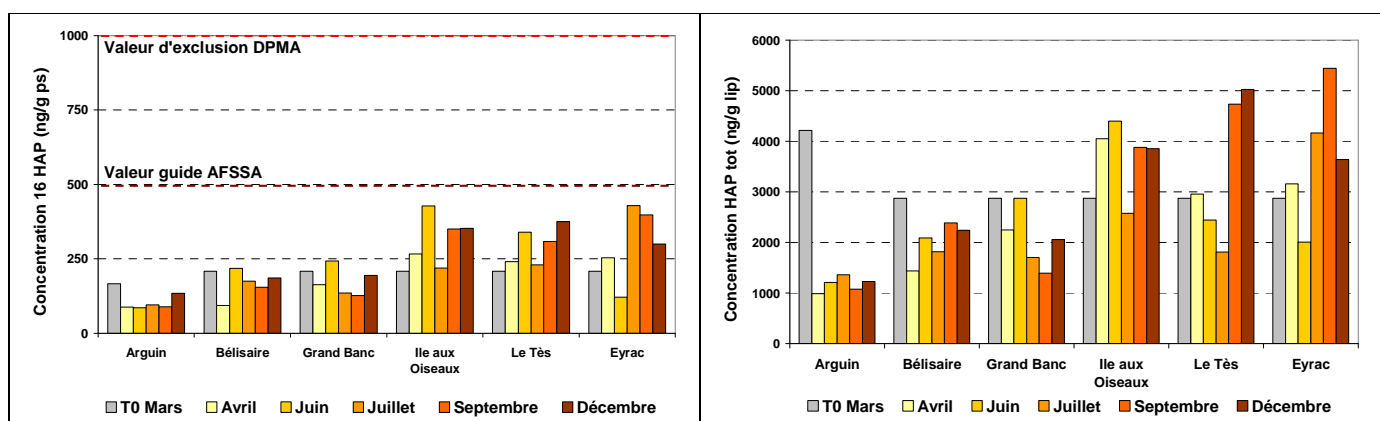
#### **a. Taille des coquilles et indices de condition**

La détermination de la taille des coquilles a permis d'étudier la croissance des organismes placés sur les 6 sites d'étude. L'analyse des 7 premiers points de prélèvement a montré des différences notables entre les sites. Les tailles les plus importantes sont mesurées au niveau d'Arguin, puis viennent les deux sites situés à l'entrée du Bassin (Grand banc et Bélisaire) et enfin les trois sites d'Eyrac, Ile aux Oiseaux et Le Tès (localisés plus à l'intérieur du Bassin). Cette classification semble logique au vu de la position des 6 sites d'étude. L'indice de condition (IC) est calculé en faisant le rapport du poids de l'organisme entier (corps mou) sur celui de la coquille. Cet indice peut nous renseigner sur l'état physiologique des individus

et notamment sur les périodes de pontes. Dès le premier temps de prélèvement, trois types d'évolution de l'IC sont observables, celles des stations les plus externes comme Arguin et Bélisaire qui présentent des IC très élevés, celles des stations les plus internes comme l'Ile aux oiseaux, Le Tès et Eyrac qui présentent les IC les plus faibles et enfin une situation intermédiaire présente au niveau de la station du Grand banc.

#### Dosage des polluants organiques

Dans cette approche, deux classes de contaminants ont été ciblées les Hydrocarbures Aromatiques Polycyclique (HAP) et les pesticides. La quantification des pesticides d'intérêt dans les huîtres a demandé une mise au point de méthode d'extraction et de quantification qui est en cours de finalisation. Les échantillons prélevés en 2008, seront donc traités en 2009. Concernant les HAP, les échantillons d'huîtres cultivées ont été analysés jusqu'à T5 (Décembre 2008). La Figure 23 présente les niveaux de contamination retrouvés dans les huîtres. Les teneurs varient de 85 à 428 ng.g<sup>-1</sup> poids sec (ps) et de 872 à 4418 ng.g<sup>-1</sup> lipides (lp). Globalement les huîtres transplantées en fond du bassin (Ey, Lt, Io) présentent des niveaux d'accumulation en HAP plus élevés que celles transplantées dans les parcs proches de la jonction à l'océan (Ar, Be, Gb). Ces différences de profil d'accumulation pourraient être liées aux charges particulières des masses d'eau qui sont elles aussi plus importantes dans les eaux internes de la lagune. Aucune concentration retrouvées dans les huîtres ne dépassent la valeur guide définie par l'AFSSA de 500 ng.g<sup>-1</sup> ps (AFSSA 2003-SA-0007). Cependant il est à noter que les concentrations en HAP avoisinent cette valeur guide pour les sites de l'Ile aux Oiseaux (427 ng.g<sup>-1</sup> ps en juillet), d'Eyrac (428 ng.g<sup>-1</sup> ps en juillet) et du Tès (375 ng.g<sup>-1</sup> ps en décembre).



**Figure 23 :** Concentrations en HAP tissulaires des huîtres cultivées transplantées dans différents sites au cours de l'année 1 du projet.

#### **b. Analyses des contaminants métalliques et organométalliques**

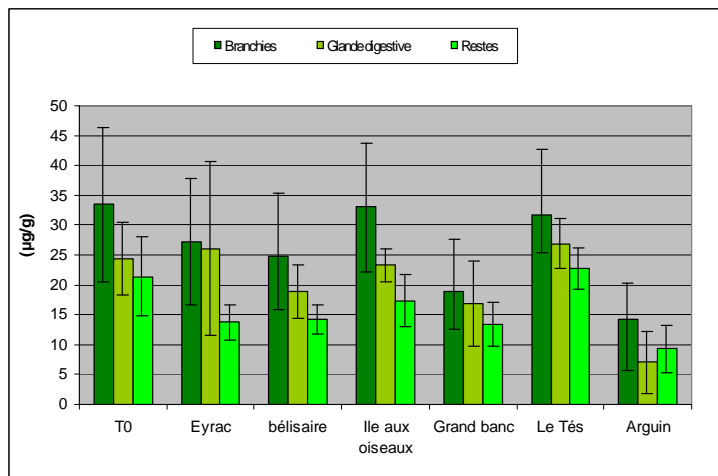
Les échantillons d'huîtres cultivées ont été prélevés et stockés. Ils sont en cours d'analyse, les résultats seront donnés ultérieurement par les équipes de l'UT2A et de l'IPREM.

#### **c. Dosage des métaux et quantification des métallothionéines (MTs)**

A ce jour, seuls les deux premiers temps (T<sub>0</sub> et T<sub>1</sub>) ont été traités pour ces deux paramètres. Concernant le dosage des métaux, des résultats comparables ont été obtenus pour le cuivre (Cu) et le zinc (Zn). En effet, les concentrations en Cu et Zn déterminée dans les branchies, la glande digestive et le reste de l'organisme sont identiques pour la quasi-totalité des sites (respectivement 20 et 200 µg.g<sup>-1</sup> dans la glande digestive). Seules les huîtres du site d'Arguin présentent des concentrations significativement plus faibles (Figure 24). Pour tous les sites et temps étudiés (T<sub>0</sub> et T<sub>1</sub>), la concentration en cadmium dans le reste de l'organisme est relativement faible par rapport à celle présente dans les autres organes. Elles sont d'environ 500 ng.g<sup>-1</sup> pour les branchies et 700 ng.g<sup>-1</sup> pour les glandes digestives, ce qui est relativement élevées. A ce jour, les concentrations en mercure sont encore en cours de détermination.

La répartition des MTs au niveau des compartiments cellulaires montre une concentration très importante de ces protéines dans les glandes digestives (entre 35 et 50 nmol de Hg.g<sup>-1</sup>, pf) en accord avec la

grande activité métabolique de cet organe (Amiard et al, 2006). Les concentrations en MTs dans les branchies et le reste du corps mou sont deux fois moins élevées. L'étude des MTs, au point de prélèvement du mois d'avril, montre une plus forte concentration de ces protéines au niveau de trois sites, Ile aux Oiseaux principalement puis Grand Banc et Le Tès, sites se trouvant les plus au fond du bassin. Cette analyse semble montrer que les individus de ces sites sont soumis à plus de stress que les autres, notamment métalliques. Une nouvelle fois, la station d'Arguin, située à l'entrée du Bassin d'Arcachon, montre les concentrations les moins élevées, en adéquation avec les concentrations métalliques les plus faibles.



**Figure 24 :** Concentrations de cuivre au temps T0 et au niveau des sites étudiés en avril (moyenne  $\pm$  ET), déterminées dans les branchies, la glande digestive et le reste du corps.

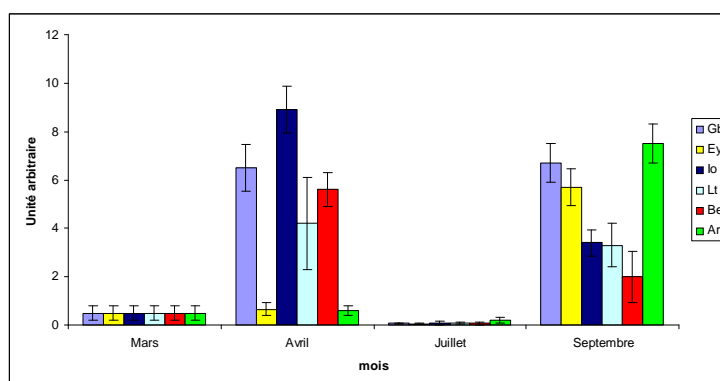
#### **d. Analyse génétique**

L'analyse génétique a pour l'instant porté sur les 4 premiers temps de prélèvement et concerné essentiellement les branchies. Le niveau d'expression des gènes étudiés est très différent selon le site sur lequel les huîtres ont été placées. Dans le cas de l'expression des gènes de MT, mt1 et mt2, par rapport au temps initial (T0), l'expression de mt2 est toujours supérieure à celle de mt1. Ce résultat confirme une étude récente dans laquelle mt2 a été montrée comme étant l'isoforme de métallothionéine préférentiellement exprimée dans les huîtres (Marie et al., 2005). Cependant, l'expression de ce gène est différente, et ce dès le prélèvement d'avril, selon le site de transplantation (Figure 25). En effet, si celle-ci reste comparable à celle des individus de T0 à Eyrac et Arguin, elle augmente de façon importante sur l'ensemble des autres sites avec par ordre croissant de niveau d'expression : Le Tès, Bélisaire, Grand Banc et Ile aux Oiseaux. Notons que ces résultats sont concordants avec ceux obtenus lors de la quantification des MT. L'expression de ce gène redevient faible entre avril et juillet sur tous les sites, puis est à nouveau surexprimé entre juillet et septembre. A cette date, il est observé que cette expression est très forte au niveau des stations d'Arguin, Grand banc et Eyrac, probablement en relation avec le cycle de reproduction de cette espèce (Baudrimont et al., 1997 ; Baudrimont et al., 2008 ; Marie, 2005).

Le même type de résultats a été obtenu pour grand nombre des autres gènes étudiés. En effet, dès le mois d'avril, l'ensemble des gènes est fortement exprimé au niveau de Bélisaire, Grand Banc, mais surtout Ile aux oiseaux. Sur ces trois sites, nous voyons que cox1, cyp1A, les deux Mts, sod et mxr sont les gènes les plus surexprimés dans les branchies. La surexpression du gène cox1 montre que l'individu demande plus d'énergie. La surexpression des gènes mxr et ceux codant pour les deux isoformes de la métallothionéine (mt1 et 2) montre qu'il y a un processus de détoxification. Nous remarquons également une forte expression du gène sod marqueur de réponse aux stress oxydant. Ces résultats peuvent être dus au fait que la cellule subit un stress, ou peuvent être liés à la forte productivité des mitochondries qui produisent, elles aussi, des espèces réactives de l'oxygène (Stohs et Badgchi, 1995). Cependant, la surexpression de Cyp1A1 au niveau de ces stations montre que la première hypothèse est plus probable. En effet, ce gène est impliqué dans la métabolisation de certains polluants tels que les HAP.



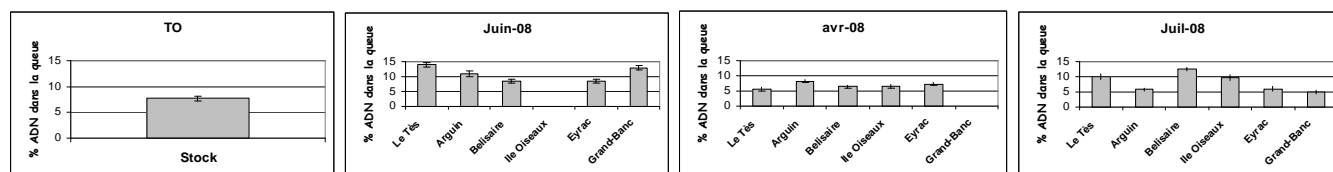
Le même type d'observation est fait sur les 6 stations entre avril et juillet, même si le niveau d'expression des gènes étudiés devient moins important. Seul le site d'Arguin se distingue à cette période, avec un taux d'expression de *gpx*, *coxI*, *mt1*, *mt2* et surtout *cyp1A1* significativement augmenté. Par contre, entre juillet et septembre, une forte augmentation des gènes *gst*, *mxr*, *coxI*, *sod*, *sodmt* et *cyp1A1* est observée au niveau des stations de Grand Banc, Ile aux Oiseaux, mais aussi Eyrac. Cette augmentation peut être mise en relation avec les teneurs en HAP retrouvés sur les sites d'Eyrac et de l'Ile aux Oiseaux. Pour le site de Grand Banc, la contamination en HAP ne permet pas *a priori* d'expliquer les réponses génétiques observées. La suite des analyses chimiques, des pesticides notamment, apportera sans doute un nouvel éclairage sur ces résultats.



**Figure 25 :** Expression différentielle du gène *mt2* observée au niveau des branchies des individus placés sur les 6 sites d'études à T0 (mars) et lors des prélèvements d'avril, juillet et septembre.

#### **e. Suivi des dommages à l'ADN : Analyse des cassures de l'ADN**

Le dosage des cassures des brins d'ADN a été réalisé par le test des comètes en mesurant le pourcentage d'ADN des hémocytes d'huître ayant migré dans la queue de la comète (Figure 26). Pour l'instant, l'analyse a porté sur les 4 premiers temps de prélèvements. Le taux de cassures dans les huîtres au temps initial est de 7% d'ADN dans la queue. Il n'y a pas d'effet notable du site de prélèvement, par contre un niveau de cassures de l'ADN globalement plus élevé en juin et juillet (période de ponte) par rapport au mois d'avril ou au temps initial est observé. Cependant, l'effet reste modéré avec une augmentation d'un facteur 3 pour Le Tès. Les analyses statistiques sont en cours afin de déterminer si les augmentations de cassures de l'ADN observées sont corrélées ou non aux périodes de ponte qui sont variables selon les sites.



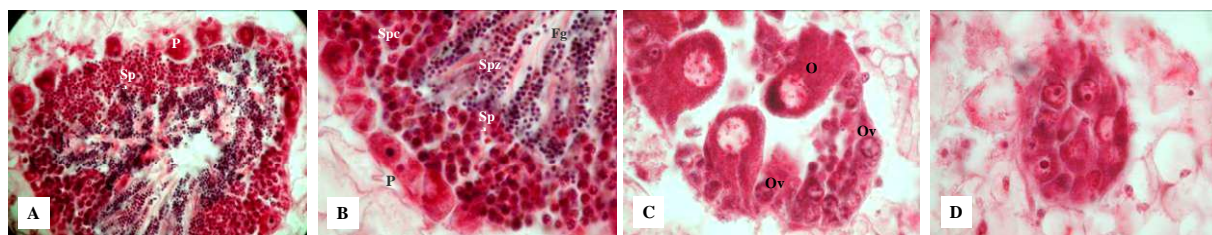
**Figure 26 :** Effet du temps de prélèvement sur le niveau de cassures de brins de l'ADN des hémocytes d'huîtres (moyenne  $\pm$  SEM).

#### **f. Analyse histologique et métabolisme hormonal**

Une étude histologique du déroulement de la reproduction a été menée, et sera par la suite corrélée au suivi des paramètres hormonaux mesurés dans l'hémolymph. La corrélation avec les taux hormonaux a comme pré-requis essentiel, l'identification du sexe de l'huître dont les analyses hormonales sont prévues. L'huître est un mollusque hermaphrodite successif, réputé protandre (développe la fonction mâle en première reproduction, puis la fonction femelle lors de la reproduction suivante). Cette étude histologique a pour but de sexer les animaux étudiés, d'identifier les stades des cellules germinales et/ou des gamètes, d'évaluer l'importance et la place des tissus gonadiques dans le manteau, en fonction des saisons, de mettre en évidence d'éventuelles figures de dysplasie ou anomalies de ces tissus gonadiques.

identifiables et enfin de corrélérer ces anomalies aux conditions environnementales de leur site d'exposition (indice de condition, présence de polluants, perturbateurs endocriniens, métaux...).

A ce stade de l'étude, l'analyse histologique et le métabolisme stéroïdien sont en cours d'analyse. Les résultats présentés portent uniquement sur les trois premiers prélèvements ( $T_0$ ,  $T_1$  et  $T_2$ ). Le sexage des huîtres a pu être réalisé dans les prélèvements les plus précoces, où la gonade est très peu développée. L'histologie permet en outre l'identification précise des stades de développement des cellules germinales (Figure 27). Sur les prélèvements plus tardifs, tels que celui effectué au mois de juin ( $T_2$ ), la reproduction est suffisamment avancée pour que le sexe des huîtres soit visible par un simple frottis étalé entre lame et lamelle dans une goutte d'eau de mer, et observé au microscope (X40).



**Figure 27 :** Observation en microscopie photonique, (x40, x100) de coupes histologiques du manteau au niveau des tissus gonadiques. La coloration utilisée est une coloration au trichrome de Masson (protocole Sigma-NHT-15). On observe ainsi des tissus mâles (A et B), femelle (C) et indifférencié (D).

**A-** Vue d'ensemble d'un cyste présentant tous les stades de développement de la lignée germinale mâle.

**B-** Détail à plus fort grossissement (x100) d'un spermatozyste. La coloration bien contrastée permet de différencier aisément les différents types cellulaires : les spermatozoïdes (Spz) apparaissent en noir, proches de flagelles (Fg) roses ; les spermatides (Spd) sont de petites cellules présentant un noyau violet foncé et un cytoplasme restreint rose. Les spermatozytes (Spc) sont des cellules plus grosses, visibles en rose dont le noyau plus ou moins condensé permet de différencier les stades (1 et 2). On distingue clairement deux types de cellules pavimenteuses (P), de plus grosse taille, qui constituent la limite du cyste.

**C-** Détail à fort grossissement (x100) d'un nid ovocyttaire. On distingue deux stades de cellules germinales, les ovules (O), ainsi que les ovocytes (Ov).

**D-** Vue d'ensemble du manteau dans lequel figure une structure gonadique d sexe non identifié.

Les dosages hormonaux de l'oestradiol (E2) et de la testostérone (T) dans l'hémolymph ont été réalisés par la technique immunologique ELISA développée dans notre groupe. Les concentrations de T et de l'E2 variant de façon aléatoire en fonction du temps et du sexe des individus, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence. Le dosage des hormones ne permet pas, à ce stade de l'étude, d'associer un taux d'hormones (T, E2) à un individu mâle ou femelle en fonction des prélèvements et des stations. Le développement des huîtres montre qu'elles se développent en longueur et en poids, et l'histologie prouve le développement des tissus gonadiques dans le manteau. Les mesures ne portent encore que sur 3 mois de mise en station. Il est donc prématuré pour déduire d'un impact de la station sur les taux d'hormones dans l'hémolymph.

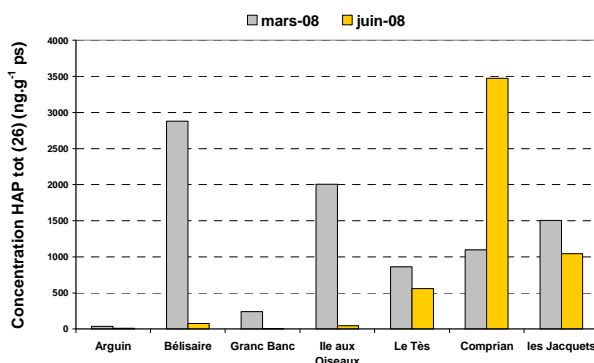
### 2.1.3.2. Approche multicontaminants

Parallèlement au suivi de la contamination des huîtres cultivées, l'approche multicontaminants vise à caractériser les niveaux de contamination dans les différents compartiments du système (dissous, particules, sédiments, huîtres sauvages). Tous les 90 jours, des prélèvements d'eau, de sédiments et d'huîtres sauvages ont été réalisés sur sept points (Arguin, Bélisaire, Grand Banc, Ile aux Oiseaux, Le Tès, Comprian, Les Jacquets). Sur ces sept points, cinq sont communs avec l'axe "Couplage Chimie Biologie" (Arguin, Bélisaire, Grand Banc, Ile aux Oiseaux, Le Tès). Les points de Comprian et des Jacquets ont été choisis car ils font déjà l'objet du suivi RNO par l'IFREMER. Cela permettra de comparer les données acquises dans le cadre de ce projet avec les données antérieures de l'IFREMER.

#### a. Analyses des contaminants organiques

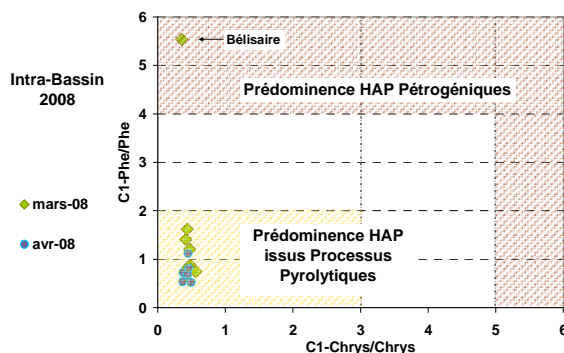
A ce jour, seuls les sédiments des deux premières campagnes ont été analysés. Sur ces deux premiers temps, les sept sites échantillonnés présentent des teneurs en HAP concordantes avec les teneurs observées lors de la cartographie de septembre 2007 réalisée dans le cadre de la thèse d'Alexia Crespo.

Pour les sites de Bélisaire, Ile aux Oiseaux et Comprian, les teneurs sont très variables entre les campagnes de mars et avril 2008. Ceci semble dû a priori plus à des différences dans la nature des sédiments échantillonnés (granulométrie, teneur en carbone organique), qu'à une variabilité saisonnière (Figure 28).



**Figure 28 :** Concentrations en HAP retrouvés dans les sédiments analysés lors du projet en 2008 (ng.g<sup>-1</sup> ps)

Les rapports entre certains composés particuliers (C1 phénanthrène / phénanthrène et C1 Chrysène/ Chrysène) permettent de définir l'origine des HAP présents dans le sédiment (Figure 29). Selon ces ratios, la contamination en HAP des sédiments étudiés se ferait essentiellement via les processus pyrolytiques (combustion de matières organiques et de produits pétroliers : feux de forêts, gaz d'échappements de véhicules motorisés) dans l'ensemble des sites. On peut noter toutefois une trace de contamination pétrogénique (produits pétroliers bruts) ponctuelle au mois de mars pour le site de Bélisaire.



**Figure 29 :** Origine des HAP retrouvés dans les sédiments analysés

La première année du programme a permis la collecte des échantillons et le développement des méthodes d'extraction et d'analyse. A ce jour le dosage et la quantification de 54 molécules, appartenant à 5 classes de pesticides (les triazines, les pyrèthrinoides, les phénylurées, les organophosphorés, les chloroacétanilides) ont été développés. Les protocoles sont au point pour l'analyse de l'eau, des particules, des sédiments et en cours de finalisation pour les matrices biologiques.

#### **b. Analyses des contaminants métalliques et organométalliques**

Les échantillons de sédiments, d'huîtres sauvages ont été prélevés et stockés, ils sont en cours d'analyse. Les résultats seront donnés ultérieurement par UT2A et l'IPREM.

##### **2.1.3.3. Echantillonnage passif (POCIS, SPMD, SBSE, SPME)**

Afin de pallier aux problèmes posés par les méthodes d'échantillonnage classiques (représentativité uniquement ponctuelle, coût, risque de contamination...), deux approches ont été développées :

- une approche intégrative d'échantillonnage: les échantillonneurs passifs.
- une approche visant à développer des techniques de micro-extraction.

Ces outils font l'objet d'un livrable à part entière, et ne feront donc pas l'objet d'un paragraphe détaillé.

## **2.2. Développement d'une méthode "Toxicity Identification Evaluation (TIE)"**

### **2.2.1. Contexte**

L'existence de molécules toxiques pour la plupart non identifiées dans l'environnement pose le problème d'une stratégie adaptée aux études sur l'évaluation de l'état de santé d'un milieu naturel et de son biota. Afin de screener l'ensemble des molécules présentes dans l'environnement et de définir leur potentiel toxicité, une méthodologie basée sur les concepts utilisés dans l'approche dite "Toxicity Identification Evaluation (TIE)" initiée par l'US EPA (United States Environmental Protection Agency) (Norberg-King et al., 1991) a été développée. Cette approche est une méthode d'identification de polluants qui couple des analyses chimiques à des procédures de fractionnement de l'échantillon suivies de tests toxicologiques. Ces fractionnements successifs de l'échantillon permettent de diviser la multitude de composés chimiques présents dans différentes fractions. Ces fractions sont ensuite soumises séparément à différents tests de toxicité *in-vitro* afin d'évaluer leur potentiel toxique. Ceci permet donc bien de lier la concentration d'un contaminant à un potentiel toxique.

### **2.2.2. Objectifs**

L'objectif général de ce travail est de développer une méthodologie TIE (« Toxicity Evaluation and Identification ») permettant sur la base des effets, d'identifier les composés présents dans le bassin d'Arcachon pouvant avoir un potentiel toxique pour le biota. Il a été choisi de développer cette approche sur la matrice sédimentaire. L'objectif de cette première année a été de développer et de valider les techniques d'extraction de sédiment et de fractionnement de l'échantillon en vue des tests de toxicité *in vivo*.

### **2.2.3. Résultats**

Cette approche a été développée sur du sédiment, il a donc fallu développer une technique d'extraction adaptée permettant d'extraire la plus large gamme de composés organique possible. La technique d'extraction choisie est l'extraction sous fluide pressurisé (ASE : Accelerated Solvent Extraction). Trois solvants de polarité croissante ont été choisis, le cyclohexane (apolaire), le dichlorométhane (polarisable) et le méthanol (polaire). Cela permet d'obtenir à partir d'un même échantillon, trois fractions de polarités différentes, qui vont contenir chacune des composés différents. La méthode d'extraction a été testée et validée sur des solutions de standards.

Ces fractions obtenues par ASE sont encore trop complexes pour être traitées directement par chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC). Une étape de fractionnement par extraction sur phase solide (SPE) a donc été développée. Deux types de colonne SPE ont été retenues, colonne NH2 et C18. Deux protocoles d'élution ont été développés sur les colonnes C18 et un sur colonne NH2. Le protocole de fractionnement permet à ce stade d'obtenir 9 fractions de polarité différentes à partir d'un même échantillon.

Le fractionnement HPLC a été développé pour augmenter le nombre de fractions, et affiner la caractérisation de la composition des différentes fractions. L'étape de fractionnement/purification par HPLC a été réalisée sur une colonne Waters Spherisorb ODS-2 (5µm particle size, 250mm x 4.6mm) avec un gradient d'élution Méthanol/Eau. L'analyse de solution de standards a permis de définir 4 fractions bien distinctes contenant chacune des composés spécifiques. Cette étape de fractionnement par HPLC demande à être encore améliorée, elle pourra conduire à terme à plusieurs dizaines de fractions. Le principe global de fractionnement (ASE + SPE + HPLC) est synthétisé dans la Figure 30. Une fois, cette méthodologie de fractionnement développée, les biotests peuvent être mis en oeuvre à chaque étape de fractionnement.

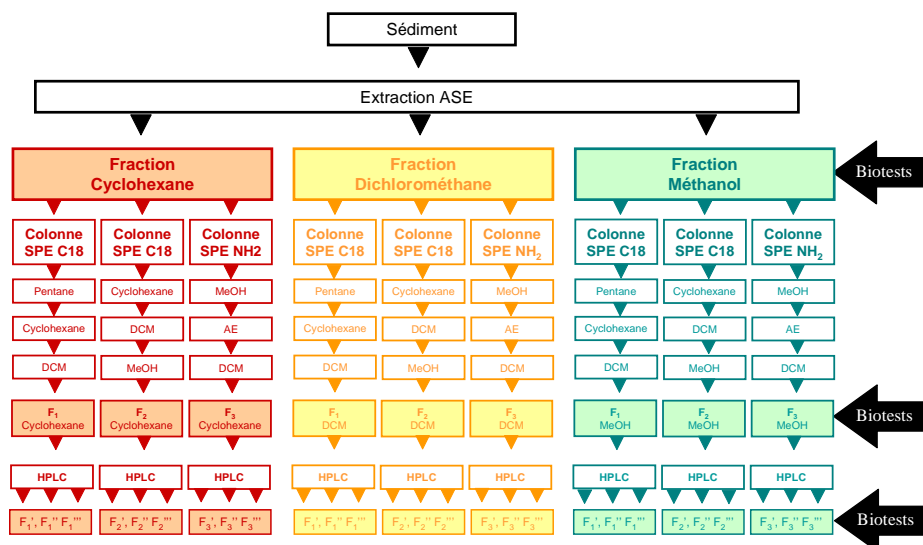


Figure 30 : Schéma de principe de la méthode de fractionnement développer pour la TIE

## 2.3. Etude des pesticides

Le but est ici de caractériser les niveaux de pesticides sur le continuum eau douce / eau marine et d'en identifier/hierarchiser les sources principales. Ce volet d'étude implique les équipes du LPTC/ISM UMR 5255 et du CEMAGREF (U.R. REQE).

### 2.3.1. Contexte

En complément de l'approche multi-résidus, une attention particulière a été portée à l'étude des pesticides. La nature et les teneurs des pesticides retrouvés dans le bassin sont peu documentées alors que ces composés sont fortement suspectés d'avoir un impact négatif sur cet écosystème (Auby et al, 2004). Les origines des pesticides peuvent être très diverses : agriculture, sylviculture, urbanisme et industrie, entretien des routes et des espaces verts, démoustication et lutte anti-termite, nautisme... La détermination des molécules trouvées dans les cours d'eau et dans le bassin et les moments où on les détecte dans les milieux devrait permettre de mieux cibler les usages à risque.

### 2.3.2. Objectifs

Les objectifs généraux de cette action sont d'identifier et de quantifier les pesticides présents dans les eaux du Bassin d'Arcachon, d'en identifier les sources, d'étudier leur dynamique dans cet hydro-système et leur transfert vers l'huître. Les POCIS seront mis en œuvre afin de tester et valider leur intérêt comme outil de surveillance de routine de la contamination de la colonne d'eau, tant en eau douce qu'en eau marine. L'ensemble des ces travaux sur les pesticides posera les bases d'un réseau « Pesticides » qui pourrait être piloté par l'IFREMER pour un meilleur suivi de la qualité des eaux du Bassin d'Arcachon.

### 2.3.3. Résultats

La première année de ce programme a nécessité des développements méthodologiques afin de pouvoir analyser les différentes matrices (eau et sédiments). Le suivi des pesticides dans la colonne d'eau a été réalisé grâce à des échantillonneurs passifs de type POCIS. L'utilisation des échantillonneurs passifs est détaillée dans un livrable commun LPTC/ISM et du CEMAGREF (U.R. REQE).

#### 2.3.3.1. Caractérisation des apports par les tributaires

##### Echantillonnage passif de la colonne d'eau

Les échantillonneurs de type POCIS ont été utilisés pour le suivi des concentrations en herbicides dans les eaux des tributaires.



**Figure 31.** Localisation des points d'exposition des POCIS (1. Craste de Nézer, 2. Canal des Landes, 3. Bourg, 4. Leyre, 5. Ponteils, 6. Lanton, 7. Betey, 8. Cirès, 9. Canal des Etangs).

Les stations suivies sont indiquées dans la Figure 31. Les POCIS ont été disposés en duplicats dans des cages en polyéthylène pour les protéger. Dans ce premier screening, 26 herbicides, fongicides, insecticides ont été suivis. Parmi les herbicides, des familles telles que les triazines (l'hexazinone, l'atrazine, simazine, terbuthylazine, la DEA, la DIA et la DET), les chloroacétanilides (alachlore, acétochlore, S-métolachlore et métazachlore) et d'autres herbicides plus hydrophobes comme la trifluraline, la pendiméthaline et l'acélonifén ont été suivis. Certaines substances actives, dont le S-métolachlore, se sont d'ailleurs substituées aux triazines aujourd'hui interdites. Aucun composé n'a été détecté hormis le S-métolachlore, dont les concentrations moyennes dans les eaux ont été estimées à 17 ng.L<sup>-1</sup> à Bourg, 98 ng.L<sup>-1</sup> pour la Leyre, 12 ng.L<sup>-1</sup> à Lanton, 24 ng.L<sup>-1</sup> pour le Cirès et 12 ng.L<sup>-1</sup> pour le canal des Etangs. Ces observations concordent avec les résultats des campagnes réalisées en 2006. Il s'agit ici d'une première approche semi-quantitative puisque aucun effet lié aux conditions environnementales (température, hydrodynamisme, turbidité) et agissant sur les cinétiques d'accumulation des contaminants dans les POCIS n'a été corrigé. Des résultats quantitatifs seront envisageables en 2009 avec l'utilisation de POCIS dopés avec un composé de référence et de performance déjà validé sur d'autres sites d'étude comme la Charente. D'autres composés d'intérêt comme le diuron seront également rajoutés à la liste des composés analysés.

### **Analyse des sédiments des cours d'eau :**

Des sédiments ont été collectés le 9 juillet 2008 au niveau du canal des Etangs, de la Leyre et du canal des Landes. Ils sont constitués essentiellement de sable (plus de 95 %) et contiennent assez peu de matière organique (1,5 % en moyenne). Les sédiments ont été tamisés, séchés puis extraits au moyen de solvants sous pression (ASE) et analysés par chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectrométrie de masse. L'analyse des sédiments prélevés au niveau du canal des Etangs ou des Landes n'a pas révélé la présence de résidus de pesticides (concentrations inférieures aux limites de détection : 0,4 à 5 ng.g<sup>-1</sup>). Certains composés comme le carbaryl (insecticide), l'hexazinone (herbicide) et l'azoxystrobine (fongicide) ont été détectés mais non quantifiés (limites de quantification de 1 à 15 ng.g<sup>-1</sup>). Seul l'acélonifén, un herbicide utilisé essentiellement pour le désherbage des cultures de maïs et du tournesol, mais aussi de la vigne et des cultures légumières, a pu être dosé à très faible niveau (1,4 ng.g<sup>-1</sup>) dans les sédiments de la Leyre. L'acélonifén est peu soluble dans l'eau (2,5 mg.L<sup>-1</sup>), peu mobile (K<sub>oc</sub>=5318-12164) et relativement persistant (DT<sub>50</sub>=92-150 jours), ce qui peut expliquer sa présence dans les sédiments de ce cours d'eau.

Une campagne d'échantillonnage a été réalisée en décembre 2008 afin de caractériser d'éventuelles pollutions péri-urbaines. Un suivi trimestriel est envisagé à partir du printemps et jusqu'à la fin 2009.



### 2.3.3.2. Caractérisation des niveaux de contamination intrabassin

Parallèlement au premier suivi des apports en pesticides par les tributaires, un screening de la teneur en pesticides dans les eaux du bassin a été réalisée. Des POCIS ont été déployées sur trois points dans le Bassin d'Arcachon (Port d'Arcachon, La Vigne et Eyrac) sur deux périodes d'échantillonnage (printemps et été 2008). Au total 27 molécules appartenant aux familles des triazines, chloroacétanilides et phénylurées ont été recherchées, 23 d'entre elles ont été retrouvées dont certaines à l'état de traces.

**Tableau 3 :** Concentrations en pesticides retrouvés dans les 3 sites échantillonnés au printemps et à l'été

	Eyrac Avril 2008 (ng.L <sup>-1</sup> )	Eyrac Juillet 2008 (ng.L <sup>-1</sup> )	La Vigne Avril 2008 (ng.L <sup>-1</sup> )	La Vigne Juillet 2008 (ng.L <sup>-1</sup> )	Arcachon Juillet 2008 (ng.L <sup>-1</sup> )
Atrazine	1,44	0,51	4,55	0,39	0,44
Cyanazine	nd	nd	nd	1,18	nd
Diuron	3,10	4,35	0,90	6,40	35,13
Irgarol	1,96	2,58	3,05	7,65	32,23
Metoxuron	nd	nd	0,00	nd	nd
Nicosulfuron	0,91	nd	1,10	0,26	0,45
Promethryn	nd	nd	3,03	nd	nd
Propachlor	1,90	nd	nd	nd	nd
Propazine	1,91	0,03	3,73	23,88	nd
Simazine	0,78	0,12	nd	nd	nd
S-Metolachlor	11,71	6,46	9,17	5,76	10,22
Terbuthryn	nd	nd	2,84	nd	nd
Terbuthylazin	0,50	0,17	4,98	0,48	0,53

Parmi les molécules retrouvées à des concentrations significatives, on retrouve le S métolachlor, déjà détecté au niveau des tributaires. Sa concentration dans les eaux du bassin varie de 5,7 à 11,7 ng.L<sup>-1</sup>. Deux autres molécules utilisées dans la formulation des peintures antifouling, le diuron et l'irgarol, ont également été détectées à des niveaux de concentration allant du nanogramme à la trentaine de nanogrammes par litre dans le port d'Arcachon (Tableau 3).

## 3. Etude des éléments biogènes

### 3.1. Contexte

Les éléments biogènes sur lesquels nous travaillons sont les composés du carbone, de l'azote et du phosphore. Des fertilisations excessives en azote et phosphore, conduisent à une eutrophisation du milieu. L'eutrophisation se traduit par un enrichissement de la production primaire principalement sous la forme de macroalgues. Le dopage est en effet sélectif et profite surtout aux espèces les plus opportunistes. Dans ces conditions, l'eutrophisation représente une menace pour la biodiversité des écosystèmes naturels et représente un dysfonctionnement majeur d'un écosystème. L'eutrophisation du Bassin d'Arcachon est modérée mais réelle. C'est dans les années 1980 que sont recensés les premiers cas de prolifération de l'algue filamenteuse *Enteromorpha clathrata*, prolifération limitée à la saison printanière. A partir de 1988, l'espèce *Monostroma obscurum* apparaît et prolifère du printemps à l'automne.

### 3.2. Objectifs

Les mécanismes de transfert des nutriments vers le Bassin d'Arcachon sont variés. D'une manière générale, ils ont soit une origine autochtone, soit une origine allochtone. L'origine allochtone (rivières, pluie) est le sujet de la thèse de Mathieu Canton à l'Université Bordeaux 1 financée par la Région Aquitaine dans le cadre du projet 2006 "RESEAU DE RECHERCHE LITTORALE" Qualité des espaces littoraux en Aquitaine et Pays Basque espagnol : Flux de contaminants et évolution du trait de côte". La soutenance est prévue en fin 2009. Une partie des flux autochtones, issus des échanges entre le sédiment du bassin d'Arcachon et la colonne d'eau, ont fait l'objet de la thèse de Jonathan Deborde, soutenue en décembre 2007.

Quatre points majeurs ont été abordés :

- 1) L'évolution des flux d'azote et de phosphore du bassin versant
- 2) L'étude de Ponteil (bassin versant du CET d'Audenge)
- 3) La transformation des composés liés à l'azote, carbone et phosphore aux embouchures des rivières
- 4) Le rôle de la marée sur les flux à l'interface eau-sédiment des composés biogènes.

### **3.3. Résultats**

#### **3.3.1. Point 1**

Nous avons constaté une typologie marquée des différents bassins versants. La Leyre, le plus grand bassin versant, est clairement affectée par les activités agricoles en amont. Les concentrations en nitrate sont de l'ordre de 100 à 150  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (1,5 à 2  $\text{mg.L}^{-1}$ ). L'évolution annuelle des concentrations semble davantage dépendre de la saison que du débit du fleuve. En effet on constate un minimum estival de nitrate alors que le fleuve est en étiage estival et automnal. Si les concentrations en nitrate sont peu influencées par le débit du fleuve, le flux d'azote en revanche est maximal lors des crues.

Le Passaduy est un bassin versant de petite taille, influencé par le domaine agricole de Certelandes. Les concentrations en nitrate atteignent 200  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (2,8  $\text{mg.L}^{-1}$ ) et sont élevées de janvier à juin, indépendamment du débit du cours d'eau. Le Cirès est le bassin versant le plus concentré en nitrate avec des maxima de plus de 600  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (8  $\text{mg.L}^{-1}$ ). Il est également très hétérogène pendant l'année. A travers ces quelques exemples, on constate que les activités agricoles impactent clairement les cours d'eau, avec des effets saisonniers très marqués liés aux pratiques culturales. Le canal des Landes est un bassin versant de type indirect puisque les eaux transitent par le lac de Lacanau. Les concentrations en nitrates sont homogènes et faibles, de même pour le Tagon qui est un petit bassin versant forestier.

Sur une année hydrologique, le flux d'azote dissous a été estimé à 630 tonnes et le flux de phosphore à 3,8 tonne pour la Leyre. Les autres bassins versants représentent 41 tonnes d'azote et 0,2 tonnes de phosphore. Une crue d'hivers échantillonnée en 2008 permettra de préciser ces chiffres.

#### **3.3.2. Point 2**

Le suivi régulier du bassin versant du Ponteil a montré des concentrations en ammonium nettement supérieures à celles mesurées dans les autres bassins versants en période estivale. Nous nous sommes donc focalisés sur celui-ci.

La concentration en ammonium augmente dans la rivière en aval du CET. Cette augmentation est régulière et traduit un enrichissement continu en ammonium qui pourrait être attribué à un écoulement continu de la nappe superficielle vers le cours d'eau. Le rôle de la nappe dans l'alimentation du cours d'eau a été démontré dans nos dernières campagnes de mesures où nous avons observé une augmentation du débit du Ponteil de l'amont vers l'aval malgré l'absence d'affluents. Des carottes sédimentaires prélevées dans le lit de la rivière confirment l'existence de flux d'ammonium du sol vers le cours d'eau.

Une petite partie de l'ammonium est oxydée en nitrate dans la rivière. Les effets de la contamination en ammonium sont pour l'instant très modérés puisque seule une partie de l'ammonium présent dans la nappe diffuse dans le cours d'eau. En période de hautes eaux, la quantité d'ammonium diffusée est presque négligeable par rapport à l'effet de dilution. En étiage en revanche, on observe une augmentation significative de l'ammonium dissous dans le Ponteil. Une atténuation naturelle du stock d'ammonium semble impossible au regard du très faible taux de nitrification que nous avons observé dans la nappe.

Bien que les effets actuels de cette pollution soient négligeables, la question mérite d'être posée pour le futur. En effet, hormis le drainage de la nappe par la rivière, celle-ci s'écoule également vers le Bassin d'Arcachon. A terme, la nappe contaminée pourrait donc se déverser directement dans le Bassin d'Arcachon. Une modélisation hydrologique permettrait de quantifier les effets à long terme de la contamination.



### 3.3.3. Point 3

Les bilans de masse de nutriments en aval des bassins versants, tels que nous les avons présentés dans la première partie, ne sont pas forcément représentatifs de la quantité réellement disponible dans le Bassin d'Arcachon. En effet les zones de transitions entre les cours d'eau et le Bassin d'Arcachon représentent des réacteurs biogéochimiques qui peuvent être efficaces, notamment si le temps de résidence des masses d'eaux est suffisamment long.

Un échantillonnage saisonnier a été réalisé dans l'estuaire de la Leyre en 2007-2008. Le contenu biogène dissous (nitrate, ammonium, nitrite, phosphate et silice) et particulaire (azote, phosphore) a été analysé. Les rapports isotopiques  $\delta^{13}\text{C}$  et  $\delta^{15}\text{N}$  ont également été mesurés sur les matières en suspension. Ponctuellement, nous nous sommes intéressés à l'estuaire du Cirès et du domaine de Certes qui est commun à quatre bassins versants dont celui du Ponteil et du Passaduy.

En juin et septembre, l'estuaire supérieur de la Leyre est une zone de nitrification de l'ammonium et de l'azote organique. Dans sa partie inférieure, entre les salinités 5 et 30, on observe une dilution du stock de nitrate par les eaux du Bassin d'Arcachon qui se traduit par une diminution relativement linéaire de la concentration. En début d'estuaire, une augmentation du temps de résidence des masses d'eau et des conditions redox favorables, permettent une oxydation efficace de l'azote réduit (azote organique, ammonium) en nitrate. En revanche, il n'existe pas de processus d'atténuation pour le nitrate. Les flux entrants de nitrate sont donc intégralement biodisponibles dans le Bassin d'Arcachon.

On remarque que les eaux continentales comme les eaux du Bassin d'Arcachon contiennent un stock d'azote organique dissous non négligeable. Pour le Bassin d'Arcachon, il s'agit même de la forme d'azote majoritaire. En revanche il n'y a aucun mélange entre ces deux stocks car, quelle que soit la saison, on remarque que l'azote organique dissous issu du continent disparaît entre les points de salinité 0 et 5. Cela confirme le caractère oxydant du début de l'estuaire.

La lecture de l'estuaire du Ponteil est un peu plus difficile car il est commun à plusieurs bassins versants dont le Passaduy. On remarque toutefois que la concentration en ammonium diminue fortement dans le Ponteil au tout début de l'estuaire, dans la zone de salinité nulle. Parallèlement, la concentration en nitrate augmente, entre la partie fluviale et le début de l'estuaire. On a là deux effets qui se conjuguent. D'une part l'ammonium du Ponteil est dilué par les eaux du Passaduy. D'autre part, le début de l'estuaire est favorable à une nitrification intense de l'ammonium qui se traduit par une augmentation de la concentration en nitrate.

Le rapport C/N de la matière organique des particules en suspension évolue de 12 dans la partie fluviale à 6 à la fin de l'estuaire. Il reflète deux sources de matière organique : matière organique continentale avec un rapport C/N élevé et matière organique marine avec un rapport proche du rapport de Redfield. De la même manière, le  $\delta^{13}\text{C}$  est plus faible dans la partie fluviale, typique de matière organique continentale (débris végétaux et algues de rivière). Il augmente dans le long du gradient de salinité jusqu'à atteindre une valeur typique du phytoplancton marin.

### 3.3.4. Point 4

Il a été démontré que les eaux des chenaux tidaux drainant les platiers intertidaux à marée descendante étaient le résultat de la percolation, diffusion et advection d'eaux interstitielles anoxiques depuis les sédiments vaseux et sableux. Ces eaux sont enrichies en produits de dégradation de la matière organique, tels que l'ammonium, les phosphates, le  $\text{CO}_2$ , le  $\text{CH}_4$  et les métaux dissous. Un premier essai de bilan à l'échelle de la lagune démontre l'importance de ce processus de pompage tidal dans le budget global en sels nutritifs de la lagune.

La colonisation du substrat par les herbiers de zostères apparaît comme un facteur déterminant sur les associations biologiques et les distributions géochimiques des espèces biogènes. Une stratification de l'eau interstitielle est observée sur certains profils reflétant leur production, leur consommation par les processus de minéralisation de la matière organique, leur prélèvement par le système racinaire des zostères, et des mécanismes de transports biologiques ou physiques. A la différence des sédiments subtidaux et stationnaires, dans lesquels la diffusion moléculaire est le premier mécanisme de transport des solutés, la distribution verticale géochimique dans les sédiments intertidaux est dominée par la bioirrigation et les interactions avec les zostères, conférant une très forte hétérogénéité spatiale et

saisonnière. Une interaction très forte entre les cycles du fer et du phosphore avec la dynamique annuelle de ces herbiers a été découverte, précisant que le rapport entre la surface couverte par les herbiers et celle non-végétalisée est un paramètre majeur du bilan de masse en phosphore dans le Bassin d'Arcachon.

## **4. Etude des apports microbiologiques**

### **4.1. Contexte**

Les sources de pollution microbienne sont nombreuses mais souvent ponctuelles. Ces apports bactériens peuvent représenter un risque sanitaire pour l'Homme, en affectant la qualité des eaux de baignades (maladies liées à l'ingestion ou au contact cutané) ou à travers la consommation de coquillages. La détermination de la qualité des eaux de baignade (directive européenne 76/160/CEE du 8 décembre 1975) et de la qualité des coquillages (Directive européenne 91/492/CEE du 15 juillet 1991, modifiée par la Directive du Conseil 97/61/CE du 20 octobre 1997, Décret 94-340 du 28 avril 1994 modifié, Arrêté du 21 mai 1999) repose donc (pour partie dans le cas des eaux de baignade) sur des critères microbiologiques. Cette qualité microbiologique est définie sous forme de classements basés sur l'abondance de germes témoins de contamination fécale, tels que les coliformes fécaux ou les entérocoques. Ces microorganismes sont associés aux rejets fécaux d'origine humaine ou animale. Leur présence est utilisée comme indicateur de la présence potentielle de pathogènes entériques susceptibles d'affecter la santé des personnes exposées.

Pour le Bassin d'Arcachon, le contrôle de la qualité des eaux de baignade est organisé par le SIBA (Syndicat Intercommunal du Bassin d'Arcachon) pour le compte de la D.D.A.S.S. de la Gironde. De mai à octobre depuis 1977, avec une fréquence hebdomadaire, 24 sites répartis dans la zone Bassin d'Arcachon sont surveillés. Parallèlement, depuis 1989, la station Ifremer d'Arcachon gère le Réseau de contrôle microbiologique (REMI) dont les objectifs sont le classement et le suivi microbiologiques des zones de production conchylicole. Le contrôle sanitaire se fonde sur le dénombrement des bactéries *E. coli* dans certains bivalves (huîtres, moules, palourdes, ou coques) sur 20 points situés dans la zone Bassin d'Arcachon. Les différents résultats obtenus par ces deux réseaux indiquent que la qualité microbiologique globale du Bassin d'Arcachon est satisfaisante, malgré quelques épisodes ponctuels de contamination microbiologique.

### **4.2. Objectifs**

Au vu de l'ensemble de ces données, il ne nous semblait donc pas nécessaire de mettre en place un autre suivi de contamination bactériologique d'origine anthropique qui aurait pu entraîner des doublons inutiles : les réseaux de mesure existants (24 points de contrôle SIBA et 20 points du réseau REMI) semblant largement suffisants. Toutefois, ces 2 réseaux de surveillance étant déconnectés l'un de l'autre, il nous a paru intéressant de collecter les données de 2 suivis (SIBA et REMI) sur les 10 dernières années afin d'établir une banque de données brutes. L'analyse de cette banque de données nous a permis :

(i) de documenter un état des lieux du système ("point zéro") indépendamment des seuils fixés par la législation,

(ii) de mettre en évidence des sites et/ou périodes dont le niveau de contamination est plus marqué. Cette identification des zones et/ou périodes à risque pourra nous permettre dans un 2ème temps de mieux comprendre le déterminisme des apports de bactéries témoins de contamination fécale et d'anticiper sur une dégradation du système.

### **4.3. Résultats**

La banque de données collectées se compose de :

- 7000 données « Qualité des eaux de baignade » (SIBA-DDASS), correspondant à 8 années de prélèvement (2000 à 2007) sur 23 sites (sites d'eaux marines exclusivement ; site d'eau douce de Cazaux non considéré). La fréquence des prélèvements est de 12 par site et par année de mai à octobre. Trois marqueurs bactériens témoins de contamination fécale sont dénombrés (pour 100 mL d'eau) : les coliformes fécaux, *Escherichia coli* et les streptocoques fécaux (remerciements : P. Capdeville, SIBA).

- 2350 données « Qualité des coquillages » (REMI-Ifremer), correspondant à 10 années de prélèvement sur 22 sites (1998 à 2007). La fréquence des prélèvements est de 1 par site et par mois sur l'ensemble de l'année. Un seul marqueur bactérien témoin de contamination fécale est dénombré (pour 100g de CLI : Chair et Liquide Intervalaire) : *Escherichia coli* (remerciements : I. Auby, Ifremer Arcachon).

Afin de pouvoir comparer les données SIBA et REMI, nous avons analysé uniquement le marqueur bactérien *E. coli* (Ec), commun aux 2 suivis. Enfin pour les analyses statistiques des données SIBA, nous avons transformé les valeurs <15 Ec / 100mL en 15 Ec pour 100mL. Ces valeurs <15 Ec pour 100mL correspondent au seuil de détection de la méthode de dénombrement utilisée (norme NF EN ISO 9308-3).

Les bactéries témoins de contamination fécale sont des bactéries allochtones dont la concentration dans le milieu résulte du ratio : quantité des apports / (niveau de dispersion + mortalité des bactéries allochtones). Dans notre étude nous avons considéré que la mortalité de ces bactéries était équivalente en tout point du Bassin.

L'analyse des données a été conduite dans 2 optiques :

- mettre en évidence des sites plus marqués par une contamination fécale (analyse spatiale)
- rechercher l'existence de périodes plus sensibles (analyse temporelle).

Ces analyses ont été réalisées en utilisant comme paramètre discriminant le quartile 75% qui permet de séparer les données en groupes, et déterminer les 25% de données les plus élevées.

#### 4.3.1. Analyse spatiale

L'analyse des données SIBA montre une répartition géographique en 3 zones :

- la zone 1 constituée de 9 points situés sur la façade océanique pour lesquels 75% des données sont inférieures ou égales à 15 *E. coli* pour 100mL d'eau. Cette zone 1, sous influence océanique marquée, est caractérisée par des faibles apports en bactéries allochtones et une forte dispersion (hydrodynamisme important).

- la zone 2, nettement différenciée, constituée de 7 points situés essentiellement dans la partie intrabassin sud-ouest, pour lesquels 25% des données sont supérieures à 60 *E. coli* pour 100mL d'eau. Cette zone 2, sous influence plus continentale, est caractérisée par des apports plus importants en bactéries allochtones et/ou une plus faible dispersion de ces apports (hydrodynamisme local plus faible).

- une zone intermédiaire constituée des 7 points restants.

L'analyse des données REMI montre une répartition géographique plus complexe :

- la zone 1 constituée de 9 points répartis dans tout le bassin pour lesquels 75% des données sont inférieures ou égales à 100 *E. coli* pour 100g de CLI. Cette zone ne contient que des sites « filtreurs » (huîtres et moules).

- la zone 2 constituée de 4 points (Herbe, Loscle, La Touze et Banc des Chiens) pour lesquels 25% des valeurs sont supérieures ou égales à 400 *E. coli* pour 100g de CLI. Trois de ces 4 sites correspondent à des sites « fousseurs » (coques et palourdes) : Loscle, La Touze et Banc des Chiens.

Ce niveau de contamination plus important des sites « fousseurs » est-il lié à la position de vie des bivalves : pleine eau pour les filtreurs (huîtres et moules), sédiments pour les fousseurs (coques et palourdes) ?

L'analyse des 17 sites « filtreurs » seuls montre que 3 d'entre eux sont plus impactés (quartile 75%  $\geq$  à 300 *E. coli* pour 100g de CLI) : Herbe, Comprian, Piraillan. Ce niveau de contamination plus important de ces 3 sites est-il lié à une source de contamination fécale proche et plus importante et/ou à un faible hydrodynamisme local ?

#### 4.3.2. Analyse temporelle

L'analyse de l'ensemble des données SIBA sur les 8 années (2000 à 2007) ne montre aucune différence interannuelle significative. En revanche, l'analyse des données cumulées sur les 8 années

montre que les mois de juillet et août présentent un quartile 75% supérieur (45 E. coli pour 100mL d'eau) aux autres mois (< 30 E. coli pour 100mL).

En ce qui concerne le réseau REMI, l'analyse des données cumulées sur les 10 années (1998 à 2007) montre que les mois d'août et septembre présentent un quartile 75% très nettement supérieur (> 340 E. coli pour 100g de CLI) aux autres mois (< 150 E. coli pour 100g de CLI). Cette tendance est amplifiée au niveau des 4 sites « fouisseurs » (coques / palourdes).

L'augmentation de la fréquentation touristique sur les mois d'été (juillet à septembre) explique-t-elle à elle seule cette différence significative observée à la fois sur les données SIBA et REMI ?

Les bivalves sont des organismes intégrateurs des fluctuations en bactéries dans l'eau, donc également en bactéries allochtones, mais pourquoi les bivalves de type fouisseurs (coques / palourdes) sont-ils plus impactés que les bivalves filtreurs (huîtres / moules) ? Cette sensibilité est-elle en relation avec leur position de vie enfouie dans le sédiment ?

### **Conclusions et Perspectives**

Les concentrations en bactéries allochtones sont nettement influencées par le phénomène de dispersion aussi bien sur les sites océaniques moins impactés, caractérisés par un hydrodynamisme fort, que sur les sites « intra-bassin » plus impactés, pour lesquels l'hydrodynamisme peut être plus faible.

La contamination bactériologique d'origine fécale plus marquée durant les mois d'été (juillet à septembre) semble être associée avant tout à l'augmentation de la fréquentation touristique et à la diminution de la pluviométrie. En effet, la diminution des apports continentaux (pluies, débits des intrants) peut limiter la dilution et la dispersion des bactéries allochtones. Ces 2 hypothèses expliquent-elles à elles seules le phénomène observé ?

Les bivalves fouisseurs apparaissent plus « sensibles » que les bivalves filtreurs. Leur position de vie dans le sédiment leur confère-t-elle la qualité de « détecteurs » de bactéries allochtones présentes dans le sédiment ? Dans ce cas, les sédiments sont-ils le réservoir de bactéries allochtones simplement en survie ou au contraire naturalisées dans ce nouvel habitat écologique ?

La recherche de coexistences de dates associées à des coups de vent ou des tempêtes (qui auraient pu remettre en suspension les bactéries naturalisées dans le sédiment) et de pics de contamination en bactéries allochtones permettra de renforcer l'hypothèse des sédiments « réservoir » de bactéries allochtones.

Le marqueur « streptocoques fécaux » (données SIBA) sera analysé pour savoir si celui-ci est un marqueur plus sensible car leur survie est connue pour être différente en milieu marin de celle des E. coli.

L'identification des sources de contamination fécale par « *microbial source tracking* » a été proposée dans le projet Région « OSQUAR » (proposition 2009).

## **5. Conclusion**

La première année s'est déroulée en phase avec le calendrier prévisionnel proposé. Les campagnes terrain se poursuivent lors de la seconde année. Les traitements des échantillons initiés en première année se poursuivent en seconde année. Des résultats d'ors et déjà prometteurs ont été générés notamment dans l'approche couplage Chimie/Biologie montrant clairement la présence d'une contamination en Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques associées à des réponses biologiques. Les développements sur les capteurs passifs ont été couronnés de succès et la seconde année est consacrée à la mise en place du suivi des pesticides utilisant ces outils à l'échelle du Bassin d'Arcachon et de ses tributaires.

Au-delà des résultats scientifiques à proprement parlé ce projet a permis de fédérer une communauté de chercheurs réunis autour du même objet et focalisés sur les mêmes questions. Une synergie a opéré et un des résultats à mettre au profit du projet a été le dépôt en mars dans le cadre de l'appel d'offre de l'ANR CES d'un projet piloté par P. Gonzalez et associant une majorité des acteurs du Projet Région.

### **Références**

AFSSA 2003-SA-0007. Avis de l'agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'évaluation des risques sanitaires qui pourraient résulter de la contamination des produits de la mer destinés à la consommation humaine, suite au naufrage du pétrolier Prestige

Auby I, Maurier D., 2004. Rapport étude Ifremer arcachon 1999-2003 : étude de la reproduction de l'huître creuse dans le bassin d'Arcachon. 203pp.

Amiard J. C., Amiard-Triquet C., Barka S., Pellerin J., Rainbow P.S. (2006). Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic toxicology*, 76 : 160-202.

Baudrimont, M., Lemaire-Gony, S., Métivaud, J., Ribeyre, F. and Boudou, A. (1997). Seasonal variations of metallothionein concentrations in the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 118C (3): 361-367.

Baudrimont M., Boutet I., Moraga D., Bourdineaud JP. and Boudou A. (2006). Metallothionein gene expression and protein levels in triploid and diploid oysters *Crassostrea gigas* after exposure to cadmium and zinc. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25, 412-418.

Marie V. 2005. Etude de la réponse des métallothionéines chez les bivalves *Corbicula fluminea*, *Dreissena polymorpha* et *Crassostrea gigas*, après exposition au cadmium et au zinc. Approches in situ et expérimentales. Thèse de Doctorat de l'Université Bordeaux1.

Norberg-King T.J., Mount D.I. (1991) Methods for aquatic toxicity identification evaluations, phase I toxicity characterization procedures. EPA 600/6-91/003, U.S. Environmental Protection Agency, Environmental Research Laboratory, Duluth, MN, USA.

Stohs, S. J ; Bagchi, D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biol. Med*, 18, 321-336.

## VOLET « L'HUITRE DANS SON ENVIRONNEMENT »

Coordination : Isabelle AUBY, Guy BACHELET

L'objectif général de ce volet est d'acquérir une meilleure connaissance de l'écologie et du comportement de l'huître creuse *Crassostrea gigas* dans son environnement naturel (le Bassin d'Arcachon), hors contaminants. Nos travaux sont conduits selon 3 axes de recherche :

1. l'impact de l'environnement physico-chimique et biologique sur l'huître et, en retour, l'impact de l'huître sur son propre environnement, en privilégiant une approche comparative entre populations d'huîtres cultivées et populations d'huîtres sauvages, ces deux types de populations présentant des biomasses équivalentes dans le Bassin d'Arcachon ;
2. le développement d'un système d'analyse *in situ* du comportement de l'huître, basé sur la valvométrie, permettant de caractériser la variabilité naturelle des rythmes biologiques chez l'huître (ouverture et fermeture des valves) en liaison avec la variabilité de son environnement ;
3. la potentialité des substances phénoliques émises par les zostères, dont les herbiers constituent un patrimoine biologique de première importance dans le Bassin d'Arcachon, à inhiber le développement de microalgues, élément essentiel de l'alimentation des huîtres.

### **1. Impact de l'environnement physico-chimique et biologique sur l'huître et action en retour de l'huître sur son environnement**

(EPOC : Flora Salvo, Guy Bachelet, Yolanda Del Amo, Benoît Sautour – collab. : Antoine Grémare, Florence Jude, Jean-Charles Massabuau, Aldo Sottolichio)

Dans le Bassin d'Arcachon, l'huître *Crassostrea gigas* représente une ressource économique importante. Native du Pacifique NW, elle a été introduite sur les côtes européennes dans les années 1970 à des fins aquacoles, et s'est si bien acclimatée à nos eaux côtières qu'elle s'y reproduit de façon naturelle. A Arcachon, l'espèce existe ainsi sous deux formes : d'une part, cultivée sur tables ostréicoles, et, d'autre part, sous forme sauvage, constituant alors des récifs d'huîtres d'origine 'naturelle' ; il est possible que ces deux types de populations aient une écologie différente. Les objectifs de cet axe de recherche, qui constitue le travail de thèse de Flora SALVO (allocation de thèse du MESR), sont, en prenant en considération les deux types – cultivées et sauvages – de populations d'huîtres :

- (1) de caractériser les flux trophiques allant des différents compartiments planctoniques vers les populations d'huîtres ;
- (2) de quantifier l'impact des huîtres sur l'ensemble du pool nutritif présent dans la colonne d'eau ;
- (3) de déterminer la réponse fonctionnelle des communautés benthiques (macro- et méiofaune, microphytobenthos, bactéries totales) en réponse aux modifications des caractéristiques sédimentaires liées à l'activité des huîtres (production de fèces et pseudofèces).

Un site-atelier unique (crassat des Hosses, au SE de l'Ile aux Oiseaux) a été sélectionné pour ce travail. Pour mener à bien les objectifs (1) et (2), les huîtres et la colonne d'eau ont été suivies pendant un an et demi, à une fréquence bimensuelle, de manière à évaluer la ressource alimentaire disponible pour les huîtres et les conditions environnementales pouvant influencer sur leurs réactions physiologiques (indice de condition, gamétogénèse, croissance...). Par ailleurs, des tunnels benthiques ont été déployés au-dessus de récifs d'huîtres et de populations cultivées, à quatre périodes clés du cycle biologique des huîtres, afin de quantifier les flux nutritifs au cours d'un cycle de marée. L'ensemble des paramètres étudiés pour les objectifs (1) et (2) figure dans le **Tableau 4**. Pour répondre à l'objectif (3), une stratégie d'échantillonnage adaptée aux compartiments étudiés, a été appliquée pendant un an (de mai 2007 à mai 2008), sur 3

stations, espacées de quelques dizaines de mètres : station avec huîtres cultivées, station avec huîtres en récif et station sans huîtres (témoin).

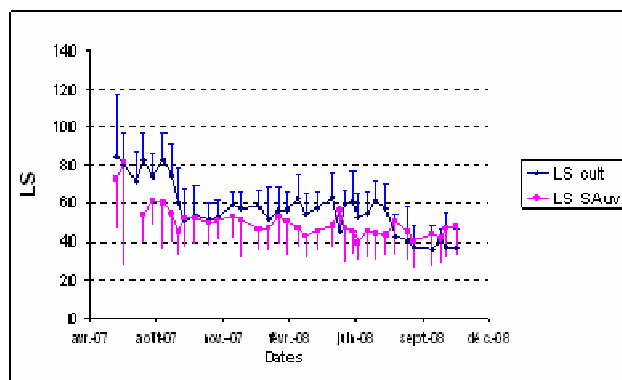
**Tableau 4.** Paramètres étudiés dans les compartiments huîtres et colonne d'eau. La trame jaune indique les éléments restant à analyser.

Paramètres	Huîtres cultivées (suivi bimensuel)	Huîtres sauvages (suivi bimensuel)	Colonne d'eau (suivi bimensuel)	Tunnel benthique
Indice de condition	N=30	N=30		
Isotope stable $\delta^{13}\text{C}$	N=5	N=15	MES	
Isotopes stables $\delta^{15}\text{N}$	N=5	N=15	MES	
Lipides, glucides, protéines	N=10	N=30 (3 lots de tailles différentes)		
Gamétogénèse	Toutes	Toutes		
MES			X	X
Chlorophylle <i>a</i>			X	X
COP			X	X
Phytoplancton			X	X
Microzooplancton			X	X
Zooplancton			X	
Température			X	X
Salinité			X	X
Valvométrie				X
Courantométrie				X

### 1.1. Effets des conditions environnementales sur l'évolution annuelle de l'état physiologique des huîtres

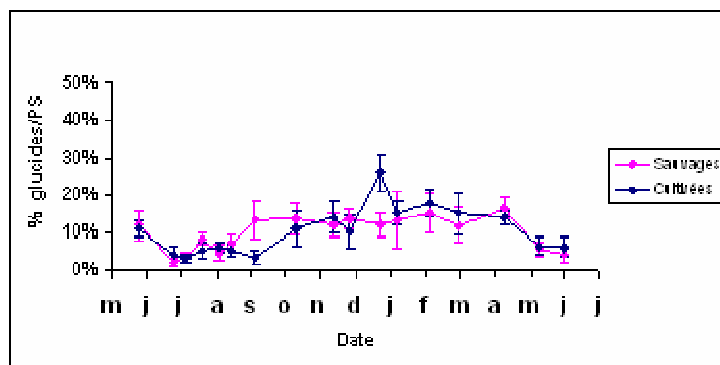
Un suivi bimensuel de 30 huîtres cultivées et 30 huîtres sauvages a été réalisé de mai 2007 à octobre 2008, afin de mettre en relation les variations physiologiques des huîtres en fonction des conditions environnementales. Le suivi des conditions environnementales a été effectué sur le même site à la même fréquence.

L'évolution de l'indice de condition permet d'évaluer l'évolution de la gamétogénèse et des pontes (**Figure 32**). En 2007, l'effort de reproduction a été plus important qu'en 2008 se traduisant par un indice de condition plus élevé ; par contre, les pontes ont été anormalement tardives (septembre) et ne semblent pas avoir été totales en 2007 chez les organismes cultivés. L'évolution saisonnière de l'indice de condition des huîtres sauvages est moins variable, ce qui signifie que l'effort de reproduction semble être plus faible chez ces individus.



**Figure 32.** Evolution de l'indice de condition de Lawrence et Scott (1982) (LS) calculé pour les huîtres cultivées (en bleu) et les huîtres sauvages (en rose), sur le site des Hosses de mai 2007 à octobre 2008. Barres verticales : écart-type par rapport à la moyenne.

L'indice de condition permet, chez les bivalves, de déterminer principalement les périodes de ponte, mais la condition physiologique des individus n'est pas prise en compte ; il est donc difficile d'interpréter le comportement réel des huîtres à partir de ce seul indice. L'analyse biochimique de la quantité de lipides, glucides et protéines est une approche qui permet d'évaluer le déroulement de la gamétogénèse d'une manière plus fiable. L'évolution des glucides observé entre 2007 et 2008 (**Figure 33**) correspond au schéma classique, à savoir une accumulation en période printanière, puis une diminution abrupte en mai correspondant à la transformation des glucides en lipides lors du développement de la gonade. Les huîtres sous forme cultivée ou sauvage répondent globalement de la même manière. Cependant, l'étude des lipides, pour valider ces données et déterminer plus en détail les périodes de pontes, n'a pas été encore réalisée.



**Figure 34.** Evolution de la quantité de glucides par poids sec des huîtres cultivées (en bleu) et des huîtres sauvages (en rose) sur le site des Hosses entre mai 2007 et juin 2008. Barres verticales : écart-type par rapport à la moyenne.

L'initiation et l'intensité de la gamétogénèse, ainsi que la ponte sont liées chez les huîtres à la température et aux ressources alimentaires disponibles pour les adultes. Grâce au suivi bimensuel du milieu, l'hypothèse d'un déficit alimentaire pendant ces périodes ou d'une année atypique concernant la qualité alimentaire a été rejetée en 2007 et 2008. Ces données seront confirmées avec la détermination des espèces planctoniques présentes dans le milieu. Par contre, une température anormalement élevée en avril 2007 et une température relativement faible et variable durant l'été 2007 ont été remarquées, pouvant expliquer le retard des pontes. Ce phénomène n'a pas été observé en 2008, les huîtres ayant eu un comportement plus 'classique', soit une ponte mi-juillet.

Le suivi des huîtres et ces diverses hypothèses seront confirmés par l'étude plus complète de la biochimie des huîtres. L'étude de la variation saisonnière des isotopes stables permettra aussi de déterminer la source alimentaire principale en fonction des saisons. En effet, l'étude des isotopes stables en  $\delta^{13}\text{C}$  et  $\delta^{15}\text{N}$  des huîtres cultivées et sauvages et des différentes sources de matière organique disponibles pour les huîtres permettra de mettre en évidence la source de nourriture préférentiellement assimilée par les huîtres au cours de l'année.

De plus, les résultats acquis avec les tunnels benthiques permettront d'évaluer quels compartiments planctoniques sont préférentiellement consommés par les huîtres.

## **1.2. Quantification de l'impact des huîtres sur le pool nutritif présent dans la colonne d'eau et évaluation des flux trophiques entre huîtres et colonne d'eau**

Pour évaluer l'impact des huîtres sur le pool alimentaire disponible et la matière en suspension, et quantifier les flux trophiques, des tunnels benthiques de 20 m de long ont été déployés sur les récifs d'huîtres sauvages et les tables ostréicoles (**Figure 35**). Les tunnels sont constitués de plaques de plexiglas transparent, fixées les unes aux autres pour assurer l'étanchéité du dispositif. La hauteur maximale de chaque tunnel est d'environ 1 m pour une largeur équivalente. Leur volume est de 15 m<sup>3</sup>, leur section verticale de 0,75 m<sup>2</sup> et leur surface au sol représente 20 m<sup>2</sup>.



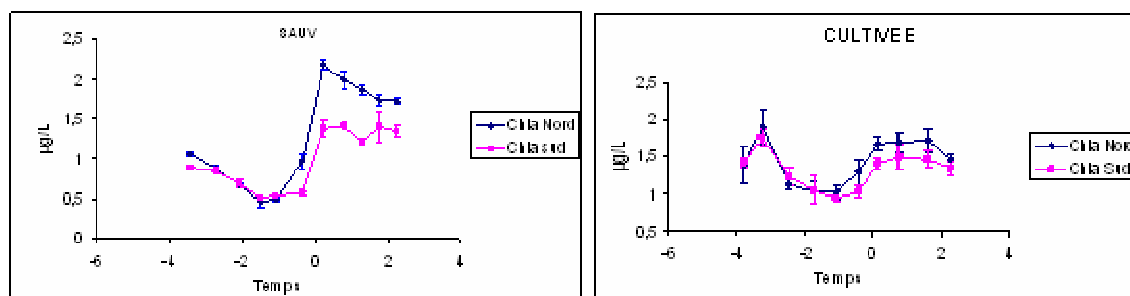
Des prélèvements d'eau ont été réalisés à chaque extrémité du tunnel, à intervalles réguliers (toutes les 30 minutes), durant un demi-cycle de marée (soit dès que l'eau recouvre le tunnel à marée montante jusqu'à ce que le tunnel se découvre lors de la marée descendante suivante). Les consommations ou excréctions de substances sont évaluées en mesurant les différences de concentration entre la masse d'eau entrant dans le tunnel et la masse d'eau en sortant. Les flux trophiques sont estimés en appliquant ces différences de concentration au volume d'eau transitant dans les tunnels (mesure de la vitesse du courant). Les temps de prélèvement se situent généralement entre 3 h avant et 3 h après la pleine mer. Ces opérations ont été réalisées aux mois de mars, mai, juillet et octobre 2008, soit à quatre périodes différentes du cycle physiologique des huîtres.

Des différences de concentrations particulières ont été mises en évidence à toutes les périodes échantillonnées. Dans le cas de la chlorophylle *a*, par exemple (**Figure 36**), la différence entre les deux courbes indique une consommation de chlorophylle *a* par le système huîtres/sédiment (la chlorophylle *a* étant un indicateur de la biomasse phytoplanctonique du système). Cette différence s'accroît 1 h avant la pleine mer. Les flux trophiques seront ensuite calculés lorsque les données sur la vitesse des courants seront disponibles.

La détermination des espèces phytoplanctoniques et microzooplanctoniques permettra d'évaluer quelles proies sont préférentiellement consommées. Les données acquises en valvométrie permettront également de connaître à quel(s) moment(s) de la marée les huîtres sont ouvertes, et donc susceptibles de se nourrir.



**Figure 35.** Vue d'un tunnel benthique à marée basse, déployé au-dessus d'un récif d'huîtres.



**Figure 36.** Evolution de la chlorophylle *a* sur les huîtres sauvages (SAUV) et cultivées (CULTIVEE) à l'entrée et à la sortie du tunnel benthique au cours d'une marée les 21 et 23 mai 2008. En abscisses, 0 indique la pleine mer, 2 la pleine mer + 2 heures, etc. La courbe rose représente les concentrations mesurées à l'extrémité sud du tunnel (i.e. l'eau entrant pendant le flot [valeurs négatives en abscisses] et l'eau sortant pendant le jusant [valeurs positives en

abscisses]). La courbe bleu représente les concentrations mesurées à l'extrémité nord du tunnel (i.e. l'eau sortant pendant le flot [valeurs négatives en abscisses] et l'eau entrant pendant le jusant [valeurs positives en abscisses]).

### 1.3. Impact de la présence d'huîtres sur les communautés benthiques

Par leur activité de filtration des particules en suspension dans la colonne d'eau, leur production de fèces et pseudofèces, les huîtres augmentent la sédimentation de particules fines, et une tendance à l'envasement est généralement observée dans les milieux où elles sont présentes.

Par ailleurs, les récifs sauvages offrent un habitat particulier à de nombreux organismes, trouvant refuge dans les interstices entre les huîtres ou vivant en épibiontes sur celles-ci.

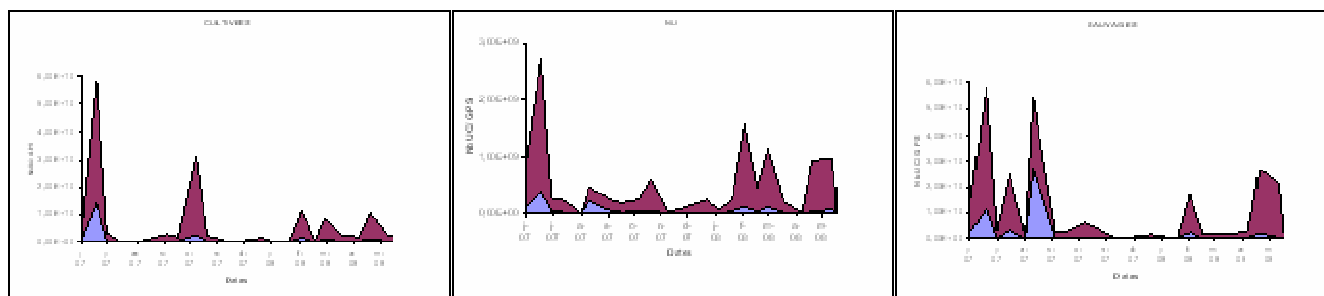
Afin d'évaluer les changements des caractéristiques sédimentaires associés à l'activité des huîtres et leur influence sur le biotope, un suivi mensuel à bimensuel a été réalisé de mai 2007 à mai 2008 sur trois configurations : huîtres sauvages, tables ostréicoles, et site dépourvu d'huîtres (référence).

Les variations saisonnières de ce compartiment seront mises en relation avec les variations saisonnières de l'activité des huîtres. Les différents paramètres étudiés sont résumés dans le Tableau 5.

**Tableau 5.** Paramètres sédimentaires mesurés et compartiments biologiques benthiques échantillonnés. Sont surlignés les compartiments en cours d'analyse.

Caractéristiques sédimentaires	Compartiments biologiques
Chlorophylle a	Bactéries
COP/NOP	Microphytobenthos
Granulométrie	Méiofaune
Matière organique	Macrofaune sédiment / Epifaune des récifs sauvages

La **Figure 37** montre l'évolution saisonnière de la quantité de bactéries dans le sédiment en fonction des configurations. Des différences spatio-temporelles importantes existent, notamment une quantité plus faible de bactéries dans le sédiment dépourvu d'huîtres. Les quantités présentes dans les deux autres configurations sont du même ordre de grandeur, bien qu'elles évoluent de manière différente sur certaines périodes.

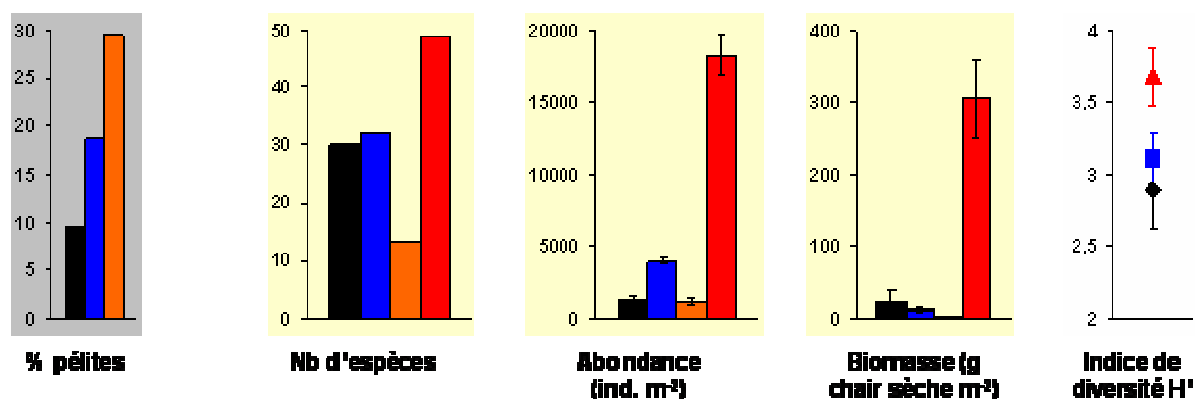


**Figure 37.** Evolution saisonnière de mai 2007 à mai 2008 de la quantité totale de bactéries (unités cellulaires / g de sédiment sec) présente dans le sédiment des différentes configurations (à gauche : sédiment sous table ostréicole ; au centre : sédiment dépourvu d'huîtres ; à droite : récifs sauvages). En mauve, les bactéries actives ; en bleu, les bactéries non actives mesurées par fluorescence.

A titre d'exemple, les résultats concernant le macrobenthos (> 1 mm) pour le mois d'avril 2008 sont représentés sur la **Figure 38**. Des différences importantes sont observées entre configurations.

La configuration « récif sauvage » se démarque particulièrement, avec de plus fortes richesses spécifiques, biomasses, abondances et diversité. La configuration « cultivée » apparaît intermédiaire entre la configuration « sédiment nu » servant de référence et le récif d'huîtres sauvages.

Une différenciation importante des configurations est liée à la présence d'espèces préférentes et/ou spécialistes de l'une des configurations. L'évolution saisonnière de la macrofaune benthique sur toute la durée d'échantillonnage sera traitée plus en détail durant l'année en cours.



**Figure 38.** Caractéristiques sédimentaires et biologiques (macrobenthos) associées aux différents biotopes d'huîtres observées en avril 2008. Sédiment nu en noir (biomasse d'huîtres = 0 g/m<sup>2</sup>). Sédiment sous table ostréicole en bleu (biomasse d'huîtres = 380 g sec/m<sup>2</sup>). La configuration « sauvage » (biomasse d'huîtres = 1324 g sec/m<sup>2</sup>) a été découpée en deux parties : sédiment sous les récifs (en orange), et ensemble [sédiment sous les récifs + épifaune des récifs] (en rouge). De gauche à droite : teneur du sédiment en pélites, nombre d'espèces de macrofaune, abondance de macrofaune (nombre d'individus/m<sup>2</sup>), biomasse de macrofaune (g de chair sèche/m<sup>2</sup>), indice de diversité de Shannon (H').

## 2. Etude du comportement valvaire de l'huître : modélisation et analyse de l'influence du milieu

(EPOC : Mohamedou Sow, Jean-Charles Massabuau, Pierre Ciret, Gilles Durrieu, Damien Tran)

L'étude du comportement valvaire est celle du mouvement des valves chez les mollusques bivalves. Leur squelette étant formé de deux valves, actionnées par un ou deux muscles, cette analyse donne une bonne vision de l'ensemble du comportement « moteur » de l'animal et, dans un contexte environnemental, de son éthologie. Diverses anomalies, telles que le contact d'un prédateur ou l'arrivée d'un contaminant dans la colonne d'eau (détectées grâce aux différents types de chimiorécepteurs) jugées comme dangereuses pour l'animal, se traduisent par des comportements de protection allant de la fermeture brève, complète ou incomplète, à la fermeture prolongée en passant par des modifications de la fréquence des séquences d'ouverture et de fermeture de référence. La mort est associée à une ouverture béante, permanente. Lorsque ces comportements affectent, non pas uniquement un individu mais un groupe, ces modifications sont alors le reflet des perturbations du milieu et le comportement valvaire peut devenir alors un outil d'aide à la gestion de ce milieu (Tran et al., 2003, 2004). La compréhension de l'activité des bivalves est aussi un outil de compréhension de leur activité de filtration, de leur comportement trophique et de leur croissance. C'est donc un outil d'aide à la gestion qui peut permettre de mieux comprendre comment cette croissance est influencée par le milieu et/ou peut influencer le milieu.

A l'UMR EPOC, un des projets récents est le développement d'un dispositif expérimental permettant de suivre 24h/24 le comportement valvaire *in situ* de 16 huîtres. L'approche est pluridisciplinaire : biologique, électronique et mathématique. A l'heure actuelle, l'analyse et le traitement mathématique du signal sont en phase de développement (Thèse Sow). Le premier site équipé se situe dans le bassin d'Arcachon, au pied de la jetée d'Eyrac, face à la Station Marine. Cette mesure d'écartement valvaire est faite grâce à la valvométrie HFNI (Haute fréquence, non invasive) qui génère une grande quantité de données (1 728 000 mesures par jour). L'idée initiale était de modéliser puis de traiter statistiquement et produire en ligne des graphes pour interpréter. Ces données, la représentation du

projet et la description du dispositif expérimental, sont mises à disposition du public sur le site web [www.domino.u-bordeaux.fr/molluscan\\_eye](http://www.domino.u-bordeaux.fr/molluscan_eye)

Toute étude sophistiquée d'un corpus de données doit être précédée d'une étude exploratoire à l'aide d'outils robustes, en privilégiant les représentations graphiques. C'est la seule façon de se familiariser avec des données et surtout de dépister les sources de problèmes : distributions « anormales », incohérences, liaisons non linéaires, valeurs erronées ou atypiques.

Le but de la thèse de M. Sow est de mettre en place des modèles (les outils) et algorithmes (programmes sous le langage **R** et des scripts Bash tout en optimisant les algorithmes afin d'éviter des temps de calculs trop importants) pour décrire et quantifier rapidement, puis stocker de façon accessible ces comportements. En plus de l'activité valvaire de l'animal, divers paramètres du milieu ont été mesurés afin de rechercher des corrélations entre écophysiologie et paramètres significatifs du milieu (marée, courant, température, jour/nuit).

Dans la première partie de ce rapport d'avancement, nous présentons les outils d'acquisition et le prétraitement des données, puis le modèle non paramétrique et les estimateurs utilisés pour décrire l'activité du bivalve. Enfin, nous montrerons quelques applications.

## **2.1. Acquisition et prétraitements des données**

### **2.1.1. Le modèle biologique : huître**

L'huître sur laquelle nous travaillons est l'espèce *Crassostrea gigas*. Dans le Bassin d'Arcachon, c'est la seule espèce cultivée d'où une forte demande de la profession pour obtenir davantage de connaissance sur sa physiologie. La problématique des algues toxiques a aussi généré un besoin fort d'outil pour mieux comprendre les impacts directs des microalgues sur l'huître et, éventuellement, détecter leur entrée au niveau des passes. L'huître étant largement répandue dans le monde, l'applicabilité de la valvométrie pourrait être très large.

### **2.1.2. Protocoles expérimentaux**

#### **2.1.2.1. La valvométrie**

La valvométrie utilisée ici est la valvométrie HFNI (Haute fréquence, non invasive) développée dans l'équipe GEMA-Arcachon de l'UMR EPOC. Elle consiste à mesurer, grâce à des cartes électroniques développées au laboratoire, la distance entre deux électrodes légères (moins de 100 mg) collées sur chaque valve et reliés à l'électronique par un câblage fin et souple. La mesure de la distance entre les deux bobines est effectuée grâce à un principe magnétique insensible aux variations de la physico-chimie de l'environnement. Tout le dispositif consomme seulement 2 Watts (un ordinateur consomme approximativement 250 W).

#### **2.1.2.2. Dispositif expérimental de la jetée d'Eyrac**

Dans le bassin d'Arcachon, la jetée d'Eyrac, face à la station marine, abrite à ses pieds le premier site équipé où des lots de 16 huîtres sont étudiés depuis février 2006. Les huitres sont placées dans une poche ostréicole posée sur le fond et immergée en permanence.

### **2.1.3. Les données**

#### **2.1.3.1. Transfert des données biologiques de la jetée d'Eyrac**

Les écartements valvaires sont mesurés toutes les 100 ms. Les données sont ensuite transmises au laboratoire à minuit en utilisant le réseau de la téléphonie mobile et Internet.

### 2.1.3.2. Les données physico-chimiques du milieu

Les données de la marée sont fournies par le Service Hydrographique et Océanographique de la Marine (SHOM). Pour chaque jour, nous disposons de la hauteur d'eau (en cm) toutes les heures ainsi que des horaires de pleine et de basse mer. Actuellement, nous avons caractérisé mathématiquement les relations entre l'activité valvaire des huîtres et la marée, les courants et l'ensoleillement. A terme, nous avons prévu aussi d'analyser d'autres paramètres environnementaux comme la température, les types de microalgues, etc.

## 2.2. Modélisation et traitements des données

Nous présentons maintenant les différents outils mathématiques et statistiques utilisés pour décrire et quantifier les distributions, les amplitudes et les vitesses de fermetures-ouvertures. Nous appliquons ensuite ces outils aux données recueillies au niveau de la jetée d'Eyrac.

### Modèle et estimateurs

Nous disposons d'un échantillon composé de  $n$  couples indépendants de variables aléatoires  $(T_1, Y_1), \dots, (T_n, Y_n)$  et nous considérons le modèle de régression non paramétrique donné, pour  $i=1, \dots, n$ , par

$$Y_i = m(T_i) + \varepsilon_i.$$

Dans ce modèle intervient une fonction de lien  $m$  inconnue (à estimer) qui exprime la valeur moyenne de l'écartement valvaire en fonction du temps  $T$  et un terme aléatoire d'erreur  $\varepsilon$  de loi inconnue et indépendant de  $T$ . Nous proposons trois estimateurs non paramétriques de la fonction  $m$ , mais nous présentons ici seulement l'estimateur de Nadaraya-Watson (Nadaraya, 1964 et Watson, 1964). Il est construit à partir d'une fonction noyau  $K$  et d'une fenêtre  $h_n$ , de manière similaire à l'estimateur à noyau de la fonction de densité de probabilité (Silverman, 1986). Cet estimateur de la densité  $f$  de  $T$  s'écrit :

$$\hat{f}_n(t) = \frac{1}{n h_n} \sum_{i=1}^n K\left(\frac{t - T_i}{h_n}\right),$$

L'estimateur de Nadaraya-Watson s'écrit comme la moyenne pondérée des valeurs  $(Y_1, \dots, Y_n)$ . Il est donné par :

$$\hat{m}_n(t) = \begin{cases} \frac{\sum_{i=1}^n K\left(\frac{t - T_i}{h_n}\right) Y_i}{\sum_{i=1}^n K\left(\frac{t - T_i}{h_n}\right)} & \text{si } \sum_{i=1}^n K\left(\frac{t - T_i}{h_n}\right) \neq 0, \\ \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n Y_i & \text{sinon.} \end{cases}$$

Sous les conditions de régularité qui sont vérifiés, nous avons quand  $n \rightarrow \infty$  :

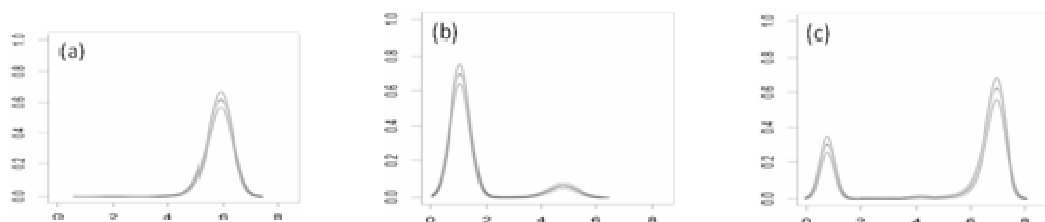
$$\hat{m}_n(t) \xrightarrow{ps} m(t).$$

$$\sqrt{nh_n} (\hat{m}_n(t) - m(t)) \xrightarrow{\mathcal{L}} \mathcal{N}\left(0, \frac{\sigma^2(t) \tau^2}{f(t)}\right).$$

Les estimateurs de la densité de probabilité et de la fonction de lien sont calculés en utilisant un noyau gaussien et le paramètre de lissage est estimé par la méthode de la validation croisée. L'estimation des vitesses d'ouverture et fermeture s'obtient explicitement par dérivation de l'estimateur de Nadaraya-Watson (Sow et al., 2009).

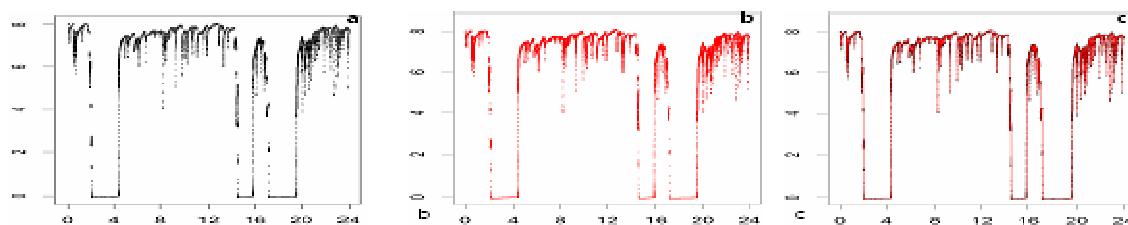
### Application en valvométrie

**Caractérisation des amplitudes d'ouverture / fermeture :** L'estimateur de la densité nous a permis de déterminer la distribution de l'activité valvaire et d'en déduire les probabilités et les durées des états de fermetures et ouvertures au cours de la journée. Sur des graphiques aisément lisibles, l'estimateur permet de voir immédiatement si l'huître reste ouverte toute la journée (distribution unimodale) ou si elle alterne entre ouverture et fermeture (distribution bimodale). Nous observons sur la **Figure 39a**, un seul pic qui correspond à une ouverture autour de 6 mm (100% de temps ouvert). Sur la **Figure 39b**, nous observons une amplitude majoritaire autour de 1 mm (12% de temps ouvert) et, sur la **Figure 39c**, l'huître alterne entre 1 et 7 mm (74% de temps ouvert). Ce type d'analyse peut être, bien sûr, utilisé pour comparer des huîtres dans différentes conditions, normales et en présence de contaminants. Des expériences en laboratoire (Tran et al, en prép) ont par exemple montré qu'en présence de l'algue toxique *Alexandrium minutum*, l'amplitude d'ouverture diminue fortement.



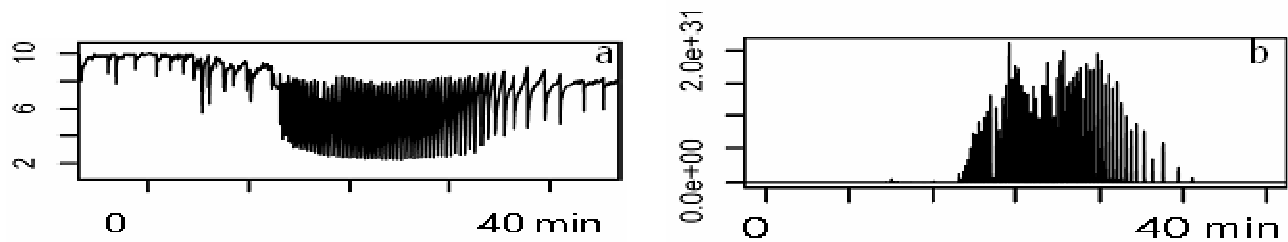
**Figure 39.** Estimation de la distribution de trois états caractéristiques des états de fermeture-ouverture au cours de la journée (a, b et c), avec en abscisse l'amplitude d'ouverture et en ordonnée la densité.

**Modélisation du signal original :** L'estimateur de Nadaraya-Watson nous permet de décrire avec précision les mouvements des valves au cours de la journée (Figure 40).



**Figure 40.** Représentation a) des données brutes, b) de l'estimateur de Nadaraya-Watson et c) de la superposition des données brutes et de l'estimateur avec en abscisse le temps (h) et en ordonnée l'écartement valvaire (mm).

**Estimation de la vitesse des mouvements valvaires :** L'estimation de la vitesse des mouvements valvaires donne des informations particulièrement importantes sur la vitesse de contraction de son muscle adducteur et l'élasticité de sa charnière. Elle permet de caractériser des épisodes particuliers comme les réactions en présence de contaminants ou lors de la ponte. En collaboration avec Ifremer Argenton (I. Bernard et S. Pouvreau), nous avons travaillé récemment sur un outil de détection automatique de la ponte en se servant de la vitesse. La **Figure 41a** présente la suite de contractions rapides caractéristiques et la **Figure 41b**, un index de la vitesse permettant une visualisation immédiate.



**Figure 41.** a) Enregistrement des données brutes ; b) estimation de la vitesse de l'activité valvaire en valeur absolue puissance 5 pour le 15 Juillet 2007.

Pour améliorer la précision, tout en optimisant les vitesses de calcul, nous avons récemment comparé avec les Professeurs Bernard Bercu et Jérôme Saracco (Institut des Mathématiques de Bordeaux) et leur étudiante en thèse Thi Mong Ngoc Nguyen, l'estimateur de Nadaya-Watson avec l'estimateur de Nadara-Watson récursif et l'estimateur de Révész (Révész, 1977) au sens du critère de la plus petite variance. Nous montrons qu'au sens de la variance, les estimateurs récursifs de type Révész et Nadaraya-Watson récursif sont statistiquement meilleurs que Nadaraya-Watson. Ce résultat suggère d'utiliser dans le futur un estimateur récursif (Durrieu et al. 2009). Nous prévoyons de modifier les codes de calculs pour de meilleures estimations.

### 2.3. Conclusion

En l'état actuel d'avancement de la thèse de M. Sow, nous avons mis en place des modèles statistiques permettant de décrire et comprendre le comportement de l'huître dans son milieu. L'objectif était de proposer une visualisation rapide, automatique et précise de l'activité valvaire d'un groupe de 16 huîtres *Crassostrea gigas*, placées sous la jetée d'Eyrac à Arcachon, depuis février 2006. A ce jour, ce travail déjà appliqué sur le site de l'Œil du Mollusque, a permis d'améliorer la gestion du flux de données journalier et d'extraire de manière automatique des tableaux et des graphiques. En particulier, nous avons optimisé les algorithmes afin d'éviter des temps de calculs trop importants liés au gros volume de données traitées tous les jours sur plusieurs sites.

Nous avons pu mettre en évidence des corrélations fortes entre l'activité valvaire et les différentes caractéristiques du milieu. En particulier, nous avons décrit le fort impact de la marée sur l'activité valvaire des huîtres et aussi caractérisé le phénomène de ponte par le calcul des vitesses. Tous ces résultats obtenus, sur du long terme, devraient nous permettre de caractériser des perturbations du rythme des animaux en situation de stress comme une perturbation du milieu.

Finalement, nous avons apporté de nombreux éléments de compréhension du comportement des huîtres sur trois ans d'enregistrement en période « normale ». Nous avons également abordé la description d'événements « anormaux » qui seront approfondis dans la suite de ce travail.

### 3. Les substances phénoliques chez *Zostera noltii* et *Zostera marina* : inhibiteurs potentiels du développement de microphytes

(PhyValBio : Micheline Grignon-Dubois, Bernadette Rezzonico, Saïd Achamlale – Collab. : ECOLAG, Univ. Montpellier 2 : M. Laabir, E. Masseret ; IFREMER Brest : G. Arzul ; Univ. Southampton : C. Helio)

Les herbiers de Zostères sont un élément essentiel dans l'écosystème du Bassin d'Arcachon, tant par leur superficie (4600 ha, le plus vaste d'Europe), que par leur production annuelle de biomasse (environ 40000 T en poids sec - **Figure 42**).

Au-delà de son rôle important comme zone de reproduction, de nurserie et de nourriture pour de nombreuses espèces, dans la stabilisation des fonds, etc., il pourrait jouer un rôle en sécrétant dans le milieu des médiateurs chimiques capables d'inhiber le développement de micro-algues toxiques.

L'élaboration de défenses chimiques est une stratégie répandue chez les organismes marins. Chez les herbes marines, ce rôle est souvent attribué aux les dérivés phénoliques synthétisés par la plante. Il était donc important d'identifier les substances phénoliques de *Zostera marina* et *Zostera noltii* et d'étudier leur impact sur l'écosystème du Bassin d'Arcachon.

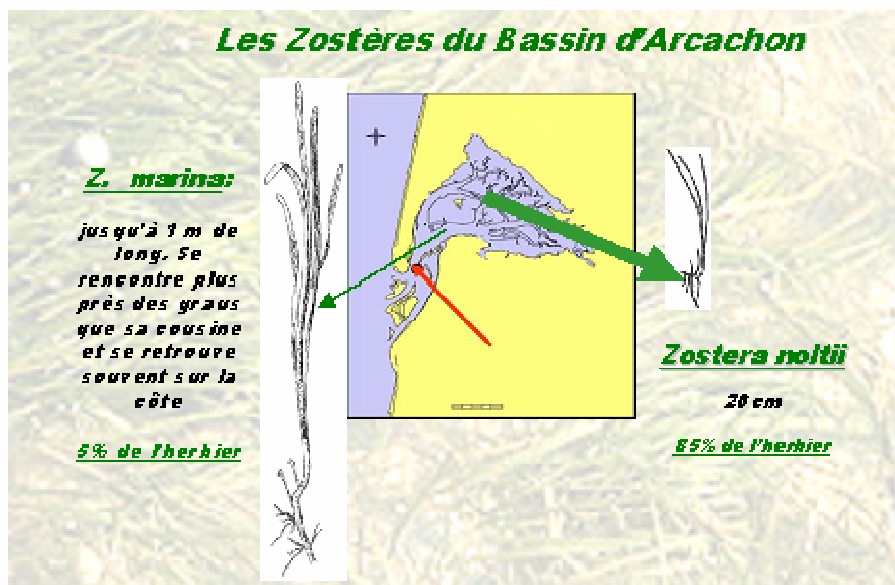
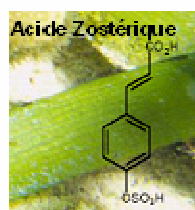


Figure 42. Les herbiers de Zostères dans le Bassin d'Arcachon.

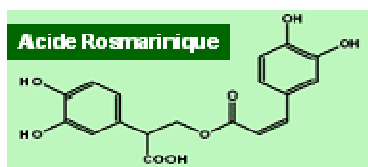
Dans le cadre du présent projet, des extractions ont donc été réalisées afin de libérer les polyphénols présents dans les structures vacuolaires de la Zostère et d'évaluer leur potentiel biologique.

Les facteurs influençant l'efficacité de l'extraction ont été recherchés et optimisés, et la méthode validée. Des extraits aqueux et méthanoliques ont été systématiquement préparés. La caractérisation physico-chimiques des substances extraites (Figure 43) a été réalisée par Résonance Magnétique Nucléaire, spectroscopie UV et spectrométrie de masse.

#### •Les substances phénoliques chez *Zostera* : Caractérisation chimique



Acide zostérique  
(antifongique,  
antibactérien,  
antisalissure)



Acide rosmarinique, flavonoïdes : fort pouvoir antioxydant

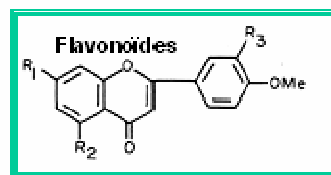
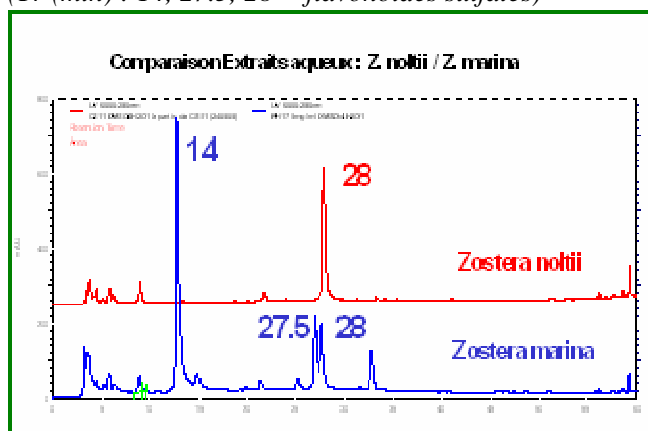


Figure 43 : Substances systématiquement trouvées chez les deux espèces du genre *Zostera*.

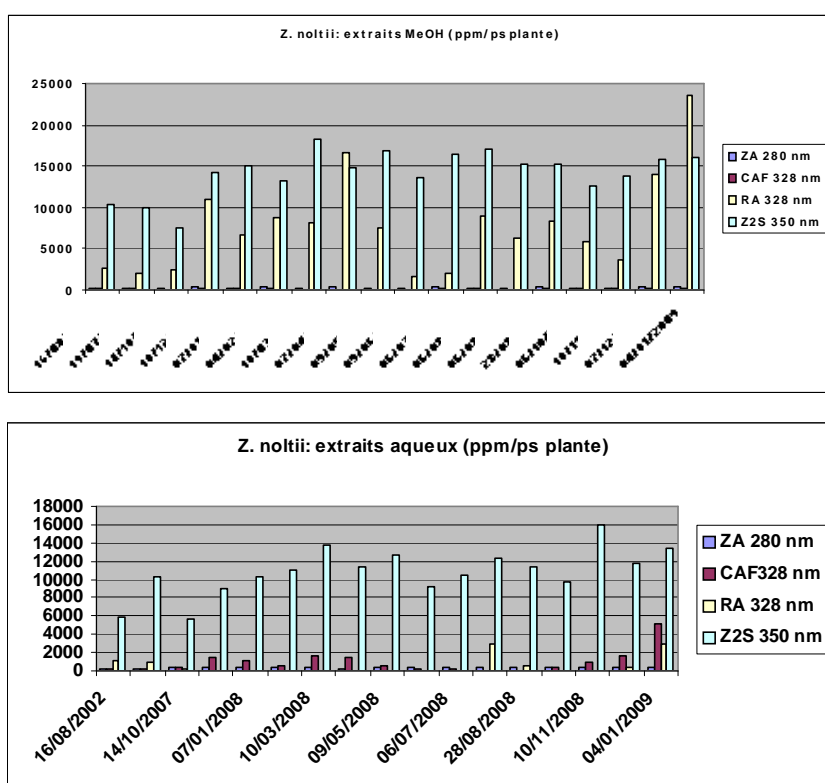


Les profils phénoliques de *Z. noltii* et *Z. marina* déterminés par HPLC (Figure 44), montrent une plus grande diversité moléculaire chez *Z. marina*, où l'on trouve 3 flavonoïdes. Nous avons représenté ci-dessous les profils d'extraits aqueux obtenus à partir de chacune des 2 espèces.  
(Tr (min) : 14, 27.5, 28 = flavonoïdes sulfatés)



**Figure 44 :** Profils phénoliques de *Z. noltii* et *Z. marina* déterminés par HPLC

Un suivi mensuel de l'herbier à *Zostera noltii* a été entrepris à partir d'octobre 2007, afin d'étudier la variabilité saisonnière de la production de polyphénols dans la plante et, par extrapolation, la quantité susceptible d'être exsudée dans l'eau de mer (Figure 45). Les prélèvements ont été effectués dans l'herbier limitrophe de la plage de Taussat. Tous les polyphénols ont été dosés dans les extraits par HPLC quantitative, après établissement de courbes de calibration à partir de standards.

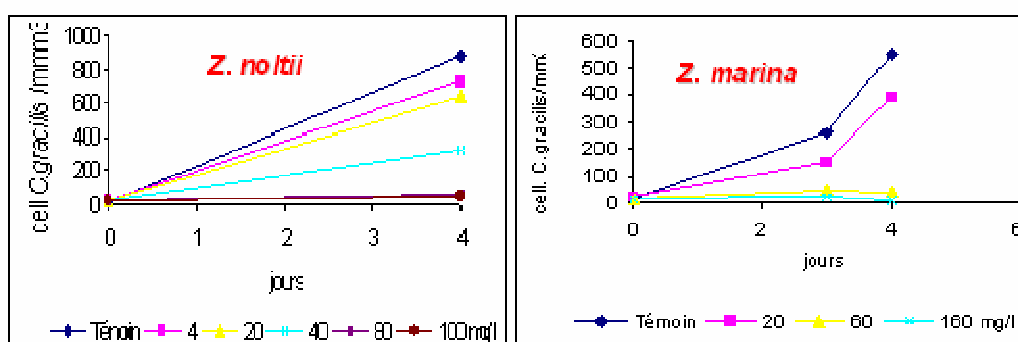
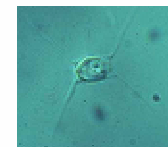


**Figure 45 :** Suivi mensuel de l'herbier à *Zostera noltii* à partir d'octobre 2007 : variabilité saisonnière de la production de polyphénols dans la plante. Résultats exprimés en ppm par rapport à la plante sèche.

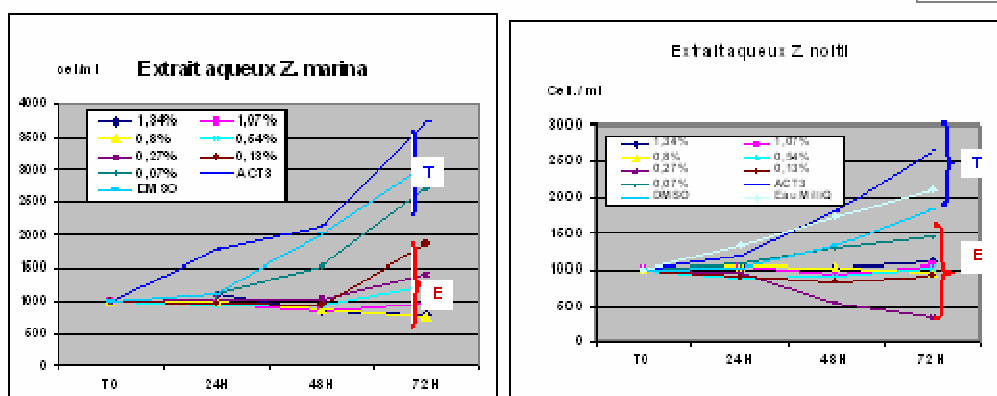
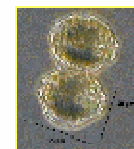
Ramenée à la production de biomasse de l'herbier estimée à 30000-44000 T/an (ps), la quantité de phénoliques pouvant diffuser dans le milieu marin peut être estimée à 1700 T/an.

Les extraits obtenus ont été évalués comme inhibiteur du développement de microphytes (Figure 46). Deux espèces phytoplanctoniques ont été étudiées : la diatomée marine *Chaetoceros gracilis* (Coll. G. Arzul, Ifremer, Brest) et la micro-algue toxique *Alexandrium catenella* (Coll. M. Laabir et E. Masseret, Ecolag, Univ. Montpellier 2). Les premiers résultats, prometteurs, montrent la capacité de l'herbier à « neutraliser » des espèces phytoplanctoniques et l'importance de stopper sa régression.

### Effets d'extraits de zostère sur la croissance de *Chaetoceros gracilis*



### Effets d'extraits aqueux sur la croissance d'*Alexandrium catenella*



T = témoins - E = extraits, gamme de concentration : 0.07-1.34%

**Figure 46 :** Effets des extraits, obtenus à partir des deux espèces de Zostères présentes dans la lagune d'Arcachon, sur l'inhibition de la croissance de deux espèces phytoplanctoniques.

## VOLET OBSERVATION

Coordination Benoît Sautour – Jean Paul Dreno

Ce volet présente l'ensemble des activités de suivi de la qualité du milieu, menées sur le Bassin d'Arcachon, ainsi que l'évolution de la construction de son image de qualité. Ces activités sont **récurrentes, à long terme** et s'inscrivent dans un cadre général de surveillance/observation du milieu en liaison avec la gestion des écosystèmes et leur évolution dans un contexte de changement global. L'apport de ces séries est indiscutable en termes de surveillance du milieu, de définition d'**états de référence**, d'identification des **tendances** et **cycles** sur le long terme et des forçages impliqués. A moyen terme ce volet s'enrichira des apports des autres volets du programme de manière à faire éventuellement évoluer l'acquisition vers de nouveaux paramètres et d'autres stratégies pertinentes.

### 1. Descripteurs de l'évolution des écosystèmes

Les acquisitions de données s'articulent autour d'un suivi de l'IFREMER Arcachon (ARCHYD), de la composante locale du Service d'Observation de l'INSU (SOMLIT<sup>1</sup>) et de suivis des compartiments biologiques réalisés par l'IFREMER et l'UMR EPOC. Ils assurent l'acquisition à basse fréquence d'un corps de paramètres descripteurs du fonctionnement de l'écosystème. Le suivi de nouveaux paramètres est mis en place dans le cadre de ce programme.

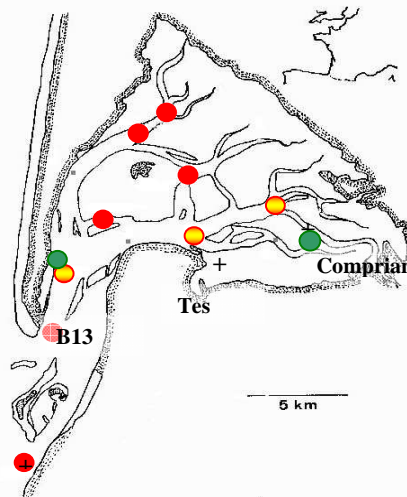
#### 1.1. EVOLUTION DES CARACTERISTIQUES ENVIRONNEMENTALES (BASSE FREQUENCE) :

Afin de répondre aux objectifs fixés, les stratégies ont été fixées en ce qui concerne: l'échantillonnage (sites et acquisition), les paramètres, les analyses et les mesures, la gestion des données.

##### 1.1.1. Paramètres

Les paramètres suivis sont pertinents tant pour la physico-chimie des eaux que pour la biologie. Ils ont été choisis comme descripteurs du fonctionnement de l'écosystème. Acquis à une fréquence suffisante, ils permettent la caractérisation de l'évolution à l'échelle pluriannuelle, voire pluri-décennale, de l'écosystème et la validation de modèles couplés physique-chimie-biologie (e.g. David *et al*, 2006).

	●●	●	●	
Périodicité	8 jours	15 jours	> 1 mois	
Température	*	*		
Salinité	*	*		
Oxygène	*	*		
PH		*		
NH <sub>4</sub>	*	*		
NO <sub>2</sub>	*	*		
NO <sub>3</sub>	*	*		
PO <sub>4</sub>	*	*		
Si(OH) <sub>4</sub>	*	*		
Matières en suspension (MES)	*	*		
Azote organique particulaire		*		
Carbone organique particulaire		*		
Delta C13		*		
Delta N15		*		
Chlorophylle a	*			
Phytoplancton (flore totale)		+		
Zooplancton		*	3 mois	
Microphytobenthos			3 mois	
Macrofaune benthique			6 mois	
	ARCHYD	ARCHYD SOMLIT SOARC	SOARC	Les points signalés par un « + » indiquent des stations REPHY (flore planctonique)



<sup>1</sup> SOMLIT : Service d'Observation en Milieu Littoral

### 1.1.2. Echantillonnage : Sites et acquisition

Les échelles d'observation basse fréquence permettent d'atteindre un objectif de caractérisation de l'évolution à long terme des écosystèmes (tendance, cycles pluriannuels, ... : Beaugrand, 2000, 2001, Abramova & Tuschling, 2005, David *et al*, 2006 ). Elles ont été choisies à partir d'un compromis entre la charge de travail à long terme et la pertinence des acquis à cette échelle temporelle. La représentativité des sites choisis est connue à partir d'études synoptiques antérieures (e.g. : Bouchet, 1968, Guillocheau, 1988, Auby *et al*, 1999, Vincent, 2002, Blanchet, 2005).

Sites	Coordonnées	
	Latitude	Longitude
Bouée 13	44°38'22 N	1°14'05 W
Tès	44°40'00 N	1°10'00 W
Comprian	44°40'77 N	1°05'96 W
Bouée 7	44°32'60 N	1°15'75 W
Courbey	44°40'66 N	1°12'17 W
Jacquets	44°43'22 N	1°10'95 W
Girouasse	44°41'95 N	1°08'75 W

### 1.1.3. Analyses et mesures

Les protocoles d'échantillonnages et d'analyses ont été adoptés à partir des standards reconnus dans le domaine (Aminot et Kérouel, 2004, protocoles DCEE) et de l'expérience des équipes impliquées. Quatre types de contrôles sont en outre mis en œuvre :

- la tenue régulière de fiches de calibration pour les capteurs;
- des certifications d'étalonnage constructeur à périodicité spécifiée;
- des intercomparaisons nationales annuelles (SOMLIT et EIL<sup>2</sup> IFREMER), et des traitements de doubles par des laboratoires non impliqués (e.g. Institut PASTEUR).

### 1.1.4. Accès / utilisation des données

La gestion des données est assurée au sein de l'UMR EPOC et de l'IFREMER (BDD DOMINO de l'UMR EPOC, SOMLIT de l'INSU et QUADRIGE de l'IFREMER) :

- site web de l'IFREMER :

<http://www.ifremer.fr/delao/francais/valorisation/quadrige/index.htm>

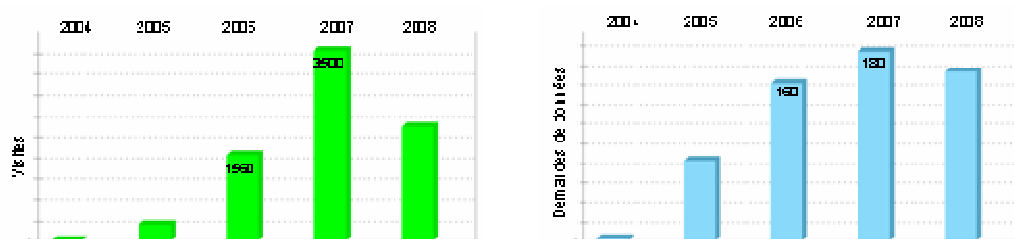
- site web de l'INSU (Sciences de la planète :

[http://www.domino.u-bordeaux.fr/somlit\\_national/](http://www.domino.u-bordeaux.fr/somlit_national/)) pour les données labellisées SOMLIT

- site web UMR EPOC, pages « Observation » :

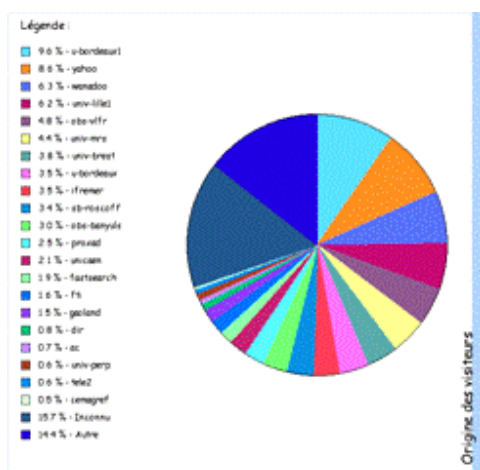
<http://www.domino.u-bordeaux.fr/observation/>.

L'ensemble des données acquises dans le cadre des suivis mis en place sur le Bassin d'Arcachon est fréquemment utilisé à des fins diverses. Ces données sont accessibles sur différentes bases de données accessibles en ligne ou non depuis un site web (e.g. Figure 47).



**Figure 47 :** Evolution du nombre de visiteurs sur le site web SOMLIT ([http://www.domino.u-bordeaux.fr/somlit\\_national/](http://www.domino.u-bordeaux.fr/somlit_national/)) et du nombre de demandes de données à partir de ce même site.

<sup>2</sup> Essais Inter-laboratoires

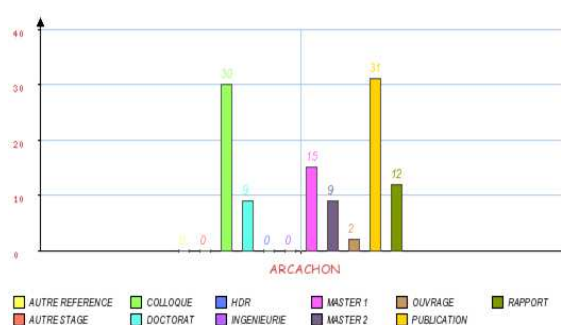


Ces données sont utilisées à des fins multiples : décideurs, bureaux d'étude, collèges/lycées, communication en environnement, recherche révélant une ouverture vers la société civile (e.g. Figure 48).

**Figure 48 :** Utilisation des données en fonction de « l'origine » (nationale) des demandeurs, site web SOMLIT.

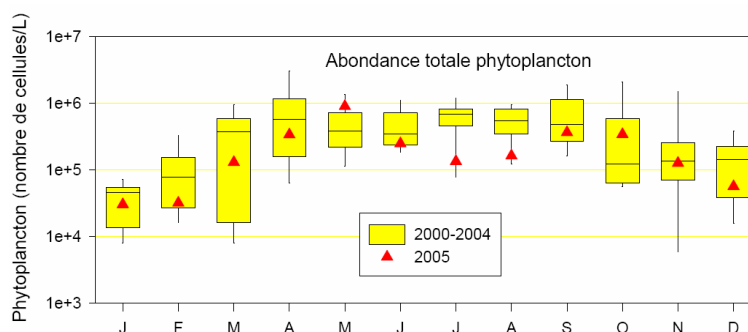
**L'utilisation scientifique** des données est réalisée aussi bien en utilisant les chroniques de données que des données plus ponctuelles à des fins de cadrage spatio-temporel d'études plus ponctuelles. Elle donne lieu à des publications de formes diverses (e.g. Figure 49)

**Figure 49 :** Utilisation des données acquises dans le cadre de SOMLIT (sites aquitains) à des fins scientifiques et types de documents produits.



Ces données sont actuellement utilisées à l'échelle locale par exemple de manière :

- récurrente pour caractériser la variabilité interannuelle des communautés phytoplanctoniques du Bassin d'Arcachon (e.g. Figure 50) : [http://wwwz.ifremer.fr/envlit/documents/bulletins/regionaux\\_de\\_la\\_surveillance](http://wwwz.ifremer.fr/envlit/documents/bulletins/regionaux_de_la_surveillance)

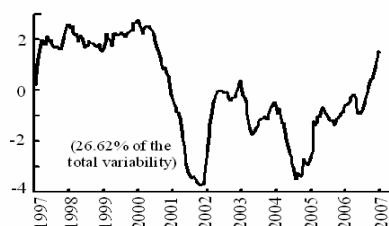


**Figure 50 :** Evolution temporelle des abondances phytoplanctoniques (Bassin d'Arcachon, eaux néritiques moyennes, Station Teychan) : moyennes mensuelles. Comparaison de l'année 2005 / données acquises depuis 2000. « Qualité du Milieu Marin Littoral - Bulletin de la Surveillance » : IFREMER - Laboratoire Environnement Ressources d'Arcachon.

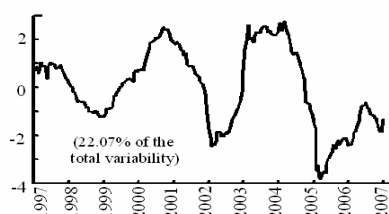
- plus ponctuelle pour répondre à une des hypothèse de travail d'un programme national piloté par l'AFSSA visant à caractériser les causes de mortalités des souris (test positifs) lors des périodes de contamination atypiques dans le Bassin d'Arcachon (2005-06-08).

Elles sont aussi utilisées à une échelle spatiale plus large de manière à mettre en évidence dans les évolutions locales observées ce qui relève de forçages locaux vs forçages plus globaux (e.g. Figures 51, 52 ; thèse CNRS en cours : E. Goberville).

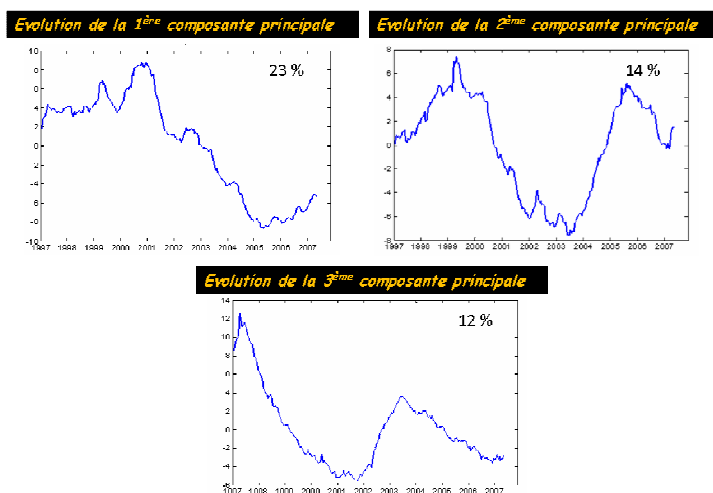
(a) Variability of the first principal component (PC) location-parameter and PC



(b) Variability of the second principal component (PC) location-parameter and PC



**Figure 51 :** ACP sur les données SOMLIT Arcachon (tous paramètres physico-biochimiques, application d'une moyenne mobile d'ordre 12). Sur la 1ère composante, on remarque un brutal changement en 2001, avec une chute de la composante, donc un événement particulier qui brise l'état d'équilibre. Phénomène de cyclicité sur la 2ème CP (E. Goberville).



	Arcachon	Banyuls	Brest	Marseille	PCO	PCO	PCO	Bassif Ant	Bassif Etacale	Villefrance sur mer	Minervois chte	Minervois Langu	
Température	1	2	3	1	2	3	1	2	1	2	3	1	USGENDE
Salinité	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	60-80
Oxygène	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	70-80
pH	2	3	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	60-70
Ammonium	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10-60
Nitrate	2	2	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	40-50
Nitrite	3	2	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	20-40
Phosphate	3	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	20-30
Silicate	2	1	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	10-20
CDP	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	0-50
NDP	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	
MLD	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Chlorophyll a	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	

**Figure 52 :** Evolution temporelle des 3 premières composantes principales déterminées à partir d'une ACP réalisée sur l'ensemble des sites suivis dans le cadre de SOMLIT (3 façades maritimes françaises) et pour l'ensemble des variables prises en compte. 1° Composante principale : modification importante entre la première partie d'acquisition 1997-2001 et la partie plus récente. 2° CP : phénomène global de cyclicité ? Contribution des variables mesurées dans l'ensemble des sites aux différentes composantes principales pour chacune des stations (E. Goberville).

## **1.2. BILAN DES ACQUISITIONS COMPLEMENTAIRES RECENTES (BASSE FREQUENCE) :**

*Les suivis complémentaires ont été mis en place en liaison avec leur intérêt scientifique et sociétal (e.g. qualité des particules en suspension, suivi du compartiment benthique, DCEE). Une action spécifique est aussi menée sur l'automatisation d'une méthode d'analyse du compartiment phytoplanctonique (méthode automatique de détermination du phytoplancton, Flowcam, problématique DCEE et phytoplancton toxique). Les premières acquisitions ont été réalisées et ont permis soit de définir une stratégie d'acquisition, soit de calibrer la méthode.*

### **1.2.1. Caractérisation des apports de matériel particulaire**

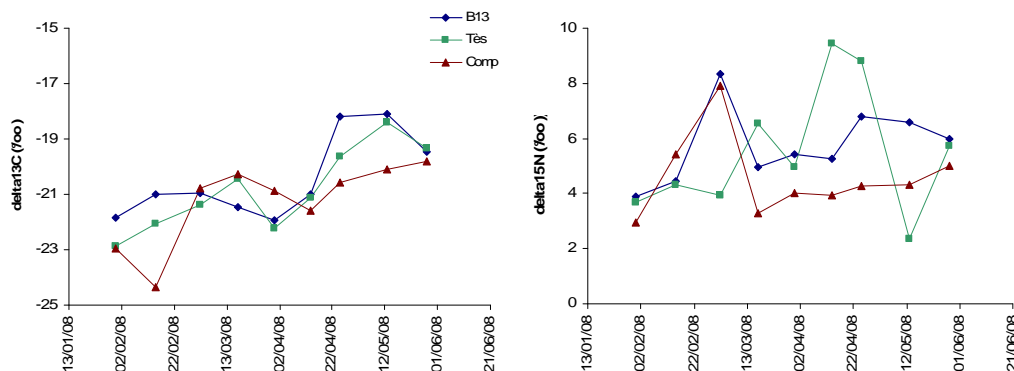
*Nicolas Savoye, H. Etcheber, Y. Del Amo, B. Sautour*

Une des questions d'actualité concernant la gestion des zones littorales concerne la modification à long terme des caractéristiques des apports marins et continentaux (diminution des débits en lien avec le changement global, salinisation des écosystèmes, augmentation des apports en nutriments). Ces modifications ont des conséquences sur le métabolisme et la productivité de ces écosystèmes (concentration des matières en suspension, teneurs en oxygène, eutrophisation, pénétration d'espèces marines, etc...). Les isotopes stables du carbone et de l'azote sont un outil de choix pour qualifier la matière organique particulaire (e.g. Savoye et al., 2003), pour en déterminer l'origine (e.g. Gearing 1988), pour quantifier les différentes sources quand ces dernières sont peu nombreuses (e.g. Fontugne et Jouanneau 1987) et pour établir les niveaux trophiques d'espèces ou les structures trophiques (e.g. Søreide et al, 2006) dans les écosystèmes côtiers. Ce sont donc des proxies de choix pour suivre l'évolution de l'apport en matériel particulaire et dissous dans les zones côtières. Les isotopes stables de l'azote peuvent permettre par ailleurs d'estimer l'utilisation relative des nutriments azotés, au moins en période printanière (Savoye et al, 2003).

L'acquisition a débuté en janvier 2008 dans le contexte national du SOMLIT, sur les 3 sites suivis dans le Bassin d'Arcachon (SOARC). Les données sont stockées en base de données SOMLIT.

L'intégration actuelle de ces outils dans le cadre de l'observation du milieu littoral (Figure 53) permet d'une part de caractériser la matière organique particulaire et d'en déterminer les sources, et d'autre part sert de soutien à des travaux de recherche en cours (thèses C. Dang et S. Dubois, UMR EPOC ; programme « diagnostic de la qualité des milieux littoraux », Région Aquitaine/Université Bordeaux 1) concernant l'origine de la matière organique particulaire et son entrée dans le réseau trophique.

D'un point de vue 'observation' *stricto sensu*, ces outils permettront à terme de suivre l'évolution des apports continentaux (matière organique particulaire et nutriments azotés) et de toute modification majeure des cycles du carbone et de l'azote dans le Bassin d'Arcachon. Ces outils étant utilisés plus largement à l'échelle des façades Manche (Manche orientale, baie de Seine, Manche orientale) et Atlantique (rade de Brest, estuaire de la Gironde, bassin d'Arcachon) dans le cadre du Service d'Observation du Milieu Littoral, les écosystèmes aquitains seront étudiés sous l'angle d'une approche multi-écosystémique à méso-échelle. La comparaison avec d'autres écosystèmes des façades Manche et Atlantique permettra en particulier de déterminer si les modifications observées en local sont d'ordre climatique (e.g. modification de la pluviométrie à grande échelle) ou anthropique (e.g. modification des prélèvements d'eau sur la Bassin versant à une échelle locale, pollution locale en nutriments azotés).



**Figure 54 :** Evolution temporelle des isotopes stables du carbone et de l'azote organique particulaire dans le Bassin d'Arcachon : eaux néritiques externes (B13), eaux néritiques moyennes (Tès) et eaux néritiques internes (Comp). L'augmentation du  $\delta^{13}C$  est caractéristique des écosystèmes tempérés évoluant de l'hiver (MOP d'origine diverse) vers l'été (MOP dominée par le phytoplancton). Données SOMLIT.

### 1.2.2. Caractérisation des communautés Phytoplanctoniques

*Danièle Maurer, Jean Paul Dreno, Yolanda Del Amo*

Les communautés planctoniques du Bassin d'Arcachon sont suivies depuis de nombreuses années. Le suivi du compartiment phytoplanctonique est actuellement réalisé dans le cadre du REPHY. Les problèmes récents liés pour certains à la présence d'algues toxiques, nous ont amené à envisager la mise au point d'un système automatisé d'identification : l'analyse manuelle au microscope, utilisée actuellement en routine, est longue et fastidieuse, et elle nécessite des opérateurs spécialisés.

La nouvelle méthode, visant à automatiser l'analyse des échantillons, consiste en une analyse des images recueillies par un flowcam, à l'aide d'un logiciel nommé PhytoImage. Cette technique est prometteuse puisqu'elle est déjà applicable en partie au compartiment zooplanctonique (Grosjean et coll., Université de Mons, Belgique).

Le travail de mise au point d'analyses automatisées, ou semi automatisées, de la composition phytoplanctonique d'échantillons d'eau de mer, effectué en collaboration par l'IFREMER et l'Université de Mons Hainaut (Belgique,) a débuté en janvier 2009 avec le post doctorat de Alina Tunin-Ley (IFREMER/ONEMA).

Le flowcam nécessaire à la réalisation de cette tâche, a été acquis en fin d'année 2008. Parallèlement, l'IFREMER a recruté une post-doctorante depuis janvier 2009, pour une durée de 18 mois. L'objectif est la mise en œuvre opérationnelle du système couplé de numérisation et de traitement d'images de phytoplancton : après numérisation par un FlowCAM, le traitement des images est réalisé avec une version spécifique du logiciel PhytoImage développé par l'Université de Mons Hainaut (Pr Philippe Grosjean).

La première étape du travail de la post-doctorante (2009-10) consiste en une prise en main du FlowCAM (en lien avec l'Université de Mons Hainaut) et en la rédaction d'un cahier des charges des objectifs à atteindre et des contraintes à respecter. La deuxième phase est la constitution d'un set d'apprentissage, banque d'images numérisées et représentatives des taxons rencontrés dans les échantillons du REPHY, pour permettre à l'Université de finaliser une version optimisée de PhytoImage. Une troisième étape est l'analyse des résultats acquis en temps réel avec cette version optimisée, ainsi que la mise en œuvre opérationnelle proprement dite (rédaction de procédures, formation des observateurs phytoplancton).



### 1.2.3. Caractérisation des communautés benthiques

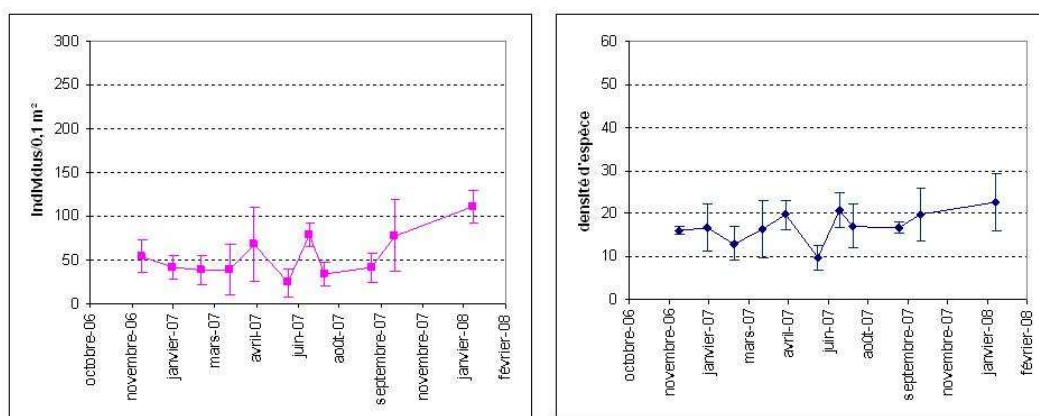
(Hugues Blanchet, X. de Montaudouin et Xavier Crosta)

En raison de sa position à l'interface eau-sédiment, de la durée de vie relativement longue et de la sédentarité des organismes qui la compose la macrofaune invertébrée benthique est reconnue comme un bio-critère prometteur pour l'observation et la bio-surveillance des changements naturels et anthropogéniques des milieux côtiers et littoraux (e. g. Pearson & Rosenberg, 1978 ; Dauvin, 1993 ; Borja et al., 2000). De plus, cette faune joue, par son activité bioturbatrice et sa position dans le réseau trophique un rôle important dans le cycle de la matière et des nutriments en domaine littoral. De son côté le microphytobenthos revêt une importance reconnue tant en ce qui concerne 1) sa participation aux bilans de production primaire et aux cycles des macronutriments (Si, N), notamment dans les zones dans lesquelles la superficie de l'estran est très développée, 2) sa participation aux flux d'alimentation des organismes filtreurs suspensivores lorsque le couplage benthopélagique est développé, deux caractéristiques du Bassin d'Arcachon. Cette communauté peut abriter en outre des espèces réputées toxiques.

Un suivi du microphytobenthos et de la faune invertébrée benthique a été proposé sur une des 3 stations SOARC située dans le chenal du Teychan (44°40.650 N ; 1°06.199 W), à proximité d'une station d'observation des paramètres de la colonne d'eau (Comprian).

Les premières années (depuis 2006) ont été dédiées à la réalisation d'un suivi de cette station selon un pas d'échantillonnage resserré (1 fois par mois, 3 points d'échantillonnage : bas d'estran, haut d'estran et herbier/biofilm) afin de cerner la variabilité annuelle du peuplement de macrofaune benthique (et du microphytobenthos) et d'optimiser une stratégie d'échantillonnage adaptée à un suivi pérenne.

Les résultats obtenus pour la macrofaune benthique montrent une grande stabilité du peuplement benthique suivi au cours de l'année 2007 (Figure 55) et aucune différence n'est observée par rapport à la situation de 2002 (Blanchet, 2004, Pothier, 2007).



**Figure 55 :** Evolution de l'abondance et de la densité d'espèces au cours du suivi du peuplement benthique du chenal du Teychan (novembre 2006 – janvier 2008)

Ces résultats indiquent que le recrutement des espèces benthiques semble à peu près continu sur ce site puisque, contrairement à ce qui était attendu, aucune saisonnalité n'a été détectée. N'ayant réalisé le suivi que sur une seule station, il est impossible de déterminer si ce phénomène est généralisable à l'ensemble des chenaux du Bassin d'Arcachon.

La mise en place du suivi « microphytobenthos » a commencé plus tardivement (2008), la première partie du travail a consisté à mettre au point la technique de prélèvement et de préparation des échantillons. Les résultats préliminaires indiquent une variabilité spatiale importante avec des abondances

de diatomées plus importantes dans les biofilms que dans les sédiments du bas de l'estran. De même, le rapport diatomées vivantes / diatomées mortes est plus fort dans les biofilms que dans les sédiments du bas de l'estran.

L'ensemble de ces résultats (microphytobenthos + macrofaune benthique) montre qu'il est souhaitable de mieux intégrer les variations spatiales à l'échelle du Bassin (suivi sur une autre station → l'une située dans le chenal du Teychan [axe hydraulique Teychan : suivi actuel], l'autre située dans le chenal d'Arès : 2° grand axe hydraulique de la lagune (axe Arès-Piquey)).

L'objectif de pérennisation du suivi sur le long terme (compromis entre questionnement scientifique / pertinence des informations acquises / faisabilité) nous amène à proposer un suivi basé sur 2 campagnes annuelles : (Mai et Novembre avec un effort d'échantillonnage accru pour le suivi de chaque station : 5 échantillons (0,1 m<sup>2</sup>) au lieu de 3 échantillons réalisés au cours du suivi 2008).

## 2. Métabolisme de l'écosystème

Gwenaél Abril, Denis Lousteau, Pierre Polsenaere

### 2.1. Rappel de la problématique générale

*Etablir un bilan de carbone d'un milieu lagunaire tel que le bassin d'Arcachon nécessite la quantification de différents flux entre les compartiments que sont le continent, les fleuves, l'atmosphère, les sédiments de la zone intertidale, et l'eau de mer qui entre et sort à chaque marée et génère des échanges avec l'océan côtier.*

*L'établissement d'un tel bilan permettra de mieux comprendre les fonctionnalités écologiques de la lagune et notamment le rôle des différents producteurs primaires (phytoplancton, microphytobenthos, herbiers de zostères) dans le métabolisme et la capacité trophique de l'écosystème.*

*De plus, la quantification des échanges de CO<sub>2</sub> entre la lagune et l'atmosphère se situe dans une problématique de sources et puits de gaz à effet de serre à l'échelle régionale et vient en complément des travaux réalisés par l'unité INRA-Ephyse sur différents environnements terrestres du bassin versant de la Leyre (Kowalski et al. 2004, Jarosz et al. 2008, Stella et al. soumis, Guillet et al. soumis).*

*Depuis septembre 2007, les acquisitions sont réalisées dans le Bassin d'Arcachon par l'UMR EPOC en collaboration avec l'Unité Ephyse de l'INRA (financement ANR Protidal, AO Région Aquitaine 2007, bourse de thèse du ministère de la recherche et de l'enseignement supérieur, Figure 60). L'objectif est de développer un outil d'observation à moyen et long terme, qui puisse nous renseigner sur les réponses de l'écosystème aux variations climatiques interannuelles et au changement global de l'océan côtier. Ceci nécessite cependant une période de mise au point technique et théorique, qui est en cours.*

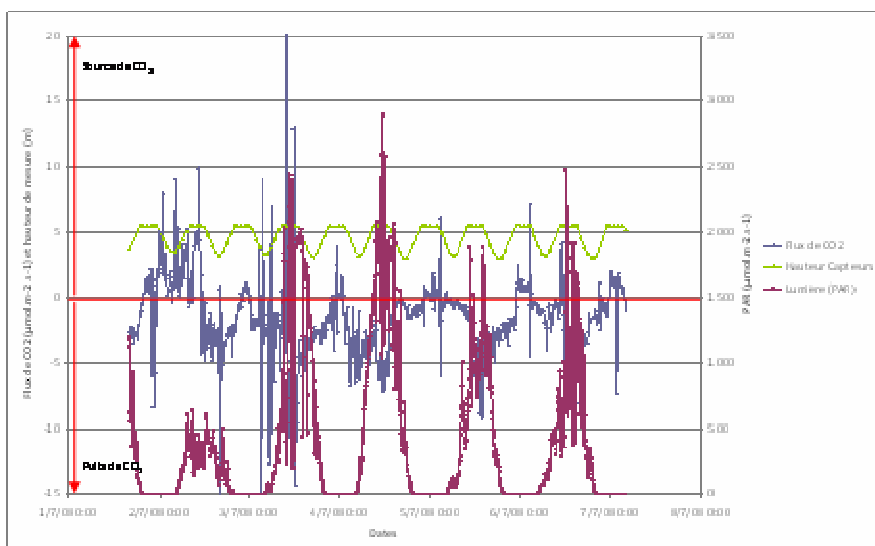


**Figure 60 :** Bassin d'Arcachon, 2008. Acquisition *in situ* des flux de CO<sub>2</sub> avec le système d'eddy-covariance (G. Abril, P. Posenaere, UMR EPOC)

## 2.2. Actions en cours

Notre implication depuis plus d'un an (thèse Pierre Polsenaere) se décline en 3 actions :

1. comprendre et quantifier les flux de carbone organique et inorganique transportés par les rivières alimentant la lagune. Ce point fait l'objet d'un échantillonnage bimensuel depuis Février 2008 et qui continuera jusqu'au printemps 2009 ;
2. étudier les variations spatio-temporelles des concentrations en carbone dans les eaux de la lagune ( $\text{CO}_2$ , carbone organique, et leurs signatures isotopiques). Quatre séries de mesures au cours de cycles de marée et à différentes saisons ont été réalisés (e.g. Figure 61). Elles seront répétées tous les 2 mois pendant toute l'année 2009 ;
3. mettre en place une technique moderne et puissante de mesure directe de flux de  $\text{CO}_2$  entre l'atmosphère et la lagune en utilisant l'eddy corrélation. Cet équipement a fait l'objet d'un financement par la région en 2007 et a été déployé sur site à 3 reprises, pendant des périodes d'environ 15 jours. **L'application de cette technique sur un écosystème côtier tel que le bassin d'Arcachon constitue une première et revêt un caractère particulièrement novateur.**



**Figure 61 :** Premiers résultats de flux de  $\text{CO}_2$  (en bleu) mesurés en Juillet 2008 dans le Bassin d'Arcachon avec le système d'eddy-covariance d'EPOC (Thèse P. Polsenaere). Les résultats montrent à cette saison un pompage de  $\text{CO}_2$  atmosphérique lorsque l'estran est recouvert (hauteur de mesure en vert plus faible et variable avec la marée). Par contre, lorsque l'estran est découvert (hauteur de mesure constante à 5.5m), on observe un pompage de  $\text{CO}_2$  le jour (cf courbes de lumière en mauve) et un dégazage de  $\text{CO}_2$  la nuit. Ceci sera vérifié à d'autres saisons et mis en relation avec les empreintes de la mesure (direction et intensité du vent horizontal) et les biomasses des différents producteurs primaires du Bassin d'Arcachon.

Pour les années 2009 et 2010, les recherches vont se poursuivre dans ces 3 directions. Nous nous donnons encore 2 ans de travail théorique et sur le terrain pour avancer sur notre compréhension tant des potentialités et limites des outils que nous mettons en œuvre, que des résultats des observations que nous réalisons, avant de proposer de nouvelles actions. Cette période sera aussi mise à profit pour étudier la nature et les flux de carbone à l'échelle du bassin versant, en distinguant notamment les échanges de  $\text{CO}_2$  atmosphérique avec les environnements terrestres et aquatiques, ainsi que le transport latéral de carbone par les fleuves.

Ainsi durant cette période, en plus de la continuation des 3 actions décrites ci-dessus, nous allons compléter l'action 1 par une étude de flux de carbone biogénique exporté par la nappe phréatique plioquaternaire dans le bassin versant Leyre-Arcachon. Ce travail qui sera réalisé en étroite collaboration

entre Ephyse (Thèse M Guillot, INRA-Ephyse) et EPOC (Thèse P. Polsenaere), consistera à mesurer de façon périodique la concentration en CO<sub>2</sub> dissous de la nappe plio-quadernaire le long d'un transect partant des parcelles amont et allant jusqu'à la Leyre en mettant à profit le réseau de piézomètres existant (INRA, BRGM, DIREN), éventuellement complété par l'ajout d'un ou deux points de prélèvement supplémentaires. Ceci permettra la quantification du flux de carbone du milieu terrestre vers le milieu aquatique et de faire le lien entre les actions menées par Ephyse et EPOC sur le bassin versant du Bassin d'Arcachon.

### **3. Outils de gestion du milieu**

#### **3.1. Transport sédimentaire dans le bassin d'arcachon**

(Aymeric Jouon, Aldo Sottolichio)

L'hydrodynamique et le transport de sédiments sont des éléments fondamentaux qui structurent les milieux marins côtiers. Le lancement ou la pérennisation de quelque activité que ce soit dans ces milieux côtiers ne peut s'affranchir des contraintes que ces processus engendrent. Envisager une production aquacole sans tenir compte de ces contraintes reviendrait à entreprendre une production agricole sans tenir compte ni du climat, ni de la nature du sol à disposition.

En effet, l'hydrodynamique et la disponibilité des sources de sédiments déterminent la nature des fonds marins. Ces deux paramètres sont donc à l'origine d'une caractéristique fondamentale d'un écosystème : la nature du substrat. De surcroît, la turbidité des eaux générée par le transport particules minérales et organiques en suspension est un paramètre physique qui, au même titre que la température et/ou la salinité, joue un rôle sur la production primaire.

Les paramètres régissant le transport sédimentaire :

- Les courants (hydrodynamique) :

L'action de l'hydrodynamique sur le transport sédimentaire est double. Dans un premier temps, les courants induisent une tension de frottement sur le fond. De l'intensité de cette tension dépend la remise en suspension du sédiment. Dans un second temps, une fois le sédiment mobilisé par la tension de frottement sur le fond, l'hydrodynamique va advecier et diffuser le sédiment (transport). Sous l'effet de leur propre poids, les particules sédimentaires vont se déposer aux endroits et/ou aux instants où la tension de frottement sur le fond est faible.

L'hydrodynamique sur le bassin d'Arcachon est contrainte par deux forçages majeurs :

- La marée

L'onde de marée se propage à l'intérieur du Bassin d'Arcachon provoquant des courants oscillants de très forte intensité.

- La météo

- Le vent

Par friction à la surface du plan d'eau, le vent induit des déplacements de masses d'eau qui se traduisent par des courants et une élévation relative du plan d'eau sous le vent.

- La pression atmosphérique

La pression exercée par l'atmosphère sur la surface du plan d'eau joue également sur l'hydrodynamique. Au passage d'une dépression, il se produit une surcôte dite « barométrique inverse ». L'analogie à une ventouse est souvent utilisée pour décrire la marée barométrique inverse.

- Les vagues

Au passage d'une vague, il se produit une oscillation horizontale de la colonne d'eau dans le sens de propagation de la vague. Cette oscillation, combinée à l'action du courant a tendance à augmenter la valeur de la tension de frottement de la colonne sur le fond. La prise en compte des caractéristiques du

champ de vagues est donc indispensable pour l'estimation des processus d'érosion et de dépôt des sédiments. On distingue deux types de vagues : la houle et la mer de vent (clapot).

- La houle

La houle provient d'une distance importante. Souvent générée par les tempêtes dans les zones hauturières, elle se propage à travers les océans jusqu'à rencontrer des obstacles (côte).

- La mer de vent

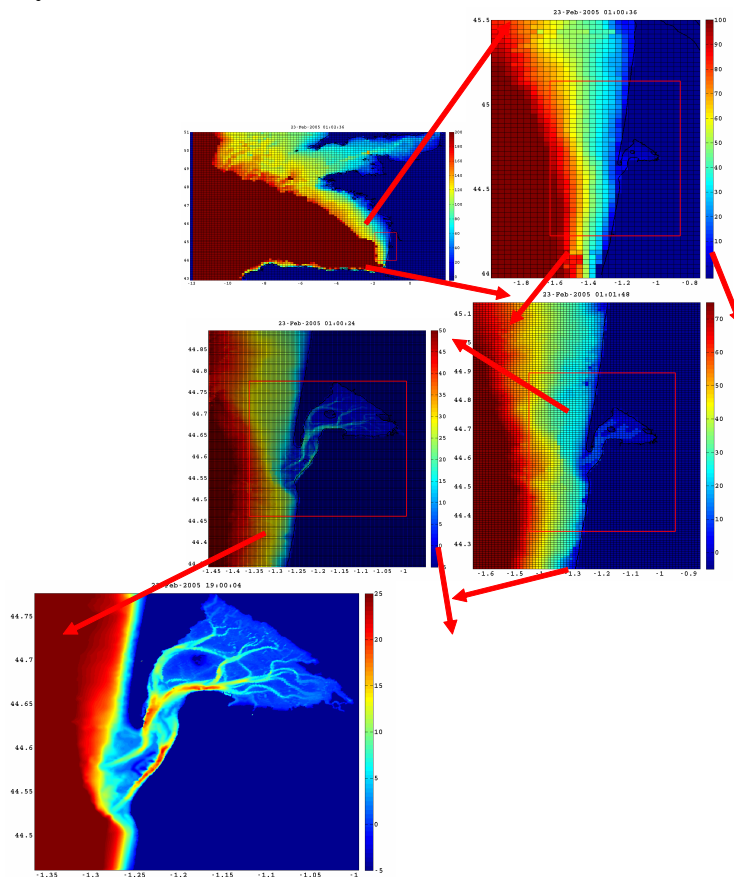
La mer de vent est générée localement par la friction du vent à la surface du plan d'eau.

En raison de son caractère semi fermé, la partie interne du Bassin d'Arcachon est moins soumise à l'action de la houle qu'à celle de la mer de vent.

- Les sources de sédiment

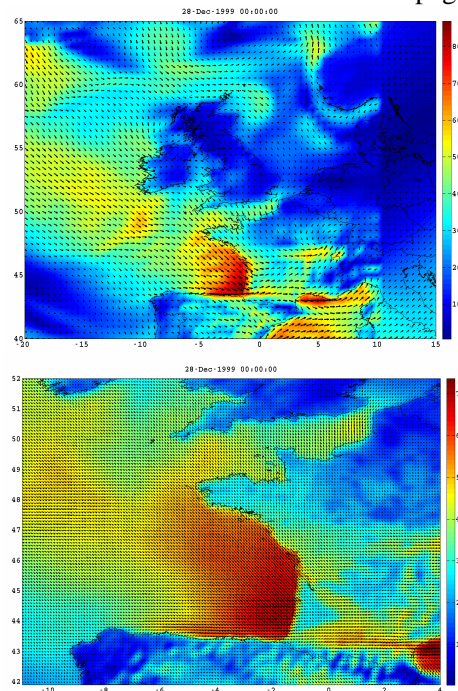
Les débits solides des rivières qui se jettent dans le Bassin d'Arcachon sont faibles. La remise en suspension apparaît comme la source majeure de sédiments en suspension dans la colonne d'eau. Les sédiments benthiques du Bassin d'Arcachon présente un éventail granulométrique important allant du sable grossier aux vases.

Les données hydrodynamiques sont fournies par le modèle numérique MARS3D (IFREMER). La solution numérique adoptée est une imbrication de maillages (Figure 62), allant du plus étendu (résolution spatiale faible) au plus ciblé (haute résolution spatiale). Cette méthode permet de propager l'onde de marée et les surcôtes météorologiques du large vers le Bassin d'Arcachon.



**Figure 62** : Imbrication des maillages

Le forçage en marée se fait aux limites du rang le plus étendu spatialement par une composition harmonique de l'élévation de surface (donnée SHOM). Le forçage météo est réalisé par l'intermédiaire des données issues des modèles METEO-France : Arpège et Aladin (Figure 63).

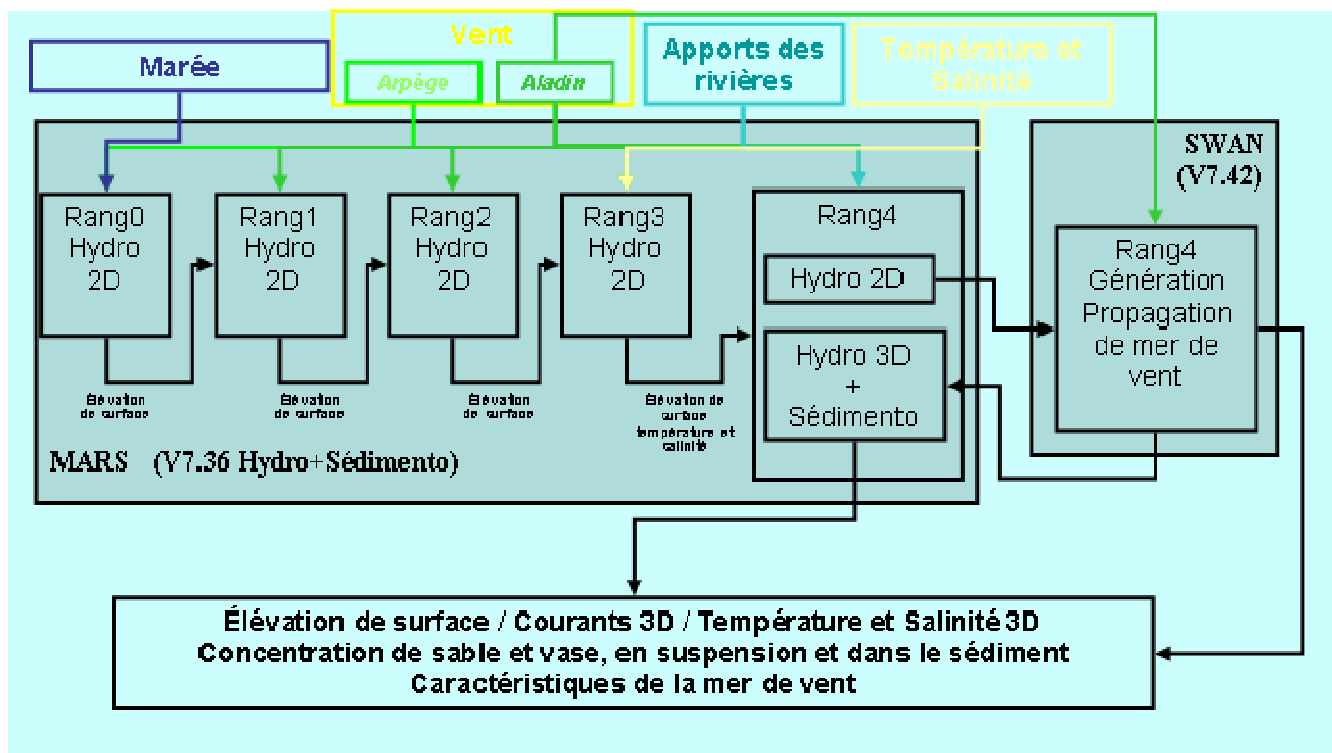


**Figure 63** Extension et résolution spatiale des modèles Arpège (gauche) et Aladin (Droite) de Météo-France.

- Les données de vagues sont produites par le modèle numérique de génération et de propagation de vagues SWAN (7.42). La grille adoptée est identique à celle utilisée par le modèle hydrodynamique, il en est de même pour le forçage en vent. Enfin, le modèle de vagues bénéficie des élévations de surface et des courants calculés par le modèle hydrodynamique, afin de représenter au mieux les surfaces mouillées et la propagation des vagues dans le Bassin.

Bien que cela ne soit pas l'objectif final de cette étude, le modèle hydrodynamique seul produit des données susceptibles de trouver des applications pour la gestion du milieu. Ainsi, les données hydrodynamiques produites peuvent contribuer à la détermination des surcôtes maximales envisageables en différents points du bassin (aide à la décision pour les plans de prévention des inondations) Il en va de même pour le modèle de vagues. Ainsi les données de vagues disponibles sur tout le bassin à quelque moment que ce soit peuvent participer à la détermination des hauteurs de vagues maximales à l'intérieur du système. Le dimensionnement des ouvrages côtiers, ou l'estimation du transit littoral sableux pour les plages internes au bassin nécessitent ce type de données non accessible autrement (aide à la décision dans toutes les problématiques d'aménagements côtiers).

- La couverture sédimentaire benthique, identifiée comme source majeure des sédiments en suspension sera intégrée en entrée de la plateforme de modélisation (Figure 64). Dans un premier temps, un fond théorique, mélange homogène de sable et de vases sera pris en compte pour jauger la capacité du modèle à reproduire qualitativement la nature des fonds du bassin. La répartition granulométrique simulée sera comparée à une carte sédimentologique du bassin d'Arcachon.



**Figure 64** Architecture de la plateforme de modélisation hydrodynamique/agitation/sédiment.

Les sédiments sont des particules dites « passives » et « conservatives ». Malgré la complexité des phénomènes prenant part à leur mobilisation, leur transport et leur dépôt, les particules sédimentaires n'ont pas la capacité de se mouvoir par elle-même, ni d'évoluer dans le temps. A partir du modèle de transport sédimentaire implémenté sur le bassin d'Arcachon, il sera possible, en modifiant les lois propres à chacun des types de particules ciblées (capacité natatoire pour certaines larves, cinétique de floraison du phytoplancton etc. ), d'adapter le modèle pour le transport de particules d'autres natures.

### 3.2. Vers un dispositif de surveillance participatif

(Denis Salles, Hugues Blanchet, Sylvie Latrille, Benoît Sautour)

La contribution des usagers et des parties-prenantes des écosystèmes à leur observation et à leur surveillance tend, de plus en plus, à être envisagée comme un complément nécessaire aux expertises scientifiques et techniques habituellement réalisées par les chercheurs et les administrations. Il ne s'agit pas remettre en cause les connaissances scientifiques disponibles mais de les compléter, voire de les susciter, par le recueil de témoignages et d'observations effectuées par des « sentinelles » qui disposent, au travers de leurs activités, d'un lien et d'un regard privilégié sur les milieux. La sociologie des « lanceurs d'alerte » (Chateauraynaud, Torny, 1999) a montré comment dans des secteurs sanitaires ou industriels marqué par l'incertitude, les dispositifs classiques de veille et de gestion des risques pouvaient être pris à défaut et utilement suppléés par une institutionnalisation de réseaux de surveillance pragmatiques, décentralisés et coopératifs. Le degré de participation et d'enrôlement des citoyens-usagers à ce type d'initiative collective peut varier dans le temps et en intensité selon les objectifs envisagés et le niveau d'apprentissage des participants. (Sabel C., Fung A., Karkakainen, 2000)<sup>3</sup>.

<sup>3</sup> Les auteurs développent l'exemple de comités de surveillance citoyens déployés pour la préservation de la Baie de Chesapeake aux USA.

La proposition faite dans le présent programme visait à étudier la faisabilité de mise en place d'un dispositif de surveillance participatif (aucun financement demandé). L'implication récentes de nouvelles disciplines des Sciences Humaines et Sociales sur le Littoral Aquitain, nous a amené à reconsidérer le planning et les objectifs.

La nouvelle proposition (réponse à l'AO recherche Région 2009) envisage d'instituer à titre expérimental un dispositif de surveillance et d'alerte appuyé sur le recueil des savoirs des usagers et des professionnels du Bassin afin de compléter les observations scientifiques, voire d'orienter vers de nouvelles recherches.

Le Bassin d'Arcachon étant très fréquenté par des professionnels (notamment des ostréiculteurs) il est envisagé de les associer à un recueil d'informations à large échelle spatiale et avec une fréquence de l'ordre de la journée. Nous proposons donc en étroite collaboration avec la commission environnement des ostréiculteurs (S. Latrille) d'étudier la faisabilité de la mise en place d'un dispositif de collecte de macro-observations (et à plus long terme d'un réseau de surveillance participatif).



## VOLET MICROCAPTEURS

Coordination : Dominique Rebière, Bernard Bennetau

### 1. Introduction

Ce projet microcapteur a pour objectif final la mise en place d'un système d'analyse rapide, des phycotoxines (libres ou conjuguées) dans le milieu marin. La plateforme de lecture est constituée d'un transducteur acoustique à ondes de love et la capture des toxines est basée sur le mécanisme de reconnaissance anticorps-antigène.

Les phycotoxines ont des structures chimiques très différentes et sont regroupées par famille (65). En France, trois familles présentant un risque sanitaire majeur ont été identifiées. Chacune correspond à la nature des symptômes qu'elle provoque : les ASP (pour Amnesic Shellfish Poisoning), les PSP (Paralytic Shellfish Poisoning) et les DSP (Diarrhetic Shellfish Poisoning).

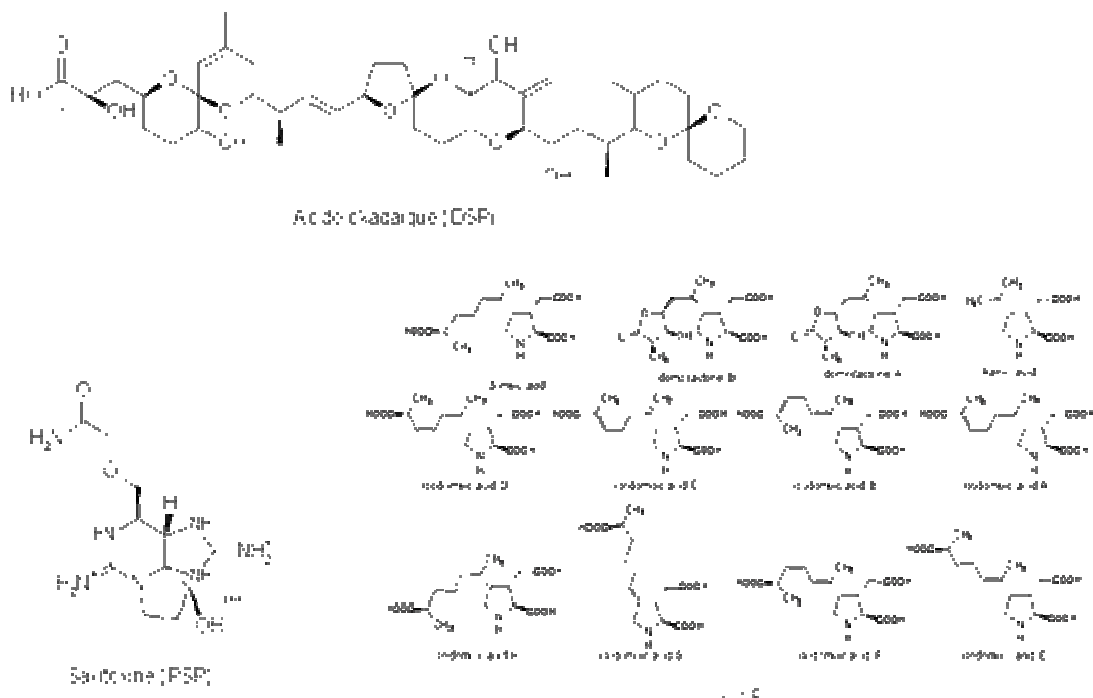


Figure 65: Phycotoxines.

Des anticorps sélectifs dirigés contre l'acide okadaïque, la saxitoxine ou l'acide domoïque sont déjà disponibles commercialement. Par contre, il n'existe pas d'anticorps capable de reconnaître simultanément les diverses molécules d'une même famille. L'un de nos objectifs est d'obtenir un tel anticorps, pour la famille des ASP, et démontrer la faisabilité de ce type d'immunocapteur.

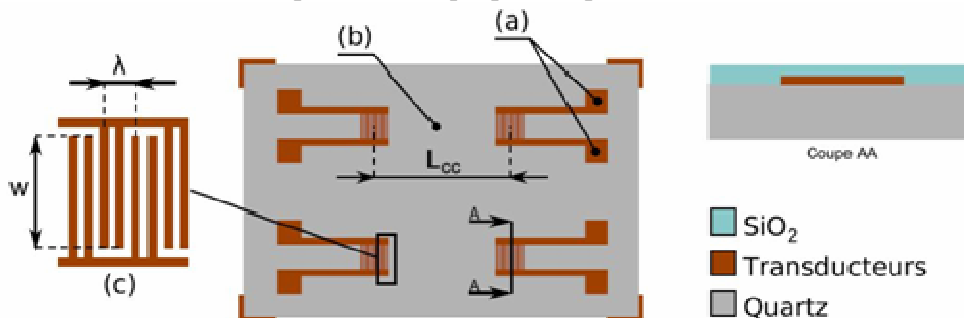
### 2. Plateforme à ondes de Love

Les dispositifs à ondes de Love constituent une solution intéressante pour effectuer des mesures en microfluidique en raison de leurs grandes sensibilités gravimétriques et de leurs capacités à fonctionner en milieu liquide. L'absence de parties mobiles, combinée à ses faibles dimensions grâce aux techniques de

fabrication de la microélectronique, sont autant d'avantages supplémentaires pour cette application biodétection.

## 2.1. Géométries Ligne à retard

Les capteurs étudiés au sein du laboratoire IMS durant nos travaux sont constitués de deux lignes à retard à ondes de Love et leur géométrie est illustrée à la figure 66. Chaque capteur est composé d'un substrat piézoélectrique de quartz de coupe AT (angles d'Euler :  $0^\circ, 121.5^\circ, 90^\circ$ ) de 0.5 mm d'épaisseur sur lequel des couches de Titane (30 nm, couche d'accroche) puis d'or (70 nm) sont déposées, puis gravées pour obtenir les plots de contacts (a) ainsi que les transducteurs interdigités (c). La réalisation technologique des lignes à retard est effectuée par le LAAS de Toulouse dans le cadre du Réseau Technologique de Base (RTB) du CNRS. Chaque transducteur est composé de 44 paires de doigts, l'organisation en doubles doigts permettant d'éviter les réflexions de Bragg pouvant intervenir entre les doigts. La longueur d'onde des transducteurs, notée  $\lambda$ , est de 40  $\mu\text{m}$ , et la distance centre à centre des transducteurs, notée  $L_{cc}$ , est de 209  $\lambda$ . L'ouverture des transducteurs, notée  $W$  est de 40  $\lambda$ , chacune des électrodes faisant  $\lambda/8$  (soit 5  $\mu\text{m}$ ) de large, structures doubles doigts. Une couche guidante de  $\text{SiO}_2$  recouvre l'ensemble du dispositif à l'exception des plots de contact. Son épaisseur est de l'ordre de 4  $\mu\text{m}$ . Ces paramètres conduisent à une fréquence de synchronisme des dispositifs située aux environs de 117 MHz. Le chemin acoustique, qui correspond à la zone sensible du capteur est indiqué par le repère (b).



**Figure 66** : Schéma de la géométrie des capteurs à ondes de Love.

## 2.2. Conditionnement électronique: montage oscillateur

Les variations des conditions de propagation de l'onde acoustique se matérialisent par une modification de la vitesse et une atténuation de l'onde. Pour mesurer ces grandeurs physiques, nous avons principalement deux méthodes à notre disposition :

- la mesure à l'analyseur de réseau, qui permet de mesurer les paramètres de dispersion ( $S_{ij}$ ) dans le domaine fréquentiel ou temporel, et donne accès notamment à la fréquence de résonance ainsi qu'aux pertes par insertion du dispositif.
- le fonctionnement en oscillateur, dans lequel le capteur est placé dans une boucle d'oscillation. A l'aide d'un fréquencemètre il est ainsi possible de suivre les variations de la fréquence d'oscillation, donnant ainsi une image des variations de la vitesse de propagation de l'onde dans le milieu environnant. La mesure des pertes peut s'effectuer à l'aide de coupleurs et d'un wattmètre.

La seconde méthode donne accès à moins d'informations mais présente l'avantage d'être plus aisément miniaturisable. Elle offre en outre une grande précision sur la mesure de fréquence, autorise un fonctionnement en temps réel. Le capteur à ondes acoustiques est placé dans une boucle d'oscillation, schématisée par les figures 67 et 68. Des coupleurs sont utilisés pour prélever une partie du signal afin d'effectuer une mesure en minimisant la perturbation sur la boucle d'oscillation. La fréquence de l'oscillateur va suivre un point équiphase, à proximité de la fréquence de synchronisme de la ligne à retard. Ainsi la mesure des variations de la fréquence donne une image des variations de la vitesse de propagation de l'onde de Love.

Pour obtenir une oscillation, la boucle doit satisfaire les conditions de Barkhausen en gain :

$$G_{\text{ligne à retard}} + G_{\text{amplification}} + G_{\text{autres éléments}} = 0^+ \text{ dB} \quad (1.1)$$

Ainsi qu'en phase:

$$2\pi f_0 L_{cc}/V_p + 2\varphi_{\text{IDT}} + \varphi_E = 2n\pi \quad (1.2)$$

Avec :

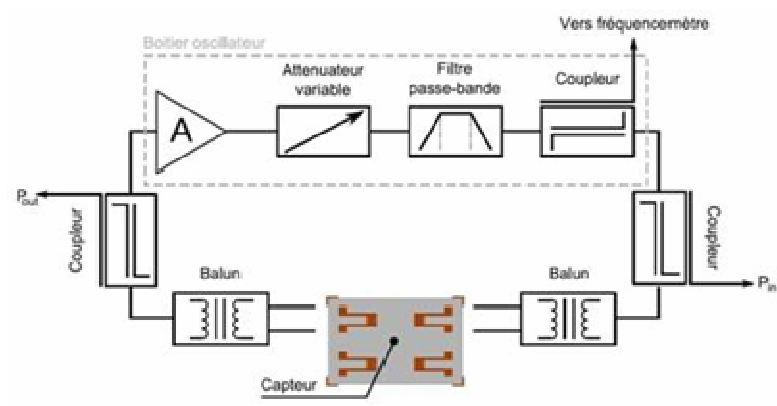
- $2\pi f_0 L_{cc}/V_p$  : déphasage de la ligne à retard,  $f_0$  étant la fréquence de synchronisme,  $L_{cc}$  la distance centre à centre des transducteurs interdigités et  $V_p$  la vitesse de phase de l'onde de Love.
- $\varphi_{\text{IDT}}$  : déphasage introduit par un transducteur interdigité ;
- $\varphi_E$  : déphasage introduit par la chaîne amplificatrice ;
- $n$  : entier naturel.

L'équation (1.1) impose que la somme des gains des éléments de boucle soit proche de l'unité: le gain de l'amplificateur doit donc être supérieur aux pertes apportées par la ligne à retard. L'équation (1.2) impose que la somme des déphasages introduits par les éléments de boucle soit multiple de  $2\pi$ . La chaîne d'oscillation est décrite en détail dans les travaux de thèse de N. Moll<sup>4</sup>.

La sensibilité  $S_{vm}$  du capteur à ondes de Love, exprime la variation relative de la vitesse de phase du capteur en fonction d'un ajout de masse sur sa surface active. Cette sensibilité est accessible théoriquement. En revanche, la mesure s'effectuant en fréquence, et non directement en vitesse de phase, il devient nécessaire de relier ces deux grandeurs si l'on souhaite pouvoir confronter les résultats théoriques aux résultats expérimentaux. Il est intéressant de noter que les sensibilités précédemment exprimées en vitesse de phase peuvent l'être en fréquence :

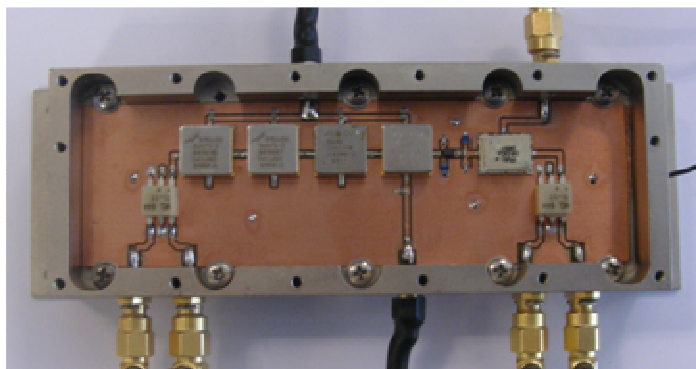
$$S_{fm} = \Delta f/f_0 \cdot A/\Delta m \quad (1.3)$$

Avec  $\Delta f$  [Hz] la variation relative de fréquence due à l'ajout de masse  $\Delta m$  [kg] sur la surface active  $A$  [m<sup>2</sup>],  $f_0$  [Hz] représentant la fréquence du dispositif avant la perturbation.



**Figure 67 :** Synoptique de l'architecture de la boucle d'oscillation pilotée par la ligne à retard, donnant accès à la mesure des variations de fréquence et d'atténuation de la ligne à retard considérée. Chaque dispositif à ondes de Love étant muni de deux lignes à retard, une seconde chaîne amplificatrice permet un fonctionnement en mode différentiel.

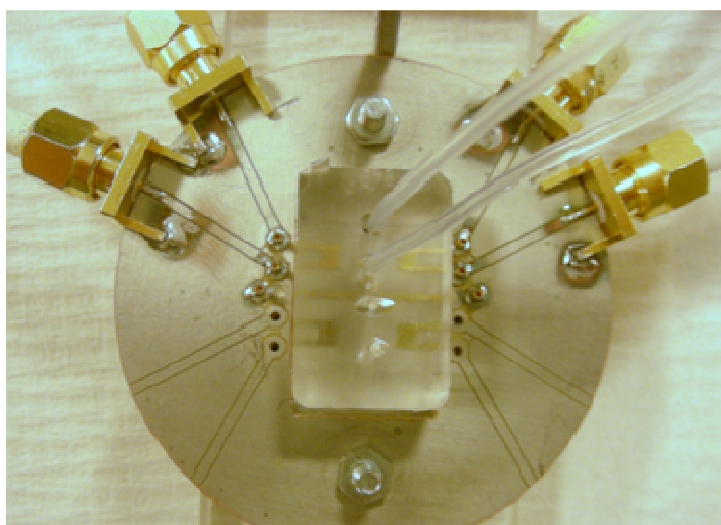
<sup>4</sup> Moll, N.. Thèse de doctorat, Université Bordeaux 1, 2007. Étude et réalisation d'un système immunocapteurs à ondes de Love : application à la détection de toxines, de virus ou de bactéries.



**Figure 68 :** Photo de l'électronique de rétroaction d'un montage oscillateur, configuration avec baluns pour fonctionnement en milieu liquide (conception et réalisation IMS).

### 2.3. Cellule de mesure pour milieux liquides

Une cellule spécifique à l'application a été conçue et développée par l'équipe MDA du laboratoire IMS sous la responsabilité de notre collègue Jean-Luc Lachaud, Ingénieur d'Etude CNRS. Cette cellule, en technologie circuit imprimé, offre les avantages d'une simplicité de mise en œuvre et d'utilisation et d'un coût de réalisation faible. La partie supérieure de la cellule supporte des pointes de touche montées sur ressorts qui permettent d'assurer un contact électrique entre les plots des lignes à retard et les connecteurs SMA d'entrée et de sortie. Une vue complète de la cellule est donnée en figure 69. Les performances électriques ont été évaluées sous analyseur de réseau et nous assurent des conditions de fonctionnement très satisfaisantes des lignes à retard. La réalisation de ce module constitue une étape déterminante dans le développement de la plateforme de détection.



**Figure 69 :** Cellule de mesure RF avec puce microfluidique

### 2.4. Techniques de fabrication de dispositifs PDMS

La technique de lithographie souple à être introduite par le groupe de Whitesides<sup>5</sup> [Whi98]. Basée sur l'activation de matériaux souples comme le poly(diméthylsiloxane) PDMS, elle permet la réalisation de puce microfluidique.

<sup>5</sup> Xia, Y.; Whitesides, G. M. *Annual Review of Materials Science*, 1998, 28, 153-184.

Le procédé de fabrication, connu sous le nom de "rapid prototyping" se décompose en trois étapes :

1. Création d'un masque souple.
2. Fabrication d'un moule par photolithographie.
3. Fabrication de la puce microfluidique de lithographie souple.

Dans le cadre de notre projet, le processus de fabrication des puces microfluidiques reprend celui utilisé par Vincent Raimbault dans le cadre de sa thèse [Raim08], mené dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire du futur LOF Rhodia (Pessac).

Après l'étape de création du masque intervient la photolithographie qui va permettre de créer le moule qui servira à la fabrication des puces microfluidiques. Pour ce faire, nous utilisons une résine photosensible aux UV de type SU8 2000 fournie par la société Microchem. Les paramètres de dépôt varient également en fonction de l'épaisseur désirée. Nous nous intéresserons par la suite à un dépôt de résine SU8 2100 de 100µm d'épaisseur.

1. déshydratation.
2. silanisation.
3. enduction.
4. soft bake.
5. insolation.
6. post expose bake (ou PEB).
7. développement.
8. rinçage et séchage.

La dernière et troisième étape est la fabrication des puces microfluidiques en poly(diméthylsiloxane)

Le PDMS utilisé est du Sylgard 184 commercialisé par la société Dow Corning. Il se présente sous la forme de deux produits, du PDMS non réticulé, à l'état liquide, et un agent réticulant. L'empreinte que représente le moule va être imprimée dans l'élastomère en quatre étapes.

La première étape est de réaliser un mélange homogène constitué de PDMS et de son agent réticulant. La concentration massique d'agent réticulant dans le PDMS est de 1 :10. Ce ratio peut être ajusté pour modifier les propriétés mécaniques du matériau final, comme par exemple pour en augmenter la rigidité. L'ensemble est mélangé à l'aide d'une spatule, puis placé dans une cloche à vide pour effectuer un dégazage à 50 mbar. Le mélange est ensuite versé sur le moule, puis placé à nouveau dans une cloche sous vide afin d'obtenir un débullage plus fin. Un soin tout particulier doit être apporté à cette étape, d'autant plus lorsque les motifs du moule sont de petite taille. L'ensemble est placé sous étuve durant une heure à une température de 65°C, afin d'assurer une réticulation partielle du PDMS (la température permettant d'accélérer le phénomène).

Une fois passé à l'étuve, le PDMS est partiellement réticulé et se trouve sous la forme d'un élastomère. Les puces microfluidiques sont alors découpées puis retirées du moule. La faible tension superficielle du PDMS permet un démoulage aisé. Les trous d'alimentation sont réalisés à l'emporte pièce: ces étapes sont réalisées sous une hotte à flux laminaire afin d'éviter au maximum la contamination des puces avec des poussières.

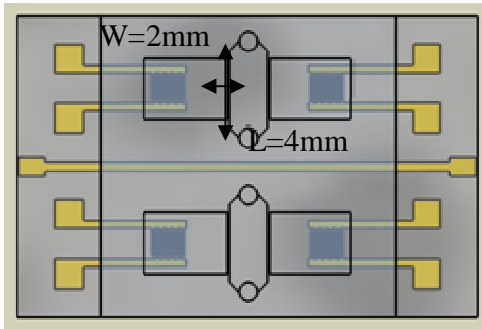
## 2.5. Géométries des puces microfluidiques (1° et 2° générations)

Les premières géométries de puces microfluidiques (première génération développée dans les travaux de thèse de Vincent Raimbault<sup>6</sup> [Raim08]) possédaient des motifs adaptés en particulier à l'écoulement de liquides très visqueux (plusieurs centaines de Pa.s), ne couvrant qu'une partie de chemin de propagation

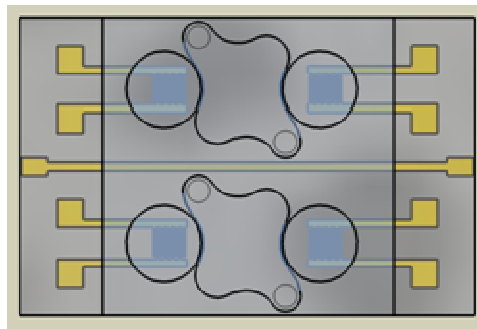
---

<sup>6</sup> Raimbault, V.. Thèse de doctorat, Université Bordeaux 1, 2008. Etude et développement d'un système microfluidique à ondes de Love dédié à la caractérisation de fluides complexes.

de l'onde acoustique. En effet, la largeur du canal microfluidique était de l'ordre de 2 mm pour une longueur de canal de 4 mm (figure 70). De plus, ces puces étaient collées directement et de manière définitive sur la ligne à retard (activation des liaisons OH par traitement UV-Ozone).



**Figure 70: Ancien motif microfluidique**

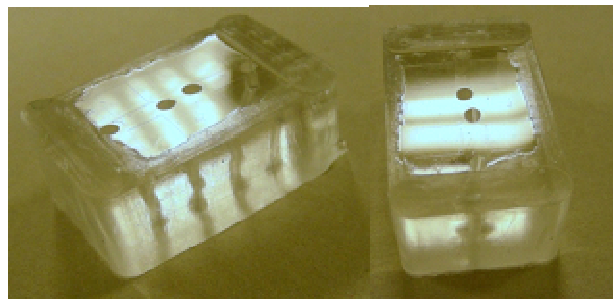


**Figure 71 : Nouveau motif microfluidique**

Dans le cadre de notre projet, la nécessité de réaliser différentes étapes de fonctionnalisation sur le chemin de propagation, nos collègues de l'ISM nous ont demandé d'étudier et de réaliser un système de puce microfluidique amovible. Cette contrainte forte nous a amené à repenser la géométrie des puces microfluidiques et en particulier de prendre en compte non seulement le maintien de cette puce par pression mais aussi la géométrie du canal.

Il faut donc élargir les canaux microfluidiques, tout en prévoyant une forme qui permettra d'amoindrir les efforts aux niveaux des murets du motif microfluidique, entre le micro-canal et les cavités, protégeant les IDTs. Nous avons donc développé une nouvelle architecture (figures 71 et 72).

La largeur des microcanaux est passée de 2 mm à 4 mm et les coins des murets ont été arrondis. La longueur initiale de 4 mm a été portée à 5 mm. La hauteur des canaux et l'épaisseur des murets du canal restent à 100 µm. La hauteur totale de deux puces microfluidiques est de 10 mm.

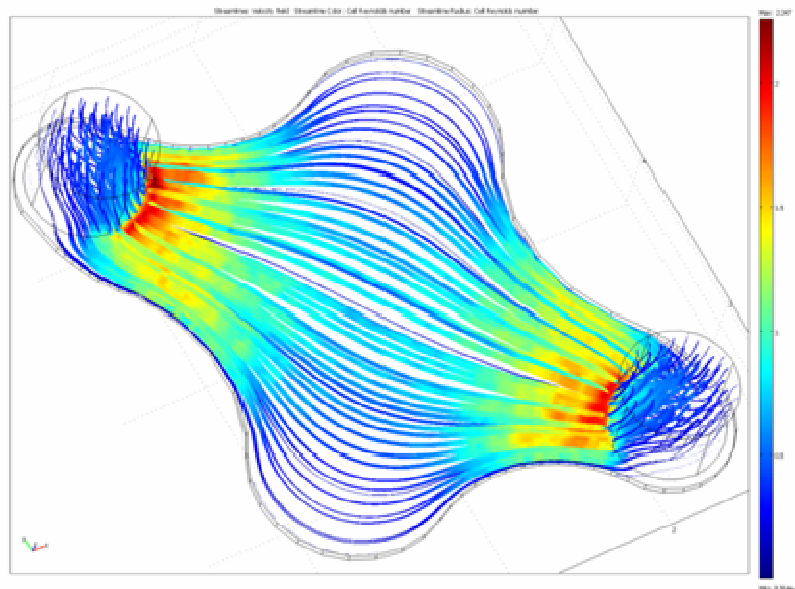


**Figure 72: Première génération de puce microfluidique**

La conception de nouveaux motifs microfluidiques ont été menés dans l'environnement COMSOL. Ce logiciel permet de visualiser, en 2D ou en 3D, des phénomènes multi-physiques complexes.

Pour illustrer les différentes études réalisées, nous présentons quelques exemples de résultats de simulation, en particulier :

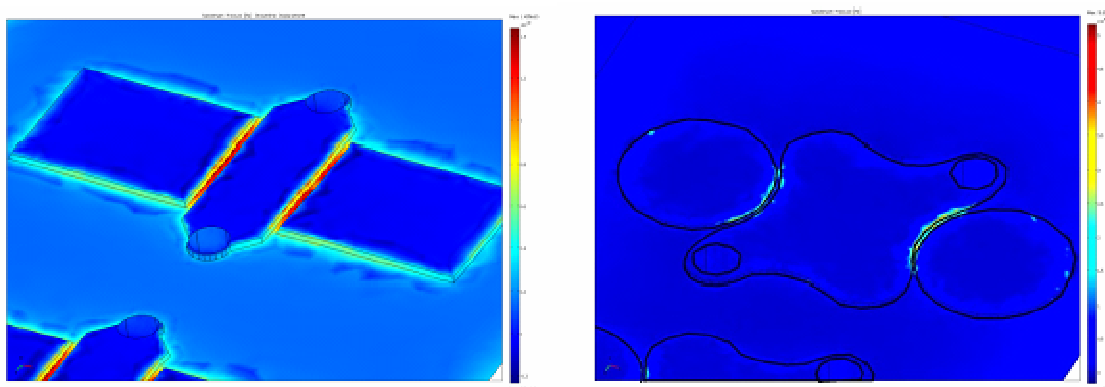
- écoulement microfluidique dans cavité PDMS.
- déformation de structure PDMS sous contrainte de déplacement.



**Figure 73** : Simulation écoulement microfluidique COMSOL

Sur la figure 73, en haut à gauche, est injecté de l'eau à débit constant 0.1ml/min. En bas à droite, la condition en sortie du motif est d'avoir une pression à 0 Pa par rapport l'entrée. Les lignes représentent les courants que suit le liquide et les couleurs, la vitesse, allant de 15 mm/s aux embouchures à 2 mm/s dans les coins du motif. Cette première simulation permet donc de voir que la nouvelle géométrie ne gêne en rien l'écoulement microfluidique avec un débit constant au-dessus de chemin de propagation de l'onde. Le renouvellement complet de la chambre est évalué à 10 secondes.

Un déplacement de 0.1 mm imposé à la surface de la puce (10 mm de haut) avec la face inférieure encastrée (ne bouge pas) permet une simulation de l'état de contrainte (figure 74). La comparaison entre l'ancien motif et le nouveau montre clairement l'intérêt de la nouvelle génération. Cette étape d'optimisation de la géométrie faite, nous sommes engagés à la micro fabrication de cette dernière génération de puce microfluidique.



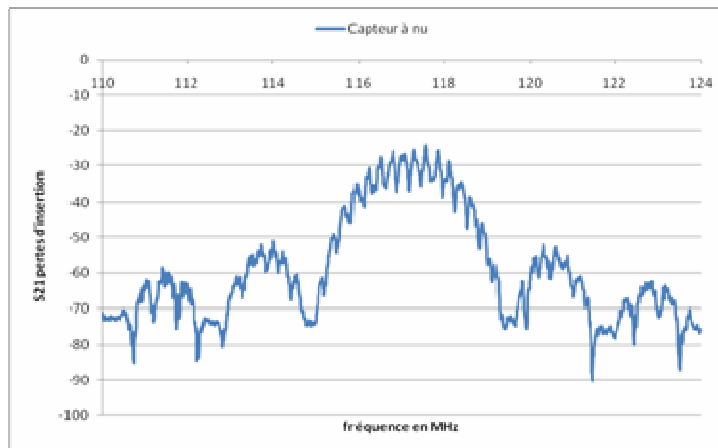
**Figure 74** : Résultats simulation contraintes (gauche: ancien motif, droite: nouveau motif)

## 2.6. Caractérisations Electriques (analyseurs de réseaux)

Avant d'être utilisé sur le banc de mesure, nos capteurs sont caractérisés électriquement sous analyseur de réseau. Ceci permet d'avoir une trace de l'évolution de leurs caractéristiques au fur et à mesure des traitements chimiques ou des améliorations qu'on leur applique.

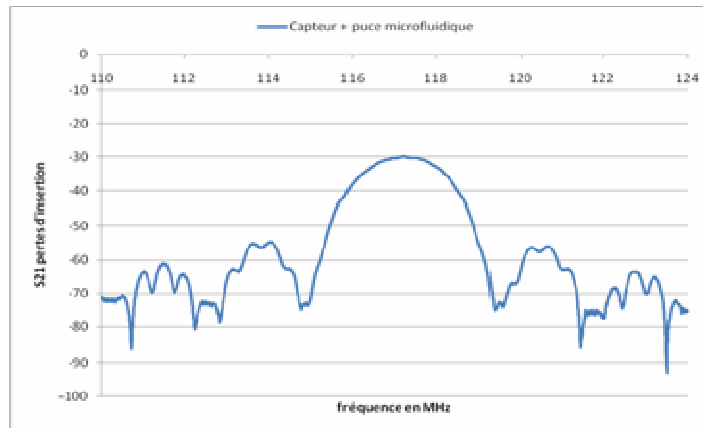
Les pertes d'insertion d'une ligne à retard (S21) mesurées sous analyseur de réseaux sont au voisinage de

25dB (figure 75).



**Figure 75 :** Caractérisation d'un capteur dans une cellule de mesure sans puce microfluidique (S21)

Le lobe principal, pour lequel les pertes sont les plus faibles, correspond à la fréquence de résonance du dispositif au voisinage de 117,57 MHz.

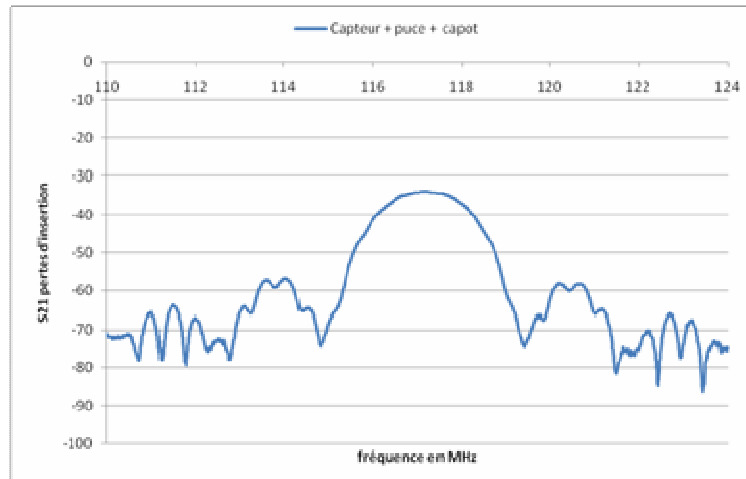


**Figure 76:** Caractéristique d'un capteur avec sa puce microfluidique

L'ajout d'une puce microfluidique permet de réduire les réflexions parasites et conduit à lisser la caractéristique de transfert. Le PDMS a pour effet d'absorber les réflexions acoustiques du fait de son caractère viscoélastique (figure 76).

Pour pouvoir injecter des liquides, il faut assurer une étanchéité entre la plateforme à onde acoustique et la puce microfluidique. Le principe retenu est d'exercer une pression par serrage de la puce.



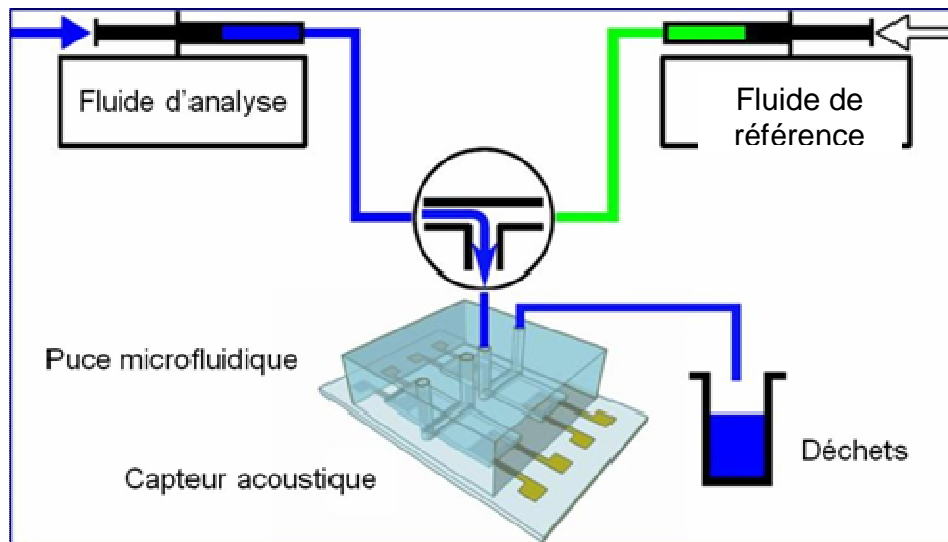


**Figure 77 :** Caractéristique d'un capteur avec puce microfluidique et capot de serrage

Les pertes générées par la pression de la puce microfluidique restent acceptable tout en gardant une étanchéité. Des études complètes sont en cours de réalisation pour s'assurer de la robustesse du système.

## 2.8. Banc de mesure microfluidique

Une description du banc de test est donnée à la figure 78. Le pilotage des instruments et de la mesure est réalisé par un ordinateur (acquisition et gestion des données).



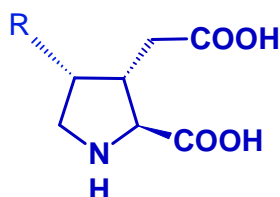
**Figure 78 :** Schéma du banc de mesure pour circulation de fluide en microfluidique

## 3. Haptènes et synthèses chimiques

### 3.1. Choix de la structure de l'haptène et stratégie de synthèse

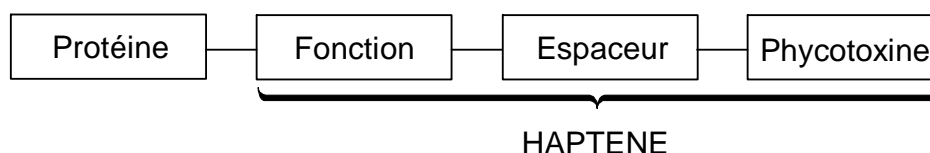
Les diverses toxines de la famille des ASP diffèrent par la chaîne alkyle sur la position -4 (Figure 79) mais présentent une partie commune. L'obtention d'anticorps dirigés contre cette partie commune, permettrait donc de disposer d'un test immunologique capable de détecter l'ensemble des toxines appartenant à la famille des ASP. Contrairement aux tests dirigés uniquement contre l'acide domoïque, celui-ci

présenterait l'avantage de détecter des molécules analogues non encore répertoriées. Ceci pourrait s'avérer utile dans les cas d'épisodes atypiques de toxicité comme ceux déjà décrits par l'AFSSA<sup>7</sup> dans le bassin d'Arcachon.



**Figure 79** : Partie commune des ASP.

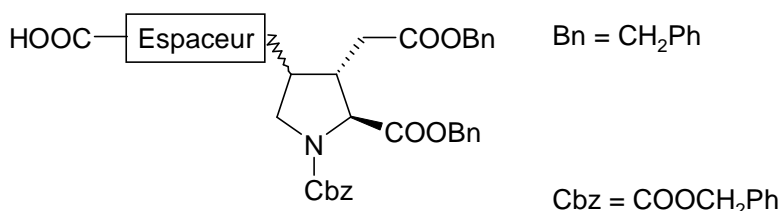
Les phycotoxines sont des molécules de faible poids moléculaire; elles sont antigéniques (pouvant être reconnu par les anticorps), mais non immunogéniques (n'induisant pas la production d'anticorps). Pour qu'un organisme produise des anticorps contre une petite molécule, il est donc nécessaire de la fixer sur une protéine porteuse avant injection à l'organisme hôte. Pour cela, la toxine ciblée doit être modifiée par ajout d'un bras espaceur terminé par une fonction acide (ou amine) qui permettra la fixation sur la protéine. Cet ensemble est appelé **haptène** (Figure 80).



**Figure 80** : Représentation d'un haptène.

#### *Choix de la structure*

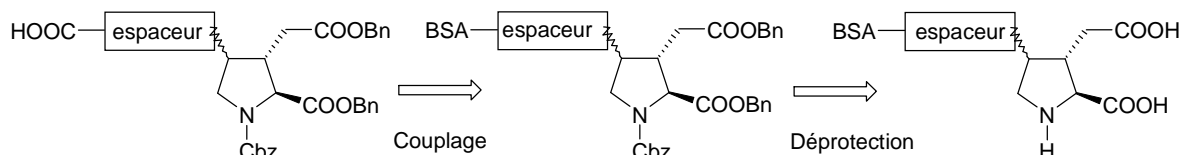
La structure visée est donnée ci-dessous (Figure ); elle présente une forte analogie avec la partie commune des ASP (Figure 79) afin d'espérer des anticorps les plus affins possible.



**Figure 81** : Structure de l'haptène

La fonction acide carboxylique (COOH) permet ce couplage par formation d'une liaison peptidique avec les fonctions amines libres d'une protéine porteuse. La BSA (Bovine Serum Albumine) possède 26 motifs lysines accessibles, soit autant de sites permettant de fixer l'haptène. La partie commune des ASP présentent deux fonctions acides carboxyliques et une fonction amine (Figure 79) qui doivent être protégées avant le couplage à la BSA afin de réaliser sélectivement la conjugaison par la fonction COOH à l'extrémité du bras espaceur. Après couplage à la BSA, les groupes protecteurs sont éliminés afin de retrouver la structure chimique de la partie commune des ASP (Schéma 1).

<sup>7</sup> affsa Avis de l'Agence Française de sécurité sanitaire des aliments relatif à la pertinence des outils de détection des phycotoxines lipophiles dans les coquillages, AFSSA, 2008.



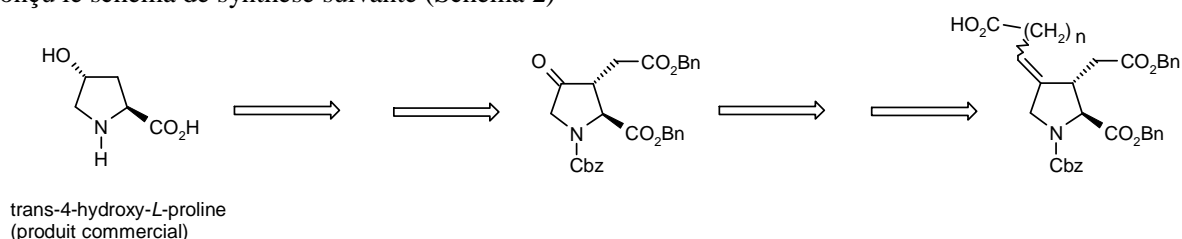
**Schéma 1 : Couplage et déprotection.**

*Remarques :*

- Le bras espaceur doit être une chaîne alkyle dont la longueur optimum est de 2 à 5 carbones.<sup>8,9</sup>
- La stéréochimie de l'haptène, doit respecter la stéréochimie de la structure de la molécule-cible.

### Stratégie de synthèse

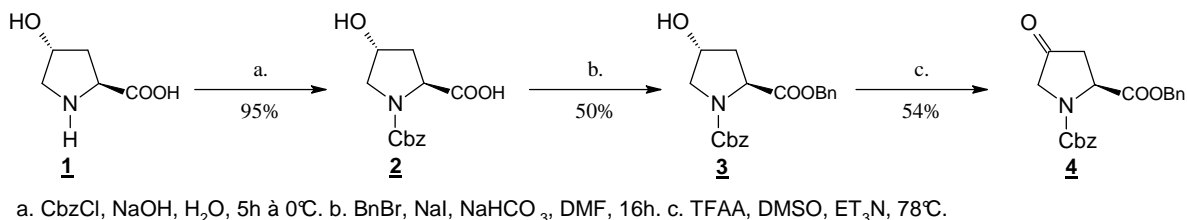
A partir de l'hydroxyproline (produit commercial), Ganorkar<sup>10</sup> et Baldwin<sup>11</sup> ont présenté la synthèse de composés proches structurellement de précurseurs de l'haptène souhaité. Ainsi, nous avons conçu le schéma de synthèse suivante (Schéma 2)



**Schéma 2 : Stratégie de synthèse.**

## 3.2. Synthèse de l'haptène

La cétone **4**, est obtenue en trois étapes (rendement global 26%), après protection des fonctions acide et amine de l'hydroxyproline puis oxydation de la fonction hydroxyle (Schéma 3):



**Schéma 3 : Synthèse de la cétone **4****

L'alkylation de la cétone **4** en position -3, est réalisée par réaction de Stork<sup>12</sup> via l'énamine intermédiaire **5** (). Elle conduit à un intermédiaire-clé, composé nouveau, à partir duquel des haptènes, avec des bras espaceurs de différentes longueurs pourront être synthétisés. La stéréochimie *trans* des carbones -2 et -3 a été confirmée par RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) du proton (<sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 5,4 Hz). Cette valeur correspond à celles trouvées par Baldwin<sup>11</sup> et Holladay<sup>13</sup> sur des composés de structure similaires.

<sup>8</sup> Schaefer, O.; Bohlmann, R.; Schleuning, W.-D.; Schulze-Forster, K.; Humpel, M. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005, 53, 2881-2889.

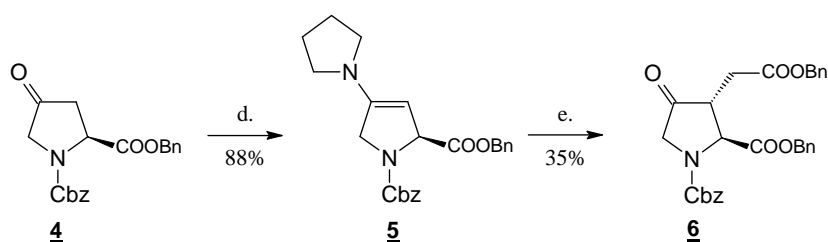
<sup>9</sup> Zhang, Q.; Wu, Y.; Wang, L.; Hu, B.; Li, P.; Liu, F. *Analytica Chimica Acta* 2008, 625, 87-94.

<sup>10</sup> Ganorkar, R. *J. Org. Chem.* 2006, 71, 5004-5007.

<sup>11</sup> Baldwin *Tetrahedron* 1997, 53, 5233-5254.

<sup>12</sup> Stork, G.; Brizzolara, A.; Landesman, H.; Szmuszkovicz, J.; Terrell, R. *Journal of the American Chemical Society* 1963, 85, 207-222.

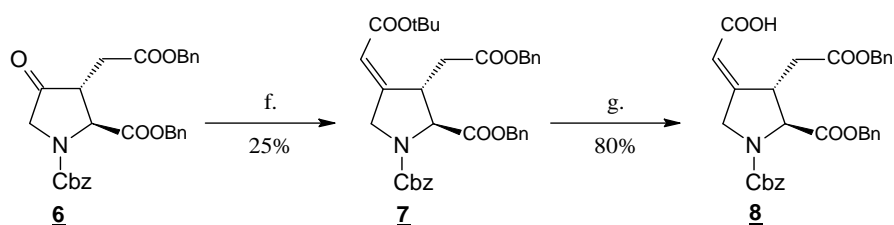
<sup>13</sup> Holladay, M. W.; Lin, C. W.; May, C. S.; Garvey, D. S.; Witte, D. G.; Miller, T. R.; Wolfram, C. A. W.; Nadzan, A. M. *Journal of Medicinal Chemistry* 1991, 34, 455-457.



d. Pyrrolidine, tamis moléculaire (4A), benzène. e. Bromoacétate de benzyle,  $K_2CO_3$ , Acétonitrile, Acide acétique (10%), chloroforme.

**Schéma 4** : Synthèse de l'intermédiaire.

Après plusieurs tentatives infructueuses, la fixation du bras espaceur, par réaction de Wittig-Horner<sup>10</sup>, entre le diéthylphosphonoacétate de *t*Bu et la fonction carbonyle a pu être réalisée. La fonction acide carboxylique terminale est ensuite régénérée<sup>14</sup> pour le couplage à la BSA (Schéma 5).

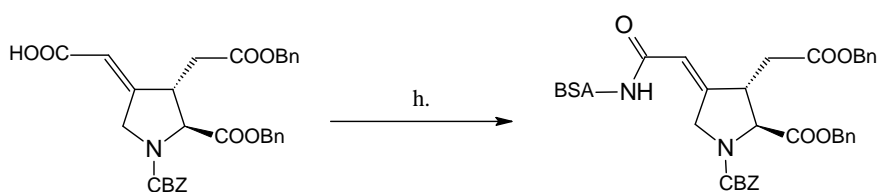


f.  $(EtO)_2POCH_2COOtBu$ , LHMDS, THF. g. TFA,  $Et_3SiH$ , dichlorométhane.

**Schéma 5** : Fixation du bras espaceur par réaction de Wittig Horner et déprotection.

### 3.3. Couplage à la BSA

Le couplage à la BSA a été réalisé en parallèle sur deux échantillons en faisant varier les conditions opératoires de couplage<sup>15</sup> (Schéma 6).



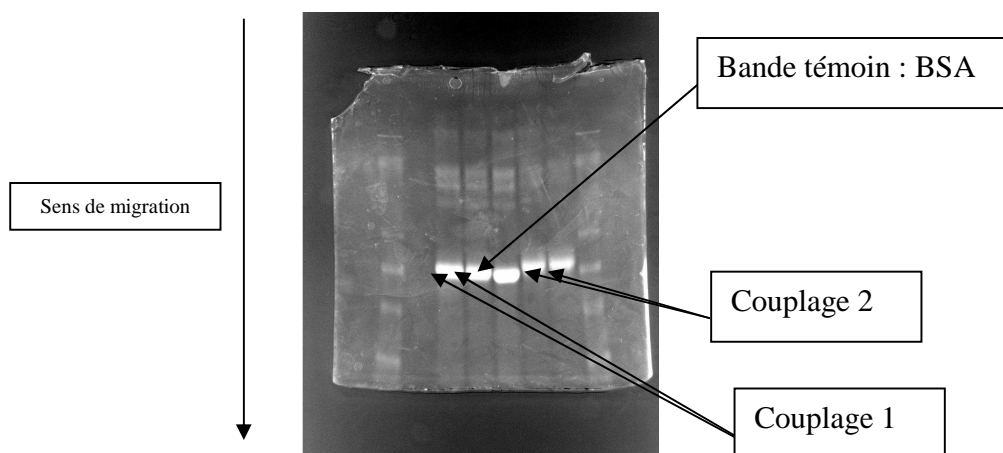
h. BSA, NHS, EDC, DMF, tampon borate borique, 0°C.

**Schéma 6** : Couplage de l'haptène protégé sur la BSA.

Les résultats obtenus ont été analysés par électrophorèse de façon à vérifier et quantifier le couplage (Figure 82).

<sup>14</sup> Mehta, A.; Jaouhari, R.; Benson, T. J.; Douglas, K. T. *Tetrahedron Letters* 1992, 33, 5441-5444.

<sup>15</sup> Brinkley, M. *Bioconjugate Chemistry* 1992, 3, 2-13.

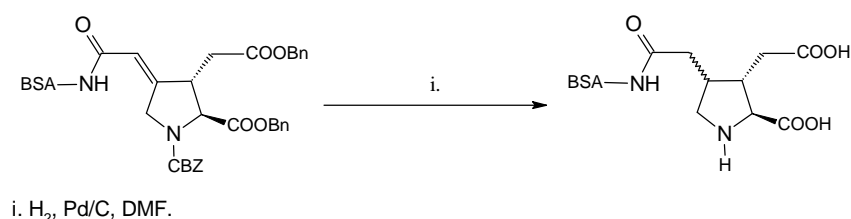


**Figure 82 : Mise en évidence du couplage par électrophorèse.**

La bande témoin correspond la migration de la BSA libre. Le couplage d'un ou plusieurs haptènes sur la BSA a pour effet d'augmenter le poids moléculaire. Un couplage, s'il est réussi, montrera des bandes avec une rétention sur le gel plus importante. Dans notre cas, les couplages 1 et 2 migrent plus lentement que la BSA seule ce qui indique que des haptènes ont bien été couplés à la BSA.

Une quantification est possible et donne, respectivement, 2-3 haptènes et 11-13 haptènes pour les couplages 1 et 2.

L'étape suivante consiste à libérer les fonctions acide et amine et réduire la double liaison C=C en liaison simple par hydrogénation sur charbon (Schéma 7).



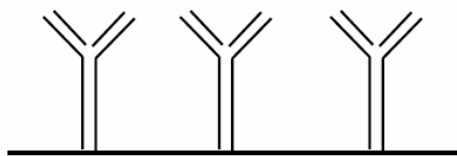
**Schéma 7 : Déprotection et réduction du produit couplé.**

Les haptènes greffés ont été envoyés pour injection aux lapins et production des anticorps (temps d'immunisation 90 jours). Parallèlement, une étude complémentaire par spectrométrie de masse (MALDI) sera effectuée pour confirmer avec précision le taux de greffage des haptènes sur la BSA.

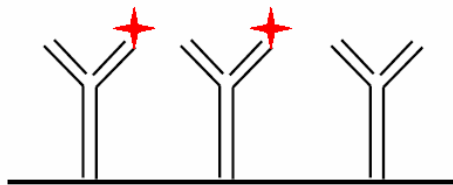
### 3.4. Immunologie

La détection d'une molécule par des anticorps fixés sur une surface est fonction de l'augmentation de masse : plus la masse augmente plus la fréquence mesurée est modifiée. Dans le cas présent les toxines dont nous envisageons la détection ont une masse très faible surtout si nous la comparons aux anticorps qui doivent la capturer. Nous avons donc prévu de réaliser une détection indirecte.

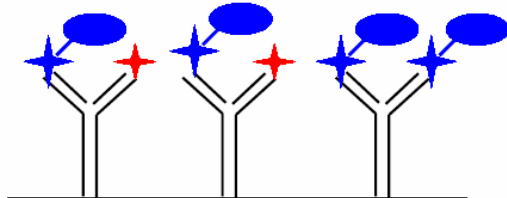
Tous les essais préliminaires ainsi que la plupart des mises au point seront faites non pas sur un dispositif à ondes de Love mais dans des microplaques de type ELISA.



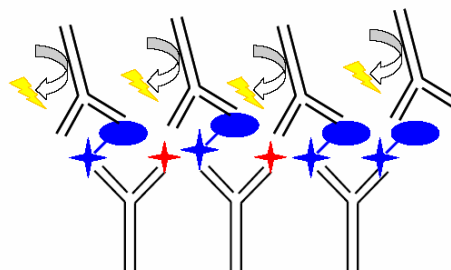
**Etape 1 Fixation des anticorps**



**Etape 2 Fixation des toxines**



**Etape 3 Fixation des toxines-protéines**



**Etape 4 Révélation avec un anticorps anti-protéine marqué**

*La révélation par un anticorps secondaire marqué par une enzyme n'est utilisée que dans les tests ELISA préliminaires, lors de l'utilisation du capteur la réaction s'arrêtera à l'étape 3.*

Nous avons étudié les effets de la concentration saline sur la réaction antigène/anticorps. En effet, l'immunocapture devant se faire en eau de mer il convenait de vérifier quelles étaient les répercussions de la salinité sur l'affinité des anticorps. Nous avons utilisé divers couples antigènes/anticorps ayant des affinités allant de faible à forte. Si les anticorps ayant une faible, voire une moyenne affinité seront difficile voire impossible à utiliser en eau de mer, les anticorps ayant une forte affinité sont parfaitement utilisables avec une faible perte.

Nous avons prévu de faire des essais d'ELISA indirect en utilisant un peptide composé de six Histidines (6 His) et une protéine de haut poids moléculaire portant l'étiquette 6 His. Pour des essais préliminaires, nous avons utilisé un peptide de synthèse mais nos premiers résultats indiquent que le peptide n'est pas reconnu par les anticorps anti 6His. Après analyse, il s'est avéré que les anticorps anti-6His sont produits par des animaux immunisés avec des protéines portant l'étiquette 6His et non avec le peptide libre. Ce peptide ayant très peu de contraintes il présente, sous sa forme libre, une structure tridimensionnelle différente de celle de la forme contrainte de l'étiquette 6His.

Dans une deuxième série d'expériences, nous avons testé un autre couple : biotine/protéine biotinilée. La biotine étant une molécule ayant de fortes contraintes présente la même conformation sous sa forme libre ou sa forme liée à une protéine. La détection indirecte est fonctionnelle mais demande encore de nombreux ajustements : en effet nous avons pu montrer l'importance de la concentration de la protéine biotinilée qui à trop forte concentration est capable de déloger la biotine de l'anticorps anti biotine.

## **4. Conclusion**

Au cours de cette première année, un premier haptène des ASP a été synthétisé et couplé à une protéine porteuse. Après une étape de déprotection, les haptènes conjugués ont été confiés à une société, spécialisée dans le domaine des biotechnologies, pour la production des anticorps. Dans le même temps, des analyses complémentaires sont effectuées pour confirmer les taux de greffage de chaque échantillon.

## 5. Perspectives

La longueur du bras espaceur est un paramètre crucial pour la sensibilité et la spécificité des anticorps. Une analyse bibliographique montre que cette longueur doit se situer entre 2 et 5 atomes de carbone. Aussi, sans attendre les prochaines études immunologiques (sensibilité et spécificité des anticorps), nous avons d'ores et déjà démarré une nouvelle synthèse d'haptène avec un bras espaceur à 4 atomes de carbone. L'obtention de ce bras espaceur nécessite la synthèse d'un nouveau phosphonate, accessible en trois étapes à partir du crotonate de méthyle.<sup>16,17,18</sup>

Lors de l'immunisation, l'animal va produire un nombre important d'anticorps différents dirigés contre les divers motifs structuraux de la molécule injectée (BSA + haptène). C'est ce qu'on appelle un mélange polyclonal. Cela signifie que les anticorps récupérés seront dirigés contre l'haptène et contre la BSA, diminuant ainsi la concentration des anticorps anti-ASP. Afin de minimiser cet inconvénient, l'haptène est conjugué à une autre protéine porteuse. Notre choix s'est porté sur l'ovalbumine, protéine issue du blanc d'œuf. Elle présente une masse légèrement plus faible (45 kDa) que celle de la BSA (66 kDa), mais garde un nombre important de sites lysines accessibles (20) pour le couplage.<sup>19</sup> Deux stratégies sont également envisageables pour améliorer la qualité de la réaction anti toxine : épuiser les anticorps anti BSA ou procéder à une immuno-purification par chromatographie d'affinité (sur colonne ou en couplant l'haptène à des billes magnétiques)

Le greffage des anticorps est prévu pour le deuxième semestre 2009. Les premiers tests d'évaluation des performances du capteur seront menés avec les anticorps anti ASP obtenus, ainsi qu'avec des anticorps commerciaux contre l'acide okadaïque, famille des DSP.

Dès que l'immunisation des lapins sera terminée nous étudierons l'affinité et l'avidité des anticorps produits, nous ferons éventuellement un appauvrissement et/ou une immuno-purification.

Afin de définir des conditions expérimentales optimales, nous allons tester des couples toxine/anti-toxine disponibles dans le commerce, comme l'acide domoïque et l'acide okadaïque ainsi que des anticorps spécifiques. Nous allons essayer de coupler ces toxines *via* leurs fonctions acides à des billes magnétiques portant des fonctions NH<sub>2</sub> à leur surface. Nous pourrions ainsi faire des essais de détection de toxines en utilisant une version non finalisée du capteur. Ces anticorps sont cependant très spécifiques d'une seule toxine et ne permettront pas une détection de tous les membres de la famille comme devraient le permettre les anticorps anti-haptènes qui sont en cours de réalisation.

---

<sup>16</sup> Vasin, V. A.; Razin, V. V. *Synlett* 2001, 2001, 0658-0660.

<sup>17</sup> Orsini, F.; Pelizzoni, F.; Ricca, G. *Synthetic Communications* 1982, 12, 1147 - 1154.

<sup>18</sup> Boeckman, R. K.; Estep, K. G.; Nelson, S. G.; Walters, M. A. *Tetrahedron Letters* 1991, 32, 4095-4098.

<sup>19</sup> Huntington, J. A.; Stein, P. E. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 2001, 756, 189-198..

## PRODUCTION SCIENTIFIQUE

---

### Publications

- Achamlale S., Rezzonico B., Grignon-Dubois M. (2008) Evaluation of *Zostera* detritus as a potential new source of zosteric acid. *Journal of Applied Phycology*, DOI 10.1007/s10811-008-9375-8
- Achamlale S., Rezzonico B., Grignon-Dubois M. (2009) Rosmarinic acid from beach waste: Isolation and HPLC quantification in *Zostera* detritus from Arcachon lagoon. *Food Chemistry* 113 : 878–883.
- Durrieu G., Nguyen TMN, Sow M., 2009. Comparaison d'estimateurs de régression non paramétriques : Application en valvométrie. Soumis pour les 41<sup>èmes</sup> journées de statistiques.
- Deborde J., Abril G., Mouret A., Jézéquel D., Thouzeau G., J. Clavier, Bachelet G., Anschutz P. 2008. Effects of seasonal dynamics of a *Zostera noltii* meadow on phosphorus and iron cycles in a tidal mudflat (Arcachon Bay, France). *Marine Ecology Progress Series* 355, 59-71
- Deborde J., Anschutz P., Glé C., Commarieu M.V., Lecroart P., I. Auby, D. Maurer, Abril G. (2008) Sediment-Water exchanges at low tide in a mesotidal lagoon: the Arcachon Bay (France). *Marine Chemistry* 109, 98-114
- de Perre C , Crespo A, Abou Mrad N, Le Ménach K, Jaber F, Parlanti E, Budzinski H, Intérêt de la micro-extraction sur phase solide couplée à la chromatographie en phase gazeuse et à la spectrométrie de masse pour l'analyse des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les eaux, *Spectra Analyse*, 2009.
- Sow M., Durrieu G., Briollais, L., Ciret P., Massabau, J.C., 2009. Modeling high-frequency serial valvometrie data of oysters : interest of kernel regression based-approach. *Ecological Modelling*, soumis.

### Présentations orales

- Crespo A, de Perre C, Le Ménach K, Parlanti E, Budzinski H (2007), Etude intégrée sur la présence et le devenir des HAP dans le Bassin d'Arcachon, Journées Bassin d'Arcachon Novembre 2007.
- Canton M., Anschutz P., Molnar N., Poirier D. (2007) Nitrogen dynamics in a small anthropized permeable catchment of a coastal lagoon (Arcachon Bay, France) LOICZ International Meeting, Shanghai, China.
- Canton M., Anschutz P., Poirier D., Bujan S., Mouret A., Savoye N. (2008) Nutrient behaviour in tidal estuaries of the Arcachon lagoon. XI International Symposium on Oceanography of the Bay of Biscay, San Sebastian, Apr. 2008.
- Canton M., Anschutz P., Savoye N. (2009) Fate and transformation through tidal estuaries of biogenic material originating from continental waters: Comparison of three estuaries of the Arcachon lagoon, France. ASLO meeting, Jan. 2009, Nice.
- Deborde J., Abril G., Mouret A., Anschutz P. (2007) Influence of seagrass dynamics on phosphorus and iron cycling in temperate lagoon systems. Gordon Research Conference, Chemical Oceanography, Tilton, NH, USA
- Deborde J., Abril G., Canton M., Guérin F., Poirier D., Boucher G., Thouzeau G., Anschutz P. (2007) Methane sources, sinks, and atmospheric fluxes in a temperate tidal lagoon (Arcachon Bay, France). LOICZ International Meeting, Shanghai, China.
- Deborde J., Abril G., Mouret A., Bujan S., Jézéquel D., Thouzeau G., J. Clavier, Bachelet G., Anschutz P (2008). Impacts of seasonal dynamics of a *Zostera noltii* meadow on phosphorus and iron cycles in a tidal mudflat (Arcachon Bay, France). XI International Symposium on Oceanography of the Bay of Biscay, San Sebastian, Apr. 2008.



- Deborde J., Abril G., Poirier D., Mouret A., Anschutz P. (2008) Methane sources, sinks, and atmospheric fluxes in a temperate tidal lagoon. ASLO Symposium, St John's, Newfoundland, Canada, June 2008.
- Mouret A., Deborde J Poirier D., Anschutz P. (2008) Spatial heterogeneity of diagenetic parameters in a coastal environment. ASLO Symposium, St John's, Newfoundland, Canada, June 2008.
- Delgard M.L., Bruno Deflandre Lucie Pastor, Edouard Metzger, A. Gremare, and P. Anschutz (2009) Use of voltammetric solid-state microelectrode for studying the effect of tidal forcing on biogeochemical processes in mudflat of the Arcachon Bay (France). ASLO meeting, Jan. 2009, Nice.

## **VALORISATION - FORMATION**

---

### **Post doctorats :**

- Bec Béatrice (2007-08). Caractérisation des relations entre communautés phytoplanctoniques intra et extra-Bassin d'Arcachon.
- Bodin Nathalie (2007-2008) Développement d'une Approche Toxicity Identification Evaluation (TIE)
- Tapie Nathalie (2008) "Développement d'outils intégratifs pour le suivi des pesticides et application au Bassin d'Arcachon". Financement de la Région Aquitaine

### **Thèses**

- Canton Mathieu, commencée en oct. 2006. Dynamique des nutriments du bassin versant du Bassin d'Arcachon . Financement de la Région Aquitaine
- Crespo Alexia (2005-2009) "Etude intégrée sur la présence et le devenir des HAP dans le Bassin d'Arcachon"
- Murcia Frédéric (2007-2010) "Etude de la contamination du bassin d'Arcachon par les pesticides"

### **Stage Ingénieur**

- Armstrong Nicholas (2008) Développement analytique pour l'analyse et le dosage des pesticides

### **Master 2**

- Belles Angel (2009) Développement et application des échantillonneurs passifs.
- Chodjai Davy (2008) Etude de la contamination du Bassin d'Arcachon par les HAP.
- Delgard Marie-Lise (2009) Mesures in situ de la dynamique biogéochimique de l'estran du bassin d'Arcachon
- Morisseau François (2008-09) Origine et qualité de la matière organique particulaire dans les écosystèmes côtiers atlantiques.
- Soulier Coralie (2008) Développement d'un échantillonneur passif pour les substances pharmaceutiques et les alkylphénols polyéthoxylés.

### **Master 1**

- Charbonnier Céline (2009) Etude d'une carotte sédimentaire de 3 m dans l'estran du bassin d'Arcachon.
- Bouchet Aurélie (2008) Etude de la bioaccumulation de polluants métalliques (Cu, Zn, Hg et Cd), de la réponse des métallothionéines et de l'expression de gènes d'intérêts chez *Crassostrea gigas* après transplantation sur différents sites du Bassin d'Arcachon.
- Boulet Florent (2008) Etude sur l'huître *Crassostrea gigas* du Bassin d'Arcachon : Réalisation de coupe histologique et extraction et dosage d'hormones stéroïdes sur l'hémolymph de *Crassostrea gigas*
- Molnar Nathalie (2007) Etude du Ponteil, un ruisseau se jetant dans le Bassin d'Arcachon, impacté par une décharge.

### **Licence 3 - IUT**

- Chollon Florent (2008) Développement d'une approche couplant Chimie Biologie dite "TIE"
- Couffinhal Benedicte (2007) méthodologie dans la biogéochimie des sédiments

Deschamps Marion (2008) Analyse de la qualité microbiologique des eaux de baignade du Bassin d'Arcachon de 2000 à 2007.

Ribeiri Alexandre (2008) Echantillonnage, conditionnement et analyse des eaux et des sédiments

Say-Liang-Fat Yann (2008) Analyse de données sur la qualité microbienne des bivalves dans le Bassin d'Arcachon.