

SPONTOX

UTILISATION D'*HYMENIACIDON PERLEVIS* COMME
BIOINDICATEUR DE L'ENVIRONNEMENT LITTORAL

2011-2012



Culture d'*Hymeniacidon perlevis*

Olivier Basuyaix, SMEL

Christelle Caplat, ABTE-Université de Caen BN

Stéphane Le Glatin, LDA50

Marie-Laure Mahaut, CNAM –INTECHMER

Les potentialités des spongiaires en tant que bioindicateurs de la qualité de l'eau sont évaluées dans le cadre du programme SPONTOX depuis l'automne 2009, et sont comparées à celles des moules intégrées dans le réseau national de biosurveillance ROCCH (anciennement RNO) (IFREMER 2007). La première démarche dans le cadre de ce programme a été d'établir un état des lieux de la biodiversité et de la répartition des spongiaires sur les côtes de la Manche et du Calvados afin d'identifier une espèce particulièrement abondante et commune qui pourrait être pressentie comme espèce sentinelle...



Synergie Mer et Littoral

Recherche & développement



université de Caen
Basse-Normandie



Institut national
des sciences et techniques de la mer



Région



Basse-Normandie



Ce programme a été réalisé avec la participation **technique de :**



Julien Pain – Mise au point d'une méthode d'extraction et d'analyse des contaminants organiques (HAP, PCB) contenus dans l'éponge *Hymeniacidon perlevis*. 50 p.

Stage de Master 2 – Chimie organique, bio-organique et environnementale – Université de Clermont-Ferrand II



Kelvin Le Guilloux- Dosage des métaux dans diverses expérimentations développées dans le programme Spontox

Stage d'IUT du 11 avril au 17 juin 2011 – IUT de Chimie de Rennes



Anatole Angot – Analyse statistique de la réponse des éponges à la contamination par les métaux (Zn, Cu, Cd)

Stage de licence 3 Biologie et écologie marine de l'université de La Rochelle



Alexandre Moisson – Utilisation des éponges pour l'étude de la qualité des eaux littorales Bas-normandes

Stage de Master II pro Contrôle environnemental industriel de l'Université de Caen.

Ainsi que : Estelle BAUDINIERE, les étudiants du CNAM-Intechmer : Antoine SIMOND, Romain THEYSSET, Marie MABIT, Marion FOGLIA, Hélène DUBRASQUET & les techniciens du LDA50 : Nathalie LELANDAIS, Florent DEMEAUTIS

Et la participation financière de :

L'Agence de l'Eau Basse-Normandie (AESN),
Le Conseil Régional Basse Normandie (CRBN),
Le Syndicat Mixte du Cotentin (SMC),
Synergie Mer et Littoral (Conseil Général de la Manche,
Chambre consulaires, Communes littorales) (SMEL),
Le Conservatoire National des Arts et Métiers (Institut National
des Sciences et Techniques de la Mer) (CNAM/INTECHMER),
L'Université de Caen - Biologie des Mollusques marins et des
Ecosystèmes Associés (BioMEA),
Laboratoire départemental de la Manche (Conseil Général de la
Manche)

Fiche résumée :

Basuyaux O., C. Caplat, S. Le Glatin & M-L. Mahaut, 2013. Spontox 2011-2012 – Utilisation d'*Hymeniacidon perlevis* comme indicateur de l'environnement littoral. Rapport d'étude 2011-2012. 144 p.

Le programme Spontox a pour objectif d'étudier la faisabilité d'utiliser les spongaires comme espèces sentinelles dans le cadre de programmes de biosurveillance. Sur plus de quarante espèces présentes et identifiées en Basse-Normandie, l'étude préliminaire (Spontox 2010) a permis de cibler l'une d'entre elles, *Hymeniacidon perlevis* qui est présente dans la plupart des masses d'eau DCE bas-normandes et présente des qualités de bioconcentration. Ainsi, l'étude bibliographique a montré que cette espèce est cosmopolite et peu sensible aux variations des conditions physico-chimiques du milieu. Elle se développe par bouturage ou par reproduction sexuée. Activement étudiée depuis quelques années pour sa capacité à produire des biomolécules d'intérêt pharmaceutique, son aquaculture n'est pas encore maîtrisée à ce jour.

La composition de cette espèce, riche en silice, induit des interactions et nous a conduit à développer une méthode d'analyse des 16 HAP et 7 PCB, méthode basée sur le principe de l'étalonnage interne permettant de garantir les résultats des diverses molécules sur chaque échantillon. Un essai interlaboratoire sur le dosage des HAP dans l'éponge a été réalisé. D'autre part, la connaissance de la variabilité intraspécifique de la bioconcentration de métaux (Cu, Zn, Cd) a permis d'attribuer une origine naturelle ou non aux variations observées entre les résultats des différentes expérimentations (caging et in-situ).

Les cinétiques de bioconcentration en cuivre, zinc, cadmium, HAP et PCB d'*Hymeniacidon perlevis* ont été suivies dans différents sites naturels, parallèlement à celles de la moule *Mytilus edulis*. La teneur en zinc dans les tissus d'*H. perlevis* est apparue systématiquement très forte mais indépendante de la fluctuation de la concentration de ce métal dans le milieu. Par contre, les résultats obtenus pour le cuivre, le cadmium, les HAP et PCB, ont été corrélés avec la variation des concentrations de ces contaminant dans le milieu, ainsi qu'avec les résultats obtenus sur les moules. Un délai d'environ 2 mois a été nécessaire pour atteindre l'équilibre entre les concentrations naturelles et celles mesurées dans les organismes transplantés, alors que la décontamination s'est faite rapidement (de 15 jours à en 1 mois). Les résultats obtenus ont été confirmés par des essais de contamination contrôlés en laboratoire (zinc et HAP).

L'étude des paramètres de stabulation et de culture d'*H. perlevis* en conditions contrôlées a permis d'observer une croissance rapide de cette espèce, mais sur une durée relativement limitée dans les conditions testées. Une auto-intoxication par des biomolécules antifouling pourrait expliquer ce phénomène en circuit fermé. Les premiers résultats en circuit ouvert semblent confirmer cette hypothèse mais impliquent des difficultés techniques importantes pour contourner ce problème.

Un suivi mensuel des concentrations en métaux, HAP et PCB a été réalisé sur les populations naturelles d'*H. perlevis* et de *M. edulis* au niveau de deux sites. Les variations saisonnières sont apparues plus faibles pour *H. perlevis* que pour *M. edulis*, rendant cette espèce intéressante pour un suivi du milieu.

Un suivi biannuel des populations naturelles d'*H. perlevis* dans les masses d'eau DCE de Basse-Normandie a permis de classifier les zones selon leur niveau de contamination en cuivre, cadmium, HAP et PCB. Ce suivi a conduit à la réalisation d'une cartographie de la concentration de divers contaminants sur le littoral bas normand.

Les résultats de l'ensemble des travaux présentés dans ce rapport confirment les potentialités d'*Hymeniacidon perlevis* comme bioindicateur de la qualité du milieu pour certains polluants métalliques et organiques, que ce soit ceux obtenus lors des suivis de populations naturelles, ou lors des surveillances par caging.

Sommaire

Introduction.....	7
1- Etat des lieux	9
1.1- Synthese des résultats obtenus en 2010 à la base de l'orientation des travaux de 2011	9
1.2- Revue bibliographique sur <i>Hymeniacidon perlevis</i>	15
2- Développement et validation de l'utilisation d' <i>Hymeniacidon perlevis</i>	18
2.1- Traitements des échantillons et dosage des métaux.....	18
2.2- Traitements des échantillons en vue des dosages de HAP et PCB.....	19
2.2.1- Optimisation de la méthode HAP & PCB dans les éponges et les moules.....	19
2.2.2. Variations des taux de contamination des populations naturelles issues d'un même site ...	33
2.3- Comparaison de la cinétique de bioaccumulation d' <i>Hymeniacidon perlevis</i> et de <i>Mytilus edulis</i>	36
2.3.1- En milieu naturel	36
2.3.2- Étude en conditions contrôlées	47
2.4- Etude de la stabulation et de la culture d' <i>Hymeniacidon perlevis</i> en conditions contrôlées.....	56
3- Evaluation du niveau de contamination d' <i>H. perlevis</i> sur la côte bas-normande	59
3.1- Suivi mensuel de la contamination des populations naturelles d' <i>H. perlevis</i> sur deux sites.....	59
3.1.1. Matériels et méthodes	59
3.1.2. Suivi mensuel de la contamination en métaux Zn, Cu et Cd	59
3.1.3. Suivi mensuel de la contamination en contaminants organiques	65
3.2- Suivi biannuel de la contamination des populations naturelles dans les masses d'eau DCE bas-normandes	72
3.2.1- Echantillonnage sur le suivi biannuel.....	72
3.2.2- Résultats du suivi biannuel en métaux dans l'éponge <i>Hymeniacidon perlevis</i>	72
3.2.3 - Résultats du suivi biannuel en contaminants organiques dans l'éponge <i>Hymeniacidon perlevis</i>	75
Synthèse	80
Conclusion	83

Perspectives	84
Bibliographie.....	87
Annexes	93

INTRODUCTION

Dans le cadre de l'évaluation du bon état écologique d'un écosystème, plusieurs démarches expérimentales peuvent être mises en place afin d'apprécier le degré et la variation spatiale de la contamination de l'environnement. Il n'est souvent pas possible d'évaluer directement les apports d'un contaminant dans le biotope ; par contre, les taux de contamination des résidus abiotiques (eau, sédiment), complétés par des recherches sur ses effets bioécologiques, permettent d'établir les voies de contamination les plus critiques de l'écosystème considéré, mais également les seuils de contamination au-dessous duquel il n'y aura pas d'effet nocif sur la biocénose. Deux notions peuvent être alors considérées : la bioaccumulation (le biote étant une sentinelle signalant la présence de contaminants dans l'environnement) et l'écotoxicologie (étudient l'impact de la contamination sur le biote).

Les potentialités des spongaires en tant que bioindicateurs de la qualité de l'eau sont évaluées dans le cadre du programme SPONTOX depuis l'automne 2009, et sont comparées à celles des moules intégrées dans le réseau national de biosurveillance ROCCH (anciennement RNO) (IFREMER 2007).

Cette première phase a permis de réaliser

- une cartographie des espèces d'éponges présentes en Basse Normandie dans chacune des zones DCE
- l'évaluation de la contamination des éponges en comparaison avec l'indicateur moule en Basse Normandie (résultats partiels compléter dans ce rapport)
- la vitesse de contamination en zinc dans *Halicondria panicea*
- la vitesse de contamination en métaux, HAP, PCB *in situ* (essai méthodologique de caging sur deux mois)
- des essais préliminaires d'élevage en système contrôlé et en mer ouverte

Les résultats obtenus en 2010 montrent clairement que les éponges sont capables de procéder à une bioconcentration particulièrement importante des métaux et des HAP mais que les réponses sont très variables en fonction de l'espèce analysée. *Hymeniacidon perlevis* a été identifiée comme étant l'espèce répondant le mieux aux exigences d'une espèce sentinelle (large répartition géographique, abondance, capacité de bioaccumulation...). D'autre part, les essais de caging réalisés dans le port de Cherbourg ont montré l'intérêt et la possibilité d'utiliser cette éponge comme bio-accumulateur.

Le programme de cette seconde phase s'est organisé autour de 4 objectifs :

- développer et valider l'utilisation de l'éponge *Hymeniacidon perlevis* en tant qu'outil de suivi *in-situ* de la qualité des eaux marines
- tester ses capacités de bioaccumulation du Zn et des HAP
- étudier les possibilités de stabulation et de culture en conditions contrôlées
- évaluer son niveau de contamination en éléments métalliques et organiques sur les côtes bas-normandes

Après un premier chapitre qui présente un état des lieux suite à nos travaux précédent (Basuyaux *et al.*, 2010), une synthèse bibliographique fera le point sur les connaissances les plus récentes et les divers intérêts suscités par *Hymeniacidon perlevis* dans différents domaines de recherche. Nos propres travaux de recherche ayant pour objectif principal de valider ce modèle en tant que bioindicateur de contamination, leur état d'avancement sera développé, d'une part sous l'angle de la mise au point des dosages analytiques (métaux, HAP, PCB) mais aussi par les résultats obtenus lors des mesures de cinétique de contamination et décontamination en milieu naturel et en laboratoire. La stabulation et la mise en culture d'*H. perlevis* seront développées. Puis dans une troisième partie, l'évolution annuelle du niveau de contamination d'*H. perlevis* sur 2 sites sera présentée grâce aux données acquises mensuellement. De même, le suivi biannuel obtenu sur l'ensemble des stations DCE des côtes bas normandes sera présenté et comparé aux données du réseau ROCCH.

1- ETAT DES LIEUX

1.1- SYNTHESE DES RESULTATS OBTENUS EN 2010 A LA BASE DE L'ORIENTATION DES TRAVAUX DE 2011

La première démarche dans le cadre de ce programme avait été dès la fin 2009 d'établir un état des lieux de la biodiversité et de la répartition des spongiaires sur les côtes de la Manche et du Calvados afin d'identifier une espèce particulièrement abondante et commune qui pourrait être pressentie comme espèce sentinelle.

Durant l'année 2010, la prospection des masses d'eau établie au titre de la DCE (Directive Cadre Européenne sur l'eau) sur le pourtour bas-normand a été effectuée sur l'estran (zone intertidale) ainsi que sur 2 zones de Haute-Normandie. Près de 1000 colonies de spongiaires ont été prélevées et identifiées en s'appuyant sur la clef de détermination de Ackers *et al.*, (2007), ce qui a permis d'établir une liste de 42 espèces présentes à cet étage. La répartition de ces 42 espèces sur les zones intertidales des 17 masses d'eau prospectées apparaît sur le tableau 1. Deux espèces d'éponge (*Hymeniacidon perlevis* et *Halichondria panicea*), s'étaient alors avérées particulièrement abondantes sur la plupart des stations.

La diversité des spongiaires sur la partie haute de l'étage subtidal, à une profondeur n'excédant pas 5 m, a été recherchée en 2011 sur 9 des 17 masses d'eau. La répartition des 39 espèces identifiées sur ces 9 masses d'eau apparaît sur le tableau 2. *Hymeniacidon perlevis* et *Halichondria panicea* ont également été retrouvées à cet étage en permanence immergé, même si leur occurrence y est apparue moins forte qu'en domaine intertidal.

Parallèlement à cette étude sur la biodiversité des spongiaires et la caractérisation des espèces dominantes, les capacités de bioaccumulation de métaux, HAP et PCB par les espèces les plus fréquentes avaient été évaluées, les concentrations mesurées dans les tissus étant systématiquement comparées aux résultats obtenus pour les moules par l'Ifremer dans le cadre du Réseau d'Observation de la Contamination Chimique du milieu marin (ROCCH ex réseau RNO).

Les dosages de contaminants métalliques dans les tissus avaient montré que l'espèce *Halichondria panicea*, présente sur de nombreux secteurs, bioaccumulait peu les métaux. *Halichondria bowerbanki* témoignait par contre de bonnes potentialités d'accumulation, mais sa répartition se limitant aux zones portuaires, on ne pouvait envisager son utilisation en tant que bioindicateur dans les réseaux de surveillance. Par contre, les tissus d'*Hymeniacidon perlevis*, très abondante en zone intertidale, accumulaient les contaminants métalliques à des niveaux très supérieurs à ceux des moules vivant sur les côtes bas-normandes et dans une moindre mesure les HAP et les PCB.

Le coût des analyses des contaminants organiques (PCB, HAP) nous avait déterminés à limiter les analyses aux tissus d'une à deux espèces parmi les plus fréquentes sur 9 masses d'eau (Bréville, Pirou, Dielette, Cherbourg, Le Moulard, Port en Bessin, Ouistreham, Bernière, Cap de la Hève). A l'époque où ces choix ont été effectués, *Hymeniacidon perlevis* n'avait pas encore été pressentie comme sentinelle potentielle. En 2010, nous avions déploré *a posteriori* ne pas avoir consacré plus d'analyses à cette

espèce lorsque ses qualités de bioindicateur nous étaient apparues. Par contre, nous avions constaté que la bioconcentration des PCB dans les éponges était faible, en-deçà de celle constatée chez *Mytilus edulis*. Ce résultat était peut-être à mettre en relation avec l'importante biomasse bactérienne qui s'accumule à la surface et à l'intérieur des tissus des éponges, tel que cela a été mis en évidence chez *Hymeniacidon perlevis* (Fu, 2008a ; Longo *et al.*, 2010). En effet des gènes capables de biodégrader les PCB ont été identifiés chez certaines bactéries (Abramowicz, 1990, Bedard et Haberl, 1990, Furukawa et Fujihara 2008). Si la position des spongiaires en tant que bioindicateurs de la présence de PCB ne pouvait être établie, en revanche, le rôle de ces invertébrés dans l'épuration des PCB grâce à leurs bactéries associées pourrait être non négligeable. Les résultats obtenus avec les HAP montraient des résultats intéressants mais hétérogènes selon l'espèce analysée. De même que pour les PCB, l'implication de certaines bactéries dans les processus de biodégradation de molécules aussi complexes que celles des hydrocarbures aromatiques polycycliques a été mise en évidence (Röling *et al.*, 2003 ; Head *et al.*, 2006). En particulier, il a été établi, dans les tissus de l'espèce *Hymeniacidon perlevis*, la présence de souches bactériennes capables de synthétiser des déhalogénases, c'est-à-dire des enzymes capables de dégrader des composés halogénés (Huang et Zhang, 2008). Dans les masses d'eau proches de zones portuaires (Dielette, Collignon, le Becquet), les concentrations en HAP étaient apparues très fortes dans les tissus d'*Hymeniacidon perlevis*. Mais le nombre d'analyses effectuées en 2010 sur cette espèce était apparu insuffisant, rendant nécessaires des recherches complémentaires pour décider de l'intérêt de cette espèce dans le cadre d'une stratégie de biosurveillance de la présence d'hydrocarbures. Si l'intérêt d'*H. perlevis* en tant qu'intégrateur de pollution par les HAP n'était pas établi, la présence de cette espèce en zone côtière pourrait toutefois revêtir un intérêt grâce aux capacités de remédiation des HAP par la flore bactérienne associée. L'étude effectuée en 2011 sur la bioconcentration en HAP par *Hymeniacidon perlevis* est présentée dans ce rapport.

Ces recherches sur la biodiversité des spongiaires sur le littoral bas-normand et leurs capacités à bioaccumuler les contaminants, qui nous avaient amenés à proposer l'espèce *Hymeniacidon perlevis* comme espèce sentinelle, ont été publiés dans *Environmental Science and Pollution Research* (Mahaut *et al.*, 2012).

Une autre phase importante dans les recherches entreprises en 2010 avait consisté en la recherche des conditions environnementales optimales permettant la production intensive d'éponges. Ces boutures étaient destinées aux expérimentations *in vivo* en conditions contrôlées, recherchant l'impact d'une contamination par le zinc, mais également au biomonitoring actif *in situ* par caging dans la zone portuaire de Cherbourg. Ces essais de culture par bouturage avaient été réalisés en laboratoire et en mer sur les deux espèces dominantes *Halichondria panicea* et *Hymeniacidon perlevis*. Plusieurs sources d'alimentations (bactéries lactiques, microalgues, «Marine Snow ») avaient été croisées avec différents supports d'élevage (fil de nylon, verre, béton). Les boutures avaient présenté des croissances intéressantes en masse et en taille pendant environ 20 jours avant de régresser. Cet arrêt de croissance au bout d'une vingtaine de jours lors de spongiculture expérimentale sur *Hymeniacidon perlevis* a également été signalé par Cao *et al.* en 2008. Par contre, de nouveaux essais de bouturage réalisés dans des cages en zone conchylicole près de Blainville sur Mer avaient permis d'observer une

bonne reprise du développement de ces boutures. Il semblait donc que d'autres facteurs tels que l'hydrodynamisme pouvaient jouer un rôle sur la croissance des boutures. La qualité de la fixation de l'éponge (Bell et Barnes, 2002 ; Xue *et al.*, 2008) ainsi que la nature et le niveau de décomposition de la matière organique filtrée intervenant certainement également de façon importante (Cao *et al.*, 2008 ; Schaal *et al.*, 2011), les expérimentations de spongiculture effectuées en 2011 et présentées dans ce rapport se sont donc attachées à mieux comprendre l'impact du régime alimentaire, du type de support et de l'hydrodynamisme sur la croissance d'*Hymeniacidon perlevis*. De plus, elles intègrent une prise en compte de l'influence de la température et de la lumière (photopériode et longueur d'onde) qui sont des traceurs de saisonnalité.

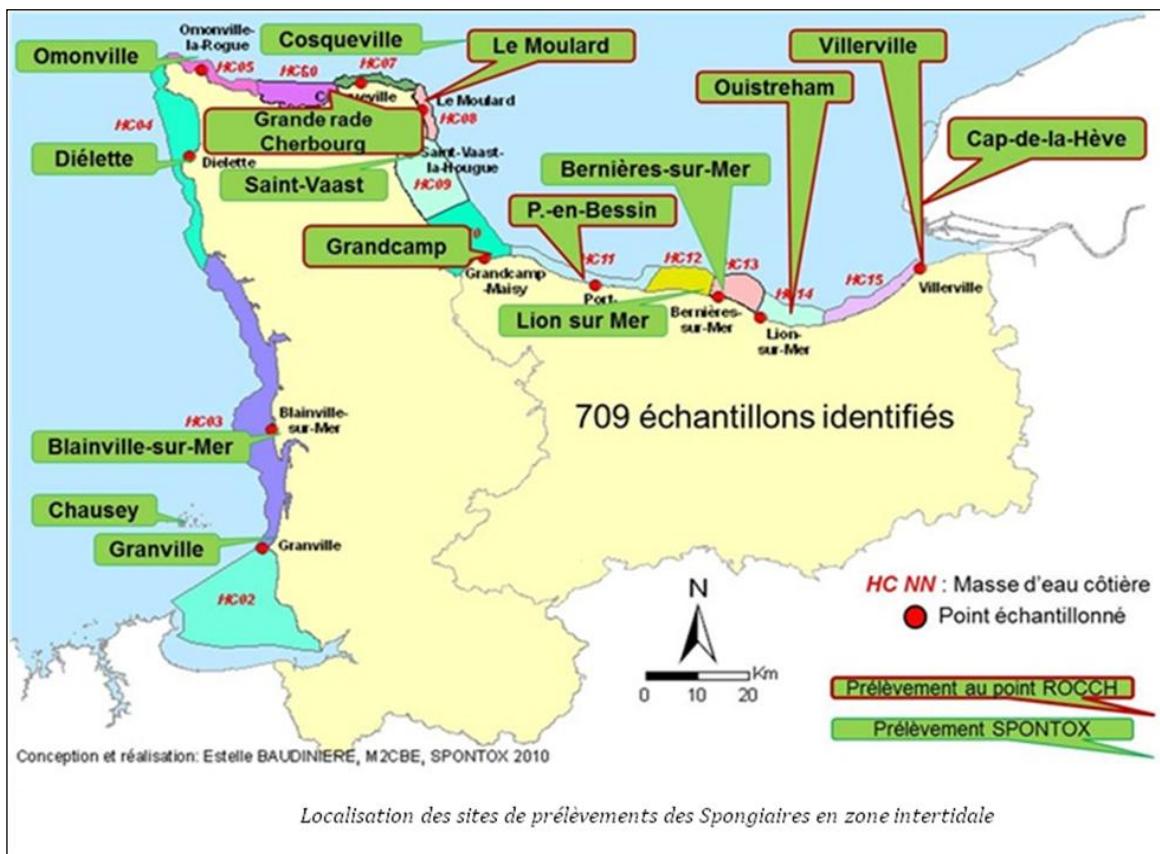
Les premiers essais contrôlés effectués afin de déterminer les capacités de bioconcentration d'un métal s'étaient tout d'abord portés en 2010 sur *Halichondria panicea*. Le zinc a été le premier métal étudié car il est très présent en zone côtière et plus particulièrement en milieu portuaire, la dissolution des anodes sacrificielles constituant une source contaminante non négligeable. De plus, les niveaux de bioconcentration de ce métal issu de la dissolution d'une anode sacrificielle avaient été comparés à ceux obtenus lors d'une contamination par de sulfate de zinc, afin de comprendre si la spéciation de ce métal a un impact sur le taux de bioaccumulation. Toutes les expérimentations avaient été effectuées simultanément sur des boutures d'éponge et sur des lots de moules. Il était alors apparu que les concentrations maximales atteintes dans les moules étaient plus importantes que celles mesurées dans l'éponge *Halichondria panicea*. En 2011, des essais similaires ont été reproduits sur l'espèce d'éponge *Hymeniacidon perlevis*. La phase de contamination en zinc d'une durée d'un mois a été suivie d'une période de décontamination pour déterminer les capacités d'épuration de cette espèce. De même, une étude des capacités de bioaccumulation et d'épuration des HAP par cette même espèce a été mise en place, un mélange essence/gaz-oil ayant été choisi comme source contaminante. Ces protocoles d'études et les résultats obtenus sont donc exposés dans ce rapport.

En 2010, des essais de biomonitoring actif par l'intermédiaire de cages immergées dans le port de Cherbourg avaient été également initiés. Ces cages contenant des éponges (*Hymeniacidon perlevis*) et des moules (*Mytilus edulis*) avaient été déployées dans différents sites du port de Cherbourg durant une durée d'un ou deux mois selon les sites. Les prélèvements réalisés régulièrement sur une période de deux mois avaient montré une accumulation rapide des métaux et HAP avec des concentrations proches, à la fin de l'étude, de celles mesurées dans les populations naturelles, et très supérieures à celles relevées dans les moules dans le cadre du ROCCH (ex RNO). Par contre, les concentrations en PCB mesurées dans ces mêmes éponges apparaissent relativement faibles, similaires à celles qui avaient été obtenues pour les populations sauvages prélevées sur les stations DCE. En 2011, des expérimentations et analyses complémentaires ont été mises en place et sont présentées ci-après, de même que les expérimentations par caging qui se sont intensifiées en 2011.

Pendant l'année 2011, une collaboration étroite avec le LDA 50 a été mise en place. Ce laboratoire a ainsi procédé à l'optimisation des dosages de polluants organiques, en développant des méthodes d'extraction et de purification des PCB et HAP adaptées à la matrice « éponge ». En effet, les mesures effectuées en 2010 au laboratoire municipal de Rouen, s'étaient appuyées sur les protocoles certifiés pour les moules et certains résultats ne semblaient pas cohérents.

Le niveau de la contamination des populations naturelles d'*Hymeniacidon perlevis*, en cuivre, cadmium, zinc, métaux, HAP et PCB a été suivi mensuellement sur deux sites (Blainville sur Mer sur la côte ouest du Cotentin, et la plage de Collignon dans la grande rade de Cherbourg). Parallèlement à ces dosages de contaminants, la variation du taux de lipides au cours de l'année 2011 dans les tissus de ces deux populations a été également recherchée, les contaminants organiques étant particulièrement lipophiles. Il a été procédé à des études similaires sur les moules sauvages vivant à proximité de ces sites, afin de disposer de critères de comparaison.

De plus, un suivi biannuel de la contamination des populations naturelles dans les masses d'eau DCE bas-normandes au printemps et en automne a permis d'enrichir nos connaissances sur les capacités du bioindicateur que nous proposons dans ce programme. L'ensemble de ces résultats sont présentés dans ce rapport.



	HC 01	HC 02	HC 03	HC 04	HC 05	HC 06	HC 07	HC 08	HC 09	HC 10	HC 11	HC 12	HC 13	HC 14	HC 15	HC 16
<i>Grantia compressa</i>	●						●									
<i>Leuconia gossei</i>		●				●		●				●				
<i>Leuconia nivea</i>					●											
<i>Oscarella lobularis</i>				●												
<i>Pachymatisma johnstonia</i>	●															
<i>Dercitus bucklandi</i>					●											
<i>Tethya citrina</i>	●	●	●				●									
<i>Suberites ficus</i>		●	●	●			●					●				
<i>Protosuberites dehhartoqi</i>		●	●	●			●									
<i>Polymastia boletiformis</i>	●		●				●									
<i>Polymastia penicilllus</i>																
<i>Stelligera rigida</i>	●															
<i>Stelligera stuposa</i>	●															
<i>Opheliaspongia papilla</i>		●			●			●								
<i>Clathria armata</i>		●								●						
<i>Clathria atrasanguinea</i>	●	●	●	●	●	●	●	●		●						
<i>Clathria strepsitoxa</i>	●				●											
<i>Antho inconstans</i>	●		●		●											
<i>Myxilla rosacea</i>	●	●	●				●									
<i>Phorbas dives</i>			●				●									
<i>Phorbas fictitius</i>	●		●				●									
<i>Phorbas plumosum</i>	●	●	●		●		●									
<i>Crella rosea</i>					●											
<i>Mycale contareni</i>			●													
<i>Mycale macilenta</i>			●													
<i>Amphilectus fucorum</i>		●					●									
<i>Amphilectus lobata</i>	●		●													
<i>Haliknemia patera</i>		●														
<i>Halichondria bowerbanki</i>		●														
<i>Halichondria panicea</i>		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●					
<i>Cyocalypta penicilllus</i>	●															
<i>Hymeniacidon perlevis</i>	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●					
<i>Hymeniacidon kitchingi</i>	●						●									
<i>Tethyspira spinosa</i>	●															
<i>Haliclona cinerea</i>	●						●									
<i>Haliclona oculata</i>							●									
<i>Haliclona rosea</i>																
<i>Haliclona simulans</i>	●		●		●											
<i>Haliclona urcealus</i>	●															
<i>Haliclona viscosa</i>	●															
<i>Dysidea fragilis</i>	●						●									
<i>Chelonaplysilla noevers</i>	●															
Richesse spécifique	25	11	18	4	13	14	3	5	9	3	4	0	10	1	1	4
Spongaires absents (environnement exclusivement sableux)																

Tableau 1 : Répartition des éponges dans les zones intertidales des différentes masses d'eau

	HC 01	HC 02	HC 03	HC 05	HC 060	HC 061	HC 07	HC 08	HC 09
<i>Clathrina coriacea</i>									●
<i>Leucosolenia variabilis</i>	●					●			
<i>Sycon ciliatum</i>					●				
<i>Stelletta grubii</i>							●		
<i>Pachymatisma johnstonia</i>	●			●			●	●	
<i>Tethya citrina</i>	●	●	●	●	●		●	●	
<i>Suberites ficus</i>	●	●			●	●			
<i>Protosuberites denhartogi</i>									
<i>Pseudosuberites sulphureus</i>		●							
<i>Polymastia penicillus</i>	○				○			○	
<i>Cliona celata</i>						●			
<i>Stelligera stuposa</i>		●	●					●	
<i>Ophilitaspanglia papilla</i>						●	●		
<i>Clathria atrasanauinea</i>					●				
<i>Clathria strepsitoxa</i>		●							
<i>Antho inconstans</i>	●	●					●		
<i>Antho coriacea</i>							●		
<i>Myxilla rosacea</i>			●						
<i>Iophon hyndmani</i>		●							
<i>Hemimycale columella</i>	●	●	●	●	●				●
<i>Phorbas dives</i>	●					●	●	●	
<i>Phorbas fictitius</i>	●		●			●	●	●	
<i>Phorbas plumosum</i>	●	●	●	●	●	●	●	●	●
<i>Crella rosea</i>							●		
<i>Amphilectus fucorum</i>		●			●				
<i>Amphilectus lobata</i>	●		●	●					●
<i>Halichnemia patera</i>				●					
<i>Axinella dissimilis</i>	●	●	●	●	●				
<i>Halichondria bowerbanki</i>						●	●		
<i>Halichondria panicea</i>	●		●	●	●	●	●	●	
<i>Cyocalypta penicillus</i>		●							
<i>Hymeniacidon perlevis</i>	●				●	●	●		
<i>Hymeniacidon kitchingi</i>					●	●			
<i>Haliclona cinerea</i>					●		●		
<i>Haliclona simulans</i>	●								●
<i>Haliclona viscosa</i>							●		
<i>Dysidea fragilis</i>	●	●	●	●	●		●	●	
<i>Spongionella pulchella</i>						●	●		
<i>Halisarca dujardini</i>					●				
Richesse spécifique	16	8	12	10	13	9	15	8	8

Tableau 2 : Répartition des éponges dans les zones subtidales des différentes masses d'eau

1.2- REVUE BIBLIOGRAPHIQUE SUR *HYMENIACIDON PERLEVIS*

Le nom de l'éponge *Hymeniacidon perlevis* (Montagu, 1818) présente une variation orthographique non valide sous la forme de *Hymeniacidon perleve* (Montagu, 1818) mais également 14 synonymes juniors dont les plus connus sont *Hymeniacidon sanguinea* (Grant, 1826) et *Halichondria caruncula* (Bowerbank, 1866). La multiplicité de ces désignations complique les recherches bibliographiques sur la répartition et la biologie de cette espèce. Il apparaît cependant que la distribution de l'espèce *Hymeniacidon perlevis* est très importante puisque sa présence a été décrite aussi bien au Svalbard, archipel de la Norvège situé à plus de 80° de latitude nord à la limite sud de l'océan Arctique (Hentschel 1929 in Van Soest 2012), qu'à 8° de latitude sud, sur les côtes de l'Angola (Araùjo *et al.*, 1999). Plusieurs équipes s'intéressent donc à cette espèce qui a été échantillonnée sur des côtes aussi diverses que celles de la Méditerranée (travaux de Sica *et al.*, 1978 en Sicile ; travaux de Aiello *et al.*, 1993 dans la lagune de Venise ; travaux de Gaino *et al.*, 2010 et Longo *et al.*, 2010 en Mer Ionienne), de Mer Noire (travaux de Christie *et al.*, 1994 sur les côtes bulgares), de l'Océan Atlantique (travaux de Nechev *et al.*, 2004 aux îles Canaries ; travaux de Araùjo *et al.*, 1999 sur les côtes Portugaises et d'Angola ; travaux de Costello et Myers, 1987 en Irlande), en Mer Jaune (Fu *et al.*, 2007 ; Xue *et al.*, 2004, 2008, 2009 ; Zhang *et al.*, 2007 ; Xue et Zhang, 2009), de la Mer du Nord (Jones, 1973 ; Van Soest, 1977) et sur les côtes de la Manche (Stone, 1970a, 1970b ; Mahaut *et al.*, 2012).

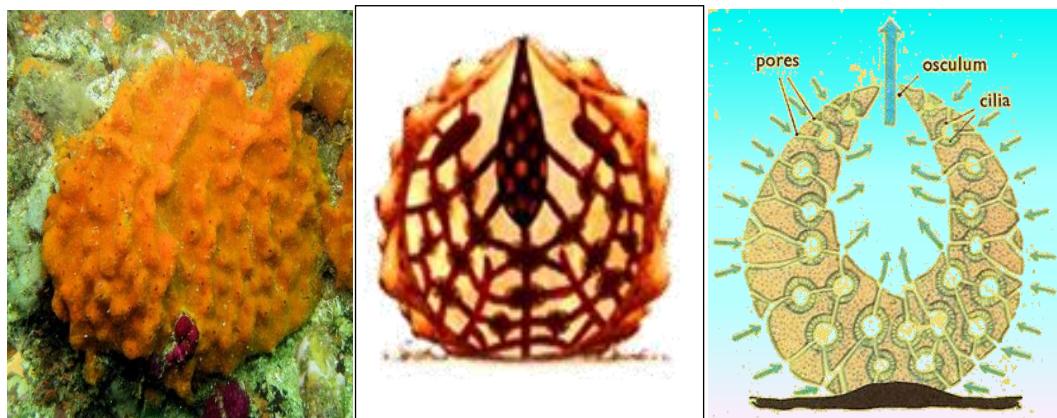
Hymeniacidon perlevis supporte bien les périodes d'émersion ce qui lui permet de coloniser la zone intertidale jusqu'au niveau de la mi-marée, plus haut que toutes les autres espèces de spongiaires (Burton 1948 in Stone, 1970a). Mais elle vit également à plusieurs dizaines de mètres de profondeur en zone subtidale, puisqu'elle a été prélevée entre 25 m et 35 m de profondeur aux îles Canaries, près de Las Palmas (Nechev *et al.*, 2004). Elle peut également supporter une grande variation de salinité : elle se développe par exemple dans le lagon de Venise où la salinité descend en dessous de 20‰ (Aiello *et al.*, 1993) et en Mer Noire (Christie *et al.*, 1994) connue pour la faible salinité de ses eaux de surface (environ 18‰) ; mais elle est également décrite sur les côtes de Sicile (Sica *et al.*, 1978) et en Mer Ionienne (Longo *et al.*, 2010) où la salinité dépasse les 38‰. On connaît peu de prédateurs, à part des gastéropodes nudibranches tel *Doris verrucosa* (Avila *et al.*, 1990). Son cycle de reproduction est net avec une période de reproduction alternant avec une période de repos sexuel. Pendant les mois d'été, elle croît en taille et fusionne avec les colonies adjacentes puis elle régresse et se fragmente en hiver (Burton, 1949a in Stone, 1970a). Ces interactions spatiales permettraient d'augmenter la variabilité génétique (Maldonado et Uriz in Gaino *et al.*, 2010). Parallèlement à cette croissance asexuée par bouturage, la reproduction sexuée s'effectue également entre juillet et septembre sur les côtes de la Manche (Stone, 1970a). En Méditerranée, cette reproduction est plus précoce et débute en avril (Gaino *et al.*, 2010). *H. perlevis* est connue comme étant une espèce hermaphrodite incubante, et la fertilisation des ovocytes se déroule dans les tissus parentaux. Les larves ciliées sont émises fin août-début septembre dans la Manche. La fixation puis la métamorphose des jeunes larves seront à l'origine de nouvelles colonies. Gaino *et al* (2010) ont mis en évidence que l'hermaphrodisme n'était pas une stratégie de reproduction systématique chez cette espèce et que le taux de production d'ovocytes différait selon que la colonie vivait en zone intertidale ou en zone subtidale.

Pour répondre à leurs besoins nutritionnels et respiratoires, les éponges ont un très fort taux de pompage de l'eau. Une éponge filtre de l'ordre de 3 fois son volume à la minute (Leys *et al.*, 2011). Cette intensité de filtration leur permet de survivre dans un milieu pauvre en nutriments. Elles se nourrissent de MOP dans une gamme de taille de 0,1 à 50 µm, mais également du phytoplancton et de bactéries. Longo *et al* (2010) ont mis en évidence qu'*Hymeniacidon perlevis* est capable de digérer une grande variété de bactéries, en particulier des streptocoques. Ces auteurs concluent que grâce aux capacités de cette espèce à accumuler et métaboliser les bactéries tout en assainissant l'environnement, elle pourrait être utilisée comme bioindicateur de pollution microbienne et intervenir efficacement lors des démarches d'épuration d'eaux biocontaminées. Dans le cadre de la pisciculture du Fugu (Fu *et al.*, 2007) et du turbot (Zhang *et al.*, 2008), cette éponge est également utilisée pour épurer l'eau du carbone organique total (TOC) qui eutrophise le milieu, mais également pour filtrer les antibiotiques tels la Terramycine qui est ensuite biodégradée par les micro-organismes associés à l'éponge (Fu *et al.*, 2008b).

Les éponges sont capables de synthétiser des métabolites secondaires qu'elles utilisent dans une stratégie de défense chimique pour lutter contre les prédateurs potentiels, mais également pour conquérir de l'espace sur un support. Les éponges marines constituent la plus grande source de molécules bioactives marines utilisées par l'industrie pharmaceutique depuis les travaux précurseurs de Bergmann sur les nucléosides d'éponges dans les années 1950 (Zhang *et al.*, 2003). Ainsi, les tissus d'*Hymeniacidon perlevis* constituent une source de composés biologiquement actifs (Benyamin *et al.*, 1981 in Christie *et al.*, 1994 ; Cimino *et al.*, 1985 in Christie *et al.*, 1994 ; Kobayashi *et al.*, 1986, 1987 in Christie *et al.*, 1994 ; Pettit *et al.*, 1990 in Christie *et al.*, 1994 ; Teshima *et al.*, 1980 in Christie *et al.*, 1994). En effet, certaines substances extraites de ses tissus témoignent d'une activité antibactérienne, antifongique, anti-inflammatoire, mais également d'une efficacité contre certains cancers tel l'hépatome humain Qgy7701, le lymphome de Burkitt, la leucémie myéloïde chronique (Xue *et al.*, 2004). Les recherches sur cette espèce se sont donc multipliées ces dernières années pour connaître sa composition élémentaire (Araùjo *et al.*, 1999) mais également la nature de ses stérols (Stone 1970 ; Erdman et Thomson, 1972 ; Aiello *et al.*, 1993 ; Nechev *et al.*, 2004), acides gras (Christie *et al.*, 2010), acides aminés (Sica et Zollo, 1977 ; Sica *et al.*, 1978 ; Kanazawa *et al.*, 1979 ; Aiello *et al.*, 1993). Plusieurs laboratoires implantés sur le pourtour de la Mer Jaune et le littoral du Japon font de la région du sud-est asiatique un grand pôle de cette recherche. Plusieurs axes sont suivis afin d'exploiter au mieux les potentialités de cette éponge. Parallèlement à l'isolement des molécules produites par l'éponge elle-même, Xin et Zhang (2008a, 2008b) se sont intéressés aux 59 espèces (réparties dans 10 genres) d'actinobactéries associées, ces microorganismes étant à l'origine de plusieurs antibiotiques. Pour parvenir à une extraction rentable de produits bioactifs, il est nécessaire de disposer d'une biomasse abondante et suffisante de ce spongiaire. C'est pourquoi, d'autres études cherchent à maîtriser et reproduire artificiellement son cycle de vie (Cao *et al.*, 2008). Ainsi dans l'objectif d'une spongiculture intensive d'*Hymeniacidon perlevis*, l'effet de la température et de la lumière sur la production et la fixation des larves a été recherché (Xue *et al.*, 2008 ; Xue *et al.*, 2009). De même, Xue et Zhang en 2009 se sont intéressés à l'impact de la nourriture, de la photopériode, de la variation de température et de l'hydrodynamisme sur le développement des jeunes boutures. Une attention toute particulière est portée également aux modalités de fixation des boutures, car Bell et Barnes ont mis en évidence en 2002 un déclin en taille et en densité de chair de cette espèce lorsque les colonies sont amenées à être détachées de leur support, déclin suivi d'une mortalité plus rapide. Xue *et al.* (2009)

ont également montré une production larvaire beaucoup plus importante lorsque cette éponge est fixée. En utilisant ici encore *H. perlevis* comme modèle, Sun *et al.* (2008) ont publié une série d'études expérimentales sur l'impact des différents types de cellules (archéocytes, pinacocytes, collencytes) sur la morphogenèse des colonies et des larves. Les travaux de Cao et Zhang (2008) sur le déplacement de ces cellules pendant la morphogénèse complètent ces connaissances. L'étude du développement des spicules d'*Hymeniacidon perlevis* s'est également intensifiée (Stone, 1970 ; Müller *et al.*, 1982 ; Zhang *et al.*, 2006, 2007 ; Qu *et al.*, 2008) car la synthèse de ces structures squelettiques siliceuses semble intimement liée au développement des tissus de l'éponge elle-même. Les spicules siliceux présentent de nombreuses propriétés qui justifient l'attention qui leur est portée : outre le fait que leur morphologie détermine la classification de chaque espèce et que leur stabilité dans le temps leur confère des qualités de marqueurs géologiques, les spicules suscitent également un intérêt pour des applications industrielles, leur conduction de la lumière et leur indice de réfraction apparaissant similaires à ceux des fibres optiques ; de plus, ils sont à la fois plus résistants à la rupture et plus flexibles qu'une tige de verre (Zhang *et al.*, 2007).

La littérature disponible sur l'espèce que nous proposons comme bioindicateur, *Hymeniacidon perlevis*, est riche et diversifiée. Tous les travaux publiés sont autant de sources de connaissance et de réflexion pour appuyer les conclusions que nous avons tirées des résultats de toutes nos séries d'analyses. Ils nous ont également aidés à améliorer le déroulement des tests de biomonitoring actif et des études en conditions contrôlées de la cinétique de contamination de l'éponge. Enfin, un certain nombre de travaux étant orienté vers une maîtrise du cycle de vie de cette espèce, les connaissances qu'ils apportent constituent une aide précieuse pour avancer dans la maîtrise de la production de boutures par spongiiculture.



Coupe schématique d'une éponge avec son système de circulation de l'eau

2- DEVELOPPEMENT ET VALIDATION DE L'UTILISATION D'*HYMENIACIDON PERLEVIS*

2.1- TRAITEMENTS DES ECHANTILLONS ET DOSAGE DES METAUX

Avant d'être analysés par spectrométrie d'absorption atomique pour rechercher le cuivre, le zinc et le cadmium, les échantillons ont été conditionnés (lavage, séchage, minéralisation) suivant les mêmes protocoles qu'en 2010 (Basuyaux *et al.*, 2010).

Le zinc et le cuivre ont été dosés par spectrométrie d'absorption atomique en mode flamme, SAA-F (concentrations de l'ordre du mg/L) et le cadmium en mode atomisation électrothermique, SAA-ET (concentrations de l'ordre du µg/L). Les spectromètres d'absorption atomique utilisés sont le VARIAN 240FS (mode flamme) et le VARIAN 240Z (mode électrothermique). Les limites de détection pour chaque élément métallique sont de 0,011 mg.L⁻¹ pour Zn, 0,007 mg.L⁻¹ pour Cu et 0,0051 mg.L⁻¹ pour Cd.

Chaque échantillon a été dosé en triplicat. Chaque série de dosage a été accompagnée par l'analyse de 2 échantillons certifiés, SRM NIST-2976 (moule) et SRM NIST-1566b (huître), représentatifs de l'étendue des concentrations mesurées dans les échantillons de moules et d'éponges étudiées. La moyenne des résultats expérimentaux en métaux obtenus durant l'année 2011, ainsi que la justesse calculée par rapport aux valeurs certifiées données pour chacun de ces métaux dosés dans les échantillons certifiés SRM, sont reportés dans le tableau 3.

mg/kg ps	Valeur certifiée SRM NIST-2976	Valeur expérimentale	Justesse	Valeur certifiée SRM NIST-2976	Valeur expérimentale	Justesse
Zn	137 ± 13	136 ± 5	99,3%	1424 ± 46	1464 ± 44	97,2%
Cu	4,02 ± 0,33	4,15 ± 0,75	96,8%	71,6 ± 1,6	67,6 ± 1,7	97,1%
Cd	0,82 ± 0,16	0,87 ± 0,15	93,9%	2,48 ± 0,08	2,70 ± 0,72	91,1%

Tableau 3- Résultats 2011 en Zn, Cd et Cu sur les échantillons de moule (SRM NIST-2976) et d'huître (SRM NIST-1566b) certifiés en métaux

2.2- TRAITEMENTS DES ECHANTILLONS EN VUE DES DOSAGES DE HAP ET PCB

2.2.1- OPTIMISATION DE LA METHODE HAP & PCB DANS LES EPONGES ET LES MOULES

La directive cadre sur l'eau (DCE ; EC, 2000) et la directive fille (EC, 2008) définissent 33 substances dangereuses prioritaires et 8 autres substances polluantes à surveiller dans les masses d'eau et fixent les normes de qualité environnementale (NQE) à respecter dans les eaux selon l'arrêté du 25 janvier 2010 (MEDD, 2010). Parmi les 41 substances ou familles de substances définies par la DCE, 22 substances organiques présentent un log de K_{ow} (coefficients de partage octanol-eau) supérieur à 3 ; ces substances sont donc considérées comme accumulables et pertinentes pour une surveillance dans le biote. Parmi cette liste des substances prioritaires, on retrouve des HAP tels que le benzo(a)pyrène, l'anthracène, le naphtalène, le fluoranthène, le benzo(b)fluoranthène, le benzo(k)fluoranthène l'indéno(1,2,3-c,d)anthracène et le benzo(g,h,i)pérylène.

De plus, la commission OSPAR (PARCOM 92/3) décrit un certain nombre de substances à caractère non prioritaire mais préoccupantes, regroupant le reste des HAP et la famille des PCB. Ces substances doivent faire l'objet de mesures prioritaires. La NQE provisoire pour les eaux de surface intérieures, eaux de transition, eaux marines intérieures et territoriales est fixée à 0,001 µg/L (PCB i) – Arrêté du 08 juillet 2010 relatif au programme national d'action contre la pollution des milieux aquatiques par certaines substances dangereuses, liste II.

Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (Fig. 1) sont constitués d'au moins deux cycles aromatiques et ne comprennent que des atomes de carbone et d'hydrogène. Selon le nombre de cycles, ils sont classés en HAP légers (jusqu'à trois cycles) ou lourds (au-delà de trois cycles), et ont des caractéristiques physico-chimiques et toxicologiques très différentes. Ils se retrouvent dans les produits de combustion (HAP pyrolytiques). Le nombre de HAP susceptibles d'être rencontrés est sans limite. En effet, non seulement il n'y a pas de limite au nombre de noyaux accolés, mais le nombre d'isomères augmente considérablement avec le nombre de cycles aromatiques. De plus, ils peuvent être alkylés.

Les propriétés physiques des HAP varient selon leur masse moléculaire et leur structure. À l'exception du naphtalène, les HAP sont très hydrophobes (solubilité dans l'eau faible) et leurs coefficients de partage octanol/eau (K_{ow}) sont relativement élevés (de l'ordre de 10^5 à 10^7) car ce sont des molécules lipophytes, les associant à un important potentiel d'adsorption sur les matières organiques particulières ainsi qu'à un fort potentiel de bioconcentration dans les organismes.

Les 16 HAP recherchés dans l'environnement sont : le naphtalène, l'acénaphtylène, l'acénaphthène, le fluorène, le phénanthrène, l'anthracène, le fluoranthrène, le pyrène, le benzo(a)anthracène, le chrysène, le benzo(b)fluranthrène, le benzo(k)fluoranthrène, le benzo(a)pyrène, l'indéno(1,2,3-

c,d)pyrène, le dibenzo(a,h)anthracène et le benzo(g,h,i)pérylène (Plaza-Bolanos *et al.*, 2010). Ces composés sont habituellement recherchés car ils sont représentatifs de toute la famille des HAP.

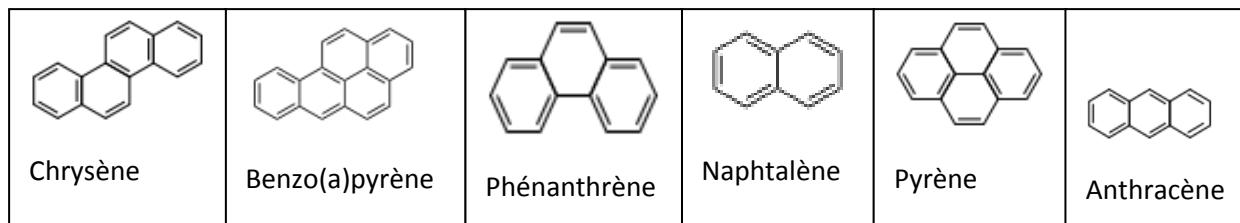


Figure 1 : Exemple d'HAPs

Les PolyChloroBiphényles (Fig. 2) constituent une famille de 209 congénères, dérivés chlorés du biphenyl, plus connus en France sous le nom de pyralènes. Ce sont des produits chimiques de synthèse, dont la première utilisation remonte à 1929. Ils sont fabriqués par chloration progressive du radical biphenyl en présence d'un catalyseur (chlorure ferrique). On peut substituer de cette façon de 1 à 10 hydrogènes par des chlores. Ils sont sous forme liquide, hydrophobes et dégradables à des températures supérieures à 1000°C. Ils sont chimiquement inertes, et de fait très peu sensibles aux acides, bases et oxydants. Ce sont des polluants très persistants (demi-vie de 94 jours à 2700 ans selon les molécules) et qui ont une toxicité qui varie selon le poids moléculaire du congénère (cf. nombre d'atomes de chlore) et la configuration spatiale de leurs molécules. Ils sont très liposolubles (Kow de l'ordre de 10^4 à 10^6) et font donc partie des contaminants très bioaccumulables (Marchand *et al.*, 1990).

Avant l'arrêt de leur production en 1987, les PCB étaient produits industriellement et utilisés en tant que :

- fluides caloporteurs
- formulation d'huiles, de lubrifiants
- plastifiants
- peinture, encre
- condensateur
- adhésifs, mastic
- pesticides

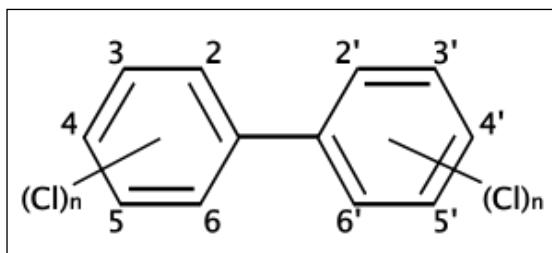


Figure 2 : Formule générale des PCB

Malgré la suspension de leur production, ces molécules perdurent dans l'environnement, du fait de leur persistance. Les 7 PCB les plus recherchés par les réseaux de surveillance de la qualité des eaux

sont les congénères CB28, CB52, CB101, CB118, CB138, CB153 et CB180. Ces composés représentent un échantillon représentatif de toute la famille des PCBi.

2.2.1.1- Organigramme du mode opératoire

Comme décrit dans la figure 3 ci-dessous, les étapes d'extraction, de concentration, de purification et enfin de dosage ont dû être optimisées pour pouvoir travailler avec une matrice aussi complexe que les tissus de l'éponge *Hymeniacidon perlevis*. Les différentes étapes importantes franchies pour améliorer le protocole sont synthétisées ci-dessous et développées dans les annexes **1 à 19**.

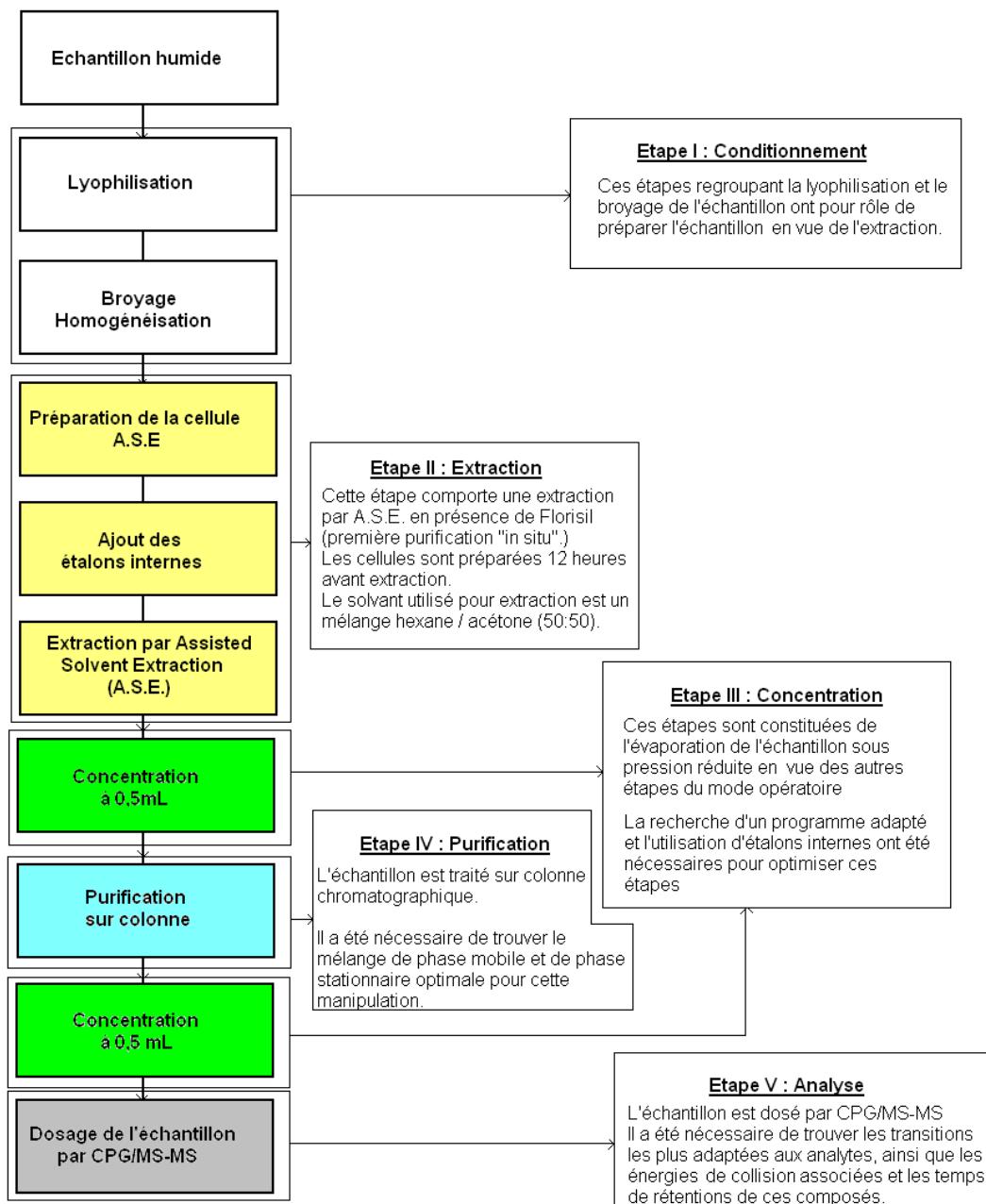


Figure 3 : organigramme général du mode opératoire

2.2.1.2- Étape d'échantillonnage

Avant d'être extraites, les éponges naturelles sont lavées à l'eau ultra pure pour éliminer les particules de sédiments et autres morceaux de coquillages. Les échantillons sont ensuite congelés, lyophilisés puis broyés jusqu'à obtenir une poudre homogène (Photos 1 et 2)



Photos 1 et 2 : Eponges naturelles, *H.perlevis* – Eponges conditionnées pour l'extraction

2.2.1.3- Optimisation de l'extraction

L'objectif est de mettre au point et d'optimiser une méthode de dosage des PCB et HAP dans les éponges. Si l'on se réfère à la littérature, ces molécules ont été peu recherchées dans les spongiaires ; la méthode retenue a donc été optimisée à partir de protocoles développés pour d'autres matrices comme les sédiments, les moules et certains organes de poisson (Barros *et al.*, 2008 ; Tapie, 2006 ; Numata *et al.*, 2005 ; Knutzen *et al.*, 1982 ; Navarro *et al.*, 2006 ; Plaza-Bolaños *et al.*, 2010 ; Khan *et al.*, 2008 ; Negri *et al.*, 2006 ; Munsch *et al.*, 2005 ; Perez *et al.*, 2003 ; Denton *et al.*, 2006 ; Xiong *et al.*, 2000). Suite à cette étude bibliographique, nous avons étudié 9 protocoles susceptibles d'être adaptés à la matrice « éponge ». Les avantages et inconvénients de ces protocoles sont présentés dans le tableau 4 .

Numéro	Mode opératoire	extraction	purification	Avantages	Inconvénients
1	Norme Iso 18287 – 2006	extraction solide -liquide	extraction liquide- liquide	protocole normé	protocole adapté aux sédiments (sans lipides)
2	Saponification	extraction solide -liquide	saponification lavage acide	élimination des lipides	7 extractions liquide-liquide, pertes de rendement importantes
<i>D'après Knutzen et al., 1982 ; Navarro et al., 2006</i>					
3	Saponification + A.S.E.	extraction par A.S.E.	saponification filtration	élimination des lipides économie en solvant 24 éch. / jour	une seule purification
<i>D'après Numata et al., 2005 ; Plaza-Bolaños et al., 2010 ; Khan et al., 2008 ; Xiong et al., 2000</i>					
4	Soxhlet	Soxhlet	lavage par 5mL d'acide sulfurique	protocole souvent cité dans des publications protocole le plus ancien	consommation importante de solvant 16h / échantillon
<i>D'après Barros et al., 2008 ; Perez et al., 2003</i>					
5	Protocole Ifremer (A.S.E.)	extraction par A.S.E.	chromatographie par perméation de gel	économie en solvant 24 éch. / jour	chromatographie par perméation de gel (GPC) non disponible au laboratoire
<i>D'après Navarro et al., 2006 ; Munsch et al., 2005</i>					
6	Extraction assistée par micro-ondes (M.A.E.)	Extraction assistée par micro-ondes	colonne de silice acidifiée	économie en solvant 26 éch. /jour	appareil non disponible au laboratoire
<i>D'après Tapie, 2006 ; Plaza-Bolaños et al., 2010 ; Denton et al., 2006 ; Xiong et al., 2000</i>					
7	A.S.E. acide	extraction par A.S.E.	purification <i>in situ</i> dans l'A.S.E. lavage acide colonne de florilis et silice acidifiée	élimination des lipides et pigments 24 éch. / jour économie en solvant	préparation silice acide contraignante
8	Norme AFNOR	extraction ASE acide	purification liquide- liquide	24 éch/jour extraction liquide- liquide	consommation importante de solvant
9	ASE florilis	extraction ASE	purification DVB	24 éch. / jour économie en solvant	
<i>D'après Negri et al., 2006</i>					

Tableau 4– Avantages et inconvénients des différentes méthodes trouvées

Certains protocoles tels les modes opératoires n°5 et 6 n'ont pas été retenus car nous ne disposions pas des appareils d'analyse au laboratoire. Le protocole n°4, très chronophage, a été également évincé. Nous avons décidé de mettre au point notre propre protocole avec une extraction de type

A.S.E acide inspirée du protocole n°7 et dont le principe est décrit en **annexe 1**. Il est en effet bien adapté au programme *SPONTOX* puisqu'il permet d'effectuer une quantité importante d'extraction par jour (24 échantillons / jour), la première purification pouvant avoir lieu dès l'étape d'extraction grâce à la présence de silice acide dans la cellule A.S.E. Ce protocole a aussi l'avantage d'être économique en solvant.

2.2.1.4- Optimisation de l'étape d'analyse par CPG/MS-MS

L'appareil de CPG/MS-MS (**annexe 2**) est un spectromètre de masse à triple quadripôle couplé à un système de chromatographie en phase gazeuse. Cet appareil offre une technique d'identification et de quantification basée sur l'étude des fragments des molécules. Pour pouvoir quantifier efficacement ces fragments, il est primordial de connaître les transitions les plus caractéristiques de ces composés. C'est pourquoi il a été effectué un travail d'optimisation sur CPG/MS-MS visant à identifier ces transitions, mais aussi à déterminer le temps de rétention des composés ainsi que les énergies de collision les plus adaptées à ces transitions (**annexe 3**). La gamme d'étalonnage a été préparée à partir d'une solution multiéléments (HAP : Techlab / PCB : Accustandard / Chlorés : Techlab) regroupant les étalons internes et les composés analysés. La composition et les concentrations des différents éléments de la gamme apparaissent en **annexe 4**.

2.2.1.5- Optimisation de l'étape de concentration

La concentration, effectuée par évaporation sur système Génévac Rocket (**annexe 5**), a dû être optimisée pour convenir au protocole, de manière à obtenir un programme rapide (durée inférieure à une heure) et présentant des rendements compris entre 60 et 120%. La figure 4 présente un rapide historique des tests effectués, en se basant sur le rendement en naphtalène, composé le plus volatil de la liste de molécules à étudier, et en fluoranthène, composé plus « lourd »

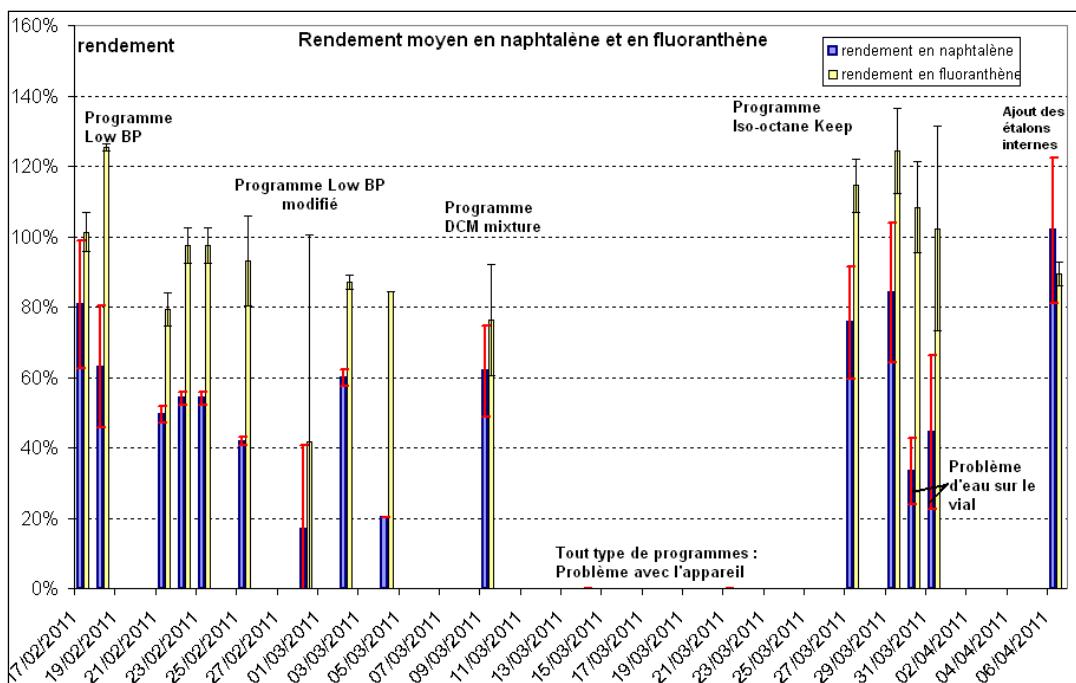


Figure 4: Rendement moyen en naphtalène et en fluoranthène sur les différents programmes testés

La démarche d'étalonnage présentée en **annexe 6** a été longue et délicate, à cause de la volatilité des composés organiques. Notre première démarche a été de s'appuyer sur des étalons externes pour obtenir des rendements satisfaisants, notamment avec le naphtalène. Or ce composé le plus volatil a montré des pertes importantes lors de cette phase de concentration. Finalement, l'utilisation d'un étalonnage interne a permis de négliger ces pertes liées à la manipulation et ainsi d'approcher des résultats plus justes. Ainsi, les rendements en Naphtalène qui pouvaient atteindre 21 % avec les étalons externes ont été ramenées à plus de 80 % avec l'étalon interne. Les tableaux des résultats de rendements obtenus en étalonnage externe et interne apparaissent en **annexe 6**.

2.2.1.6- Optimisation des étapes de purification

La première étape a consisté en une optimisation de cette étape de prépurification (**annexe 7**) puis nous avons cherché à déterminer le mode de purification le mieux adapté à nos échantillons, c'est-à-dire permettant d'éliminer les traces de lipides et de pigments pouvant subsister dans la matrice des éponges à doser. Nous nous sommes intéressés à 4 protocoles de purification cités ci-dessous et dont les compositions des différentes fractions élutantes apparaissent en **annexe 7** :

- Le protocole type « Silice-Alumine » (Munschy *et al.*, 2005 ; Tronczynski *et al.*, 2005) par absorption sur colonne de silice et d'alumine.
 - Avantages : séparation efficace, économie de solvant
 - Inconvénients : préparation fastidieuse de la phase stationnaire, purification relativement lente
- Le protocole type « Florisil-Alumine » par absorption sur colonne de Florisil et d'alumine.
 - Avantage : séparation efficace
 - Inconvénients : préparation fastidieuse de la phase stationnaire, purification relativement lente
- Le protocole Florisil activé par absorption sur colonne de Florisil activé à 150°C pendant 24 heures.
 - Avantage : préparation aisée de la phase stationnaire
 - Inconvénients : mauvaise séparation
- Le protocole Florisil par absorption sur colonne de Florisil.
 - Avantages : préparation aisée de la phase stationnaire, bonne séparation, purification relativement rapide
 - Inconvénient : possible saturation de la colonne pour les échantillons très colorés et cristallisation en tête de colonne (phénomène de bouchage).

Suite aux résultats obtenus avec ces 4 méthodes et présentés en **annexe 8**, nous avons choisi de retenir la méthode « Florisil » car elle est simple à préparer et efficace, la méthode sur Florisil activé ne permettant pas une séparation efficace, celle avec le Florisil et l'alumine nécessitant une préparation relativement importante, tout comme celle avec la silice et l'alumine qui non seulement est laborieuse mais également très lente.

2.2.1.7. Recherche d'interférences liées à la matrice *Hymeniacidon perlevis*

- Interférences liées au seul effet de matrice : rendement des dosages

Avant toute analyse de la concentration en PCB et HAP dans les tissus des éponges, il nous a fallu contrôler si la matrice de l'éponge elle-même risquait de modifier les réponses sur le chromatogramme et le spectromètre de masse, à cause de phénomènes de compétition dans la source d'ionisation, ou par fabrication d'un faux positif. Différents échantillons, après extraction et purification, ont donc été dopés par des doses connues de contaminants et nous nous sommes intéressés au rendement des dosages par CPG-MS/MS. Les résultats sont présentés en **annexe 9**.

Il est ainsi apparu que l'effet de matrice ne semblait intervenir que lors du dosage du naphtalène et du benzo(a)pyrène.

Nous avons également cherché à vérifier si les différentes étapes de préparation des échantillons, et notamment la phase de purification au fluorasil ne s'accompagnaient pas de perte en analytes trop importantes. Six échantillons d'éponges ont donc été dopés avec les différents contaminants organiques.

Afin d'optimiser l'étape de purification, nous avons été amenés à tester l'efficacité de 3 protocoles différents, les limites obtenues avec chacun des deux premiers protocoles expliquant la mise en place du protocole suivant :

- Recherches de solutions aux interférences dues à la matrice « éponge » :

1.Optimisation de la purification au Florisil

Cette purification s'est déroulée au travers de 3 séries d'essais, chaque série étant destinée à améliorer les résultats de la précédente.

Lors de la première série d'essais, les échantillons ont subi le protocole de purification au Florisil et ont été analysés par CPG/MS-MS. Rappelons que la purification au Florisil utilise 3 fractions d'éluants différents (l'hexane puis un mélange hexane et dichlorométhane, et enfin un mélange hexane et dichlorométhane). Les résultats des différents rendements obtenus par rapport aux concentrations théoriques attendues apparaissent en **annexe 10**. Ces premiers essais nous ont notamment permis de constater qu'une grande majorité des composés HAP « lourds » n'étaient pas élusés suite au passage des seules deux premières fractions. De plus, les temps d'élution du naphtalène et du benzo(a)pyrène en CPG se confondaient avec le signal d'autres molécules produisant des interférences aux mêmes temps d'élution.

Lors de la seconde série d'essais, nous avons du trouver des transitions plus spécifiques à ces composés. On a cherché à fragmenter toutes les molécules interférentes, la fragmentation épargnant la structure moléculaire des HAP qui est très résistante du fait de sa configuration aromatique et de son noyau benzénique. Les résultats obtenus après ces tests sont présentés en **annexe 11**.

Une étude du taux de lipides dans l'extrait aux différentes étapes du protocole a donc été menée de manière à vérifier l'efficacité de la purification par les phases stationnaires utilisées. Les résultats de cette étude sont présentés en **annexe 12**. Cette étude a confirmé le fait qu'un passage sur colonne de Florisil ne permet pas d'éliminer la totalité des lipides présents dans l'échantillon ce qui rend nécessaire d'améliorer encore la purification sur colonne.

Une troisième série de tests a donc cherché à définir la technique de purification la mieux adaptée à notre manipulation, en jouant à la fois sur la composition de la colonne mais également sur la composition des fractions éluantes. Ainsi, 5 échantillons d'éponges ont été exposés chacun à une

technique de purification différente. Le descriptif de ces différents tests ainsi que les résultats obtenus sont présentés dans l'**annexe 13**.

Toutes ces séries d'essais et les modifications qui ont été apportées au protocole nous permettent d'établir un **bilan de cette phase d'optimisation** :

Il apparaît donc que l'étape de purification est bel et bien l'étape clé de notre protocole. Il est nécessaire de trouver la combinaison optimale entre les phases mobiles et les phases stationnaires. La phase stationnaire la plus adaptée à notre protocole semble donc être composée de **5g de Florisil à laquelle on ajoute 5g de silice acidifiée**. La composition de la phase mobile déterminée suite aux derniers tests est de **36 mL d'hexane, 30 mL hexane / dichlorométhane 10%, 30 mL hexane / DCM 25%**.

Il reste une interrogation relative aux interférences synchrones au temps d'élution du naphtalène et du benzo(a)pyrène. En effet, nous avons une difficulté à contrôler l'élimination totale des molécules interférentes lors de leur passage sur silice acidifiée et sur Florisil. Une étude de nouveaux blancs de l'éponge *Hymeniacidon perlevis* a été effectuée en suivant le nouveau protocole, de manière à pouvoir juger de l'abondance de ces composés au sein de l'éponge.

Et, à l'aide les derniers résultats obtenus nous pouvons émettre l'hypothèse que la silice acide est un procédé trop aggressif qui décompose certains composés tels les HAP formant des composés interférents aux temps d'élution de ceux-ci.. C'est pourquoi la silice acidifiée a été remplacée par de l'alumine.

Un protocole a donc pu être établi grâce aux essais effectués ce qui a permis de doser plus de la moitié des molécules recherchées (12 sur 23) : 7 molécules de PCB (PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 118, PCB 153, PCB 138 et PCB 180) et 5 molécules de HAP (fluorène, anthracène, fluoranthène, benzo(b)fluoranthène et chrysène).

2.Comparaison de la purification au Fluorisil à un protocole AFNOR

Cependant, les rendements peu satisfaisants pour la moitié des molécules recherchées et la perte systématique des étalons internes qui ne permettait pas de réaliser un suivi du process d'extraction et de purification nous ont incités à nous appuyer également sur les protocoles disponibles dans la littérature pour réaliser d'autres essais de purification. Nous nous sommes notamment référés à une norme AFNOR en cours de rédaction, relative à la recherche de HAP dans les corps gras. Le mode opératoire est développé en **annexe 14**.

Contrairement à ce que nous avions observé lors de la purification en silice acide, les interférences avec le signal du naphtalène et benzo(a)pyrène ont disparu et les rendements sont devenus corrects pour ces deux molécules (compris entre 50 et 100 %). Par contre, cette étape s'est accompagnée de la perte des étalons internes au cours du processus. De plus, cette méthode nécessite la manipulation délicate d'une ampoule à décanter qui pourrait expliquer les écarts de répétabilités observés sur les diverses molécules.

Si ce process de purification a amélioré les rendements de dosage des divers HAP (compris en majorité entre 50 et 80 %), il a par contre entraîné la perte de l'ensemble des PCB.

Cette technique difficile à mettre en œuvre a donc été écartée du fait de sa faible répétabilité, la perte des étalons internes, et de son rendement médiocre, en particulier pour les PCB.

3.Optimisation de la purification à partir de données publiées

Nous nous sommes alors tournés vers une technique de purification selon un protocole simple et reconnu pour les 2 types de composés : la purification Silice + Alumine (Pavoni *et al.*, 2003, norme AFNOR XP X 33-012, Munsch *et al.*, 2005 ; Tronczynski *et al.*, 2005). De plus, l'arrêt de l'utilisation de la silice acide a été envisagé car cette phase pouvait être responsable de la destruction des étalons internes.

Des essais ont été également réalisés afin d'éliminer les interférences des lipides d'après une méthode élaborée au sein du LABERCA, Nantes , (Le Bizec *et al.*, 2007)

Le mode opératoire élaboré est décrit en **annexe 15**. Les résultats obtenus sur les colonies de l'éponge *Hymeniacidon perlevis* prélevées sur les côtes de Lingreville et dopées par des concentrations connues en PCB et HAP apparaissent sur **l'annexe 16**. Des dosages selon le même protocole ont été effectués sur les moules témoins *Mytilus edulis* provenant également de la région de Lingreville.

Cette optimisation s'est déroulée en 2 étapes, tout d'abord un test de l'efficacité de purification sur Silice + Alumine, cette purification étant ensuite couplée à extraction par A.S.E. Lors de la 1^{ère} étape, les rendements sont apparus corrects pour l'ensemble des molécules testées (**annexe 16**), oscillant en 80 et 120 % de rendement. Suite à la 2^{ème} étape, les rendements se sont maintenus entre 80 et 100 % (**annexe 17**). De plus, les étalons internes ont été retrouvés et on a pu constater une répétabilité dans les mesures.

Les limites de quantification sur les matrices moules et éponges sont de 2,5 µg/kg PS pour les HAP et 1, 25 µg/kg PS pour les PCB (**annexe 18**).

Ces démarches analytiques ont été accompagnées de nombreux contrôles qualité au niveau des réactifs utilisés, de la gamme d'étalonnage, lors de la préparation des étalons internes, au niveau du process d'extraction et de purification, au niveau également du blanc analytique (**annexe 19**).

Les résultats des dosages en HAP et PCB dans les espèces bioindicatrices prélevées *in situ* ou introduites dans le milieu par caging et présentés dans les chapitres suivants ont donc été obtenus selon ce protocole car il est apparu adapté aux deux matrices, moules et éponges ; outre, la performance des rendements obtenus, il s'est avéré notamment efficace pour éliminer les traces de lipides pouvant subsister dans la matrice des moules et des éponges à doser, mais également les pigments (caroténoïdes) présents dans les tissus d'*Hymeniacidon perlevis*.

2.2.1.8 Essais Interlaboratoires

Nous avons souhaité cependant valider notre protocole en comparant les rendements obtenus pour 16 HAP sur 3 échantillons d'éponges, avec ceux que pourraient obtenir d'autres laboratoires.

Trois laboratoires ont bien voulu répondre à cette sollicitation d'intercalibration. Il s'est agi :

- du **laboratoire de biogéochimie des contaminants organiques du centre IFREMER de Nantes**
- du **laboratoire départemental du Morbihan** situé à Vannes qui est agréé DGAL pour la recherche des HAP sur les mollusques
- du **laboratoire municipal de Rouen**, participant depuis de nombreuses années au réseau RNO de l'IFREMER
- Les résultats de ces trois laboratoires ont donc été comparés avec ceux que notre **laboratoire départemental de la Manche**, partenaire du programme SPONTOX a obtenu.

Dans un souci d'anonymat, nous avons choisi de ne pas indiquer le nom des laboratoires sur les tableaux de résultats ci-dessous. Ils seront indiqués par les désignations labo 1, labo 2, labo 3 et labo 4 sans relation avec l'ordre par lequel ces laboratoires ont été cités ci-dessus.

La provenance des 3 échantillons dosés sont les suivantes :

- Echantillon 1 : *H. Perlevis* prélevé sur le site de Lingreville (50)
- Echantillon 2 : *H. Perlevis* prélevé sur le site de Saint Vaast la Hougue (50)
- Echantillon 3 : *H. Perlevis* placé 2 mois en cage dans le port de Cherbourg (50)

Avant d'être adressés aux différents laboratoires, les échantillons avaient été lyophilisés, broyés et stockés dans des bocaux en verre neufs rincés à l'acide.

L'ensemble de cette intercalibration est présentée dans les tableaux 5, 6 et 7. Nous avons choisi de multiplier l'écart-type par 2 lors du calcul du facteur de variation, tel qu'il est usuellement pratiqué en chimie lors du traitement statistique des EIL. Ainsi, les écarts >40-50% ont pu être considérés comme très significatifs.

	Labo 1	Labo 2	Labo 3	Labo 4	Moyenne	Ecart type	Coefficient de variation*
Naphtalène	17.53	3.4	1.3		7.4	8.8	238.2%
Acénaphtylène	<2.5		<0,25		<2.5		
Acénaphtène	<2.5		<0,25		<2.5		
Fluorène	7.43	1.9	2.5	15.7	6.9	6.4	185.4%
Phénanthrène	15.89	6.8	15.3	3.7	10.4	6.1	117.2%
Anthracène	<2.5		<0,25	1.0	1.0		
Fluoranthène	8.15	6.6	8.7	7.3	7.7	0.9	24.1%
Pyrène	7.13	4.9	5.1	3.6	5.2	1.5	56.2%
Benzo(a)anthracène	2.76	3.0	3.0	2.7	2.9	0.2	11.0%
Chrysène	4.72	5.2	5.7	8.2	6.0	1.5	52.0%
Benzo(b)fluoranthène	20.42	24.4	37.8	12.1	23.7	10.7	90.5%
Benzo(k)fluoranthène	8.09	9.5	9.5	6.7	8.4	1.3	31.8%
Benzo(a)pyrène	5.66	4.5	7.9	5.8	6.0	1.4	47.4%
Indeno(1,2,3c-d)pyrène	24.89	24.8	31.6	4.8	21.5	11.6	107.7%
Dibenzo(a,h)anthracène	<2.5		3.9	20.3	12.1		>300 %
Benzo(g,h,i)pérylène	15.77	6.0	19.0	22.0	15.7	6.9	88.5%
Somme HAP	138.4	101.0	151.3	113.9	126.2	22.8	36.2%

Tableau 5 : Résultat EIL pour les 16 HAP en µg/kg sec pour l'échantillon n°1

*Coefficient de variation = 2 écarts-type/moyenne

	Labo 1	Labo 2	Labo 3	Labo 4	Moyenne	Ecart type	Coefficient de variation*
Naphtalène	15.64	2.7	0.8		1.8	8.1	922.6%
Acénaphtylène	<2.5		<0,25		<2.5		
Acénaphtène	<2.5		<0,25		<2.5		
Fluorène	5.50		1.8	3.5	2.7	1.8	139.6%
Phénanthrène	15.33	4.4	11.1	1.5	5.7	6.3	221.8%
Anthracène	<2.5		<0,25				
Fluoranthène	3.5	3.2	4.8	4.3	4.1	0.8	39.9%
Pyrène	5.18	3.2	3.0	2.3	2.8	1.2	87.2%
Benzo(a)anthracène	<2.5	4.7	1.6	1.6	2.6	1.8	135.9%
Chrysène	2.96	1.8	2.5	3.9	2.7	0.9	64.4%
Benzo(b)fluoranthène	6.41	7.8	10.9	5.8	8.2	2.3	55.7%
Benzo(k)fluoranthène	<2.5	1.9	2.4	1.6	2.0	0.4	41.1%
Benzo(a)pyrène	<2.5		2.7	1.2	2.0		
Indeno(1,2,3c-d)pyrène	6.85	5.3	11.0	1.6	6.0	3.9	130.4%
Dibenzo(a,h)anthracène	<2.5		1.1	7.0	4.1		>300%
Benzo(g,h,i)pérylène	4.66		6.6	7.0	6.8	1.3	36.9%
Somme HAP	62.5	35.0	60.3	41.3	45.5	13.7	60.2%

Tableau 6: Résultat EIL pour les 16 HAP en µg/kg sec pour l'échantillon n°2

*Coefficient de variation = 2 écarts-type/moyenne

	Labo 1	Labo 2	Labo 3	Labo 4	Moyenne	Ecart type	Coefficient de variation*
Naphtalène	24.82	4.8	2.6		10.7	12.2	228.0%
Acénaphtylène	<2.5	1.2	0.3		0.75		
Acénaphtène	<2.5	1.7	1.1		1.40		
Fluorène	8.65	3.9	4.4	12.1	7.3	3.9	106.5%
Phénanthrène	46.56	36.0	49.0	50.3	45.5	6.5	28.6%
Anthracène	5.73	6.2	1.7	6.2	5.0	2.2	
Fluoranthène	56.73	51.9	62.0	67.4	59.5	6.7	22.5%
Pyrène	95.33	90.7	120.1	116.6	105.7	14.8	28.0%
Benzo(a)anthracène	40.39	31.4	30.5	38.2	35.1	4.9	28.0%
Chrysène	70.80	55.1	46.2	92.5	66.2	20.3	61.4%
Benzo(b)fluoranthène	95.40	118.0	87.6	74.2	93.8	18.4	39.1%
Benzo(k)fluoranthène	26.18	22.0	27.1	22.2	24.4	2.6	21.7%
Benzo(a)pyrène	50.93	25.5	37.6	47.2	40.3	11.4	56.4%
Indeno(1,2,3c-d)pyrène	31.66	34.5	45.3	13.9	31.3	13.0	83.1%
Dibenzo(a,h)anthracène	1.97		9.5	43.9	18.5	22.4	242.3%
Benzo(g,h,i)pérylène	31.48	15.2	41.2	31.9	29.9	10.8	72.2%
Somme HAP	586.6	498.1	566.2	616.6	566.9	50.3	17.7%

Tableau 7: Résultat EIL pour les 16 HAP en µg/kg sec pour l'échantillon n°3

*Coefficient de variation = 2 écarts-type/moyenne

D'après les résultats, diverses tendances se dégagent :

- Des coefficients de variations corrects pour les molécules suivantes : Acénaphtylène, acénaphtène, anthracène, fluoranthène, pyrène, benzo(a)anthracène, benzo(b)pyrène, benzo(k)pyrène, benzo(a)pyrène, benzo(ghi)pérylène.
- Des coefficients de variation sont corrects mais élevées pour certains échantillons concernant les molécules suivantes : Chrysène, Fluorène, indéno(1,2,3 cd) pyrène.
- Les résultats concernant le fluoranthène sont relativement homogènes.
- Les coefficients de variation pour le Naphtalène et Dibenzo(a,h) anthracène sont importants pour les mesures effectuées sur les 3 éponges, avec des valeurs les plus fortes en naphtalène obtenues pour le laboratoire 1, les valeurs les plus fortes en Dibenzo(a,h) anthracène étant obtenues par le laboratoire 4. Les coefficients de variation pour le Phénanthrène sont également très importantes, mais uniquement pour les 2 premiers échantillons d'éponge. Là encore, le laboratoire 1 a obtenu la concentration la plus importante sur ces deux échantillons. La volatilité de cette molécule peut expliquer les différences entre les 3 laboratoires, la phase d'évaporation étant une phase critique.

- Le coefficient de variation est correct pour la somme des HAP.(hors labo 4, ne dosant pas 3 molécules)

2.2.1.9. Conclusion

La méthode utilisée permet de dégager les points suivants :

- La mise au point de la méthode d'analyse développée par le Laboratoire Départemental d'Analyses 50 apparaît adaptée à la matrice des éponges (microsquellette siliceux, pigments caroténoïdes, teneur en lipides). Elle a été longue et a nécessité de nombreuses adaptations méthodologiques, en particulier pendant la phase de purification.
- Les rendements obtenus aujourd’hui sont corrects puisqu’ils oscillent entre 80 et 120 %.
- Les résultats obtenus lors de ces mesures s’accompagnent d’une répétabilité tout-à-fait satisfaisante.
- L’ensemble des étalons internes est récupéré ce qui permet un suivi qualité de chaque échantillon (**annexe 19**).
- L’essai interlaboratoires permet de confirmer la justesse correcte des résultats obtenus concernant les molécules Acénaphtylène, acénaphthène, anthracène, fluoranthène, pyrène, benzo(a)anthracène, benzo(b)pyrène, benzo(k)pyrène, benzo(a)pyrène, benzo(ghi)pérylène fluoranthène.

Lors des suivis de la bioconcentration et bioaccumulation en contaminants organiques dans les éponges et les moules, 4 molécules ou familles de molécules seront dosées : le fluoranthène (également suivi dans le cadre du réseau), la somme HAP (16 molécules), PCB 153 (à l’identique du programme ROCCH) et la somme des PCBi (7 molécules).

2.2.2. VARIATIONS DES TAUX DE CONTAMINATION DES POPULATIONS NATURELLES ISSUES D’UN MEME SITE

Le but des études de biosurveillance ou des tests écotoxicologiques en laboratoire est de parvenir à déduire des valeurs de la contamination dosée dans les tissus du bioindicateur utilisé, un niveau de contamination du milieu. Ainsi, si une variation du niveau de contamination est observée entre différents individus d'une même espèce bioindicatrice, qu'ils soient présents sur différents sites, ou à l'intérieur d'un même site, ces résultats devront alors permettre de conclure à une hétérogénéité dans la contamination d'un milieu selon la localisation des sources contaminantes.

Nous avons donc tout d'abord cherché à nous assurer que des colonies naturelles d'*Hymeniacidon perlevis* vivant sur un même site à peu de distance les unes des autres, ou encore placées à l'intérieur d'une même cage, ne présentaient pas une intervariabilité naturelle importante dans leur niveau de

contamination due à différents facteurs tels que l'âge de la colonie, ou l'impact plus ou moins marqué d'un facteur environnemental (lumière, hydrodynamisme...).

Trois lots d'éponges ont été testés. Les deux premiers provenaient de stations intertidales situées à Lingreville et à Saint-Vaast. Sur chacun de ces sites, une dizaine de colonies a été prélevée sur un territoire n'excédant pas 100 m². Le site de Lingreville est un site situé sur la côte Ouest du département de la Manche à proximité de structures conchyliocoles ; il est réputé comme étant un site faiblement anthropisé. Le site de Saint-Vaast est sur la côte Est du département, et est ouvert sur la Baie de Seine. Le troisième lot a été extrait d'une cage immergée pendant 2 mois dans le bassin du commerce de Cherbourg, qui est un bassin fermé et fortement anthropisé.

Pour réaliser cette étude, nous nous sommes intéressés au niveau de contamination de 3 métaux : le cuivre, le zinc et le cadmium dans les tissus des colonies d'*Hymeniacidon perlevis*.

Sur le tableau 8 sont rassemblés les résultats des dosages des 3 ions métalliques, réalisés simultanément sur une dizaine de boutures par site. Chaque analyse a été effectuée en triplicat sur chacune des colonies dosées. Les coefficients de variation de ces mesures sur chaque triplicat ont été déterminés et figurent également sur ce même tableau. Pour 73 des 88 CV déterminés, les valeurs sont très faibles (inférieurs à 9 %), et elles oscillent entre 10 et 19 % pour les 13 restants. Cela signifie qu'une part très faible de la variation entre deux mesures peut être due à la reproductibilité de la méthode.

Les coefficients de variation calculés à partir des moyennes et des écart-types des dosages effectués sur la dizaine de boutures issues d'un même site apparaissent également sur ce tableau. Ces CV oscillent entre 28 et 33 % pour le cuivre, 24 et 28 % pour le Zinc, 14 et 22 % pour le cadmium selon le site. Ces variations sont donc inhérentes aux spécificités individuelles des colonies. Ainsi, on considérera dans la suite de ce travail que des boutures issues d'un même site, ou de sites distincts, ont des niveaux de contaminations significativement différents lorsqu'ils dépasseront 33 % pour le cuivre, 28 % pour le Zinc, 22 % pour le Cadmium. Il reste à effectuer la même étude pour la détermination de la variabilité des taux de contaminants organiques.

Cuivre (mg/kg P.S.)										
Bassin du commerce	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Résultats des analyses en triplicat par colonie	20,40	18,00	16,30	18,60	24,00	21,50	17,60	30,00	35,00	21,80
	17,40	18,60			25,20	16,50	17,90	32,10	35,00	24,00
	16,80	19,10	15,80	22,10	21,50	17,20	18,00	31,20	34,70	22,20
	moyenne	18,20	18,57	16,05	20,35	23,57	18,40	17,83	31,10	34,90
écart-type	1,93	0,55	0,35	2,47	1,89	2,71	0,21	1,05	0,17	1,17
	11%	3%	2%	12%	8%	15%	1%	3%	0%	5%
Saint-Vaast										
Résultats des analyses en triplicat par colonie	32,30	28,60	12,50	14,00	26,40	17,40	19,30	23,00	14,20	18,70
	33,40	28,10	13,40	13,40	27,50	18,80	19,60	21,40	14,90	18,80
	33,10	28,70	13,20	13,20	28,00	19,10	19,30	23,50	14,50	18,50
	moyenne	32,93	28,47	13,03	13,53	27,30	18,43	19,40	22,63	14,53
écart-type	0,57	0,32	0,47	0,42	0,82	0,91	0,17	1,10	0,35	0,15
	2%	1%	4%	3%	3%	5%	1%	5%	2%	1%
Lingreville										
Résultats des analyses en triplicat par colonie	13,30	14,00	10,30	11,70	10,80	6,50	7,40	9,40	8,10	6,00
	11,50	13,00	9,70	11,70	9,90	5,70	6,70	8,50	9,10	5,30
	13,00	13,40	9,50	11,00	11,50	6,40	7,20	7,60	8,00	5,90
	moyenne	12,60	13,47	9,83	11,47	10,73	6,20	7,10	8,50	8,40
écart-type	0,96	0,50	0,42	0,40	0,80	0,44	0,36	0,90	0,61	0,38
	8%	4%	4%	4%	7%	7%	5%	11%	7%	7%
Zinc (mg/kg P.S.)										
Bassin du commerce	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Résultats des analyses en triplicat par colonie	1572,30	965,50	1200,00	1175,20	1563,40	1118,20	1286,30	862,10	1466,00	2166,10
	1332,10	1046,50			1579,30	861,80	1374,20	848,50	1421,00	2168,40
	1210,70	981,40	1144,00	1401,30	1602,80	849,40	1444,40	865,50	1460,50	2050,90
	moyenne	1371,7	997,80	1172,00	1288,25	1581,83	943,13	1368,30	858,70	1449,17
écart-type	184,02	42,92	39,60	159,88	19,82	151,74	79,21	9,00	24,55	67,18
	13%	4%	3%	12%	1%	16%	6%	1%	2%	3%
Saint-Vaast										
Résultats des analyses en triplicat par colonie	830,10		1080,60	838,40	1451,80	1060,70	889,60	698,10	831,00	636,00
	872,00		1111,80	821,60	1446,30	1133,60	876,10	653,10	798,80	632,30
	851,10		1112,60	872,10	1479,60	1139,40	868,40	724,00	840,70	651,70
	moyenne	851,067	-	1101,67	844,03	1459,23	1111,23	878,03	691,73	823,50
écart-type	20,95	-	18,25	25,72	17,85	43,86	10,73	35,88	21,93	10,30
	2%	-	2%	3%	1%	4%	1%	5%	3%	2%
Lingreville										
Résultats des analyses en triplicat par colonie	1815,10	1647,80	2482,00	1787,10	1458,60	2314,30	1501,10	1052,90	1928,60	1592,80
	1598,20	1550,60	2591,90	1895,80	1470,30	1910,80	1409,40	977,80	1991,80	1396,60
	1792,90	1605,50	2413,60	1730,00	1608,70	1985,60	1529,00	793,10	1796,00	1547,70
	moyenne	1735,4	1601,30	2495,83	1804,30	1512,53	2070,23	1479,83	941,27	1905,47
écart-type	119,34	48,74	89,95	84,23	83,49	214,65	62,57	133,70	99,93	102,76
	7%	3%	4%	5%	6%	10%	4%	14%	5%	7%
Cadmium (mg/kg P.S.)										
Bassin du commerce	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Résultats des analyses en triplicat par colonie	2,05	1,82	1,70	1,85	1,89	1,56	1,38	2,03	0,94	
	1,95	2,14	1,29	1,49	1,87	1,18	1,34	1,90	1,15	
	1,77		1,61	2,06	1,74	1,12	1,49	1,64		
	moyenne	1,92	1,98	1,53	1,80	1,83	1,29	1,40	1,86	1,05
écart-type	0,14	0,23	0,22	0,29	0,08	0,24	0,08	0,20	0,15	-
	7%	11%	14%	16%	4%	19%	6%	11%	14%	-
Saint-Vaast										
Résultats des analyses en triplicat par colonie	1,76	2,11	1,24	1,89	1,73	1,59	1,58	1,79	1,30	1,48
	1,77	2,06	1,38	1,68	1,96	1,75	1,57	1,67	1,37	1,69
	1,67	1,95	1,26	1,63	2,05	1,79	1,55	1,78	1,33	1,63
	moyenne	1,73	2,04	1,29	1,73	1,91	1,71	1,57	1,75	1,33
écart-type	0,06	0,08	0,08	0,14	0,17	0,11	0,02	0,07	0,04	0,11
	3%	4%	6%	8%	9%	6%	1%	4%	3%	7%
Lingreville										
Résultats des analyses en triplicat par colonie	0,75	1,02	1,22	1,07	0,89	1,54	1,03	0,71	1,14	0,99
	0,94	1,07	1,21	0,90	1,31	1,03	0,59	1,22	0,85	
	0,68	1,05	1,19	1,24	0,93	1,35	1,09	perdu	1,17	0,93
	moyenne	0,72	1,00	1,16	1,17	0,91	1,40	1,05	0,65	1,18
écart-type	0,05	0,06	0,08	0,09	0,02	0,12	0,03	0,00	0,04	0,07
	7%	6%	7%	8%	2%	9%	3%	0%	3%	8%

échantillon écarté après test Q.

Tableau 8 : Résultats des dosages en Zn, Cu et Cd des 10 échantillons d'éponge prélevés sur les 3 sites (Lingreville, St Vaast La Hougue et Bassin du commerce, du port de Cherbourg)

Les résultats en cuivre, en zinc et en cadmium obtenus dans les populations d'éponges naturelles d'*H. perlevis* laissent apparaître que les populations naturelles collectées à St Vaast-la-Hougue semblent exposées au plus faible niveau de contamination en zinc. Concernant le cuivre et le cadmium, les niveaux de contamination les plus bas sont observés à Lingreville. Le bassin de Commerce du Port de Cherbourg et le Port de St Vaast-la-Hougue apparaissent contaminés par le cadmium et le cuivre de façon assez similaire, ce qui peut être expliqué par les différentes activités portuaires.

La comparaison des niveaux de contamination de ces trois sites est donc effectuée de façon indirecte grâce à la bioaccumulation des métaux dans les tissus d'éponges. Il est cependant possible d'estimer les niveaux réels de contamination métallique dans l'eau de ces sites si l'on dispose des facteurs de bioconcentration (BCF) de chacun des métaux par l'éponge *H. perlevis*. Cette capacité de bioconcentration est évaluée lors d'essai *in vivo* en structures contrôlées, conduisant à exposer l'éponge à une concentration en métal connue. En 2011, le zinc a été le premier métal mis en présence de l'éponge. Ce travail donne lieu au chapitre 2.3.2.1.

2.3- COMPARAISON DE LA CINETIQUE DE BIOACCUMULATION D'*HYMENIACIDON PERLEVIS* ET DE *MYTILUS EDULIS*

2.3.1- EN MILIEU NATUREL

Des colonies d'éponges et des moules ont été placés dans des cages et immergés de 80 jours (2 mois) à 118 jours (3 mois) en 4 points du port de Cherbourg : bassin du commerce, port de l'Epi, ponton H et ponton Q. L'objectif de cette expérimentation de caging était de vérifier les résultats obtenus en 2010 sur les 2 espèces biologiques (rapport Spontox 2010) et de comparer les niveaux de contamination des sites en vue de localiser les différentes sources contaminantes. A l'issue de cette contamination, certains échantillons ont été replacés dans un site de la côte ouest du Cotentin (Blainville sur mer) afin d'évaluer la vitesse de décontamination *in situ*.

2.3.1.1- Evolution de la concentration en métaux

➤ Cas du zinc

La figure 5 donne l'évolution des concentrations en zinc dans les échantillons d'*H. perlevis* et de *M. edulis* placés dans des cages immergées en 4 points du port de Cherbourg.

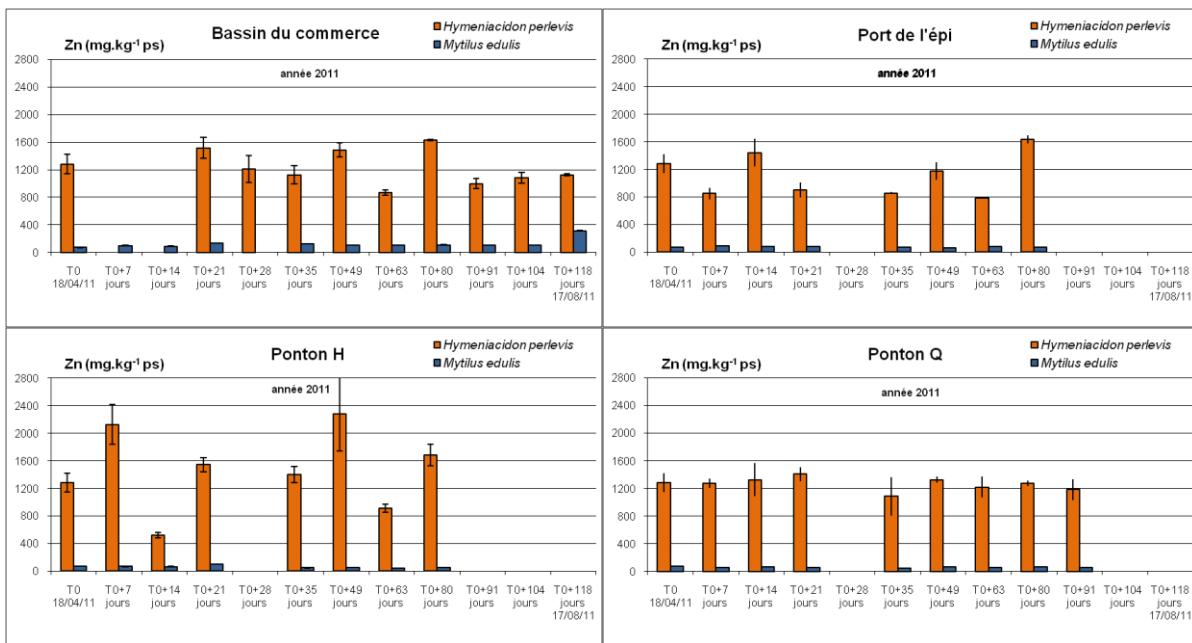


Figure 5 : Evolution des concentrations en zinc dans *Hymeniacidon perlevis* et *Mytilus edulis* placées dans des cages en 4 sites du port de Cherbourg (Bassin du commerce, port de l'épi, ponton H, ponton Q).

Les niveaux de concentration en zinc mesurés dans l'éponge *Hymeniacidon perlevis* apparaissent en moyenne 11 fois (bassin du commerce) à 25 fois (ponton H) supérieurs à ceux enregistrés dans les échantillons de la moule *Mytilus edulis*, pour les mêmes sites et mêmes durées d'immersion.

Excepté pour le site du ponton H où les valeurs semblent plus élevées (jusqu'à 2,5 fois), les échantillons d'*H. perlevis* issus des cages immergées sur les autres sites présentent des concentrations en zinc proches de la moyenne (1316 ± 369 mg/kg ps) calculée pour le bassin du commerce lors de l'étude statistique précédente (§ 2.2.2).

Quelque soit le site étudié, on n'observe pas d'évolution des concentrations dans les échantillons de l'éponge introduite par caging mais plutôt une stabilité des mesures au cours du temps qui est sans doute la résultante d'une saturation rapide des tissus par le zinc (BCF élevé).

Les fortes valeurs détectées seront associées à une forte bioconcentration de ce métal par l'éponge *H. perlevis* (§2.3.2).

➤ Cas du cuivre

La figure 6 donne l'évolution des concentrations en cuivre dans les échantillons d'*H. perlevis* et de *M. edulis* placés dans des cages immergées en 4 points du port de Cherbourg : bassin du commerce, port de l'Epi, ponton H et ponton Q.

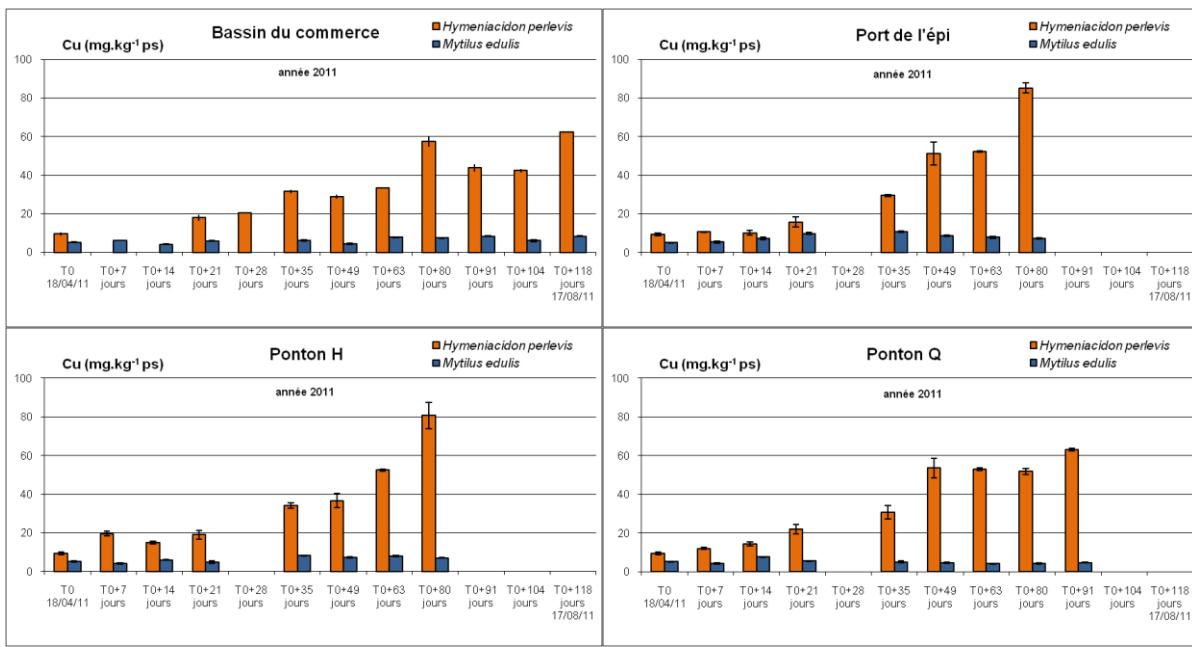


Figure 6 : Evolution des concentrations en cuivre dans *Hymeniacidon perlevis* et *Mytilus edulis* placées dans des cages en 4 sites du port de Cherbourg (Bassin du commerce, port de l'épi, ponton H, ponton Q).

Comme pour le zinc, les niveaux de concentration en cuivre mesurés dans l'éponge *Hymeniacidon perlevis* sont plus importants que ceux mesurés dans les échantillons de la moule *Mytilus edulis*, pour les mêmes sites et aux mêmes durées d'immersion.

Au contraire de l'éponge, les concentrations en cuivre mesurées dans les moules présentent une stabilité au cours du temps. Pour rappel, la moule est un organisme connu pour réguler le cuivre (Amiard *et al.*, 1986 ; Han *et al.*, 1993). Ce qui explique que l'écart de concentration entre ces deux bioindicateurs s'accroît au cours du temps avec une augmentation significative des valeurs au-delà de 28 jours d'immersion, sur l'ensemble des sites étudiés. Le rapport des niveaux de concentrations dans les éponges par rapport à ceux mesurés dans les moules passe de 2 à 3 au cours du 1^{er} mois, puis à 14 après 80 jours d'immersion (ponton Q).

Les concentrations en cuivre enregistrées dépassent alors la valeur moyenne ($22,1 \pm 6,2$ mg/kg ps) calculée dans le bassin du commerce lors de l'étude statistique menée précédemment (§ 2.2.2). En effet, la valeur maximale de 85 mg/kg ps est enregistrée après 2,5 mois d'immersion.

Il apparaît clairement que le cuivre est un élément métallique contaminant l'ensemble du port de plaisance et que l'utilisation d'une espèce sentinelle comme l'éponge *H. perlevis* s'avère pertinente pour localiser les sources et les niveaux de contamination du milieu. Cet élément est souvent associé à l'utilisation des peintures anti-salissures protégeant les coques de bateaux. La dissolution de ces peintures dans l'eau représente une source de contamination couramment rencontrée en milieu portuaire.

➤ Cas du cadmium

La figure 7 donne l'évolution des concentrations en cadmium dans les échantillons d'*H. perlevis* et de *M. edulis* placés dans des cages immergés en 4 points du port de Cherbourg : bassin du commerce, port de l'Epi, ponton H et ponton Q.

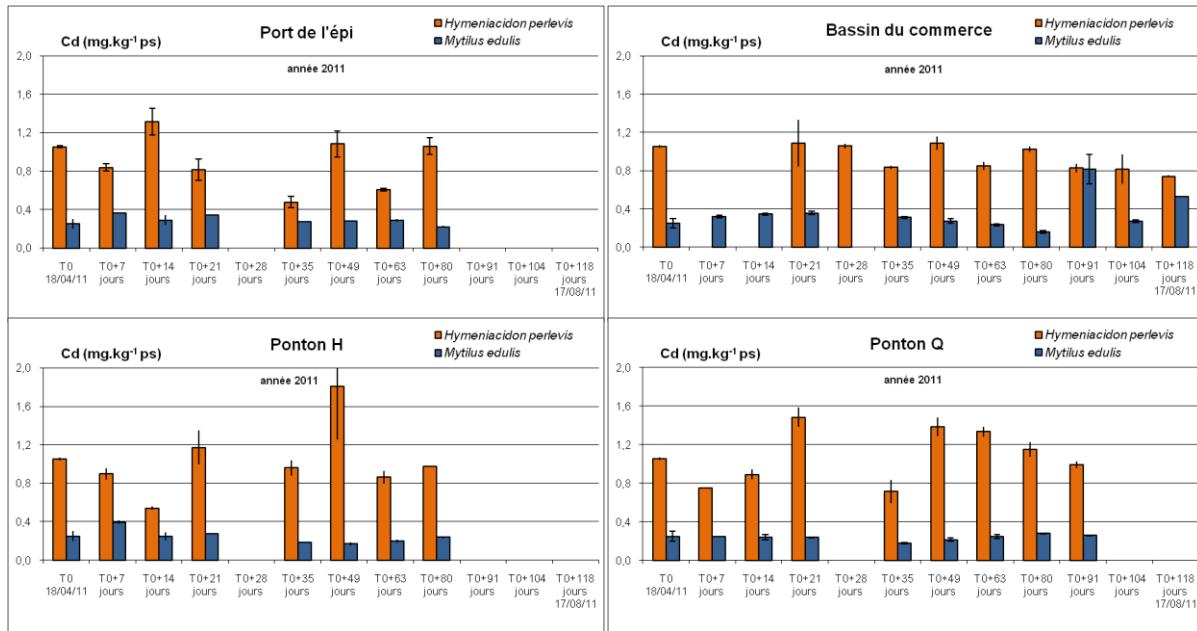


Figure 7: Evolution des concentrations en cadmium dans *Hymeniacidon perlevis* et *Mytilus edulis* placées dans des cages en 4 sites du port de Cherbourg (Bassin du commerce, port de l'épi, ponton H, ponton Q).

Les niveaux de concentration en cadmium mesurés dans l'éponge *Hymeniacidon perlevis* sont de 3 (bassin du commerce, port de l'Epi) à 5 fois (ponton Q et H) supérieurs à ceux relevés dans les échantillons de la moule *Mytilus edulis*, pour les mêmes sites et mêmes durées d'immersion.

Excepté pour le site du ponton H au 49^{ème} jour d'immersion, les concentrations en cadmium des échantillons d'*H. perlevis* restent inférieures à la moyenne ($1,63 \pm 0,33$ mg/kg ps) calculée pour le bassin du commerce lors de l'étude statistique réalisée précédemment (§ 2.2.2).

Quel que soit le site étudié, les concentrations relevées dans les échantillons de l'éponge et des moules semblent relativement constantes au cours du temps. Le cadmium ne semble pas être un élément contaminant du port au regard des valeurs mesurées dans la moule qui ne dépassent pas 0,4 mg/kg ps. En effet, selon une étude de Casas (2005), des moules immergées en cage plus de 3 mois en Méditerranée (étang de Bages) et présentant des concentrations en cadmium supérieures à 1 mg/kg ps, sont considérées comme contaminées. Mais, les bruits de fond naturels pouvant être différents entre la Manche et la Méditerranée, il sera intéressant de tester les éponges sur des sites du littoral bas-normands considérés comme contaminés. Pour cela, une étude sur le Cd pourrait être menée et des essais en parallèle de contamination en conditions contrôlées pourraient permettre de mieux connaître le phénomène de bioaccumulation du Cd dans cet organisme.

2.3.1.2- Mise en décontamination des échantillons biologiques

Deux séries d'expérimentations de « décontamination » en milieu propre ont été réalisées. La première série suit directement l'expérimentation de caging conduite dans le bassin du commerce. Les échantillons immergés pendant 118 jours ont été transplantés aussitôt en milieu naturel, sur la côte ouest du département de la Manche à Blainville sur mer et collectés tous les 15 jours sur une période de 2 mois de décontamination. La deuxième expérimentation de décontamination a suivi l'immersion pendant 2 mois (d'août à octobre 2011) de nouveaux échantillons d'éponge et de moules, placés en cages dans le bassin du commerce du port. L'échantillonnage durant la période de décontamination a suivi la même fréquence que la 1^{ère} série. La figure 8 donne l'évolution des concentrations en zinc, cuivre et cadmium dans les échantillons d'*H. perlevis* et de *M. edulis* des cages transplantés en milieu naturel après avoir immergés dans le bassin du commerce du port de Cherbourg.

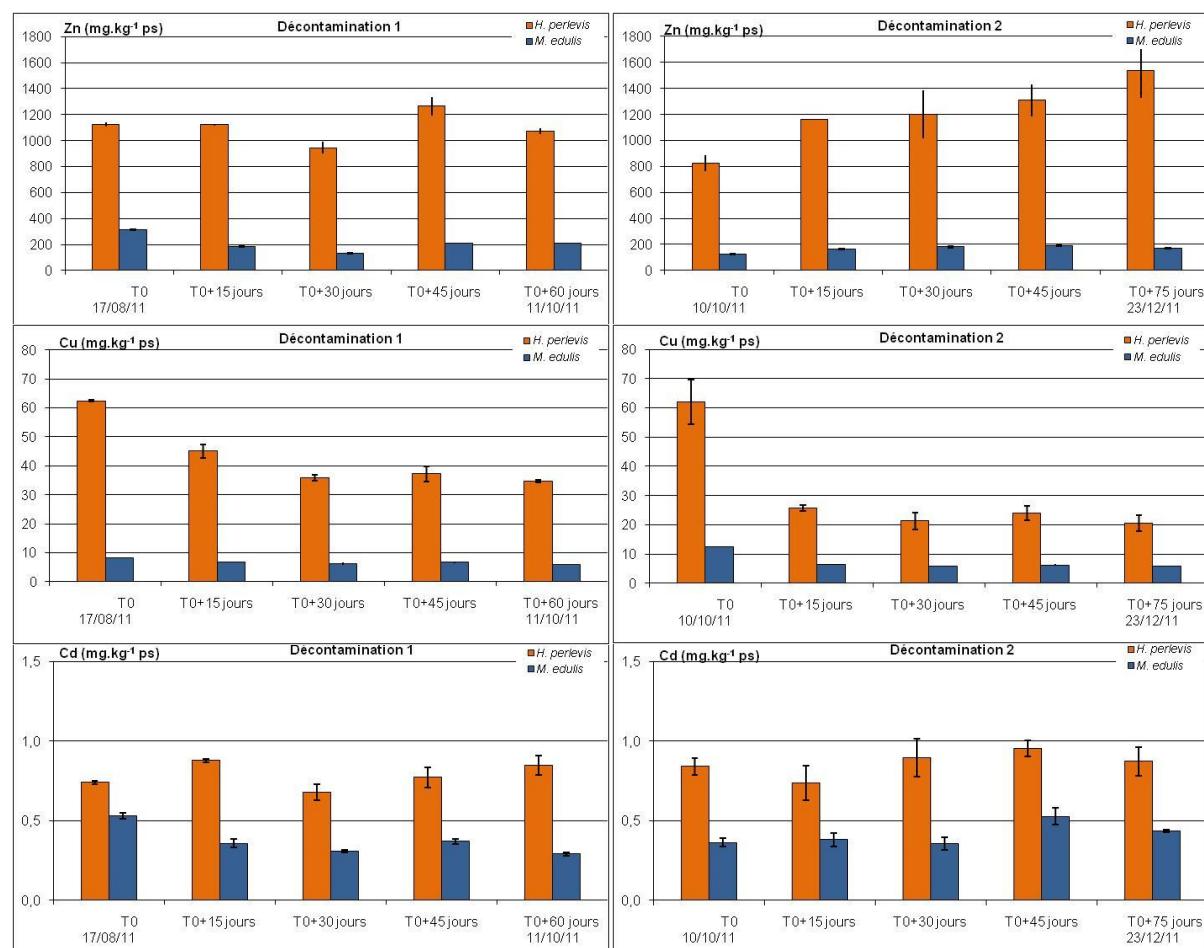


Figure 8: Evolution des concentrations en Zn, Cu et Cd dans *Hymeniacidon perlevis* et *Mytilus edulis* des cages transplantés en milieu naturel (Blainville sur mer) après avoir été immergées dans le bassin du commerce du port de Cherbourg (50).

Les niveaux de concentration en zinc et cadmium mesurés dans l'éponge *Hymeniacidon perlevis* et la moule *Mytilus edulis* après leur transfert du port vers le milieu naturel ne montrent pas de variation au cours du temps. En effet, la décontamination n'est envisageable que s'il y a eu une contamination préalable, or les concentrations n'ont pas évoluées durant leur période d'immersion dans le port de Cherbourg.

Seules les concentrations en cuivre de l'éponge affichent une diminution après les 15 premiers jours de transplantation en milieu naturel, dans les 2 séries de décontamination. Malgré des concentrations similaires au début des 2 mises en décontamination (62 mg/kg ps), la cinétique de décontamination de la 1^{ère} série, qui suit la plus longue mise en contamination (de 118 jours) des échantillons, s'avère plus lente que dans la 2^{ème} série de décontamination. Cette 2^{ème} série fait suite à une durée de contamination plus courte (sur 80 jours). Seules les concentrations mesurées en fin de période de décontamination de la 2^{ème} série reviennent à des valeurs proches du milieu (de l'ordre de 22 mg/kg ps). Ce n'est pas le cas des concentrations obtenues à la fin de la 1^{ère} série de décontamination qui diminuent jusqu'à 35 mg/kg ps, pour la même période de temps. Ceci peut laisser supposer que la décontamination des échantillons n'était pas terminée après 80 jours en milieu « propre ».

2.3.1.2- Evolution de la concentration en HAP et PCB

➤ Cas des HAP

Les figures 9 à 12 indiquent l'évolution des concentrations en somme des HAP(16) et fluoranthène dans les échantillons d'*H. perlevis* et de *M. edulis* placés dans des cages immergées dans différents sites du port de Cherbourg : le port de l'épi (figure 9), le port de commerce (figure 10), les pontons Q (figure 11) et H (figure 12) du Port de plaisance.

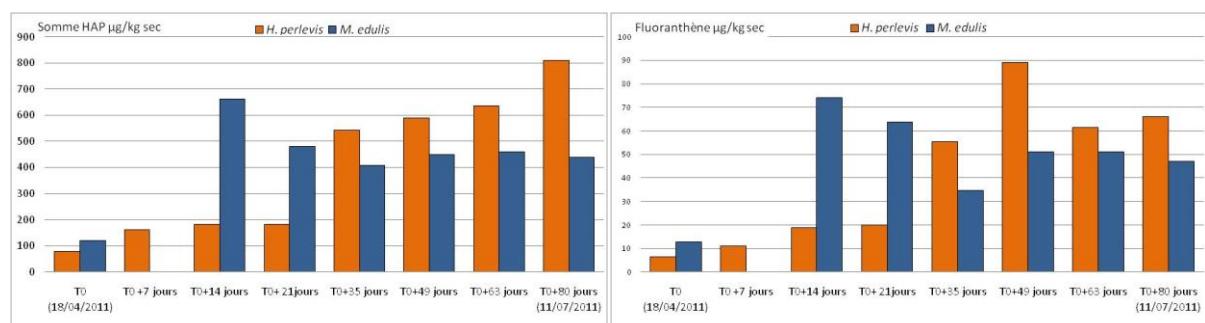


Figure 9 : Evolution sur 80 jours de la concentration en HAP et fluoranthène de *H. perlevis* et *M edulis* placés en cages dans le port de l'épi de Cherbourg.

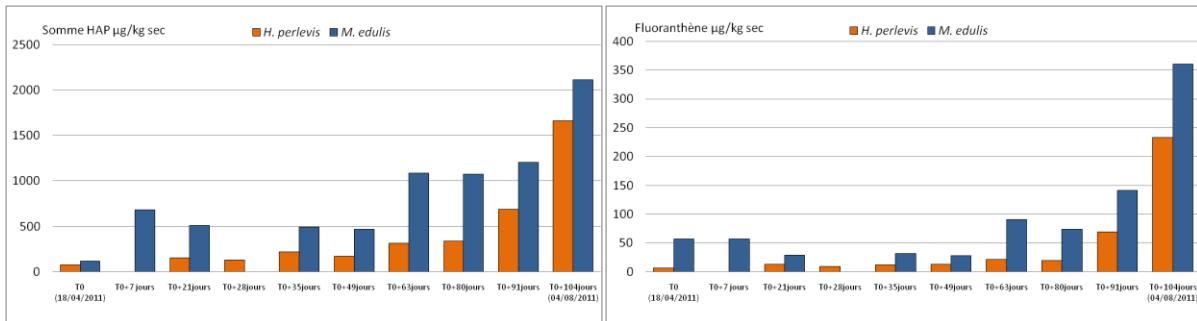


Figure 10 : Évolution sur 104 jours de la concentration en HAP et fluoranthène de *H. perlevis* et *M. edulis* placés en caging dans le bassin du commerce de Cherbourg

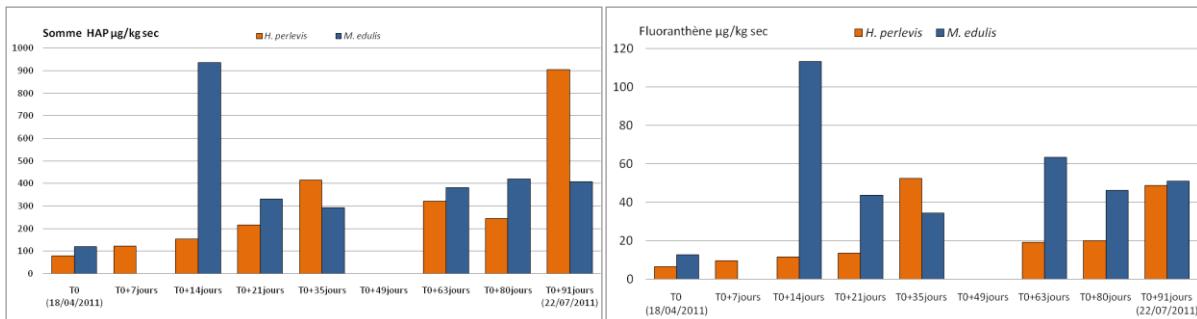


Figure 11 : Evolution sur 91 jours de la concentration en HAP et fluoranthène de *H. perlevis* et *M. edulis* placés en caging situé au niveau du ponton Q du Port de plaisance (Cherbourg).

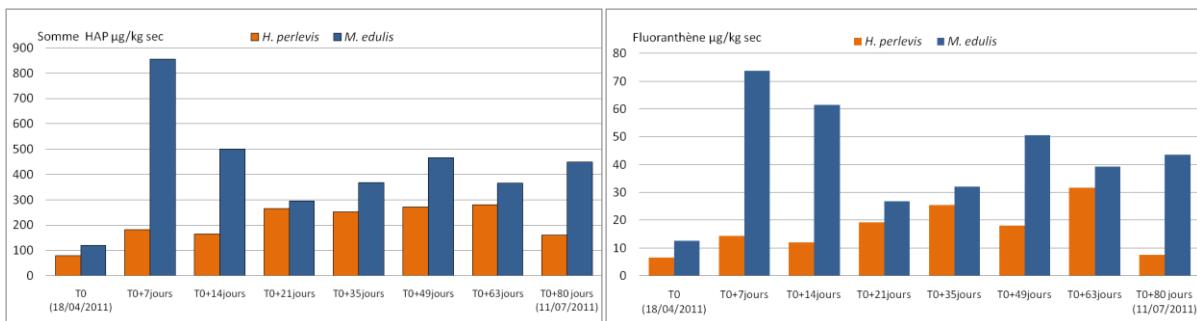


Figure 12 : Evolution sur 80 jours de la concentration en HAP et fluoranthène de *H. perlevis* et *M. edulis* placés en caging situé au niveau du ponton H du Port de plaisance (Cherbourg).

La corrélation entre les teneurs en fluoranthène et la somme des HAP(16) dans les tissus des deux espèces varie est d'un facteur compris entre 8 et 12 sur la majorité des sites d'étude.

En moyenne sur les 4 sites, la concentration en somme des HAP(16) et fluoranthène est à peine plus importante dans l'espèce *M. edulis* par rapport à l'espèce *H. perlevis*, dès le début de l'expérimentation.

Les plus faibles concentrations en somme des HAP(16) et en fluoranthène (moins de 900 mg/kg PS) sont enregistrées au niveau des pontons H, Q et du port de l'épi (pour les 2 espèces). Les plus fortes concentrations sont retrouvées en fin de période d'immersion (après 104 jours) dans le site du bassin de commerce avec plus de 2000 mg/kg PS en somme HAP dans les moules et 1600 mg/kg PS dans l'éponge.

Dans les 4 sites étudiés, les concentrations en HAP augmentent progressivement et significativement dans les 2 espèces jusqu'en fin de période d'immersion, excepté pour les moules du port de l'épi et les éponges du ponton H qui présentent respectivement un palier de concentration après 35 jours ou 21 jours. L'augmentation des concentrations reste croissante dans les 2 espèces du bassin de commerce, qui semble bien le site le plus contaminé en HAP du port.

Dans le port de l'épi (site moins contaminé), les concentrations en somme des HAP(16) et en fluoranthène atteignent des valeurs plus élevées dans les éponges que dans les moules, après 80 jours d'immersion. Dans le bassin de commerce et les pontons Q et H, les concentrations en somme des HAP(16) et en fluoranthène sont plus importantes dans les moules que dans l'éponge. Il semble que l'éponge *H. perlevis* soit plus sensible que la moule à la présence de plus faibles concentrations en HAP.

Deux pics de concentrations en HAP sont mesurées au 7^{ème} jour et 14^{ème} jour d'immersion, dans les moules, au niveau des pontons Q et H. Les mêmes fortes concentrations ne sont pas observées dans les éponges. Si l'origine de ces pics est due à un rejet ponctuel d'hydrocarbures, tels ceux rejetés dans le port de Plaisance lors du lessivage par la pluie des eaux des parkings environnants, les éponges semblent donc moins sensibles à une variation ponctuelle de la teneur en hydrocarbures dans l'eau

➤ Cas des PCB

Les figures 13 à 16 indiquent l'évolution des concentrations en somme des PCB(7) et PCB 153 dans les échantillons d'*H. perlevis* et de *M. edulis* placés dans des cages immergés dans différents sites du port de Cherbourg : le port de l'épi (figure 13), le port de commerce (figure 14), les **pontons Q (figure 15)** et **H (figure 16) du Port de plaisance**.

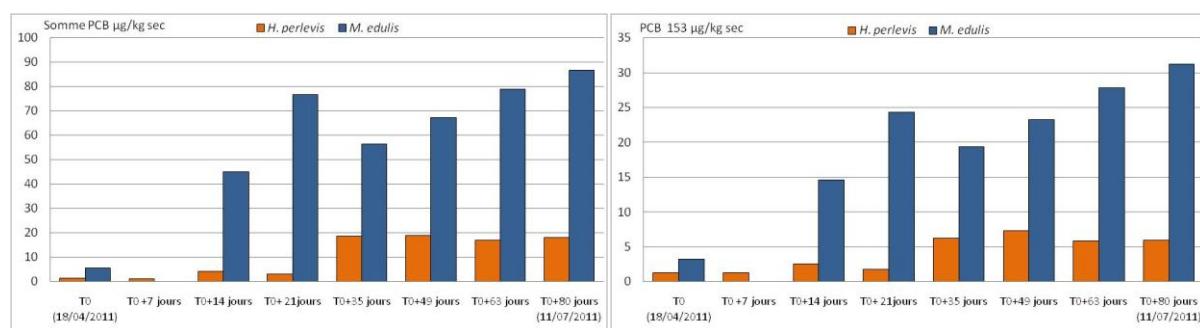


Figure 13 : Evolution sur 80 jours de la concentration en PCB et PCB 153 de *H. perlevis* et *M. edulis* placés en caging dans le port de l'épi (Cherbourg, 50).

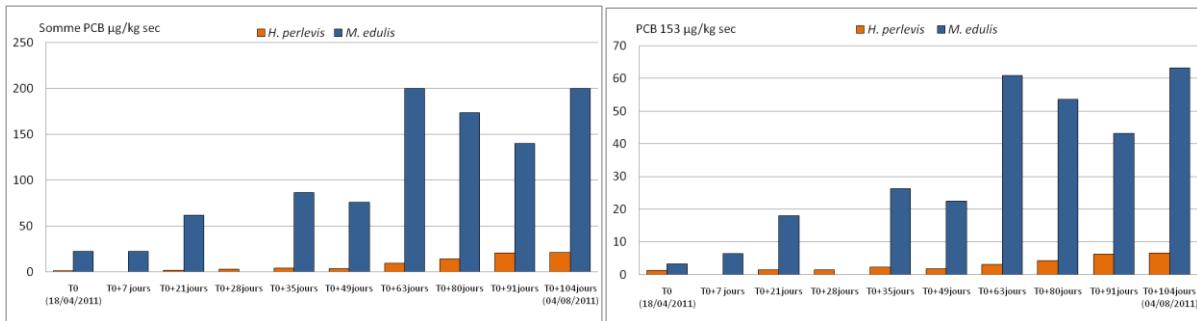


Figure 14 : Evolution sur 104 jours de la concentration en PCB et PCB 153 de *H. perlevis* et *M. edulis* placés en caging dans le bassin du commerce (Cherbourg, 50)

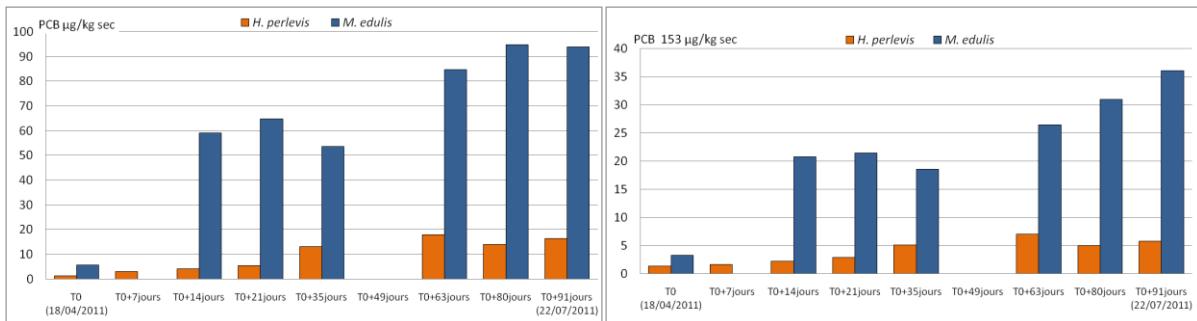


Figure 15 : Evolution sur 91 jours de la concentration en PCB et PCB 153 de *H. perlevis* et *M. edulis* placés en caging situé au niveau du ponton Q du Port de plaisance (Cherbourg)

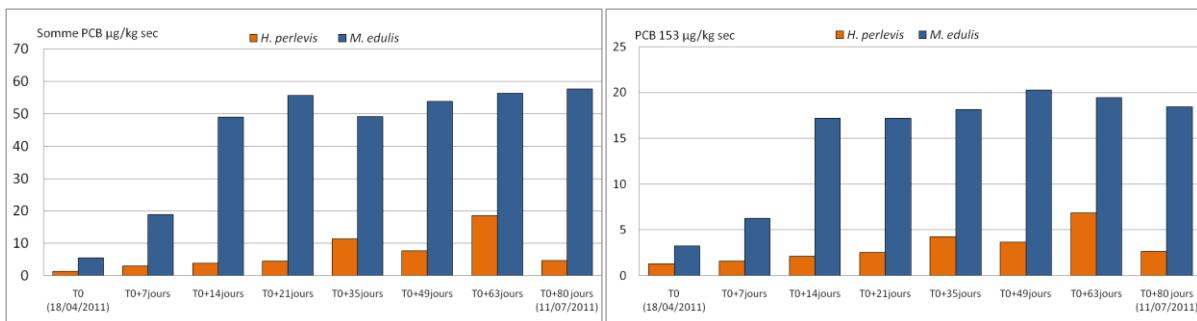


Figure 16 : Evolution sur 80 jours de la concentration en PCB et PCB 153 de *H. perlevis* et *M. edulis* placés en caging situé au niveau du ponton H du Port de plaisance (Cherbourg)

On peut observer une corrélation entre les teneurs en PCB 153 et la somme des PCB (7) dans les tissus des deux espèces varie est d'un facteur 3 sur la majorité des sites d'étude.

Comme pour les HAP, des concentrations plus faibles en somme des PCB(7) et en PCB 153 sont mesurées au niveau des pontons H, Q et au port de l'épi (avec moins de 100 mg/kg PS). Le bassin du commerce présente les valeurs les plus fortes enregistrées dans le port pouvant atteindre 200 mg/kg PS.

Au contraire des HAP, les concentrations relevées dans les 2 espèces ne sont pas similaires et la moule *M. edulis* présente des valeurs en somme des PCB(7) et en PCB 153 plus élevées d'un facteur 5 à 10 par rapport à l'éponge *H. perlevis*.

Des augmentations rapides et croissantes (d'un facteur 10 à 15) des teneurs en PCB sont observées dans la moule sur tous les sites étudiés pendant la durée d'immersion. Malgré des teneurs moins élevées dans l'éponge, cette dernière présente aussi des augmentations croissantes au cours des périodes d'immersion sur presque tous les sites. Seul, un palier en concentration est observé à partir de 35 jours d'immersion dans le port de l'épi (même observation que pour les HAP).

On peut également observer une augmentation significative de la teneur en somme des PCB(7) et en PCB 153 après 80 jours de caging sur les échantillons d'*H. perlevis* et *M. edulis*.

La concentration en PCB 153 dans les individus de l'espèce *M. edulis* augmente d'un facteur 20, et d'un facteur 6 dans l'espèce *H. perlevis*. L'augmentation de la concentration en somme de PCB (7) est d'un facteur 10 sur l'espèce *M. edulis* et d'un facteur 20 sur l'espèce *H. perlevis*.

Dès le début de l'expérimentation, la concentration en somme des PCB (7) et PCB 153 apparaît plus importante dans l'espèce *M. edulis* que dans les tissus d'*H. perlevis*. De plus, cette augmentation en PCB(7) et PCB 153 est croissante dans les moules pendant toute la période d'immersion des cages alors que ces concentrations en PCB se stabilisent dans les tissus des éponges après 91 jours d'immersion dans le port de commerce.

2.3.1.3- Mise en décontamination

→ Les HAP

La figure 17 indique l'évolution des concentrations en somme des HAP(16) et fluoranthène dans les échantillons d'*H. perlevis* et de *M. edulis* placés en décontamination après 104 et 60 jours de caging dans le bassin du commerce.

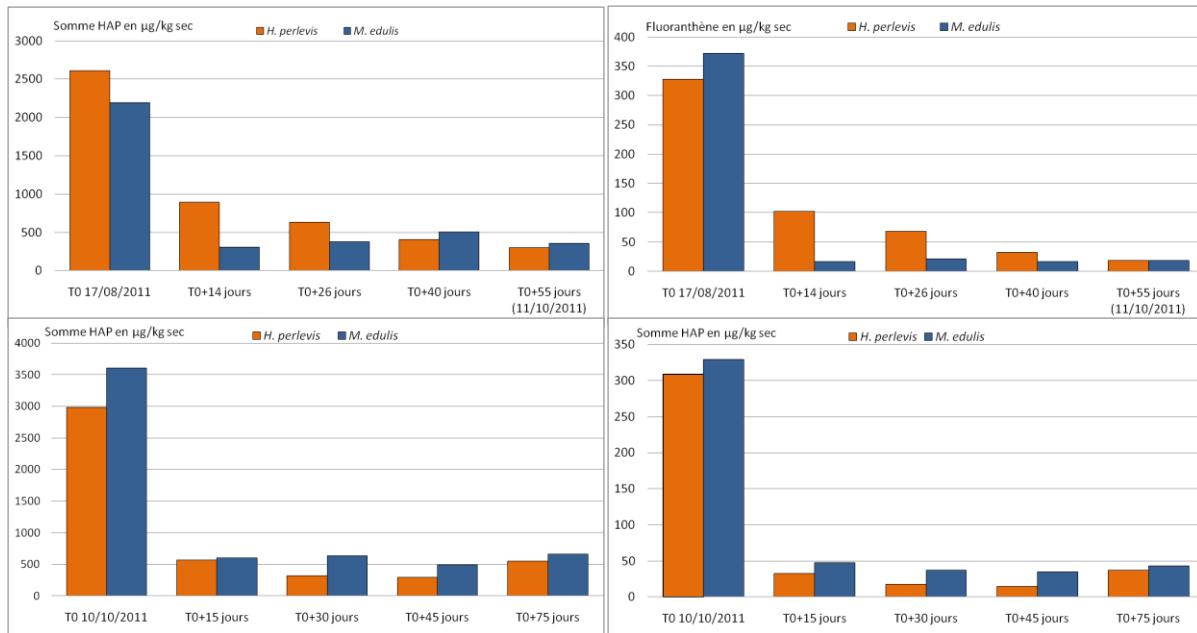


Figure 17 : Évolution des concentrations en somme HAP et fluoranthène dans *Hymeniacidon perlevis* et *Mytilus edulis* des cages immergés dans le bassin du commerce du port de Cherbourg et transplantés en milieu naturel (Blainville sur mer)- Deux expérimentations successives avec des durées de décontamination de 55 (décontamination 1) et 75 jours (décontamination 2).

On peut observer une diminution significative de la concentration en somme des HAP(16) et en fluoranthène après 55 jours de décontamination sur les échantillons d'*H. perlevis* et *M. edulis*. Cette observation est également faite pour la deuxième expérimentation (Octobre 2011). L'abattement de la concentration en somme des HAP(16) et fluoranthène varie d'un facteur 10 à 15 pour l'expérimentation après 104 jours de caging et d'un facteur 5 à 10 pour l'expérimentation après 60 jours de caging, ce facteur est observé sur les 2 espèces.

Il est intéressant d'observer que la diminution de la concentration est rapide, elle est observée dès 14 jours de décontamination sur l'espèce *H. perlevis* et sur l'espèce *M. edulis* en ce qui concerne la somme des HAP(16) et fluoranthène. Cette diminution atteint un palier pour l'espèce *M. edulis*.

Une diminution progressive est observée sur l'expérimentation du mois d'août 2011 sur l'espèce *H. perlevis*. La même observation est réalisée sur la deuxième expérimentation (octobre 2011), mais la diminution semble plus rapide (comme observée lors du suivi des métaux).

→ Les PCB

La figure 18 indique l'évolution des concentrations en somme PCB(7) et PCB 153 dans les échantillons d'*H. perlevis* et de *M. edulis* placés en décontamination après 104 jours et 60 jours de caging dans le port de commerce.

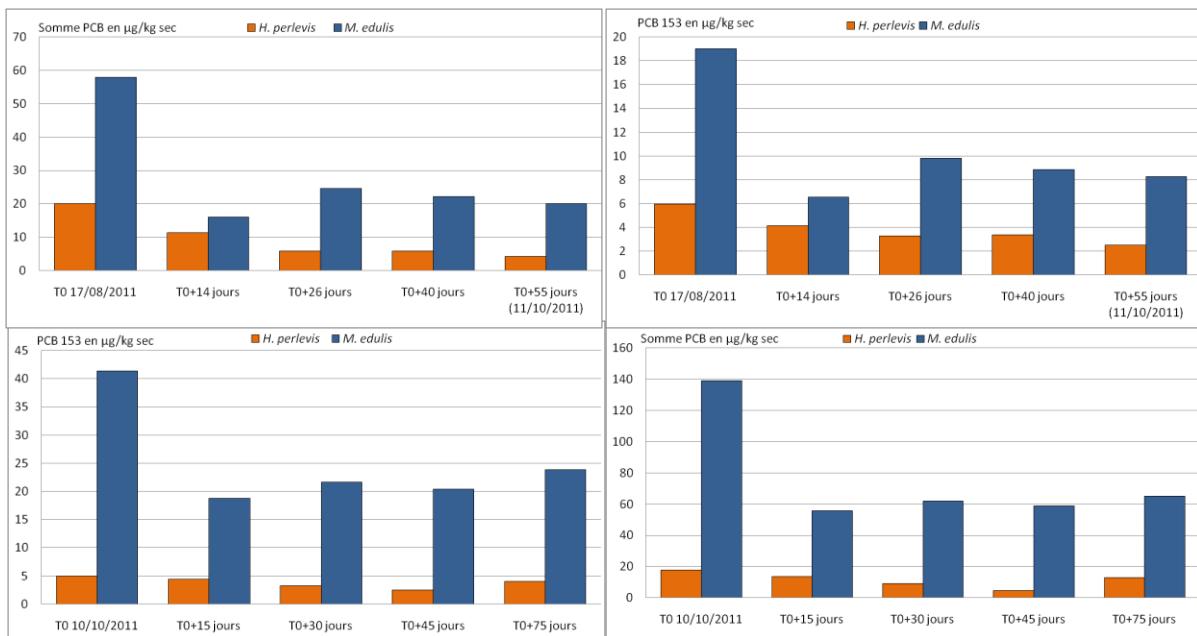


Figure 18 : Evolution des concentrations en somme PCB et PCB153 fluoranthène dans *Hymeniacidon perlevis* et *Mytilus edulis* des cages immergés dans le bassin du commerce du port de Cherbourg et transplantés en milieu naturel (Blainville sur mer)- Deux expérimentations successives avec des durées de décontamination de 55 jours (décontamination 1) et 75 jours (décontamination 2).

On peut observer une diminution significative de la concentration en somme des PCB(7) et en PCB153 après 55 jours de décontamination sur les échantillons d'*H. perlevis* et *M. edulis*. Cette observation est également faite pour la deuxième expérimentation (Octobre 2011). L'abattement de la concentration en somme des PCB(7) et PCB53 varie d'un facteur 3 pour la 1^{ère} décontamination (après 104 jours de caging) et d'un facteur 2 pour la 2^{ème} décontamination (après 60 jours de caging) pour l'espèce *M. edulis*. Pour l'espèce *H. perlevis*, l'abattement de la concentration en somme des PCB(7) varie d'un facteur 2 à 5 dans les 2 expérimentations de décontamination.

Il est intéressant d'observer que la diminution de la concentration en somme des PCB(7) et PCB153 est rapide (dès 14 jours de décontamination) sur les 2 espèces *H. perlevis* et *M. edulis*. Cette diminution atteint un palier pour l'espèce *M. edulis*.

Comme pour les HAP et les métaux, une diminution progressive des concentrations en PCB dans l'espèce *H. perlevis* est observée sur la 1^{ère} expérimentation de décontamination. Elle semble plus rapide sur la deuxième expérimentation (octobre 2011).

2.3.2- ÉTUDE EN CONDITIONS CONTROLEES

Pour mieux comprendre les mécanismes de bioconcentration et/ou bioaccumulation de l'éponge *Hymeniacidon perlevis*, des essais en laboratoire ont été initiés. Les premiers essais ont été effectués au printemps 2011 et ont consisté en l'exposition de boutures d'éponges à des différentes concentrations en zinc. En parallèle des éponges, des moules ont également subi les mêmes

expositions pour comparer le comportement de ces 2 organismes filtreurs face à cette contamination métallique.

2.3.2.1- Exposition à différentes concentrations en zinc

➤ Capacité de bioconcentration du zinc : détermination du facteur de bioconcentration FC

Le calcul des facteurs de bioconcentrations chez un organisme aquatique permet d'évaluer sa capacité à concentrer un contaminant présent dans le milieu environnant. On a donc déterminé le rapport entre la concentration moyenne (en mg/kg ps) du contaminant (zinc) mesurée dans les tissus de 12 boutures d'éponges (celles des bacs témoins) par rapport à la concentration du zinc (en mg/L) analysée dans l'eau de mer. Chaque prélèvement de bouture a donné lieu au prélèvement et au dosage conjoint de l'eau dans laquelle baignaient les boutures.

La concentration moyenne dans les tissus des 12 boutures d'éponge a atteint 879 ± 221 mg/kg PS. Cela correspond à un CV de 25 %, acceptable car démontrée au chapitre 2.2.2. comme inhérente à la spécificité individuelle des colonies et non à une variation de la contamination. La concentration moyenne dans les 12 échantillons d'eau de mer associés a été de $28,5 \pm 6,2$ mg/kg. Ces 2 moyennes nous ont permis de proposer un FC chez *H. perlevis* de l'ordre de **31000**.

A partir de ce facteur de bioconcentration, nous avons cherché à estimer les niveaux de contamination des eaux du port de Cherbourg dans lesquelles les cages ont été immergées plus de 2 mois au cours de l'expérimentation de caging (§ 2.3). Les résultats sont donnés dans le tableau 9.

$FC_{H. perlevis} = 31000$	ponton Q	Bassin du commerce	port Epi	Ponton H
[Zn] moyenne en mg/kg ps	1262	1240	1092	1496
[Zn] du milieu déduite en µg/L	41	40	35	48

Tableau 9 : Estimation du niveau de contamination en zinc des eaux du port de Cherbourg déduit du facteur de bioconcentration et des concentrations mesurées dans les tissus de l'éponge *Hymeniacidon perlevis*

Ainsi, connaissant la concentration moyenne du zinc dans les tissus des éponges immergées au niveau du ponton Q, bassin de commerce, port de l'épi et du ponton H, ce facteur de bioconcentration

nous permet de déduire que les concentrations en zinc dans la zone portuaire de Cherbourg oscillent de **35 à 48 µg/L** (tableau 9).

Des essais en laboratoire sont envisagés en 2013 pour étudier de la même façon les capacités de bioconcentration du cuivre par *H. perlevis*, afin d'estimer alors les niveaux de contamination du cuivre dans la zone portuaire.

- Suivi des concentrations en zinc dans les bioindicateurs et dans les milieux en fonction du temps de contamination et de décontamination

Les essais ont été réalisés à partir de boutures (10 fragments d'environ 15 à 20 g) d'éponge *d'Hymenacidon perlevis* prélevées en milieu naturel (St Vaast-La-Hougue) et d'un lot de cinquante moules (2 ans) de l'espèce *Mytilus edulis* récoltées à Blainville sur mer. Les échantillons ont été disposés dans des bacs contenant 40L d'eau de mer, et ont été exposées pendant 35 jours à 2 sources de contamination en zinc (sulfate de zinc et anode sacrificielle). Suivant cette période de contamination, les échantillons ont été replacés dans de l'eau de mer naturelle pendant 21 jours. Pour chaque source contaminante, quatre concentrations (5ppb, 50ppb, 500ppb et 1000ppb) ont été ajoutées à la concentration naturelle de l'eau de mer pompée dans le port des Flamands. La concentration moyenne en zinc de l'eau de mer sur la période d'essai a été de $28,5 \pm 6,2$ ppb dans les bacs contenant les éponges et de $17,9 \pm 9,2$ ppb dans les bacs contenant les moules. Le renouvellement de chaque bac a été effectué tous les 2 jours à hauteur de 50% du milieu. Un fragment d'éponge et cinq moules ont été prélevés toutes les semaines, afin de doser le zinc dans les tissus. La figure 19 décrit le schéma expérimental de la contamination des échantillons biologiques.

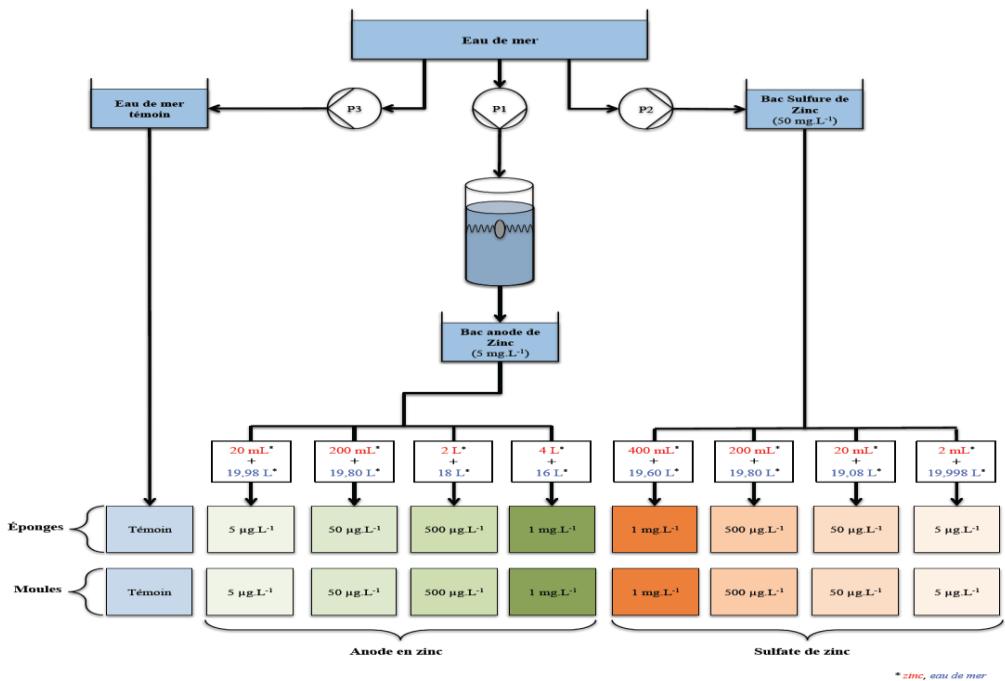


Figure 19: Dispositif expérimental destiné à la contamination de bacs contenant des boutures d'*Hymeniacidon perlevis* et de moules (*Mytilus edulis*) par 2 sources de contamination en zinc (anode sacrificielle et sel de sulfate) et sous 4 conditions de concentrations (5ppb, 50ppb, 500ppb et 1000ppb).

La figure 20 représente l'évolution des concentrations en zinc dans chacun des bacs du dispositif expérimental décrit à la figure 19, sur une période de 35 jours.

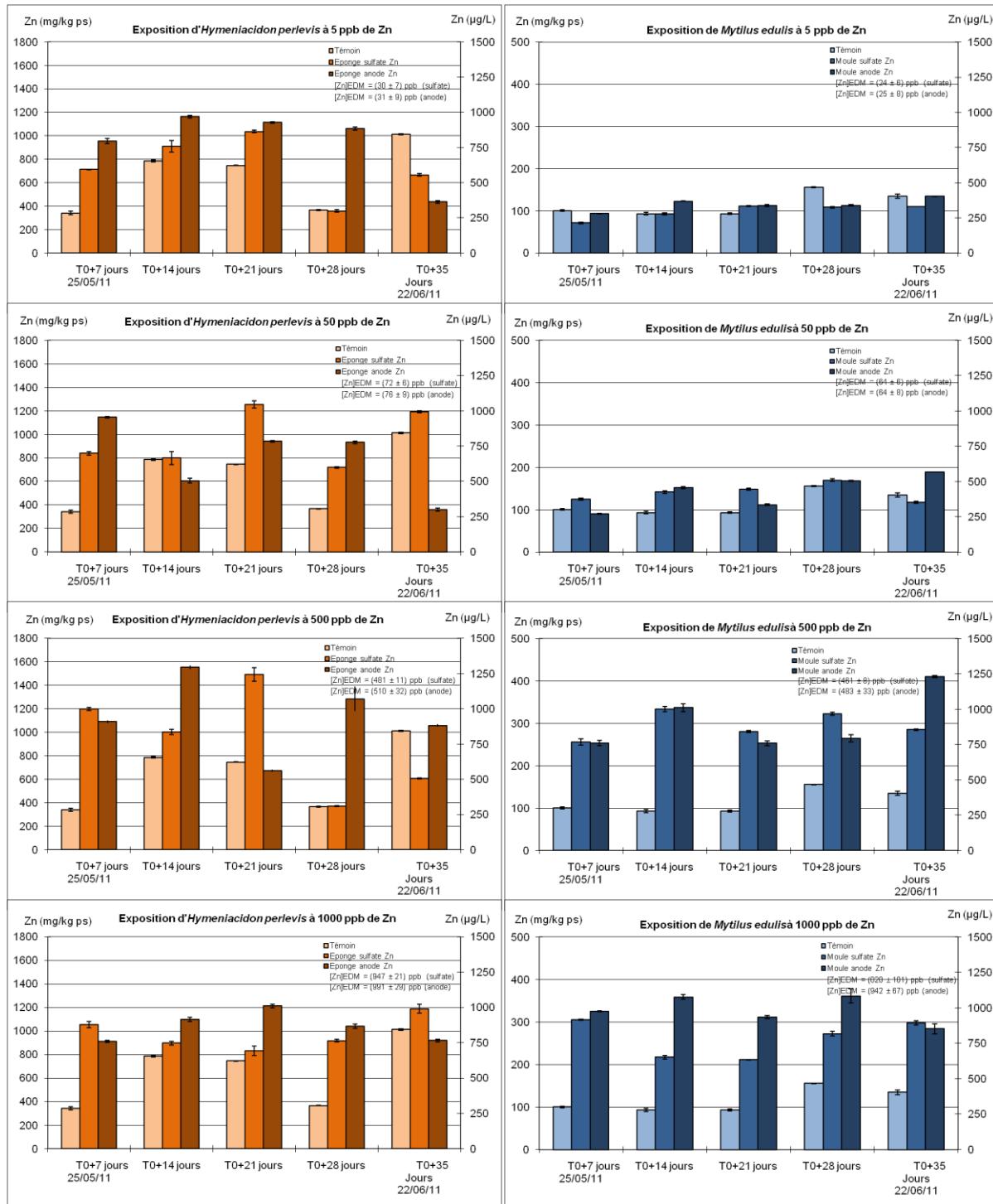


Figure 20 : Evolution des concentrations en zinc dans *Hymeniacidon perlevis* et *Mytilus edulis* contaminées pendant 1 mois par de l'eau de mer enrichies en Zn selon 2 sources de contamination (sel de sulfate et anode sacrificielle), sous 4 conditions de concentrations (5ppb, 50ppb, 500ppb et 1000ppb).

Quelle que soit la source de contamination métallique et la concentration imposée, les tissus des échantillons d'*Hymenacidon perlevis* présentent des concentrations en zinc plus élevées que les tissus des moules *Mytilus edulis*.

Les écarts de concentrations entre témoins et échantillons contaminés (*H.perlevis* et *M. edulis*) sont plus grands pour les concentrations les plus élevées (500 ppb et 1000 ppb) dans l'eau de mer. Il n'apparaît pas intéressant de travailler à des concentrations inférieures à 70 ppb (50 ppb + 20 ppb) sachant que l'eau de mer naturelle testée (origine portuaire) est déjà d'environ 20 ppb.

Pour ces 2 expositions, aucune augmentation significative des concentrations n'est observée dans les échantillons contaminés par les 2 sources de contamination durant la période des 35 jours (quelque soit l'espèce biologique).

Cette observation peut s'expliquer par la trop courte période d'exposition des échantillons aux contaminations mais sans doute plutôt une saturation rapide des éponges en zinc qui ne permet donc plus d'identifier des pics de contamination.

La figure 21 représente l'évolution des concentrations en zinc dans chacun des bacs contenant les éponges *Hymenacidon perlevis* et les moules *Mytilus edulis* pendant les 21 jours de mise en décontamination (eau de mer naturelle).

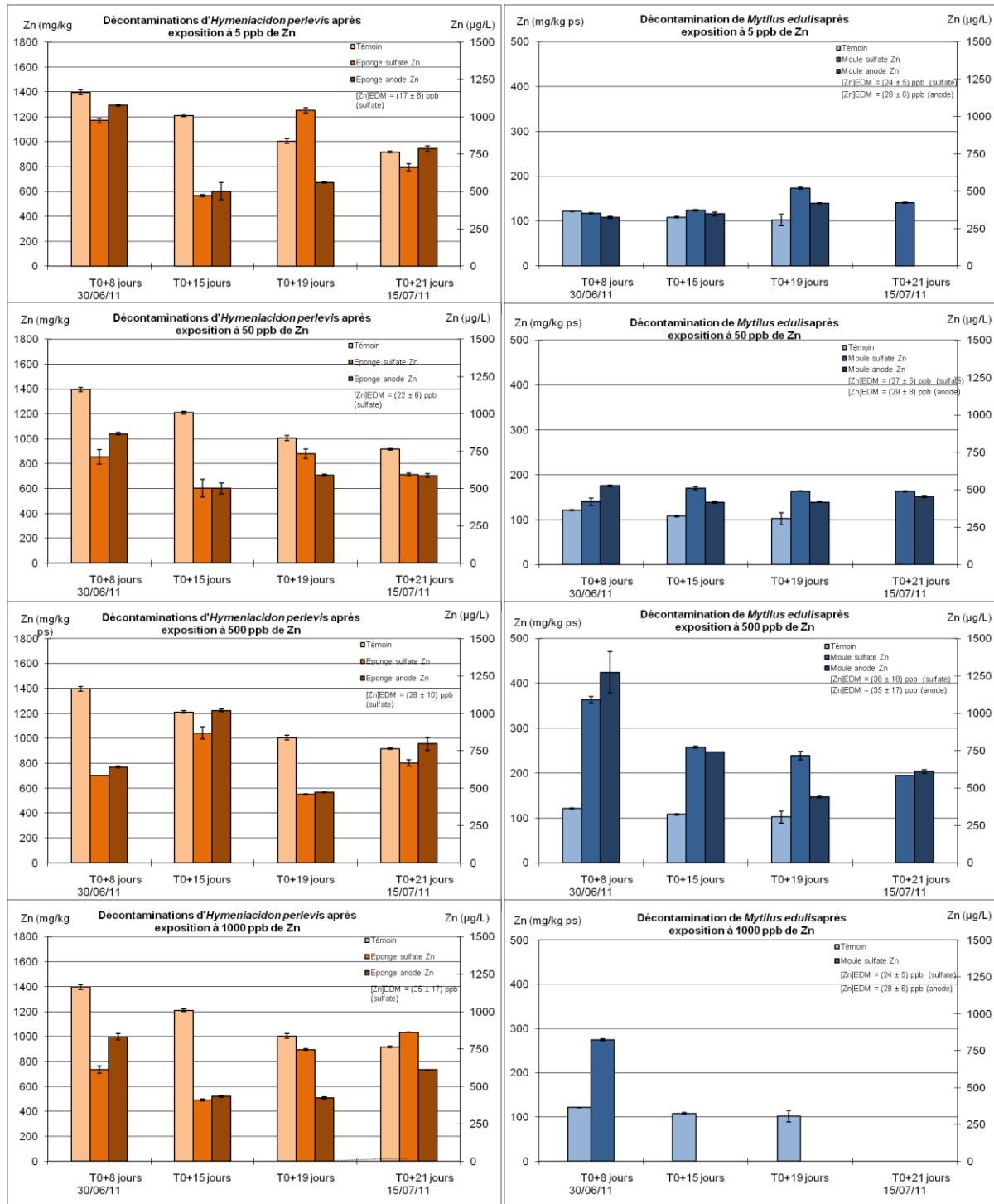


Figure 21 : Evolution des concentrations en zinc dans *Hymeniacidon perlevis* et *Mytilus edulis* pendant leur mise en décontamination pendant 1 mois dans de l'eau de mer naturelle, après exposition à 2 sources de contamination (sel de sulfate et anode sacrificielle), sous 4 conditions de concentrations (5ppb, 50ppb, 500ppb et 1000ppb).

Comme pour la période de mise en contamination, lors de la mise en décontamination des échantillons, les tissus d'*Hymeniacidon perlevis* présentent des concentrations en zinc plus élevées que les tissus des moules *Mytilus edulis*.

Après une exposition à une contamination de l'eau de 1000 ppb de zinc, les moules ont subi 100% de mortalité dans les 8 jours qui ont suivi leur mise en décontamination. Les éponges se sont maintenues pendant les 21 jours de la période de mise en décontamination. Etant donné que les résultats de l'exposition à des concentrations fortes en zinc des échantillons n'ont pas montré d'augmentation significative des concentrations dans les tissus, il n'a pas été observé de diminution significative des concentrations au cours de la mise en décontamination des 2 espèces, excepté peut-être à la condition 500 ppb dans les échantillons de moule *M. edulis*.

2.3.2.2. Exposition à différentes concentrations en HAP

Matériels et méthodes

Cinq bacs de 200 l d'eau de mer ont été utilisés. Dans chacun d'eux des boutures d'*H. perlevis* et de moules *M. edulis* provenant de Lingreville ont été disposées. Un renouvellement complet de l'eau est réalisé tous les deux jours, la température moyenne ($\pm IC95$) a été de $(18,4 \pm 0,2)^\circ C$ et la salinité de $(34,3 \pm 0,2)\%$. Dans chaque bac, un bullage assez faible a été mis en place afin de limiter l'évaporation et une pompe de circulation (500 l/h) a été immergée afin d'homogénéiser l'eau en permanence. Les animaux ont été nourris à chaque renouvellement avec un mélange de microalgues congelées. Les bacs ont été recouverts d'une plaque en polystyrène flottant à la surface afin de limiter la perte en HAP par évaporation. Un film noir occultant en plastique a recouvert l'ensemble.

Un mélange de 50% de gas-oil et 50 % d'essence (super sans plomb 98) est utilisé pour contaminer l'eau des bacs.

Témoin : Pas de contaminant

Bac 1 : 0,1 ml de mélange/bac

Bac 2 : 1 ml de mélange/bac

Bac 3 : 10 ml de mélange/bac

Bac 4 : 100 ml de mélange/bac

Composés	concentration en ng.mL ⁻¹ (hexane)		
	Essence	Gazoil	Mélange
naphtalène	7312,39	1119,18	4215,79
acénaphtylène	33,58	56,44	45,01
acénaphtène	86,76	127,65	107,21
fluorène	235,09	766,43	500,76
anthracène	110,70	539,70	325,20
phénanthrène	93,10	29,49	61,30
fluoranthène	11,48	0,00	5,74
pyrène	28,36	55,56	41,96
benzo(a)anthracène	11,78	9,68	10,73
benzo(d)fluoranthène	5,71	2,03	3,87
benzo(k)fluoranthène	3,05	0,00	1,53
benzo(a)pyrène	17,13	0,00	8,57
indéno(1,2,3-c,d)pyrène	8,82	3,52	6,17
dibenzo(a,h)anthracène	2,98	0,00	1,49
benzo(g,h,i)pérylène	8,33	1,95	5,14

Tableau 10 : Composition des 3 hydrocarbures introduits dans les bacs

Une analyse d'eau a été réalisée après 24 et 48 h. L'analyse à T0 a été abandonnée car l'homogénéisation du bac s'est révélée relativement longue.

Un prélèvement de moules (80) et d'éponges (env. 50 g) a été réalisé chaque semaine durant 4 semaine. Après cette période, l'expérimentation s'est poursuivie durant 4 semaines sans ajout du mélange pour observer la décontamination.

Les expérimentations ont été réalisées au mois de mai et juin 2011.

Afin de limiter les coûts analytiques, seules les analyses des prélèvement après 4 semaines ont été réalisées dans un premier temps.

Résultats

Les analyses d'eau montrent que seulement 4 composés sont retrouvés en quantité suffisante pour être mesurés : naphtalène, phénanthrène, fluorène, acénaphthène. Ces composés sont retrouvés dans les deux concentrations testées les plus élevées (bac 3 & 4). L'anthracène, bien que présent dans le mélange a des concentrations élevées n'est pas retrouvé dans l'eau après 24 h. Les concentrations mesurées dans l'eau sont du même ordre de grandeur que le calcul théorique.

Dans le bac 4 où la concentration est la plus élevé, les moules meurent après une dizaine de jours d'expérimentation, puis les éponges après une quinzaine de jours.

Les résultats présentés ci-dessous correspondent uniquement aux concentrations mesurées après 4 semaines d'exposition dans les éponges et les moules.

La figure 22 indique l'évolution des concentrations en somme des HAP(16) et fluoranthène dans les échantillons placés dans des milieux à diverses concentrations après 4 semaines d'immersion.

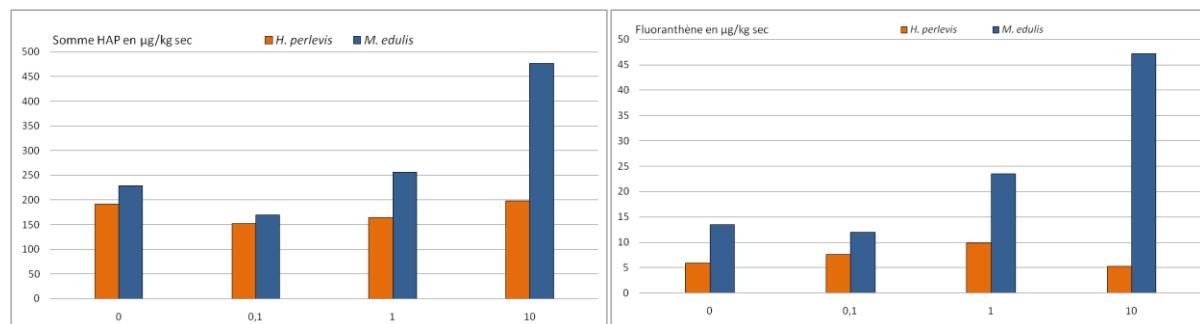


Figure 22 : Évolution après 28 jours de la concentration en HAP et fluoranthène de *H. perlevis* et *M. edulis* placés en milieu contrôlé à diverses concentrations d'un mélange Essence/Gas-oil (ml mélange/bac).

Les concentrations mesurées montrent une corrélation entre les teneurs en fluoranthène et la somme des HAP (16) d'un facteur d'environ 10 sur l'espèce *M. edulis* et un facteur d'environ 20 sur l'espèce *H. perlevis*.

La somme des concentrations en HAP(16) et en fluoranthène augmente significativement après 28 jours en milieu contrôlé sur les échantillons *M. edulis* à partir du milieu contaminé à 1 µg/l.

L'augmentation de la concentration en fluoranthène est d'un facteur 2 sur l'espèce *M. edulis* pour le milieu contrôlé à 1 µg/l et d'un facteur 4 pour le milieu contrôlé à 10 µg/l

Par contre, on n'observe aucune augmentation significative de la teneur en somme des HAP(16) et en fluoranthène après 28 jours en milieu contrôlé sur les échantillons *H. perlevis*. Comme pour les essais d'exposition en milieu contrôlé du zinc, l'expérimentation n'a pas été menée sur une période assez longue pour pouvoir observer une augmentation significative des concentrations en HAP.

2.4- ETUDE DE LA STABULATION ET DE LA CULTURE D'*HYMENIACIDON PERLEVIS* EN CONDITIONS CONTROLEES

Hymencidon perlevis est présente dans de nombreux secteurs sur le littoral Bas-Normand et les quantités présentes sur l'estran peuvent parfois être très abondantes. Les secteurs ostréicoles de Lingreville, Agon Coutainville, ou Blainville sur mer permettent la récolte de belles boutures permettant l'utilisation en caging. D'autres secteurs dans le Nord Cotentin (Collignon) ou la côte Est du Cotentin (Saint Vaast la Hougue) montrent également des quantités intéressantes. Toutefois, la qualité et la quantité de ces populations naturelles varient au cours de l'année. D'autre part, l'utilisation de la spongiiculture permettra de transplanter l'espèce cible sur les sites d'étude et d'avoir des résultats comparables. En effet, pour pouvoir bien interpréter les niveaux de contamination à l'échelle régionale, voire même nationale, il est préférable d'utiliser une même espèce d'éponge standardisée.

Les différents essais d'élevage réalisés en 2010 dans des conditions expérimentales assez variées ont montré que l'apport d'aliment entraîne une croissance rapide de la bouture très visible par la formation d'« expansions » pouvant atteindre plusieurs centimètres en quelques semaines. Par contre, la biomasse de la bouture ne semble pas évoluer. Après quelques semaines, une dégradation des boutures est observée quasiment systématiquement montrant une carence ou un déséquilibre dans la croissance. Sur plaque (verre ou béton), il semble que les croissances soient meilleures que sur fil, mais la même dégradation est observée par la suite.

Les différents aliments testés n'ont donc pas permis d'obtenir des croissances durables. Toutefois, on peut noter que le nourrissage par les bactéries lactiques entraîne davantage de dégradation des boutures que le Marine Snow®, cet aliment ayant cependant comme inconvénient principal d'être très coûteux.

Les essais réalisés en mer semblent montrer de meilleurs résultats mais les croissances observées sont variables en fonction de la saison. En hiver, les boutures ne présentent pas de croissance mais plutôt une régression alors qu'au printemps la majorité des boutures augmente en poids. Toutefois, des

boutures placées durant une longue période sont « colonisées» par des ascidies ce qui rend difficile leur utilisation lors des opérations de caging.

Les expérimentations menées en 2011-2012 ont eu pour objectifs d'évaluer les différents facteurs pouvant être limitants lors de la croissance d'*Hymeniacidon perlevis* : la température, la lumière (photopériode et longueur d'onde), le régime alimentaire, les supports d'élevage, l'hydrodynamisme.

Les éléments relatifs aux matériels et méthodes utilisés, ainsi que les résultats de ces différentes expérimentations, sont développés en **annexe 20**.

Dans le milieu naturel, *Hymeniacidon perlevis* vit principalement sur l'estran où les conditions de température et de salinité sont très variables. En effet, si la température de l'eau de mer en Basse Normandie varie d'environ 6°C l'hiver à 20°C l'été, les éponges peuvent subir des températures extrêmes en hiver et en été lors des exondations. De même, lors de forte précipitations la salinité peut être fortement réduite. Il en va de même pour la lumière ; *H. perlevis* est observée souvent au sol sans aucun ombrage permettant de la protéger des rayons directs du soleil, notamment en été. Mais elle résiste aussi à de faibles intensités lumineuses en morte eau où elle n'est pas exondée durant plusieurs jours dans des eaux souvent turbides. Ceci indique donc que cette espèce est particulièrement tolérante à la variation des paramètres physico-chimiques et assez résistante. Pourtant, lors du stockage de boutures ou lors des expérimentations de croissance, il n'est pas rare d'observer des mortalités massives. Ainsi, d'autres facteurs ont une importance capitale. Il est reconnu que l'étape de prélèvement dans le milieu naturel ainsi que le transport doivent être réalisés dans des conditions satisfaisantes. Au-delà de la santé de l'éponge, il s'avère que c'est également la santé des organismes associés qu'il faut prendre en compte. Les éponges prélevées sont souvent habitées de petits crustacés, de vers, d'algues, dont la mort et la dégradation entraînent la dégradation de l'éponge. Les boutures doivent alors être saines et exemptes autant que possible de faune ou de flore. Ces précautions permettent souvent de maintenir les boutures mais il est généralement constaté un amaigrissement. Cela pourrait suggérer que l'apport alimentaire proposé dans cette étude n'est pas adapté aux éponges.

L'objectif des expérimentations réalisées étaient d'évaluer et d'optimiser les paramètres de la croissance. Or dans la quasi-totalité des essais réalisés, une croissance est souvent observée durant une courte période allant de 15 jours à 1 mois puis la taille des éponges régresse. Les études traitant de l'élevage des éponges sont nombreuses mais pour la plupart non spécifiques à *H. perlevis*. Celles liées à cette espèce courent sur une période assez courte, ne dépassant pas 1 mois.

Les résultats obtenus sont alors parfois contradictoires ou difficiles à interpréter. L'expérimentation menée sur la température de l'eau montre une décroissance plus rapide pour les températures les plus hautes (16 - 20°C) alors qu'elle est faible lorsque les températures sont de 8 ou 12°C. Cela ne signifie pas qu'il est préférable d'élever les éponges à basse température mais plutôt que l'activité des éponges est plus importante (dépense énergétique, besoins nutritifs, besoins en O₂) à 16 ou 20°C ce qui induit une augmentation de la vitesse de décroissance. Les observations de terrain semblent

indiquer une croissance plus importante au printemps (avril-mai) et en automne (septembre-octobre) où les températures sont plutôt de l'ordre de 12-16°C mais d'autres paramètres, telle que l'alimentation, la reproduction doivent être prise en compte.

Les bactéries phototrophes symbiontes des éponges amènent à positionner les porifères dans une fonction double de producteurs primaires, mais également de consommateurs primaires de par leur activité de filtration. Chez certaines espèces, le rôle des bactéries est prédominant pour assurer leur nutrition alors que d'autres se nourrissent principalement des fines particules de 0.1 à 1.5µm en suspension qu'elles filtrent. Partant de ce principe, des expérimentations ont été réalisées en fournissant des sels nutritifs pour alimenter les bactéries avec un enrichissement ou non en silice pour constituer les spicules, tandis que d'autres expérimentations privilégièrent les apports alimentaires. Les résultats sont toutefois difficiles à interpréter car tous les régimes conduisent finalement à une perte de poids. Toutefois, l'ajout de silicate semble être positif dans la croissance (1^{ère} expérimentation) ; l'apport de sels nutritifs seul (sans microalgues) semble être moins concluant, laissant supposer l'importance des apports en MOP. Les expérimentations testant le rôle de la lumière vont dans le même sens puisqu'il ne semble pas y avoir de différence entre toutes les qualités de lumière testée, les boutures cultivées à l'obscurité ne maigrissant pas plus vite que les boutures placées à la lumière. Il semble donc qu'un facteur prédomine sur tous les autres. L'expérimentation réalisée en circuit ouvert semble ouvrir une piste. Comme lors des autres expérimentations, la croissance est importante durant le premier mois ; même si on constate ensuite une régression, on assiste à terme à une reprise. L'obtention de belles boutures en flux ouvert permanent amène donc à penser qu'un milieu confiné est moins favorable à la survie des éponges. Certaines molécules produites par ces organismes dans le but de repousser les prédateurs ou pour conquérir du territoire en empêchant la colonisation d'autres espèces sur un support, ne pourrait-il pas avoir aussi la conséquence perverse de provoquer une forme d'auto-intoxication des tissus des éponges lorsqu'elles sont maintenues en circuit fermé ? De nouvelles expérimentations seront donc nécessaires afin de valider ou d'infirmier cette hypothèse.

3- EVALUATION DU NIVEAU DE CONTAMINATION D'*H.PERLEVIS* SUR LA COTE BAS-NORMANDE

3.1- SUIVI MENSUEL DE LA CONTAMINATION DES POPULATIONS NATURELLES D'*H.PERLEVIS* SUR DEUX SITES

3.1.1. MATERIELS ET METHODES

Le suivi mensuel a été réalisé du mois de janvier 2011 à février 2012 sur deux sites : Cherbourg/Collignon et Lingreville.

Site	Espèce prélevée	Point de prélèvement	Positionnement	Précision
Cherbourg	<i>Hymeniacidon perlevis</i> (colonies sauvages)	Plage de Collignon	1°34'26" W 49°39'26" N	50 m
	<i>Mytilus edulis</i> (moules sauvages)	Port de plaisance (Ponton Q)	1°37'12 " W 49°38'45" N	10 m
		Port de plaisance (Ponton essence)	1°37'24" W 49°38'44"N	10 m
Lingreville	<i>Hymeniacidon perlevis</i> (colonies sauvages)	Secteur mytilicole	1°34'59" W 48°57'4"N	300 m
	<i>Mytilus edulis</i> (moules de bouchot)	Secteur mytilicole	1°34'58"W 48°57'0"N	50 m

Tableau 10 : Site des points de prélèvements des moules et des éponges

Chaque mois, une vingtaine de moules de 60 à 80 mm ont été prélevées sous les pontons du port de Cherbourg. Une cinquantaine de moules de 40-50 mm ont été également prélevées au niveau des bouchots du secteur de Lingreville. Les moules ont été rincées puis stockées au congélateur (-20°C) avant d'être ouvertes à l'aide d'un scalpel. L'ensemble de la chair a été lyophilisé puis broyé.

De même, une masse d'environ 300 g de l'éponge *H. perlevis* a été prélevée sur chaque site. Les éponges ont été nettoyées de leurs impuretés (sable, gravier, algues...) à l'aide d'eau distillée, puis lyophilisées et broyées.

Chaque échantillon fait l'objet d'une analyse de différents contaminants (métalliques - Cu, Zn, Cd- ; organiques - HAP, PCB -) selon les méthodes décrites dans les chapitres précédents, et leur teneur en lipides a également été estimée.

3.1.2. SUIVI MENSUEL DE LA CONTAMINATION EN METAUX Zn, Cu ET Cd

Les niveaux de contamination entre les moules et les éponges sauvages présentes sur le site de Lingreville, peu anthropisé, ont tout d'abord été recherchés pour 3 métaux, le zinc, le cuivre et le

cadmium. Les moules ont été collectées sur les tables ostréicoles situées à proximité des populations naturelles d'éponges fixées sur les rochers. Les résultats sont présentés sur la figure 23, ci-dessous.

Les concentrations en zinc, cuivre et cadmium mesurées dans les boutures naturelles d'*H. perlevis* et de la moule *M. edulis* montrent des différences. Comme constaté pendant les essais de caging, *H. perlevis* présente des concentrations plus importantes en métaux que la moule, avec des rapports de concentrations moyens entre *H. perlevis* et *M. edulis* (Hp/Me) différents en fonction du métal : Hp/Me(Zn) = **19 ± 4** ; Hp/Me (Cu) = **1,9 ± 0,4** et Hp/Me (Cd) = **3,0 ± 1,3**. On retrouve les mêmes rapports de concentrations que ceux donnés par les résultats des expérimentations de caging (§ 2.3.1).

Mais la façon dont les métaux s'accumulent dans les éponges varie de l'un à l'autre (Berthet *et al.*, 2005). Ainsi, le zinc est un fort inducteur de la synthèse des métallothionéines sur lesquels les métaux se fixent mais il se lie peu à ces protéines, ayant tendance à « céder sa place » à d'autres métaux tel le cuivre ou le cadmium. Le zinc s'accumule ainsi dans le cytosol si bien que sa régulation et son épuration peuvent alors être plus importantes que celles d'autres métaux.

Les différences observées dans les rapports de contaminations entre les deux espèces selon le métal considéré dépendent donc en partie du comportement de chaque métal dans chacune des deux espèces biologiques. De plus, lors de la reproduction la conversion des réserves somatiques en gamètes s'accompagne du déplacement des contaminants vers la gonade. Ce phénomène est plus marqué chez les moules que chez les éponges car ces dernières sont dépourvues de tissus gonadiques, les cellules sexuelles étant réparties de façon assez homogène dans l'ensemble du mésohyle. Les bivalves sont donc plus perturbés au cours de l'année par les processus liés à la reproduction sexuée que ne le sont les éponges.

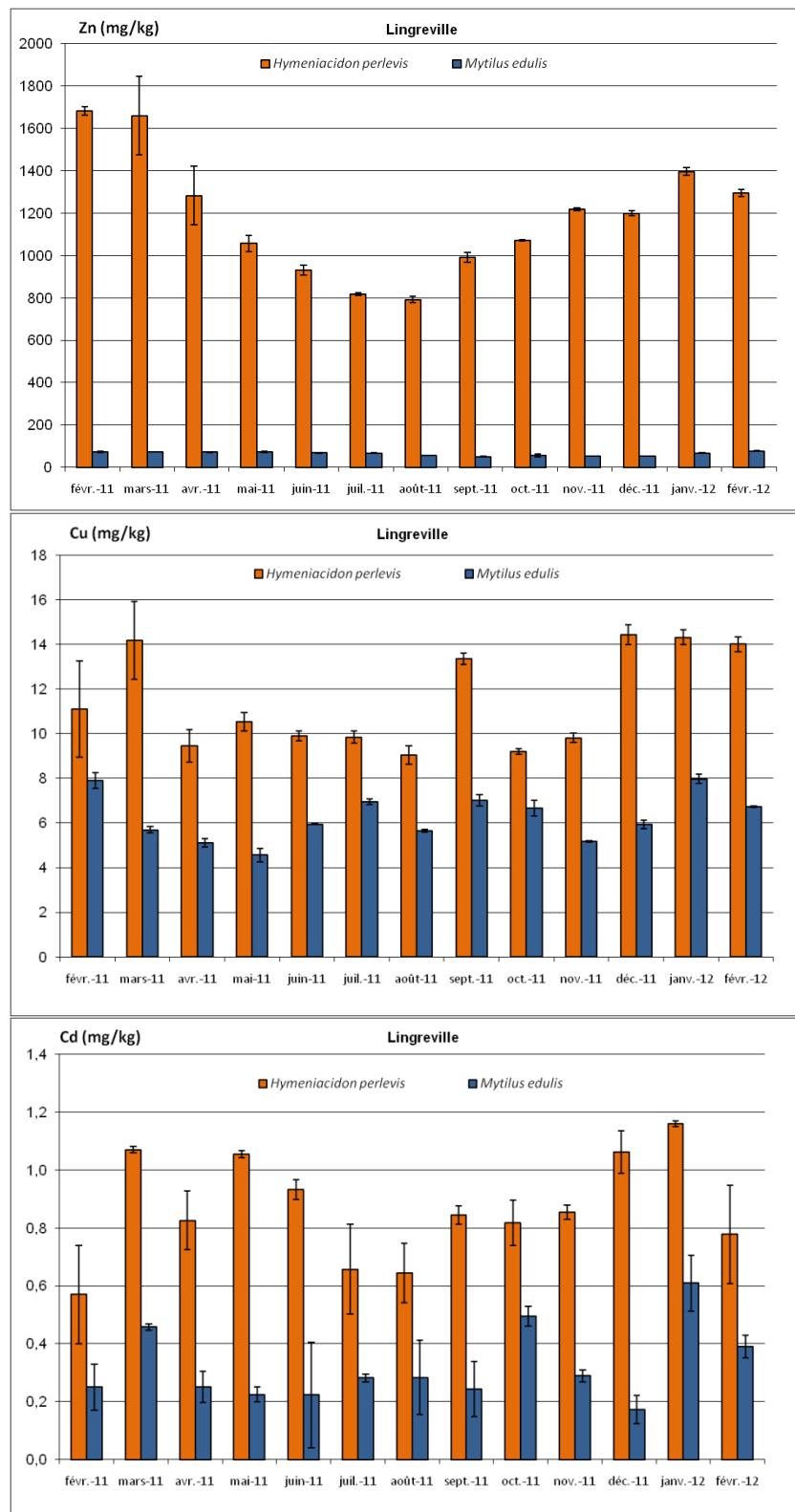


Figure 23 : Concentrations en Zn, Cu et Cd obtenus sur les échantillons d'*Hymeniacidon perlevis* et *Mytilus edulis* prélevés tous les mois entre janvier 2011 et février 2012, sur le site de Lingreville

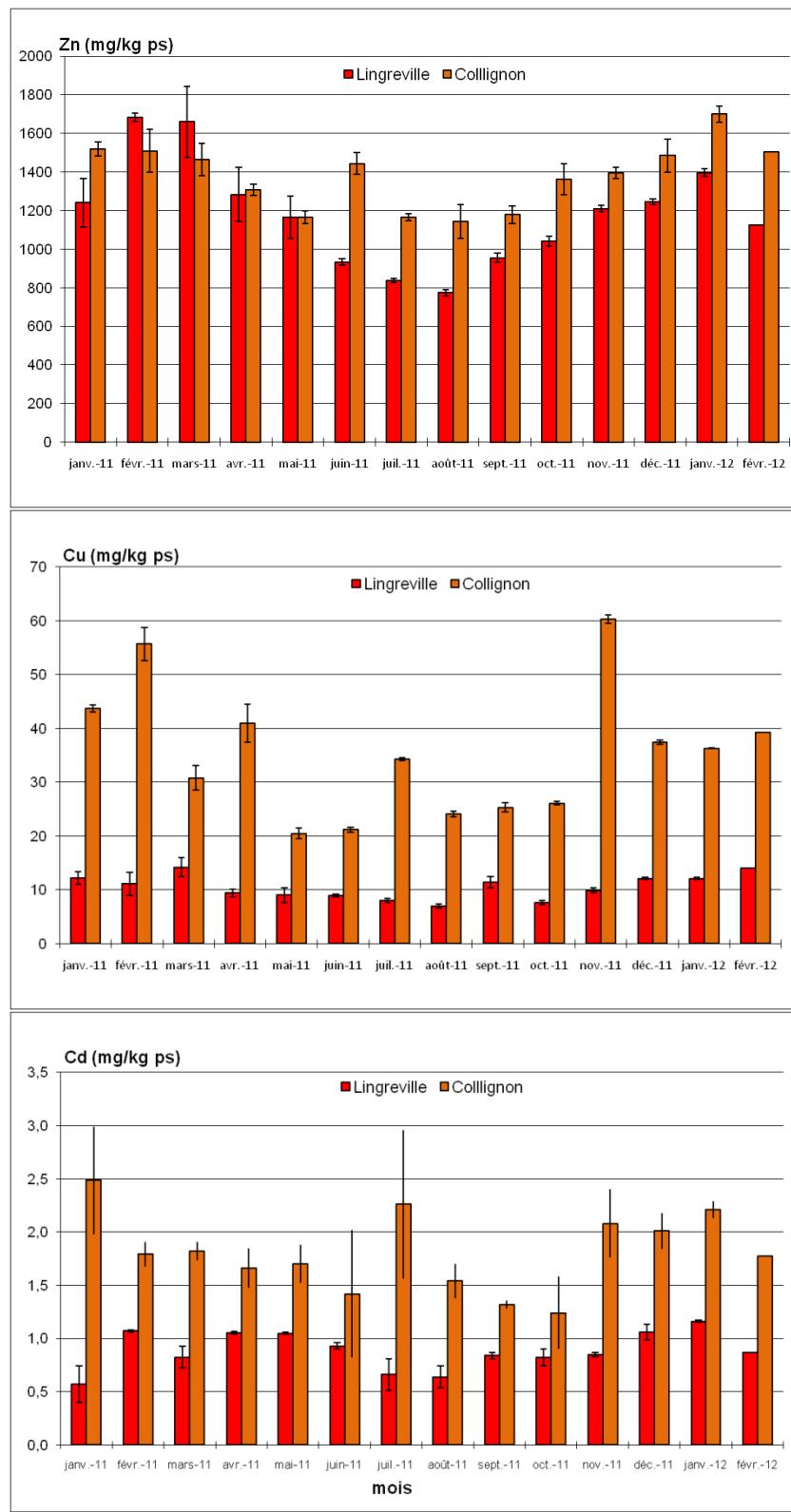


Figure 24 : Concentrations en Zn, Cu et Cd obtenus sur les échantillons d'*Hymeniacidon perlevis* prélevés tous les mois entre janvier 2011 et février 2012, sur les sites de Lingreville et de Collignon

Sur la figure 24 ci-dessus apparaissent les évolutions comparées des concentrations en zinc, cuivre et cadmium mesurées dans les populations naturelles de l'éponge *Hymeniacidon perlevis* prélevées mensuellement sur le site fortement anthropisé de Collignon, et celui plus naturel de Lingreville, entre janvier 2011 et février 2012.

Excepté pour le zinc, les résultats en cuivre et en cadmium montrent des différences de concentrations entre les 2 sites, avec des valeurs plus élevées sur le site de Collignon.

Une différence de concentrations en fonction des mois de l'année semble exister. Cette variabilité saisonnière est beaucoup plus marquée pour le zinc. En effet, de plus faibles concentrations (800 mg/kg ps) sont mesurées en été et de plus importantes (environ 1600 mg/kg ps) sont relevées en hiver. L'augmentation et la diminution progressives des valeurs en fonction de l'année peuvent être associées à la reproduction asexuée de l'éponge *H. perlevis* car les colonies croissent en taille pendant l'été puis régresse et se fragmente en hiver (Burton, 1949a in Stone, 1970a). La cyclicité de la croissance des colonies pourrait entraîner des phénomènes de dilution du contaminant dans les tissus en croissance, puis de concentration dans les tissus en régression.

De plus la relative constance des concentrations en zinc, quelque soit le site d'étude, pourrait correspondre à une régulation du métal lorsqu'il atteint une certaine concentration dans le cytosol, tel qu'expliqué précédemment dans ce chapitre. Des recherches complémentaires seront nécessaires pour comprendre ce phénomène.

Le cuivre et le cadmium varient de façon plus marquée sur le site de Collignon par rapport aux données recueillies à Lingreville. Ainsi, l'influence des activités maritimes dans la rade semble être exprimée au travers des niveaux de contamination observés, ce qui amène par exemple à supposer des rejets plus importants de métaux à certains moments de l'année comme du cuivre en novembre 2011 et du cadmium en juillet 2011.

Les moules sauvages étant absentes du site de Collignon, il nous a cependant semblé intéressant de comparer la concentration des contaminants dans les tissus des moules sauvages fixées dans des zones diversement contaminées par les contaminants métalliques et organiques. C'est pourquoi nous avons prélevé tous les mois deux lots de moules *Mytilus edulis* dans le port de Cherbourg, l'un situé sous le ponton où l'essence est délivrée aux bateaux et l'autre beaucoup plus éloigné de cette station, sous le ponton Q

Les concentrations en zinc, cuivre et cadmium ont été mesurées et comparées à celles des moules du site de Lingreville. Les résultats sont reportés sur la figure 25.

Les concentrations en zinc, cuivre et cadmium mesurées dans les populations naturelles de moules de Lingreville sont beaucoup plus faibles que celles mesurées dans les moules du port de Cherbourg. Cette différence est essentiellement liée à la différence d'âge entre les individus. En effet, les moules collectées sur Lingreville sont âgées de 2 à 3 ans alors que les moules prélevées *in-situ* (en sélectionnant les plus petites) sont plus âgées (5 à 6 ans en moyenne). Les organismes plus âgés des populations naturelles du port présentent alors des concentrations plus importantes en métaux.

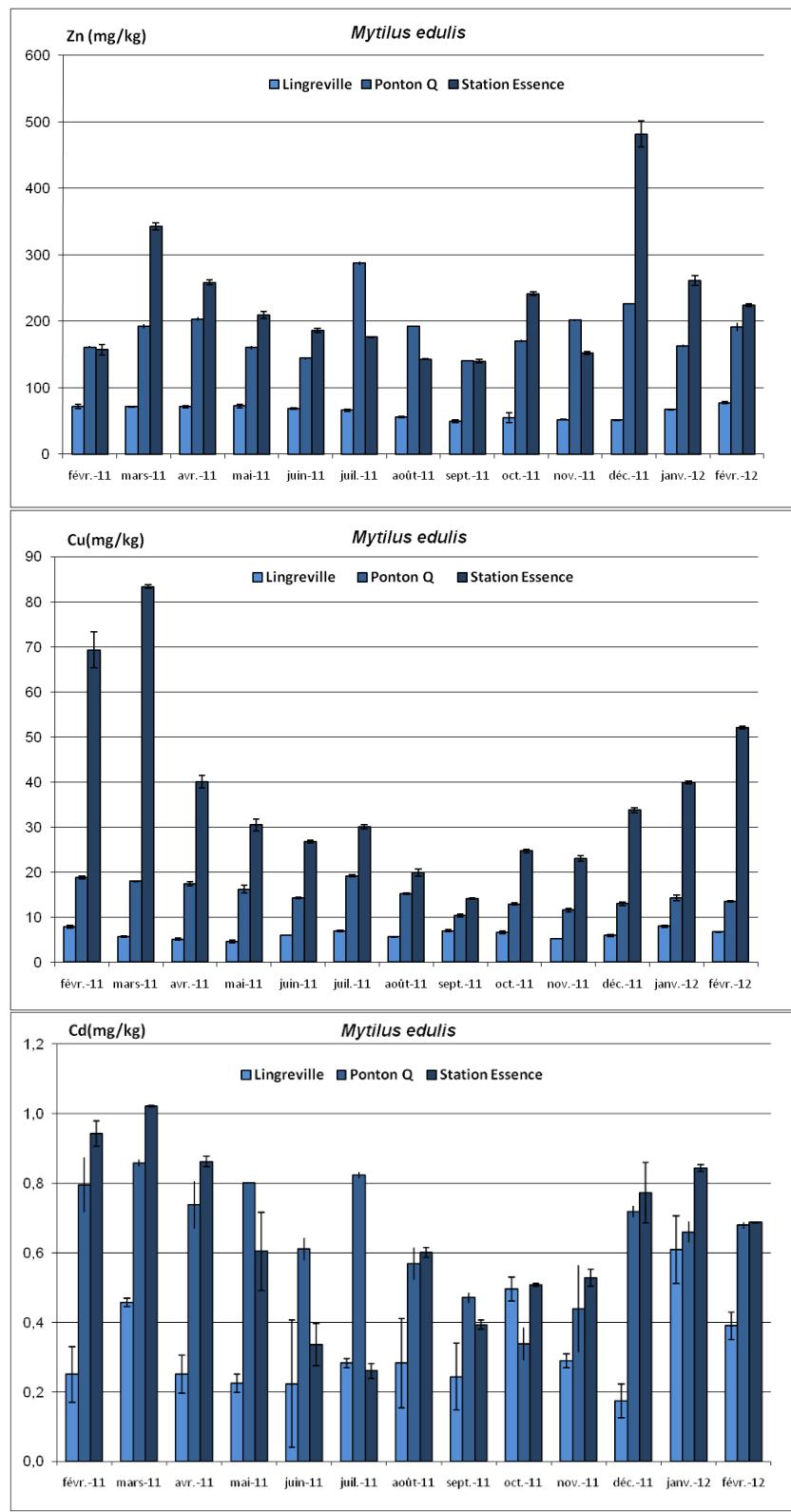


Figure 25 : Concentrations en Zn, Cu et Cd obtenus sur les échantillons de *Mytilus edulis* prélevés tous les mois entre janvier 2011 et février 2012, sur les sites de Lingreville et 2 points du port de plaisance de Cherbourg (Ponton Q et Station Essence)

Excepté une différence de concentrations sur le cuivre, les moules du ponton Q et de la station E présentent des concentrations en zinc et en cadmium qui sont relativement du même ordre de grandeur. Le cuivre ayant été identifié comme un élément métallique contaminant le port, il n'est pas surprenant de trouver une source à l'origine d'une contamination qui serait localisée à proximité de la station E (zone d'entretien des bateaux). La variabilité des concentrations enregistrées au cours de l'année, avec notamment des valeurs plus fortes en février-mars et décembre-janvier sont à associer au cycle de reproduction de la moule en ces périodes de l'année (Amiard *et al.*, 1986) et non pas à une contamination du milieu par ces métaux.

3.1.3. SUIVI MENSUEL DE LA CONTAMINATION EN CONTAMINANTS ORGANIQUES

Les composés organiques (HAP, PCB ...) sont des polluants lipophiles très stables dans l'environnement marin, que ce soit dans le compartiment biotique (vertébrés et invertébrés) ou dans le compartiment abiotique (sédiment, eau). Le niveau de contamination du milieu est le plus souvent chronique, sauf dans le cas de pollution pétrolière accidentelle, si bien que les effets de ces contaminants sur les organismes marins et les réseaux trophiques sont souvent difficiles à mettre en évidence. De par leur caractère lipophile, leur degré de bioconcentration est fortement corrélé à la fois à la teneur en lipide dans les tissus dans lesquels ils s'accumulent, mais également aux capacités des organismes vivants à métaboliser et excréter ces xénobiotiques. C'est pourquoi, corollairement à l'étude de la variation annuelle de la concentration en HAP et PCB dans les colonies d'*Hymeniacidon perlevis* présentes sur ces deux sites d'étude, nous avons cherché à connaître la variation annuelle de la teneur en lipides dans leurs tissus.

3.1.3.1. Suivi du taux de lipides dans les tissus d'*H. perlevis*

Les dosages des taux de lipide ont été réalisés sur les éponges suite à l'extraction liquide/solide sous pression des matières grasses par l'ASE 200 (Accelerated Solvent Extraction System -Dionex). L'analyse a été réalisée par pesée après évaporation de l'hexane et de l'acétone (50/50) utilisés comme solvants d'extraction.

La variation de la teneur en lipides dans les tissus d'*Hymeniacidon perlevis* prélevés mensuellement sur les deux sites (Collignon et Lingreville) apparaît sur la figure 26. L'écart-type donné au niveau de chaque valeur correspond aux dosages effectués en duplicitat.

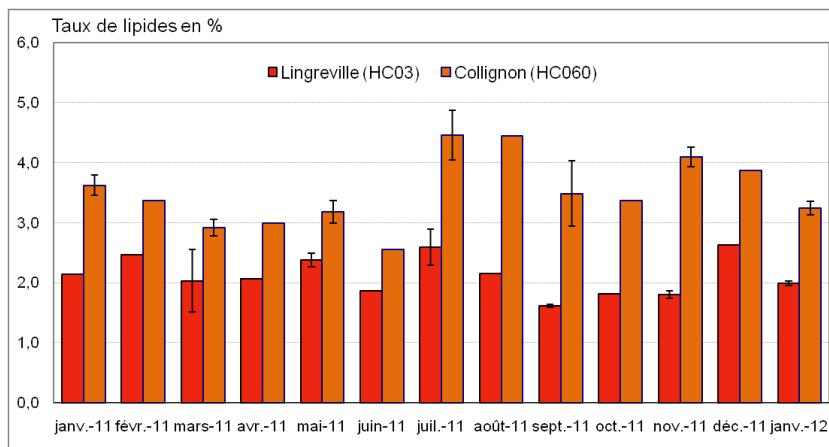


Figure 26 : Évolution du taux de lipides sur l'année 2011 en fonction de chaque site

On peut observer des teneurs en lipides significativement plus élevées dans les éponges issues du site de Collignon par rapport à celles de Lingreville, quel que soit le mois de l'année. En effet, la moyenne du taux de lipide sur le site de Collignon est de $3,5 \pm 0,2\%$ tandis que celles de Lingreville contiennent $2,1 \pm 0,1\%$ de lipides. Sur cette dernière station, ce taux est d'ailleurs relativement stable comme le montre l'intervalle de confiance sur les 13 mois (0,1%). Le minimum est observé en septembre (1,6%) et le maximum en juillet et décembre (2,6%). Sur le site de Collignon, les écarts sont un peu plus importants avec un minimum en juin (2,6%) et le maximum en juillet (4,5%). Plus globalement, il semble que les éponges sont moins riches en lipide au printemps qu'en automne sur le site de Collignon.

Nechev *et al* (2004) ont montré que la composition des lipides d'*Hymeniacidon perlevis*, et en particulier des stérols, dépend principalement des conditions environnementales (température, salinité, nutriments, pollution...). Chez les spongiaires, les lipides sont principalement localisés dans l'ensemble des membranes cellulaires. Si la teneur en lipides varie au cours de l'année, elle est plus liée à une modification de la qualité du régime alimentaire qu'au déroulement de la gamétogenèse lors du cycle sexuel ; en effet, les œufs des spongiaires sont formés à partir de cellules totipotentes du mésohyle qui se différencient en gonocytes. Ces cellules très peu chargées en réserves lipidiques évoluent après la fécondation en œufs oligolécithes de ce fait extrêmement pauvres en vitellus. La décharge lipidique des tissus au moment de l'émission des larves est donc dérisoire au regard de la variation des apports lipidiques liés au régime alimentaire. Ceci explique donc la relative stabilité de la teneur en lipides au cours de l'année sur chacun des sites, de même que la différence observée dans cette teneur en lipides entre les colonies de Collignon et celles de Lingreville.

Ces résultats sont beaucoup plus faibles que les teneurs en lipides de 8 à 12 % publiées par Deslous et Paoli (1992) pour la moule bleue *Mytilus edulis*, valeurs confirmées par nos propres dosages situant cette teneur autour de 7 %. Même s'ils restent peu chargés en réserves, les œufs hétérolécithes des bivalves accumulent surtout du glycogène, mais également un peu plus de lipides que ceux des spongiaires. De plus, la genèse du tissu gonadique lors du cycle sexuel s'effectue au détriment des tissus de réserves. La variation annuelle de la teneur en lipides chez la moule est donc plus importante qu'elle ne l'est chez les spongiaires. L'émission des gamètes lors de la reproduction provoque donc un

départ des contaminants chimiques liés aux réserves lipidiques du vitellus. Cela explique la raison pour laquelle les prélèvements de moules pour le dosage de contaminants sont systématiquement effectués lors du repos sexuel des bivalves (entre septembre et mars) dans le cadre des réseaux de surveillance.

3.1.3.2. Suivi du taux de HAP

Sur la figure 27 apparaissent les variations mensuelles des niveaux de contamination en HAP totaux (somme des 16 HAP principalement détectables), et en particulier du Fluoranthène qui est le HAP suivi par l'IFREMER dans le cadre de son réseau ROCCH. Ces résultats concernent le site de Lingreville et les données obtenues pour les populations naturelles d'éponges sont comparées à celles mesurées dans les tissus de moules.

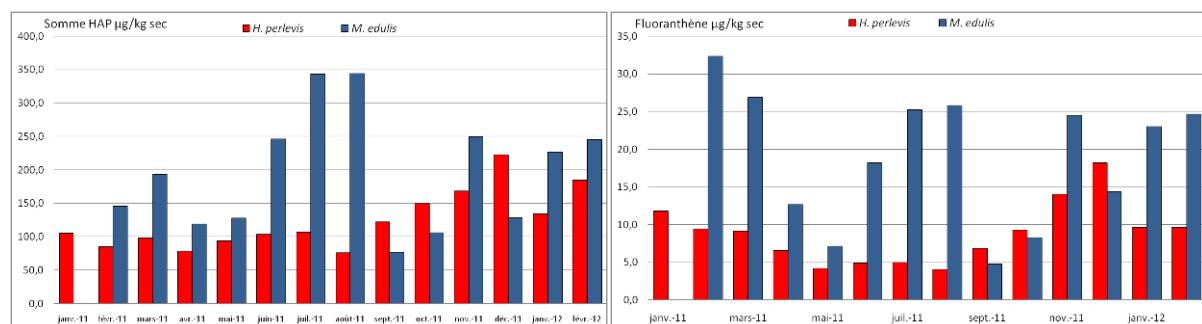


Figure 27 : Evolution mensuelle de la concentration en somme des HAP et fluoranthène dans les éponges (*H. perlevis*) et les moules (*M. edulis*) sur le site de Lingreville, année 2011

Les concentrations en HAP (totaux ou Fluoranthène) apparaissent significativement plus élevées sur la matrice *M. edulis* par rapport à la matrice *H. perlevis*. En particulier, on observe en avril et septembre une chute importante de cette concentration qui pourrait s'expliquer par la survenue de deux épisodes de pontes, un au début du printemps et l'autre au début de l'automne. Cette émission de gamètes à plusieurs périodes dans l'année, même si elle n'est pas systématique, a été décrite par plusieurs auteurs (e.g. Lubet, 1959). Ainsi, si les moules bioaccumulent sans conteste beaucoup plus intensément les HAP que ne le font les colonies d'*H. perlevis*, l'extrapolation des niveaux de bioaccumulation dans les moules à un état du milieu est rendu délicate, du fait du cycle sexuel net qui monopolise et déplace les réserves lipidiques des tissus somatiques vers les tissus gonadiques.

Par contre, dans les tissus d'*H. perlevis*, la variation de la concentration en HAP apparaît moins marquée, la différence sur l'année est de l'ordre d'un facteur 3 (somme des HAP) ou 4 (fluoranthène) entre août où les valeurs sont les plus basses et décembre. La diminution apparente de la concentration des HAP pendant les mois d'été peut trouver une explication dans la croissance rapide des tissus à cette période qui provoquerait alors une « dilution » des contaminants présents dans les tissus. La régression de ces tissus en hiver par un processus de fragmentation entraînerait alors

corrélativement une concentration apparente de ces mêmes contaminants dans les colonies. Tel qu'expliqué précédemment, la reproduction sexuée qui monopolise moins de lipides aurait moins d'influence sur cette fluctuation que la croissance due aux variations des conditions environnementales.

Nous avons donc comparé ces résultats obtenus sur *H. perlevis* sur le site de Lingreville à ceux consécutifs aux dosages des éponges prélevées sur le site de Collignon. Ces résultats apparaissent sur la figure 28.

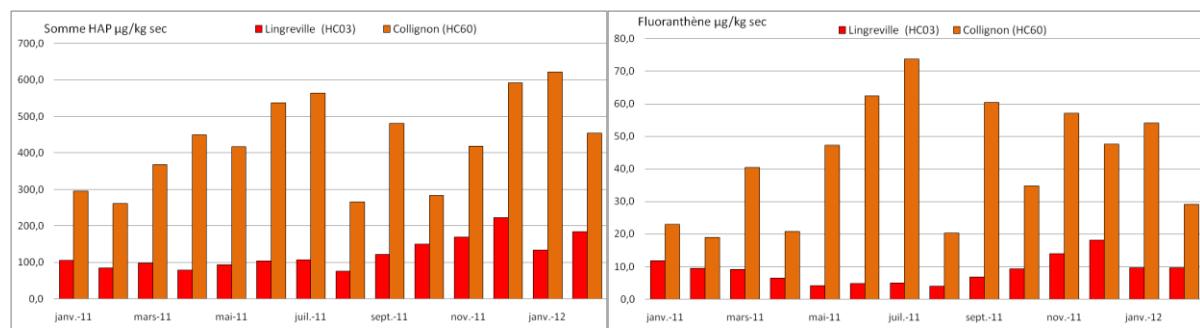


Figure 28 : Évolution mensuelle de la concentration en somme des HAP et du fluoranthène dans les éponges (*H. perlevis*) sur le site de Lingreville et Collignon.

Les profils obtenus apparaissent alors radicalement différents. Alors que la variation annuelle observée sur le site de Lingreville trouve une explication dans la physiologie de la croissance des boutures, les concentrations mesurées sur les colonies de Collignon sont nettement plus importantes, et augmentent de plus pendant les mois d'été, au moment où elles baissent à Lingreville.

Le site de Collignon est situé à l'intérieur de la grande rade de Cherbourg et est de ce fait plus anthropisé que ne l'est le site de Lingreville ouvert sur la Baie du Mont-Saint-Michel. Ainsi cette contamination en HAP dans les tissus des éponges prélevées sur la plage de Collignon est sans doute le résultat des activités maritimes à l'approche de Cherbourg. De plus, l'augmentation très sensible de cette contamination pendant les mois d'été, à une époque où une baisse de concentration est observée sur les colonies non anthropisées de Lingreville, correspond vraisemblablement à l'essor des activités nautiques à cette période, et notamment une pêche de loisir à partir de petits bateaux mouillés au printemps et en été dans le petit port des Flamands situé à proximité de Collignon.

Ainsi, *Hymeniacidon perlevis* apparaît particulièrement sensible à la présence de HAP dans le milieu, ce qui lui confère des qualités de bioindicateur pour ce contaminant. De plus, la stabilité de la concentration chronique de ce contaminant au cours de l'année dans les tissus de l'éponge (tel observé sur le site de Lingreville) permet d'envisager son utilisation dans le cadre de biosurveillance quelque soit la période.

Sur la figure 29 apparaissent les concentrations en HAP mesurées mensuellement sur les deux lots de moules échantillonnées dans le Port de Cherbourg, celles sous le ponton où l'essence est délivrée aux bateaux et celles sous le ponton Q.

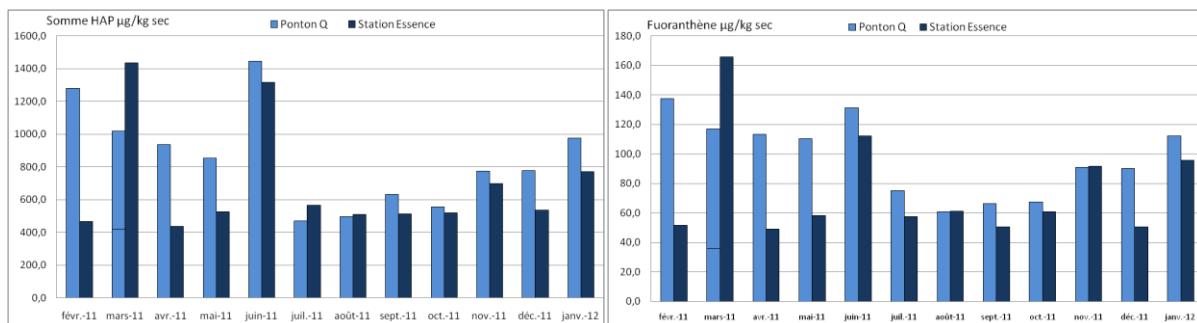


Figure 29 : Evolution mensuelle en 2011 de la concentration en HAP (somme des HAP et fluoranthène) dans les moules (*M. edulis*) sur le site Ponton Q et Ponton où l'essence est délivrée

La concentration en HAP dans les moules du Port apparaît environ 4 fois plus importante que celle mesurée dans les moules de Lingreville (figure 27). Les moules bioaccumulent donc bien les HAP lorsqu'elles sont introduites dans un milieu anthropisé. Cependant, les résultats qui apparaissent sur la figure 29 ne montrent pas de différences importantes dans l'ordre de grandeur des concentrations entre les deux sites du port de Cherbourg, dont l'un est plus contaminé par les HAP du fait de l'essence qui y est desservie. De plus, la concentration dans les tissus de moules à proximité du poste à essence apparaît certains mois moins importante que dans les tissus des moules sous le ponton Q. Les moules pourraient donc ne pas être très sensibles à un gradient croissant de la concentration des hydrocarbures dans le milieu environnement dans les zones fortement anthroposées.

3.1.3.3. Suivi du taux de PCB

Sur la figure 30 apparaissent les suivis mensuels sur le site de Lingreville de la somme de 7 PCB et en particulier du PCB 153. Le PCB153 est l'un des composés suivis en routine par le réseau ROCCH. C'est également l'un des composés les plus persistants dans l'environnement (avec le PCB180) et le plus présent (30 à 40% de la somme des PCB) dans le biote. Les dosages ont été effectuées sur les populations naturelles de l'éponge *Hymeniacidon perlevis* et de la moule *Mytilus edulis*.

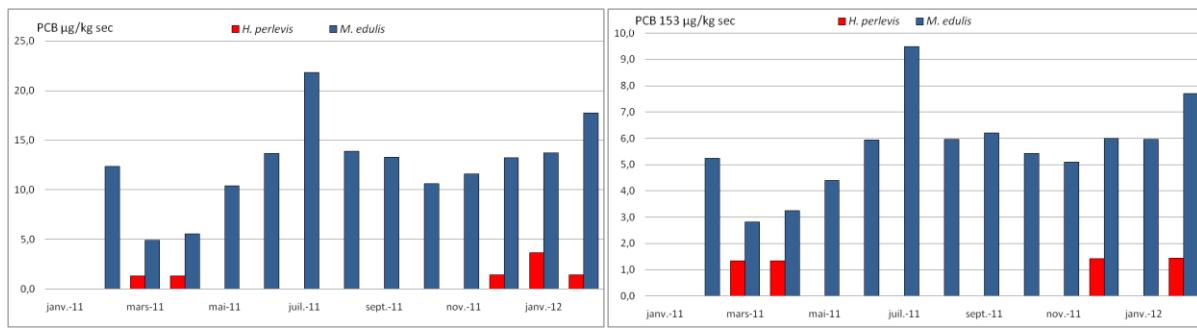


Figure 30 : Évolution mensuelle de la concentration en PCB (somme des PCB et PCB 153) dans les éponges (*H. perlevis*) et les moules (*M. edulis*) sur le site de Lingreville

Comme pour le HAP, on observe une baisse au printemps de la concentration en PCB dans les tissus de moules et une augmentation pendant les mois d'été et d'hiver. Cette augmentation en été peut être liée à la teneur en lipides des proies filtrées par les moules, le PCB s'accumulant dans les réseaux trophiques. D'autre part, d'après Abaranou (2000), la contamination des moules par les PCB en hiver est particulièrement importante du fait des pluies hivernales qui apportent ce contaminant à la mer via le ruissellement de surface du bassin. La sortie de PCB suite aux pontes apparaît moins visible qu'elle nous est apparue pour les HAP, mais les PCB sont extrêmement lipophiles, alors que les œufs hétérotrophes des moules contiennent peu de lipides comparé au glycogène contenu (Roe et Mac Isaac, 1998).

Les concentrations en PCB dans les éponges apparaissent par contre très faibles, inférieures en été et en automne au seuil de quantification (1,25 µg/Kg poids sec). Les éponges semblent moins accumuler les PCB que les moules. La présence de gènes permettant la dégradation des PCB chez les bactéries (Abramowicz, 1990, Bedard et Haberl, 1990, Furukawa et Fujihara 2008), ainsi que l'existence d'une importante biomasse bactérienne à la surface et à l'intérieur des tissus d'*Hymeniacidon perlevis* (Fu, 2008a ; Longo *et al.*, 2010) peut suggérer la possibilité d'une épuration de ce contaminant chez cette éponge. Toutefois, la faiblesse du taux de lipide dans les éponges peut également expliquer un BCF relativement faible pour les molécules lipophytes.

Sur la figure 31 sont comparées les concentrations en PCB dans les populations d'*H. perlevis* sur les sites de Lingreville et de Collignon.

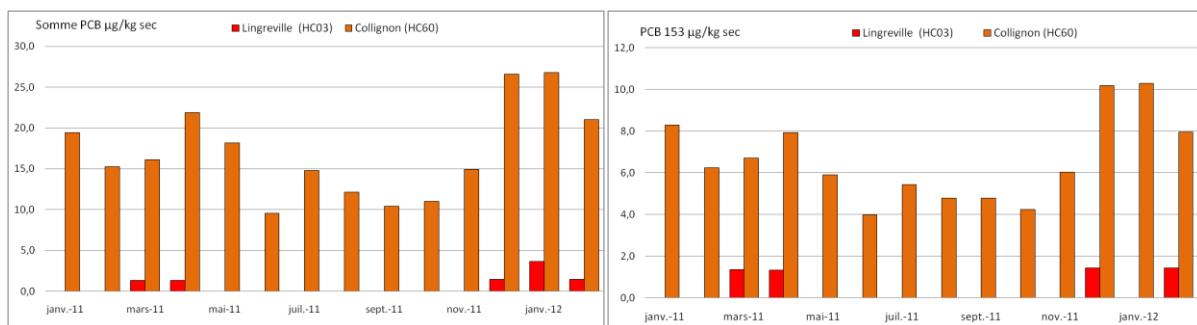


Figure 31 : Évolution mensuelle de la concentration en PCB (somme des PCB et PCB 153) dans les éponges *H. perlevis* sur les sites de Lingreville et Collignon

L'influence des activités anthropiques dans la grande rade de Cherbourg est visible sur ces profils puisque les concentrations en PCB augmentent fortement dans ce secteur. Même si cette éponge accumule peu les PCB dans les zones non anthropisées, elle semble sensible à la présence de ce contaminant. Lorsque la valeur est supérieure à la limite de quantification, le rapport entre les deux sites peut atteindre un facteur 6.

Comme pour les métaux et les HAP, les moules sauvages étant absentes du site de Collignon, nous avons comparé la concentration des PCB dans les tissus des moules sauvages fixées dans deux zones du port de Cherbourg entre lesquelles une différence de contamination organique nous apparaît visuellement évidente (surface irisée de l'eau près du ponton où l'essence est délivrée).

Sur la figure 32 apparaissent les profils des niveaux de contaminations observés dans les moules de ces deux sites.

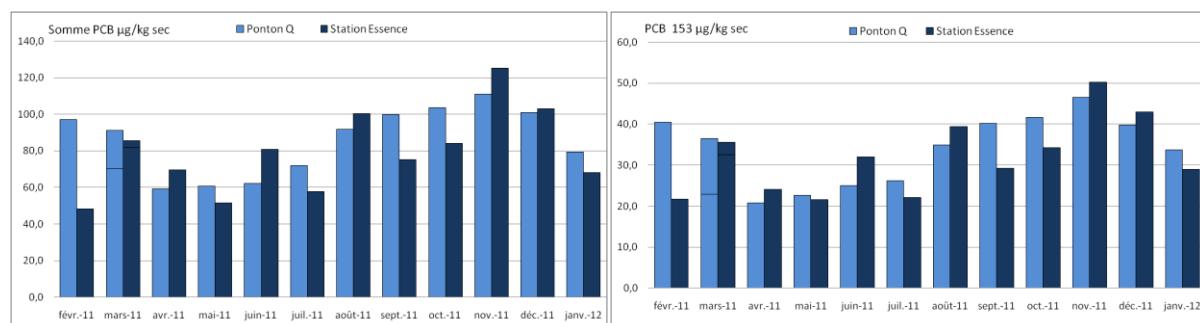


Figure 32 : Evolution mensuelle en 2011 de la concentration en PCB (somme des PCB et PCB 153) dans les moules (*M. edulis*) sur le site Ponton Q et Ponton Essence, année 2011

Aucune différence significative n'est observée entre les moules prélevées sous le ponton Q et celles vivant sous le ponton où l'essence est délivrée. On observe cependant des valeurs plus importantes en automne-hiver par rapport aux périodes printemps-été, sans doute dues aux pluies hivernales qui lessivent les sols et parkings entourant la zone portuaire.

Ainsi, *Hymeniacidon perlevis* accumule moins les contaminants organiques que *Mytilus edulis*, peut-être du fait de sa moindre teneur en lipides, notamment dans les réserves des gamètes. Elle apparaît cependant sensible à une variation de la contamination du milieu. D'autre part, son cycle reproductif a moins d'influence sur les flux de contaminants dans et hors des tissus, de même que sur les phénomènes de concentration/dilution dus aux pertes ou gains de masse, ce qui constitue une qualité attendue d'un bioindicateur de contaminants.

3.2- SUIVI BIANNUEL DE LA CONTAMINATION DES POPULATIONS NATURELLES DANS LES MASSES D'EAU DCE BAS-NORMANDES

3.2.1- ECHANTILLONNAGE SUR LE SUIVI BIANNUEL

Des échantillons de populations naturelles d'éponge (*Hymeniacidon perlevis*) ont été prélevés tous en deux périodes de l'année 2011 (mars-avril et septembre-octobre) sur toutes les zones DCE du littoral de la Basse-Normandie présentant des populations naturelles d'éponges. Les métaux; Zn, Cu et Cd ainsi que les contaminants organiques ; PCB et HAP, ont été recherchés dans les échantillons afin de comparer les données à celles du réseau ROCCH de l'Ifremer, qui prélève aux mêmes périodes des moules sur ces points de suivi.

3.2.2- RESULTATS DU SUIVI BIANNUEL EN METAUX DANS L'EPONGE *HYMENIACIDON PERLEVIS*

La figure 33 présente les concentrations en zinc, cuivre et cadmium mesurées dans les populations naturelles d'éponge *H. perlevis* prélevées au niveau des zones DCE, au printemps et à l'automne de l'année 2011. Les concentrations sont comparées à celles des analyses 2011 effectuées dans le cadre du suivi des zones conchyliocoles classées par Ifremer (suivi DGAL) dans la moule *M. edulis*. Ces périodes ont été choisies car elles correspondent aux périodes de repos sexuel de l'éponge et de la moule.

Seuls 6 points en Basse-Normandie sont suivis par la DGAL et seront donc comparés à nos échantillons d'éponges prélevés bi-annuellement : Bréville et Pirou Nord (HC03), grande rade de Cherbourg (HC61), Le Moulard (HC08), Grandcamp ouest (HC10), Port-en-Bessin (HC11), Ouistreham (HC14). Un point en Haute-Normandie (cap de la Hève, HC16) a également été étudié aux mêmes périodes. Les concentrations en zinc mesurées dans *H. perlevis* sur les différentes zones DCE de Basse-Normandie affichent des résultats de l'ordre de 1000 à 2000 mg/kg ps au printemps et entre 400 et 1200 à l'automne. Sur les mêmes sites, les concentrations ont tendance à être moins élevées en automne.

Les concentrations en cuivre mesurées dans *H. perlevis* sur les différentes zones DCE de Basse-Normandie affichent des résultats compris entre 12 et 24 mg/kg ps (hors site du port de Cherbourg en HC61) au printemps et entre 10 et 25 mg/kg ps à l'automne. Les concentrations ont tendance à rester constantes entre les 2 saisons. La concentration très élevée mesurée au printemps dans le port de Cherbourg ne peut être associée qu'à un rejet ponctuel en cuivre.

Les concentrations en cadmium mesurées dans *H. perlevis* sur les différentes zones DCE de Basse-Normandie affichent des résultats compris entre $0,36 \pm 0,01$ mg/kg ps et $4,8 \pm 0,7$ mg/kg ps (hors site du port de Cherbourg en HC61) au printemps et entre $0,69 \pm 0,06$ mg/kg ps et $2,2 \pm 0,2$ mg/kg ps à l'automne. Sur certaines zones (HC04, HC05, HC10, HC11 et HC13), les concentrations sont plus élevées en période d'automne.

En moyenne, les concentrations en zinc dans l'éponge *H. perlevis* sont 20 fois plus importantes que les concentrations mesurées dans les moules suivies par Ifremer sur les mêmes zones, à la même période. Elles sont 2,7 fois plus importantes pour le cuivre et 3 fois plus importantes pour le cadmium. Le même rapport associé aux données d'automne n'a pu être calculé en raison de la non-disponibilité des derniers résultats Ifremer sur cette période. Ces résultats rejoignent les résultats obtenus par les expérimentations du caging (§ 2.3) et du suivi mensuel (§ 3.1.2.2).

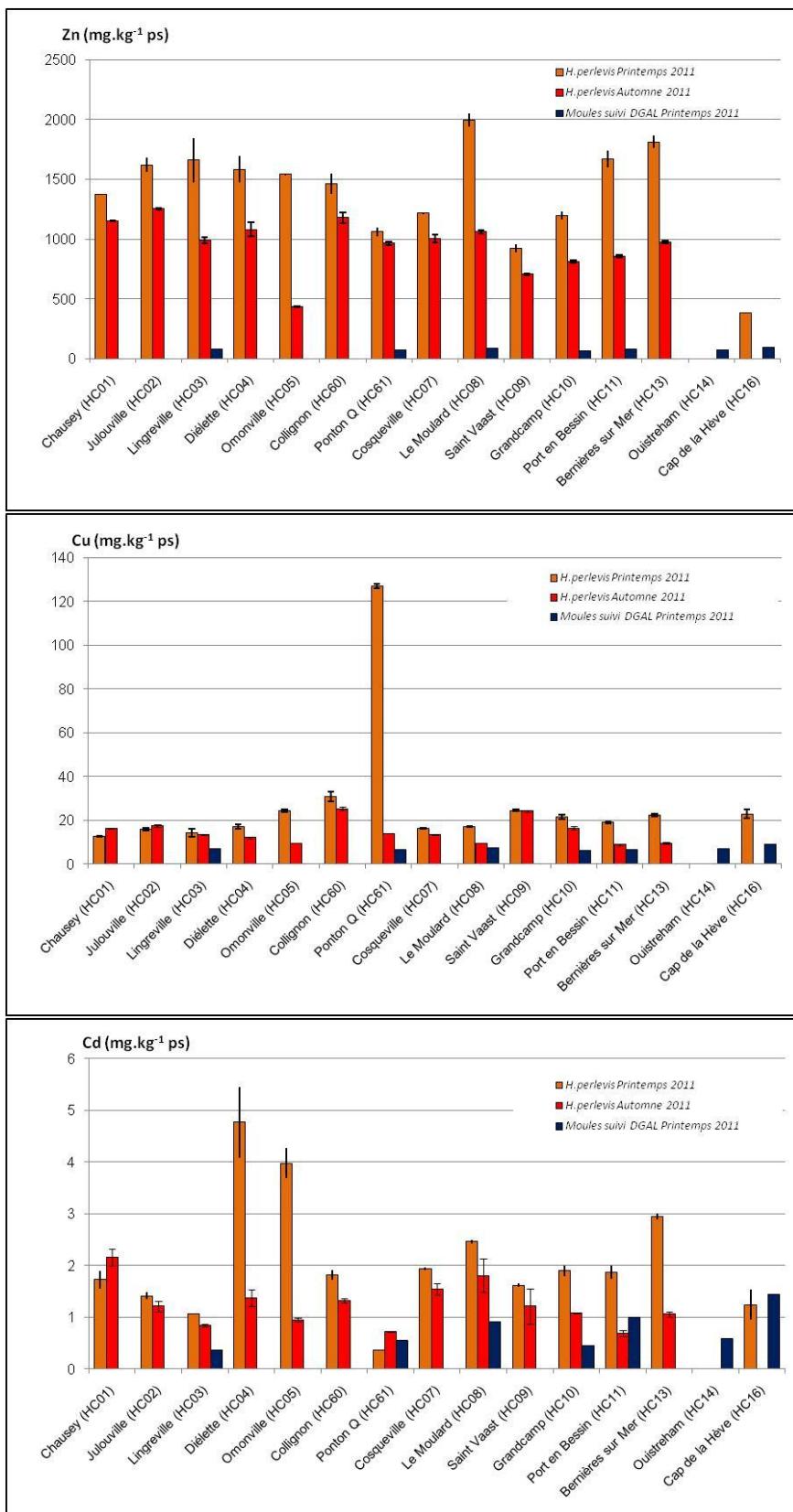


Figure 33 : Concentrations en Zn, Cu et Cd obtenus sur les échantillons de *Hymeniacidon perlevis* prélevés sur les zones DCE au printemps (mars-avril) et à l'automne (septembre-octobre) de l'année 2011.

3.2.3 - RESULTATS DU SUIVI BIANNUEL EN CONTAMINANTS ORGANIQUES DANS L'EPONGE *HYMENIACIDON PERLEVIS*

→ HAP

Les résultats des concentrations en fluoranthène mesurées dans l'éponge *H. perlevis* au niveau de chaque masse d'eau DCE, sont présentés à la figure 34. Comme pour les métaux, ces molécules ont été recherchées dans les échantillons sur 2 périodes de l'année, en mars 2011 (printemps) et octobre 2011 (automne).

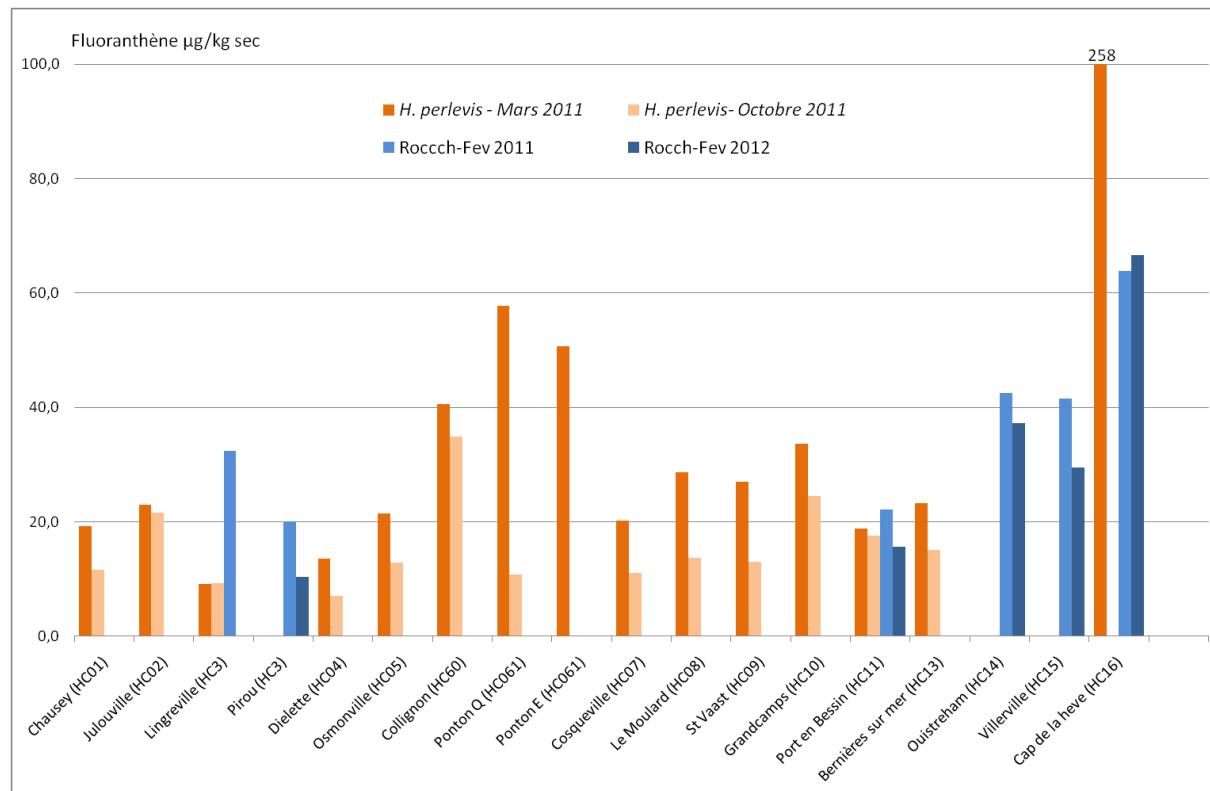


Figure 34 : Suivi de la concentration en fluoranthène dans les éponges *H. perlevis* sur divers sites de Basse Normandie (masses d'eau DCE) ainsi que les résultats Rocch sur les moules en 2011 et 2012 (Données Spontox sur Lingreville).

Trois classes de concentrations en fluoranthène sont observées :

- des valeurs relativement faibles sur les sites de Chausey, Jullouville, Diellette, Osmonville, Cosqueville, Le Moulard, St Vaast, Grandcamps, Port en Bessin, Bernières sur mer et Jullouville (entre 15 et 30 µg/kg en fluoranthène),
- des valeurs moyennes pour les sites Ponton Q et Ponton essence (entre 50 et 60 µg/kg),
- des valeurs élevées sur le site du Cap de la Hève avec une concentration de 250 µg/kg sec.

Les résultats montrent une concentration en fluoranthène plus élevée au cap de la Hève (258 µg/kgsec en mars 2011) par rapport aux autres sites étudiés. Les masses d'eau près de la zone portuaire de Cherbourg (HC60 et HC61) présentent également des valeurs relativement importantes entre 40 et 60 µg/kgsec au mois de mars 2011. Par contre, les éponges prélevées sur la côte ouest du Cotentin (HC01 – HC04) montrent des taux relativement faibles de l'ordre de 10 à 20 µg/kg sec. La plupart du temps, la concentration automnale en fluoranthène est plus faible que la concentration mesurée au mois de mars.

Les concentrations obtenues dans les moules sont souvent supérieures à celles obtenues dans les éponges excepté au cap de la Hève. Toutefois, ces constatations sont à relativiser puisque les prélèvements ne sont pas réalisés exactement au même endroit excepté à Lingreville dans le cadre de ce programme.

→ PCB

Les résultats des concentrations en PCB 153 mesurées dans l'éponge *H. perlevis* au niveau de chaque masse d'eau DCE, sont présentés figure 35.

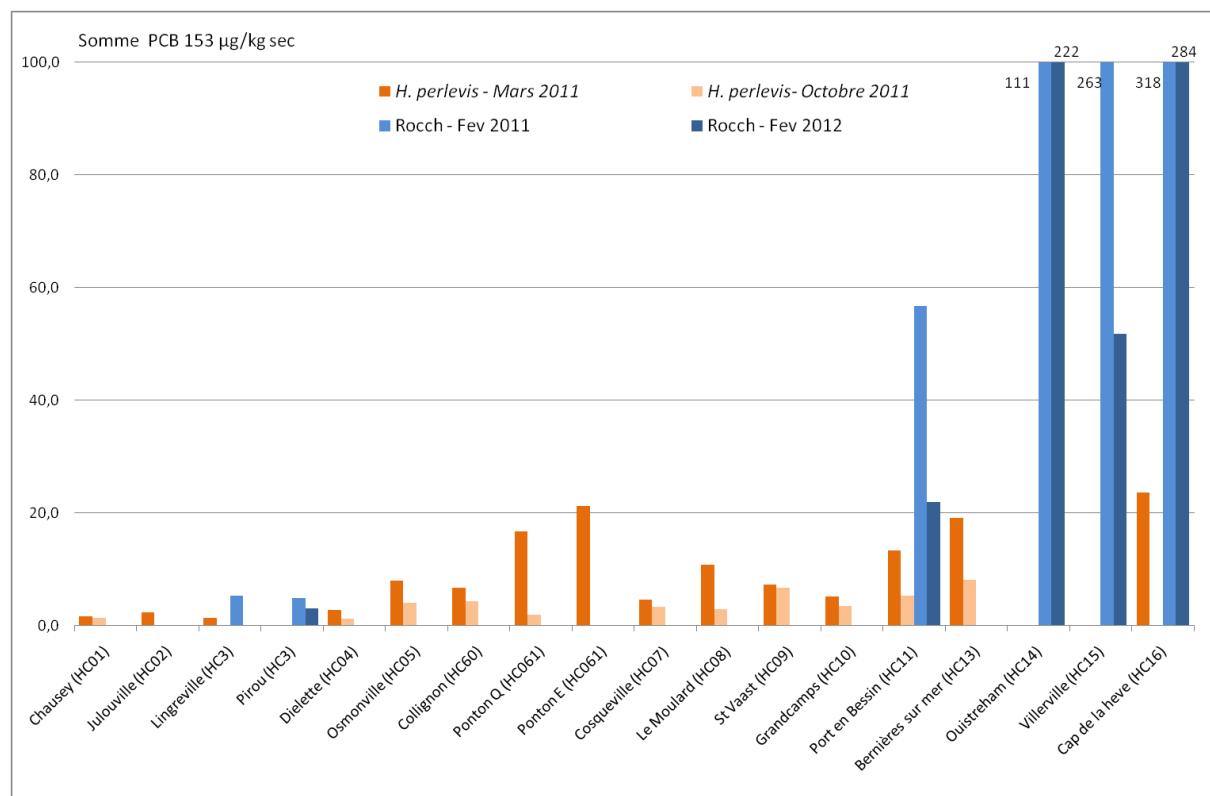


Figure 35 : Suivi de la concentration en PCB 153 dans les éponges *H. perlevis* sur divers sites de Basse Normandie (masses d'eau DCE) ainsi que les résultats Rocch sur les moules en 2011 et 2012 (Données Spontox sur Lingreville).

Les résultats montrent une concentration en PCB153 plus élevée au cap de la Hève (23,6 µg/kgsec en mars 2011) par rapport aux autres sites étudiés. Les masses d'eau près de la zone portuaire de Cherbourg (HC60 et HC61) présentent également des valeurs relativement importantes entre 16 et 21 µg/kgsec au mois de mars 2011. Par contre, les éponges prélevées sur la côte ouest du Cotentin (HC01 –HC04) montre des teneurs relativement faibles, inférieures au µg/kg PS. La plupart du temps, la concentration automnale est plus faible que la concentration mesurée au mois de mars. Cette différence est particulièrement marquée sur les sites du port de Cherbourg.

Sur les moules, les concentrations mesurées sont beaucoup plus importantes, notamment sur les secteurs proches de l'embouchure de la Seine où les concentrations atteignent plus de 300 µg/kg PS. La même constatation est observée sur le secteur de Port-en-Bessin avec une concentration de 13 µg/kg en PCB 153, à comparer aux valeurs de 57 et 22 µg/kg en PCB 153 données par le ROCCH dans l'espèce *M. edulis* (février 2011 et février 2012). Par contre, sur la côte ouest du Cotentin les concentrations dans les moules sont relativement proches de celles mesurées dans *H. perlevis*.

Trois classes de concentrations en PCB 153 sont observées :

- des valeurs très faibles sur les sites de Chausey, Jullouville, Diellette, Cosqueville, Grandcamps (valeurs comprises entre 1,5 et 5 µg/ kg sec),
- des valeurs comprises entre 5 et 10 µg/kg sur les sites d'Osmonville, Le Moulard, Saint Vaast.
- des valeurs plus élevées (comprises entre 10 et 20 µg/kg) sur les sites de Port en bessin, Bernières sur mer, Ponton Q et ponton Essence et Cap de la Hève.

Les suivis par site de la somme des HAP et des PCB sont reportés sur les figures 36 et 37 pour les éponges prélevées au mois de mars 2011.

Les observations réalisées sur le suivi en HAP en mars 2011 sont équivalentes à celles réalisées sur le fluoranthène, c'est-à-dire une différence significative de la majorité des HAP entre les milieux côtiers et les milieux portuaires et une différence significative de la majorité des HAP entre le Cap de la Hève et les autres sites. Cette différence est en effet observée quelque soit le type d'HAP, lourds (benzo(ghi)pérylène par exemple) ou légers (naphtalène par exemple). Une exception concerne les HAP légers sur les sites portuaires, la différence est moins significative par rapport aux sites côtiers concernant les molécules naphtalène, acénaphtylène, acénaphthène, et fluorène.

Concernant le suivi en PCB, on peut observer une absence des PCB les plus biodégradables (28, 52, 101) sur certains sites (Chausey, Jullouville, Diellette, Osmonville, Cosqueville). Le PCB 28 est absent de l'ensemble des sites et le PCB 153 est le PCB majoritaire sur l'ensemble des sites.

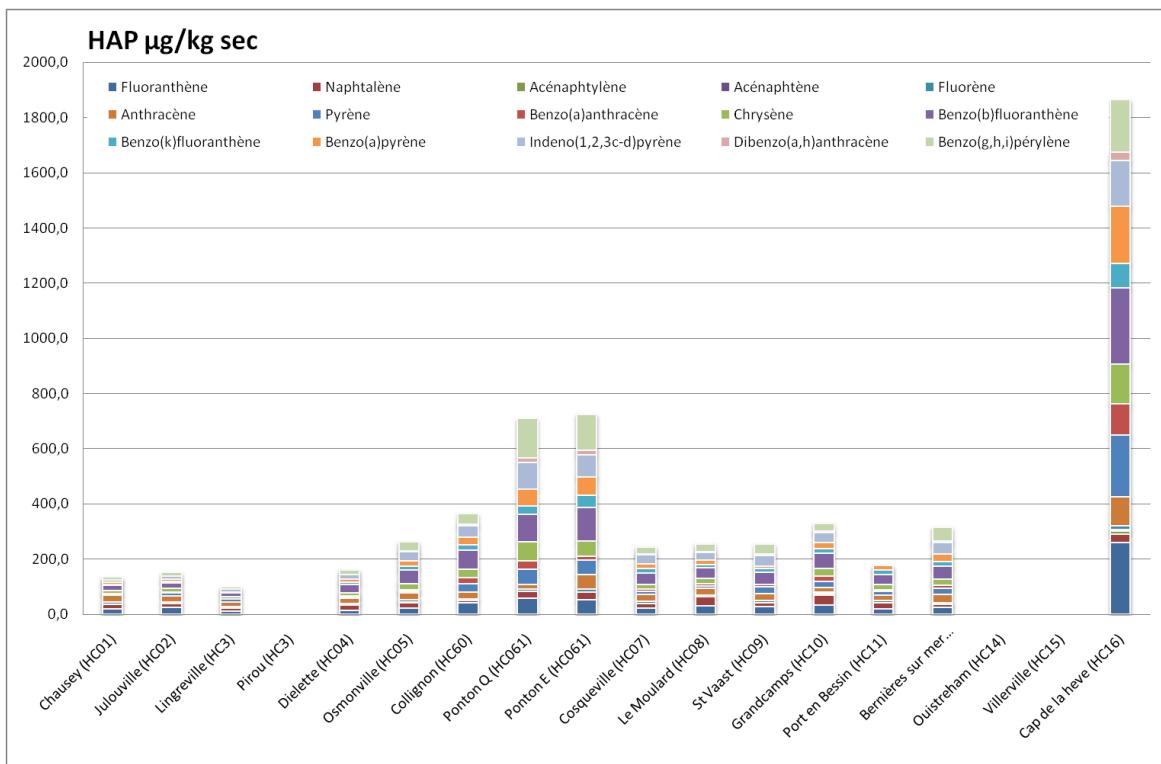


Figure 36 : Suivi de la concentration en divers HAP (16) dans les éponges *H. perlevis* sur divers sites de Basse-Normandie au printemps 2011.

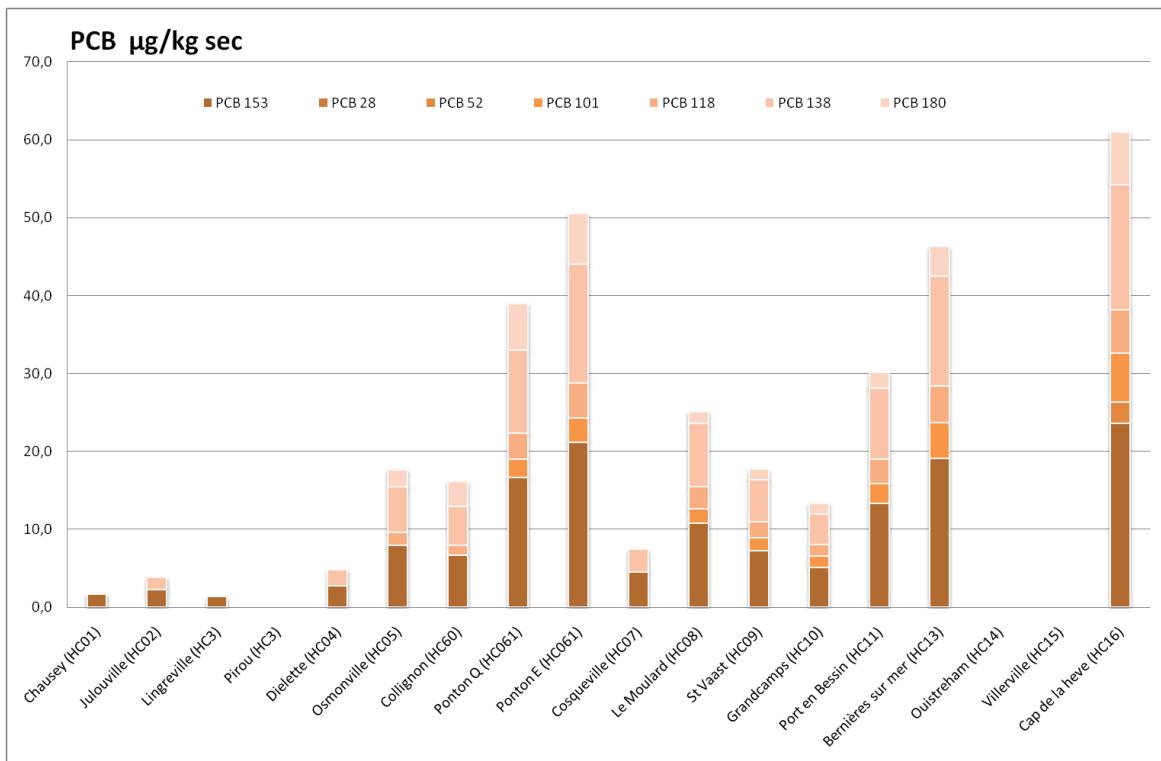


Figure 37 : Suivi de la concentration en divers PCB (7) dans les éponges *H. Perlevis* sur divers sites de Basse-Normandie au printemps 2011.

L'espèce *H perlevis* semble représenter correctement la contamination observée sur le littoral, avec des valeurs faibles en milieu côtiers (Port en Bessin, Jullouville, ...) et hauturier (Chausey), des valeurs élevées en milieu portuaire et sur le point cap de la Hève, fortement influencé par l'estuaire de la Seine. De plus, le fluoranthène semble être un élément représentatif de la contamination en HAP, cependant, il peut sembler intéressant de le coupler à la somme des HAP.

SYNTHESE

Les espèces présentes sur le littoral Bas-Normand : Près de 1000 colonies de spongaires ont été prélevées et identifiées en s'appuyant sur la clef de détermination de Ackers *et al.*, (2007), ce qui a permis d'établir une liste de 42 espèces présentes sur les zones intertidales des 17 masses d'eau prospectées en Normandie. Deux espèces d'éponge (*Hymeniacidon perlevis* et *Halichondria panicea*), se sont avérées particulièrement abondantes sur la plupart des stations. Trente neuf espèces de spongaires ont été identifiées sur la partie haute de l'étage subtidal de 9 masses d'eau en Basse-Normandie.

Quelques précisions bibliographiques sur *Hymeniacidon perlevis* : Le nom de l'éponge *Hymeniacidon perlevis* (Montagu, 1818) présente une variation orthographique non valide sous la forme de *Hymeniacidon perleve* (Montagu, 1818) mais également 14 synonymes juniors dont les plus connus sont *Hymeniacidon sanguinea* (Grant, 1826) et *Halichondria caruncula* (Bowerbank, 1866). Présente de la zone subtidale à la zone intertidale (mi-marée) dans de très nombreuses mers et océans, cette espèce supporte très bien les variations des conditions environnementales, telles la température et la salinité, ce qui explique sa grande aire de répartition. Sa croissance asexuée par bouturage lui permet d'étendre la colonie sur son support. On observe également une phase de reproduction sexuée qui s'effectue entre juillet et septembre sur les côtes de la Manche. Elle se nourrit de matière organique particulière mais également de phytoplancton et de bactéries. Ses tissus renferment des composés biologiquement actifs (antibactérienne, antifongique, anti-inflammatoire) qui suscitent un vif intérêt de la part de l'industrie pharmaceutique. C'est pourquoi cette espèce est activement étudiée depuis quelques années mais le succès de sa spongiculture se limite actuellement à la production de jeunes plants.

Optimisation du dosage en HAP et PCB dans la matrice éponge : La spécificité de la matrice a conduit à développer et optimiser les techniques analytiques. Après une étape de préparation des échantillons, les molécules sont extraites à l'aide de florisol, de silice diatomée et d'un mélange acétone-hexane (50-50) dans un système ASE. Elles sont ensuite purifiées au travers d'une colonne remplie du mélange silice-alumine après élution par les mélanges de solvants hexane et hexane/dichlorométhane (90/10) et hexane/dichlorométhane (75/25). L'éluat obtenu est concentré pour être analysé par CPG-MS-MS. L'ensemble de la procédure a fait l'objet d'un contrôle qualité. Un essai interlaboratoires a permis de valider la technique utilisée.

Variation du taux de contamination inter population en métaux sur un même site : Les colonies d'éponges présentent une variabilité naturelle par rapport à la bioconcentration en métaux. Les coefficients de variation maximum sont sur un même site de 33 % pour le cuivre, 28 % pour le Zinc, et 22 % pour le cadmium. Lors d'un prélèvement *in situ*, il est donc préférable de prélever plusieurs boutures afin de réduire la variabilité de la mesure.

Cinétique de la bioaccumulation de *H. perlevis* et *M.edulis* : Des cages avec des boutures d'éponge et des moules ont été transplantées dans le port de Cherbourg afin d'évaluer la cinétique d'accumulation en métaux, HAP et PCB. Certaines d'entres elles ont ensuite été placées sur la côte ouest du Cotentin afin d'étudier la cinétique de décontamination de ces mêmes molécules. Les résultats ont été comparés à des expérimentations réalisées en conditions contrôlées. Dans les 2 expérimentations réalisées en milieu naturel et contrôlé, des concentrations plus élevées en métaux (Cd, Cu, Zn) ont été mesurées dans l'espèce *Hymeniacidon perlevis* par rapport à la moule *Mytilus edulis*. Cet écart est moins marqué pour les HAP et s'inverse dans le cas des PCB. L'expérimentation de caging a démontré que l'espèce *H. perlevis* était plus sensible à la détection d'une contamination en cuivre que la moule *M. edulis*. Le zinc et le cadmium ne semblent pas contaminer les eaux du port, les concentrations mesurées dans les 2 espèces immergées restant stables au cours du temps. Comme pour le cuivre, l'évolution des concentrations en HAP et PCB de ces mêmes échantillons est croissante pendant les périodes d'immersion. Lors de leur mise en décontamination en milieu naturel, les concentrations en métaux, HAP et PCB des 2 espèces diminuent rapidement (dans les 15 premiers jours) pour se stabiliser après environ 1 mois. L'expérimentation en laboratoire ne permet pas d'obtenir de contamination probante sur les échantillons, en raison de la trop courte période d'étude (4 semaines). Pour les molécules organiques, il existe sans doute 2 dynamiques superposées : d'une part une adsorption/désorption rapide sur les tissus et d'autre part une accumulation lipidique lente dans les tissus.

Etude de la stabulation et de la culture d'*H. perlevis* en conditions contrôlées : De nombreuses expérimentations ont été réalisées sur la croissance d' *H. perlevis* en conditions contrôlées, en testant séparément différents facteurs tels la lumière, la photopériode, l'alimentation, etc.... La plupart des résultats montrent une croissance durant le premier mois d'élevage puis on observe une décroissance avec quasiment l'ensemble des paramètres testés. Par contre, en circuit ouvert, il semble que cette espèce affiche des croissances sur une période plus longue. L'ensemble des résultats nous ont amenés à supposer qu'un facteur clé contrôlait ou inhibait l'ensemble du processus de croissance en circuit fermé. Nous avons de ce fait envisagé que les nombreuses molécules produites par *Hymeniacidon perlevis*, et notamment les molécules biocides qui lui permettent de s'étendre sur un support au détriment des autres espèces fixées, pouvaient conduire, en circuit fermé ou semi-fermé à une auto intoxication des boutures. Cette hypothèse est appuyée par les bons résultats de croissance que l'on observe dans les expérimentations de caging. D'autres expérimentations en circuit ouvert seront nécessaires pour valider cette hypothèse avec la difficulté technique de faire varier les paramètres physico-chimiques durablement dans un tel système.

Suivi mensuel des populations de *H. perlevis* sur deux sites : Comme constaté pendant les essais de caging, *H. perlevis* présente des concentrations plus importantes en métaux que la moule, notamment pour le zinc, et dans une moindre mesure pour le cuivre quel que soit le site. Cela s'explique par le fait que la moule régule ces deux contaminants. De plus, chez *H. perlevis*, le zinc est un fort inducteur de la synthèse des métallothionéines sur lesquels les métaux se fixent mais il se lie peu à ces protéines,

ayant tendance à « céder sa place » à d'autres métaux tel le cuivre ou le cadmium. Le zinc s'accumule ainsi dans le cytosol des cellules de l'éponge si bien que sa mobilité vers et en dehors des cellules, c'est-à-dire sa bioconcentration, sa régulation et son épuration peuvent alors être plus importantes que celles d'autres métaux. Les différences observées dans les rapports de contaminations entre les deux espèces biologiques selon le métal considéré dépendent donc en partie du comportement de chaque métal dans chacune des deux espèces biologiques. Une différence de concentrations en fonction des mois de l'année semble exister, surtout pour le zinc. L'augmentation et la diminution progressives des valeurs en fonction des mois de l'année peuvent être associées à la reproduction asexuée de l'éponge *H. perlevis* car les colonies croissent en taille pendant l'été puis régressent et se fragmentent en hiver entraînant ainsi une alternance entre dilution et concentration du contaminant dans les tissus. Le cuivre et le cadmium varient de façon plus marquée sur le site de Collignon par rapport aux données recueillies à Lingreville. Ainsi, l'influence des activités maritimes dans la rade semble être exprimée au travers des niveaux de contamination observés. Les composés organiques (HAP, PCB ...) sont des polluants lipophiles très stables dans l'environnement marin. De par leur caractère lipophile, leur degré de bioconcentration est fortement corrélé à la fois à la teneur en lipide dans les tissus dans lesquels ils s'accumulent, mais également aux capacités des organismes vivants à métaboliser et excréter ces xénobiotiques. *Hymeniacidon perlevis* accumule moins les contaminants organiques (HAP, PCB) que *Mytilus edulis*, peut-être du fait de sa moindre teneur en lipides, notamment dans les réserves des gamètes. Elle apparaît cependant sensible à une variation de la contamination du milieu. D'autre part, son cycle reproductif a moins d'influence sur les flux de contaminants dans et hors des tissus, de même que sur les phénomènes de concentration/dilution dus aux pertes ou gains de masse, ce qui constitue une qualité attendue d'un bioindicateur de contaminants.

Suivi biannuel des populations naturelles d'*H. perlevis* dans les masses d'eau de Basse Normandie : La concentration en zinc est élevée sur l'ensemble des sites bas-normands. Pour le cuivre, une forte concentration est observée au printemps dans le port de plaisance de Cherbourg résultant sans nul doute de l'activité portuaire (démontrée par les résultats des expérimentations de caging), la source principale en cuivre des milieux portuaires résidant dans l'utilisation des peintures anticalcaires qui protègent les coques de bateaux. Dans une moindre mesure, les éponges prélevées à Collignon présentent également des concentrations plus importantes en cuivre, démontrant l'influence de la proximité des eaux contaminées du port et/ou la présence d'autres petits ports proches du site d'étude. Des concentrations en cadmium assez importantes sont observées à Dielette et Omonville et dans une moindre mesure à Bernières sur Mer. Ici encore, les éponges prélevées au cap de la Hève présentent des concentrations significativement plus faibles que dans les moules. Les données recueillies sur les HAP et PCB sont très cohérentes avec des concentrations assez importantes mesurées dans la zone portuaire de Cherbourg (confirmant les résultats de caging) et un pic au cap de la Hève soumis à l'influence de l'estuaire de la Seine. On remarquera également les concentrations faibles de la côte ouest du Cotentin par rapport aux concentrations moyennes du Calvados et de la côte Est du Cotentin.

Synthèse des résultats obtenus en 2011-2012

- Cartographie des espèces de spongiaires présents en Basse Normandie dans chacune des zones DCE (complément de SPONTOX 2010)
- Revue bibliographique des travaux liés à l'espèce sentinelle *Hymeniacidon perlevis*
- Adaptation des méthodologies analytiques à la matrice « éponge » lors des dosages des HAP et PCB
- Etude de la variabilité intra-spécifique du taux de contamination en métaux (Cu, Zn, Cd) entre des populations naturelles issues d'un même site
- Evaluation bi-annuelle du niveau de contamination des populations locales d'*Hymeniacidon perlevis* sur les masses d'eau DCE bas-normandes (métaux, HAP, PCB)
- Etude de l'évolution des niveaux de contamination mensuels en métaux, HAP, PCB, ainsi que de la teneur en lipides totaux, dans les spongiaires (*H. perlevis*) et les moules (*Mytilus edulis*) prélevés sur 2 sites (l'un anthropisé dans la grande rade de Cherbourg et un ouvert sur la Baie du Mont-Saint-Michel)
- Suivi de la cinétique de contamination et décontamination en métaux, HAP et PCB dans les populations *H. perlevis* et *M. edulis* en environnement naturel
- Suivi de la cinétique de contamination & décontamination en zinc et en HAP dans des populations *H. perlevis* et *M. edulis* en environnement contrôlé
- Etude multiparamétrique des facteurs favorisant la croissance des boutures d'*H. perlevis*. Faisabilité et limites de sa spongiculture
- Validation (*en cours*) de l'utilisation d'*Hymeniacidon perlevis* en tant qu'outil de suivi *in-situ* de la qualité des eaux

CONCLUSION

La densité des résultats obtenus en 2011 et 2012 ont permis de mieux cerner les potentialités d'*Hymeniacidon perlevis* en tant qu'indicateur de la qualité du milieu. La répartition spatiale très large de cette espèce permet l'intercomparaison de l'état de différents sites, suite au dosage des contaminants dans les tissus des populations naturelles qui en sont issues. La biosurveillance active par caging donne des résultats très concluants en zone portuaire, et pourra également être mise en œuvre dans le cadre de la biosurveillance de sites naturels. *Hymeniacidon perlevis* bioaccumule particulièrement bien le cuivre, le cadmium et dans une moindre mesure les HAP et PCB. Bien que les concentrations en polluants organiques apparaissent plus faibles dans les tissus de cette éponge que dans ceux des moules, leur variation au cours de l'année est beaucoup moins dépendante du cycle sexuel. Ceci autorisera donc leur utilisation tout au long de l'année dans un cadre de biosurveillance, ce qui n'est pas possible avec les moules. Le maintien en culture des boutures est simple à mettre en œuvre, mais des études complémentaires sont encore nécessaires avant de parvenir à une production intensive de tissus.

PERSPECTIVES

Le programme Spontox 2011-2012 a conduit à la réalisation de nombreuses expérimentations permettant d'obtenir une masse importante de données mais également d'échantillons disponibles pour d'autres analyses. Les travaux ont porté sur trois métaux ; le cuivre, le zinc et le cadmium. L'analyse par ICP-AES de l'ensemble des échantillons déjà minéralisés permettrait de compléter les données sur les métaux en quantifiant jusqu'à 21 autres éléments (Al, As, Ba, Ca, Co, Cr, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Ni, P, Pb, S, Sc, Se, Si, Sn, Sr, Ti). De même, le développement en cours des méthodes d'analyses en TBT et DBT sur cette matrice pourrait permettre d'obtenir des données supplémentaires sur les organostanniques, en particulier en zone portuaire.

Ce rapport rassemble les principaux résultats issus des suivis et des expérimentations réalisées en 2011 et 2012. Toutefois, l'analyse de la masse très importante d'informations va être approfondie en 2013 dans l'objectif de rédiger et soumettre à des revues de niveau international un minimum de 2 publications scientifiques.

Ce programme a permis également de soulever de nombreuses interrogations sur les éponges et particulièrement sur l'espèce *Hymeniacidon perlevis* très répandue sur l'ensemble des mers et océans mondiaux. Les données bibliographiques soulignent la possibilité pour cette espèce de s'adapter à des conditions environnementales très diverses, et notamment à des conditions d'hydrodynamisme et d'exondation qui se traduisent notamment par des phénotypes différents des populations. Cette particularité permet de donner une explication vraisemblable à la multiplicité des noms qui ont été attribués à cette espèce. Nous avons pu nous-même constater ce polymorphisme entre ces différentes populations, et établir que cette adaptation à différents environnements allait de pair avec des teneurs en lipides différentes, une variabilité dans les capacités à résister aux tests, aux conditions d'élevage, au caging. L'analyse génétique de ces populations pourrait peut-être permettre une avancée importante dans la connaissance de cette espèce pour laquelle différentes populations sont aisément identifiables.

Ce programme a permis de montrer qu'il existe une variation mensuelle de la concentration en métaux, HAP ou PCB dans les populations naturelles. Cette évolution est la résultante, d'une part d'une variation du taux de contamination du milieu mais également de l'évolution physiologique de l'espèce sur l'année. Des études récentes ont mis en évidence une cyclicité annuelle marquée de la reproduction asexuée qui se traduit par un développement des colonies suivi en hiver par la régression des tissus. On a ainsi déduit que ce phénomène avait un impact, notamment sur la concentration du zinc dans les tissus. L'obtention de données sur l'évolution pondérale mensuelle des populations naturelles pourrait donc être envisagée.

Les expérimentations menées sur les paramètres d'élevage laissent supposer que les paramètres « température, lumière, alimentation, hydrodynamisme... » sont mineurs par rapport à un autre paramètre encore non identifié. Certaines expérimentations semblent néanmoins montrer qu'un élevage en circuit ouvert améliore considérablement les performances. Les éponges synthétisant de nombreuses biomolécules, notamment anti-fouling, elles pourraient s'auto-intoxiquer en élevage en

faible volume et/ou en circuit fermé. Des *nouvelles expérimentations en circuit ouvert* devront être mise en œuvre pour vérifier ou infirmer cette hypothèse.

Des expérimentations en laboratoire en conditions contrôlées ont permis de conforter les résultats obtenus dans le milieu naturel (Zn, Cu, HAP). Ce type d'expérimentation pourrait être conduit avec les PCB sur les éponges et sur les moules. La distinction entre l'adsorption/désorption et la bioaccumulation lipidique devra être réalisée.

Enfin, il sera intéressant de tester d'autres molécules telles que les organo-étains, les phtalates, bisphénol A, perfluorés...pour cela l'ajustement des méthodes analytiques devra être réalisées sur chacune de ces substances.

Communications issues du programme SPONTOX 2011-2012

Publication scientifique

M-L Mahaut, O. Basuyaux, E. Baudinière, C. Chataignier, J. Pain, C. Caplat, 2012. The porifera *Hymeniacidon perlevis* (Montagu, 1818) as a bioindicator for water quality monitoring. *Environ Sci Pollut Res.*, DOI 10.1007/s11356-012-1211-7

Présentations orals & posters

Mahaut ML, O. Basuyaux, S. Le Glatin, C. Caplat, 2011. Des éponges pour surveiller la qualité de l'eau dans le golfe Normano-Breton. Colloque 2&3 Novembre 2011 Saint Malo.

O. Basuyaux, C. Caplat, S. Leglatin & M-L Mahaut, *Hymeniacidon perlevis* (Montagu, 1818), un spongiaire pour la biosurveillance des zones portuaires. En soumission pour présentation orale au Colloque Francophone d'Anaba (Algérie).

C. Caplat, O. Basuyaux, S. Leglatin & M-L Mahaut, Inventaire et état chimique des colonies de spongiaires en Basse-Normandie - *Hymeniacidon perlevis*, une espèce pertinente pour le suivi de la qualité des eaux côtières ? En soumission pour poster au Colloque Francophone d'Anaba (Algérie).

Rapports

Basuyaux O., C. Caplat, S. Le Glatin & ML Mahaut, 2012. Utilisation d'*Hymeniacidon perlevis* comme indicateur de l'environnement littoral. Travaux 2011-2012 du programme SPONTOX, Rapport d'étude AESN-CRBN-SMC : 143 p.

Presse locale

MancheMag : Décembre 2011 - Des éponges pour veiller sur l'écosystème

Ouest France : 12 décembre 2011 – L'éponge de mer détecte la pollution

BIBLIOGRAPHIE

- Abarnou A. (coord) 2000, *Les contaminants organiques – Quels risques pour le monde vivant ?*, IFREMER, Région Haute Normandie, (Programme scientifique Seine- Aval), **13**, 35 p.
- Abramowicz, D. A., 1990. Aerobic and anaerobic biodegradation of PCBs. A review. *Crit. Rev. Biotechnol.* **10**: 241–250.
- Ackers RG, Moss D, Picton B, Stone SMK, Morrow C, 2007. Sponges of the British Isles (“Sponge V”), A Colour Guide and Working Document, 1992 edition, reset with modification, 2007 *Marine Conservation Society*. 165 p
- Aiello A, Fattorusso E, Menna ML, Pansini M, 1993. The chemistry of three species of demospongiae collected from the lagoon of Venice: a comparison with some ecological implications. *Biochemical Systematics and Ecology* **21** : 655-660
- Araùjo MF, Cruz A, Humanes M, Lopes MT, Da Silva JAL, Frausto da Silva JJR, 1999. Elemental composition of Demospongiae from the estern Atlantic coastal waters. *Chemical Speciation and Bioavailability* **11** : 25-36.
- Avila C, Ballesteros M, Cimino G, Crispino A, Gavagnin M, Sodano G, 1990. Biosynthetic origin and anatomical distribution of the main secondary metabolites in the nudibranch mollusc *Doris verrucosa*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B Comparative Biochemistry* **97** : 363-368
- Basuyaux O., Caplat C., Mahaut M.L, 2010 Utilisation des spongiaires comme bioindicateurs de l'environnement littoral. Travaux 2010 du programme SPONTOX, Rapport d'étude AESN-CRBN-SMC : 110 p.
- Battershill C.N., Abraham R., 1999. Sponges, indicators of marine environmental health. *Memoirs of Queensland Museum* **44**: 50.
- Baudinière E., 2010. Etude de la répartition des Spongiaires sur la zone intertidale de la région de Basse-Normandie : recherche d'une espèce bioindicatrice de contamination dans le cadre du projet SPONTOX. *Rapport de stage du Master 2^{ème} année Cartographie et Bioproduction des Ecosystèmes*. Université de Nantes, 48pp.
- Bedard DL, Haberl ML, 1990. Influence of Chlorine Substitution Pattern on the Degradation of Polychlorinated Biphenyls by Eight Bacterial Strains. *Microb Ecol* **20** : 87-102
- Bell JJ, Barnes DKA, 2002. Density, distribution and decline of two species of unattached demosponge. *Sarsia* **87** : 110-118.
- Berthet B, Mouneyrac C, Perez T, Amiard-Triquet C, 2005. Metallothionein concentration in sponges (*Spongia officinalis*) as a biomarker of metal contamination. *Comp Biochem Physiol, Part C* **141**: 483-493
- Cao X, Zhang W, 2008. Cell Locomotion in Archaeocyte-dominant Cell Population (ADCP) Primmorph Culture of Marine Sponge *Hymeniacidon perlevis*. *Chinese Journal of Biotechnology* **24** : 2133-2134

Cao H, Xue L, Cao X, Zhang W, 2008. Laboratory adaptation of life cycle of *Hymeniacidon perlevis* explants cultured in aquarium. *Journal of Biotechnology* **136**: S551

Capon R.J., Elsbury K., Butler M.S., Lu C.C., Hooper J.N.A., Rostas J.A.P., O'Brien K.J., Mudge L.M., Sim A.T.R., 1993. Extraordinary levels of cadmium and zinc in a marine sponge, *Tedania charcoti* Topsent: inorganic chemical defence agents, *Experientia* **49**: 263-264.

Casas S., 2005. Modélisation de la bioaccumulation de métaux traces (Hg, Cd, Pb, Cu et Zn) chez la moule, *Mytilus galloprovincialis*, en milieu méditerranéen. Thèse de doctorat de l'Université du Sud, Toulon : 363 pp.

Chataigner C., 2010. Etude préliminaire de l'opportunité d'utiliser les éponges comme bioindicateur de l'environnement en Basse-Normandie. Rapport de stage Ingénieur 2010, Ecole nationale Supérieure de Chimie de Montpellier : 74 pp.

Christie WW, Brechany EY, Marekov IN, Stefanov KL, Andreev SN , 1994. The fatty acids of the sponge *Hymeniacidon sanguinea* from the Black Sea. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* **109** : 245-252

Claisse D., 2009. Adaptation de la surveillance chimique pour la DCE conformément à la directive fille 2008/105/CE, *Rapport Ifremer : convention Onema / Ifremer 2009, action n°13*, 28 pp.

Costello MJ, Myers AA., 1987. Amphipod fauna of the sponges *Halichondria panicea* and *Hymeniacidon perlevis* in Lough Hyne, Ireland. *Marine Ecology Progress Series* **41**: 115-121

Denton G.R.W., Concepcion L.P., Wood H.R., R.J Morrison, 2006. Polycyclic aromatics hydrocarbons (PAHs) in small island coastal environments : A case study from harbours in Guam, Micronesia, *Marine Pollution Bulletin*, **52** : 1090-1117.

Deslous-Paoli J.M., 1992. Les réserves énergétiques de *Mytilus edulis*, comparaison des stratégies développées dans la baie de Gdansk (Pologne) et le bassin de Marennes-Oleron. (France), Ifremer, *Actes de Colloques*, **13**: 19-28.

Erdman TR, Thomson RH, 1972. Sterols from the sponges *Cliona celata* Grant and *Hymeniacidon perleve* Montagu. *Tetrahedron*, **28** : 5163-5173 + errata in *Tetrahedron* (1973), **29** : 790

Folsom T.R., Young D.R., Johnson J.N., Pillai K.C., 1963. Manganese-54 and Zinc-65 in coastal organisms of California, *Nature*, **20**: 327-329.

Fu Q, Wu Y, Sun L, Zhang W, 2007. Efficient bioremediation of total organic carbon (TOC) in integrated aquaculture system by marine sponge *Hymeniacidon perleve*. *Biotechnol Bioeng* **97** : 1387–1397

Fu W, Liu H, Zhan W, 2008a. Molecular cloning of 14-3-3 genes in marine sponge *Hymeniacidon perleve* and its role in differentiating infectious and non-infectious bacteria. *Journal of Biotechnology* **136**: S557

Fu W, Yue R, Zhang J, Li T, 2008b. Influence of terramycin on functions of marine sponge *Hymeniacidon perleve*. *Journal of Biotechnology* **136**: S557

Furukawa K., Fujihara H., 2008. Microbial degradation of polychlorinated biphenyls: Biochemical and molecular features *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **105** : 433-449

Gaino E, Frine C, Guiseppe C, 2010. Reproduction of the intertidal sponge *Hymeniacidon perlevis* (Montagu) along a bathymetric gradient. *The Open Marine Biology Journal* **4**: 47-56

Han BC, Jeng WL, Tsai YN, Jeng MS, 1993. Depuration of copper and zinc by green oysters and blue mussels of Taiwan. *Environ Pollut* **82** : 93-97

Head IM, Jones DM, Röling WF, 2006. Marine microorganisms make a meal of oil. *Nat Rev Microbiol* **4** : 173-182.

Henocque Y., Andral B., 2003. The french approach to managing water resources in the mediterranean and the new European Water Framework Directive, *Marine Pollution Bulletin*, **47**: 155-161.

Huang J, Zhang W, 2008. 2-Haloacid dehalogenase-producing bacteria diversity isolated from marine sponge *Hymeniacidon perlevis*. *Journal of Biotechnology* **136** : S400

IFREMER, 2007. Les contaminants chimiques dans les huîtres et les moules du littoral français. Résultats du réseau de surveillance ROCCH (ex RNO) pour la période 2003-2007.

<http://envlit.ifremer.fr/var/envlit/storage/documents/parammaps/contaminants-chimiques/>

Jones DJ, 1973. Variation in trophic structure and species composition of some invertebrate communities in polluted kelp forests in the North sea *Marine Biology* **20** : 351-365

Kanazawa A, Teshima S, Hyodo S, 1979. Sterols of the sponges (porifera, class demospongiae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* **62** : 521-525

Khan M.R., Busquet R., Santos F.J., Puignou L., 2008. New method for the analysis of heterocyclic amines in meat extracts using pressurised liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, **1194** : 155-160.

Knutzen J., Sortland B., 1982. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) in some algae and invertebrates from moderately polluted partsof the coast of Norway, *Water Research*, **16**: 421-428.

Le Bizec B., Veyrand B, Brosseaud A., Sarcher L., Varlet V., Monteau F., Marchand P., Andre F, 2007. Innovative method for détermination of 19 polycyclic aromatics hydrocarbons in food and oil samples using gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry based an isotope dilution approach. *J Chromatogr A*. **1149** : 333-344.

Leys SP, Yahel G, Reidenbach MA, Tunnicliffe V, Shavit U, Reiswig HM., 2011. The Sponge Pump: The Role of Current Induced Flow in the Design of the Sponge Body Plan. *Public library of sciences one* **6**: e27787

Longo C, Corriero G, Licciano M, Stabili L, 2010. Bacterial accumulation by the Demospongiae *Hymeniacidon perlevis* : A tool for the bioremediation of polluted seawater. *Marine Pollution Bulletin* **60** : 1182-1187

Lubet P, 1959. Recherches sur le cycle sexuel et l'émission des gamètes chez les mytilides et les pectinides (Mollusques bivalves). *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*, **23** : 387-548

Mahaut ML, Basuya O, Baudinière E, Chataignier C, Pain J, Caplat C, 2012. The porifera *Hymeniacidon perlevis* (Montagu, 1818) as a bioindicator for water quality monitoring. *Environmental Sciences and Pollution Research* , [PMID 23054777](#)

Marchand M., Abarnou A., Marcaillou-Lebaut C., 1990. Les Polychlorobiphényles (PCB) en milieu marin : biogéochimie et écotoxicologie. *Rapports scientifiques et techniques de l'IFREMER*, **18** : 162 pp.

Mauvais JL, Goarnisson R, 1999. Etat de l'environnement sur la façade atlantique. Ifremer. <http://archimer.ifremer.fr/doc/1999/rapport-1097.pdf>

Montagu G, 1818. An essay on Sponges, with descriptions of all the species that have been discovered on the coast of Great Britain. *Memoirs of the Wermerian Natural History Society* **2**: 67-122

Müller WEG, Conrad J, Podeljak V, Steffen R, Zahn RK, 1982. Electron microscopical characterization of sponge aggregation factors. *Tissue and Cell* **14** : 219-223

Munsch C., Héas-Moisan K., Guiot N., Truquet I., 2005. Analyse de contaminants organiques (PCB, OCP, HAP) dans les organismes marins. Ed. Ifremer, *Méthodes d'analyse en milieu marin*, 44p.

Nechev J, Christie WW, Robaina R, de Diego F, Popov S, Stefanov K, 2004. Chemical composition of the sponge *Hymeniacidon sanguinea* from the Canary Islands. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **137**: 365-374

Navarro P., Cortazar E., Bartolomé L., Deusto M., Raposo J.C., Zuloaga O., Arana G., Etxebarria N., 2006. Comparison of solid phase extraction, saponification and gel permeation chromatography for the clean-up of microwave-assisted biological extracts in the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Journal of Chromatography A*, **1128** : 10-16.

Negri A., Burns K., Boyle S., Brinkman D., Webster N., 2006. Contamination in sediments, bivalves and sponges of McMurdo Sound, Antarctica, *Environmental Pollution*, **143** : 456-467.

Numata M., Yarita T., Aoyagi Y., Yamazaki M., Takatsu A., 2005. Investigation of saponification for determination of polychlorinated biphenyls in marine sediments, *Chemosphere*, **58** : 865-875.

Pain J., 2010. Etude de la qualité des eaux côtières appliquée au modèle biologique des éponges. *Rapport de stage du Master Chimie (1^{ère} année)*, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand. 40 pp

Patel B., Balani M.C., Patel S., 1985. Sponge 'sentinel' of heavy metals. *Sciences of the Total Environment* **41**: 143-150.

Pavoni B., Caliceti M., Sperni L., Sfriso A., 2002. Organic micropollutants (PAHs, PCBs, pesticides) in seaweeds of the lagoon of Venice. *Oceanologica Acta*, **26** : 585–596.

Pérez T., 2000. Evaluation de la qualité des milieux marins côtiers par les spongaires : état de l'art, *Bulletin de la Société Zoologique Française*, **125** : 17-25.

Pérez T., Wafo E., Fourt M., Vacelet J., 2003. Marine Sponges as Biomonitor of PCB contamination: concentration and fate of 24 congeners, *Environmental Sciences & Technologies*, **37**: 2152-2158.

Pérez T., Longet D., Schembri T., Rebouillon P., Vacelet J., 2005. Effects of 12 years' operation of sewage treatment plant on trace metal occurrence within a Mediterranean commercial sponge (*Spongia officinalis*, Desmospongiae), *Marine Pollution Bulletin*, **50**: 301-309.

Plaza-Bolanos P., Garrido Frenich A., Martinez Vidal J.L, 2010. Polycyclic aromatic hydrocarbons in food and beverages. Analytical methods and trends, *Journal of Chromatography A*, **1217**: 6303-6326.

Qu Y, Hankel D, Janussen D, Cao X, Zhang W, 2008. Morphological variations of *Hymeniacidon perlevis* in north Atlantic and China Yellow Sea. *Journal of Biotechnology* **136** : S531

Rainbow P.S., 1995. Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, **31**: 183-192.

Roberts D. A., Johnston E.L., Poor A.G.B., 2008. Contamination of marine biogenic habitats and effects upon associated epifauna, *Marine Pollution Bulletin*, **56**: 1057-1065.

Roe S., MacIsaac H.J., 1998. Temporal variation of organochlorine contaminants in the zebra mussel *Dreissena polymorpha* in Lake Erie. *Aquatic Toxicology* **41**:125-140.

Röling WFM, Head IM, Larter SR, 2003) The microbiology of hydrocarbon degradation in subsurface petroleum reservoirs: perspectives and prospects. Review Article. *Research in Microbiology*, **154** : 321-328

Ruppert, E.E., Barnes R.D., 1994. Invertebrate Zoology, Sixth Edition. *Saunders College Publishing*, Harcourt Brace and Company, Orlando, Florida. Hardcover. 1100 pp.

Schaal G, Riera P, Leroux C, 2010. Microscale variations of food web functioning within a rocky shore invertebrate community. *Mar Biol*, **158** : 623-630

Sica D, Zollo F, 1977. Free amino acids in some sponges. *Biochemical Systematics and Ecology*, **5** : 129-131

Sica D, De Simone F, Ramundo E, Zollo F, 1978. Sterols from some sponges. *Biochemical Systematics and Ecology* **6** : 77-79

Stone AR, 1970a. Growth and reproduction of *Hymeniacidon perleve* (Montagu) (Porifera) in Langstone Harbour Hampshire. *Journal of Zoology* **161** : 443–459.

Stone AR, 1970b. Seasonal variation in the gross biochemical composition of *Hymeniacidon perleve* (Montagu). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **5** : 265-271

Sun L, Zhang W, Yu XJ, Jin M, 2008. Experimental studies of the role of different cell types in morphogenesis in marine sponge *Hymeniacidon perleve*. *Journal of Biotechnology* **136**: S110

Tapie N., 2006. Contamination des écosystèmes aquatiques par les PCB et PBDE : Application à l'estuaire de la Gironde. Thèse, Université de Bordeaux I, LPTC UMR 5472, Ecole doctorale des sciences chimiques, 276 pp.

Tapie N., H. Budzinski, K. Le Ménach (2008). Fast and efficient extraction methods for the analysis of persistent organohalogened pollutants in biological matrices. *Anal. Bioanal.Chem.*, **391** : 2169-2177.

Tronczyński J., Munsch C., Héas-Moisant K., Guiot N., Truquet I., 2005. Analyse de contaminants organiques (PCB, OCP, HAP) dans les sédiments marins. Ed. Ifremer, Méthodes d'analyse en milieu marin, 44 pp.

Van Soest, R. W. M., 1977. Marine and freshwater sponges (Porifera) of the Netherlands. *Zoologische Mededelingen*, **50**, 261-273.

Van Soest RWM, 2012. *Hymeniacidon perlevis* (Montagu, 1818). In: Van Soest RWM. Boury-Esnault N, Hooper JNA, Rützler K, de Voogd NJ, Alvarez de Glasby B, Hajdu E, Pisera AB, Manconi R, Schoenberg C, Janussen D, Tabachnick KR, Klautau M., Picton B, Kelly M., Vacelet J (2012) World Porifera database.

<http://www.marinespecies.org/porifera/porifera.php?p=taxdetails&id=132663>

Xin Y, Zhang W, 2008a. Culture-independent diversity of actinobacteria associated with two marine sponges *Hymeniacidon perlevis* and Sponge sp. *Journal of Biotechnology* **136** : S615

Xin Y, Zhang W, 2008b. Marine sponge *Hymeniacidon perlevis* possesses high diversity of culturable actinobacteria. *Journal of Biotechnology* **136**: S618

Xiong G., He X., Zhang Z., 2000. Microwave-assisted extraction or saponification combined with microwave-assisted decomposition applied in pre-treatment of oil or mussel samples for the determination of polychlorinated biphenyls, *Analytica Chimica Acta*, **413**: 49-56.

Xue S, Zhang HT, Wu PC, Zhang W, Yuan Q, 2004. Study on bioactivity of extracts from marine sponges in Chinese Sea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **298** : 71-78

Xue L, Zhang X, Cao X, Zhang W, 2008. Controlled larval release and settlement of the marine sponge *Hymeniacidon perlevis* (Porifera, Demospongiae). *Journal of Biotechnology* **136** : S552

Xue L, Zhang W, 2009. Growth and survival of early juveniles of the marine sponge *Hymeniacidon perlevis* (Demospongiae) under controlled condition. *Mar Biotechnol* **11** : 640-649

Xue L, Zhang X, Zhang W, 2009. Larval release and settlement of the marine sponge *Hymeniacidon perlevis* (Porifera, Demospongiae) under controlled laboratory conditions. *Aquaculture* **290** : 132-139

Zhang W, Xue S, Zhao Q, Zhang X, Li J, Jin M, Yu X, Yuan Q.,2003. Biopotentials of marine sponges from China oceans: past and future. *Biomolecular Engineering* **20** : 413-419.

Zhang W, Cao X, Yu X, 2006. Characterization of silica spicule formation during the resuscitation and in vitro cell culture of *Hymeniacidon perleve*. *Developmental Biology* **295** : 398

Zhang W, Cao X, 2007. Dynamics of silica spicule evolution in marine sponge *Hymeniacidon perlevis* during in vitro cell culture and the seasonal development in field. *Journal of Biotechnology* **131**: S30

Zhang W, Cao X, Zhang W, 2007. Comparison of spiculogenesis in in vitro ADCP-primmorph and explants culture of marine sponge *Hymeniacidon perleve* with 3-TMOSPU supplementation. *Journal of Biotechnology* **131** : S31

Zhang X, Zhang W, Xue L, Zhang B, 2008. Feasibility of sponge *Hymeniacidon perlevis* in controlling pathogenic bacteria in turbot *Scophthalmus maximus*-culture water system. *Journal of Biotechnology* **136**: S685

ANNEXES

ANNEXE 1 : Présentation de l'A.S.E. (Extraction par Assisted Solvent Extraction)

ANNEXE 2 : Présentation du CPG/MS-MS

ANNEXE 3 : Transitions, Énergie de collision CPG/MS-MS

ANNEXE 4 : Etalonnage pour l'analyse par CPG/MS-MS

ANNEXE 5 : Concentration des échantillons par Système Genevac

ANNEXE 6 : Sélection des étalons externes ou internes

ANNEXE 7 : Optimisation des étapes de prépurification et purification

ANNEXE 8 : Méthodologie pour la recherche de la purification la plus adaptée

ANNEXE 9 : Interférences liées au seul effet de matrice : rendement des dosages

ANNEXE 10 : Interférences liées à l'effet de matrice : rendement des dosages après purification sur colonne de Fluorisil

ANNEXE 11 : Interférences liées à l'effet de matrice : rendement des dosages après purification sur colonne de Fluorisil et fragmentation des molécules interférentes

ANNEXE 12 : Interférences liées à l'effet de matrice : recherche de l'efficacité de la purification sur colonne Fluorisil pour élimination des lipides

ANNEXE 13 : Interférences liées à l'effet de matrice : influence de la composition de la colonne et des fractions éluantes

ANNEXE 14 : Mode opératoire de la Norme AFNOR (en cours de rédaction) relative à la recherche de HAP dans les corps gras.

ANNEXE 15 : Elimination des interférences dues aux lipides d'après la méthode du LABERCA, Nantes (Le Bizec *et al.*, 2007)

ANNEXE 16 : Dosages de l'éponge *Hymeniacidon perlevis* dopées en HAP et PCB et purifiées selon le protocole Silice + Alumine

ANNEXE 17 : Dosages de l'éponge *Hymeniacidon perlevis* dopées en HAP et PCB, purifiées selon le protocole Silice + Alumine, et soumises à une extraction au Florisil

ANNEXE 18 : Limites de quantification

ANNEXE 19 : Contrôles qualités

ANNEXE 20 : Expérimentations relatives à la culture de l'éponge *Hymeniacidon perlevis*

ANNEXE 21 : Article accepté en 2012 pour publication

ANNEXE 22 : Communications scientifiques en soumission lors de colloque

ANNEXE 23 : Poster réalisé pour le colloque des Aires Marines Protégées 2 & 3 novembre 2011

ANNEXE 24 : Revue de presse

ANNEXE 1

Présentation de l'A.S.E. (Extraction par Assisted Solvent Extraction)

L'A.S.E (Assisted Solvent Extraction), connue aussi sous le nom de P.L.E (Pressurized Liquid Extraction) est une méthode d'extraction permettant le traitement rapide et économique en solvant d'une grande quantité d'échantillons solides.

L'appareil (figure 1) impose une température et une pression de manière à placer le solvant utilisé dans un état proche de l'état supercritique, état où le solvant présente des capacités d'extraction optimales. Dans ce domaine, la température élevée permet une solubilité et une diffusion importante des composés liposolubles dans le solvant, tandis que la pression, maintenant le solvant en dessous de son point d'ébullition, permet une pénétration importante de celui-ci dans la matrice. De fait, l'A.S.E permet une extraction efficace avec un volume de solvant utilisé très faible (entre 15 et 40 mL), en un laps de temps court (15-20 min) selon le schéma de fonctionnement présenté à la figure 2 de cette annexe.

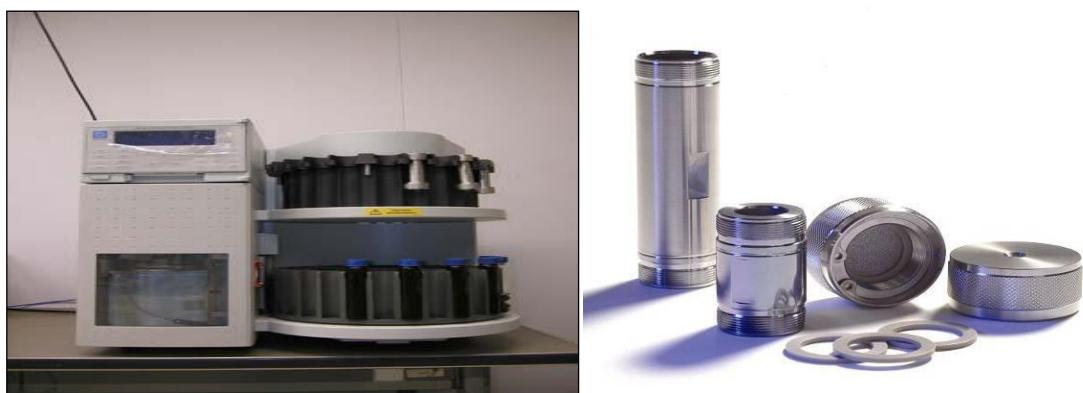


Figure 1 : Appareil ASE
Dionex 200 + cellule ASE

Schéma ASE

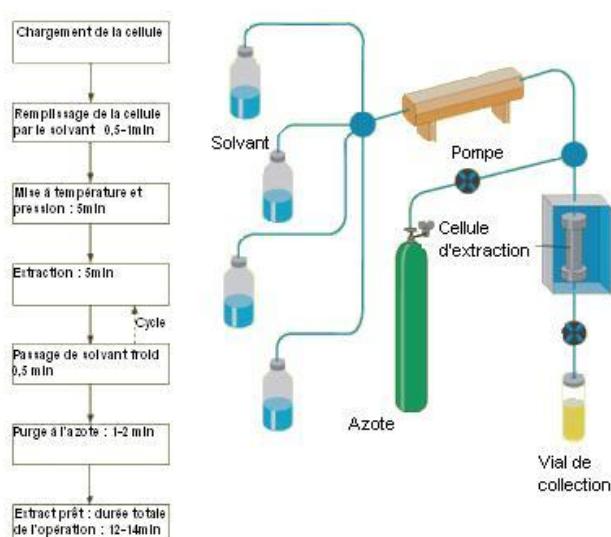


Figure 2 : Schéma de fonctionnement de l'appareil A.S.E

ANNEXE 2

Présentation du CPG/MS-MS

L'appareil de CPG/MS-MS (figure 1) est un spectromètre de masse à triple quadripôle couplé à un système de chromatographie en phase gazeuse. Cet appareil offre une technique d'identification et de quantification basée sur l'étude des fragments des molécules. Ces fragments sont formés sous vide par fragmentation de l'ion moléculaire à l'aide d'Argon. Ils sont caractérisés par un rapport m/z (masse sur charge, z généralement égal en valeur absolue à l'unité). Ces ions issus de la fragmentation permettent au terme de l'analyse de donner une information structurale et une quantification du composé analysé.

- La chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition, aux composés relativement volatils et thermiquement stables. Le chromatographe est composé d'un injecteur, d'une unité d'alimentation en gaz, d'un four à température réglable où est fixée la colonne capillaire, d'un détecteur et d'un enregistreur. Il existe plusieurs types de détecteurs mais le spectromètre de masse est le plus adapté à notre manipulation puisqu'il est le seul à fournir des informations structurales sur les composés séparés.



Figure 1 : Appareil de GC /MS – MS (Thermo) / Quadripôle Q0

- La spectrométrie de masse à triple quadripôle

La spectrométrie de masse à triple quadripôle est une technique très sélective. Les ions accélérés et focalisés dans le quadripôle Q0 arrivent dans un second quadripôle (Q1, Figure 2). Q1 a pour rôle de sélectionner les ions caractéristiques de l'analyte et de les envoyer vers le troisième quadripôle (Q2)

où ils entreront en collision avec des atomes de gaz inerte (Argon). Cette fragmentation des fragments permet d'obtenir une sélectivité plus importante puisque les fragments obtenus sont spécifiques des ions sélectionnés par Q1. Le dernier quadripôle (Q3) permet d'obtenir une sensibilité optimale puisqu'il est réglé comme un filtre, ne laissant passer que les ions caractéristiques des composés étudiés. Ce mode, qui est appelé MRM (Multiple Reaction Monitoring), offre une sensibilité de détection optimale par rapport aux autres modes de balayage et est donc un mode de choix pour la quantification.

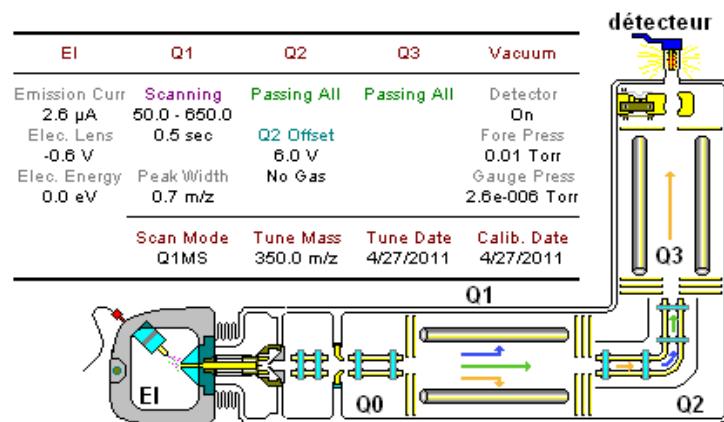


Figure 2 : Schéma du triple quadripôle

ANNEXE 3

Transitions, Énergie de collision CPG/MS-MS

Composé	ion parent	ion fils	E _{collision} (eV)	transition n°
naphtalène	128,00	102,0	15	1
	128,00	128,0	5	2
acénaphthylène	152,00	151,0	10	1
	152,00	126,0	30	2
	152,00	152,0	5	3
acénaphthène	154,00	153,0	10	1
	154,00	154,0	4	2
fluorène	166,00	165,0	10	1
	166,00	166,0	5	2
anthracène	178,00	176,0	28	1
	178,00	151,0	32	2
phénanthrène	178,00	176,0	32	1
	178,00	177,0	30	2
PCB 28	256,00	186,0	20	1
	258,00	186,0	20	2
PCB 52	290,00	220,0	23	1
	290,00	220,0	20	2
	292,00	222,0	22	3
fluoranthène	202,00	201,0	30	1
	202,00	202,0	10	2
pyrène	202,00	201,0	20	1
	202,00	202,0	10	2
PCB 101	324,00	254,0	20	1
	328,00	256,0	25	2
	326,00	256,0	25	3
PCB 118	326,00	256,0	25	1
	328,00	256,0	25	2
	324,00	254,0	10	3
PCB 153	360,00	290,0	25	1
	358,00	288,0	25	2
	362,00	290,0	25	3
PCB 138	360,00	290,0	25	1
	358,00	288,0	25	2
	362,00	290,0	25	3
benzo(a)anthracène	228,00	226,0	30	1
	228,00	228,0	5	2
chrysène	228,00	226,0	30	1
	228,00	226,0	5	2
PCB 180	394,00	324,0	25	1
	396,00	324,0	22	2
	392,00	322,0	25	3
benzo(b)fluoranthène	252,00	250,0	35	1
	252,00	252,0	5	2
benzo(k)fluoranthène	252,00	250,0	35	1

	252,00	252,0	5	2
benzo(a)pyrène	252,00	252,0	5	1
	252,00	250,0	35	2
	252,00	225,0	40	3
	252,00	178,0	40	4
indéno(1,2,3-c,d)pyrène	276,00	276,0	10	1
	276,00	274,0	35	2
dibenzo(a,h)anthracène	278,00	278,0	10	1
	278,00	276,0	35	2
benzo(g,h,i)pérylène	276,00	276,0	10	1
	276,00	274,0	35	2
anthracène d10	188,00	184,0	30	1
	188,00	160,0	28	2
benzo(a)pyrène d12	264,00	260,0	30	1
	264,00	262,0	35	2
PCB 103	326,00	291,0	10	1
	326,00	256,0	25	2
	326,00	254,0	25	3
PCB 198	430,00	360,0	30	1
	430,00	395,0	20	2

ANNEXE 4

Etalonnage pour l'analyse par CPG/MS-MS

La solution étalon est une solution multiéléments (HAP : Techlab / PCB : Accustandard / Chlorés : Techlab) regroupant les étalons internes et les composés analysés.

Composés (ng/mL)	g1	g2	g3	g4	g5
HAP	2,5	5	10	15	20
PCB	1,25	2,5	5	7,5	10
anthracène d10 ^a	10	10	10	10	10
benzo(a)pyrène d12 ^b	10	10	10	10	10
PCB 103 ^c	5	5	5	5	5
PCB 198 ^d	5	5	5	5	5
Chlorés	2,5	5	10	15	20
2,4-DDT d8 ^e	10	10	10	10	10

Composition des différents éléments de la gamme (g1 à g5)

^a anthracène d10 (Ehrenstofer) caractéristique des HAP dits « légers » : naphtalène, acénaphtylène, acénaphtène, fluorène, anthracène, phénanthrène.

^b benzo(a)pyrène d12 (Ehrenstofer) caractéristique des HAP dits « lourds » : fluoranthène, pyrène, benzo(a)anthracène, chrysène, benzo(b)fluoranthène, benzo(k)fluoranthène, benzo(a)pyrène, indéno(1,2,3-c,d)pyrène, dibenzo(a,h)anthracène, benzo(g,h,i)pérylène.

^c PCB 103 (Ehrenstofer) caractérise les PCB 28, 52 et 101.

^d PCB 198 (Accustandard) caractérise les PCB 118, 153, 138 et 180.

^e 2,4'-DDT d8 (Ehrenstofer) caractéristique des composés dit « chlorés » inclus dans la gamme pour lesquels il faudra adapter le protocole.

ANNEXE 5

Concentration des échantillons par Système Genevac

Cette étape permet de concentrer l'échantillon pour la purification ou pour le dosage par CPG-MS/MS. L'appareil utilisé est le Genevac (Figure 1) Cet appareil permet d'évaporer le solvant (hexane) en abaissant la pression et en chauffant légèrement, tout en empêchant l'évaporation des composés recherchés, composés étant piégés dans un solvant appelé « keeper », (utilisation de l'iso-octane).



Figure 1 : Appareil Genevac Rocket

Cet appareil exploite la différence de point d'ébullition et de pression de vapeur saturante entre le solvant et le « keeper ». En effet, le « keeper » est choisi comme étant plus difficile à évaporer que le solvant d'origine. Les composés à analyser seront donc en solution dans le « keeper ».

De plus, l'appareil offre une centrifugation importante, ce qui permet de maintenir une surface d'échange plus importante, et donc une évaporation plus rapide. Le « keeper » est donc récupéré dans un vial.

ANNEXE 6

Sélection des étalons externes ou internes

Les étalons internes utilisés sont l'anthracène d10, le benzo(a)pyrène d12, le 2,4'-DDT d8, le PCB 101 et le PCB 198.

Un comparatif des valeurs obtenues en étalonnage interne et externe est présenté sur les tableaux ci-dessous avec l'étude des échantillons tests 43 à 48.

Rendements obtenus en étalonnage externe :

Composés	rendement T43	rendement T44	rendement T45	rendement T46	rendement T47	rendement T48
naphtalène	53%	53%	70%	53%	49%	19%
acénaphtylène	62%	49%	64%	60%	59%	16%
acénaphthène	61%	61%	71%	59%	50%	9%
fluorène	64%	60%	76%	63%	52%	15%
anthracène	108%	82%	89%	90%	93%	32%
phénanthrène	91%	74%	86%	47%	33%	22%
PCB 28	95%	78%	96%	92%	77%	54%
PCB 52	81%	73%	100%	92%	63%	50%
fluoranthène	99%	81%	131%	118%	95%	68%
Pyrène	125%	92%	123%	113%	113%	85%
PCB 101	79%	62%	106%	98%	75%	52%
PCB 118	128%	92%	113%	133%	124%	61%
PCB 153	131%	103%	145%	130%	129%	82%
PCB 138	107%	91%	139%	126%	100%	76%
Benzo(a)anthracène	142%	100%	138%	143%	114%	83%
chrysène	133%	101%	149%	138%	129%	84%
PCB 180	121%	88%	133%	111%	78%	53%
benzo(b)fluoranthène	139%	106%	150%	143%	129%	83%
benzo(k)fluoranthène	135%	105%	149%	142%	78%	84%
benzo(a)pyrène	139%	103%	145%	137%	118%	80%
indéno(1,2,3-c,d)pyrène	149%	113%	143%	137%	112%	89%
dibenzo(a,h)anthracène	160%	129%	162%	147%	163%	98%
benzo(g,h,i)pérylène	140%	107%	141%	134%	132%	79%

Résultats obtenus en étalonnage externe (rendements en gris = rendements hors de la tranche recherchée (60-140%)

Rendements obtenus en étalonnage interne :

	rendement T43	rendement T44	rendement T45	rendement T46	rendement T47	rendement T48
naphthalène	129%	101%	85%	88%	124%	82%
acénaphtylène	139%	123%	86%	97%	190%	75%
acénaphtène	158%	174%	98%	105%	225%	72%
fluorène	155%	163%	101%	108%	221%	80%
anthracène	232%	185%	103%	134%	266%	156%
phénanthrène	190%	168%	106%	126%	226%	135%
PCB 28	115%	102%	102%	99%	105%	132%
PCB 52	110%	107%	113%	105%	106%	146%
fluoranthène	76%	73%	92%	87%	67%	83%
Pyrène	95%	80%	84%	82%	76%	102%
PCB 101	61%	73%	88%	74%	63%	67%
PCB 118	94%	107%	93%	81%	104%	77%
PCB 153	94%	116%	115%	93%	105%	99%
PCB 138	84%	115%	116%	94%	94%	103%
Benzo(a)anthracène	116%	104%	109%	108%	102%	111%
chrysène	110%	92%	104%	103%	95%	105%
PCB 180	98%	122%	115%	87%	87%	84%
benzo(b)fluoranthène	115%	104%	110%	106%	102%	111%
benzo(k)fluoranthène	105%	96%	105%	105%	96%	106%
benzo(a)pyrène	115%	102%	105%	104%	95%	111%
indéno(1,2,3-c,d)pyrène	104%	89%	93%	92%	89%	91%
dibenzo(a,h)anthracène	108%	97%	104%	99%	92%	93%
benzo(g,h,i)pérylène	107%	95%	98%	98%	93%	94%

Résultats obtenus en étalonnage interne (rendements en gris = rendements hors de la tranche recherchée (60-140%)

Résultats :

- rendements sont plus satisfaisants qu'en étalonnage externe car moins de composés situés hors de la tranche de rendement fixée.

- quelques composés hors de la fourchette de rendement recherchée : l'acénaphtène, le fluorène, l'anthracène et le phénanthrène.

- pour ces composés, l'utilisation de l'anthracène d10 n'apporte aucune amélioration. Ce manque de reproductibilité peut être dû à la préparation de l'anthracène d10, qui l'amène à être 10 fois moins concentré que les autres composés, proche de la limite de quantification. Ainsi, les aires de l'étalon sur les chromatogrammes étaient très faibles, et la moindre variation de l'aire provoque des variations de concentrations importantes.

- pour les autres composés étudiés, l'étalonnage interne apporte une grande amélioration des rendements. Ce mode d'étalonnage permet donc de négliger les pertes dues à la manipulation, et offre une répétabilité relativement importante.

Optimisation des étapes de prépurification et purification

- Protocole de prépurification :

but : élimination des pigments et lipides présents dans l'extrait

- lavage en milieu acide dans 60 mL d'acide sulfurique
- temps de décantation : 2 heures

- Protocoles de 4 purifications testées

- 1) protocole type « Silice-Alumine » (Munschy *et al.*, 2005 ; Tronczynski *et al.*, 2005) : purification par absorption sur colonne de silice et d'alumine
 - éluants utilisés :
 - 1^{ère} fraction : hexane (36mL) et mélange hexane-dichlorométhane (30mL, 90/10)
 - 2^{ème} fraction : mélange hexane-dichlorométhane (20mL, 75/25)
- 2) protocole type « Florisil-Alumine » : purification par absorption sur colonne de Florisil et d'Alumine.
 - éluants utilisés :
 - 1^{ère} fraction : hexane (40 mL)
 - 2^{ème} fraction : mélange hexane-dichlorométhane (40mL, 75/25)
 - 3^{ème} fraction : mélange hexane-dichlorométhane (40mL, 50/50)
- 3) protocole Florisil activé : purification par absorption sur colonne de Florisil activé à 150°C pendant 24 heures.
 - éluants utilisés :
 - 1^{ère} fraction : hexane (40 mL)
 - 2^{ème} fraction : mélange hexane-dichlorométhane (40mL, 75/25)
 - 3^{ème} fraction : mélange hexane-dichlorométhane (40mL, 50/50)
- 4) protocole Florisil : purification par absorption sur colonne de Florisil
 - éluants utilisés :
 - 1^{ère} fraction : hexane (40 mL)
 - 2^{ème} fraction : mélange hexane-dichlorométhane (40mL, 75/25)
 - 3^{ème} fraction : mélange hexane-dichlorométhane (40mL, 50/50)

ANNEXE 8

Méthodologie pour la recherche de la purification la plus adaptée

Protocole :

- introduction de 0,5mL d'un point de gamme g3 (cf annexe 4) en haut de colonne
- concentration et dosage des fractions récupérées
- pourcentage d'acceptabilité d'une concentration : $\pm 40\%$

Protocoles	1	2	3	4	C théorique
Composés (ng/mL)	Silice-Alumine	Florisil + alumine	Florisil activé	Florisil	
naphtalène	8,73	2,32	18,12	2,97	10,00
acénaphtylène	8,00	8,25	19,21	7,96	10,00
acénaphtène	7,73	6,60	ND	6,60	10,00
fluorène	16,78	9,67	7,41	9,61	10,00
anthracène	43,45	10,60	6,73	10,22	10,00
phénanthrène	4,62	1,99	ND	1,81	10,00
PCB 28	4,83	4,40	5,95	4,39	5,00
PCB 52	4,00	4,17	7,62	4,32	5,00
fluoranthène	22,58	9,52	8,70	9,97	10,00
pyrène	15,32	1,75	ND	1,61	10,00
PCB 101	4,98	4,01	8,70	4,08	5,00
PCB 118	5,81	4,58	6,87	4,98	5,00
PCB 153	4,62	5,02	5,07	5,31	5,00
PCB 138	4,64	4,99	9,52	5,83	5,00
benzo(a)anthracène	13,29	4,31	0,00	3,97	10,00
chrysène	13,64	8,25	8,26	10,86	10,00
PCB 180	3,08	5,69	9,59	5,85	5,00
benzo(b)fluoranthène	13,30	6,64	ND	9,76	10,00
benzo(k)fluoranthène	14,17	6,32	ND	7,88	10,00
benzo(a)pyrène	15,30	4,32	ND	2,21	10,00
indeno(1,2,3-c,d)pyrène	13,16	6,19	ND	4,92	10,00
dibenzo(a,h)anthracène	16,98	7,01	ND	5,89	10,00
benzo(g,h,i) pérylène	14,70	6,45	15,95	3,97	10,00

Résultats obtenus après les différentes purifications

ANNEXE 9

Interférences liées au seul effet de matrice : rendement des dosages

Protocole :

- dopage d'un échantillon d'*Hymeniacidon perlevis* préalablement extrait et purifié
- calculs des rendements à partir d'une concentration théorique égale à celle dans le point de gamme ayant servi au dopage (g6 le cas présent).

Composés	EP1
naphtalène	8784%
acénaphtylène	83%
acénaphtène	94%
fluorène	96%
anthracène	102%
phénanthrène	108%
PCB 28	100%
PCB 52	88%
fluoranthène	97%
pyrène	100%
PCB 101	81%
PCB 118	104%
PCB 153	107%
PCB 138	96%
benzo(a)anthracène	82%
chrysène	89%
PCB 180	65%
benzo(b)fluoranthène	48%
benzo(k)fluoranthène	104%
benzo(a)pyrène	1983%
indeno(1,2,3-c,d)pyrène	82%
dibenzo(a,h)anthracène	65%
benzo(g,h,i) pérylène	65%

Rendements obtenus lors de l'étude de l'effet de matrice

Conclusion :

effet de matrice pour le naphtalène et le benzo(a)pyrène (rendements très supérieurs à 100%)

ANNEXE 10

Interférences liées à l'effet de matrice : rendement des dosages après purification sur colonne de Fluorisil

Protocole :

- Dopage de six échantillons d'*Hymeniacidon perlevis* (EP1 à EP6)
- Purification sur colonne au Fluorisil
 - 1^{ère} fraction : hexane (40 mL)
 - 2^{ème} fraction : mélange hexane-dichlorométhane (40mL, 75/25)
 - 3^{ème} fraction : mélange hexane-dichlorométhane (40mL, 50/50)
- Analyse par CPG/MS-MS
- Calculs des rendements à partir rendements par rapport aux concentrations théoriques attendues.

	EP1	EP2	EP3	EP4	EP5	EP6
naphtalène	24039%	25339%	54348%	46842%	50762%	35900%
acénaphtylène	245%	133%	84%	74%	75%	31%
acénaphtène	61%	ND	ND	ND	13%	ND
fluorène	113%	57%	177%	126%	257%	61%
anthracène	128%	87%	115%	205%	204%	55%
phénanthrène	23%	ND	ND	27%	33%	10%
PCB 28	90%	90%	ND	ND	61%	18%
PCB 52	83%	69%	51%	78%	56%	16%
fluoranthène	163%	93%	89%	221%	244%	82%
pyrène	102%	83%	36%	184%	234%	81%
PCB 101	115%	57%	84%	95%	79%	27%
PCB 118	155%	112%	92%	108%	88%	26%
PCB 153	113%	143%	114%	184%	142%	41%
PCB 138	122%	153%	105%	171%	138%	35%
benzo(a)anthracène	68%	82%	89%	79%	134%	35%
chrysène	129%	27%	64%	280%	237%	58%
PCB 180	70%	112%	80%	104%	75%	27%
benzo(b)fluoranthène	ND	ND	ND	ND	ND	ND
benzo(k)fluoranthène	131%	140%	126%	ND	ND	ND
benzo(a)pyrène	3915%	-	-	-	-	-
indeno(1,2,3-c,d)pyrène	130%	94%	88%	ND	125%	ND
dibenzo(a,h)anthracène	83%	100%	ND	ND	506%	63%
benzo(g,h,i) perylène	131%	76%	82%	195%	649%	ND

Rendements après ajouts dans la matrice « éponge » et purification sur colonne au Florisil

ANNEXE 11

Interférences liées à l'effet de matrice : rendement des dosages après purification sur colonne de Fluorisil et fragmentation des molécules interférentes

But du protocole : améliorer les transitions plus spécifiques des HAP « lourds » et fragmenter les molécules interférentes avec le naphtalène et le benzo(a)pyrène en appliquant des transitions type :

- ion parent : masse molaire du composé
- ion fils : masse molaire du composé
- énergie de collision : 50eV.

	EP7	EP8	EP9	EP10	EP11	EP 14
naphthalène	20738%	135231%	106009%	83133%	197534%	247618%
acénaphtylène	25%	528%	328%	17%	16%	15%
acénaphtène	ND	ND	ND	34%	38%	2822%
fluorène	49%	ND	ND	74%	77%	92%
anthracène	51%	410%	150%	178%	181%	224%
phénanthrène	12%	75%	74%	ND	ND	68%
PCB 28	14%	180%	137%	72%	94%	83%
PCB 52	14%	177%	143%	81%	69%	94%
fluoranthène	69%	ND	ND	139%	167%	215%
pyrène	78%	54%	ND	67%	75%	145%
PCB 101	26%	132%	110%	84%	91%	89%
PCB 118	< LQ	133%	48%	42%	83%	67%
PCB 153	35%	279%	95%	112%	119%	142%
PCB 138	24%	188%	169%	66%	69%	87%
benzo(a)anthracène	36%	ND	ND	53%	59%	70%
chrysène	43%	ND	ND	110%	121%	149%
PCB 180	22%	73%	49%	43%	52%	69%
benzo(b)fluoranthène	ND	ND	ND	90%	74%	89%
benzo(k)fluoranthène	ND	ND	ND	89%	101%	123%
benzo(a)pyrène	-	-	-	-	-	-
indeno(1,2,3-c,d)pyrène	ND	52%	51%	64%	84%	110%
dibenzo(a,h)anthracène	65%	106%	126%	49%	58%	88%
benzo(g,h,i) pérylène	ND	51%	37%	49%	78%	98%

Rendements après ajouts dans la matrice « éponge » et purification sur colonne au Florisil avec amélioration des transitions et fragmentation des molécules interférentes

Résultats

- amélioration des rendements en HAP « lourds »
- transitions testées ne semblent pas éliminer les interférents (naphtalène en concentration toujours trop importante, benzo (a)pyrène est toujours confondu avec interférences spectrales)

ANNEXE 12

Interférences liées à l'effet de matrice : recherche de l'efficacité de la purification sur colonne Florisil pour élimination des lipides

But du protocole : évaluer l'efficacité des phases stationnaires utilisées pour éliminer les lipides issus des éponges.

Etape	Extraction ASE acide	Extraction ASE acide + passage sur Florisil	Extraction ASE acide + lavage acide + passage sur Florisil	Extraction ASE acide + lavage acide + passage sur silice acide / Florisil
Taux de lipides	2,04 %	1,70%	0,50%	ND

Evolution du taux de lipides en fonction des étapes du protocole

Résultats : un passage sur colonne de Florisil ne permet pas d'éliminer la totalité des lipides présents dans l'échantillon

ANNEXE 13

Interférences liées à l'effet de matrice : influence de la composition de la colonne et des fractions éluantes

But : trouver les compositions de la colonne et des fractions éluantes les plus efficaces lors de la purification.

		EP20	EP21	EP22	EP23	EP24
Colonne	Florisil	5 g	0 g	0 g	2 g	2 g
	Silice acidifiée	5 g	10 g	10 g	10 g	10 g
Eluant	1 ^{ère} fraction	Hexane	40 mL	80 mL	75 % 60 mL	75 % 80 mL
	2 ^{ème} fraction	Hexane	75 %	75 %	75 % 60 mL	75 % 80 mL
		Dichlorométhane	25 %	25 %	25 % 60 mL	25 % 80 mL
	3 ^{ème} fraction	Hexane	50 %	50 %	50 % 60 mL	50 % 80 mL
		Dichlorométhane	50%	50%	50 % 60 mL	50 % 80 mL

Résultats

	EP20	EP21	EP22	EP23	EP24
naphtalène	1969%	18505%	7623%	37686%	25861%
acénaphtylène	18%	70%	17%	228%	77%
acénaphtène	9%	377%	118%	526%	253%
Fluorène	80%	164%	37%	103%	76%
anthracène	142%	131%	49%	240%	136%
phénanthrène	10%	16%	12%	33%	22%
PCB 28	91%	25%	17%	51%	33%
PCB 52	58%	18%	32%	61%	44%
fluoranthène	102%	52%	24%	138%	146%
Pyrène	20%	94%	13%	162%	394%
PCB 101	119%	26%	32%	67%	50%
PCB 118	90%	18%	30%	52%	56%
PCB 153	55%	11%	13%	30%	18%
PCB 138	79%	10%	17%	43%	28%
benzo(a)anthracène	51%	16%	ND	46%	36%
Chrysène	97%	8%	16%	45%	40%
PCB 180	87%	16%	31%	47%	55%
benzo(b)fluoranthène	89%	16%	25%	76%	65%
benzo(k)fluoranthène	52%	16%	8%	37%	30%
Benzo(a)pyrène	1078%	2504%	3411%	7461%	5715%
indeno(1,2,3-c,d)pyrène	41%	ND	ND	ND	94%
dibenzo(a,h)anthracène	40%	270%	38%	417%	472%
benzo(g,h,i) pérylène	13%	ND	ND	103%	39%

Résultats des différents tests de purifications

Bilan :

- présence de 5g de Florisil dans la colonne nécessaire car interférences (cellules grisées dans le tableau) en absence de 5g de Florisil
- 5g de silice acidifiée à ajouter complémentairement pour améliorer la purification
- nécessité d'augmenter le volume des phases mobiles utilisées :
 - EP 20 : Eluants 40 mL – rendements acénaphtylène et acénaphtène : 10 à 20%
 - EP21 à EP24 Eluants 60 à 80 mL - rendements acénaphtylène et acénaphtène acceptables

ANNEXE 14

Mode opératoire de la Norme AFNOR (en cours de rédaction) relative à la recherche de HAP dans les corps gras.

Protocole :

- extraction par système A.S.E., hexane (50 %)/acétone (50 %), silice acide.
- extraction liquide-liquide pour les composés aliphatiques et lipides (extrait introduit dans une ampoule contenant 10mL d'un mélange DMF (90 %)/eau (10%) puis lavages à l'hexane par 3x10mL.
- récupération de la phase de DMF
- introduction de la phase DMF dans une ampoule contenant 100mL d'eau ultrapure.
- extraction des PCB et HAP par 2 extractions par 10mL d'hexane.
- passage sur colonne de 5g de Florisil (élution par 40mL d'hexane, 40mL d'un mélange hexane (75 %)/ DCM (25%) et 40mL d'un mélange hexane(50%) / DCM (50 %).

	EP35	EP36	EP 38	EP 39	EP 41	EP 42	rendement moyen	ecart type
naphthalène	97%	79%		100%	52%	60%	78%	21%
acénaphtylène	18%	18%	40%	32%	8%	7%	20%	13%
acénaphtène	18%	21%	36%	30%	6%	5%	19%	13%
fluorène	35%	24%	67%	48%	14%	12%	33%	21%
anthracène		70%	84%	154%	66%	75%	90%	36%
phénanthrène			48%		23%	14%	29%	18%
PCB 28	51%	17%		51%	8%	5%	26%	23%
PCB 52	42%	15%	111%	57%	9%	6%	40%	40%
fluoranthène		68%	76%	150%	88%	78%	92%	33%
pyrène	129%	33%	97%	159%	96%	91%	101%	42%
PCB 101	57%	22%	82%	49%	7%	5%	37%	31%
PCB 118	66%	26%	82%	76%	11%	7%	45%	34%
PCB 153	66%	22%	81%	49%	7%	4%	38%	32%
PCB 138	69%	23%	70%	35%	5%	3%	34%	30%
benzo(a)anthracène	65%	33%	63%	128%	22%	20%	55%	41%
chrysène		98%	66%	50%	58%	62%	67%	18%
PCB 180	69%	27%	95%	35%	5%	0%	38%	37%
benzo(b)fluoranthène		160%	73%	105%	67%	69%	95%	40%
benzo(k)fluoranthène	110%	110%	50%	70%	30%	31%	67%	36%
benzo(a)pyrène	73%	28%	41%	94%	47%	44%	54%	24%
indeno(1,2,3-c,d)pyrène	49%	91%	81%	134%	48%	42%	74%	35%
dibenzo(a,h)anthracène	94%	96%	56%	105%	22%	17%	65%	39%
benzo(g,h,i) pérylène	36%	74%	53%	126%	22%	13%	54%	42%

Rendements moyens calculés pour le protocole AFNOR

ANNEXE 15

Elimination des interférences dues aux lipides d'après la méthode du LABERCA, Nantes (Le Bizec et al., 2007)

Protocole :

- introduire dans une cellule ASE (DIONEX) la phase d'extraction suivante :
 - 12g de florisol
 - 2 g d'échantillon
 - Silice provenant de diatomées
 - des étalons internes ayant subi une imprégnation de 12 heures
 - mélange acétone + hexane (50/50)
- concentrer l'éluat dans un volume d'environ 1ml à l'aide du système Genevac Rocket (annexe 5) avec un solvant keeper (isoctane)
- purifier l'extrait sur une colonne dotée d'un bouchon de laine de verre et remplie d'hexane dans laquelle on introduit
 - 7g de gel de silice désactivé
 - 7g d'oxyde d'aluminium désactivé
- Phases éluantes :
 - Hexane
 - Hexane + dichlorométhane (90 %/10 %)
 - Hexane + dichlorométhane (75%/25%)

La concentration de l'éluat est réalisée de préférence sur Genevac en utilisant un solvant keeper (isoctane)



Etapes de purification

ANNEXE 16

Dosages de l'éponge *Hymeniacidon perlevis* dopées en HAP et PCB et purifiées selon le protocole Silice + Alumine

Etalons internes utilisés : anthracène d10 (Ehrenstofer), benzo(a)pyrène d12 (Ehrenstofer), PCB 103 (Ehrenstofer) PCB 198 (Accustandard).

Matrice dopée : *Hymeniacidon perlevis* prélevée sur la région de Lingreville (50).

Concentration en HAP : 5 ng/ml

Concentration en PCB : 2,5 ng/ml

Composés	SiAl 1	SiAl 2	SiAl 3	SiAl 4
Naphtalène	241,6	247,6	106,8	118
Acénaphtylène	91,2	94,4	100,8	98,4
Acénaphthène	96	97,2	100	101,2
Fluorène	131,00	150	104	103,6
Anthracène	168,60	206,4	111,80	108,60
Phénanthrène	92	102,60	103,40	95,40
Fluoranthène	87,6	91,6	82,4	90,4
Pyrène	88,60	94	85,6	93,40
Benzo(a)anthracène	97,40	105,00	92,4	92,20
Chrysène	96,60	103,40	104	99,2
Benzo(b)fluoranthène	86,8	96,20	81,40	86
Benzo(k)fluoranthène	82	95,40	80,8	85,6
Benzo(a)pyrène	88	95,6	89,6	84,20
Indeno(1,2,3c-d)pyrène	101,6	98,20	88	100,20
Dibenzo(a,h)anthracène	101,00	90,8	72,60	91,20
Benzo(g,h,i)pérylène	87,80	91,80	79,80	87,00
PCB 28	110,00	107,2	110,00	107,60
PCB 52	106,80	108	108,40	103,2
PCB 101	100,8	110,8	114,00	114,00
PCB 118	98,4	110,4	115,60	108,8
PCB 153	100,40	108,00	104,40	112
PCB 138	105,20	110,00	110,80	107,60
PCB 180	102,4	114,4	108	109,6

Premiers essais purification silice-Alumine

Bilan : rendements corrects (compris entre 80 et 120 %)

ANNEXE 17

Dosages de l'éponge *Hymeniacidon perlevis* dopées en HAP et PCB, purifiées selon le protocole Silice + Alumine, et soumises à une extraction au florisil

Etalons internes utilisés : anthracène d10 (Ehrenstofer), benzo(a)pyrène d12 (Ehrenstofer), PCB 103 (Ehrenstofer) PCB 198 (Accustandard).

Matrices dopées : *Hymeniacidon perlevis* et *Mytilus edulis* prélevées sur la région de Lingreville (50)

Concentration en HAP : 5 ng/ml

Concentration en PCB : 2,5 ng/ml

Masse de Florisil dans la cellule d'extraction : 12 g

	<i>M. edulis</i>		<i>H. perlevis</i>						
Naphtalène		124	117	74	111	105	54	55	95
Acénaphtylène	98	106	94	76	83	78	72	80	81
Acénaphtène	66	94	94	84	84	83	55	77	78
Fluorène	36	104	111	93	86	88	75	80	82
Anthracène	-85	102	121	116	107	121	92	106	113
Phénanthrène	88	109	108	109	97	98	93	95	115
Fluoranthène	80	88	108	129	101	100	101	128	99
Pyrène	75	71	122	148	88	84	101	152	124
Benzo(a)anthracène	105	104	108	112	108	111	104	94	88
Chrysène	113	121	106	115	109	98	106	110	110
Benzo(b)fluoranthène	107	110	107	129	98	90	101	120	117
Benzo(k)fluoranthène	92	103	109	131	98	91	92	99	97
Benzo(a)pyrène	97	98	0	0	79	81	85	114	110
Indeno(1,2,3c-d)pyrène	108	113	119	134	95	79	101	125	115
Dibenzo(a,h)anthracène	119	118	114	111	101	114	103	111	110
Benzo(g,h,i)pérylène	97	102	113	124	94	86	95	110	106
PCB 28	103	103	111	106	110	111	101	110	97
PCB 52	108	96	105	103	101	102	98	105	96
PCB 101	79	74	96	96	91	93	94	100	92
PCB 118	85	78			94	98	100	94	94
PCB 153	84	81	114	112	89	92	107	98	94
PCB 138	84	84	116	114	92	99	98	98	96
PCB 180	93	87	112	117	94	95	93	91	96

Rendements après extraction ASE (florisil et purification Silice-Alumine)

Bilan : - rendements corrects (compris entre 80 et 100 %)

- essais répétables (essais réalisés sur 4 semaines, Janvier 2012)

- rendements des étalons internes corrects pour l'ensemble des essais.

ANNEXE 18

Limites de quantification

Protocole :

- calcul des limites de quantification sur les matrices des moules et des éponges à partir du premier point de gamme et de la masse introduite

Composés	µg/kg sec
Naphtalène	2.5
Acénaphtylène	2.5
Acénaphtène	2.5
Fluorène	2.5
Anthracène	2.5
Phénanthrène	2.5
Fluoranthène	2.5
Pyrène	2.5
Benzo(a)anthracène	2.5
Chrysène	2.5
Benzo(b)fluoranthène	2.5
Benzo(k)fluoranthène	2.5
Benzo(a)pyrène	2.5
Indeno(1,2,3c-d)pyrène	2.5
Dibenzo(a,h)anthracène	2.5
Benzo(g,h,i)pérylène	2.5

PCB 28	1.25
PCB 52	1.25
PCB 101	1.25
PCB 118	1.25
PCB 153	1.25
PCB 138	1.25
PCB 180	1.25

Limite de quantification des HAP & PCB

ANNEXE 19

Contrôles qualités

Réactifs utilisés :

Isooctane : solution mère d'HAP pour étalonnage et contrôle de gamme (mélange de naphtalène, fluorène, fluoranthène, chrysène, benzo(a)pyrène, indéno(1,2,3cd)pyrène, acénaphtylène, phénanthrène, pyrène, benzo(b)fluoranthène, dibenzo(ah)anthracène, acénaphtène, anthracène, benzo(a)anthracène, benzo(k)fluoranthène, benzo(g,h,i)pérylène)-(Concentration : 200 µg/ml)

Solution mère de 7 PCB pour étalonnage et contrôle de gamme (200 µg/ml)

Gamme d'étalonnage :

Diluer les solutions mères de PCB (7) et d'HAP (16) afin d'avoir un mix de solution avec:
100ng/ml en PCB
200ng/ml en HAP

	G1	G2	G3	G4	G5 ng/ml
HAP	2.5	5	10	15	20
PCB	1.25	2.5	5	7.5	10
Solution mix étalon en µl	125	250	500	750	1000
Mix Etalons internes 250/500 en µl	200	200	200	200	200
Isooctane	qsp 10ml				

Gamme d'étalonnage HAP & PCB

Contrôle de la gamme d'étalonnage :

Diluer les solutions mères de PCB (S0915) et d'HAP (S0665) afin d'avoir un contrôle qualité à 10 ng/ml en HAP et 5 ng/ml en PCB. Ajout du mix étalons internes

Préparation des étalons internes

Etalons internes utilisés :

benzo(a)pyrène d12, anthracène d10, fluoranthène d19, naphtalène d10, acénaphtène d10, phénanthrène d10, benzo(a)anthracène d12
PCB103, PCB198

Mix d'étalons internes, pour gamme et contrôles de gamme 250ng/ml en PCB et 500ng/ml en Étalon interne HAP :

Mix d'étalons internes, pour témoins échantillons 25ng/ml en PCB et 50ng/ml en Étalon interne HAP

Contrôle du process d'extraction et de purification (périodicité : hebdomadaire)

Préparation : Dans une cellule Ase de 66ml, introduire l'éponge témoin et un ajout du point d'un point de gamme et le mix d'étalon interne.

L'ensemble des résultats des contrôles qualité se trouvent en annexe 2

Contrôle du blanc analytique

Préparation : Dans une cellule Ase de 66ml, introduire l'éponge témoin (Lingreville) et le mix d'étalon interne.

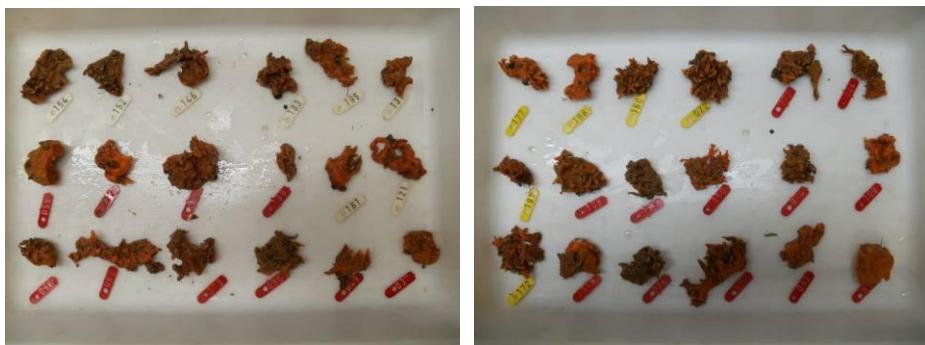
L'ensemble des résultats des blancs analytiques se trouvent en annexe 2

Expérimentations relatives à la culture de l'éponge *Hymeniacidon perlevis*

1- Influence de la température

Les éponges

Les boutures d'*Hymeniacidon perlevis* sont prélevées sur l'estran de Lingreville (Manche) au mois de février et stockée quelques jours dans un bac aéré, sans ajout d'aliments et sans lumière. Trente six boutures de 5 à 15 grammes sont réalisées et identifiées par étiquetage (photos 1 et 2).



Photos 1 et 2 : Boutures d'*Hymeniacidon perlevis* avant mise en culture

Système d'élevage

Quatre enceintes thermorégulées permettent de maintenir des bains-marie à 8, 12, 16 et 20 °C. Une sonde enregistreuse de température dans chaque bac permet d'obtenir un suivi horaire.

	8°C	12°C	16°C	20°C
Moyenne	8,8	12,3	16,4	19,9
IC95	0,0	0,0	0,0	0,0
Ecart-type	0,4	0,4	0,2	0,4
Max	12,4	13,6	16,7	20,6
Min	7,5	11,2	15,8	18,4

Tableau 1 : Températures testées pour la culture d'*H. perlevis*

Trois boutures sont placées dans trois bacs de 40 l. L'oxygénation est assurée grâce à un diffuseur relié à un surpresseur. Les éponges sont soumises à une photopériode 12/12 pour une intensité lumineuse de 50 lux obtenue par une ampoule à incandescence de 25W.

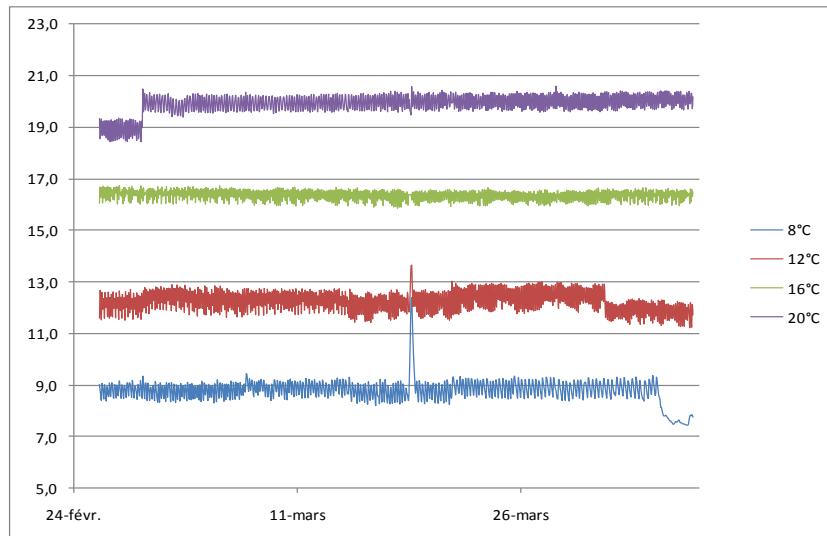


Figure 1 : Evolution des températures pour chaque bassin

Les boutures sont alimentées trois fois par semaine avec 10 ml par bac de Marine Snow (nourriture planctonique pour invertébrés marins filtreurs)[Composition : Eau, phytoplancton (*Nanochloropsis*, *Tetraselmis*, *Isocrisis*, *Spirulina*, *Schyzochitrium*), farine d’algues, zooplancton, acide citrique – Protéines 10%, Lipide 0.1%, Fibre 3%, Humidité 99.6%].

Mesures

L’expérimentation a été réalisée durant 45 jours à compter du 20 février 2011. Les boutures sont pesées au début d’expérimentation, après 1 mois et 1 mois et demi. Des photographies sont prises afin de voir l’évolution des boutures.

Résultats

Les mesures pondérales montrent une évolution significative en fonction de la température (figure 2). Les éponges placées à 16 et 20°C montrent des évolutions pondérales négatives alors que celles placées à 8 °C évoluent très peu. Cette constatation est inversement corrélée avec les observations. En effet, les éponges placées à 16 et 20 °C montrent des croissances importantes de diverticules (ph. 15 à 20). Ces constatations semblent démontrer que les éponges placées à basse température n’évoluent que très peu, alors que celles placées à 16 et 20°C ont un fort dynamisme de croissance avec toutefois l’absence de gain pondéral démontrant sans doute une carence en substances nutritives. A terme, les éponges placées à 16 et 20°C se déstructurent et finissent par se détacher de leur support.

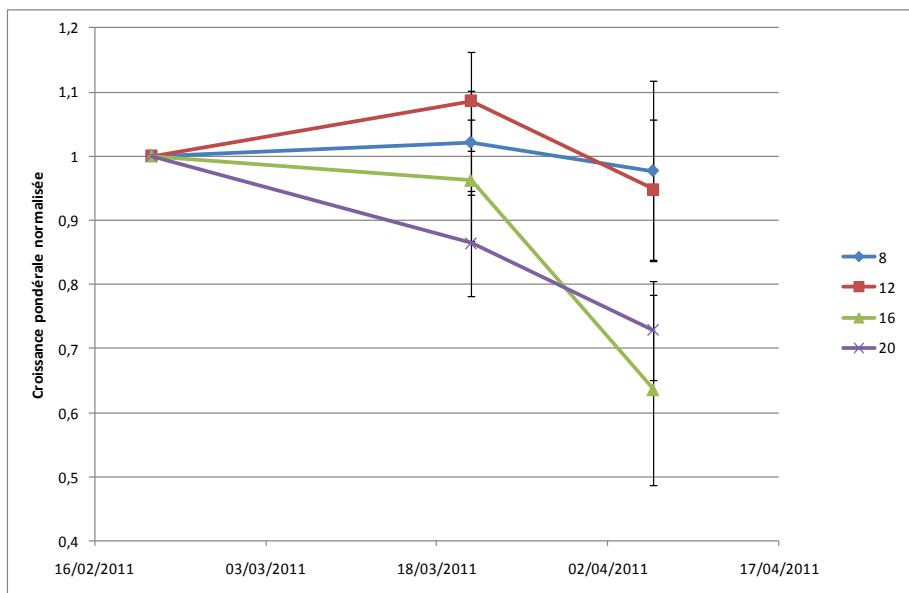
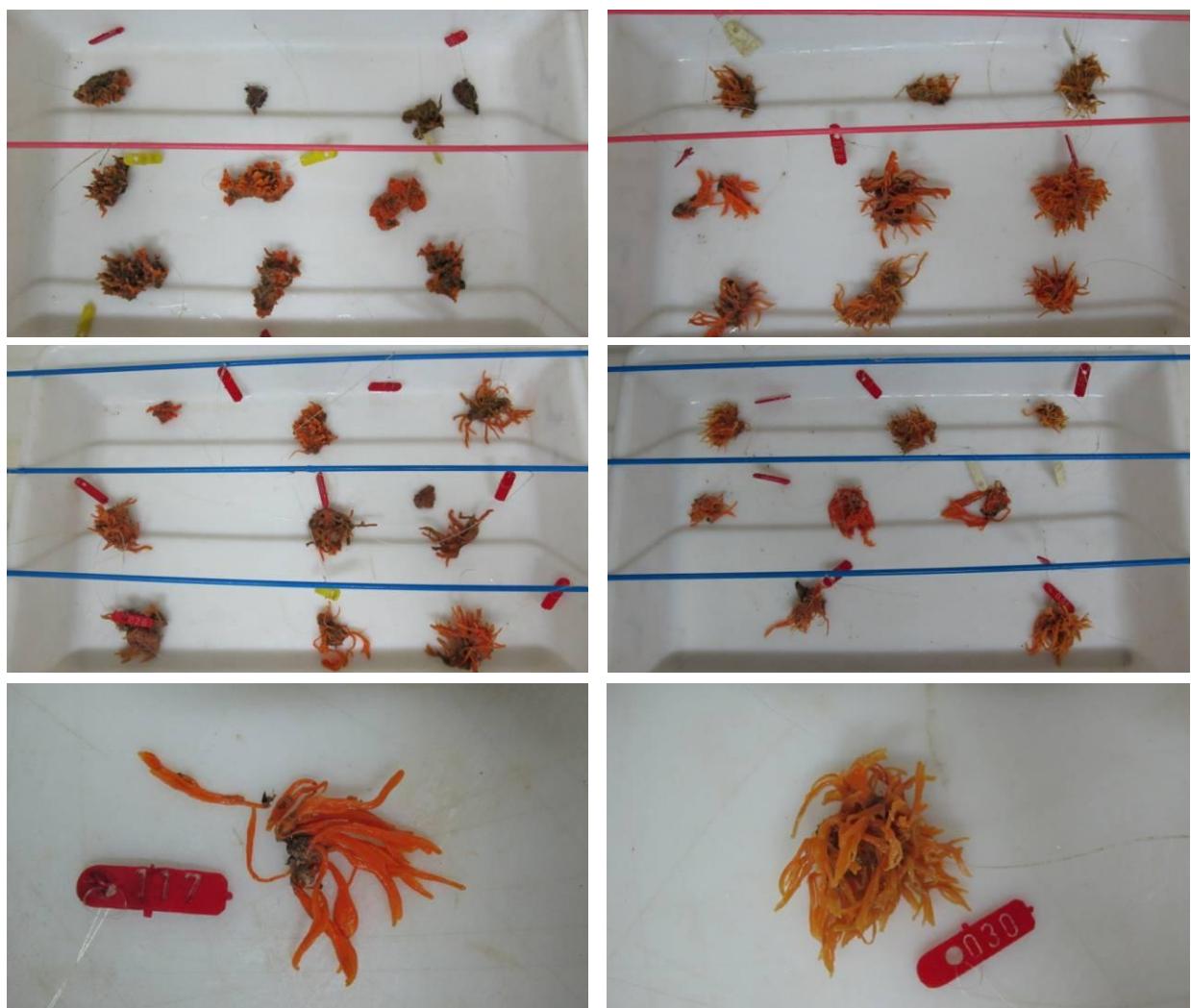


Figure 2 : Evolution des croissances moyennes des boutures pour les 4 températures testées

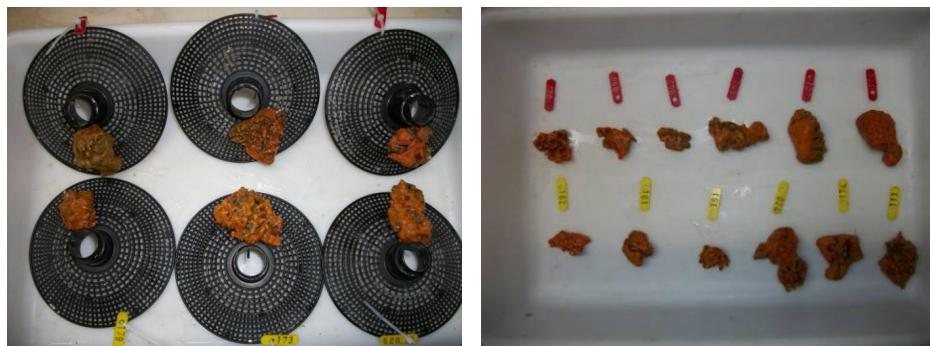


Photos 3 à 8 : Croissance des boutures d'*H. perlevis* à 16°C (gauche) et 20°C (Droite)

2- Influence du support d'élevage

Les éponges

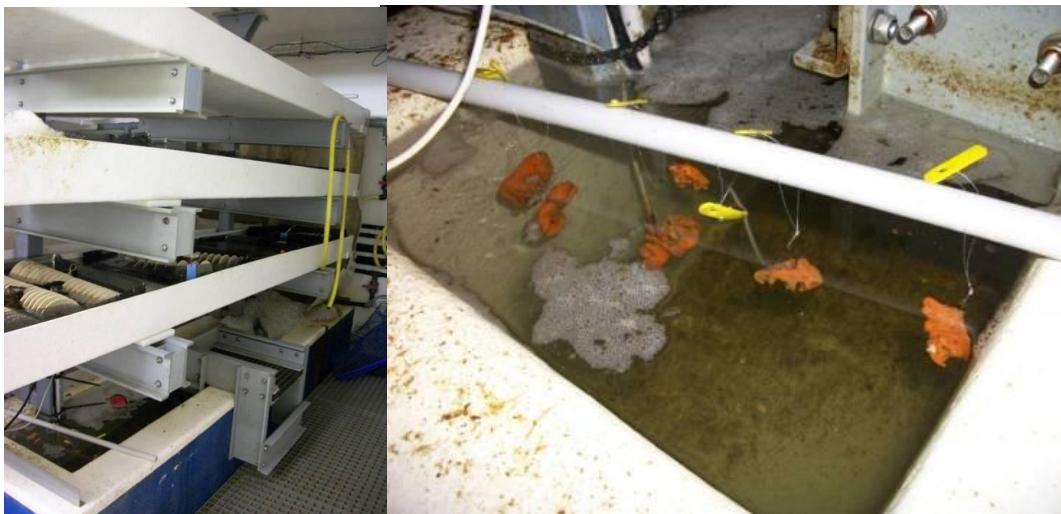
Les boutures d'*Hymeniacidon perlevis*, prélevées à Lingreville en février sont stockées quelques jours dans un bac aéré sans ajout d'aliments et sans lumière. Dix huit boutures de 5 à 30 grammes sont réalisées et identifiées par étiquetage (photos 9 et 10) ; 6 sont fixées sur des coupelles ostréicoles, 12 sur des fils en nylon.



Photos 9 et 10 : Boutures d'*H. perlevis* avant mise en culture sur différents supports

Système d'élevage

Les éponges sont placées en co-culture avec des oursins dans une structure d'élevage dédiée aux échinodermes. Une réserve d'eau d'environ 750 l dispose d'un système de régulation thermique par échangeur. L'eau est pompée dans cette réserve et amenée en tête de toboggan dans lesquel elle s'écoule par gravité pour retomber dans la réserve. L'oxygénation est obtenue par le simple brassage de l'eau. La structure est placée à l'obscurité. La température ($M \pm IC95$) est de $17.2 \pm 0.1^\circ\text{C}$ (Min= 16.2/ max=19.8°C) et la salinité ($M \pm IC95$) de $33.5 \pm 0.1\text{‰}$ (Min=30.9‰ ; max=34.3‰). Un renouvellement de 20% de l'eau est fait quotidiennement. Six boutures sur fil nylon sont placées dans la réserve où la vitesse de l'eau est faible. Les 6 autres boutures sur fil ainsi que les boutures sur coupelles sont placées dans un toboggan où la vitesse de l'eau est rapide. Les éponges sont alimentées par les bactéries qui se développent naturellement dans l'eau d'élevage ainsi que par les exsudats organiques issus des algues (*Laminaria digitata* destinée à alimenter les oursins) et par les fèces des oursins en élevage.



Photos 11 et 12 : Structure d'élevage Plateaux (7) et réserve (8)

Mesures

Le suivi est réalisé par pesée après égouttage sur papier absorbant. L'expérimentation a débuté le 14 février pour une durée de 2 mois.



Photos 13 et 14 : Les éponges sont placées dans des plateaux avec de l'eau circulante

Résultats

Les boutures montrent des élongations très visibles après quelques jours d'élevage quelque soit le type de support. Ces élongations atteignent environ 2 cm après 1 mois d'élevage (photos 15 et 16).

Une croissance pondérale est mesurée après 1 mois de mise en culture pour les trois systèmes (figure 3), toutefois, les éponges placées dans la réserve où l'hydrodynamisme est moindre montrent des croissances plus faibles. Cette croissance se prolonge jusqu'à 40 jours pour les éponges sur coupelles alors que les éponges sur fil nylon maigrissent assez rapidement. La dislocation des éponges apparait à

partir de 50^{ème} jour, en particulier celles placées sur les fils nylon. Celles sur coupelles ont par contre tendance à se fixer, si bien qu'elles se disloquent beaucoup moins (photos 16 à 18).



Photos 15 et 16 : Croissance des boutures en fonction du support d'élevage après 1 mois.

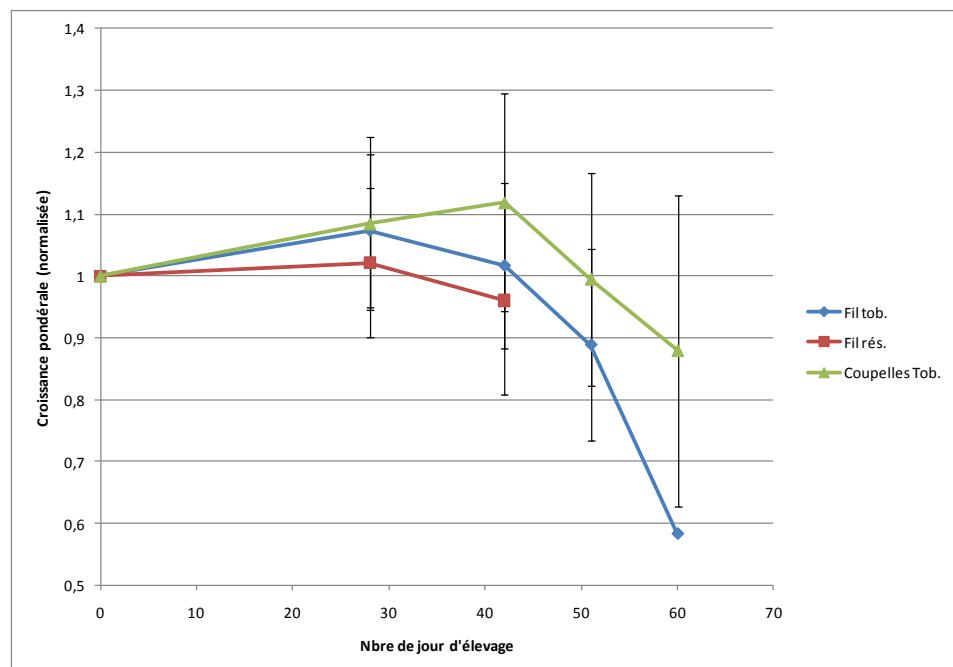
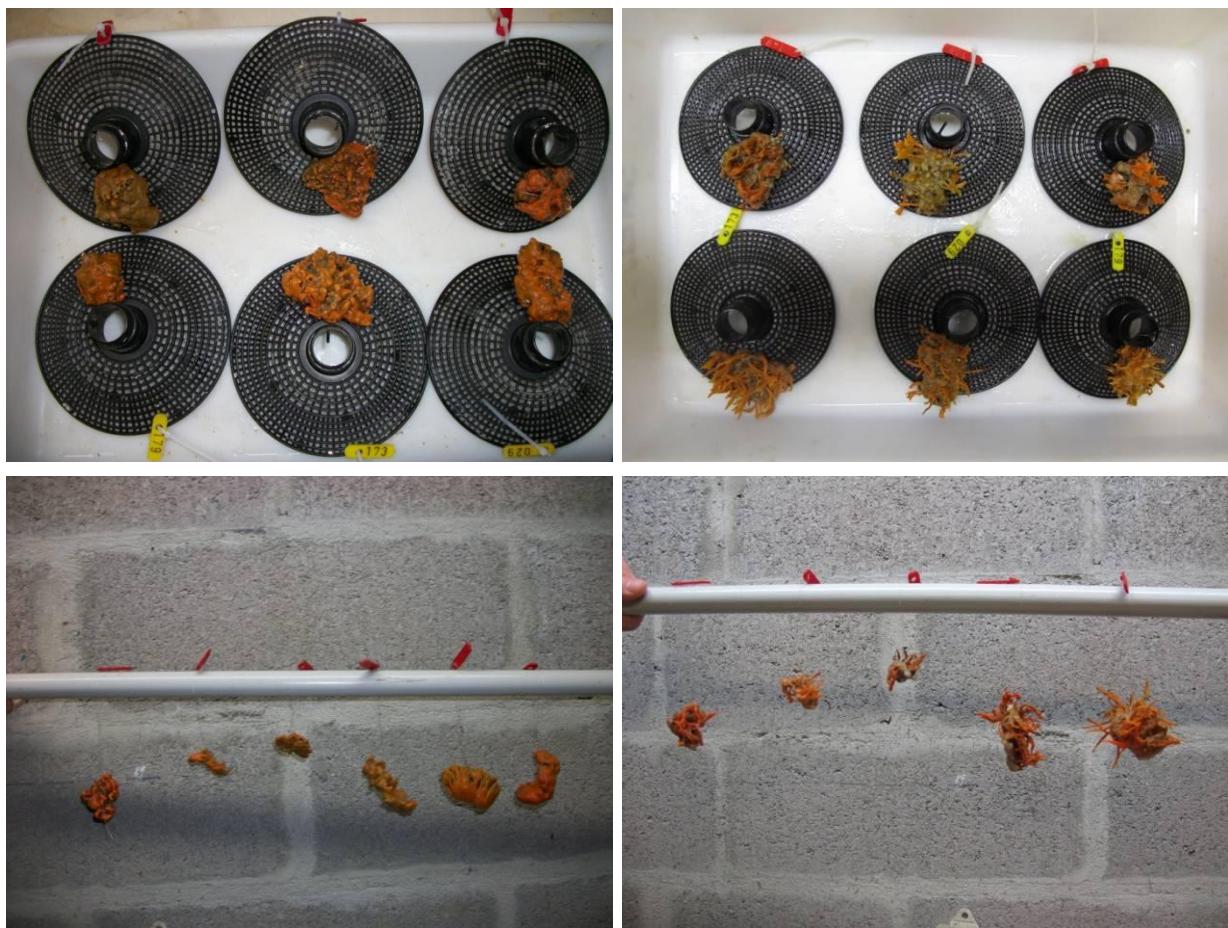


Figure 3 : Evolution des croissances moyennes des boutures pour les différents supports de culture



Photos 17 à 20: Boutures avant (gauche) et après 50 jours (droite) de culture sur deux supports différents.

3- Influence du régime alimentaire sur la croissance des éponges

3.1. 1^{ère} expérimentation

Les éponges

Les boutures d'*Hymeniacidon perlevis* utilisées pour cette expérimentation ont-elles aussi été prélevées sur l'estran de Lingreville (Manche) à la fin du mois de mars et stockées quelques jours dans un bac aéré sans alimentation ajoutée et sans lumière. Des boutures de 20 à 30 grammes sont réalisées. Chacune est fixée sur une coupelle ostréicole à l'aide de fil nylon puis identifiée par numérotation. Trois boutures sont utilisées pour tester chaque aliment.

Système d'élevage

Les éponges sont placées dans des bacs en polypropylène de 40 l munis d'une vanne à mi hauteur permettant de réaliser des renouvellements de 50% du volume d'eau, trois fois par semaine. Les bacs

sont placés dans un bain marie permettant d'homogénéiser la température d'élevage. Le bain marie est thermo-régulé à environ 18°C (17.9 ± 0.0 ; min= 16.7 ; max= 18.6). Les bacs sont placés à l'obscurité et sont munis d'un système d'aération par surpresseur. La salinité moyenne est de 35.1‰ (Min=33.9‰; Max= 36.9‰).

Après un mois d'expérimentation, les bacs sont déplacés en extérieur afin de bénéficier de la lumière (ombrage). La température n'est plus régulée. Un enregistreur horaire de température montre une moyenne ($M \pm IC95$) de $13.8 \pm 0.1^\circ\text{C}$ (min= 11.4 ; max= 18.5).

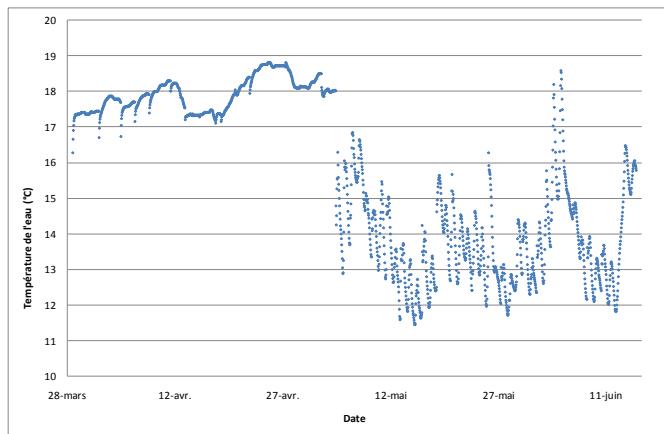


Figure 4 : Evolution de la température dans le bassin d'élevage

Régimes alimentaires testés

Onze régimes alimentaires différents sont testés :

1. 10 ml de Marine Snow par bac et par alimentation
2. 20 ml de Marine Snow par bac et par alimentation
3. 30ml de Marine Snow par bac et par alimentation
4. Maïs broyé (1 g) par bac et par alimentation
5. Aliment reconstitué pour gastéropode (Adam & Amos 1) (1 g) par bac et par alimentation
6. Aliment reconstitué pour gastéropode (Adam & Amos 2) (1 g) par bac et par alimentation
7. Moules broyées et congelées (env. 10ml)
8. Co élevage avec des oursins nourris au maïs
9. Co-élevage avec des oursins nourris avec *Laminaria digitata*
10. 30 ml de mélange de microalgues concentrées (*Isocrisis galbana* 81 M/ml, *Nanochloropsis* sp. 19 M/ml, *Chaetoceros calcitrans* 11 M/ml) et de zooplancton (Nauplii d'*Artemia salina*) broyés et congelés par bac et par alimentation
11. 150 ml de mélange de microalgues concentrées (*Isocrisis galbana* 81 M/ml, *Nanochloropsis* sp. 19 M/ml, *Chaetoceros calcitrans* 11 M/ml) et de zooplancton (Nauplii d'*Artemia salina*) broyés et congelés par bac et par alimentation

Mesures

Les éponges sont pesées avec leur support après égouttage durant 5 secondes sur papier absorbant tous les 15 jours. L'expérimentation a été menée sur 2 mois et demi à partir du 30 mars.

Résultats

La figure 5 montre l'évolution pondérale moyenne des éponges placées sous différents régimes alimentaires. Dans la plupart de ces conditions, les éponges montrent une croissance pondérale durant la première quinzaine puis une décroissance.

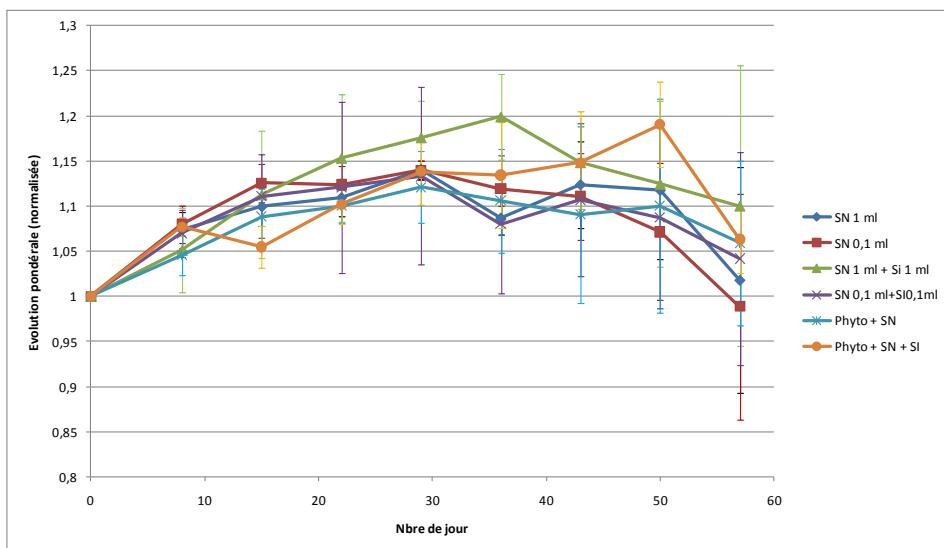


Figure 5 : Evolution des croissances moyennes des boutures pour les différentes alimentations testées (1^{ère} expérimentation)

Le mélange de microalgues et de zooplancton congelés ne permet pas de croissance même pendant la première quinzaine. Le maïs broyé permet la meilleure croissance sur la première quinzaine. La co-culture avec des oursins alimentés avec des algues fraîches permet de limiter la décroissance. Les deux aliments pour ormeaux (Adam & Amos 1 et 2) ne permettent pas de gain de croissance.

Le changement des conditions de luminosité après 30 jours n'a pas infléchi la tendance de la décroissance.

Il est observé une reprise de croissance après 45 jours sur le régime alimentaire à base de moules broyées et congelées. Toutefois, les trois boutures sont mortes après 60 jours.

3.2. 2^{ème} expérimentation

Les éponges

Les boutures *Hymeniacidon perlevis* prélevées à la fin du mois de mai sur l'estran de Lingreville (Manche) sont stockées quelques jours dans un bac aéré sans aliment ajouté et sans lumière. Des boutures de 10 à 20 grammes sont réalisées. Chacune est fixée sur une coupelle ostréicole à l'aide de fil nylon puis identifiée par numérotation. Trois boutures sont utilisées pour tester chaque aliment.



Photo 21 : Bouture d'*H.perlevis* fixée sur coupelle

Système d'élevage

Les éponges sont placées dans des bacs en polypropylène de 40 L munis d'une vanne à mi hauteur permettant de réaliser des renouvellements de 50% du volume d'eau, trois fois par semaine. Les bacs sont placés à l'extérieur sous ombrage dans un bain marie de 200 L (non chauffé) permettant de tamponner (jour/nuit) et d'homogénéiser la température d'élevage entre les bacs. Un enregistreur horaire de température montre une moyenne ($M \pm IC95$) de 15.5 ± 0.1 °C (Min=11.8°C ; Max= 22.0°C). Les bacs sont munis d'un système d'aération par surpresseur. La salinité moyenne est de $34.3 \pm 1.1\%$. Un renouvellement de l'eau de 100% est réalisé chaque semaine.

L'expérimentation est réalisée du 7 juin au 3 août 2011.

Les régimes alimentaires testés

Les régimes alimentaires testés sont basés sur un apport de solution nutritive utilisée pour la culture des microalgues et/ou par l'ajout de microalgues (*Nanochloropsis sp.*)

Six régimes alimentaires différents sont testés :

1. 40 ml de solution nutritive par bac (soit 1ml/l)
2. 4 ml de solution nutritive par bac (soit 0.1 ml/l)
3. 40 ml de solution nutritive + 40 ml de Silice
4. 4 ml de solution nutritive par bac + 40 ml de Silice
5. 40 ml de solution nutritive par bac + 1.5 l de *Nanochloropsis sp.* (à env.25 M de cellule/ml)
6. 40 ml de solution nutritive par bac + 40 ml de Silice + 1.5 l de *Nanochloropsis sp.* (à env.25 M de cellule/ml)

La solution de silice est une solution de métasilicates de sodium à 30 g/l ($\text{Na}_2\text{CO}_3\text{Si}_x\text{H}_2\text{O}$, masse molaire 221.14 g/mol).

Solution nutritive		*Solution métallique	
Produit	Quantité	Produit	Quantité
Solution métallique*	80 mL	$\text{Fe}^2(\text{SO}_4)_3$	15,5 g
NO_3K	80 g	$\text{MnSO}_4\text{H}_2\text{O}$	1,55 g
$\text{K}_2\text{PO}_4\text{H}$	16 g	$\text{ZnSO}_4\text{7H}_2\text{O}$	0,22 g
E.D.T.A	4 g	$\text{CuSO}_4\text{5H}_2\text{O}$	0,019 g
Vitamine B12	1 mL	$\text{CoSO}_4\text{7H}_2\text{O}$	0,024 g
Vitamine B1	0,01 g	$\text{Na}^2\text{Mo}^4\text{2H}_2\text{O}$	0,012 g
Eau distillée	1 L	Eau distillée	1 L

Tableau 2 : composition de la solution nutritive

Mesures

Les éponges sont pesées après égouttage de quelques secondes sur papier absorbant. La mesure est réalisée chaque semaine.

Résultats

Aucune mortalité d'éponge n'est observée durant cette expérimentation. Les éponges montrent un gain de croissance pondérale durant le premier mois, quelque soit le régime alimentaire. Ce gain est d'environ 20% lorsque l'on apporte la solution nutritive (1ml/l) et des silicates. Toutefois, des pertes de poids interviennent pour l'ensemble des régimes lors du second mois d'expérimentation. Il n'y a pas de différences significatives entre les régimes, toutefois il semble néanmoins que les silicates permettent de limiter cette baisse. En effet les deux meilleurs résultats sont observés pour deux régimes où l'on apporte des silicates supplémentaires ; les plus mauvais résultats sont obtenus avec des régimes alimentaires sans supplémentation de silicate (figure 6). De même les deux régimes où l'on apporte des microalgues semblent donner de bons résultats.

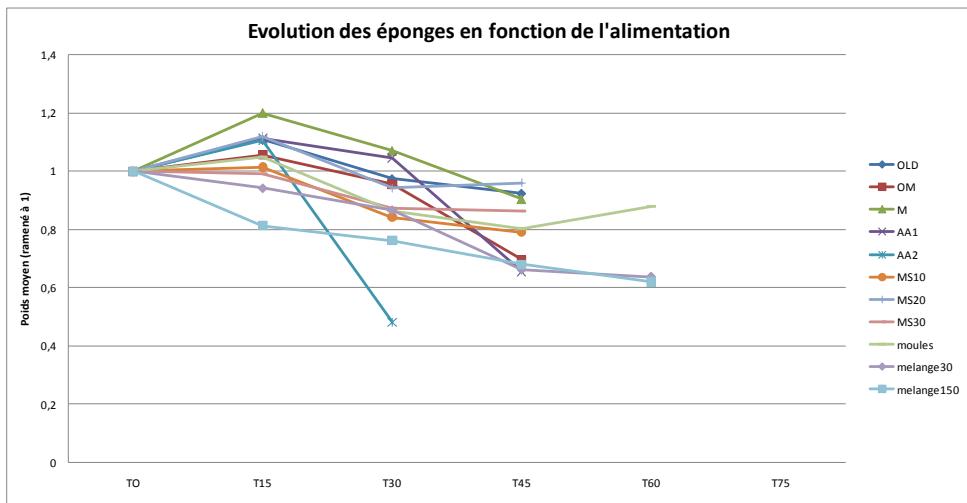


Figure 6 : Evolution des croissances moyennes des boutures pour les différentes alimentations testées (2^{nde} expérimentation)

3.3. 3^{ème} expérimentation

Les éponges

Hymeniacidon perlevis a été prélevée sur l'estran d'Agon Coutainville (Manche, 50, France) le 1^{er} septembre et stockée quelques jours dans un bac aéré sans ajout d'aliment et sans lumière. Des boutures de 20 à 40 grammes sont réalisées. Chacune est fixée sur une coupelle ostréicole à l'aide de fil nylon puis identifiée par numérotation. Trois boutures sont utilisées pour tester chaque condition.

Système d'élevage

Les éponges sont placées dans des bacs en polypropylène de 40 l. Les bacs sont placés à l'extérieur sans ombrage dans un bain marie de 200 L (non chauffé) permettant de tamponner (jour/nuit) et d'homogénéiser la température d'élevage entre les bacs. La température moyenne ($M \pm IC95$) est de 15.8 ± 0.8 °C (Min=14.0°C ; Max=18.3°C).

Les bacs sont munis d'un système d'aération par surpresseur. La salinité moyenne est de $35.0 \pm 0.4\%$. Un renouvellement de l'eau de 100% est réalisé chaque semaine.

Les régimes alimentaires testés

Les régimes alimentaires testés sont basés sur un apport de solution nutritive utilisée pour la culture des microalgues et/ou par l'ajout de microalgues (*Nanochloropsis sp.* & *Chaetoceros calcitrans*)

Six régimes alimentaires différents sont testés :

Témoin (non alimenté)

Nanochloropsis sp

Chaetoceros calcitrans

Chaetoceros calcitrans & *Nanochloropsis sp*

[*Chaetoceros calcitrans* (250 ml) & *Nanochloropsis sp* (250ml)] passés au congélateur + 4 ml de solution nutritive (avec métaux) + 4 ml Solution de silicate

[*Chaetoceros calcitrans* (250 ml) & *Nanochloropsis sp* (250ml)] passés au congélateur + 4 ml de solution de métaux + 4 ml Solution de silicate

Mesures

Les éponges sont pesées après égouttage de quelques secondes sur papier absorbant. La mesure est réalisée chaque semaine.

L'expérimentation a été réalisée du 7 septembre au 28 septembre 2011

Résultats

De nombreuses mortalités par nécrose ont été observées dès la première semaine d'expérimentation (6 boutures sur 18). Ainsi, seule une bouture a survécu avec l'alimentation en *Chaetoceros calcitrans* la première semaine. Cette bouture est morte la seconde semaine. Une seule bouture alimentée en *Nanochloropsis sp.* a survécu après 3 semaines d'expérimentation.

Globalement, les résultats sont du même ordre que ceux présentés dans les expérimentations précédentes avec une croissance durant la première quinzaine puis une décroissance. La troisième semaine, quelque soit le type d'aliment fourni, le témoin non alimenté présente des croissances finales supérieures à celles obtenues avec les autres régimes testés. Par contre, les éponges alimentées avec des microalgues seules présentent les croissances les plus faibles.

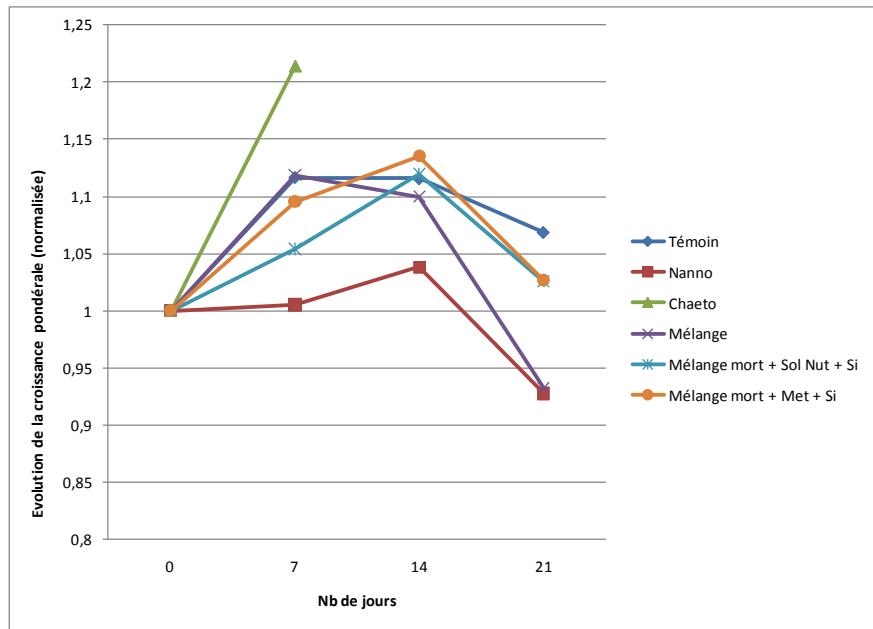


Figure 7 : Evolution des croissances moyennes des boutures pour les différentes alimentations (3^{ème} expérimentation)

4- Influence de la lumière

4.1. 1^{ère} expérimentation

Les éponges

Hymeniacidon perlevis est prélevée sur l'estran de Lingreville (Manche, 50, France) à la fin au mois de juin et stockée quelques jours dans un bac aéré sans ajout d'aliments et sans lumière. Des boutures de 20 à 30 grammes sont réalisées. Chacune est fixée sur une coupelle ostréicole à l'aide de fil nylon puis identifiée par numérotation. Trois boutures sont utilisées pour tester chaque condition.

Système d'élevage

Quatre conditions de lumière sont testées : lumière, obscurité, les éponges à la lumière mais l'eau à l'obscurité, l'eau à la lumière mais les éponges à l'obscurité.

Pour les deux premières conditions, les éponges sont placées dans des bacs en polypropylène de 40 L noirs. Les bacs sont placés à l'extérieur sous ombrage dans un bain marie de 200 L (non chauffé) permettant de tamponner (jour/nuit) et d'homogénéiser la température d'élevage entre les bacs. L'un des bacs est muni d'un couvercle ne permettant pas de laisser passer la lumière. Aucun couvercle n'est disposé sur le second.

Pour les deux autres conditions, un système de deux bacs avec un système de pompe à eau entre les deux permet de disposer les éponges dans un faible volume d'eau (env. 5 l) qui sera éclairé avec une

réserve de 40 l à l'obscurité, et le système est inversé dans le second cas (40 l d'eau à la lumière et les éponges à l'obscurité).

Un témoin non alimenté, placé à la lumière est également réalisé.

Un enregistreur horaire de température montre une moyenne ($M \pm IC95$) de 16.1 ± 0.1 °C (Min=12.7°C ; Max= 22.0°C).

Les bacs sont munis d'un système d'aération par surpresseur. La salinité moyenne est de $33.5 \pm 1.9\%$. Un renouvellement de l'eau de 100% est réalisé chaque semaine.

L'alimentation est réalisée par l'apport de solution nutritive utilisée pour la culture des microalgues ; 4 ml de solution nutritive par bac (soit 0.1 ml/l). Le témoin ne reçoit pas de solution nutritive.

Mesures

Les éponges sont pesées après égouttage de quelques secondes sur papier absorbant. La mesure est réalisée chaque semaine.

L'expérimentation a été réalisée du 30 juin au 3 août.

Résultats

L'évolution des croissances pondérales montre que le maximum de poids est atteint après 20 jours de culture quelque soit les conditions d'élevage. Puis toutes les éponges montrent une décroissance. Les éponges placées dans le bac à l'obscurité présente une mortalité massive après 10 jours d'élevage. Cette mortalité massive peut être la résultante d'une contamination et n'est pas à mettre en relation avec les conditions d'élevage tant la mortalité a été rapide.

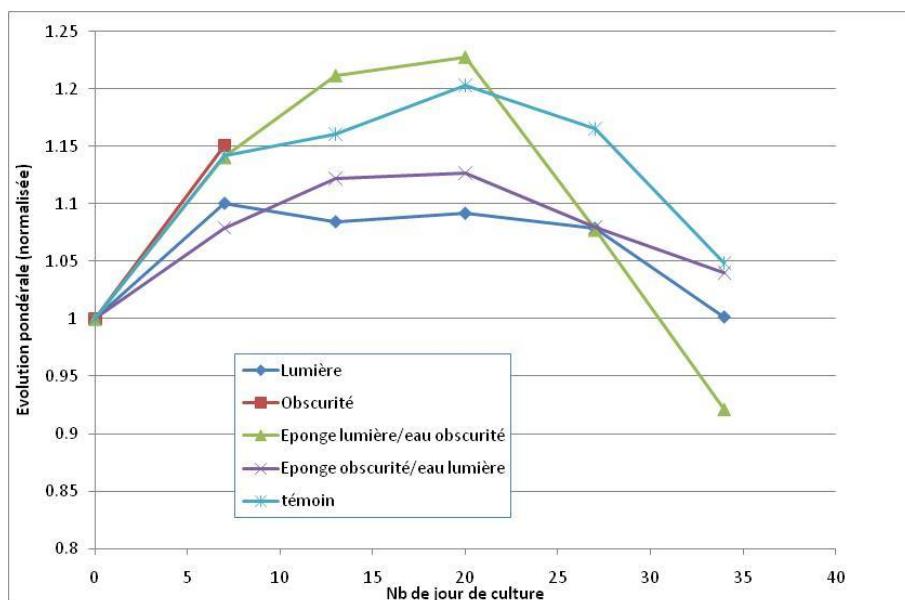


Figure 8 : Evolution des croissances moyennes des boutures pour les différents types de lumière testées (1^{ère} expérimentation)

4.2. 2^{ème} expérimentation

Les éponges

Hymeniacidon perlevis est prélevée sur l'estran d'Agon Coutainville (Manche, 50, France) le 1^{er} septembre et stockée quelques jours dans un bac aéré sans ajout d'aliments et sans lumière. Des boutures de 20 à 40 grammes sont réalisées. Chacune est fixée sur une coupelle ostréicole à l'aide de fil nylon puis identifiée par numérotation. Trois boutures sont utilisées pour tester chaque condition.

Système d'élevage

Les éponges sont placées dans des bacs en polypropylène de 40 L munis d'une vanne à mi volume. Les bacs sont placés dans un bâtiment sans éclairage extérieur. Une pompe de 500 L/h permet de réaliser une circulation d'eau entre les bacs et une réserve commune de 500 L placée en dessous. Les pompes sont munies d'un programmeur. Lorsque les pompes ne fonctionnent pas, l'eau qui s'écoule par la vanne n'est pas remplacée et les éponges subissent une exondation. Le programmeur permet ainsi de réaliser une exondation de 2x30 minutes chaque jour. Les bacs sont munis d'un système d'aération par suppresseur.

Un enregistreur horaire de température montre une moyenne ($M \pm IC95$) de 16.0 ± 0.0 °C (ET=0.2 ; Min=14.8°C ; Max= 16.5°C) durant les 30 premiers jours et une moyenne de 14.6 ± 0.0 °C (ET=0.2 ; Min=13.4°C ; Max= 15.7°C) les jours suivants. La salinité mesurée quotidiennement est de 34.1 ‰.

L'alimentation (5 l nano + 50 ml engrais phytoplancton + 50 ml silicate) est donnée trois fois par semaine directement dans la réserve d'eau.

Chaque bac est éclairé avec un type de tube différent dont les spectres apparaissent sur la figure 9.:

1. Témoin (non éclairé)
2. Tube « Grolux » 18W - Le tube Grolux stimule la croissance des plantes, fait ressortir les couleurs rouges et bleues.
3. Tube « Daylightstar » 18 W avec uv stop. Le tube daylightstar limite le développement des algues (5000°K)
4. Tube « Aquastar » 18 W. Le tube Aquastar éclaire très profondément. Température de couleur 10000°K.
5. Tube « True lite » 18 W. Le tube True Lite donne 91% du spectre solaire dont les rayons ultra violets. Température de couleur 5500°K.
6. Tube « Trilux » 18 W – 4000 °K (pas de données spectrales disponibles).

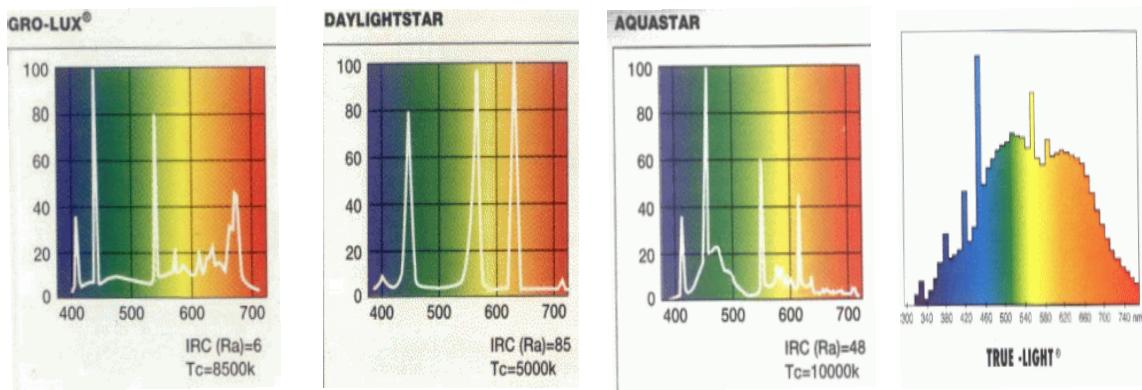


Figure 9 : Spectre pour chaque type de lumière testée

Mesures

Les éponges sont pesées après égouttage de quelques secondes sur papier absorbant. La mesure est effectuée chaque semaine. L'expérimentation a été réalisée du 21 septembre au 1^{er} décembre 2011.

Résultats

L'évolution des croissances pondérales montre une faible augmentation du poids voire une stabilisation durant les 15 premiers jours. Ensuite, et quelque soit la qualité de la lumière, le poids des boutures diminue pour atteindre 60% du poids initial après 70 jours d'expérimentation.

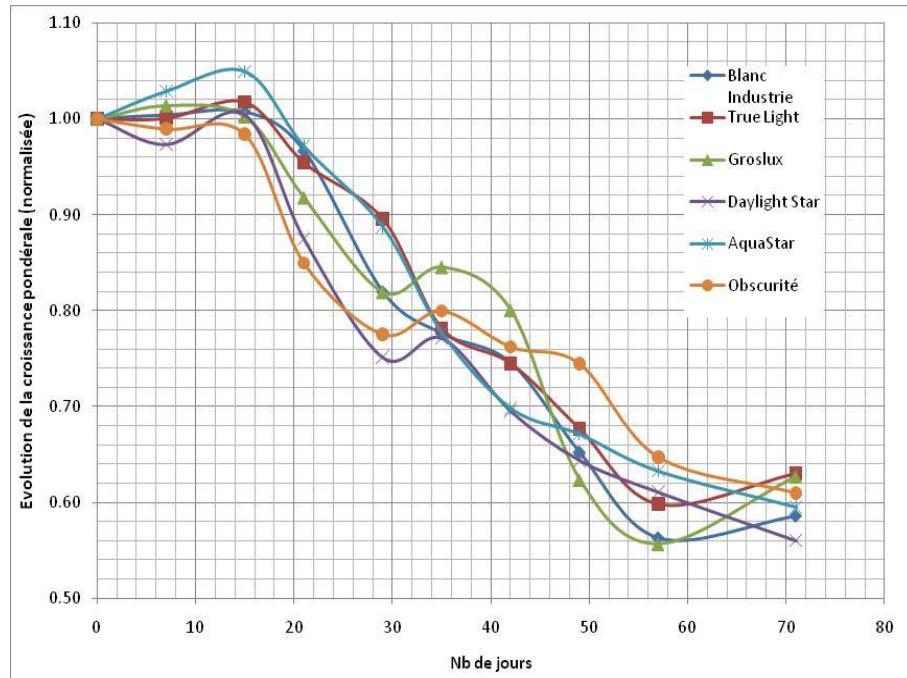


Figure 10 : Evolution des croissances moyennes des boutures pour les différents types de lumière testées (2^{nde} expérimentation)

5- Influence de l'hydrodynamisme

5.1. 1^{ère} expérimentation

Les éponges

Hymeniacidon perlevis est prélevée sur l'estran de Lingreville (Manche, 50, France) à la fin au mois de juin et stockée quelques jours dans un bac aéré sans ajout d'aiments et sans lumière. Des boutures de 20 à 30 grammes sont réalisées. Chacune est fixée sur une coupelle ostréicole à l'aide de fil nylon puis identifiée par numérotation. Trois boutures sont utilisées pour tester chaque condition.

Système d'élevage

Les éponges sont placées dans des bacs en polyéthylène circulaires immergés dans un bac rempli de 1.5 m³ d'eau de mer. Dans le premier, un bullage léger permet de faire circuler l'eau entre le grand bac et le bac circulaire. Dans le second, une pompe de circulation de 500 l/h permet de créer un mouvement d'eau circulaire dans le bac où sont placées les éponges. Dans le troisième, deux pompes de 500 l/h permettent de créer un mouvement d'eau, circulaire et puissant, dans le bac où sont placées les éponges.

La température ($18.0 \pm 0.7^\circ\text{C}$) de l'eau est régulée par un système de régulation thermique par échangeur avec une pompe à chaleur. La salinité est de $35.3 \pm 0.3\%$.

Un apport de solution nutritive de 150 ml (0.1 ml/l) est assuré une fois par semaine.

Le système est placé à l'intérieur d'un bâtiment bénéficiant d'un ensoleillement naturel.

Mesures

Les éponges sont pesées après égouttage de quelques secondes sur papier absorbant. La mesure est effectuée chaque semaine.

L'expérimentation a été réalisée du 30 juin au 3 août 2011.

Résultats

Après une forte croissance la première semaine, l'évolution des croissances pondérales montre que le maximum de poids est atteint après 20 jours de culture quelques soient les conditions d'élevage. Puis toutes les éponges montrent une décroissance pondérale. Ainsi, les conditions hydrodynamiques ne semblent pas permettre la poursuite de la croissance.

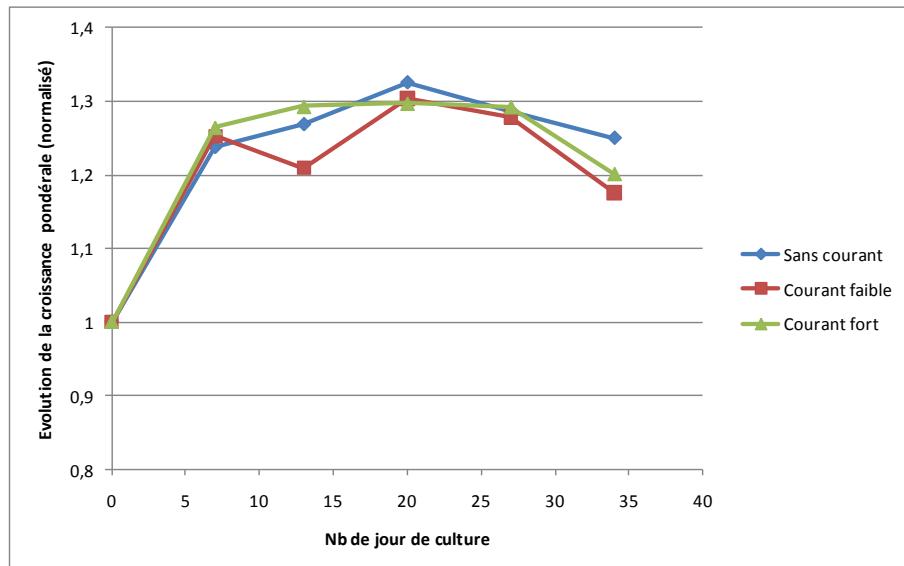


Figure 11 : Evolution des croissances moyennes des boutures selon l'hydrodynamisme (1^{ère} expérimentation)

5.2. 2^{ème} expérimentation

Les éponges

Hymeniacidon perlevis est prélevée sur l'estran d'Agon Coutainville (Manche) et stockée quelques jours dans un bac aéré sans ajout d'aliments et sans lumière. Six boutures de 25 à 35 grammes sont réalisées en les fixant sur une coupelle ostréicole à l'aide de fil nylon puis identifiées par numérotation. D'autre part, 6 petites boutures de 2 à 4 grammes sont issues d'une expérimentation précédente déjà fixés sur des coupelles (photo 22).



Photos 22 et 23 : Bouture d'*H.perlevis* sur coupelles et système de culture en eau ascendante.

Système d'élevage

Les éponges sont placées dans des bacs en polyéthylène circulaires avec un fond grillagé et immergées dans un bac de 100 l avec un flux permanent de 100 l/h d'eau de mer (ph. 14). Dans le premier, l'alimentation est apportée uniquement par l'eau de mer (alimentation naturelle) ; dans un second

bac, l'alimentation est complétée par un ajout de *Chaetoceros sp.* à une concentration variant de 60 000 à 120 000 cellules par ml (milieu eutrophe)

La température de l'eau est comprise entre 12 et 14°C et la salinité est de 32 à 34‰.

Un apport de solution nutritive de 150 ml (0.1 ml/l) est assuré une fois par semaine.

Le système est placé à l'intérieur d'un bâtiment bénéficiant d'une « légère » lumière naturelle.

Mesures

Les éponges sont pesées après égouttage de quelques secondes sur papier absorbant. L'expérimentation a été réalisée du 1^{er} décembre 2011 au 11 juin 2012.

Résultats

Les boutures n'ont pas la même croissance selon qu'il s'agit de petites boutures ayant déjà colonisé une coupelle ou de grosses boutures fraîchement récoltées. Si chacune a une tendance à la croissance durant les deux premiers mois, les petites grandissent beaucoup plus vite et atteignent plus de trois fois leur poids après 60 jours. Par contre, il n'y a pas d'influence de l'ajout ou non d'alimentation, les deux courbes présentant les mêmes tendances sur l'ensemble de l'expérimentation.



Photos 24 et 25 : Exemple de développement d'éponges en culture sur coupelles

Entre 60 et 150 jours, la tendance est très nettement à la perte de poids pour toutes les boutures, quel que soit le régime alimentaire.

Puis la croissance repart à la hausse jusqu'à la fin de l'expérimentation pour atteindre à nouveau une biomasse multipliée par plus de 3 pour les petites boutures et par 1,4 pour les grosses boutures.

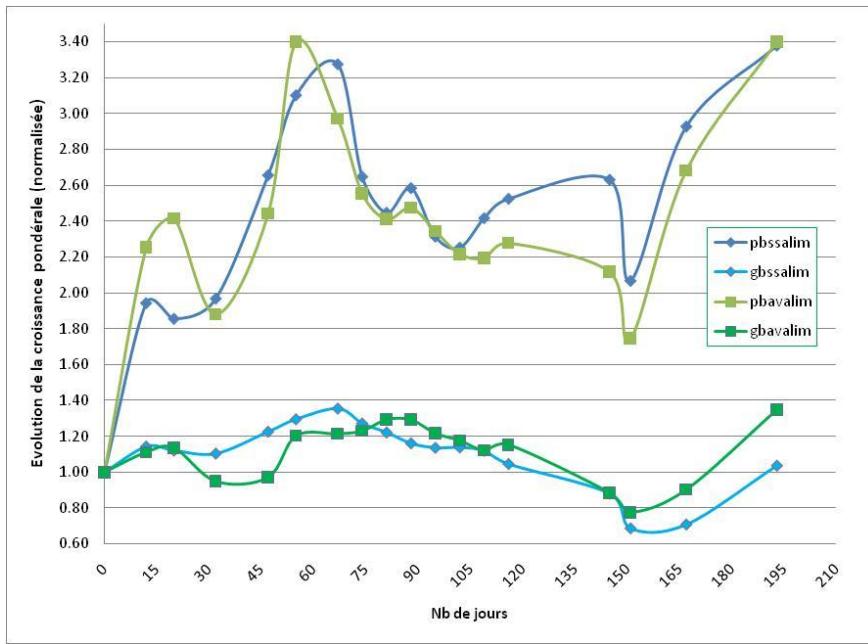


Figure 12 : Evolution des croissances moyennes des boutures placées en circuit ouvert avec ou sans alimentation ajoutée (2^{nde} expérimentation)

6- Influence de la marée (exondation)

Les éponges

Pour le premier lot, les boutures d'*Hymeniacidon perlevis* sont issues de l'expérimentation précédente sur les conditions hydrodynamiques. Dans le deuxième lot, *Hymeniacidon perlevis* est prélevée sur l'estran de Lingreville (Manche, 50, France) au mois d'août et stockée quelques jours dans un bac aéré sans aliments ajoutés et sans lumière. Des boutures de 20 à 40 grammes sont réalisées. Chacune est fixée sur une coupelle ostréicole à l'aide de fil nylon puis identifiée par numérotation. Trois boutures sont utilisées pour tester chaque condition.

Système d'élevage

Les boutures sont placées dans des bacs de 40 l munis d'une vanne placée à mi volume. L'eau circule grâce à une pompe délivrant 500 l/h à partir d'une réserve d'eau de 1.5 m³ située en dessous, vers chacun des trois bacs de 40 l. La vanne de renouvellement reste ouverte permettant d'éviter le débordement. Les pompes sont mises en marche ou coupées à l'aide d'un programmateur, selon un rythme de 1 ou 2 fois par jour durant 2h (pendant les 21 premiers jours), durant 1 h (15 jours suivants) puis durant 30 minutes. Lorsque la circulation de l'eau cesse, le bac se vide de 50% et les éponges (placées au dessus de la vanne) sont exondées. Ce montage permet d'obtenir une simulation de situation de marée.

Trois conditions sont testées :

1. Pas d'exondation (témoin)
2. Exondation 1 fois par jour
3. Exondation 2 fois par jour

La température ($18.2 \pm 0.5^\circ\text{C}$) de l'eau est régulée par un système de régulation thermique par échangeur avec une pompe à chaleur. La salinité est de $34.2 \pm 0.4\%$.

Un apport de solution nutritive de 150 ml (0.1 ml/l) est assuré une fois par semaine.

Le système est placé à l'intérieur d'un bâtiment bénéficiant d'un ensoleillement naturel.

Mesures

Les éponges sont pesées après égouttage de quelques secondes sur papier absorbant. La mesure est effectuée chaque semaine.

L'expérimentation a été réalisée du 3 août au 14 septembre.

Résultats

Certaines éponges ont été colonisées par des ascidies (photos 26 et 27) ne permettant pas la poursuite des pesées sans biais. Ces éponges ne seront pas prises en compte dans les calculs.



Photos 26 et 27 : Contamination des boutures par des ascidies

Les éponges placées dans des conditions de marée (avec assec) semblent présenter moins d'expansions et avoir un port plus conforme à ce qui est observé sur l'estran. Le première lot d'éponges provenant de l'expérimentation précédente poursuit son amaigrissement, mais elle est accélérée pour le lot subissant 2 x 2 heures d'exondation par jour par rapport au témoin et au lot ne présentant qu'une seule exondation. Toutefois, la décroissance semble s'infléchir lorsqu'elle n'est plus que d'une heure au lieu de deux. Après 6 semaines, plusieurs éponges se sont fixées y compris directement dans le bac, ce qui conduit parfois à des pertes de matière lors du prélèvement pour la pesée.

Dans le second lot d'éponges, des croissances sont observées durant 15 jours pour deux des conditions puis les éponges décroisent, à l'exception du lot 2 x X heures qui se stabilise puis augmente en fin d'expérimentation.

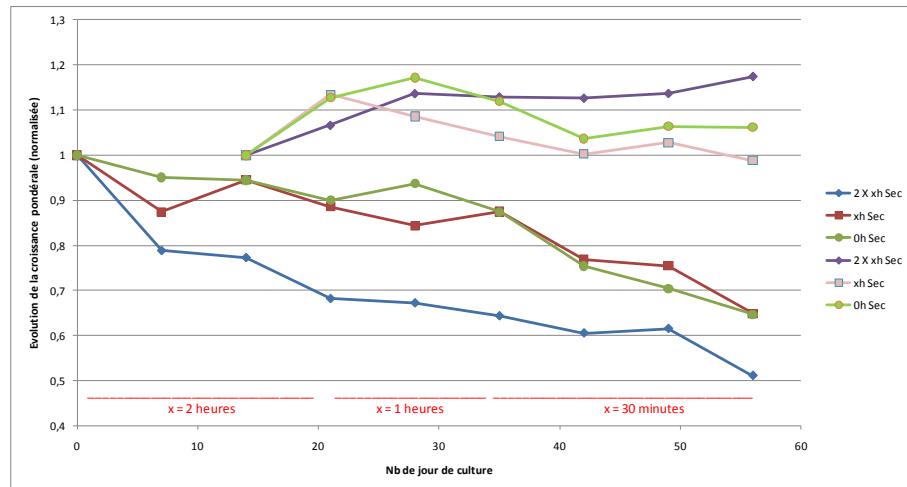


Figure 13 : Evolution des croissances moyennes des boutures placées en condition de marée

Article accepté en 2012 pour publication

Environ Sci Pollut Res
DOI 10.1007/s11356-012-1211-7

RESEARCH ARTICLE

The porifera *Hymeniacidon perlevis* (Montagu, 1818) as a bioindicator for water quality monitoring

Marie-Laure Mahaut · Olivier Basuyaux ·
Estelle Baudinière · Claire Chataignier · Julien Pain ·
Christelle Caplat

Received: 14 June 2012 / Accepted: 17 September 2012
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2012

Abstract Because sponges are promising bioindicators, we present here a multispecies comparison of the bioconcentration capacity for copper, zinc and the hydrocarbon fluoranthene. The spatial distribution of sponge populations was studied in 17 areas in intertidal zones on the Lower Normandy coast (France) to determine the most common species with the highest bioaccumulation capacity. Results are compared with published data on blue mussels *Mytilus edulis* from the Réseau d'Observation de la Contamination Chimique biomonitoring network. A total of 720 sponge samples were collected to assess species richness. Samples were analysed for metal concentrations by flame-mode atomic absorption spectrometry. Analyses of polycyclic aromatic hydrocarbon were sub-contracted. Species richness varies according to the water mass concerned. The most common species in the study area showing the highest bioconcentration in its soft tissues is *Hymeniacidon perlevis*, which contains about 20 times the zinc, 44 times the copper and 16 times the fluoranthene levels found in mussels. The

variability of contaminant concentrations in *H. perlevis* is also systematically higher than those in mussels. The results obtained for this sponge closely reflect the heterogeneous distribution of contaminants. This study demonstrates that *H. perlevis* has a much higher capacity to accumulate in situ contaminants than the blue mussel *M. edulis*. *H. perlevis* meets all the requirements of a good bioindicator suitable for use in an integrated monitoring programme. In the near future, controlled cultivation of *H. perlevis* will allow us to produce sufficient quantities of this species to carry out ecotoxicological tests and in situ biomonitoring by caging.

Keywords Bioindicator · Sponge · *Hymeniacidon perlevis* · Zinc · Copper · Fluoranthene · PAH · Lower Normandy · France

Background, aim and scope

Estuarine and coastal areas are the marine environments most exposed to contamination by many chemical products, metals or organic substances released by industrial, urban and agricultural activities. To assess the amount of bioavailable contaminants, research programmes have been developed to identify species able to accumulate contaminants in their tissues that can be correlated with concentrations in the water or sediments (Butler et al. 1971; Behrens and Duedall 1981; Mackay 1982; Rainbow et al. 1990). For this purpose, sessile invertebrates and sedentary fishes were mostly chosen according to criteria related to their morphology, physiology and ethology (Phillips 1976a, b; Mc Dermott et al. 1976; Cunningham 1979; Boalch et al. 1981; Widdows et al. 1982; Bruggeman et al. 1984; Regoli and Orlando 1993). The identification of these sentinel species has led to the

Responsible editor: Philippe Garrigues

M.-L. Mahaut (✉) · E. Baudinière
CNAM/INTECHMER,
BP 324, 50103 Cherbourg, France
e-mail: marie-laure.mahaut@cnam.fr

O. Basuyaux · C. Chataignier
SMEL,
Zac de Blainville,
50560 Blainville sur Mer, France

J. Pain · C. Caplat
Université de Caen Basse Normandie,
FRE3484 CNRS BioMEA, Esplanade de la Paix, BP 5186, 14032
Caen Cedex, France

Published online: 30 September 2012

Springer

ANNEXE 22

Communications scientifiques en soumission lors de colloque

En soumission pour présentation orale au Colloque Francophone d'Anaba (Algérie)

***Hymeniacidon perlevis* (Montagu, 1818), un spongiaire pour la biosurveillance des zones portuaires**

O. Basuya¹, C. Caplat², S. Leglatin³ & M-L Mahaut⁴

¹ SMEL, Zac de Blainville, 50560 Blainville sur mer, France (obasuya^x@smel.fr)

² FRE 3484 BioMEA CNRS-INEE, Université de Caen, Esplanade de la Paix 14032 Caen, France

³ LDA50, 1352 Avenue de Paris - CS 33608 – 50008 Saint-Lô Cedex, France

⁴ CNAM/Initechmer, BP 324, 50103 Cherbourg, France

Depuis plus de 40 ans, de nombreux programmes de recherche et de surveillance détectent la présence de contaminants chimiques dans l'environnement aquatique en mesurant leur bioaccumulation dans les tissus d'espèces vivantes. La directive européenne 2000/60/CE fixe pour 2020 des objectifs environnementaux en termes de qualité des eaux côtières. Dans ce contexte, le programme SPONTOX (SPONGiaires TOXicité) a été mis en place en 2009 pour tester les potentialités des éponges marines en tant que bioindicateurs de la contamination chimique de l'eau. Les spongiaires sont des animaux qui présentent une organisation très primitive ; leur physiologie est cependant adaptée pour maximiser l'efficacité de la filtration de l'eau qui leur permet de se nourrir, et qui les amène également à concentrer les contaminants. L'espèce cosmopolite *Hymeniacidon perlevis* très fréquente en zone intertidale et infralittorale, a montré des capacités exceptionnelles pour bioaccumuler les contaminants métalliques et les HAP en zone côtière (Mahaut *et al.*, soumis).

En 2011, une importante campagne d'observation par caging a été déployée dans un port français afin de tester les potentialités d'*Hymeniacidon perlevis* dans le cadre d'études d'impact d'activités portuaires sur l'environnement. Des cages contenant des boutures de cette espèce ont été placées dans différents sites du port de Cherbourg alignés selon un axe sud-nord. En parallèle, des moules (*Mytilus edulis*), organismes couramment intégrés aux réseaux de surveillance, ont également été placées dans ces cages afin de comparer les réponses apportées par ces deux organismes « sentinelles » dans le cadre de surveillance de qualité des eaux portuaires. Les dosages en contaminants dans les boutures d'éponges et les tissus de moules ont débuté 1 semaine après l'immersion des cages, et se sont prolongés pendant 2 mois à raison d'un prélèvement tous les 15 jours. Les résultats de la concentration en métaux mais également en contaminants organiques montrent que l'éponge *Hymeniacidon perlevis*, placée dans différents secteurs du port de Cherbourg, bioaccumule régulièrement dans le temps les contaminants présents dans l'eau et permet la localisation des zones les plus contaminées. De plus, les concentrations après 60 jours d'immersion sont apparues proches de celles mesurées dans les populations naturelles présentes dans le port, aux mêmes sites. Cette expérience de caging de spongiaires a donc permis de collecter des données intéressantes sur la qualité de l'eau, mais également de prouver que l'espèce choisie est sensible aux variations de concentration en contaminants. En effet, les résultats obtenus ont mis en évidence que le Port de Cherbourg n'est pas homogène en terme de qualité de ses eaux et que des différences importantes sont observées entre les sites. De même, les expérimentations grâce au caging ont permis de mesurer des taux de bioaccumulation par cette éponge sur plus de deux mois. L'indicateur *Hymeniacidon perlevis* est apparu pertinent pour le suivi de la qualité d'eau et en particulier pour le suivi de la teneur en HAP et en métaux. Cette première étude confirme le grand potentiel de l'espèce choisie en tant que bioindicateur.

En soumission pour un poster au Colloque Francophone d'Anaba (Algérie)

**Inventaire et état chimique des colonies de spongiaires en Basse-Normandie -
Hymeniacidon perlevis, une espèce pertinente pour le suivi de la qualité des eaux côtières ?**

C. Caplat¹, O. Basuyaux², S. Leglatin³ et M-L Mahaut⁴

¹ FRE 3484 BioMEA CNRS-INEE, Université de Caen, Esplanade de la Paix 14032 Caen, France (christelle.caplat@unicaen.fr)

² SMEL, Zac de Blainville, 50560 Blainville sur mer, France

³ LDA50, 1352 Avenue de Paris - CS 33608 – 50008 Saint-Lô Cedex, France

⁴ CNAM/Intechmer, BP 324, 50103 Cherbourg, France

Depuis quelques années, les pays membres de l'Europe se préparent à l'entrée en vigueur pour 2020 de la directive européenne cadre sur l'eau (DCE, 2000/60/CE) fixant des objectifs environnementaux en termes de qualité chimique et écologique de leurs eaux côtières. Les autorités concernées (états, collectivités territoriales, agences de bassin...) ont été sollicitées et soutiennent fortement les initiatives scientifiques visant à développer de nouveaux outils permettant le suivi de la qualité chimique de ces eaux. Dans ce contexte, le programme SPONTOX (SPONGiaires TOXicité) a été mis en place en 2009 pour tester les potentialités des éponges marines en tant que bioindicateurs de la contamination chimique des eaux.

Les spongiaires sont des animaux qui se retrouvent dans tous types de milieux aquatiques, littoral, mer, grands fonds, ainsi que dans les eaux de rivières. Ils présentent une organisation très primitive se nourrissant par filtration de la fraction dissoute et d'une partie des matières en suspension dans les eaux. Ces organismes filtrent en quelques secondes leur propre volume d'eau. Ce mode de développement les amène ainsi à concentrer fortement les contaminants présents dans les milieux aquatiques.

Au vu de ces propriétés, les éponges sont apparues comme des candidates idéales pour étudier la qualité des eaux côtières et répondre aux besoins imposés par la DCE. Le programme SPONTOX a donc défini, comme premier objectif, l'identification des différentes espèces présentes en zones intertidale et infralittorale des côtes bas-normandes. Puis, dans un deuxième temps, ce programme a cherché à quantifier les concentrations en contaminants métalliques et organiques dans les espèces collectées. De 2010 à 2011, des campagnes de prélèvements de spongiaires ont alors été menées sur le littoral bas-normand afin de mesurer les concentrations en 3 métaux (Cu, Cd et Zn) et en HAP de ces échantillons naturels.

Une espèce, *Hymeniacidon perlevis*, est apparue pertinente par rapport aux autres espèces étudiées, en termes de distribution spatiale et de bioconcentration de ces contaminants. En effet, cette espèce est répandue sur presque toutes les zones côtières bas-normandes définies par la DCE et montre une capacité de concentration en Cu, Cd, Zn et HAP plus importante par rapport aux autres éponges identifiées en Basse-Normandie.

Ces premiers résultats ont confirmé le grand potentiel de l'espèce pouvant être choisie comme bioindicateur de la qualité des eaux côtières.

ANNEXE 23

Poster réalisé pour le colloque des Aires Marines Protégées 2 & 3 novembre 2011

Des éponges pour surveiller la qualité de l'eau dans le Golfe Normano-Breton

M-L. Mahaut^{1,3}, O Basuyaux², S. Le Glatin³ et C Caplat⁴
¹CNAM/INTECHMER, BP 324, 50103 Cherbourg cedex (marie-laure.mahaut@cnam.fr)
²SMEL, Zac de Blainville, 50560 Blainville/Mer
³LDA 50 – 1352 Avenue de Paris - CS 33608 – 50008 Saint-Lô Cedex
⁴ERPCB EA 3914 IUT-UFR Sciences, Université de Caen Basse-Normandie, boulevard du Maréchal Juin, 14032 Caen

INTRODUCTION
Depuis près de 50 ans, de nombreux programmes de recherche et de surveillance détectent la présence de contaminants chimiques dans l'environnement aquatique en étudiant leur bioaccumulation dans les tissus d'espèces vivantes. En 2000, la directive cadre européenne sur l'eau 2000/60/CE (DCE) est adoptée et fixe pour 2020 des objectifs environnementaux en termes de qualité des eaux côtières. Dans ce contexte, le programme SPONTOX (SPONGIAIRES TOXICITÉ) a été mis en place en 2009 pour tester les potentialités des éponges en tant que bioindicateurs de la contamination chimique de l'eau. Les spongaires sont des animaux présentant une organisation très primitive mais adaptée pour maximiser l'efficacité de la filtration de l'eau qui, en les nourrissant, les amène aussi à concentrer les contaminants.

MATÉRIELS ET MÉTHODES
Un des premiers objectifs du programme SPONTOX a été d'étudier la distribution spatiale des populations intertidales d'éponges sur les côtes de Normandie. Durant l'année 2010, les 16 masses d'eau définies par la DCE le long des côtes normandes ont été prospectées. Plus de 700 colonies ont été prélevées en zone médiolittorale et identifiées à l'aide de clés de détermination (Ackers *et al.*, 2007). La richesse spécifique des éponges a été estimée pour chacune de ces masses d'eau, permettant d'établir une corrélation entre les caractéristiques environnementales et la diversité des espèces.

Une seconde démarche a consisté à évaluer les capacités de bioaccumulation des espèces les plus fréquentes. Des métaux, HAP et PCB a été dosés dans les tissus et les résultats ont été comparés aux données du réseau ROCCH (ex RNO) publiées pour des moules prélevées sur ces mêmes zones DCE.

Une optimisation d'une méthode de dosage des contaminants organiques adaptée à la matrice « spongaire » est en développement. La spongiculture, en cours d'optimisation, devrait permettre d'obtenir des implants de qualité homogène et utilisables lors de bio-surveiller par caging.

RESULTATS:
42 espèces d'éponges ont été identifiées en zone intertidale sur les 16 zones DCE prospectées, dont 36 sur les estrans des 4 masses d'eau ouvertes sur le Golfe normano-breton : 25 espèces sur l'estran des îles Chausey (HC 01), 11 espèces près de Granville (HC 02), 18 espèces à Blainville-sur mer (HC 03), et 4 proches du Port de Diélette (HC 04). *Hymeniacidon perlevis* est apparue la plus fréquente, aussi bien dans le Golfe normano-breton que sur le reste des côtes normandes. C'est également la seule à avoir été prélevée en zone médiolittorale, les autres espèces étant localisées en horizon infralittoral. Les dosages de contaminants dans les tissus de cette espèce ont laissé apparaître une concentration en fluoranthène (HAP) plus de 10 fois supérieure à celle relevée dans les moules. De même, la capacité de cette espèce à bioconcentrer le zinc est 16 fois supérieure à celle des moules. Par contre, aucune des éponges analysées ne semblent bioaccumuler les PCB.

Pourquoi *Hymeniacidon perlevis* est-elle proposée comme espèce bioindicatrice de la qualité de l'eau ?
Les recherches conduites depuis fin 2009 dans le cadre du programme SPONTOX ont permis de montrer qu'*Hymeniacidon perlevis* rassemble un très grand nombre des qualités attendues d'un « bioindicateur quantitatif ».

1. Un bioindicateur doit avoir une large aire de répartition
Hymeniacidon sp. est observée dans tous les océans et à différentes latitudes.

2. Une espèce indicatrice doit supporter une large gamme de conditions environnementales et climatiques

3. Les prélevements doivent être faciles à réaliser
H. perlevis est une espèce très commune et abondante en zone médiolittorale. Parce qu'elle est dépourvue d'organes, la colonie est analysée dans son ensemble.

4. L'espèce doit être de préférence sédentaire

5. La collecte, la dissection et la prise d'échantillons des tissus doivent être simples
H. perlevis a été décrite pour la première fois en 1818 par Montagu. L'eau chargée de nutriments pénètre dans ce filtreur par des pores s'ouvrant sur les canaux plus ou moins complexes. La reproduction peut être sexuée ou asexuée par bouturage. Son existence coloniale lui confère une espérance de vie élevée de durée indéfinie.

6. L'espèce doit être taxonomiquement bien documentée et stable

7. L'espèce doit avoir une durée de vie suffisamment longue pour pouvoir accumuler les polluants sur de longues périodes
H. perlevis a été décrite pour la première fois en 1818 par Montagu. L'eau chargée de nutriments pénètre dans ce filtreur par des pores s'ouvrant sur les canaux plus ou moins complexes. La reproduction peut être sexuée ou asexuée par bouturage. Son existence coloniale lui confère une espérance de vie élevée de durée indéfinie.

8. Son mode de vie doivent être documentés

9. Son écologie et son mode de vie doivent être documentées

10. Un bioindicateur doit pouvoir subir des tests éco-toxicologiques

11. L'espèce doit concentrer suffisamment pour permettre des dosages sans préconcentration
Des tests éco-toxicologiques ont été réalisés dans le cadre du programme Spontox. Les premiers résultats montrent une bonne corrélation entre la concentration en contaminants dans l'eau et celle dans les tissus. Cette éponge est apparue robuste et capable de survivre dans un milieu présentant un niveau de contamination important.

12. L'espèce doit être abondante
H. perlevis peut se reproduire par bouturage. Des essais d'élevage en conditions contrôlées sont en cours.

Les quantités disponibles pourront permettre la multiplication des tests éco-toxicologiques mais également la mise en place de suivi *in situ* par caging.

Revue de presse

Manche Mag décembre 2011

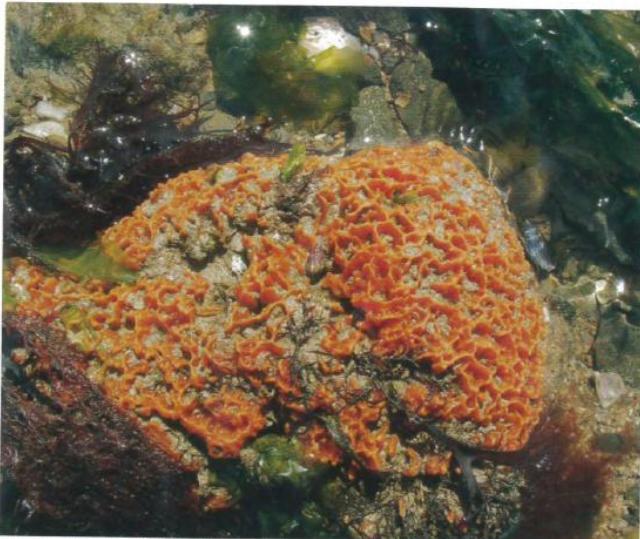
Développement durable

manche.tv | manche.fr

> EAUX LITTORALES

Des éponges pour veiller sur l'écosystème

La qualité de l'environnement marin a un impact important sur nombre d'activités pratiquées sur nos côtes. Bientôt, la tâche de suivre au plus près l'évolution qualitative des eaux et de détecter les éventuelles pollutions sera confiée à des éponges, organismes marins aptes à filtrer de grandes quantités d'eau.



Hymeniacidon perlevis, un parfait « capteur de pollution »

Département largement ouvert sur la mer, la Manche se doit de veiller à la qualité de ses eaux littorales, car nombre d'activités économiques en dépendent : la pêche et l'aquaculture, bien sûr, mais aussi le tourisme. Or, l'écosystème côtier est d'une grande complexité, ce qui ne facilite pas son suivi scientifique. De plus, la recherche de certains éléments polluants, dont la présence peut être très diffuse, voire à la limite du seuil de détection, se révèle souvent délicate. Enfin, le coût souvent élevé des analyses de laboratoire est inadapté pour un suivi de routine.

C'est de ce constat qu'est né le programme « Spontox » (pour SPONGiaire TOXicologie) qui réunit le Syndicat mixte pour l'équipement du littoral (lire encadré), le Conservatoire national des arts et métiers (Cnam/Intechmer) de Cherbourg-Octeville et l'université de Caen. Objectif de ces trois équipes locales de chercheurs : proposer une alternative fiable et économique pour le suivi de la qualité du milieu marin. L'idée de ces scientifiques est d'utiliser un organisme capable de concentrer certaines substances polluantes pour en faciliter la détection. Animal aquatique capable de filtrer d'importantes

quantités d'eau, l'éponge a été jugée particulièrement adaptée pour jouer ce rôle de « capteur de pollution ». Depuis le début de l'année, des mesures et des évaluations sont donc menées en liaison avec le Laboratoire départemental d'analyses de la Manche (LDA 50), pour déterminer quelle espèce d'éponge présente les meilleures capacités de concentration des substances polluantes. En collaboration avec les Ports Normands Associés, une étude sur le port de Cherbourg a d'ores et déjà clairement établi l'efficacité des éponges dans la surveillance de la qualité des eaux du port et de la rade. Après une phase de tests, cette technique prometteuse pourra être « exportée » sur d'autres zones littorales.



Olivier Basuyaux, chargé d'études pour le SMEL, et Marie-Laure Mahaut, maître de conférence au Cnam/Intechmer, au colloque de Hong-Kong.

Début juillet, plusieurs chercheurs engagés dans le programme Spontox ont participé à Hong-Kong à un colloque d'écotoxicologie, dans lequel ils ont présenté les premiers résultats.

► (PLUS D'INFOS : smel.fr)

► (Contact :

- **Syndicat mixte pour l'équipement du littoral**
Maison du Département
50050 SAINT-LÔ Cedex
02 33 05 96 51
- **Centre Expérimental**
Zone conchylicole
50560 BLAINVILLE-SUR-MER
02 33 76 57 70



veille sur le littoral !

Créé il y a tout juste 30 ans par le conseil général de la Manche, le Syndicat mixte pour l'équipement du littoral (SMEL) est un établissement public basé à Blainville-sur-Mer, qui a pour mission de mettre en valeur les ressources biologiques du littoral (poissons, crustacés, mollusques, végétaux marins) et de développer les activités littorales, à l'exclusion du tourisme et de la plaisance. Conscient que la pêche et l'aquaculture ne peuvent pas développer leurs activités dans un environnement dégradé, le SMEL veille tout particulièrement à la qualité des eaux. C'est à ce titre qu'il participe, en collaboration étroite avec le Cnam/Intechmer et l'université de Caen, au programme Spontox, financé par le Département de la Manche, l'Agence de l'Eau Seine-Normandie et le Syndicat mixte du Cotentin.

L'éponge de mer détecte les pollutions

Les éponges de mer ont l'art de concentrer des produits toxiques. A Blainville-sur-Mer, le Smel cherche à élever des « testeuses ».

Reportage

Comment, en milieu marin, déceler le taux de cobalt, de cadmium ou d'autres molécules, comme celles contenues dans certaines peintures utilisées pour les bateaux ? Jusqu'à alors, on comptait sur les moules. Véritables pompes à eau de mer, elles ont l'art de collectionner tout ce qui traîne. La solution a fait ses preuves de longue date, mais l'animal ne s'accorde pas partout.

Le Smel, le laboratoire de Blainville-sur-Mer, s'est lancé sur la piste de l'éponge voilà deux ans avec l'université de Caen et l'Institut de Cherbourg. « L'idée n'est pas nouvelle », précise Olivier Basuyaux, responsable innovation. L'équipe a repéré une quarantaine d'espèces d'éponges en Basse-Normandie.

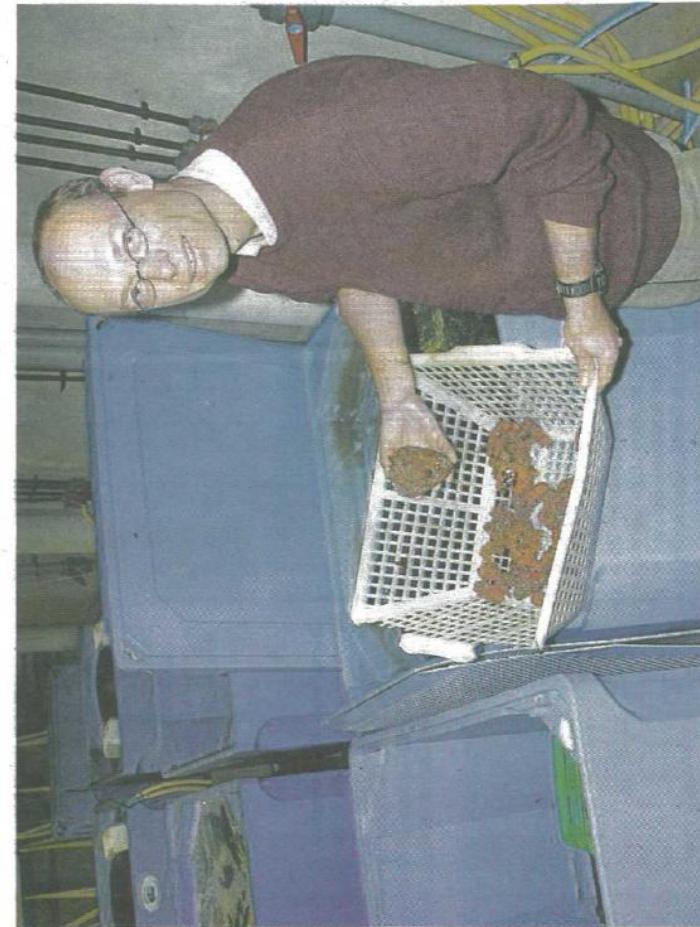
En cage sur une dizaine de sites

Chacune accumule plus ou moins de produits différents. L'une d'entre elles, l'Hymeniacidon Perlevis, s'avère particulièrement intéressante. Elle n'a pas son pareil pour conserver les métaux et les HAP (hydrocarbures). Ces éponges, prélevées en milieu naturel, ont été « nourries » de molécules peu fréquentables afin d'établir une échelle de référence. « On fait le rapport entre la dose contenue dans le milieu et ce que l'on retrouve dans l'éponge. »

Des travaux pratiques ont été réalisés à Cherbourg. Des éponges ont été mises en cage et disposées en plusieurs endroits du port. « On a trouvé des quantités de métaux et d'HAP différentes selon les endroits : bassin fermé, port de plaisance et de commerce. » Pour être sur de ne pas se tromper, des moules ont été placées en parallèle, histoire de comparer les résultats.

Pour aller au bout de la démarche, le laboratoire du Smel veut produire des éponges. « On veut éviter de les prélever massivement dans le milieu naturel. On bute sur certains obstacles mais on devrait y arriver. » L'expérience de terrain va être étendue en 2012. Des éponges en cage vont être réparties sur une dizaine de sites normands d'Honfleur à Lingreville.

Thierry BALLU.



Corentin, futur officier

Corentin de Castelnau est bientôt après quatre ans d'études à l'École



Trois questions à...

Corentin de Castelnau,
24 ans, élève en
4^e année de
l'École navale au
sud de la rade de
Brest.

Comment avez-vous intégré l'École navale ?

Après un bac scientifique, j'ai effectué deux ans de classes préparatoires aux grandes écoles spécialisées. J'ai ensuite passé les concours de l'École navale. Les écrits sont ceux du concours d'ingénieurs de la Banque centrale-Supélec. Les candidats admissibles passent un oral et des épreuves sportives communs aux écoles militaires.

Comment se déroule la formation ?

Les deux premières années sont des années avec des cours théoriques. Il est tout de même possible de faire de courts stages sur des corvettes. J'ai même effectué deux mois sur un bâtiment école au Canada et aux USA. La troisième année, il y a un stage en entreprise. J'ai travaillé à Thalès sur l'acoustique sous-marine. Puis, cinq mois à bord du BPC (Bâtiment de projection et de commandement) de type Mistral où j'ai pu découvrir Djibouti, les Maldives et Abu Dhabi. Enfin, en 4^e année, après un dernier séminaire de cours nous avons notre première affectation en janvier. Nous devenons alors officier de quart sur