



HAL
open science

**Etude intégrée de l'effet des apports amont et locaux sur
le fonctionnement de la Garonne estuarienne
(ETIAGE) : Addendum année 2 Avril 2011 - Mars 2012**

H. Etcheber, Mario Lepage

► **To cite this version:**

H. Etcheber, Mario Lepage. Etude intégrée de l'effet des apports amont et locaux sur le fonctionnement de la Garonne estuarienne (ETIAGE) : Addendum année 2 Avril 2011 - Mars 2012. irstea. 2013, pp.172. hal-02605337

HAL Id: hal-02605337

<https://hal.inrae.fr/hal-02605337>

Submitted on 16 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



dépasser les frontières



Etude intégrée de l'effet des apports amont et locaux sur le fonctionnement de la Garonne estuarienne (ETIAGE)



Addendum année 2 : Avril 2011 – Mars 2012

Editeurs : H. Etcheber et M. Lepage

Etcheber H. et Lepage M. 2013 : Etude intégrée de l'effet des apports amont et locaux sur le fonctionnement de la Garonne estuarienne (ETIAGE). Addendum Année 2 : Avril 2011-Mars 2012. Rapport n°175, 172p.

Annexe 1

Valorisation scientifique des travaux

Année 2 : Avril 2011- Mars 2012

PUBLICATIONS

Etcheber H., Schmidt S., Sottolichio A., Maneux E., Chabaux G., Escalier J.-M., Wennekes H., Derriennic H., Schmeltz M., Quéméner L., Repecaud M., Woerther P., Castaing P. (2011) Monitoring water quality in estuarine environments: lessons from the MAGEST monitoring program in the Gironde fluvial-estuarine system. *Hydrology and Earth System Sciences* **15**, 831-840.

Sottolichio A., Castaing P., Etcheber H., Maneux E., Schmeltz M., Schmidt S. (2011) Observations of suspended sediment dynamics in a highly turbid macrotidal estuary, derived from continuous monitoring. *Journal of Coastal Research* **64**, 1579-1583.

COMMUNICATIONS ORALES

Aminot Y, Pardon P, Budzinski H. Contamination de la Garonne estuarienne par les résidus médicamenteux : Apports amonts et locaux (2012). Réseau Recherche Littoral Aquitain (RRLA), 8ème journée de l'estuaire 22 mars 2012, Talence, France.

Cruz J, Le Menach K, Geneste E., Devier M., H., Budzinski H. Le fipronil en estuaire de la Gironde : un enjeu écologique et analytique (2012) Réseau Recherche Littoral Aquitain (RRLA), 8ème journée de l'estuaire 22 mars 2012, Talence, France.

Etcheber H., G. Abril, C. Bertier, V. Foussard, A. Lanoux, M. Schmeltz, S. Schmidt, A.Sottolichio and L. Gorse . Dissolved oxygen contents of estuarine waters: interest of continuous monitoring in the Gironde, Loire and Seine Estuaries. ELET - ECSA Symposium, Bordeaux, France, 24-28 Octobre 2011.

H. Etcheber , Schmidt S. , Sottolichio A., Schmeltz M., Maneux E. Advantages of high frequency measurements of the water quality to the understanding of climatic and/or anthropogenic impacts in estuarine environment. Vulnerability of coastal ecosystems to global change and extreme events – Biarritz – 18-21 Octobre 2011.

Etcheber H, C. Bertier, V. Foussard, S. Schmidt, A. Sottolichio, M. Schmeltz. Surveillance des estuaires et optimisation des partenariats. BEEST, Colloque de restitution, Paris, 19 Mai 2011.

Etcheber H. ETude Intégrée de l'effet des Apports amonts et locaux sur le fonctionnement de la Garonne Estuarienne. RRLA – Les enjeux de la Recherche Littorale en Aquitaine – Bordeaux - 28 Mars 2011.

Etcheber H. ETude Intégrée de l'effet des Apports amonts et locaux sur le fonctionnement de la Garonne Estuarienne. NEED – Forum Nouvelle Economie Durable – Bordeaux - 24 Mars 2011.

Lanoux A., H. Etcheber, G. Abril, P. Anschutz, S. Schmidt, A. Sottolichio. Oxygénation des eaux de la Garonne estuarienne. 8ème Journée de l'estuaire, Cestas, France, 22 Mars 2012.

Lanoux A., H. Etcheber, G. Abril, P. Anschutz, F. Garabetian, S. Schmidt and A. Sottolichio. Impact of the wastewaters discharges on the physico-chemical quality of a macrotidal estuary (Gironde). ELET – ECSA Symposium, Bordeaux, France, 24-28 Octobre 2011.

Lanoux A., H. Etcheber, P. Anschutz, G. Abril, F. Garabetian, S. Schmidt, A. Sottolichio, A. Coynel & B. Sautour. Impact des rejets urbains sur la qualité physico-chimique des eaux de la Garonne estuarienne (programme ETIAGE). Colloque International CITEF “La gestion de l'eau, défi du XXème siècle, Limoges, France, 19-21 Octobre 2011.

COMMUNICATIONS PAR POSTER

Aminot Y, Pardon P, Budzinski H. Pharmaceutical residue levels in river garonne: coverage of a raw wastewater bypass event (2011). European Meeting on Environmental Chemistry (EMEC), 7-10 décembre 2011, Clermont-Ferrand, France.

RAPPORTS

Rapport Synthétique Annuel D'avancement (Avril 2010-Mars 2011).

Addendum Rapport ETIAGE (Avril 2010-Mars 2011).

Rapport Synthétique Annuel D'avancement (Avril 2011-Mars 2012).

Addendum Rapport ETIAGE (Avril 2011-Mars 2012).

Aminot Y., Les Médicaments Dans Les Eaux De La Garonne : Suivi D'un Episode De Rejet D'eaux Brutes. 4/11/11 (présenté en annexe 4 de ce rapport).

Collard M., Etude de la contamination des milieux aquatiques par les contaminants émergents : application aux composés pharmaceutiques et à la Garonne estuarienne. Rapport de stage de M2, juin 2011.

Cruz J., Étude de la contamination des milieux aquatiques par les pesticides : Application aux hydrosystèmes d'Aquitaine, Développement de nouveaux outils et suivi environnemental. Rapport de stage de M2, Université Bordeaux1, juin 2011.

Deroubaix A., Impact des conditions environnementales de l'estuaire de la Gironde chez le copépode *Eurytemora affinis*, rapport de stage de M2, Université Bordeaux I, juin 2011, 35p.

Dranguet P., Effets isolés et combinés de l'exposition de *Corbicula fluminea* à l'hypoxie et au nickel par voie directe en laboratoire. Rapport de stage de M2, Université de Bordeaux I, juin 2011, 28p.

Gal V., Etude de la contamination des milieux aquatiques par les contaminants organiques : application aux composés pharmaceutiques dans le cadre du programme Etiage. Rapport de stage de M2, Université Bordeaux1, juin 2011.

Lanoux A., H. Etcheber, S. Pelloux & A. Ventura (2011). Impact du rejet d'effluents bruts sur le milieu naturel : arrêt de la station d'épuration de Louis Fargue – Avril 2011. 17 pp.

Lanoux A., H. Etcheber, S. Pelloux & A. Ventura (2011). Impact du rejet d'effluents bruts sur le milieu naturel : arrêt de la station d'épuration de Louis Fargue – Juillet 2011. 19 pp.

Schmidt S., H. Etcheber, A. Sottolichio & A. Lanoux (2011). Le réseau MAGEST : rapport scientifique annuel, 22 pp.

Annexe 2

Résultats du screening multi-classes

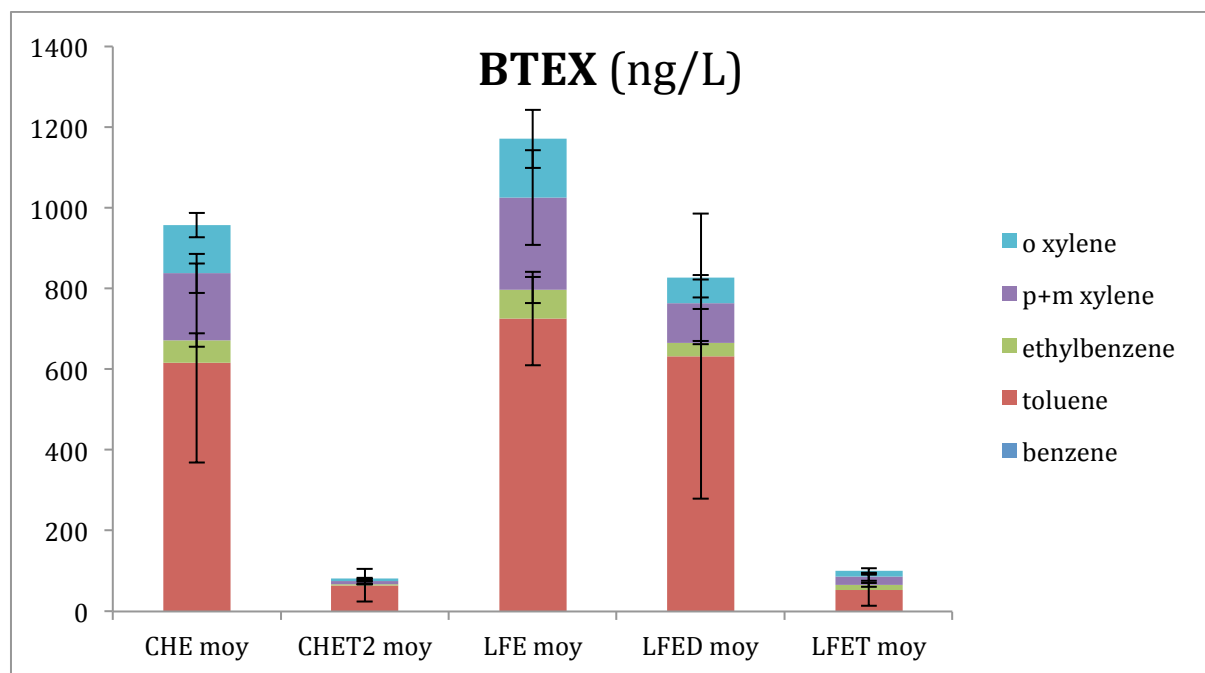
SOUS-ECHANTILLONNAGE

Les HAP, PCB-PBDE, OCP, phtalates, BTEX, ETBE-MTBE, hormones et alkylphénols ont été analysés sur un jeu réduit d'échantillons. Les prélèvements moyennés 24h en LFE, LFED, LFET, CHE et CHET2 du 8 et 10 février 2011 ainsi que du 8 et 10 mars 2011 sont concernés.

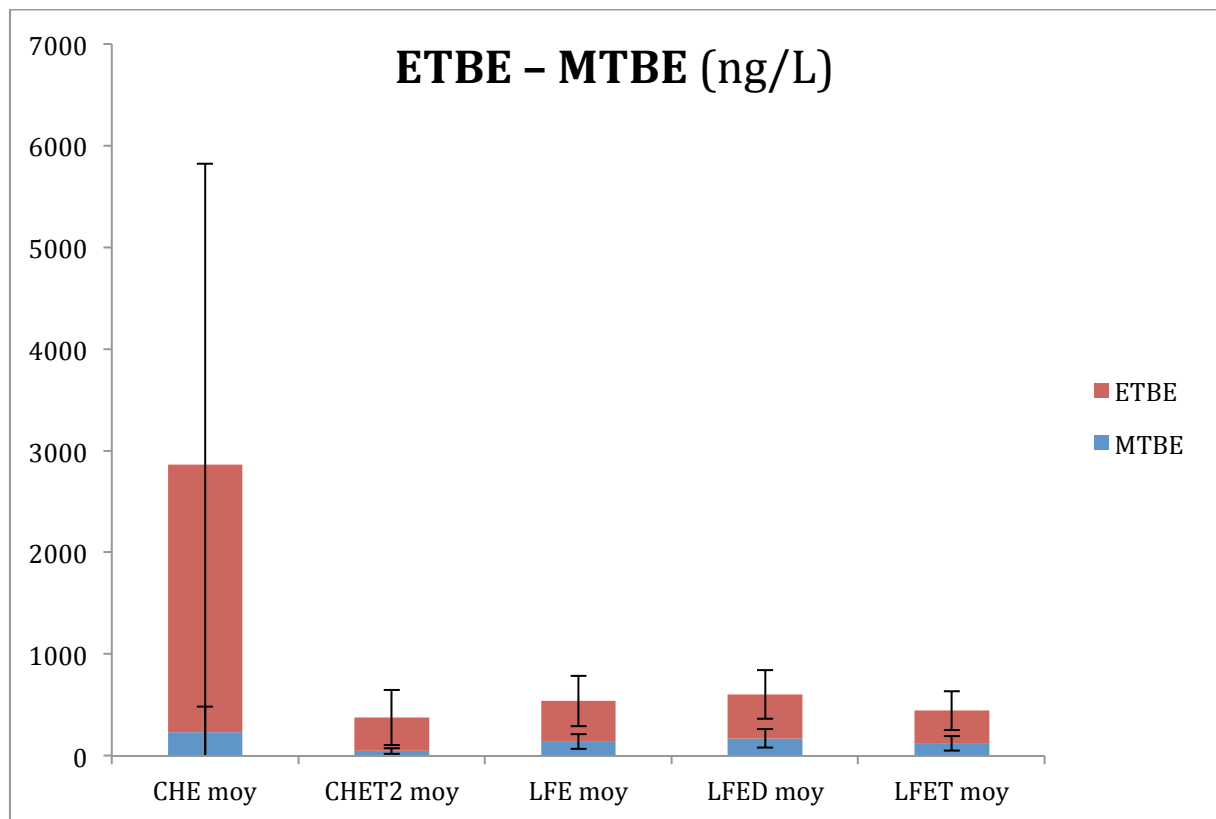
Les résultats seront exprimés comme la moyenne des 4 prélèvements de chaque point.

Pour les HAP, les PCB-PBDE, les OCP et les alkylphénols, la phase particulaire a également été analysée.

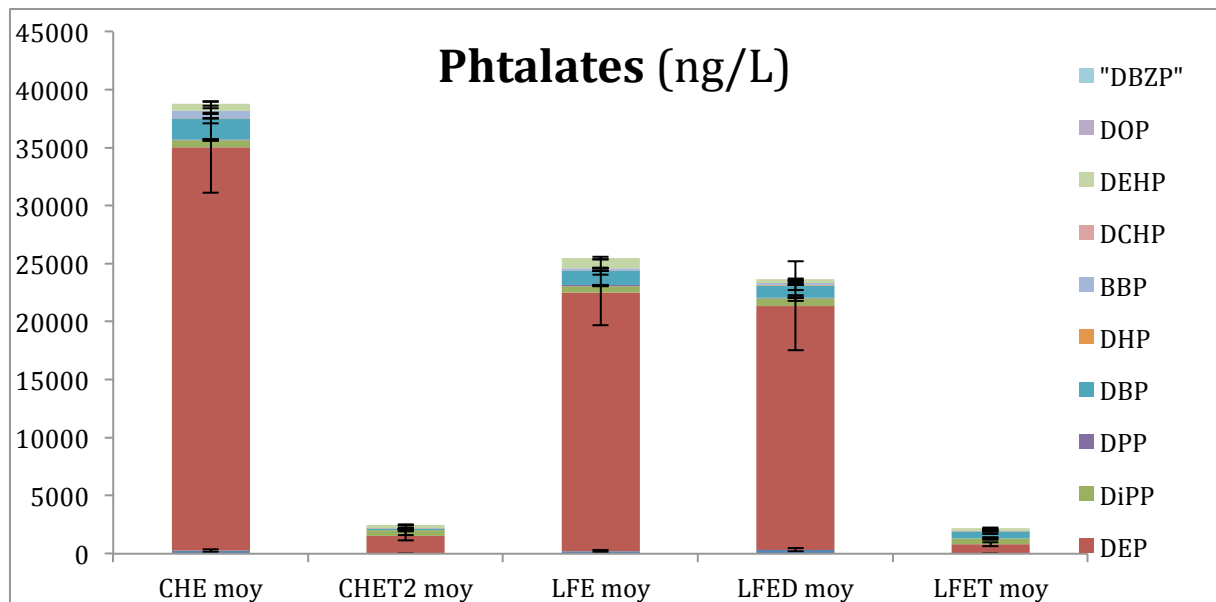
BTEX



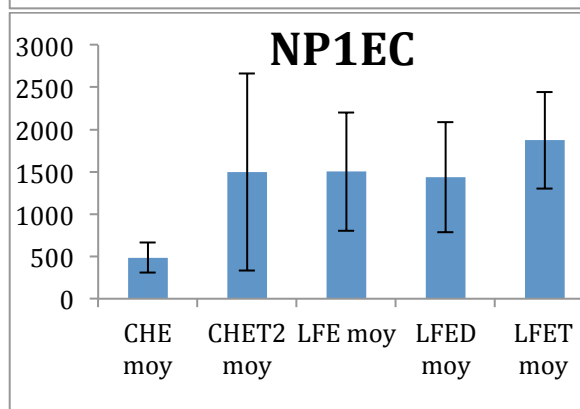
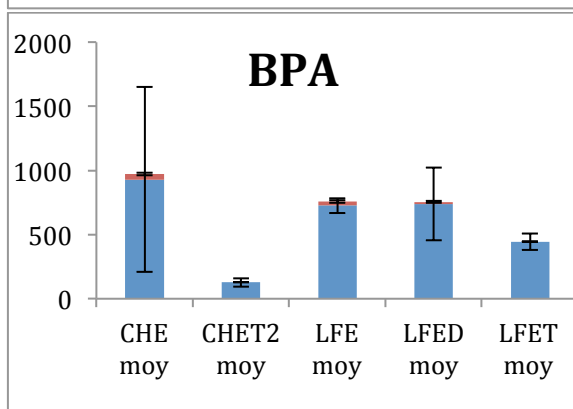
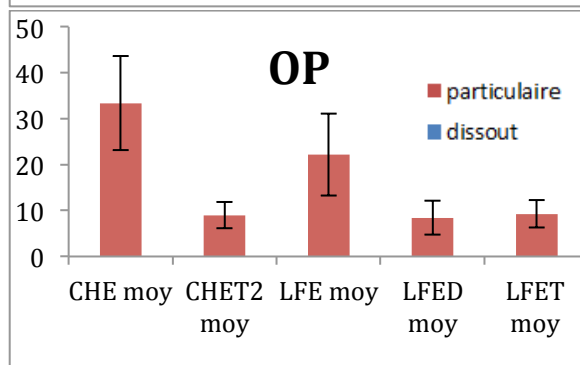
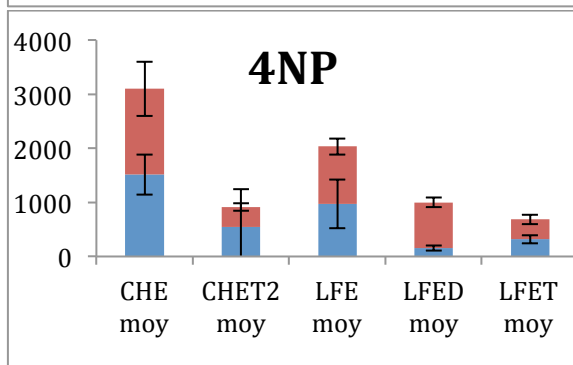
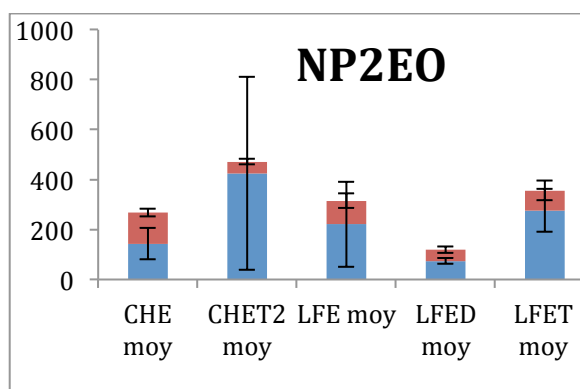
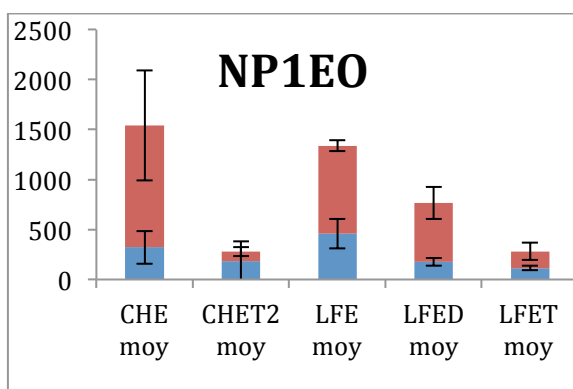
ETBE-MTBE



PHTALATES

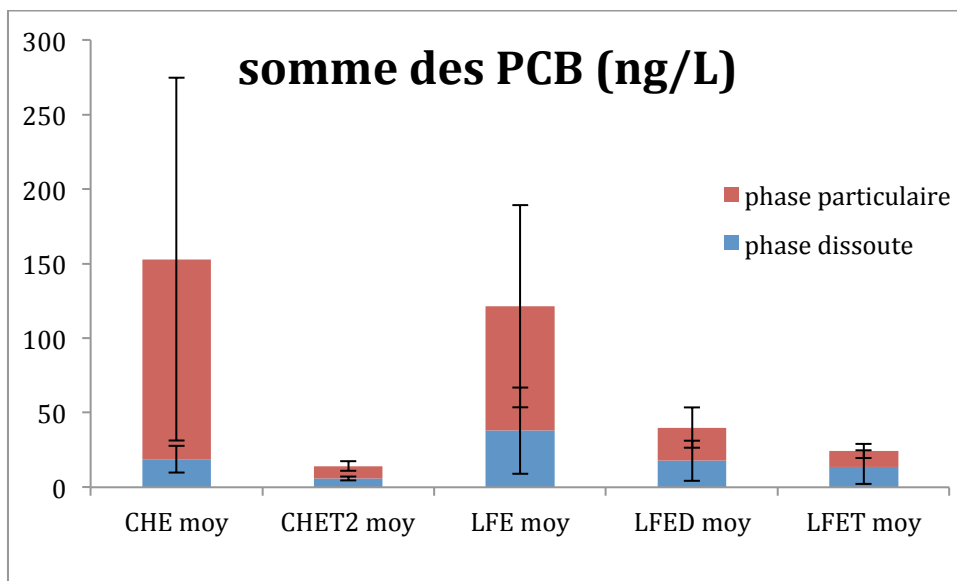
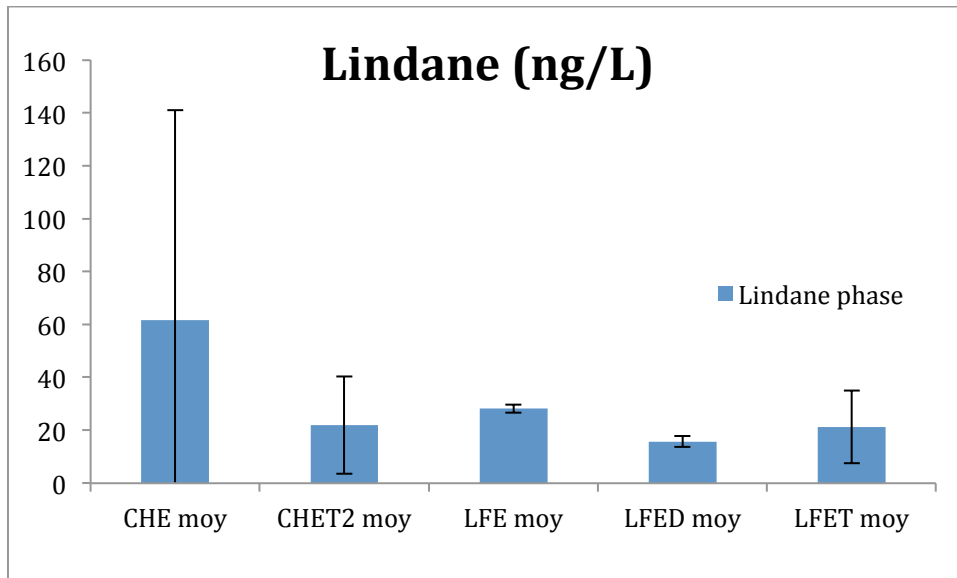


ALKYLPHENOLS (AKP)

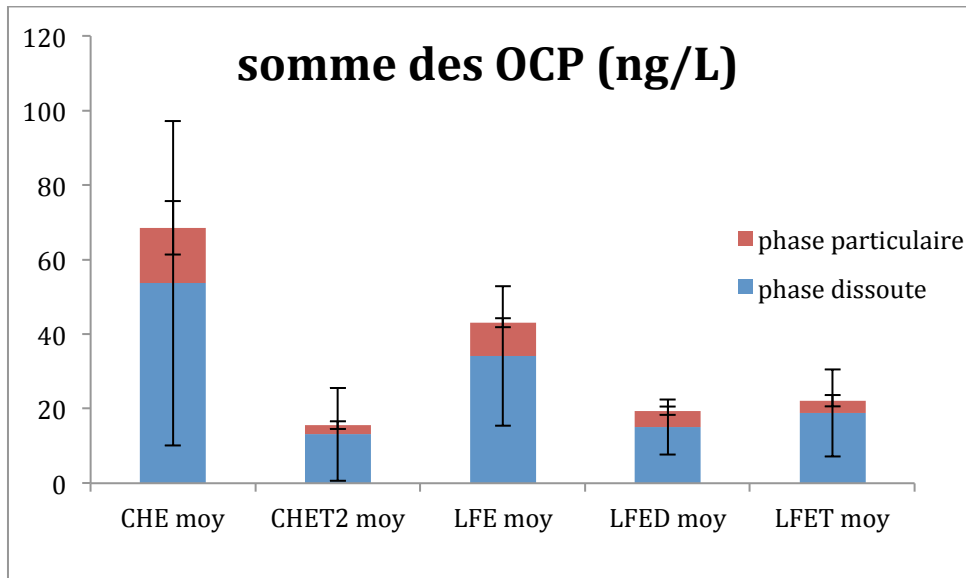


Les concentrations sont données en ng/L.

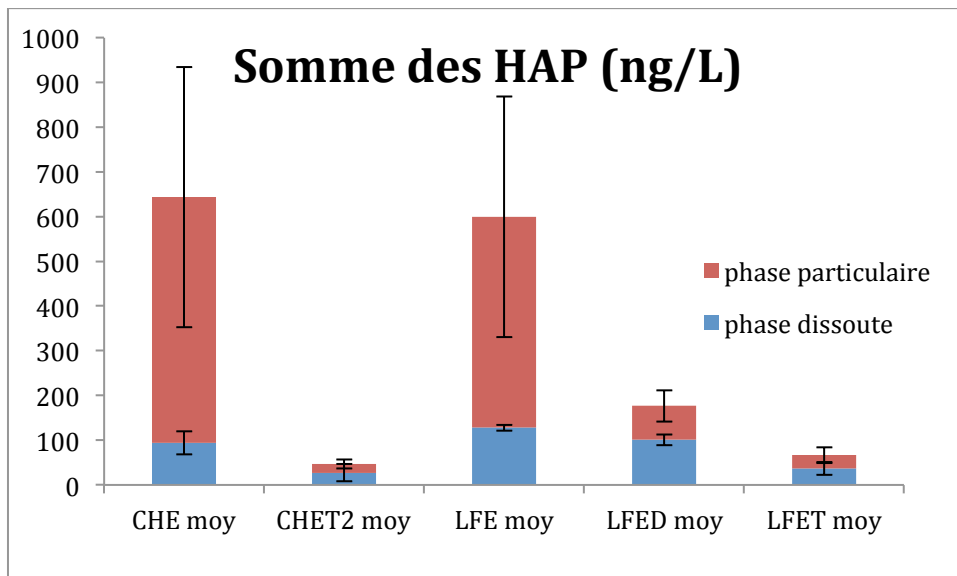
LINDANE ET POLYCHLOROBIPHENYLES (PCB)



PESTICIDES ORGANO-CHLORES (OCP)



HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES (HAP)



Annexe 3

Rapport complet d'avancement – axe 2 année 1

RAPPORT COMPLET D'AVANCEMENT – AXE 2

ANNEE 1

Objectifs

La Garonne estuarienne est un milieu sensible, réceptacle drainant un bassin versant de 56 000 km². La contamination quasi-généralisée des eaux de surface par différentes familles de micropolluants organiques comme l'estuaire de la Seine (résultats du programme Seine-Aval) ainsi que le peu de données existantes sur l'estuaire de la Gironde justifie la nécessité de documenter la contamination de la Garonne estuarienne. Il s'agit, selon les 5 actions définies dans cet axe, de :

- Action 1 : déterminer les contaminants organiques dans les effluents de la CUB arrivant en Garonne
- Action 2 : étudier le comportement de ces composés dans le bouchon vaseux
- Action 3 : comprendre les flux échangés et les approcher par échantillonnage passif
- Action 4 : comprendre les particularités du système estuarien girondin par comparaison avec d'autres systèmes estuariens
- Action 5 : étudier le transfert vers les organismes et approcher le risque écotoxicologique.

A noter que l'étude sera approfondie pour les contaminants émergents étudiés dans le cadre d'un travail de thèse et que les autres contaminants feront l'objet d'un suivi moins fin.

L'année 1 s'étend de janvier 2011 à mars 2011 pour l'axe 2. Le travail réalisé est essentiellement bibliographique.

Première partie : choix des molécules d'intérêt

Dans le cadre de l'action 1, il s'agit de caractériser des usages par des molécules traceurs d'activité. Ainsi, les HAP tracent la circulation auto ou le chauffage, les anticancéreux tracent un usage médical etc.

Un travail de choix des contaminants à suivre a été réalisé. L'objectif est de couvrir la sélection la plus vaste possible sur de multiples classes de contaminants. Les classes de contaminants à l'étude sont détaillées ci-après.

Résidus médicamenteux

L'étude approfondie concernant les résidus médicamenteux portera sur des molécules déjà développées au laboratoire et sur de nouvelles molécules.

Les molécules déjà développées au laboratoire sont présentées dans les tableaux 1 et 2 par classe thérapeutique (médicaments classiques) ou par famille (*i.e.* mode d'action) pour les antibiotiques. Le choix de ces molécules dans le cadre d'Etiage est justifié par de précédentes études (Seine-Aval, Flash...).

Tableau 1 : médicaments classiques par classe thérapeutique

Anti-rétroviraux	Analgésiques	βbloquants	Antidépresseurs	Psycholeptiques	bronchodilatateurs	Autres
abacavir indinavir lamivudine nelfinavir nevirapine ritonavir saquinavir stavudine zidovudine	aspirine acide salicylique ketoprofène naproxène diclofenac ibuprofène paracétamol	atenolol bisoprolol metoprolol propranolol sotalol timolol	imipramine doxépine amitriptyline fluoxétine	bromazepam nordiazepam alprazolam diazepam	salbutamol terbutaline théophylline	anticatabolisant clenbuterol stimulant caféine inhibiteur de la PDE-5 sildenafil Hypolipémiant gemfibrozil Anticonvulsivant carbamazépine

Tableau 2 : médicaments antibiotiques par famille

Pénicillines	Céphalosporines	Macrolides	Lincosamides	Fluoroquinolones
amoxicilline ampicilline pénicilline G pénicilline V oxacilline cloxacilline dicloxacilline	cefalexine cefotaxime cefepodoxime ceftiofur cefuroxime	azithromycine clarithromycine érythromycine josamycine roxithromycine spiramycine tylosine	lincomycine clindamycine	ciprofloxacine enrofloxacine marbofloxacine norfloxacine ofloxacine acide pipémidique acide oxolinique fluméquine

Tétracyclines	Sulfonamides	Phénicolés	Autre antibio
tétracycline oxytétracycline chlortétracycline doxycycline	sulfadiazine sulfadiméthoxine sulfamérazine sulfaméthazine sulfaméthizole sulfaméthoxazole sulfanilamide sulfapyridine sulfathiazole triméthoprime	chloramphénicol thiamphénicol	bacitracine monensine salinomycine virginiamycine acide fusidique métronidazole rifampicine

Le choix des nouvelles molécules pharmaceutiques a fait l'objet d'un travail bibliographique. Il s'agit, parmi plus de 4 000 substances autorisées à la vente en France, de sélectionner un nombre raisonnable de molécules susceptibles d'être présentes en station d'épuration et dans le milieu récepteur.

Plusieurs paramètres vont rentrer en compte :

- Les données de consommation renseignent sur les bons candidats à être présents en quantités importantes dans les eaux usées
- Les études pharmacocinétiques indiquent la métabolisation ou non des composés et complètent le point précédent en indiquant si la molécule est excrétée inchangée ou sous forme métabolisée
- Les publications d'autres équipes de recherche indiquent l'occurrence dans les eaux.

Les données de toxicité, quand elles existent, sont difficilement exploitables. En effet, l'absence de test standardisé rend très hétérogènes les effets recherchés, les espèces testées et les gammes de concentrations recherchées. Pour cette raison, les critères écotoxicologiques, bien que pertinents, ne sont pas appliqués dans cette sélection de molécules.

L'étude de ces critères a donc permis la sélection de 48 autres médicaments. Ces molécules sont présentées par famille dans le tableau 3, accompagnées de données ayant incité leur sélection.

Tableau 3 : molécules sélectionnées pour leur étude dans le cadre d'Etiage

Molécule	Présence avérée	Inclus dans la liste de priorisation de Besse&Garric, 2007.	Remarques
Agents de contraste			
Iopamidol	Détection systématique, 100aine ng/L en rivière hollandaise [1]	Pas pris en compte	Non métabolisé
Iopromide	Détection systématique, 100aine ng/L en rivière hollandaise [1]	Pas pris en compte	Non métabolisé
Iomeprol	Détection systématique, 100aine ng/L en rivière hollandaise [1]	Pas pris en compte	Non métabolisé
Amidotrizoate	Détection systématique, 100aine	Pas pris en compte	Non métabolisé

	ng/L en rivière hollandaise [1]		
Iohexol	Détection quasi-systématique, 100aine ng/L en rivière hollandaise [1]	Pas pris en compte	Non métabolisé
Ioxitalamate	Détection quasi-systématique, 10aine ng/L en rivière hollandaise [1]	Pas pris en compte	Non métabolisé
Hypolipidémiants			
Acide clofibrique	détection systématique dans les effluents et dans les eaux de surface [2]	Non	Métabolite principal du clofibrate. Taux d'excrétion 99%
Acide fénofibrique	Détection supérieure au µg/L en rejet de STEP [2]	Oui	Métabolite principal du fénofibrate. Taux d'excrétion 60%
Bézafibrate	Détection supérieure au µg/L en rejet de STEP [2]	Oui	
Acide 4-chlorobenzoïque	Détection à la 10aine de ng/L dans diverses eaux de surface du bassin Loire-Bretagne [3]	Pas pris en compte	Métabolite principal du bézafibrate
Pravastatine	Détection systématique le long de l'Ebre (Espagne) [4]	Oui	
Atorvastatine	Déteçté dans l'Ebre [4]	Non	Substance active d'un des 50 produits les plus vendus en officine en 2009 en quantités
Rosuvastatine	100aine de ng/L déteçté en rejet de step [5]	Pas pris en compte	Statine récente (AMM 2003). Substance active d'un des 50 produits les plus vendus en officine en 2009 en quantités
Psychotropes			
Venlafaxine	100aine de ng/L déteçté en rejet de step [6]	Non	
Oxazepam	Détection supérieure au µg/L en rejet de STEP [2]	Oui	Substance active d'un des 50 produits les plus vendus en officine en 2009 en quantités
Lorazepam	100aine de ng/L en rejet de STEP [6]	Non	

Clonazepam		Non	
Méprobamate	10aine de ng/L dans des eaux de boisson aux US [7]	Pas pris en compte	Résiste à l'ozonation et la chloration [7]
Codéine	100aine de ng/L en rivière au Pays de Galle [8]	Pas pris en compte	
Tramadol	Jusqu'au µg/L en rivière au Pays de Galle [8]	Oui	Substance active d'un des 50 produits les plus vendus en officine en 2009 en quantités
o-desméthyl tramadol		Oui	Métabolite principal du tramadol. Taux d'excrétion 60%.
Antiépileptiques			
Gabapentin	Jusqu'au µg/L en rivière au Pays de Galle [8]	Pas pris en compte	
Lamotrigine	100aine de ng/L en rivière aux USA [9]	Pas pris en compte	
Primidone	détection systématique dans les rejets de step [2]	Pas pris en compte	
Métabolites de la carbamazépine (6 moléc)	Détection supérieure au µg/L en rejet de STEP de carbamazépine époxyde [6]	Carbamazépine oui	Molécules pertinentes au vu du caractère persistant de la carbamazépine
Antihistaminiques			
Cétirizine		Non	Substance active d'un des 50 produits les plus vendus en officine en 2009 en quantités
Ranitidine	100aine de ng/L en rejet de STEP [10]	Oui	
Antihypertenseur			
Lisinopril	100aine de ng/L détecté en rejet de step [6]	Pas pris en compte	
Losartan	100aine de ng/L détecté en rejet de step [6]	Oui	
Irbesartan	Détection supérieure au µg/L en rejet de STEP [6]	Pas pris en compte	
valsartan	Détection supérieure au µg/L en rejet de STEP [6]	Non mais à surveiller	
β-bloquants			

Labetalol	100aine de ng/L détecté en rejet de step [6]	Pas pris en compte	
Acebutolol	10aine de ng/L détecté en eaux de surface [10]	Non	
Diurétique			
Furosémide	Détection supérieure au µg/L en rejet de STEP [2]	Oui	
Inhibiteurs de la pompe à protons			
Oméprazole	100aine de ng/L détecté en rejet de step [11]	Non	
5-hydroxy-oméprazole		Pas pris en compte	Métabolite principal de l'oméprazole
Antidiabétique			
Metformine	100aine de ng/L détecté en eaux de surface [12]	Oui	N'est pas métabolisé
Anti-inflammatoire			
2-hydroxy-ibuprofène	Détection à la 10aine de ng/L dans diverses eaux de surface du bassin Loire-Bretagne [3]	Oui	Métabolite de l'ibuprofène. Taux d'excrétion 25%.
Antibiotique			
Anhydro-erythromycine	100aine ng/L en rivière hollandaise [1]	Pas pris en compte	Métabolite de l'erythromycine
N-acétyl-sulfaméthoxazole	Détecté en concentrations supérieures au sulfaméthoxazole en step et eaux de surface [13]	Oui	Métabolite du sulfaméthoxazole (excrétion à 80% sous cette forme)
Hydroxy-métronidazole		Oui	Métabolite du métronidazole. Taux d'excrétion 28%.
Antiagrégant plaquettaire			
Clopidogrel		Non	Substance active d'un des 50 produits les plus vendus en officine en 2009 en quantités. Excrété à 50% sous forme inchangée.
Antiarythmique			
Disopyramide	100aine de ng/L détecté en sortie de traitement biologique [14]	Pas pris en compte	Indiquée comme peu biodégradable [14]

Filtres UV

L'intérêt pour le suivi des filtres UV dans l'environnement est récent et fait suite, entre autres, à leur détection dans le biota à la fin des années 90. Considérés comme des polluants émergents, les filtres UV font partie de la classe des produits de soin personnel ou cosmétiques qui, sans répondre à une classification figée, comprennent également les musks, les antiseptiques et désinfectants et les conservateurs (parabènes).

26 filtres UV organiques sont autorisés par l'union européenne. 7 filtres UV, sélectionnés sur des critères de détection et de tonnage produit font l'objet d'une étude dans le cadre d'Etiage : oxybenzone, avobenzon, sulisobenzon, octoyle, ODPABA (acide octyl diméthyl para amino benzoïque), EHMC (ethylhexyl methoxy cinnamate) et 4-MBC (4 méthyl benzilidène camphre).

Pesticides

Les pesticides sont présents dans plusieurs compartiments de l'environnement, dont l'eau, ce qui est problématique étant donné qu'il s'agit d'une ressource essentielle pour les êtres vivants. Leur utilisation et leur mise sur le marché sont de plus en plus réglementées. De nombreuses molécules ont déjà été interdites et d'autres font polémique.

90 % des pesticides étant utilisés pour l'agriculture, celle-ci apparaît comme la source majeure de la contamination des milieux. La Gironde est un département à forte tradition et vocation viticole, ce qui présuppose des apports non négligeables vers les milieux aquatiques de l'estuaire de la Gironde. Or il s'agit d'une zone d'intérêt écologique pouvant être sensible à la contamination par les pesticides.

Cependant, les apports du milieu urbain ne sont pas à négliger. En effet, ils y sont utilisés pour diverses applications comme par exemple l'entretien des trottoirs, des jardins publics, les chemins de fers mais aussi pour les traitements antipuces des animaux de compagnie, les traitements contre les fourmis... Il existe donc un risque de lixiviation de ces pesticides lors des épisodes pluvieux. En fonction du type de réseau d'assainissement (unitaire ou séparatif), les eaux de pluie, potentiellement contaminées en pesticides, peuvent être acheminées jusqu'en station d'épuration. C'est pourquoi il est pertinent de s'intéresser aux effluents de station d'épuration : ceux d'entrée permettent de caractériser la contamination « urbaine » et ceux de sortie permettent de caractériser une source de contamination possible pour le milieu réceptacle des effluents.

Que ce soit pour une utilisation en milieu urbain ou agricole, les pesticides appliqués sont très variés (herbicides, insecticides, fongicides...) ce qui représente un large nombre de molécules. Ainsi, dans l'environnement, de nombreuses familles de pesticides sont présentes sous forme de mélanges. Pour analyser ces mélanges complexes, des techniques analytiques, dites multi-résidus, peuvent analyser plusieurs molécules en même temps ce qui permet d'effectuer de larges screenings environnementaux. Cependant, parfois certains pesticides ne peuvent pas être analysés par ces méthodes multi-résidus et font l'objet d'une analyse spécifique.

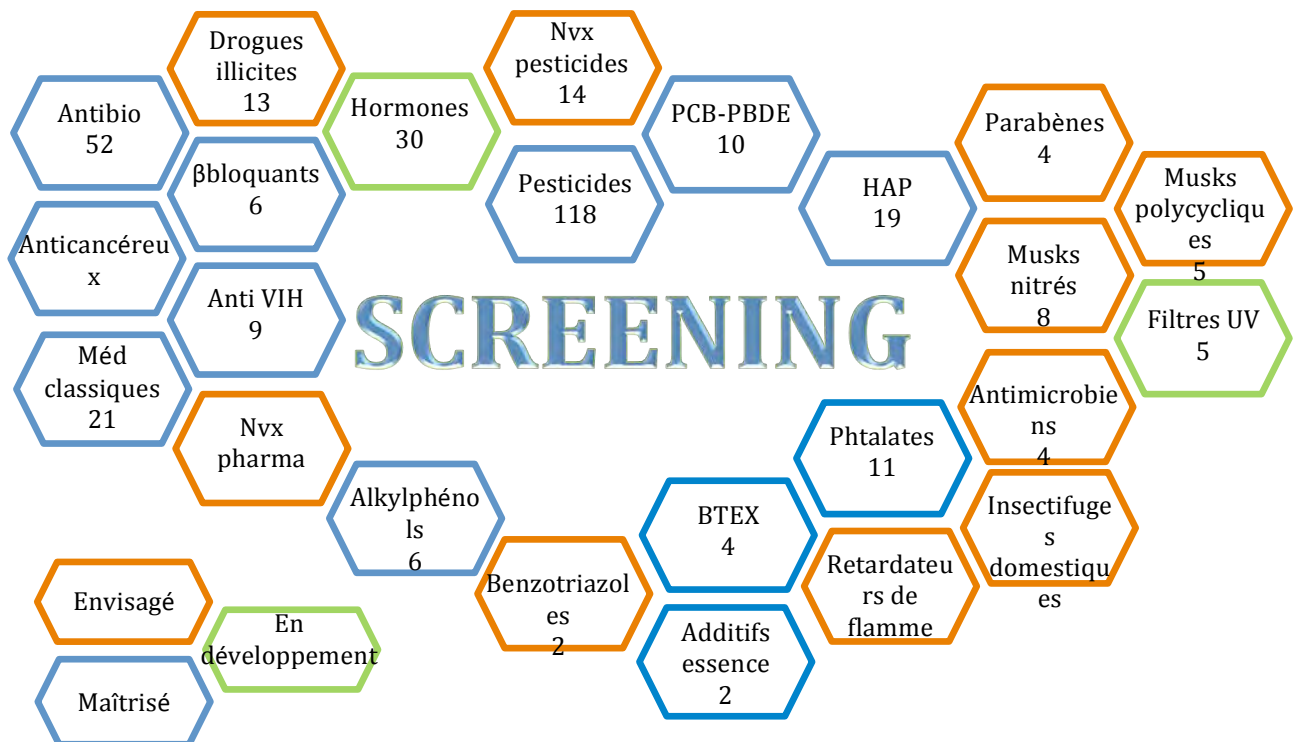
Dans cette étude, deux approches ont été utilisées : une approche multi-résidus et une approche ciblée. La méthode multi-résidus regroupe 57 pesticides issus de familles chimiques différentes (triazines, phénylurées, carbamates...). Il s'agit de molécules « mères » mais aussi de certains produits de dégradation. L'approche ciblée regroupe un pesticide, le fipronil, et certains de ses métabolites, le fipronil desulfinyl, sulfide et sulfone.

Autres classes de micropolluants organiques

En complément des résidus médicamenteux, des filtres UV et des pesticides des analyses vont être faites sur des échantillons de station d'épuration sur les classes suivantes, qui ont été développées au laboratoire lors de programmes précédents (nombre de composés analysés entre parenthèses).

- Pesticides (118)
- PCB et PBDE (10)
- HAP (19)
- Phtalates (11)
- BTEX (4)
- Alkylphénols (6)
- ETBE et MTBE (2)

Le nombre total de molécules suivies ou envisagées d'être suivies avoisine donc les 400 molécules, les classes de molécules sont regroupées le schéma suivant.



2ème partie : premiers résultats de screening

Résidus médicamenteux dans les effluents de station d'épuration

De premiers résultats ont été obtenus sur des échantillons prélevés en juin 2010 à Clos de Hilde, en juillet-août 2010 à Louis Fargue et en février 2011 à Clos de Hilde et Louis Fargue. Les protocoles analytiques sont détaillés en annexe.

En figure 1 sont présentées les concentrations moyennes mesurées sur 3 jours en entrée, sortie décantée et sortie traitée biologique à la station Louis Fargue en février 2011, représentées par ordre décroissant des concentrations en sortie traitée biologique. Le paracétamol et l'aspirine, largement hors échelle, atteignent des concentrations de l'ordre de 0,1 – 0,2 mg/L en entrée et sortie décantée. Pour l'ensemble des composés, on constate que le simple traitement physico-chimique (floculation-décantation) n'abaisse pas sensiblement les concentrations de pharmaceutiques contenues dans les effluents. En revanche, la différence entre concentration en entrée de STEP et concentration en sortie traitée biologique est composé-dépendante. Ces résultats sont à conforter par des calculs d'abattement, c'est-à-dire en tenant compte des débits en STEP mais on imagine d'ores et déjà l'utilisation de composés comme traceurs de type d'effluent.

Le mélange entre eau décantée et eau traitée biologique étant proche de 50:50, la qualité des eaux rejetées en Garonne est largement impactée par les eaux uniquement décantées.

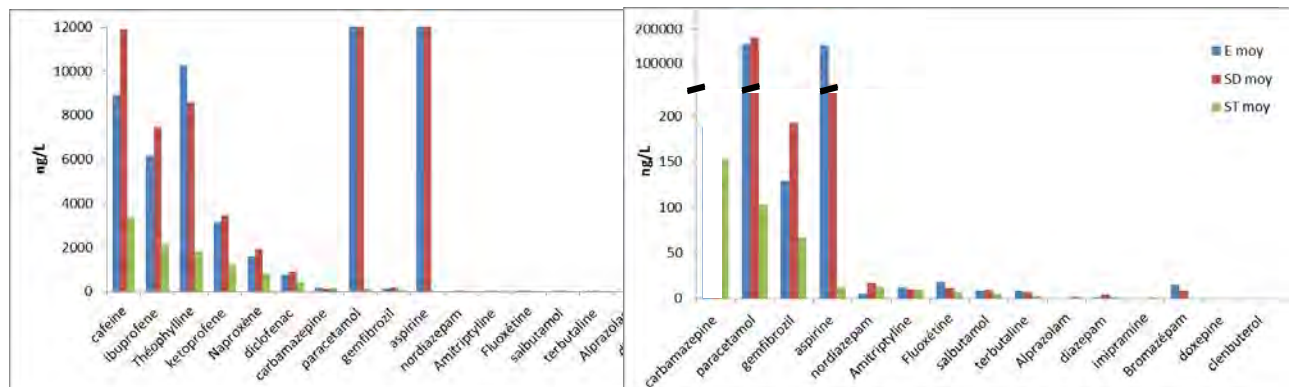


Figure 1 : concentrations (ng/L) moyennes en entrée (E), sortie décantée (SD) et sortie traitée biologique (ST) du 8 au 10 février 2011 à la station Louis Fargue. Les concentrations en carbamazépine en entrée et en sortie décantée ne sont pas présentées.

Les médicaments recherchés sont donc présents dans les effluents de la station Louis Fargue à des concentrations variant de 10 à 3000 ng/L en sortie traitée et de 10 à 200 000 ng/L en entrée et sortie

Les prélèvements ayant été faits à Louis Fargue et Clos de Hilde en parallèle pour ce mois de février 2011, il est possible de comparer la qualité des eaux en entrée (figure 2) et en sortie de station (figure 3).

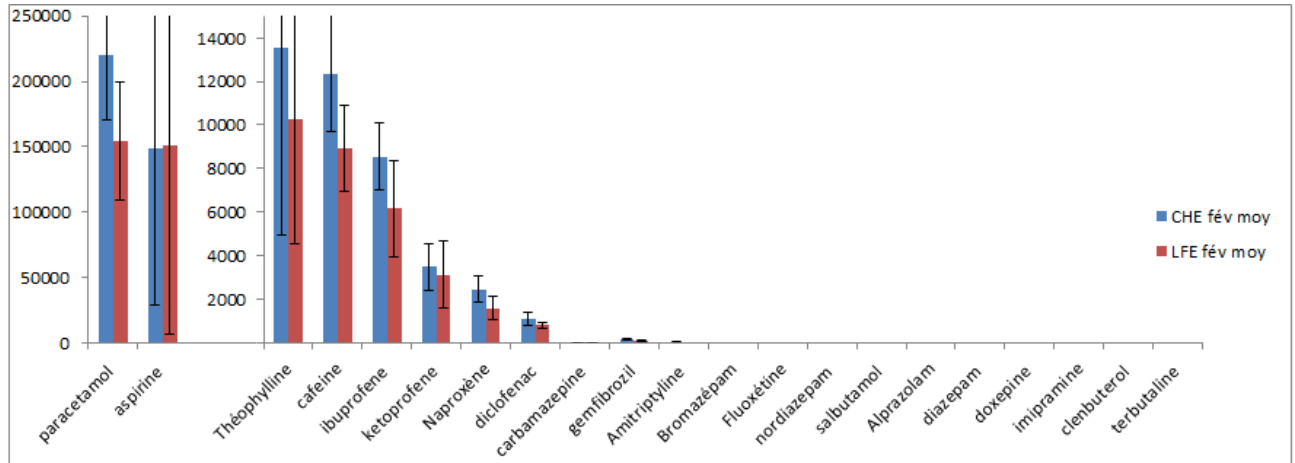


Figure 2 : concentrations (ng/L) comparées en entrée de Clos de Hilde (CHE) et en entrée de Louis Fargue (LFE). Les concentrations en carbamazépine en entrée ne sont pas présentées.

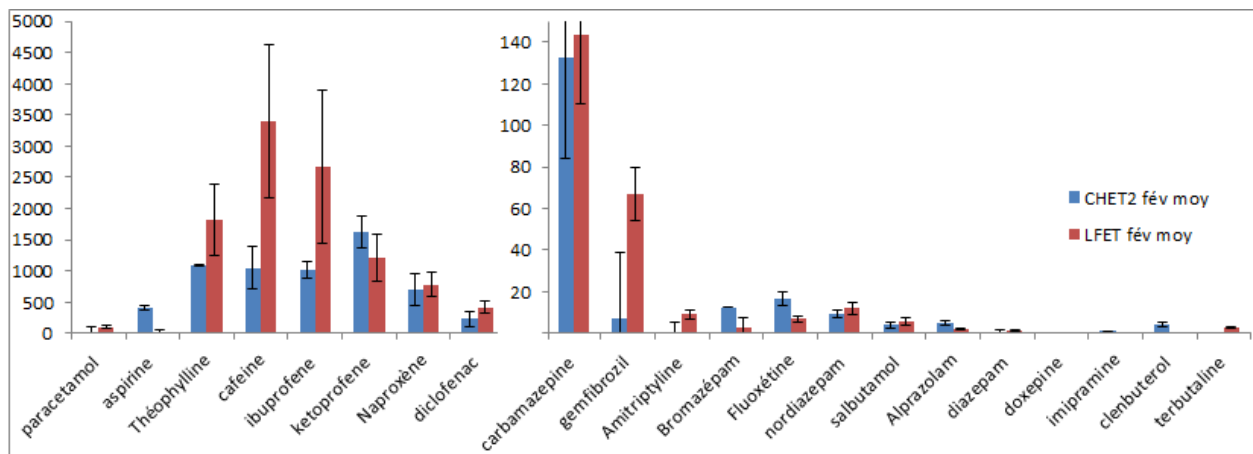


Figure 3 : concentrations (ng/L) comparées en sortie de Clos de Hilde (CHET2) et en sortie de Louis Fargue (LFET)

Compte tenu des barres d'erreur, il n'est pas possible, sur ces échantillons, de constater une contamination supérieure des effluents d'entrée d'une station par rapport à l'autre. En revanche, sur ce jeu d'échantillons, les concentrations en sortie de traitement par boues activées de Louis Fargue sont globalement supérieures aux concentrations en sortie de traitement par biofiltres de Clos de Hilde. La différence n'est pas significative pour la carbamazépine, molécule persistante difficilement dégradée par traitement secondaire. Ces résultats sont à confirmer sur d'autres échantillons et par le calcul des abattements sur les charges.

Les valeurs moyennes et les écart-types relatifs relevés pendant le suivi de 3 semaines à Clos de Hilde en juin 2010 sont indiquées dans le tableau 4.

Tableau 4 : concentrations moyennes et écart-types relatifs relevés pendant 3 semaines en entrée et sortie de Clos de Hilde. Les concentrations en carbamazépine en entrée ne sont pas présentées.

	C° moy (ng/L)		RSD	
	entrée	sortie	entrée	sortie
cafeine	4353	1068	15	43
carbamazépine	-	434	-	18
diazepam	7	3	97	78
nordiazepam	24	23	24	19
Amitriptyline	22	12	26	25
doxépine	nd	nd	nd	nd
imipramine	1	0	49	35
ibuprofène	4226	403	19	35
paracétamol	113133	228	21	44
ketoprofène	3329	1183	17	28
Naproxène	1522	1031	26	22
aspirine	182078	392	64	83
diclofenac	805	697	18	20
gemfibrozil	159	87	19	36
clenbuterol	nd	nd	nd	nd
salbutamol	9	8	20	23
terbutaline	19	5	41	38
Théophylline	24429	796	51	45
Alprazolam	4	2	26	28
Bromazépine	80	7	82	41
Fluoxétine	22	9	57	33

Pour la plupart des molécules les écart-types relatifs sont faibles, de l'ordre de 20 à 30% sans distinction entrée/sortie. Des valeurs plus élevées de RSD sont atteintes lorsque les concentrations sont faibles (cas du diazepam) ou pour des molécules de dosage délicat (cas de l'aspirine).

La figure 4 présente dans le détail la variation des concentrations dans le cas particulier de l'ibuprofène lors de ce suivi de 3 semaines.

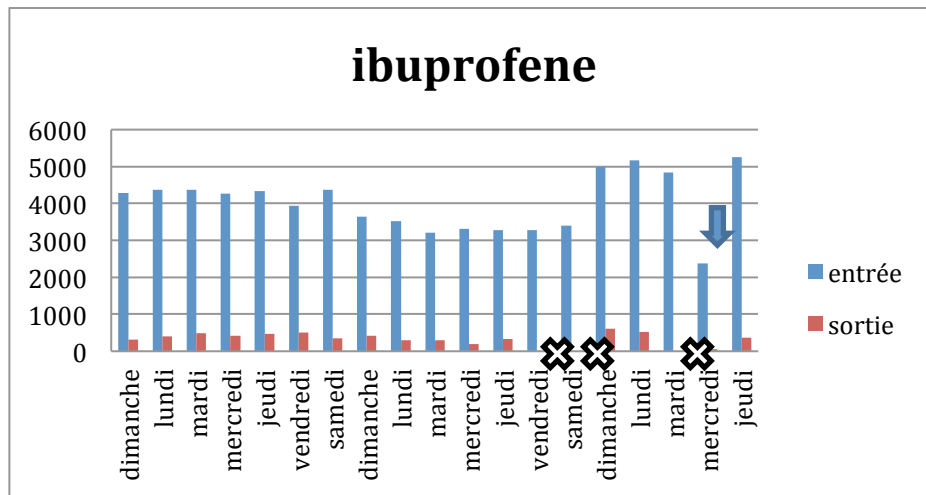


Figure 4 : évolution des concentrations (ng/L) en ibuprofène lors du suivi de 3 semaines. Une croix indique l'absence d'échantillon en sortie.

On observe une homogénéité de concentrations au cours du temps. Le jour marqué d'une flèche présente une concentration plus faible que les jours précédents et suivants : cela coïncide avec un relevé pluviométrique (données Lyonnaise des Eaux) traduisant un événement pluvieux remarquable (31mm de pluie relevés). L'ensemble des molécules suivies présente la même chute de concentration. Les effluents urbains subissent alors une dilution.

Cela confirme la nécessité de travailler de façon complémentaire en terme de charge et de concentration.

Fin mars 2011, l'avancement de l'action 1 visant à caractériser les rejets des STEP de Bordeaux est de 20%. Le screening des effluents va être poursuivi sur les autres classes de molécules et un suivi mensuel des rejets sera mis en place.

Résidus médicamenteux dans l'estuaire

Le volet suivi par échantillonnage passif de l'action 3 bénéficie de l'intégration du savoir-faire du laboratoire en matière de capteurs passifs.

Cette action a donc pu être anticipée par une campagne préliminaire effectuée à l'été 2009 sur des antibiotiques et d'autres médicaments d'usage courant. La figure 15 présente les composés échantillonnés dans la Garonne par des capteurs passifs.

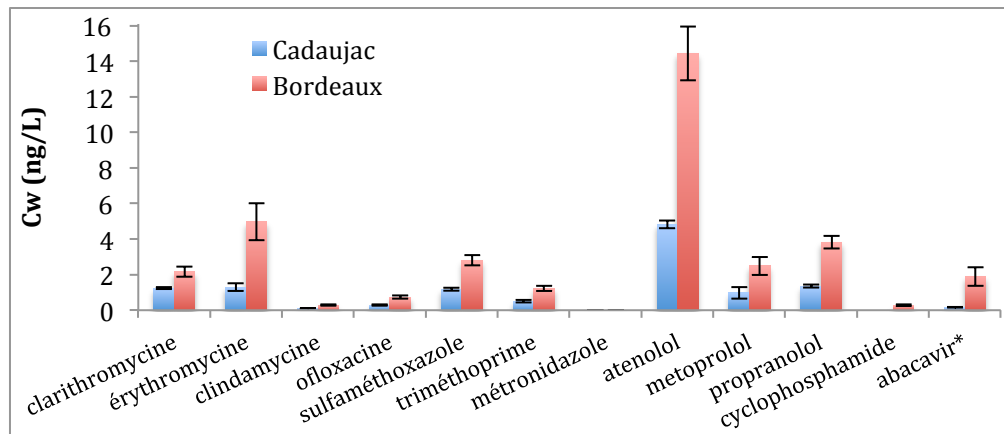


Figure 5 : concentrations relevées par POCIS dans la Garonne à l'été 2009

Sur les 22 composés recherchés, 11 ont été détectés à Cadaujac et 12 à Bordeaux. Les concentrations relevées à Bordeaux sont de deux à trois fois plus élevées qu'à Cadaujac.

Les prélèvements ponctuels réalisés au 1^{er} jour et au 15^{ème} et dernier jour d'exposition des POCIS n'ont pas permis de détecter les composés recherchés à Cadaujac. Leur détection dans les capteurs passifs traduit le caractère intégrateur du POCIS et l'intérêt de cet outil dans le suivi de la contamination de l'estuaire.

Fin mars 2011, l'avancement de l'action 3 est de 10%.

Perspectives

L'objectif à atteindre pour l'année 2 est la finalisation du screening prévu dans l'action 1. Les méthodes déjà au point pour certaines classes de composés doivent être appliquées à une sélection d'échantillons des stations d'épuration Clos De Hilde et Louis Fargue. Cette sélection d'échantillon devra permettre de renseigner les variabilités de la composition des effluents (variabilité saisonnière, variabilité intra-journalière). Il s'agira également de mettre au point des méthodes d'analyse pour les classes de composés non encore étudiées.

Le suivi dans le milieu par échantillonnage passif doit être généralisé sur une sélection de points géographiques de l'estuaire. Le calcul des flux associés permettra une avancée significative dans l'action 3.

L'action 2 est un gros chantier qui requiert d'avoir choisi des molécules-traceurs à la fois rejetées par les stations d'épuration (action 1) et détectées dans le milieu (action 3). Elle pourra être envisagée en fin d'année 2.

Les actions 4 et 5 nécessitent plus de recul sur les actions précédentes et ne pourront être envisagées que plus tard.

Références bibliographiques pour le choix des molécules à l'étude

- [1] Pharmaceuticals residues in waters in the netherlands. Rapport RIWA, 2003
- [2] Les substances émergentes dans l'environnement. Rapport Onema Ineris, 2009.
- [3] Les substances pharmaceutiques dans les eaux superficielles et souterraines du bassin Loire-Bretagne. Rapport BRGM, 2008
- [4] Silva, B.F. da, Jelic, A., López-Serna, R., Mozeto, A.A., Petrovic, M., Barceló, D., 2011. Occurrence and distribution of pharmaceuticals in surface water, suspended solids and sediments of the Ebro river basin, Spain. *Chemosphere* 85, 1331–1339.
- [5] Lee, H.-B., Peart, T.E, Lewina Svoboda, M., Backus, S. Occurrence and fate of rosuvastatin, rosuvastatin lactone, and atorvastatin in Canadian sewage and surface water samples. *Chemosphere* 77,10-1285, 2009
- [6] Maria Huerta-Fontela, Maria Teresa Galceran, Francesc Ventura. Fast liquid chromatography–quadrupole-linear ion trap mass spectrometry for the analysis of pharmaceuticals and hormones in water resources. *Journal of Chromatography A*, 1217 4212-4222, 2010.
- [7] Benotti, Mark J., Rebecca A. Trenholm, Brett J. Vanderford, Janie C. Holady, Benjamin D. Stanford, et Shane A. Snyder. Pharmaceuticals and Endocrine Disrupting Compounds in U.S. Drinking Water. *Environ. Sci. Technol.* 43, no. 3 (2008): 597-603.
- [8] Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R.M., Guwy, A.J. The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK., 2008. *Water Research* 42, 3498-3518.
- [9] Ferrer, I. & Thurman, E. M. Identification of a New Antidepressant and its Glucuronide Metabolite in Water Samples Using Liquid Chromatography/Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 82, 8161-8168 (2010).
- [10] Capdeville M.-J. Etude des cycles biogéochimiques des contaminants dits émergents dans les systèmes aquatiques. Thèse de doctorat 2011.
- [11] Rosal, R., Rodríguez, A., Perdígón-Melón, J.A., Petre, A., García-Calvo, E., Gómez, M.J., Agüera, A., Fernández-Alba, A.R. Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. *Water Research* 44, 578-588 (2010).
- [12] Vulliet, E., Cren-Olivé, C., 2011. Screening of pharmaceuticals and hormones at the regional scale, in surface and groundwaters intended to human consumption. *Environmental Pollution* 159, 2929-2934.
- [13] Ashton, D., Hilton, M., Thomas, K.V., 2004. Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom. *Science of The Total Environment* 333, 167-184.

[14] Kim, I., Yamashita, N., Tanaka, H., 2009. Performance of UV and UV/H₂O₂ processes for the removal of pharmaceuticals detected in secondary effluent of a sewage treatment plant in Japan. Journal of Hazardous Materials 166, 1134-1140.

[15] Besse J.P.; Garric J. (2007) Médicaments à usage humain: risque d'exposition et effets sur les milieux récepteurs. Proposition d'une liste de médicaments à usage humain à surveiller dans les eaux de surface continentales. Agence de l'Eau R.M.C., Lyon, 241 p.

Protocoles d'analyse

Médicaments Classiques

Extraction par SPE :

- Acidification pH 2
- Extraction sur cartouche MCX 3cc
- Elution 3 mL acétate d'éthyle
 3 mL acétate d'éthyle/acétone (v/v)
 3 mL méthanol/dichlorométhane +hydroxyde d'ammonium (5% v)
- Reconcentration sous N₂
- Reprise dans 300µL d'acétonitrile

Analyse sur LC-ESI+-MS-MS :

- Phase mobile : eau milli-Q acidifiée par 0,1% d'acide formique et acétonitrile acidifié par 0,1% d'acide formique
- Colonne : Zorbax Eclipse Plus C18
- Ionisation par électrospray en mode positif
- Spectromètre de masse en mode dynamic MRM (multiple reaction monitoring)

Analyse sur LC-ESI- -MS-MS :

- Phase mobile : eau milli-Q et acétonitrile
- Colonne : Zorbax SB C18
- Ionisation par électrospray en mode négatif
- Spectromètre de masse en mode MRM (multiple reaction monitoring)

Pesticides

Extraction par SPE :

- Acidification pH 2
- Extraction sur cartouche HLB 3cc
- Elution 3 mL méthanol
- Reconcentration sous N₂
- Reprise dans 300µL de méthanol

Analyse sur LC-ESI+-MS-MS :

- Phase mobile : eau milli-Q acidifiée par 0,1% d'acide acétique et tamponnée à 5mM d'acétate d'ammonium et méthanol
- Colonne : Kinetex C18
- Ionisation par électrospray en mode positif
- Spectromètre de masse en mode dynamic MRM (multiple reaction monitoring)

Annexe 4

Les médicaments dans les eaux de la Garonne : suivi d'un épisode de rejet d'eaux brutes

LES MEDICAMENTS DANS LES EAUX DE LA GARONNE : SUIVI D'UN EPISODE DE REJET D'EAUX BRUTES

Volet 1 : suivi des rejets par échantillonnage ponctuel

Variabilités testées :

- Profondeur : surface (S) et profondeur (P)
 - Position le long d'un transect : rive gauche (RG), milieu (M), rive droite (RD)
 - Cycle de marée : mi-flot (MF), pleine mer (PM), mi-jusant (MJ), basse mer (BM)
 - 3 jours étudiés : avant rejet (01/04/11), pendant rejet (07/04/11), après rejet (11/04/11)
- ➔ 2x3x4x3=72 échantillons

21 composés à l'étude

Protocole :

- prélèvement en bateau à l'aide d'une bouteille Go-Flo. Transfert en bouteille verre.
- filtration sur le terrain sur UF Nalgene
- conservation en bouteille Nalgene au congélateur
- extraction d'un volume de 500mL (proto médocs classiques)
- analyse sur RRLC-MS² 6410 ou 6460.

Résultats :

Composés détectés

12 composés détectés au dessus des LD sur les 21 recherchés. (non détectés : diazepam, amitriptyline, doxépine, imipramine, aspirine, clenbuterol, alprazolam, bromazepam, fluoxétine)

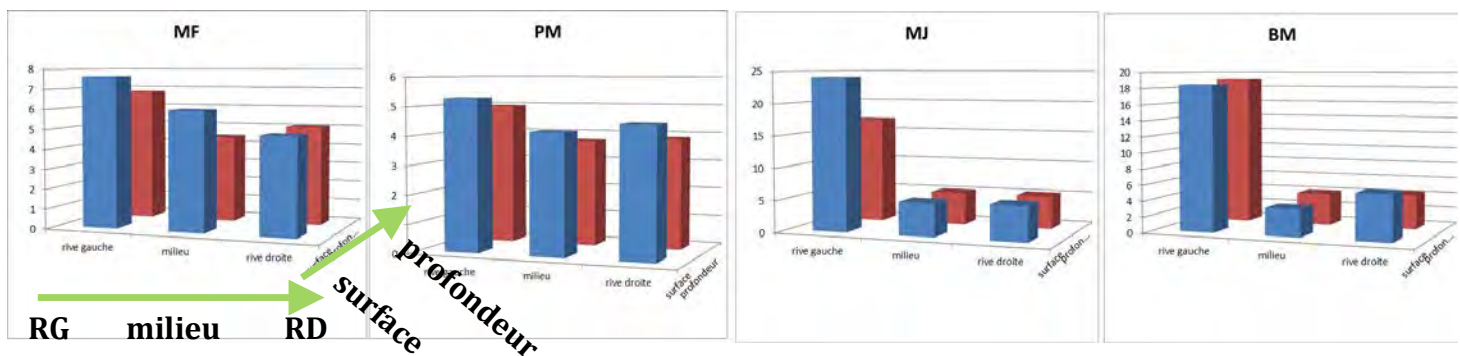
En comparaison, en sortie de step, seuls le clenbutérol et la doxépine sont ND.

Valeurs moyennes (ng/L) et écart-type relatif (%) obtenus sur l'ensemble des 72 points de la campagne :

composé	C° moy (ng/L)	RSD (%)
cafeine	119	61
carbamazepine	7	31
nordiazepam	0,3	39
ibuprofene	12	114
paracetamol	209	161
<i>ketoprofene *</i>	78	153
Naproxène	7	68
diclofenac	7	41
gemfibrozil	1	50
salbutamol	0,2	114
terbutaline	0,1	140
Théophylline	22	86

* le ketoprofene présentant une variabilité supérieure aux autres composés, de plus amples vérifications doivent être menées avant de certifier ses concentrations.

Variabilité surface/profondeur



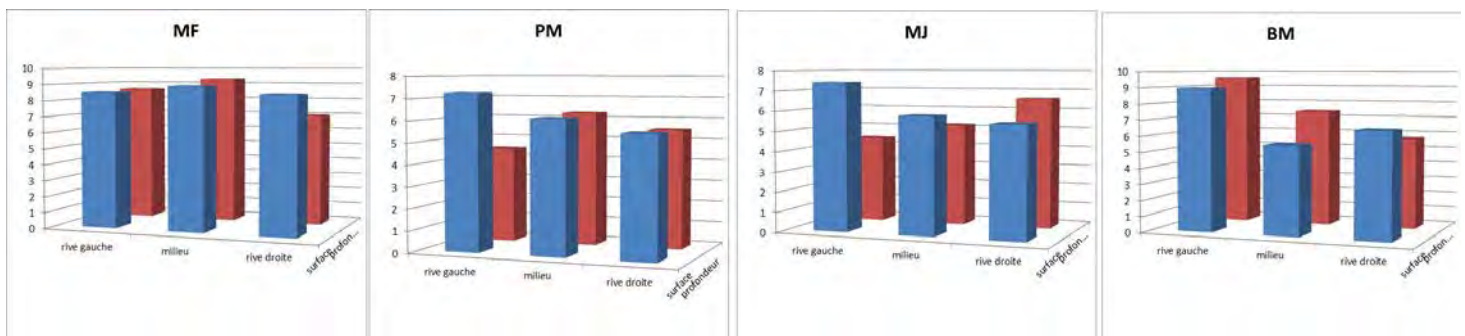
Naproxene 11/04/11

Carbamazépine 01/04/11

Les concentrations en profondeur suivent l'évolution des concentrations en surface.

Les concentrations en surface et en profondeur sont du même ordre de grandeur bien que la concentration en surface soit régulièrement supérieure à celle en profondeur, en particulier en RGS.

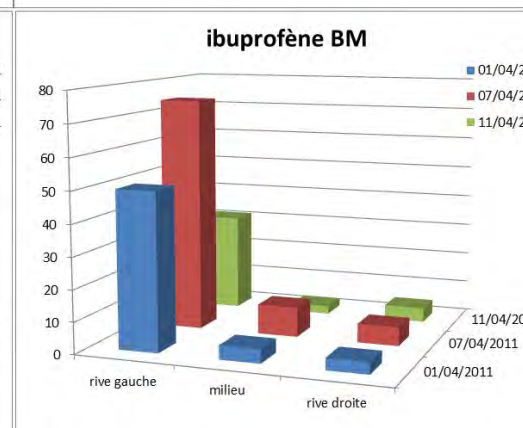
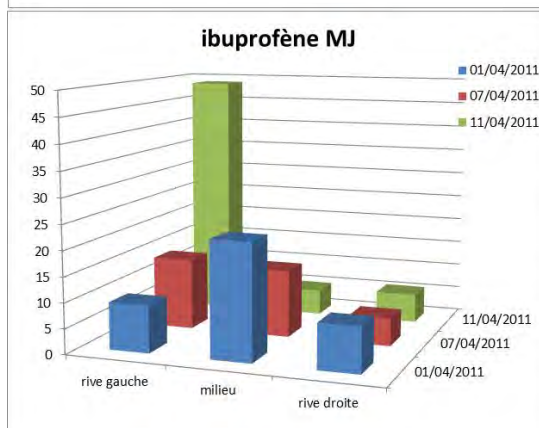
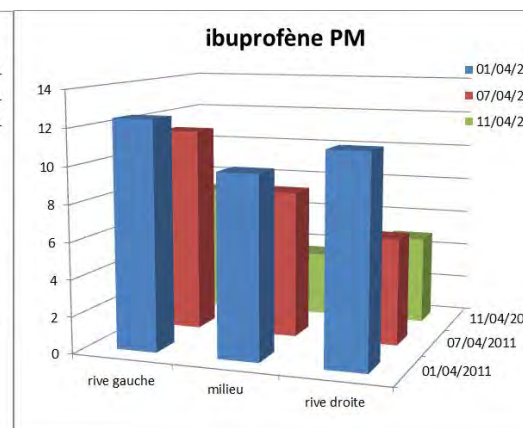
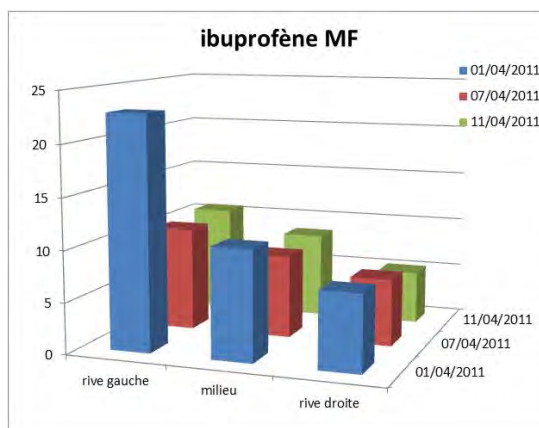
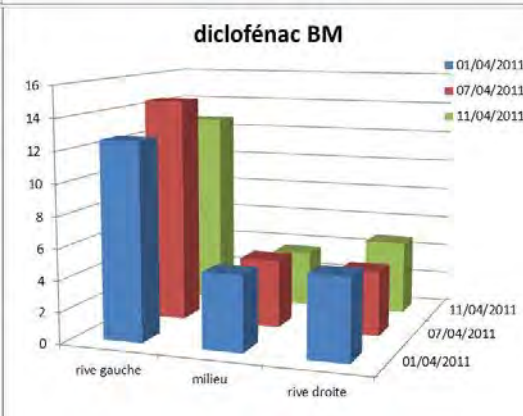
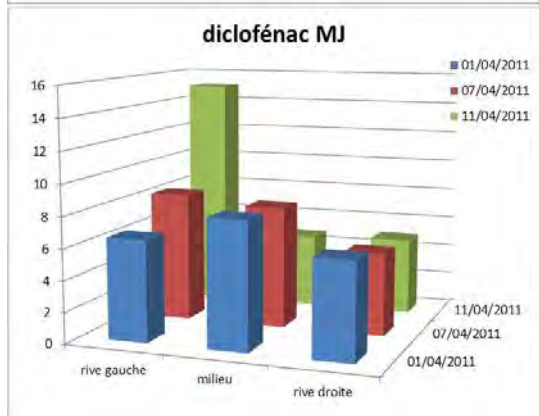
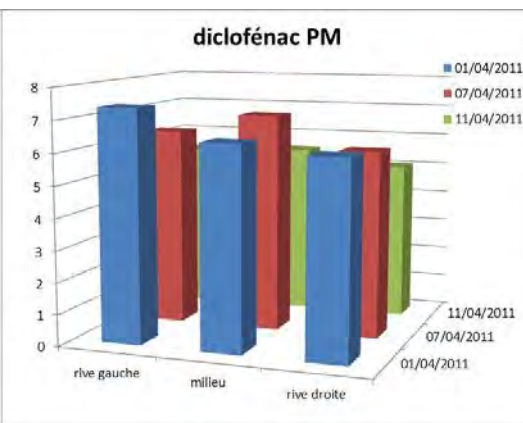
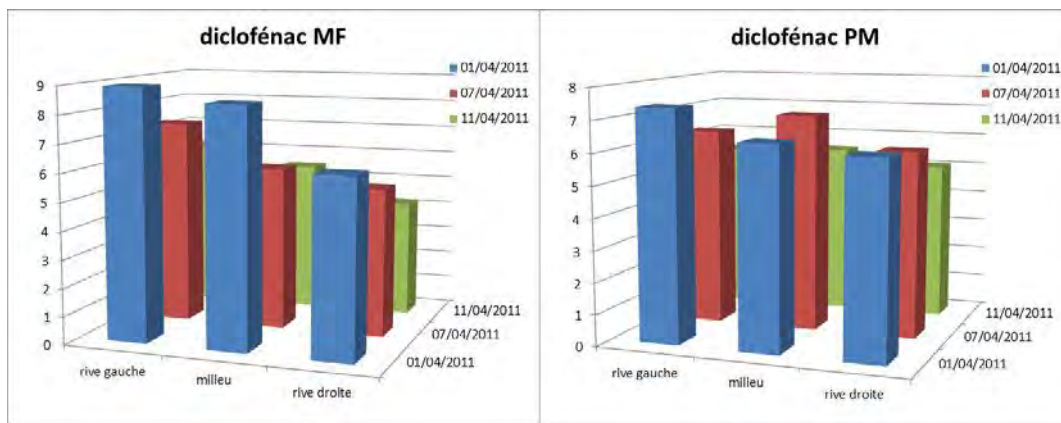
L'étude comparée en surface et profondeur des 3 cycles de marée ne permet pas de dégager un rapport entre la marée et les différences de concentration surface-profondeur.



Tous composés et tous points confondus, pour 75% des points, les concentrations en profondeur s'éloignent à moins de 33% des concentrations en surface.

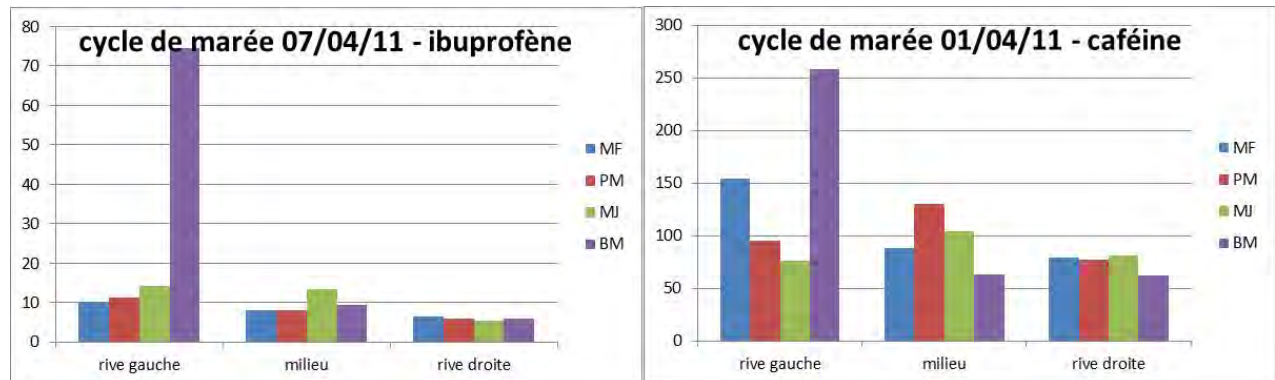
On conclut donc à une homogénéité des concentrations en surface et en profondeur.

Variabilité le long d'un transect



Les concentrations ont tendance à décroître de la rive gauche vers la rive droite mais de façon modérée en mi-flot, pleine mer et mi-jusant. L'inhomogénéité le long du transect est particulièrement remarquable à basse mer (BM), la rive gauche étant fortement impactée par les rejets des effluents proches. Cette différence de concentration entre la rive gauche et le reste du transect est composée-dépendante : d'un facteur 10 pour le paracétamol ou l'ibuprofène à un facteur 2 ou 3 pour la carbamazépine ou le diclofénac.

Etude d'un cycle de marée



Les valeurs exceptionnelles de concentration sont atteintes pour tous les composés à basse mer rive gauche.

Les autres niveaux de marée sont homogènes, tant le long d'un transect que dans le temps.

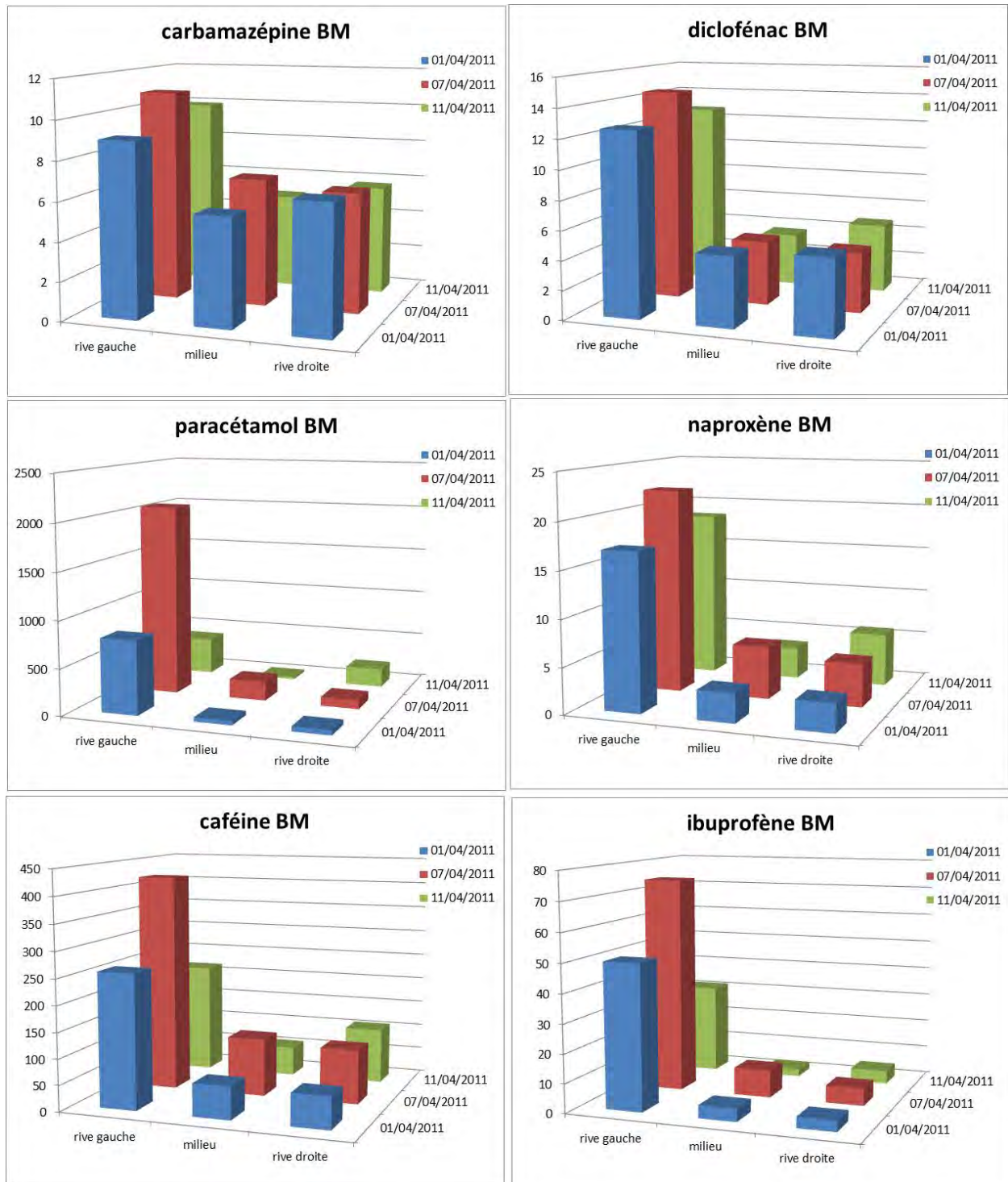
Impact du rejet d'eaux brutes

L'impact du rejet est notable uniquement à basse mer.

cafeine	+77%
carbamazepine	+16%
ibuprofene	+83%
paracetamol	+248%
Naproxène	+26%
diclofenac	+15%
Théophylline	+98%

Augmentation des concentrations rive gauche à basse mer lors de l'épisode de rejet par rapport à un fonctionnement normal (7/04/11 par rapport à la moyenne du 01/04/11 et du 11/04/11) en pourcentage.

La carbamazépine et le diclofénac (composés persistants) présentent une augmentation mineure lors du rejet. Puisqu'ils sont faiblement dégradables en step, le rejet d'eau brute plutôt que d'eau traitée augmente peu la charge en composés apportée à la Garonne. *A contrario*, paracétamol, caféine ou ibuprofène, relativement bien abattus en STEP, augmentent sensiblement lors du rejet.



Conclusion du volet suivi par échantillonnage ponctuel

- les concentrations des composés recherchés sont homogènes le long de la colonne d'eau
- l'inhomogénéité le long du transect est notable essentiellement à basse mer, où les concentrations en rive gauche peuvent être de 10 fois supérieures au reste du transect
- l'étude du cycle de marée ne met pas en évidence une variation progressive des concentrations mais souligne l'inhomogénéité du point basse mer

- l'impact des travaux est notable en rive gauche à basse mer avec une augmentation des concentrations composé-dépendante, de 15 à 250%

Perspectives

L'abattement quasi-nul de la carbamazépine et quasi-total du paracétamol dans la step révèle deux comportements distincts et deux traceurs d'intérêt différent. Le rapport des concentrations paracétamol sur carbamazépine pourrait donner un indice qualifiant l'impact d'un milieu par des eaux usées non traitées.

Cette campagne souligne l'intérêt du suivi de la carbamazépine, composé persistant. Le développement de l'analyse des métabolites de la carbamazépine est en cours.

Volet 2 : suivi des rejets par capteurs passifs

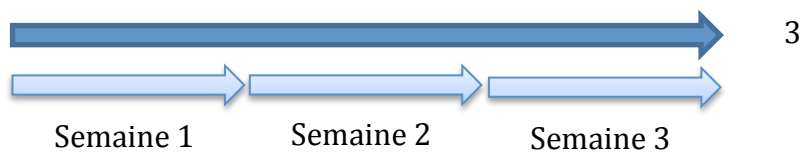
Lieux étudiés et période d'exposition :

2 points géographiques ont été instrumentés :

- un ponton du Port Autonome de Bordeaux (PAB) situé rive gauche à Bacalan, près du Bassin à flot et à proximité directe des points de rejets (tant sortie de STEP (1km) que déversoirs d'orage utilisés lors de l'épisode de rejet)
- le ponton Benauge situé rive droite près du pont de pierre et situé entre les points de sortie des STEP Louis Fargue (2,8km) et Clos de Hilde (4,9km)

Le point PAB est dans l'axe du point de rejet, sous le courant à marée descendante. Le point Benauge est à la fois plus éloigné et après le méandre du port de la lune, suggérant un meilleur brassage des eaux.

4 jeux de POCIS sont posés à chaque point : 3 jeux consécutifs couvrant 1 semaine et un jeu couvrant les 3 semaines instrumentées.



Un jeu comprend 6 POCIS phase HLB enrobée de PRC, pour 5 dotés de membrane en PES et 1 doté de membrane Nylon 30 μ m.

Protocole :

- exposition des POCIS
- relève, rinçage et conservation au congélateur
- extraction (proto combiné pesticides, médocs et AKP) en 2 manip : les capteurs exposés puis les T₀
- analyse sur RRLC-MS² 6410.

Résultats :

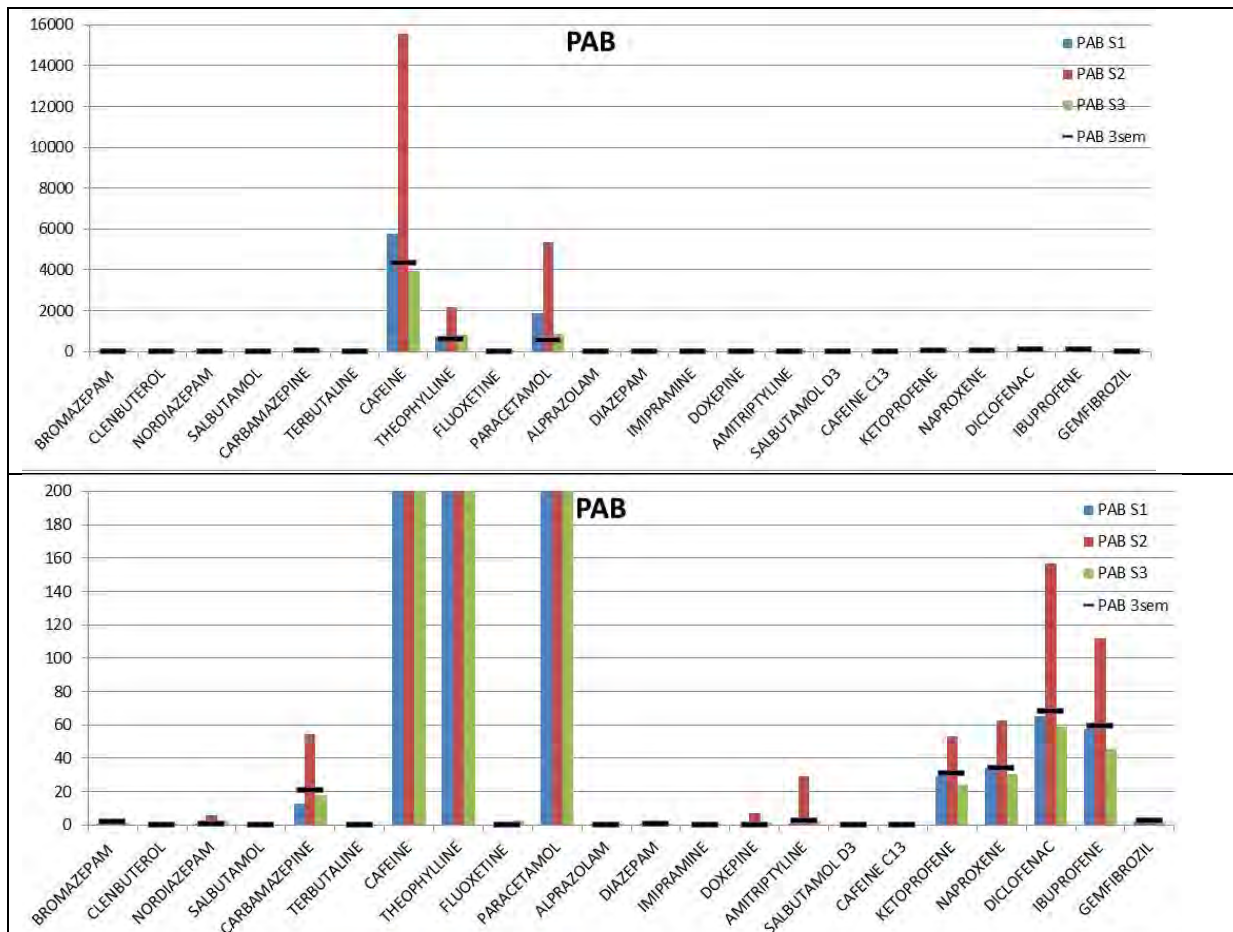
Composés détectés

Seul le clenbuterol n'est pas détecté.

Concentrations dans l'eau

Les résultats présentés sont la moyenne des concentrations dans l'eau corrigées par la désorption du salbutamol d3 et de la caféine 13C3.

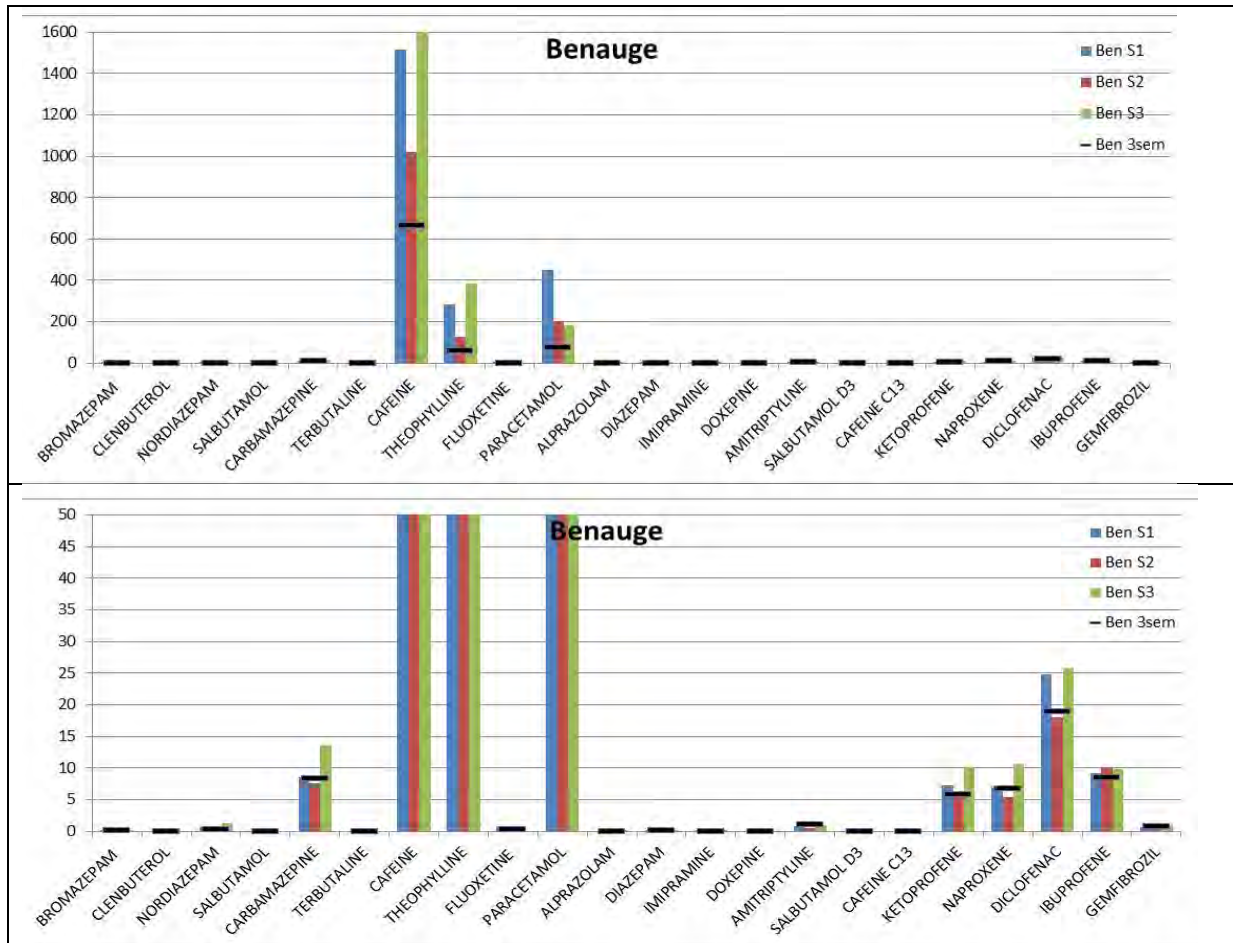
Il est à noter que les composés caféine, théophylline et paracétamol, en raison d'une adsorption rapide dans la phase du capteur, ne sont pas quantitatifs.



Concentrations dans l'eau au port autonome de Bordeaux (Bacalan) en haut et zoom de cette figure en bas (ng/L)

L'étude des concentrations au PAB révèle une contamination supérieure la semaine du rejet, ce qui concorde avec les constats faits sur le prélèvement ponctuel.

La singularité observée en S2 est confirmée par les concentrations intégrées par le POCIS 3 semaines : elles sont supérieures à celles des POCIS S1 et S3.



Concentrations dans l'eau au ponton Benauges en haut et zoom de cette figure en bas (ng/L)

A Benauges, les concentrations intégrées par les 4 POCIS sont homogènes, la légère diminution observée en S2 traduit vraisemblablement plus une variabilité analytique.

Comparaison PAB/Benauges

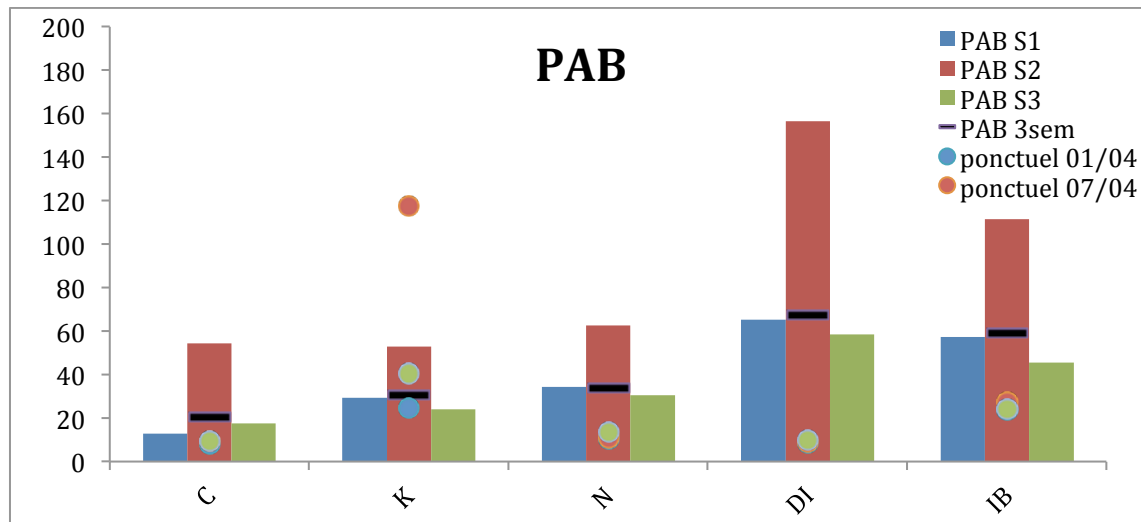
Le tableau suivant présente les concentrations moyennes observées sur les 4 POCIS de chaque point géographique et le facteur observé entre ces 2 points.

La différence de concentration est composé-dépendante : d'un facteur 3 pour la carbamazépine à un facteur 8 pour l'ibuprofène.

Le point PAB, situé à proximité du rejet, présente donc des concentrations élevées, qui ne reflètent pas absolument la contamination de la Garonne au niveau de Bordeaux.

Comparaison passif-ponctuel

On compare la moyenne des concentrations au PAB rive gauche aux 4 niveaux de marée à la concentration intégrée par le capteur passif. Les concentrations sont en ng/L.



Les ordres de grandeur sont respectés mais le POCIS surévalue les concentrations.

On peut calculer le ratio de la moyenne des concentrations données par les pocis aux moyennes des prélèvements ponctuels en RGS :

	surévaluation moyenne POCIS/ponctuel
CARBAMAZEPINE	3,2
KETOPROFENE*	0,6
NAPROXENE	3,6
DICLOFENAC	10,1
IBUPROFENE	2,8

* On note que la quantification du ketoprofene dans les échantillons ponctuels renvoie quelques anomalies, à contrôler plus en profondeur.

La surévaluation est composée-dépendante, d'un facteur 3 à un facteur 10 pour le diclofenac.

Conclusion et perspectives du volet suivi par POCIS

- mise en évidence de la contamination supérieure au site PAB en comparaison au site Benauges
- mise en évidence d'une contamination supérieure la semaine du rejet au site PAB
- mise en évidence d'une différence notable entre l'échantillonnage ponctuel et l'échantillonnage passif

Le POCIS est un outil performant et prometteur pour le suivi environnemental. L'approche quantitative doit être améliorée pour s'affranchir de tout biais entre ponctuel et passif.

Annexe 5

IMPACT DU REJET D'EFFLUENTS BRUTS
SUR LE MILIEU NATUREL :
ARRET DE LA STATION D'EPURATION DE
LOUIS FARGUE, Avril 2011



IMPACT DU REJET D'EFFLUENTS BRUTS SUR LE MILIEU NATUREL :

ARRET DE LA STATION D'EPURATION DE LOUIS FARGUE

Avril 2011

		Date :	Date :	Date :
Rédaction :	Aurélie Lanoux	05/09/2011	12/09/2011	
Correction :	Henri Etcheber	12/09/2011	12/09/2011	
	Sandrine Pelloux			
	Alexandre Ventura			

SOMMAIRE

1. Arrêt de la station de Louis Fargue	2
a. Stratégie d'échantillonnage	2
b. Conditions hydrologiques.....	3
2. Résultats	4
a. Matières en suspension	4
b. Carbone Organique Particulaire (COP).....	6
c. Carbone Organique Dissous (COD).....	6
d. Ammonium (NH_4^+).....	9
e. Nitrites (NO_2^-) et nitrates (NO_3^-)	9
f. Phosphates (PO_4^{3-}).....	13
3. Discussion	14
a. Matériel particulaire.....	14
b. Matériel dissous	15
1. Marqueurs potentiels préférentiels.....	15
2. Autres paramètres.....	16
<i>Figure 1 : Points de rejets lors des travaux de raccordement de la STEP de LF.....</i>	<i>2</i>
<i>Figure 2 : Vue aérienne du site d'étude avec le transect réalisé (trait jaune) et les 5 points de rejets (étoiles).....</i>	<i>3</i>
<i>Figure 3 : Evolution des teneurs en MES (mg/l) aux différents moments de la marée, en surface et au fond, et pourcentage en COP associé (valeur indiquée au-dessus des barres).</i>	<i>5</i>
<i>Figure 4 : Evolution des teneurs en COD (mg/l) aux différents moments de la marée, en surface et au fond.....</i>	<i>7</i>
<i>Figure 5 : Evolution des teneurs en NH_4^+ ($\mu\text{mol/l}$) aux différents moments de la marée, en surface et au fond.....</i>	<i>8</i>
<i>Figure 6 : Evolution des teneurs en NO_2^- ($\mu\text{mol/l}$) aux différents moments de la marée, en surface et au fond.....</i>	<i>10</i>
<i>Figure 7 : Evolution des teneurs en NO_3^- ($\mu\text{mol/l}$) aux différents moments de la marée, en surface et au fond.....</i>	<i>11</i>
<i>Figure 8 : Evolution des teneurs en PO_4^{3-} ($\mu\text{mol/l}$) aux différents moments de la marée, en surface et au fond.....</i>	<i>12</i>
<i>Tableau 1 : Caractéristiques hydrologiques des journées de prélèvements.....</i>	<i>3</i>
<i>Tableau 2 : Pourcentages en COP mesurés sur l'ensemble des échantillons.</i>	<i>6</i>

1. Arrêt de la station de Louis Fargue

En vue d'une remise aux normes de la filière de traitement de l'eau, la station d'épuration (STEP) de Louis Fargue a été contrainte d'arrêter le traitement des eaux usées durant les travaux de raccordement de l'ancienne station à la nouvelle. Ces travaux ont été réalisés du 04 au 07 avril 2011. Durant cette période, il est estimé à près de 332 000 m³ d'eaux brutes déversées dans la Garonne via les 5 points de rejets, situés rive gauche, présentés ci-dessous.

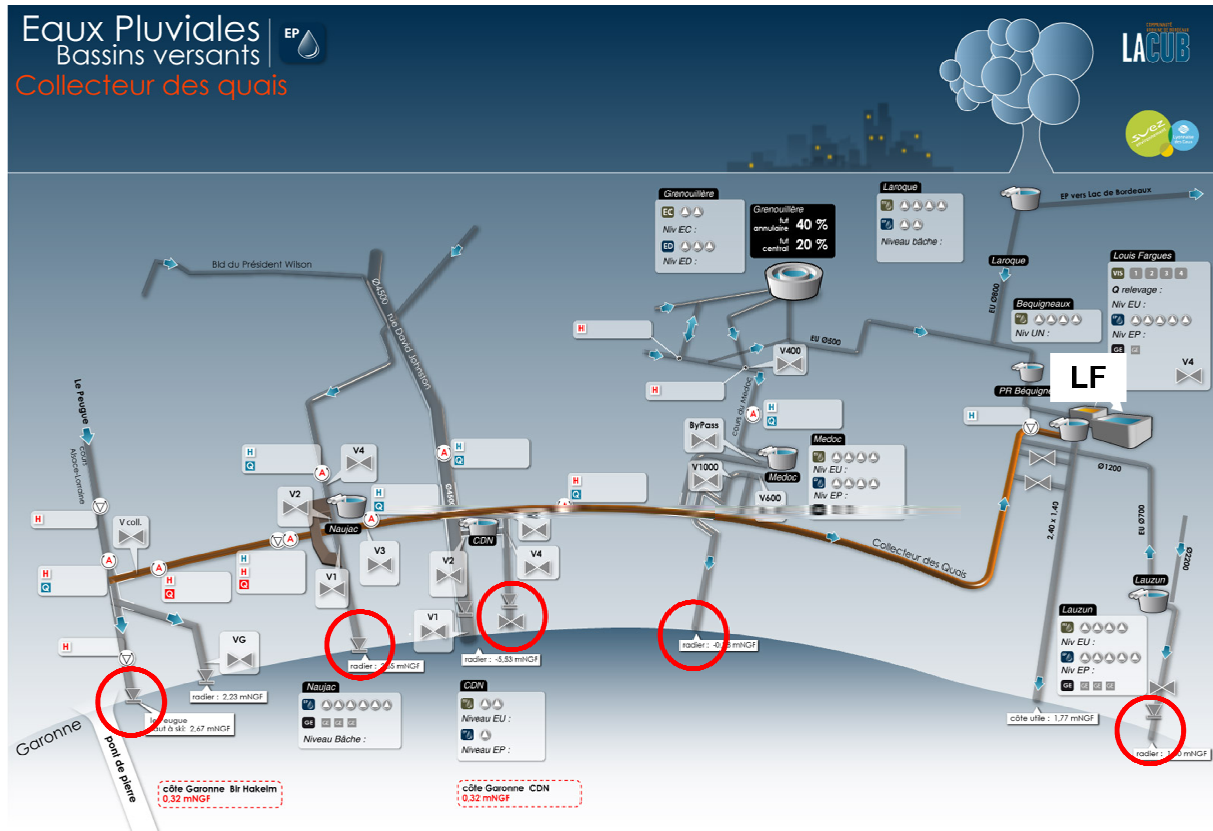


Figure 1 : Points de rejets lors des travaux de raccordement de la STEP de LF

a. Stratégie d'échantillonnage

Afin de voir si de tels rejets ont eu un impact ou non sur le milieu naturel, des prélèvements d'eaux ont été effectués sur un transect de la Garonne, situé au niveau du port autonome de Bordeaux. Trois missions ont été réalisées :

- Une mission le **01 avril 2011**, avant l'arrêt de la STEP : condition normale de rejets
- Une mission le **07 avril 2011**, durant l'arrêt de la STEP : impact des rejets
- Une mission le **11 avril 2011**, après l'arrêt de la STEP : condition normale de rejets

Durant ces trois missions, les prélèvements ont été faits à l'aide d'une bouteille Niskin :

- à 1m de la surface (S) et à 1m du fond (F),
- en rive gauche (RG), rive droite (RD) et au milieu (M) de la Garonne,
- en basse mer (BM), pleine mer (PM), mi-flot (MF, marée montante) et mi-jusant (MJ, marée descendante).

b. Conditions hydrologiques

Les débits correspondants aux trois missions ont été fournis par le Port Autonome de Bordeaux. Les caractéristiques hydrologiques sont présentées dans le tableau ci-dessous :

	01 avril	07 avril	11 avril
Débit moyen journalier	490 m ³ /s	525 m ³ /s	441 m ³ /s
Coefficient de marée	72 – 76	79 – 75	43 – 40

Tableau 1 : Caractéristiques hydrologiques des journées de prélèvements.

Aucune précipitation n'a été enregistrée durant ces différentes missions. Le débit moyen du mois d'avril est de 385 m³/s. Les rejets ont donc été faits dans de bonnes conditions hydrologiques.



Figure 2 : Vue aérienne du site d'étude avec le transect réalisé (trait jaune) et les 5 points de rejets (étoiles).

2. Résultats

Durant ces campagnes d'échantillonnage, les différents paramètres étudiés sont les suivants :

- paramètres physico-chimiques : **température, salinité, conductivité,**
- les matières en suspension (**MES**), le carbone organique particulaire (**COP**) et dissous (**COD**),
- les sels nutritifs : ammonium (**NH₄⁺**), nitrites (**NO₂⁻**), nitrates (**NO₃⁻**), phosphates (**PO₄³⁻**).

Parmi ces paramètres, l'ammonium et la charge organique dissoute (COD) sont ceux qui caractérisent le plus les rejets anthropiques. De plus, il faut préciser que la dégradation de l'ammonium par les bactéries aérobies nécessite plus d'oxygène que pour la dégradation du COD.

Afin de voir un éventuel impact de tels rejets dans le milieu naturel, on présentera les différents paramètres étudiés sous forme d'histogrammes. Il y aura ainsi un graphe pour chaque moment de la marée, en distinguant les prélèvements de surface et de fond. Chaque paramètre sera discuté séparément.

L'interprétation des résultats reste délicate étant donné que les prélèvements sont réalisés de façon ponctuelle sur l'ensemble de la masse d'eau transitant et qu'il n'y a pas de réplicats.

a. Matières en suspension

Les concentrations en MES ont été déterminées après la filtration d'un volume connu d'eau de la Garonne sur des filtres GF/F en fibre de verre de porosité nominale de 0.70 µm, préalablement brûlés à 500°C. Le poids en MES a été déduit en faisant la différence du poids du filtre avant et après la filtration, qui, ramené au volume filtré, nous donne la concentration en MES (mg/l) dans l'échantillon prélevé.

La valeur indiquée au dessus de chaque barre correspond au pourcentage en COP mesuré dans chaque échantillon.

Les plus faibles teneurs en MES sont enregistrées aux alentours des étales de BM et de PM (globalement inférieures à 500 mg/l). En effet, l'étales, qui se situe entre deux moments de marée à courantologie forte, est caractérisée par des courants faibles sinon nuls. Ainsi, les particules présentes dans l'eau vont-elles sédimenter sur le fond, ce qui explique les faibles teneurs mesurées aussi bien en surface qu'en profondeur.

A l'inverse, les plus fortes teneurs en MES sont enregistrées au fond, en période de mi-marée (MF et MJ). C'est à ce moment là que le courant est à son maximum, entraînant ainsi une remise en suspension importante des particules présentes au fond de la Garonne. Au niveau de Bordeaux, la marée est asymétrique et le flot est environ deux fois plus rapide que le jusant, avec des vitesses de courant plus importantes, ce qui explique que les teneurs en MES, au fond, en MF, sont plus élevées (environ 1030 mg/l) qu'au fond, en MJ (environ 750 mg/l). Ce phénomène influence très peu les concentrations en particules en surface, avec des teneurs plus faibles aux alentours de 500 mg/l.

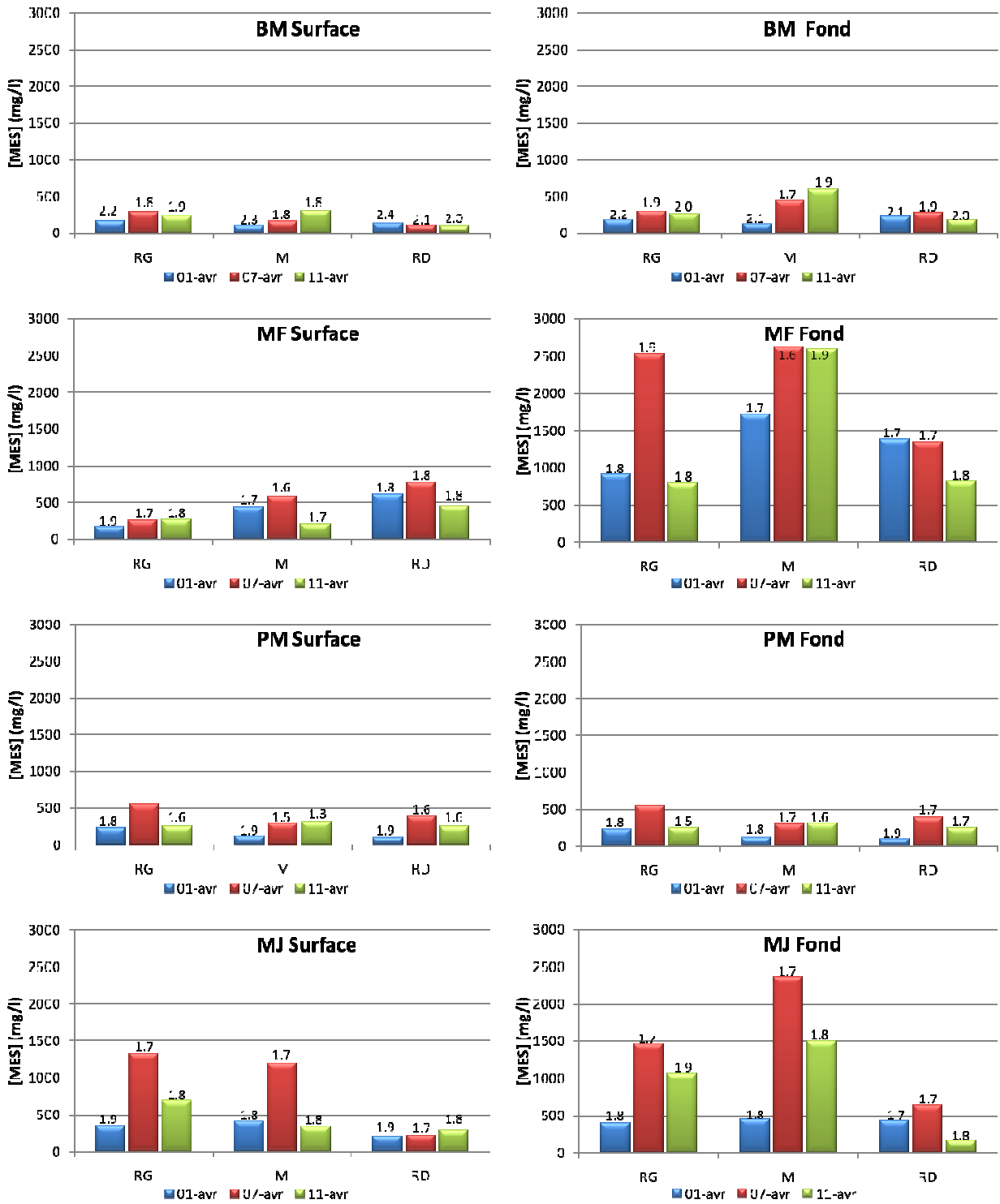


Figure 3 : Evolution des teneurs en MES (mg/l) aux différents moments de la marée, en surface et au fond, et pourcentage en COP associé (valeur indiquée au-dessus des barres).

La hausse des teneurs en MES enregistrée durant la journée du 07 avril n'est pas forcément causée par un apport particulière supplémentaire dû aux rejets directs, étant donné que le pourcentage en COP associé reste constant. Cette hausse serait plutôt liée aux forts coefficients de marée et aux forts débits rencontrés ce jour là, qui ont mélangé les masses d'eau. Ce point sera discuté dans la prochaine partie.

b. Carbone Organique Particulaire (COP)

Le COP a été déterminé à partir du même filtre utilisé pour les MES. Ce dernier a été mesuré à l'aide d'un analyseur à carbone LECO CS 125. Le résultat est exprimé en pourcentage de matière sèche, qui, ramené à la concentration en MES (mg/l), nous donne la teneur en COP (mg/l) présent dans l'échantillon.

Il existe une relation quasi linéaire entre le pourcentage en COP et les MES (mg/l). Par conséquent, les teneurs en COP (mg/l) présentent les mêmes variations que les teneurs en MES discutées précédemment. Seuls les pourcentages obtenus pour l'ensemble des échantillons sont présentés dans le tableau ci-dessous :

	Minimum	Maximum	Moyenne
01 avril 2011	1.65 %	2.39 %	1.90 %
07 avril 2011	1.50 %	2.10 %	1.70 %
11 avril 2011	1.33 %	2.02 %	1.80 %

Tableau 2 : Pourcentages en COP mesurés sur l'ensemble des échantillons.

Des études menées sur les effluents de la STEP de Louis Fargue indiquent que le COP en pourcentage de matière sèche, est constant avec une moyenne de 40% environ. Lors de cette étude, c'est en période de basse mer que les particules sont les plus riches en carbone organique, avec des pourcentages de l'ordre de 2%. Les moyennes calculées sur l'ensemble de chacune des journées de prélèvements sont légèrement plus élevées que le pourcentage en COP rencontré dans la littérature, et qui est compris entre 1.2 et 1.5% dans la Garonne. Cette hausse témoigne que le matériel organique est légèrement différent, soit dû à un léger impact des rejets anthropiques ou bien par un apport phytoplanctonique, plausible en cette période de l'année.

c. Carbone Organique Dissous (COD)

L'échantillon est filtré sur un filtre en fibre de verre GF/F de porosité nominale de 0.70 μm , préalablement brûlé à 500°C. Il est traité à l'acide pour stopper toute activité bactérienne avant d'être analysé à l'aide d'un analyseur de carbone organique total de type TOC 5000 Shimadzu. Les résultats sont exprimés en mg/l.

Les variations du COD sont présentées en Figure 4. Le trait en pointillé rouge correspond à la concentration moyenne annuelle en COD (mg/l) dans la Garonne, qui selon la littérature est d'environ 1.8 mg/l. Des études de COD réalisées sur les effluents de la STEP de Louis Fargue présentent des teneurs comprises entre 10 et 50 mg/l, soit 30 mg/l en moyenne pour les eaux brutes, soit près de 15 fois plus que ce qui est présent dans le milieu naturel.

Globalement, les valeurs mesurées sont proches des teneurs trouvées habituellement en Garonne, témoin d'un effet de dilution important probablement dû aux conditions de forts débits et de forts coefficients de marée.

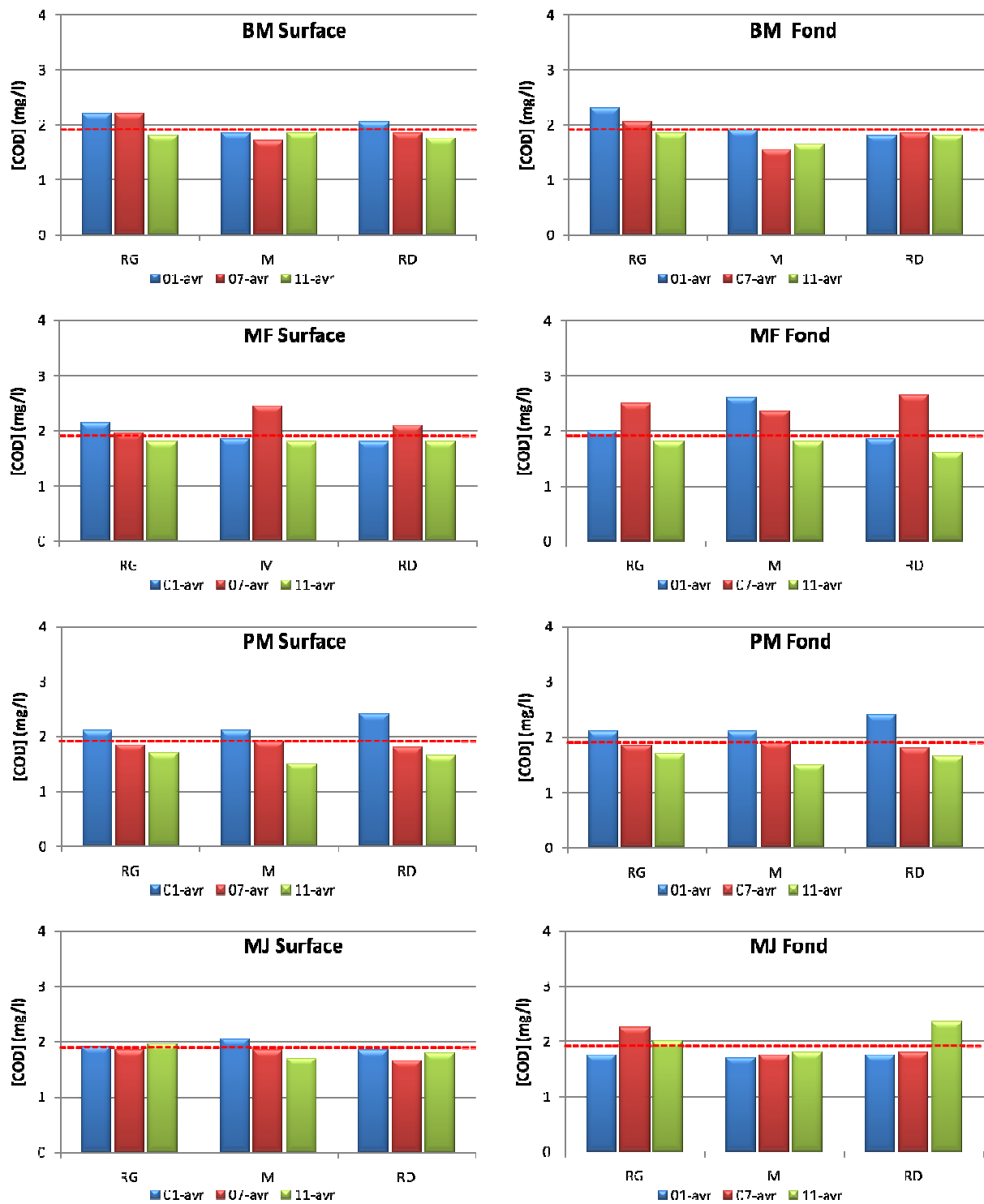


Figure 4 : Evolution des teneurs en COD (mg/l) aux différents moments de la marée, en surface et au fond.

Quelque soit le moment de la marée, la journée ou l'endroit du prélèvement, aucun impact significatif des rejets d'eaux brutes n'est donc enregistré. De plus, on note qu'il y a très peu de différence entre les échantillons de surface et de fond, témoin d'une bonne homogénéisation verticale de la colonne d'eau concernant ce paramètre.

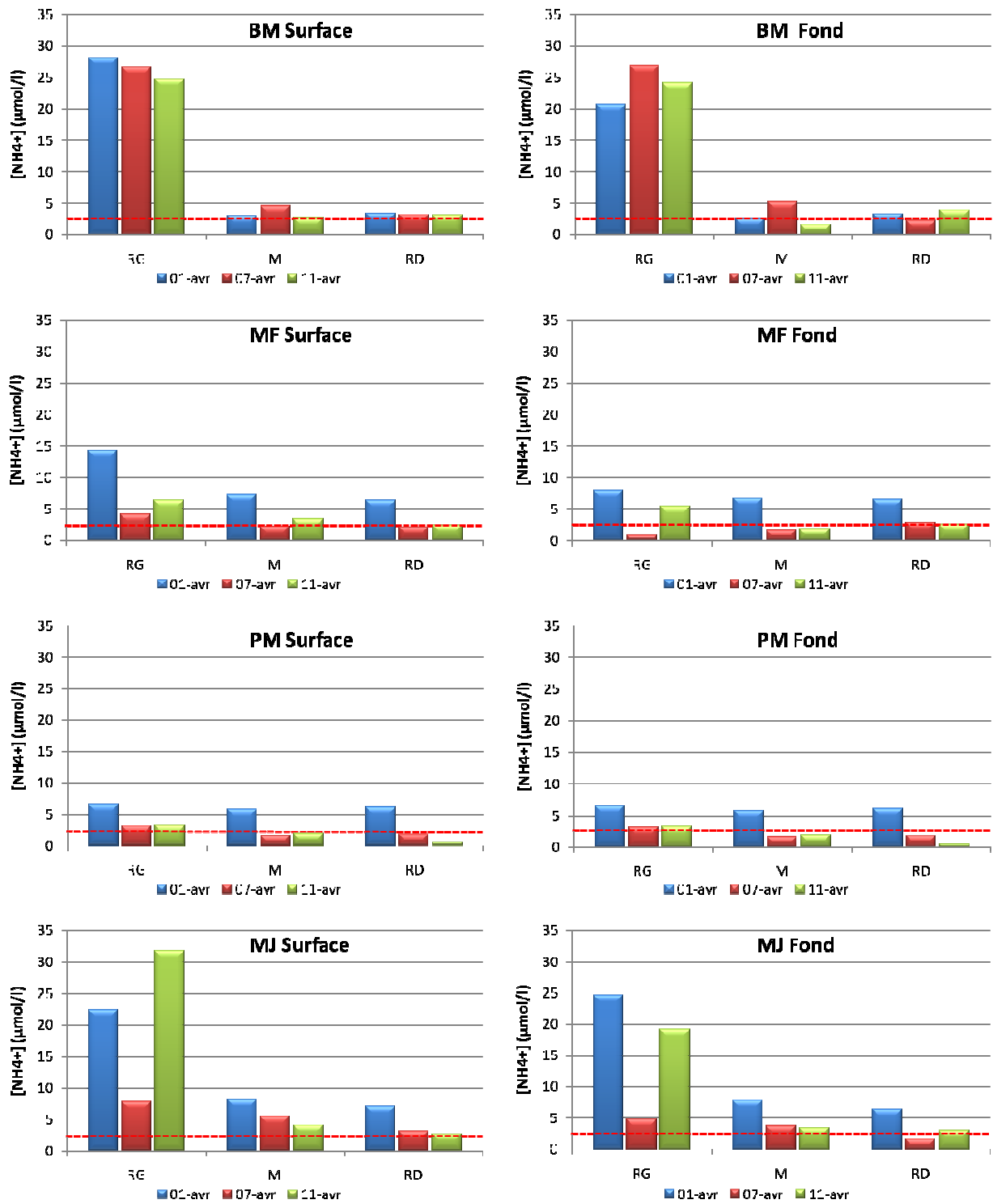


Figure 5 : Evolution des teneurs en NH_4^+ ($\mu\text{mol/l}$) aux différents moments de la marée, en surface et au fond.

d. Ammonium (NH_4^+)

L'échantillon d'eau est passé au travers d'un filtre dont le seuil de rétention est de $0.2 \mu\text{m}$ avant d'être conservé à -20°C . L'analyse est faite par colorométrie à l'aide d'un spectrophotomètre qui détermine l'absorbance de l'échantillon. La concentration en $\mu\text{mol/l}$ est déduite à partir d'un gamme d'étalons préalablement réalisée.

Le trait en pointillé rouge correspond à la teneur moyenne annuelle en ammonium dans la Garonne, qui selon la littérature, est d'environ $2.5 \mu\text{mol/l}$ (Figure 5). Pour l'ensemble des prélèvements effectués durant les 3 journées, on ne remarque aucune différence significative entre la surface et le fond, témoin que le mélange sur la colonne d'eau est bon.

Les plus faibles concentrations sont enregistrées en période de mi-flot et de pleine mer, avec des teneurs relativement proches de $2.5 \mu\text{mol/l}$. Aucun impact des rejets d'effluents n'est constaté durant ces deux moments de la marée. D'autant que des analyses réalisées sur des échantillons d'eaux brutes de la STEP de Louis Fargue ont permis d'estimer des teneurs comprises entre 620 et $3500 \mu\text{mol/l}$ ($2000 \mu\text{mol/l}$ en moyenne), soit près de 800 fois la teneur naturelle rencontrée en Garonne.

Durant la basse mer et le mi-jusant, on peut noter que les concentrations mesurées au milieu et en rive droite de la Garonne sont proches de $2.5 \mu\text{mol/l}$. Cependant, en rive gauche, les concentrations sont jusqu'à 10 fois supérieures à la concentration moyenne habituelle ($25 \mu\text{mol/l}$ en moyenne). Cette hausse n'est pas spécifique à la journée de rejets d'effluents du 07 avril. En effet, les journées du 01 et du 11 avril, représentant des conditions normales de rejets, présentent le même type de variation. Cette observation permet donc de voir que l'ammonium est un bon traceur des rejets anthropiques, que l'on retrouve essentiellement en rive gauche, là où les points de rejets sont les plus nombreux. Le fait que les fortes teneurs soient observées principalement en rive gauche indique d'une part, que l'homogénéisation se fait mal sur la largeur de la Garonne, et d'autre part, que le courant semble « plaquer » les rejets anthropiques le long de la rive gauche.

Comme on a pu le constater avec les paramètres étudiés précédemment, l'effet de dilution des rejets est important, notamment en raison des conditions particulièrement favorables de débits, relativement élevés pour une période d'étiage.

e. Nitrites (NO_2^-) et nitrates (NO_3^-)

L'échantillon est conditionné de la même façon que pour l'analyse de l'ammonium. Les analyses sont réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre.

Concernant les nitrites (Figure 6), aucun impact lié aux rejets d'eaux brutes n'est constaté. Dans les eaux brutes de la STEP de Louis Fargue on mesure des teneurs proches de $0 \mu\text{mol/l}$. Durant cette campagne, les teneurs mesurées sont également très faibles, toujours inférieures à $2 \mu\text{mol/l}$, quel que soit l'échantillon analysé. Ces observations sont cohérentes avec le fait que dans la littérature, il y a très peu de nitrites présents dans la Garonne.

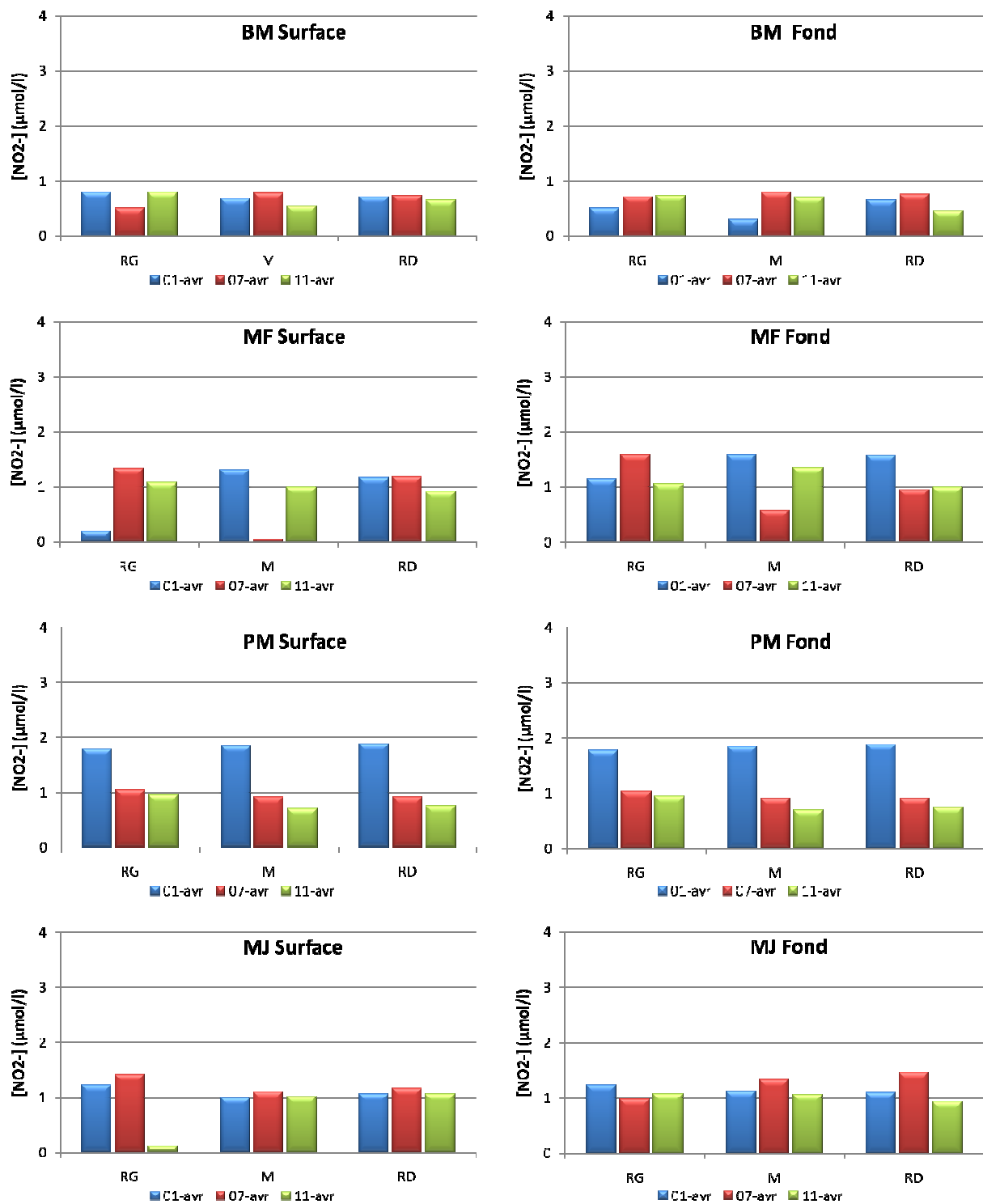


Figure 6 : Evolution des teneurs en NO_2^- ($\mu\text{mol/l}$) aux différents moments de la marée, en surface et au fond.

Le même constat est fait concernant les teneurs en nitrates (Figure 7). Le trait en pointillé rouge indique la teneur moyenne annuelle mesurée en Garonne, qui d'après la littérature, est aux alentours de $130 \mu\text{mol/l}$. Les analyses d'eaux brutes de la STEP de Louis Fargue indiquent des teneurs en nitrates quasi-nulles, inférieures à $0.5 \mu\text{mol/l}$. Avec de telles concentrations, le rejet d'eaux brutes n'a pas d'impact direct sur le milieu.

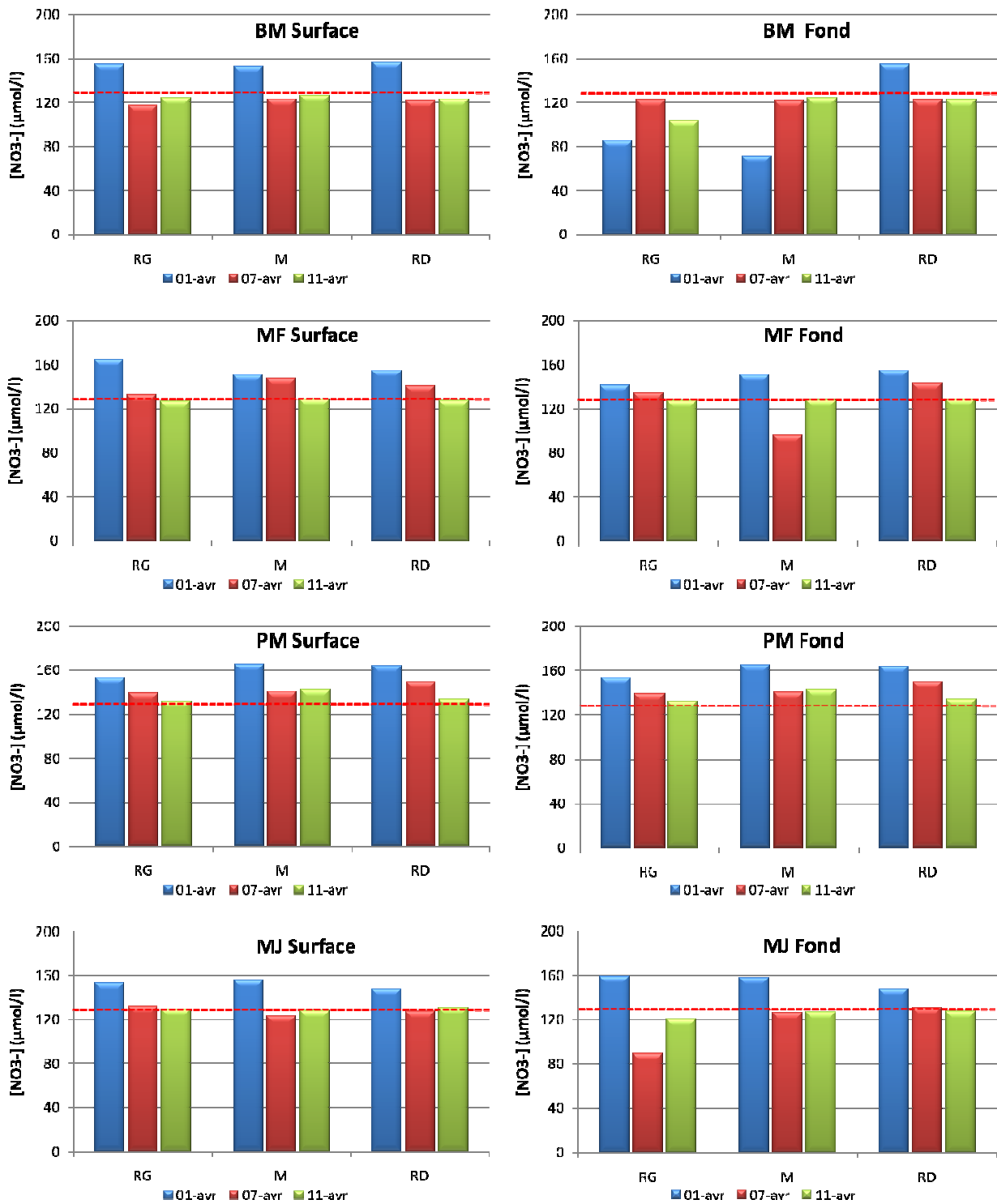


Figure 7 : Evolution des teneurs en NO_3^- ($\mu\text{mol/l}$) aux différents moments de la marée, en surface et au fond.

Les teneurs mesurées durant ces 3 jours de prélèvements sont, dans l'ensemble, proches de la teneur en nitrates présents naturellement en Garonne.

On observe de nouveau une bonne homogénéisation verticale de la masse d'eau, avec des concentrations quasi identiques entre la surface et le fond, quel que soit le paramètre étudié.

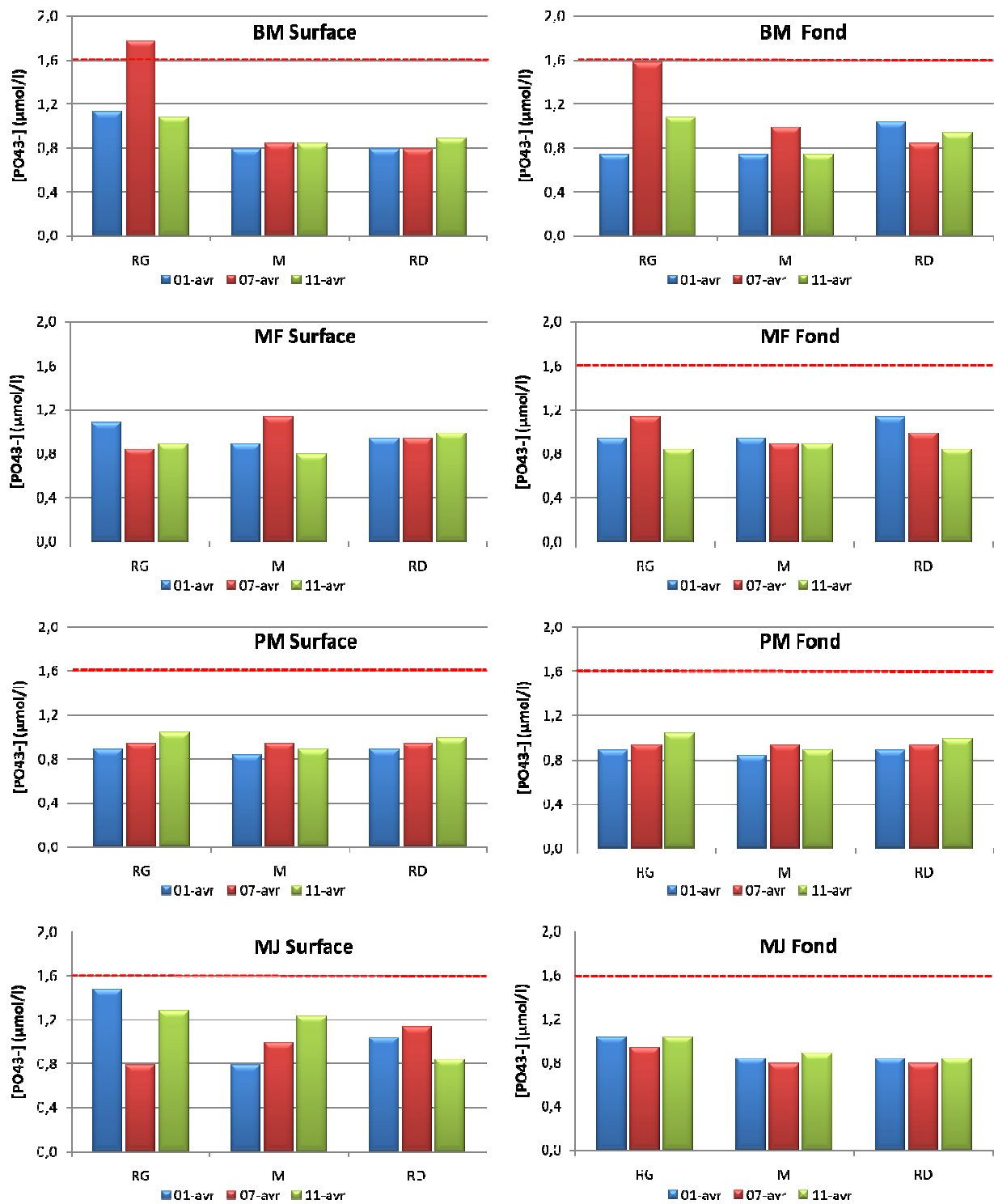


Figure 8 : Evolution des teneurs en PO_4^{3-} ($\mu\text{mol/l}$) aux différents moments de la marée, en surface et au fond.

f. Phosphates (PO_4^{3-})

La filtration des échantillons d'eau est la même que pour l'analyse des sels nutritifs azotés. Seul le conditionnement diffère. Les échantillons sont acidifiés pour limiter les effets d'adsorption et pour une meilleure conservation. L'analyse des échantillons est la même que celle décrite pour l'analyse de l'ammonium.

Le trait en pointillé rouge indique la teneur moyenne annuelle mesurée en Garonne, qui est de 1.6 $\mu\text{mol/l}$ d'après la littérature. Les analyses de phosphates dans les eaux brutes de la STEP de Louis Fargue révèlent des concentrations proches de 100 $\mu\text{mol/l}$, soit près de 60 fois la teneur naturelle.

Bien que les phosphates sont caractéristiques des rejets anthropiques et agricoles, aucun impact lié aux rejets d'eaux brutes n'est constaté via ce paramètre, quel que soit le moment de la marée, contrairement à l'ammonium. Les teneurs mesurées ici sont inférieures à la teneur naturelle en Garonne, avec une concentration moyenne de 1 $\mu\text{mol/l}$. Ceci s'explique par un phénomène de dilution, qui est loin d'être négligeable dans de telles conditions hydrologiques.

Cependant, comme pour la majorité des paramètres étudiés précédemment, les teneurs mesurées en surface et au fond de la Garonne sont très similaires, témoin que la colonne d'eau est homogène.

3. Discussion

Le suivi de la qualité de l'eau avant, pendant et après des rejets d'eaux brutes dans la Garonne, suite aux travaux de raccordements de la station d'épuration de Louis Fargue, a permis de voir si il y avait un réel impact de ces rejets exceptionnels sur le milieu naturel.

Compte tenu des conditions hydrologiques favorables, forts débits et forts coefficients de marée, et des études qualitatives d'eaux brutes de la station de Louis Fargue, il ressort que, globalement, l'impact est atténué par un important effet de dilution. En effet, **les eaux brutes de station d'épuration, bien que fortement chargées en matière organique particulaire et dissoute, mais également en nutriments, essentiellement ammonium et phosphates, n'impriment pas d'augmentation sensible de concentration en ces paramètres, hormis l'ammonium en rive gauche.**

Pour l'ensemble des paramètres étudiés, on remarque que globalement, les teneurs mesurées en surface et au fond sont proches, témoin de la bonne homogénéisation verticale de la colonne d'eau.

a. Matériel particulaire

Concernant le matériel particulaire, les MES ne semblent pas présenter des teneurs atypiques dans le milieu naturel suite aux rejets d'eaux brutes. Les teneurs en MES mesurées concordent avec ce qui est habituellement rencontré suivant le moment de la marée, c'est-à-dire qu'on enregistre les plus fortes teneurs au moment où le courant est à son maximum et inversement. Les concentrations les plus élevées observées la journée du 07 avril, durant le mi-jusant, sont vraisemblablement dues aux conditions hydrologiques (forts débits et forts coefficients de marée). Elles sont de l'ordre de 1.2 g/l en surface, durant cette journée, tandis que l'on enregistre environ 0.4 g/l les autres jours.

Le constat est le même pour le pourcentage en COP des échantillons prélevés en mi-jusant le 07 juillet, qui est seulement de 1.7% et n'est en rien caractéristique d'un rejet d'eau brute (environ 40%). S'il y avait apport notable d'effluents, le pourcentage en COP aurait augmenté considérablement. Les pourcentages en COP mesurés en basse mer sont plus élevés que la normale (de 1.3 et 1.7% en Garonne) : or on trouve environ 2% de COP, sur l'ensemble du transect et légèrement plus en surface. Certes, cette hausse peut venir d'une contribution d'effluents, mais trouve plus vraisemblablement son origine dans un matériel organique différent d'origine fluviale avec contribution phytoplanctonique, plausible en ce moment de l'année.

En ce qui concerne la concentration en COP (en mg/l), elle présente les mêmes tendances que pour les concentrations en MES, du fait qu'il existe une relation quasi-linéaire entre ces deux paramètres. Ainsi, plus il y aura de MES dans le milieu, plus la concentration en COP sera élevée.

L'effet de dilution du matériel particulaire est très important dans de telles conditions hydrologiques, ce qui a vraisemblablement minimisé l'impact des rejets d'eaux brutes.

b. Matériel dissous

1. Marqueurs potentiels préférentiels

Ammonium

Une grande partie de l'ammonium dans les eaux de surface provient des eaux usées domestiques. On trouve environ 800 fois plus d'ammonium en moyenne dans les eaux brutes que dans le milieu naturel. La journée d'échantillonnage du 07 avril ne présente pas de différence significative comparée aux autres journées. Il n'y a pas de hausse marquée pour la teneur en ammonium malgré la forte concentration de ce paramètre dans les eaux rejetées. Cependant, on observe que durant la basse mer et le mi-jusant, moments de la marée où l'on a une influence des apports amont de la CUB et donc du maximum des rejets, la concentration en ammonium en rive gauche est nettement supérieure (comprise entre 20 et 30 $\mu\text{mol/l}$) à la concentration trouvée au milieu et en rive droite de la Garonne (inférieure à 8 $\mu\text{mol/l}$), excepté le prélèvement du 07 avril en mi-jusant (8 $\mu\text{mol/l}$). Cette tendance ne s'observant pas uniquement lors de rejets exceptionnels, on peut dire que l'ammonium est un bon marqueur des rejets anthropiques de cette zone urbaine. De plus, il semblerait que le courant « plaque » les effluents sur la rive gauche provoquant une mauvaise homogénéisation sur la largeur du fleuve.

Carbone Organique Dissous

Comme pour l'ammonium, le carbone organique dissous est un paramètre qui caractérise relativement bien les effluents urbains de part sa grande labilité. En effet, des incubations réalisées avec de l'eau de STEP ont montrées que le COD, en milieu aérobie, est dégradé à environ 80% en 15 jours. Bien que les teneurs en COD mesurées dans les eaux brutes soient comprises entre 20 et 35 mg/l, soit près de 15 fois la teneur rencontrée habituellement dans le milieu naturel (1.8 mg/l), on le retrouve de manière nettement moins prononcée comparé à l'ammonium, qui a été nettement observé en rive gauche. Il n'y a aucune variation significative suivant l'endroit du prélèvement ou encore même le moment de la marée. Pour les échantillons présentant des teneurs légèrement supérieures à la normale, il est difficile d'assurer que cette augmentation soit en relation directe avec les rejets.

Il n'y a aucune corrélation nette entre les paramètres les plus caractéristiques des STEP, comme les teneurs élevées en ammonium, en COD ou même en COP. Le COD marque moins bien l'impact des rejets comparé à l'ammonium, en raison : soit d'un effet de dilution, soit de teneurs initiales plus faibles que pour l'ammonium, soit parce qu'il est dégradé plus rapidement que l'ammonium, tout en sachant que des incubations réalisées par nos soins révèlent que l'ammonium est dégradé à environ 90% en 15 jours.

2. Autres paramètres

Phosphates

Les composés phosphatés sont de bons traceurs anthropiques puisqu'ils proviennent de matières fécales, des détergents et des produits d'entretien, en plus des engrais transportés après ruissellement. Les teneurs habituelles en phosphates mesurées en Garonne sont très faibles ($1\mu\text{mol/l}$) comparées à ce qui est mesuré dans les eaux brutes ($100\mu\text{mol/l}$), soit près de 60 fois moins, et restent inférieures à la teneur habituelle annuelle mesurée dans ce fleuve ($1.6\mu\text{mol/l}$), témoin d'un effet de dilution prononcé dans les conditions hydrologiques de la période étudiée.

Nitrites – Nitrates

Les nitrites et les nitrates, paramètres présentant habituellement de très faibles concentrations dans l'effluent brut, ne sont pas à considérer comme des marqueurs majeurs des rejets anthropiques contrairement à l'ammonium. En effet, ces derniers peuvent être le produit d'une transformation chimique de l'ammonium, plus connue sous le nom de « nitrification », réalisée en présence d'oxygène et de bactéries spécifiques : l'ammonium est d'abord oxydé en nitrites puis en nitrates. Si la nitrification est totale, le stock d'ammonium est entièrement transformé en nitrates. Lors de cette mission, on n'observe pas d'impact réellement lié aux rejets directs à travers les paramètres « nitrites-nitrates ». D'une part, les eaux usées sont très faiblement concentrées en nitrates ($0.2\mu\text{mol/l}$ en moyenne) et, d'autre part, ces derniers étant présents en plus grande quantité dans la Garonne que l'ammonium, il n'est pas évident d'observer l'effet de l'oxydation de l'ammonium.

Les bactéries présentes naturellement dans le milieu naturel, vont consommer l'oxygène du milieu pour dégrader le COD et l'ammonium. Les forts débits et les forts coefficients de marée rencontrés durant ces journées de rejets ont donc minimisé l'impact sur le milieu naturel, notamment grâce à un effet de dilution très important et des eaux relativement bien oxygénées, favorisant ainsi la dégradation de ces paramètres.

Le prochain arrêt de la STEP, pour continuer les travaux de raccordement, étant prévu au mois de juillet, les conditions hydrologiques à cette période risquent d'être moins favorables à une innocuité éventuelle des effluents sur la qualité des eaux de la section estuarienne de la Garonne. En effet, on se trouvera en période d'étiage plus prononcée, donc avec des débits plus faibles, des températures plus élevées, des eaux stagnantes et la présence du bouchon vaseux au niveau de la CUB, ainsi que des teneurs en oxygène plus faibles (minima de l'ordre de 30% en juillet). Cependant, les coefficients de marée prévus lors de ces journées de rejets étant relativement forts, compris en 73 et 90, devraient faciliter l'effet de dilution des effluents, avec apport conséquent d'eaux estuariennes bien oxygénées.

Annexe 6

IMPACT DU REJET D'EFFLUENTS BRUTS
SUR LE MILIEU NATUREL :
ARRET DE LA STATION D'EPURATION DE
LOUIS FARGUE, Juillet 2011



IMPACT DU REJET D'EFFLUENTS BRUTS SUR LE MILIEU NATUREL :

ARRET DE LA STATION D'EPURATION DE LOUIS FARGUE

Juillet 2011

		Date :	Date :	Date :
Rédaction :	Aurélie Lanoux	04/11/11	07/11/11	09/11/11
Correction :	Henri Etcheber	05/11/11		
	Sandrine Pelloux			
	Alexandre Ventura			08/11/11

SOMMAIRE

1.	Arrêt de la station de Louis Fargue	2
a.	Stratégie d'échantillonnage	2
b.	Conditions hydrologiques	3
2.	Résultats.....	4
a.	Matières en suspension.....	4
b.	Carbone Organique Particulaire (COP)	6
c.	Carbone Organique Dissous (COD)	6
d.	Ammonium (NH_4^+)	8
e.	Nitrites (NO_2^-) et nitrates (NO_3^-)	10
f.	Phosphates (PO_4^{3-})	12
3.	Discussion	14
a.	Matériel particulaire	14
b.	Matériel dissous.....	15
1.	Marqueurs potentiels préférentiels	15
2.	Autres paramètres.....	16
c.	Impact sur le taux d'oxygène.....	17
	<i>Figure 1 : Points de rejets lors des travaux de raccordement de la STEP de LF</i>	2
	<i>Figure 2 : Vue aérienne du site d'étude avec le transect réalisé (trait jaune) et les 5 points de rejets (étoiles).....</i>	3
	<i>Figure 3 : Evolution des teneurs en MES (mg/l) aux différents moments de la marée, en surface et au fond, et pourcentage en COP associé (valeur indiquée au-dessus des barres).</i>	5
	<i>Figure 4 : Evolution des teneurs en COD (mg/l) aux différents moments de la marée, en surface et au fond.....</i>	7
	<i>Figure 5 : Evolution des teneurs en NH_4^+ ($\mu\text{mol/l}$) aux différents moments de la marée, en surface et au fond. ...</i>	9
	<i>Figure 6 : Evolution des teneurs en NO_2^- ($\mu\text{mol/l}$) aux différents moments de la marée, en surface et au fond... </i>	10
	<i>Figure 7 : Evolution des teneurs en NO_3^- ($\mu\text{mol/l}$) aux différents moments de la marée, en surface et au fond... </i>	11
	<i>Figure 8 : Evolution des teneurs en PO_4^{3-} ($\mu\text{mol/l}$) aux différents moments de la marée, en surface et au fond.. </i>	13
	<i>Figure 9 : Evolution de la salinité (‰) entre le 06 avril 2011 et le 01 août 2011 (sonde MAGEST de Bordeaux). </i>	16
	<i>Figure 10 : Evolution et comparaison de la teneur en oxygène (mg/l) à Portets et à Bordeaux (sondes MAGEST). </i>	17
	<i>.....</i>	
	<i>Tableau 1 : Caractéristiques hydrologiques des journées de prélèvements.....</i>	3
	<i>Tableau 2 : Pourcentages en COP mesurés sur l'ensemble des échantillons.</i>	6

1. Arrêt de la station de Louis Fargue

En vue d'une remise aux normes de la filière de traitement de l'eau, la station d'épuration (STEP) de Louis Fargue a été contrainte d'arrêter le traitement des eaux usées durant une deuxième phase de travaux de raccordement de l'ancienne station à la nouvelle. Ces travaux ont été réalisés du 04 (7h TU) au 07 juillet 2011 (8h TU). Durant cette période, il est estimé à près de 110 030 m³ d'eaux brutes déversées dans la Garonne via les 5 points de rejets, situés rive gauche, présentés ci-dessous.

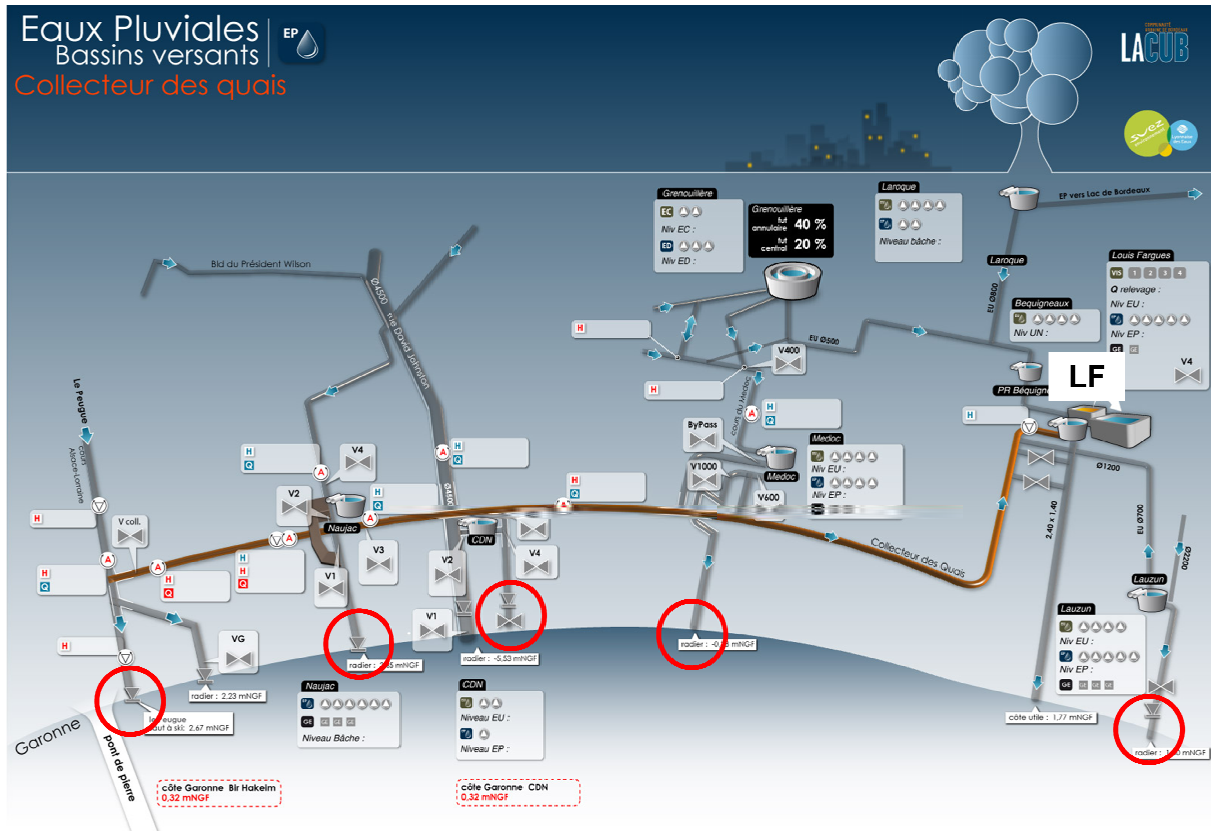


Figure 1 : Points de rejets lors des travaux de raccordement de la STEP de LF

a. Stratégie d'échantillonnage

Afin de voir si de tels rejets ont eu un impact ou non sur le milieu naturel, des prélèvements d'eaux ont été effectués sur un transect de la Garonne, situé au niveau du Grand Port Maritime de Bordeaux. Quatre missions ont été réalisées :

- Une mission le **29 juin 2011**, avant l'arrêt de la STEP : condition normale de rejets
- Deux missions les **05 et 06 juillet 2011**, durant l'arrêt de la STEP : impact des rejets
- Une mission le **19 juillet 2011**, après l'arrêt de la STEP : condition normale de rejets

Durant ces trois missions, les prélèvements ont été faits à l'aide d'une bouteille Niskin :

- à 1m de la surface (S) et à 1m du fond (F),
- en rive gauche (RG), rive droite (RD) et au milieu (M) de la Garonne,
- en basse mer (BM), pleine mer (PM), mi-flot (MF, marée montante) et mi-jusant (MJ, marée descendante).

b. Conditions hydrologiques

Les débits correspondants aux trois missions ont été fournis par le Grand Port Maritime de Bordeaux. Les caractéristiques hydrologiques sont présentées dans le tableau ci-dessous :

	29 juin	05 juillet	06 juillet	19 juillet
Débit moyen journalier	97 m ³ /s	88 m ³ /s	84 m ³ /s	192 m ³ /s
Coefficient de marée	60 – 65	88 – 86	84 – 81	80 – 77

Tableau 1 : Caractéristiques hydrologiques des journées de prélèvements.

Aucune précipitation n'a été enregistrée durant les 29 juin, 05 et 06 juillet. Il est tombé 7 mm de pluie le 19 juillet. Le débit moyen du mois de juillet est de 175 m³/s. Les rejets ont été faits dans de bonnes conditions hydrologiques.



Figure 2 : Vue aérienne du site d'étude avec le transect réalisé (trait jaune) et les 5 points de rejets (étoiles).

2. Résultats

Durant ces campagnes d'échantillonnage, les différents paramètres étudiés sont les suivants :

- paramètres physico-chimiques : **température**, **salinité**, **conductivité**,
- les matières en suspension (**MES**), le carbone organique particulaire (**COP**) et dissous (**COD**),
- les sels nutritifs : ammonium (**NH₄⁺**), nitrites (**NO₂⁻**), nitrates (**NO₃⁻**), phosphates (**PO₄³⁻**).

Parmi ces paramètres, l'ammonium et la charge organique dissoute (COD) sont ceux qui caractérisent le plus les rejets anthropiques. De plus, il faut préciser que la dégradation de l'ammonium par les bactéries aérobies nécessite plus d'oxygène que pour la dégradation du COD.

Afin de voir un éventuel impact de tels rejets dans le milieu naturel, on présentera les différents paramètres étudiés sous forme d'histogrammes. Il y aura ainsi un graphe pour chaque moment de la marée, en distinguant les prélèvements de surface et de fond. Chaque paramètre sera discuté séparément. Suite à un problème technique, il n'y a pas eu de prélèvements réalisés le 29 juin pendant la pleine mer.

L'interprétation des résultats reste délicate étant donné que les prélèvements sont réalisés de façon ponctuelle sur l'ensemble de la masse d'eau transitant et qu'il n'y a pas de répliqués.

a. Matières en suspension

Les concentrations en MES ont été déterminées après la filtration d'un volume connu d'eau de la Garonne sur des filtres GF/F en fibre de verre de porosité nominale de 0,70 µm, préalablement brûlés à 500°C. Le poids en MES a été déduit en faisant la différence du poids du filtre avant et après la filtration, qui, ramené au volume filtré, nous donne la concentration en matières en suspension (MES) en g/l dans l'échantillon prélevé.

La valeur indiquée au dessus de chaque barre correspond au pourcentage en COP mesuré dans chaque échantillon.

Les plus faibles teneurs en MES sont enregistrées aux alentours des étales de basse mer (BM) et de pleine mer (PM) (globalement inférieures à 4 g/l). En effet, l'étales, qui se situe entre deux moments de marée à courantologie forte, est caractérisée par des courants faibles sinon nuls.

A l'inverse, les plus fortes teneurs en MES sont enregistrées au fond. On peut mesurer jusqu'à 50 g/l de MES au centre de la Garonne. Ces teneurs sont largement plus importantes que lors de la mission réalisée au mois d'Avril, témoin que le bouchon vaseux est bien présent au niveau de Bordeaux à ce moment de l'année. La distribution verticale est moins ressentie en raison de courants plus faibles.

En surface, on n'observe aucune hausse anormale des teneurs en MES durant les dates pendant lesquelles ont eu lieu les rejets de temps sec liés aux travaux. Les augmentations qui sont enregistrées durant les 05 et 06 juillet, au fond de la Garonne, ne sont pas liées à ces rejets de temps sec. En effet, le pourcentage en COP ne présente pas de variation particulière. Celles-ci sont donc dues à des coefficients de marée plus élevés durant ces journées (05, 06 et 19 juillet).

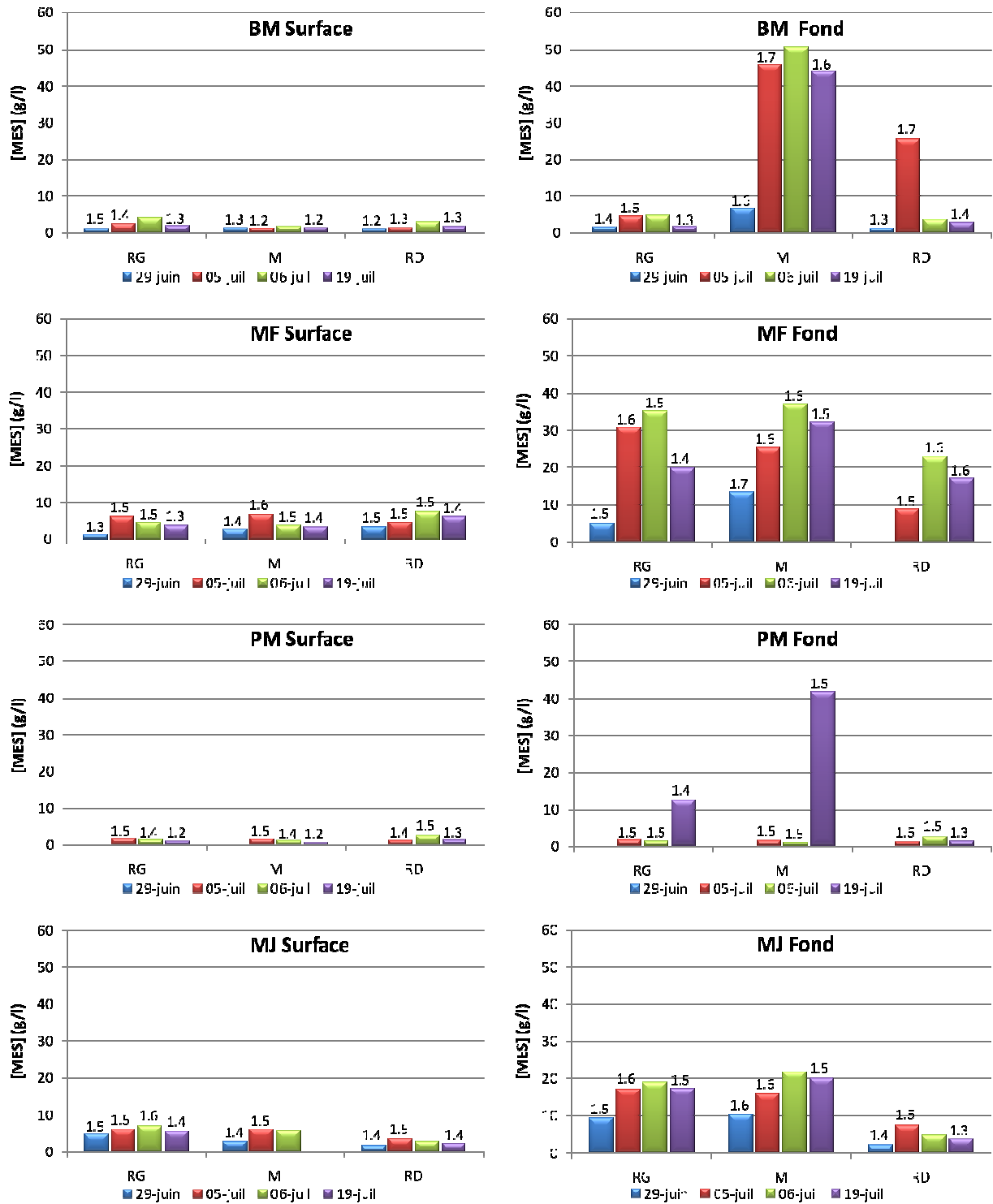


Figure 3 : Evolution des teneurs en MES (mg/l) aux différents moments de la marée, en surface et au fond, et pourcentage en COP associé (valeur indiquée au-dessus des barres).

b. Carbone Organique Particulaire (COP)

Le COP a été déterminé à partir du même filtre utilisé pour les MES. Ce dernier a été mesuré à l'aide d'un analyseur à carbone LECO CS 125. Le résultat est exprimé en pourcentage de matière sèche, qui, ramené à la concentration en MES (mg/l), nous donne la teneur en COP (mg/l) présent dans l'échantillon.

Il existe une relation quasi linéaire entre le pourcentage en COP et les MES (mg/l). Par conséquent, les teneurs en COP (mg/l) présentent les mêmes variations que les teneurs en MES discutées précédemment. Seuls les pourcentages obtenus pour l'ensemble des échantillons sont présentés dans le tableau ci-dessous :

	Minimum	Maximum	Moyenne
29 juin 2011	1.2%	1.7%	1.4%
05 juillet 2011	1.2%	1.7%	1.5%
06 juillet 2011	1.4%	1.6%	1.5%
19 juillet 2011	1.2%	1.6%	1.4%

Tableau 2 : Pourcentages en COP mesurés sur l'ensemble des échantillons.

Des études menées sur les effluents de la STEP de Louis Fargue indiquent que le COP en pourcentage de matière sèche, est constant avec une moyenne de 40% environ. Lors de cette étude, c'est en période de basse mer que les particules sont les plus riches en carbone organique, avec des pourcentages de l'ordre de 1.6%. Les moyennes calculées sur l'ensemble de chacune des journées de prélèvements sont comprises dans la gamme de concentration du pourcentage en COP rencontré dans la littérature, compris entre 1.2 et 1.5% dans la Garonne. Ceci témoigne qu'il n'y a pas eu d'impact majeur suite aux rejets directs.

c. Carbone Organique Dissous (COD)

L'échantillon est filtré sur un filtre en fibre de verre GF/F de porosité nominale de 0,70 μm , préalablement brûlé à 500°C. Il est traité à l'acide pour stopper toute activité bactérienne avant d'être analysé à l'aide d'un analyseur de carbone organique total de type TOC 5000 Shimadzu. Les résultats sont exprimés en mg/l.

Les variations du COD sont présentées en Figure 4. Le trait en pointillé rouge correspond à la concentration moyenne annuelle en COD (mg/l) dans la Garonne, qui selon la littérature est d'environ 1.8 mg/l. Des études de COD réalisées sur les effluents de la STEP de Louis Fargue présentent des teneurs comprises entre 10 et 50 mg/l, soit 30 mg/l en moyenne pour les eaux brutes, soit près de 15 fois plus que ce qui est présent dans le milieu naturel.

Les teneurs en COD mesurées le 29 juin sont toutes légèrement supérieures à la concentration moyenne dans la Garonne. Comparé aux autres journées où les teneurs sont proches voire inférieures à ce qui est mesuré dans le milieu naturel. Cette différence est due aux coefficients de marée.

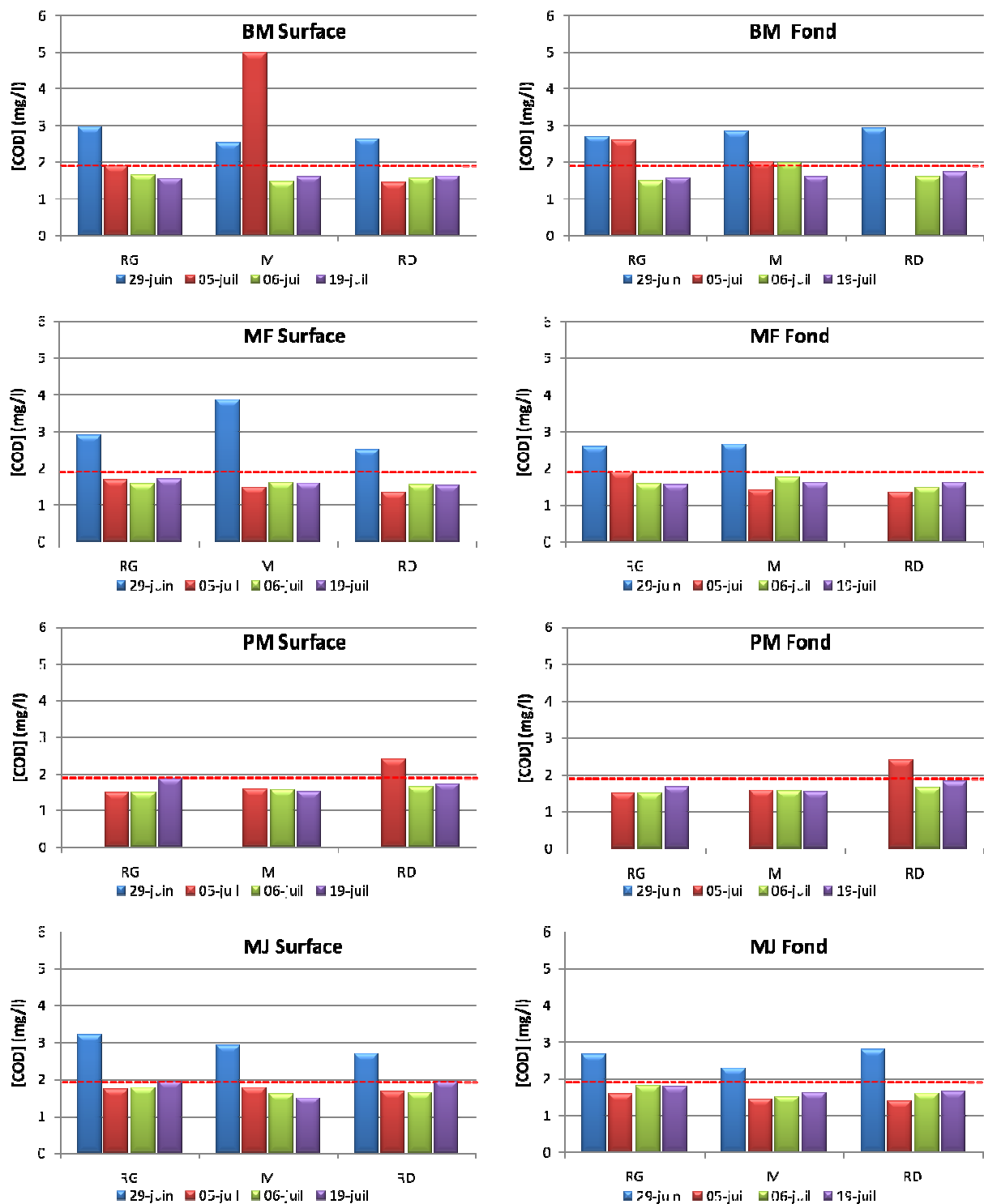


Figure 4 : Evolution des teneurs en COD (mg/l) aux différents moments de la marée, en surface et au fond.

En effet, le 29 juin, les coefficients de marée sont faibles. Nous sommes en période de mortes eaux (coefficients <70), induisant une faible oscillation des masses d'eau et donc, avec un apport constant d'effluents traités, cela tend à une accumulation de ce matériel au niveau de Bordeaux. Pour les autres journées, les teneurs mesurées sont plus faibles en raison de coefficients de marée plus élevés

(période de vives eaux), ce qui engendre un balancement des masses d'eau plus important. L'effet de dilution est donc plus prononcé. Bien que les coefficients de marée soient élevés, il y a près de 3 fois moins d'effluents bruts rejetés durant cette 2^{ème} phase de raccordement (110 030 m³) que lors de la 1^{ère} phase (332 000 m³). Le pic de COD mesuré le 05 juillet à basse mer peut être considéré comme valeur atypique (aucun réplikat).

On ne remarque donc aucun impact significatif des rejets directs à travers le paramètre du COD durant cette 2^{ème} phase de raccordement.

d. Ammonium (NH₄⁺)

L'échantillon d'eau est passé au travers d'un filtre dont le seuil de rétention est de 0,2 µm avant d'être conservé à -20°C. L'analyse est faite par colorométrie à l'aide d'un spectrophotomètre qui détermine l'absorbance de l'échantillon. La concentration en µmol/l est déduite à partir d'un gamme d'étalons préalablement réalisée.

Le trait en pointillé rouge correspond à la teneur moyenne annuelle en ammonium dans la Garonne, qui selon la littérature, est d'environ 2.5 µmol/l (Figure 5). Comme lors de la 1^{ère} phase de raccordement, les plus faibles concentrations sont enregistrées en période de mi-flot et de pleine mer, avec des teneurs inférieures à 2,5 µmol/l voire même quasi nulles. Ces teneurs sont beaucoup plus faibles que lors de la mission du mois d'Avril, cependant les volumes déversés sont 3 fois moins importants. Aucun impact des rejets d'effluents n'est constaté durant ces deux moments de la marée. D'autant que des analyses réalisées sur des échantillons d'eaux brutes de la STEP de Louis Fargue ont permis d'estimer des teneurs comprises entre 620 et 3500 µmol/l (2000 µmol/l en moyenne), soit près de 800 fois la teneur naturelle rencontrée en Garonne.

Comme lors de la mission réalisée en Avril, c'est durant la basse mer et le mi-jusant que l'on enregistre les plus fortes concentrations en ammonium, et plus particulièrement en rive gauche de la Garonne. Le maximum d'ammonium est enregistré le 29 juin, journée où les coefficients de marée sont les plus faibles et où l'oscillation des masses d'eau est la plus faible (accumulation des rejets en condition normale au niveau de Bordeaux). C'est durant la phase des rejets directs, 05 et 06 juillet, que les teneurs en ammonium sont les plus faibles. Comme pour le COD, ceci est dû aux coefficients de marée qui sont plus élevés, ce qui amplifie l'effet de dilution.

Cette observation permet donc de voir que l'ammonium est un bon traceur des rejets anthropiques, que l'on retrouve essentiellement en rive gauche, là où les points de rejets sont les plus nombreux. Le fait que les fortes teneurs soient observées principalement en rive gauche indique d'une part, que l'homogénéisation n'est pas toujours parfaite sur la largeur de la Garonne, et d'autre part, que le courant semble « plaquer » les rejets anthropiques le long de la rive gauche.

Comme on a pu le constater avec les paramètres étudiés précédemment, bien que les débits soient très faibles durant cette période de l'année, l'effet de dilution de ces rejets directs est important en raison des forts coefficients de marée.

Les pics du 29 juin et 19 juillet précédant et suivant l'arrêt de la STEP de Louis Fargue montrent que, en fonctionnement normal, les rejets en ammonium du bassin de collecte de la STEP Louis Fargue

sont concentrés au niveau du point de rejet de la STEP, alors que lors des travaux, ils ont été dilués sur les différents points de rejet du réseau en amont. En effet, la STEP de Louis Fargue ne traitant pas l'ammonium, ces concentrations sont d'autant plus visible sur les résultats des prélèvements effectués en rive gauche à proximité du rejet.

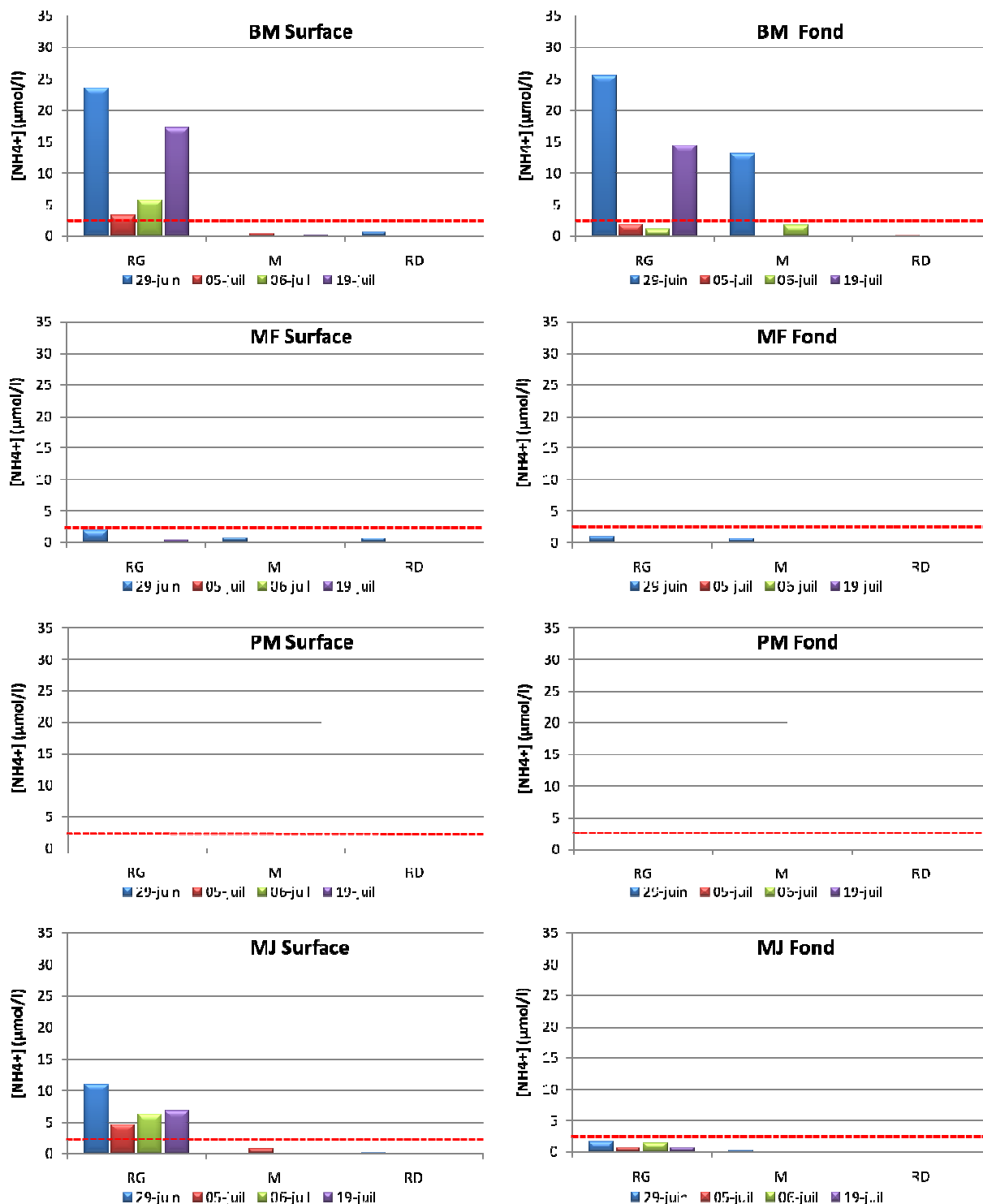


Figure 5 : Evolution des teneurs en NH_4^+ ($\mu\text{mol/l}$) aux différents moments de la marée, en surface et au fond.

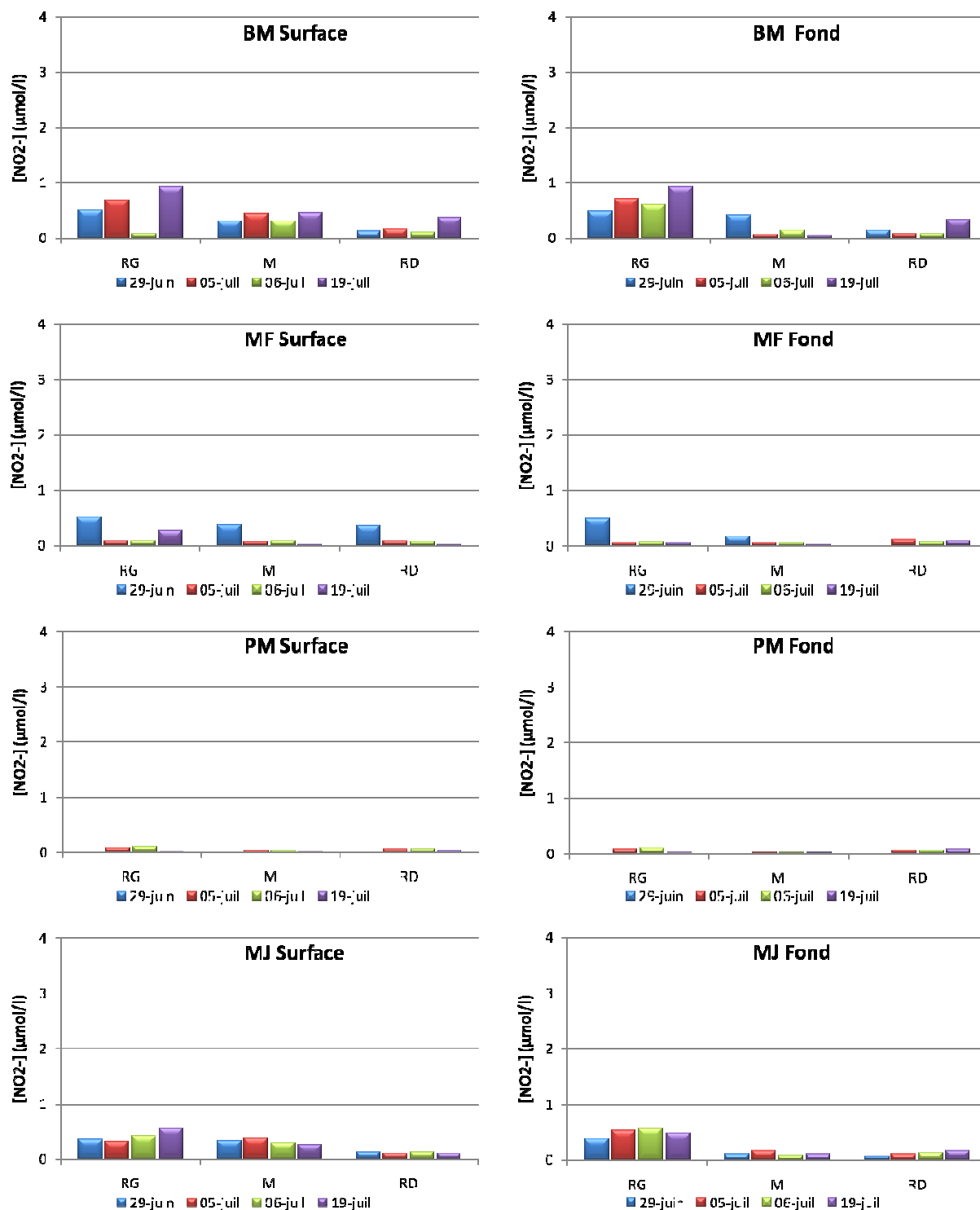


Figure 6 : Evolution des teneurs en NO_2^- ($\mu\text{mol/l}$) aux différents moments de la marée, en surface et au fond.

e. Nitrites (NO_2^-) et nitrates (NO_3^-)

L'échantillon est conditionné de la même façon que pour l'analyse de l'ammonium. Les analyses sont réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre.

Concernant les nitrites (Figure 6), aucun impact lié aux rejets d'eaux brutes n'est constaté. Dans les eaux brutes de la STEP de Louis Fargue on mesure des teneurs proches de 0 $\mu\text{mol/l}$. Durant cette campagne, les teneurs mesurées sont également très faibles, toujours inférieures à 1 $\mu\text{mol/l}$, quel que soit l'échantillon analysé. Ces observations sont cohérentes avec le fait que dans la littérature, il y a très peu de nitrites présents dans la Garonne.

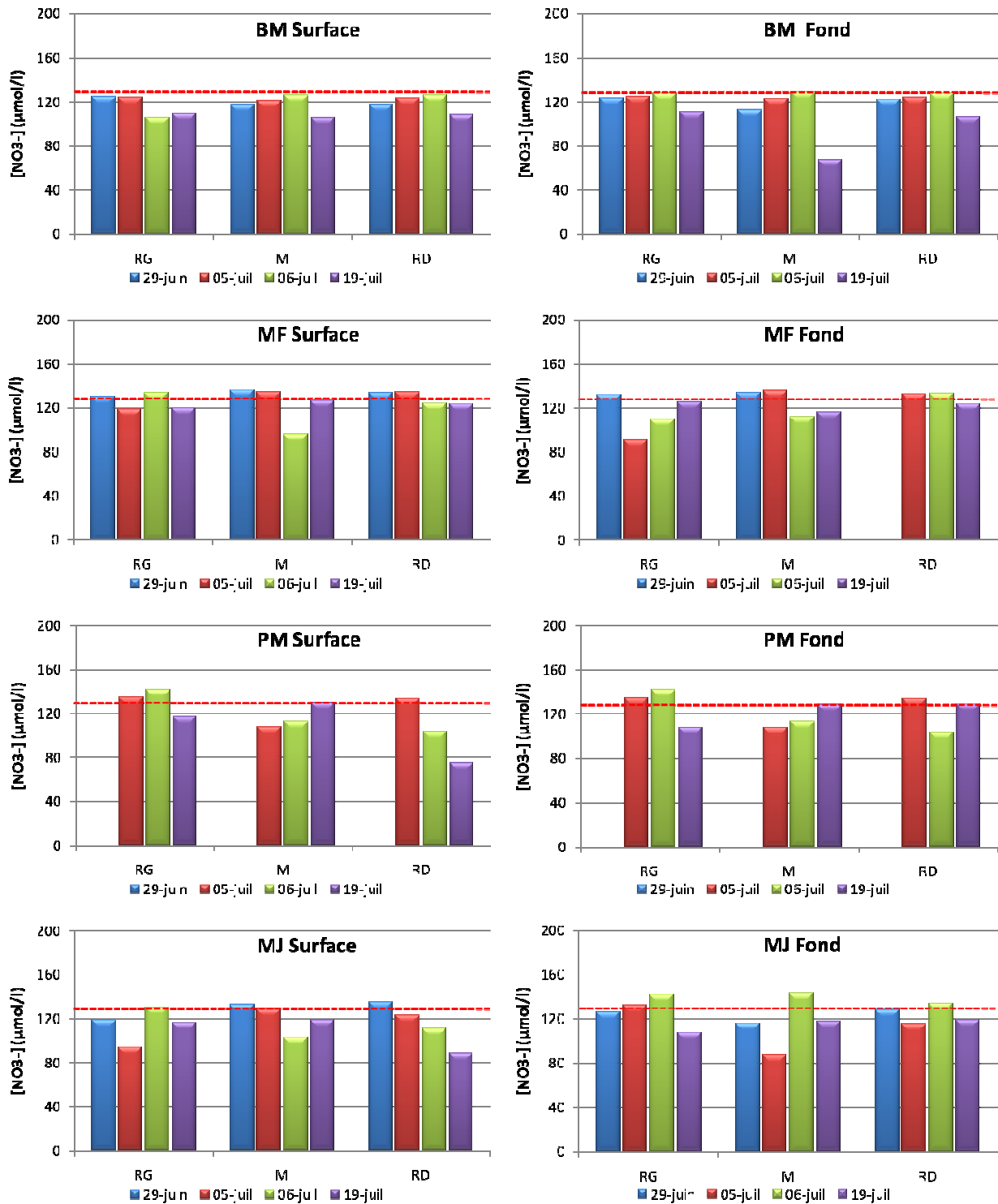


Figure 7 : Evolution des teneurs en NO_3^- ($\mu\text{mol/l}$) aux différents moments de la marée, en surface et au fond.

Le même constat est fait concernant les teneurs en nitrates (Figure 7). Le trait en pointillé rouge indique la teneur moyenne annuelle mesurée en Garonne, qui d'après la littérature, est aux alentours de 130 $\mu\text{mol/l}$. Les analyses d'eaux brutes de la STEP de Louis Fargue indiquent des teneurs en nitrates quasi-nulles, inférieures à 0.5 $\mu\text{mol/l}$. Avec de telles concentrations et sachant que le volume déversé est largement inférieur à celui de la 1^{ère} phase de raccordement, on peut dire que d'une part, les concentrations en nitrates mesurées sont légèrement plus faibles que celles mesurées durant la mission d'Avril, et d'autre part, le rejet d'eaux brutes n'a pas eu d'impact direct sur le milieu.

Les teneurs mesurées durant ces 4 jours de prélèvements sont, dans l'ensemble, proches de la teneur en nitrates présents naturellement en Garonne.

f. Phosphates (PO_4^{3-})

La filtration des échantillons d'eau est la même que pour l'analyse des sels nutritifs azotés. Seul le conditionnement diffère. Les échantillons sont acidifiés pour limiter les effets d'adsorption et pour une meilleure conservation. L'analyse des échantillons est la même que celle décrite pour l'analyse de l'ammonium.

Le trait en pointillé rouge indique la teneur moyenne annuelle mesurée en Garonne, qui est de 1.6 $\mu\text{mol/l}$ d'après la littérature (Figure 8). Les analyses de phosphates dans les eaux brutes de la STEP de Louis Fargue révèlent des concentrations proches de 100 $\mu\text{mol/l}$, soit près de 60 fois la teneur naturelle.

Bien que les phosphates soient caractéristiques des rejets anthropiques et agricoles, aucun impact lié aux rejets d'eaux brutes n'est constaté via ce paramètre, quel que soit le moment de la marée, contrairement à l'ammonium. On n'enregistre pas forcément des teneurs plus élevées durant les journées de rejets directs.

Les concentrations en phosphates dépassent toutes la teneur moyenne annuelle mesurée en Garonne. On trouve des teneurs comprises entre 1.8 et 3.0 $\mu\text{mol/l}$ sur l'ensemble des échantillons analysés lors de la mission de Juillet, contrairement à des teneurs comprises entre 0.7 et 1.8 $\mu\text{mol/l}$ durant la mission d'Avril. Cette hausse générale n'est pas liée aux rejets directs, comme les autres paramètres mesurés peuvent le confirmer. Cependant, les teneurs mesurées en surface et au fond de la Garonne sont très similaires, témoin que la colonne d'eau est homogène.

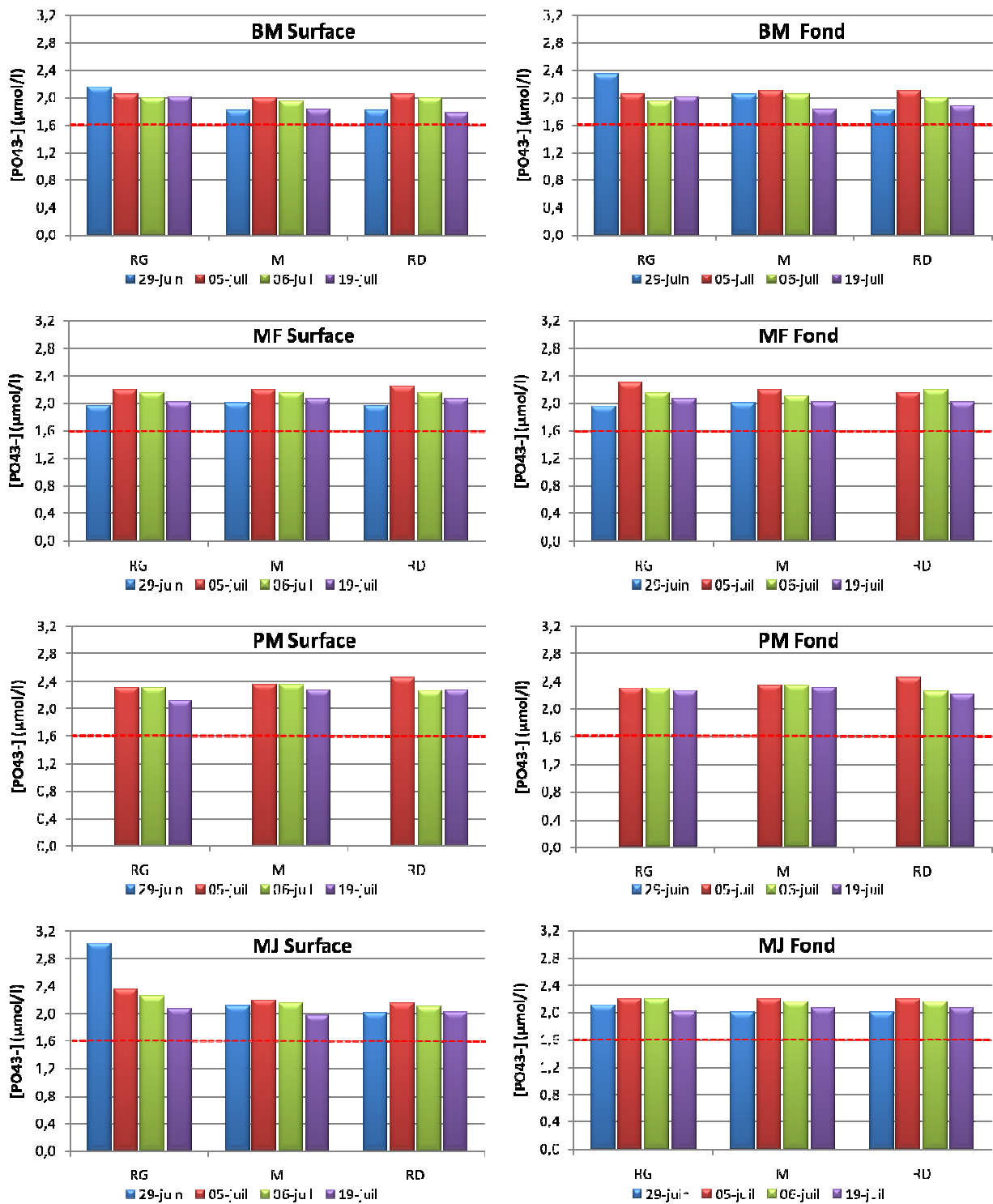


Figure 8 : Evolution des teneurs en PO_4^{3-} ($\mu\text{mol/l}$) aux différents moments de la marée, en surface et au fond.

3. Discussion

Le suivi de la qualité de l'eau avant, pendant et après des rejets d'eaux brutes dans la Garonne, suite à la deuxième phase de travaux de raccordements de la station d'épuration de Louis Fargue, a permis de voir si il y avait un réel impact de ces rejets exceptionnels sur le milieu naturel.

Bien que les débits aient été faibles ($< 200\text{m}^3/\text{s}$), les conditions hydrologiques présentes lors des journées de rejets directs étaient favorables à la dilution de ces déversements, en raison de forts coefficients de marée (vives-eaux).

Compte tenu de ces conditions hydrologiques, de la quantité d'effluents rejetée et des études qualitatives d'eaux brutes de la station de Louis Fargue, il ressort que, globalement, l'impact est atténué par un important effet de dilution. En effet, **les eaux brutes de station d'épuration, bien que fortement chargées en matière organique particulaire et dissoute, mais également en nutriments, essentiellement ammonium et phosphates, n'impriment pas d'augmentation sensible de concentration pour ces paramètres, hormis l'ammonium en rive gauche, en période de jusant.**

Pour l'ensemble des paramètres étudiés, on remarque que globalement, les teneurs mesurées en surface et au fond sont proches, témoin de la bonne homogénéisation verticale de la colonne d'eau.

a. Matériel particulaire

Concernant le matériel particulaire, les MES ne semblent pas présenter de teneurs atypiques dans le milieu naturel suite aux rejets directs d'eaux brutes. Les concentrations en MES mesurées concordent avec ce qui est habituellement rencontré à ce moment de l'année. On enregistre de plus fortes teneurs par rapport à la mission d'Avril en raison de la présence marquée du bouchon vaseux au niveau de Bordeaux en période estivale, avec des teneurs respectives de 4 à 50 g/l en surface et au fond de la Garonne.

Le constat est le même pour le pourcentage en COP des échantillons qui n'est en rien caractéristique d'un rejet d'eau brute (environ 40%). S'il y avait apport notable d'effluents, le pourcentage en COP aurait augmenté considérablement. Les pourcentages mesurés sont compris entre 1.4 et 1.5% et situent donc dans la gamme rencontrée naturellement en Garonne (de 1.3 à 1.7%). Ces pourcentages sont plus faibles que ceux obtenus lors de la mission d'Avril, qui présentaient des valeurs proches de 2% de COP. Le matériel organique était probablement différent en ce moment de l'année, plus d'origine fluviale avec une contribution phytoplanctonique, tandis qu'en Juillet, en raison de faibles débits, l'apport de l'estuaire central domine et la présence du bouchon vaseux, avec un matériel peu labile, expliquerait cette baisse du pourcentage en COP.

En ce qui concerne la concentration en COP (en mg/l), elle présente les mêmes tendances que pour les concentrations en MES, du fait qu'il existe une relation quasi-linéaire entre ces deux paramètres. Ainsi, plus il y aura de MES dans le milieu, plus la concentration en COP sera élevée.

Bien que les débits soient faibles, l'effet de dilution du matériel particulaire est d'autant plus important que les coefficients de marée sont élevés, ce qui a vraisemblablement minimisé l'impact des rejets d'eaux brutes.

b. Matériel dissous

1. Marqueurs potentiels préférentiels

Ammonium

Une grande partie de l'ammonium dans les eaux de surface provient des eaux usées domestiques. On trouve environ 800 fois plus d'ammonium en moyenne dans les eaux brutes que dans le milieu naturel. Il n'y a pas de hausse marquée pour la teneur en ammonium durant les journées de rejets liés aux travaux, malgré la forte concentration de ce paramètre dans les eaux brutes rejetées. Cependant, comme durant la 1^{ère} phase de raccordement, on observe les maxima de concentrations en rive gauche, pendant la basse-mer et le mi-jusant, moments de la marée où l'on a une influence des apports amont de la CUB (amont, par rapport à la localisation du transect étudié). Les concentrations mesurées durant cette 2^{ème} phase de travaux sont plus faibles qu'en Avril, en raison d'un volume déversé 3 fois moins important et de forts coefficients de marée.

La concentration en ammonium mesurée en rive gauche domine par rapport aux autres endroits du transect. Cette tendance ne s'observant pas uniquement lors de tels rejets exceptionnels, on peut dire que l'ammonium est un marqueur préférentiel des rejets anthropiques de cette zone urbaine. De plus, il semblerait que le courant, même faible, « plaque » les effluents sur la rive gauche, provoquant une mauvaise homogénéisation sur la largeur du fleuve.

Carbone Organique Dissous

Comme pour l'ammonium, le carbone organique dissous est un paramètre qui caractérise relativement bien les effluents urbains de part sa grande labilité. Bien que les teneurs en COD mesurées dans les eaux brutes soient comprises entre 20 et 35 mg/l, soit près de 15 fois la teneur rencontrée habituellement dans le milieu naturel (1.8 mg/l), on le retrouve de manière nettement moins prononcée comparé à l'ammonium, qui a été nettement observé en rive gauche. Il n'y a aucune variation significative suivant l'endroit du prélèvement ou encore même le moment de la marée. Seule la journée du 29 juin, avant travaux, présente des teneurs plus élevées que pour les autres jours. Ceci est dû aux coefficients de marée, qui sont les plus faibles sur l'ensemble des journées d'analyses (< 70), engendrant un temps de résidence des masses plus long autour de Bordeaux et donc probablement lié à une accumulation du matériel dissous dans des conditions normales de rejets.

Il n'y a aucune corrélation nette entre les paramètres les plus caractéristiques des STEP, comme les teneurs élevées en ammonium, en COD ou même en COP. Le COD marque moins bien l'impact des rejets comparé à l'ammonium, en raison : soit d'un effet de dilution, soit de teneurs initiales plus faibles que pour l'ammonium, soit parce qu'il est dégradé plus rapidement que l'ammonium.

2. Autres paramètres

Phosphates

Les composés phosphatés sont de bons traceurs anthropiques puisqu'ils proviennent de matières fécales, des détergents et des produits d'entretien, en plus des engrais transportés après ruissellement.

Lors de la première mission d'Avril, les teneurs en phosphates mesurées étaient faibles ($1\mu\text{mol/l}$) comparées à ce qui est mesuré dans les eaux brutes ($100\mu\text{mol/l}$), soit près de 60 fois moins, et restaient inférieures à la teneur habituelle annuelle mesurée dans ce fleuve ($1.6\mu\text{mol/l}$), témoin d'un effet de dilution prononcé dans des conditions hydrologiques favorables (forts débits et forts coefficients de marée).

Lors de la deuxième mission de Juillet, les teneurs mesurées étaient plus élevées. Cette hausse est liée à la présence du bouchon vaseux, mais aussi à la remontée d'eaux salines, nettement plus prononcée en Juillet qu'en Avril. En effet, au mois d'Avril, les concentrations en MES atteignent des maximums de 1.3 g/l en surface et de 2.5 g/l au fond, tandis que durant le mois de Juillet, les maxims sont de 7.4 g/l en surface et près de 50 g/l au fond. Parallèlement à ceci et d'après les données du réseau de mesure en continu MAGEST (Figure 9), la salinité mesurée au mois d'Avril est comprise entre 0.1 et 0.3‰ , tandis qu'elle augmente pour atteindre en Juillet entre 0.1 et 3.3‰ . Cette intrusion saline engendre des phénomènes de désorption du phosphore inorganique. Il y a en effet une compétitivité entre le phosphore et les anions présents dans l'eau de mer. Ces derniers remplacent le phosphore à la surface des particules en suspension induisant sa désorption et sa libération sous forme dissoute dans le milieu naturel.

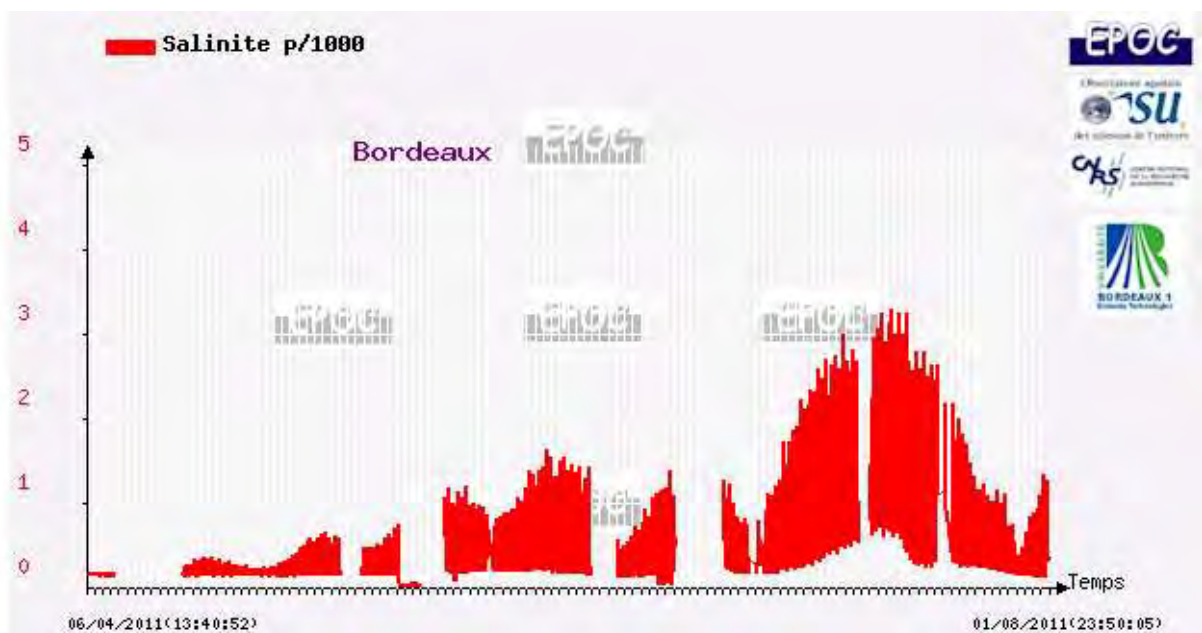


Figure 9 : Evolution de la salinité (‰) entre le 06 avril 2011 et le 01 août 2011 (sonde MAGEST de Bordeaux).

Nitrites – Nitrates

Les nitrites et les nitrates, paramètres présentant habituellement de très faibles concentrations dans l'effluent brut, ne sont pas à considérer comme des marqueurs majeurs des rejets anthropiques, contrairement à l'ammonium. En effet, ces derniers peuvent être le produit d'une transformation chimique de l'ammonium, plus connue sous le nom de « nitrification », réalisée en présence d'oxygène et de bactéries spécifiques : l'ammonium est d'abord oxydé en nitrites puis en nitrates. Si la nitrification est totale, le stock d'ammonium est entièrement transformé en nitrates. Lors de cette mission, on n'observe pas d'impact réellement lié aux rejets directs à travers les paramètres « nitrites-nitrates ». D'une part, les eaux usées sont très faiblement concentrées en nitrates (0.2 $\mu\text{mol/l}$ en moyenne) et, d'autre part, ces derniers étant présents en plus grande quantité dans la Garonne que l'ammonium, il n'est pas évident d'observer l'effet de l'oxydation de l'ammonium, sauf si l'on se réfère à l'évolution des teneurs en oxygène dissous dans l'eau.

c. Impact sur le taux d'oxygène

Les bactéries, présentes naturellement dans le milieu naturel, vont consommer l'oxygène du milieu pour dégrader le COD et l'ammonium. La figure 10 présente l'évolution de la teneur en oxygène à Bordeaux et à Portets (point amont servant de référence), fournie par le réseau de surveillance en continu MAGEST, entre le 26 juin et le 25 juillet 2011. Les traits en pointillés rouges correspondent aux différentes journées d'échantillonnages lors de la 2^{ème} phase de travaux.

Les teneurs mesurées lors de la 1^{ère} phase de travaux (Avril 2011) sont globalement comprises entre **9 et 10 mg/l à Portets** (environ 90% du taux de saturation en oxygène) et entre **7 et 8 mg/l à Bordeaux** (environ 65% du taux de saturation).

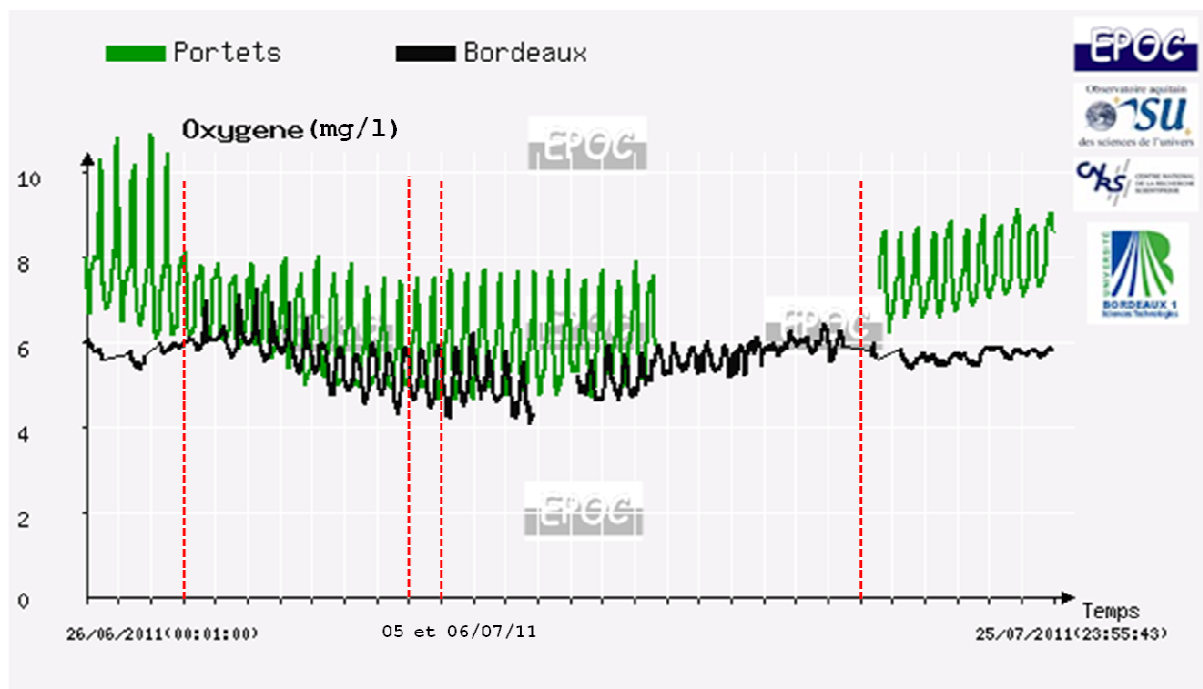


Figure 10 : Evolution et comparaison de la teneur en oxygène (mg/l) à Portets et à Bordeaux (sondes MAGEST).

Concernant la 2^{ème} phase de travaux (Juillet 2011), les teneurs sont comprises entre **5 et 7,5 mg/l à Portets**, soit entre 60 et 90% du taux de saturation. Pour la station de **Bordeaux**, les teneurs en oxygène mesurées sont comprises entre **4 et 6 mg/l**, soit entre 50 et 70% du taux de saturation.

La baisse des teneurs en oxygène observée entre les deux missions de raccordements sont principalement expliquées par la hausse des températures, principal facteur responsable de la diminution de l'oxygène. Sur la figure 10, on remarque l'influence du cycle semi-diurne de la marée (deux marées basses et deux marées hautes par jour) sur l'évolution de la teneur en oxygène. Le décalage que l'on constate entre les pics d'oxygène à Bordeaux et à Portets est simplement dû au décalage de l'heure de marée. Cependant, on n'observe pas de baisse significative de la teneur en oxygène suite aux rejets directs.

L'impact sur l'oxygénation des eaux n'est pas considéré comme très préoccupant suite à ces rejets de temps sec liés aux travaux. Ceci est dû notamment aux forts coefficients de marée rencontrés durant ces journées de rejets, ce qui a minimisé l'impact sur le milieu naturel, grâce à un effet de dilution très important.

Dans le cadre d'une meilleure gestion, il apparaît clairement que le meilleur moment pour rejeter des effluents bruts dans le milieu naturel, soit, dans tous les cas :

-en période de **jusant** (marée descendante),

-pour limiter l'impact sur le milieu, il faudrait en plus du jusant, **des coefficients de marée élevés (supérieurs à 70)**.

Annexe 7

AXE 4



Approche de l'impact des conditions physico-chimiques affectant la masse d'eau estuarienne garonnaise sur les cortèges biologiques

Action 2 : Caractérisation de la composante planctonique et benthique dans la partie fluviale de l'estuaire de la Gironde

Avril 2011 – Mars 2012

B. Sautour (Pr), G. Bachelet (DR), F. Dindinaud (Doctorant)

1. Contexte scientifique et objectifs de l'étude

Les organismes vivants, et notamment planctoniques, sont extrêmement dépendants de leurs environnements. Ils possèdent un temps de génération court, ce qui leur confère un potentiel de réactivité intéressant en tant que marqueur des modifications qualitatives et quantitatives de leurs habitats (Omori, 1984 ; Beaugrand, 2009). Alors que les populations planctoniques et benthiques ainsi que leurs dynamiques associées sont bien connues dans la zone aval de l'estuaire de la Gironde (à partir du PK 30) (Sautour et Castel 1995 ; David *et al.* 2005 ; Quintin *et al.* 2011), rares sont les informations relatives à la composition de ces communautés biologiques dans la partie fluviale de l'estuaire de la Gironde.

Connaître la variabilité spatio-temporelle des communautés benthiques et planctoniques, ainsi que les patrons responsables de cette variabilité au sein de la partie fluviale de l'estuaire de la Gironde, constitue la finalité recherchée de cette action, avec pour objectifs de répondre aux questions suivantes :

- **déterminer la composition des communautés biologiques (benthiques et planctoniques) dans la partie fluviale de l'estuaire de la Gironde (Garonne, zone impactée par la CUB, et Dordogne, zone témoin),**
- **déterminer la qualité ainsi que la variabilité du pool nutritif essentiel au maintien des communautés,**
- **établir un lien avec les paramètres du milieu susceptibles d'agir sur les compositions biologiques.**

Les différentes réponses à ces questions fourniront dans un premier temps un état des lieux fondamental des communautés en présence et par la suite, avec la connaissance des patrons de distribution, un outil précieux de gestion.

2. Méthodologie

		Année 1 (-> 31/03/2011)	Année 2 (-> 31/03/2012)
Echantillonnages Manipulations		30 %	90 %
Analyses plancton	Phytoplancton	30 %	100 %
	mesozooplancton	10 %	80 %
Analyses benthos	Meiofaune	10 %	70 %
	Macrofaune	0 %	50 %
Analyses paramètres environnementaux	Colonne d'eau	15 %	80 %
	Sédiment	0 %	80 %

Tableau 1 : Etat d'avancement des travaux de l'action 2 au 31/03/2012

Rappel sur la stratégie d'échantillonnage

- Pour les communautés planctoniques, douze stations ont été choisies (Figure 1):
 - o Garonne : Ambès, au niveau de la station de Bacalan quatre moments de marée (mi-jusant, mi-flot, pleine mer et basse mer) ont été échantillonnés afin d'obtenir un gradient spatial suffisant pour englober l'ensemble de la CUB, Langoiran.
 - o Dordogne : Ambès, au niveau de la station de Cubzac-les-Ponts, quatre moments de marée (mi-jusant, mi-flot, pleine mer et basse mer) ont été échantillonnés pour obtenir un gradient spatial similaire à celui de la Garonne, Libourne.

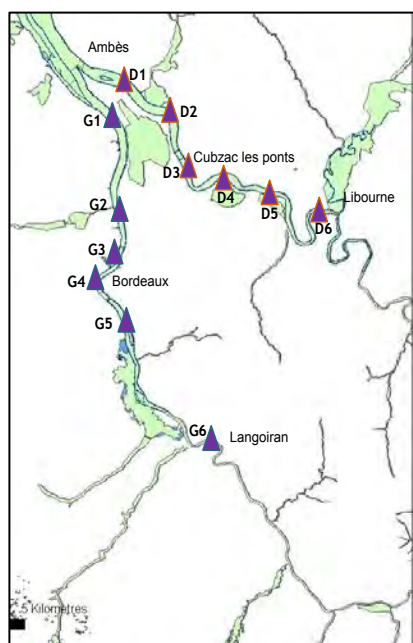


Figure 1 : Stations d'échantillonnages retenues dans l'estuaire fluvial. En Garonne estuarienne ; G1 = Ambès, G2 = Bacalan à pleine mer, G3 = Bacalan à mi-flot, G4 = Bacalan à mi-jusant, G5 = Bacalan à basse mer et G6 = Langoiran. En Dordogne estuarienne D1 = Ambès, D2 = Cubzac-les-Ponts à pleine mer, D3 = Cubzac-les-Ponts à mi-flot, D4 = Cubzac-les-Ponts à mi-jusant, D5 = Cubzac-les-Ponts à basse mer et D6 = Libourne.

NB : Les sites Ambès ont été échantillonnés uniquement à pleine mer afin de mettre en évidence une influence marine. A contrario, les sites de Langoiran et Libourne ont été échantillonnés à basse mer afin de mettre en évidence une influence continentale.

- Pour les communautés benthiques, neuf stations ont été choisies :
 - o Garonne : Ambès, Bacalan, Bordeaux (Chantier Nicolas), Bègles (rives d’Arcins) et Langoiran.
 - o Dordogne : Ambès, Cubzac-les-Ponts, Izon et Libourne.

NB : L’échantillonnage est réalisé en zones intertidale et subtidale (hors chenaux de navigation pour éviter les zones de dragage).

En parallèle, dans les deux milieux, les paramètres biotiques et abiotiques (biomasse chlorophyllienne, isotopie, carbone et azote organiques particulaires, acides gras, température et conductimétrie) ont été mesurés. Des mesures de production de l’espèce planctonique dominante *Eurytemora affinis* ont été mises en place afin de mettre en avant l’impact des matières en suspension, ainsi que de l’oxygène durant la période d’étéage.

Planning d’échantillonnage

L’échantillonnage a été effectué avec une périodicité mensuelle depuis février 2011 à raison de 4 jours par mois. Les échantillonnages se sont terminés en novembre 2011.

L’échantillonnage du benthos en zone subtidale a été réalisé uniquement durant les mois de juin, août et octobre, qui correspondent à la période où les abondances et la diversité sont maximales.

3. Résultats

3-1. Principaux descripteurs environnementaux

Paramètres abiotiques

Les mesures des paramètres environnementaux sont essentielles dans la compréhension de la dynamique des populations car ils sont susceptibles d’agir sur les compositions biologiques.

Les températures annuelles moyennes sont plus élevées en Dordogne estuarienne ($16,8 \pm 7,0^{\circ}\text{C}$) qu’en Garonne estuarienne ($16,5 \pm 6,7^{\circ}\text{C}$). La période et les valeurs des maxima et des

minima des deux domaines de l'estuaire fluvial sont indiquées dans le Tableau 2. Il est intéressant de noter cette inversion inter-fleuves des maxima de température (Figure 2). Cette information indique que les deux fleuves estuariens n'ont pas la même dynamique. En période hivernale et en début de printemps, les températures sont plus élevées en Garonne qu'en Dordogne ; ce patron s'inverse à partir de mai. Ceci pourrait s'expliquer par des débits plus faibles en Dordogne (Tableau 2) engendrant un temps de résidence des masses d'eau plus long en Dordogne.

Une observation similaire est visible pour les matières en suspension (MES) (Figure 3). La concentration annuelle moyenne des matières en suspension est plus élevée en Dordogne estuarienne ($2,33 \pm 0,3 \text{ g.l}^{-1}$) qu'en Garonne estuarienne ($1,84 \pm 0,28 \text{ g.l}^{-1}$). Néanmoins, les maxima sont localisés en Garonne estuarienne en septembre.

La concentration annuelle moyenne en oxygène est plus élevée en Dordogne estuarienne ($8,2 \pm 1,7 \text{ mg.l}^{-1}$) qu'en Garonne estuarienne ($6,5 \pm 1,8 \text{ mg.l}^{-1}$). L'information importante est un minimum enregistré en septembre pour la Garonne pouvant engendrer un effet néfaste pour les communautés biologiques.

	T°C	[MES] en g.l ⁻¹	Débits en m s ⁻¹	Oxygène mg.l ⁻¹
Garonne	Moy 16,5 ± 6,7	Moy 1,84 ± 0,28	Moy 302 ± 255	Moy 6,5 ± 1,8
	Max 25,8 (août) Min 3,9 (fev)	Max 10,39(sept) Min 0,04 (fev)	Max 2187(mars) Min 71 (août)	Max 10,52(janv) Min 3,45 (sept)
Dordogne	Moy 16,8 ± 7	Moy 2,33 ± 0,3	Moy 188 ± 72	Moy 8,2 ± 1,7
	Max 26,9 (août) Min 3,7 (fev)	Max 7,47 (août) Min 0,02 (fev)	Max 497 (déc) Min 85 (août)	Max 11,55 (déc) Min 4,8 (août)

Tableau 2 : Variation annuelle (moyenne ± ES) de la température, de la concentration des matières en suspension, des débits et de l'oxygène dans la Garonne et la Dordogne estuariennes.

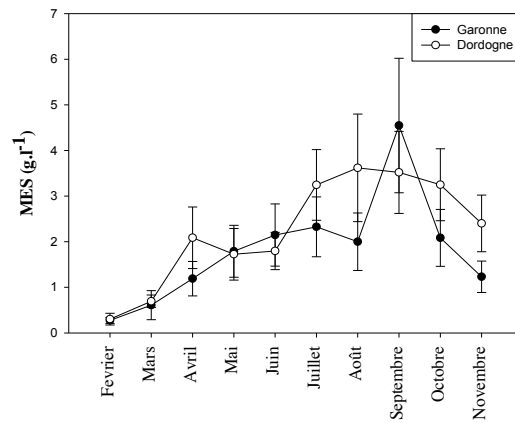
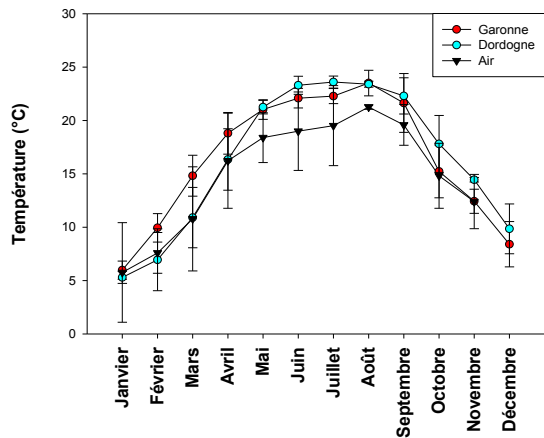


Figure 2 : Variation annuelle (moyenne \pm ES) de la température de l'eau en Garonne (rouge) et Dordogne estuariennes et de la température atmosphérique (blanc) estuariennes. (noir).

Figure 3 : Variation annuelle (moyenne \pm ES) des matières en suspension en Garonne (noir) et Dordogne (bleu) estuariennes.

En comparaison avec la partie aval de l'estuaire (en aval du PK30) (Tableau3), les températures annuelles moyennes, la concentration des matières en suspension et la concentration en oxygène sont plus élevées dans la Garonne et la Dordogne estuariennes.

Moyenne \pm ET (février-novembre)	Aval	Amont	Garonne	Dordogne
Température en °C	16,6 \pm 4,2 Min 7,8 (fev) Max 22,5 (ao)	17,9 \pm 4,9 Min 6,7 (fev) Max 24,0 (ao)	18,2 \pm 4,7 Min 3,9 (fev) Max 25,8 (ao)	18,0 \pm 5,8 Min 3,7 (fev) Max 26,9 (ao)
[MES] en g.l ⁻¹	0,1 \pm 0,09 Min 0,008 (juil) Max 0,4 (fev)	0,5 \pm 0,3 Min 0,1 (juil) Max 1 (ao)	1,84 \pm 0,28 Min 0,04 (fev) Max 10,4 (sep)	2,33 \pm 0,3 Min 0,02 (fev) Max 7,47 (ao)
Oxygène en mg.l ⁻¹	5,2 \pm 1,2 Min 4,7 (ao) Max 6,7 (fev)	5,5 \pm 1,2 Min 4,1 (ao) Max 7,55(feve)	6,5 \pm 1,8 Min 3,45 (sept) Max 10,52(janv)	8,2 \pm 1,7 Min 4,8 (août) Max 11,55 (déc)

Tableau 3 : Variation annuelle (moyenne \pm ES) de la température, de la concentration des matières en suspension et de l'oxygène dans la Garonne et la Dordogne estuariennes ainsi que dans l'estuaire aval et amont de la Gironde en 2011.

La biomasse phytoplanctonique est estimée par la concentration en chlorophylle. Les différentes formes de chlorophylle ont également été analysées car l'information donnée par chacune d'elles est différente, à savoir :

- Chlorophylle a : pigment présent chez l'ensemble des végétaux aquatiques,

- Chlorophylle *b* : pigment présent chez l'ensemble des chlorophycées,
- Chlorophylle *c* : pigment présent chez les péophycées (algues brunes).

De la même façon, les phéopigments (à savoir, phéophytines *a*, *b* et *c*) ont été analysés. La concentration des phéopigments est en relation directe avec les concentrations des différentes chlorophylles car ils sont leurs produits de dégradation. Cette dégradation nécessitant une consommation d'oxygène, il est indispensable de suivre la concentration des phéopigments car cela peut engendrer des périodes d'anoxie ponctuelles.

	Chlo <i>a</i> (µg.l ⁻¹)	Chlo <i>b</i> (µg.l ⁻¹)	Chlo <i>c</i> (µg.l ⁻¹)	Pheo <i>a</i> (µg.l ⁻¹)	Pheo <i>b</i> (µg.l ⁻¹)	Pheo <i>c</i> (µg.l ⁻¹)
Garonne	Moy 3,3 ± 2,62	Moy 0,12 ± 0,08	Moy 0,17 ± 0,14	Moy 9,6 ± 8,1	Moy 0,7 ± 0,63	Moy 4,7 ± 3,7
	Max 14,4 (juil) Min 0,34(août)	Max 0,6(nov) Min 0 (août)	Max 1,26(mai) Min 0,01 (nov)	Max 39,4 (sepy) Min 1,1 (nov)	Max 3,68 (sept) Min 0,03 (avr)	Max 17,3 (sept) Min 0,3 (nov)
Dordogne	Moy 3,57 ± 2,1	Moy 0,09 ± 0,09	Moy 0,16 ± 0,15	Moy 13,5 ± 10,1	Moy 1,06 ± 0,9	Moy 6,4 ± 4,9
	Max 12,2 (juil) Min 0,7 (nov)	Max 0,53 (nov) Min 0 (août)	Max 1,1 (juil) Min 0,04 (avr)	Max 3,1 (sept) Min 0,9 (fev)	Max 4,05 (sept) Min 0 (avr)	Max 22 (août) Min 0 (juil)

Tableau 4 : Variation annuelle (moyenne ± ES) de la concentration des différentes formes de chlorophylle et de phéopigment dans la Garonne et la Dordogne estuariennes.

Les concentrations moyennes annuelles des différentes phéophytines sont plus élevées que les concentrations en chlorophylle (Tableau 4). Cela indique que le matériel végétal est fortement dégradé dans la partie fluviale de l'estuaire de la Gironde. Ces valeurs correspondent à la période de remontée du bouchon vaseux dans cette partie de l'estuaire.

L'analyse des chlorophylles et des phéopigments a permis d'observer de la même façon que précédemment pour les paramètres biotiques, une inversion des maxima entre la Garonne et la Dordogne estuariennes au mois de juin (Figure 4). Cette observation est également valable pour les chlorophylle *b* et *c* ainsi que pour les phéopigments respectifs (figures non présentées).

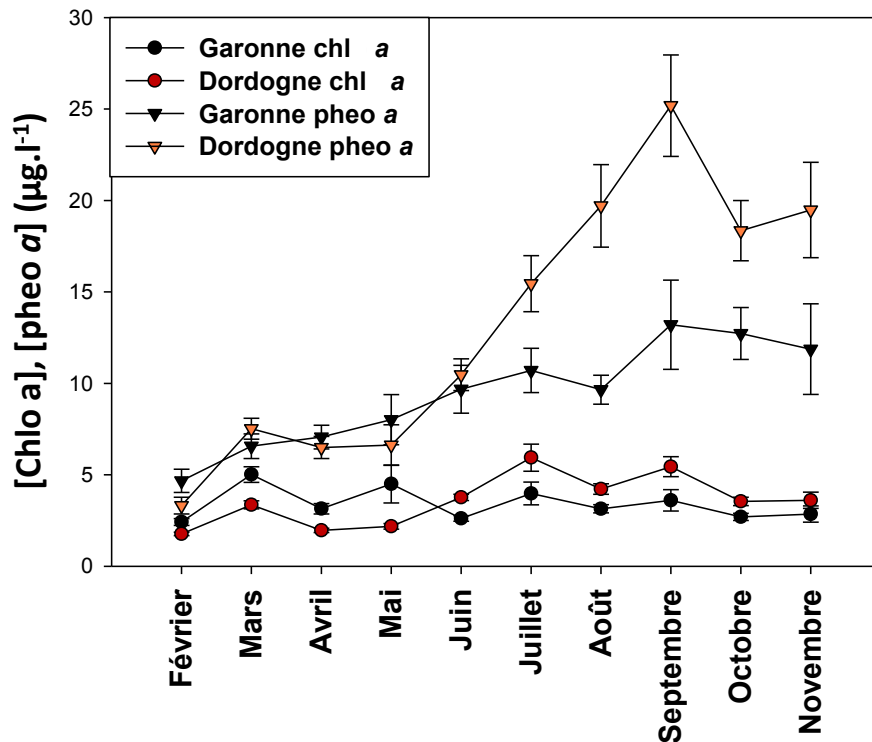


Figure 4 : Variation annuelle (moyenne \pm ES) de la concentration en chlorophylle *a* et en phéophytine *a* en Garonne (chl = rond noir ; phéo = triangle noir) et en Dordogne (chl = rouge ; phéo = orange) estuariennes.

Variabilité des descripteurs environnementaux

Les analyses statistiques des paramètres environnementaux dans l'estuaire fluvial de la Gironde ont permis de mettre en évidence une variabilité spatiale et une variabilité temporelle.

Les analyses faites sur l'ensemble des stations ne différencient pas la Garonne (potentiellement impactée par la CUB) de la Dordogne estuarienne (zone de référence). En revanche, les analyses différencient très bien les stations amont (respectivement Langoiran sur la Garonne estuarienne et Libourne sur la Dordogne estuarienne) des stations aval (respectivement Ambès côté Garonne et Ambès côté Dordogne). La différenciation est engendrée par les concentrations des matières en suspension et également par les différentes formes de chlorophylle et phéopigments qui sont plus élevées en aval. L'influence des apports provenant de l'aval est plus importante que ceux provenant de l'amont.

Les descripteurs environnementaux présentent une saisonnalité importante, et cette dynamique saisonnière est commune à la Garonne et à la Dordogne estuariennes. Il est possible de distinguer deux groupes :

- un groupe « hiver – printemps » caractérisé par de faibles concentrations en chlorophylle, phéopigments et matières en suspension,
- un groupe « été – automne » caractérisé par des concentrations élevées en chlorophylle, phéopigments et matières en suspension.

3-2. Descripteurs de la matière organique

Les matières en suspension sont en concentration élevée dans la partie fluviale de l'estuaire, mais peuvent devenir limitantes si elles sont de mauvaise qualité. Il existe plusieurs descripteurs pour la qualité des matières en suspension. Lors de cette étude, plusieurs d'entre eux ont été développés.

Qualité des matières en suspension

Le rapport carbone organique particulaire / matières en suspension est en moyenne \approx 1% ; il y a donc peu de matière organique au sein des MES dans la partie fluviale de l'estuaire de la Gironde. Cela représente 1 à 3% de moins que dans la zone aval au PK 67.

Le rapport COP/chl est un descripteur de l'importance relative des autotrophes, mixotrophes et hétérotrophes (ces derniers ne contenant pas de chlorophylle) et de l'état de fraîcheur ou de dégradation des autotrophes (la chlorophylle *a* se dégradant plus rapidement que le COP total). Ses valeurs varient de 1001 (février-mars) à >10000 (avril-novembre) : elles indiquent la présence d'hétérotrophes et confirment que le matériel présent dans la Garonne et la Dordogne estuariennes est fortement dégradé.

Le rapport chl/COP indique s'il y a une concentration élevée en phytoplancton. La valeur moyenne est de 1.10^{-4} ; cela indique une présence faible de phytoplancton.

Sources de matière organique dans l'estuaire fluvial

Il est important de déterminer les sources de matière organique dans la partie fluviale de l'estuaire : continentale, marine, autochtone ou autre.

Dans la Garonne estuarienne (Dordogne estuarienne en cours d'analyse), quatre sources de matière organique ont été identifiées par **isotopie** dans les MES : le bouchon vaseux (BV), la matière organique particulaire (MOP) terrestre, la MOP anthropique, le phytoplancton.

La MOP de la Garonne estuarienne est constituée à 69% de MOP du BV, 20% de MOP anthropique, 10% de matériel terrestre et 1% de phytoplancton. A titre de comparaison, les travaux de Savoye et al. (2012) ont caractérisé ainsi la composition de la matière organique de la Gironde : 96,4% de MOP du BV, 1,6% de matériel terrestre, 0,8% de phytoplancton estuarien, 0,1% de phytoplancton fluvial et 1,1% de phytoplancton marin.

Une **analyse lipidique** a également été réalisée sur les matières en suspension. En effet, les métazoaires sont dépendants des acides gras polyinsaturés (AGPI) fournis par leur alimentation. Les copépodes synthétisent et transforment mal les acides gras ; leur composition est majoritairement déterminée par les composés qu'ils ingèrent.

Etant donné la faible concentration en matière organique contenue dans les MES, seulement trois mois (avril, mai et juin) ont pu être exploités. Ils correspondent néanmoins à la période de production des espèces planctoniques.

Les acides gras du pool nutritif sont variables dans le temps, mais moins dans l'espace dans la Garonne et la Dordogne estuariennes.

Les AGPI représentent 25 ± 2 % (avril), 37 ± 5 % (mai) et 50 ± 4 % (juin) des acides gras totaux. Ils sont composés du 18:2(n-6), 18:3(n-3), 20:3(n-3), 20:5(n-3) et 22:2(n-6), qui caractérisent le phytoplancton (la détermination du phytoplancton n'a pas été réalisée). Du fait de la faible présence des AGPI à 16 atomes de carbone et d'AGPI insaturés à 4,5 et 6, on peut conclure que les deux fleuves sont pauvres en diatomées.

Les acides gras ramifiés (AGR) représentent 51 ± 3 % (avril), $48 \pm 3\%$ (mai) et $36 \pm 5\%$ (juin) des acides gras totaux. Ils sont composés du 15:0, 16:0, 17:0, 16:1(n-7), qui caractérisent les bactéries hétérotrophes. La présence de 18:2(n-6) et 18:3(n-3) est une signature de la MOP détritique.

Comparaison entre estuaires

La présence de certains composés tels que le 18:2(n-6) et le 18:3(n-3) témoigne d'une signature détritique de la MOP. La concentration de ces deux composés permet de décrire la Dordogne estuarienne comme plus détritique. La Dordogne estuarienne est plus concentrée en AGR que la Garonne estuarienne.

Les mêmes classes d'acides gras sont retrouvées, avec des concentrations plus élevées pour les AGPI, dans la Loire et la Seine. En revanche, une différence notable concerne les acides

gras essentiels présents et plus concentrés dans les deux autres estuaires fluviaux, notamment ceux des diatomées C16:2, C16:3 et C20:5w3 : 6-10 % des AGT dans la Seine, 14,9 % dans la Loire, 2 % dans la Gironde.

La partie fluviale de l'estuaire de la Gironde est donc nutritionnellement très pauvre.

3-3. Communautés benthiques : la méiofaune

L'identification de la méiofaune a permis de mettre en évidence une richesse taxonomique similaire dans la Garonne et la Dordogne estuariennes. **Neuf groupes taxonomiques ont été identifiés** : Nématodes (contribuant à 80% de l'abondance totale), Copépodes, Foraminifères, Rotifères, Cladocères, Tardigrades, Insectes, Gastéropodes et Annélides Oligochètes.

La variabilité spatiale est marquée. Quelle que soit la période de l'année, les abondances sont plus élevées dans la Garonne estuarienne que dans la Dordogne estuarienne, avec des moyennes respectives de 1371 ± 193 ind.10 cm⁻² et 347 ± 86 ind.10 cm⁻² (Figure 5). **Les stations de Bacalan (G2) et de Bordeaux (G3) se démarquent** par une dynamique différente et des abondances plus élevées que dans les autres stations (Dordogne comprise) (Figure 6). Les analyses en composantes principales et les régressions à posteriori ont montré que les stations de Bordeaux et Bacalan sont caractérisées par un fort pourcentage en carbone organique particulaire et une concentration en phéophytine *a* élevés dans le sédiment.

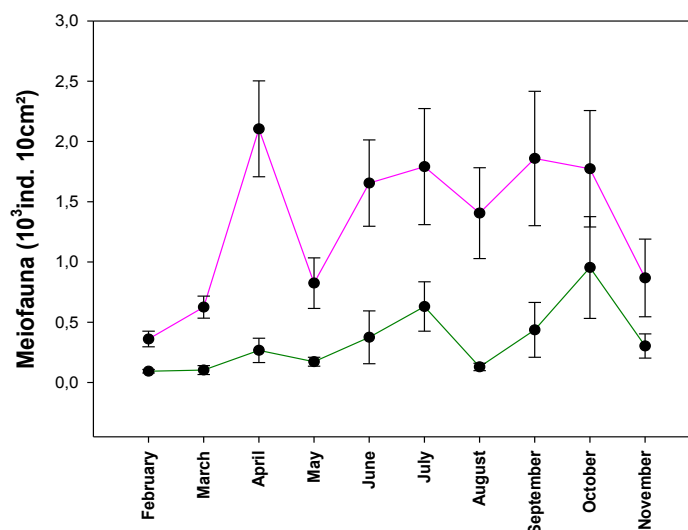


Figure 5 : Variation annuelle de la densité totale de la méiofaune (moyennes ± ES) dans la Garonne (en rose) et la Dordogne (en vert) estuariennes.

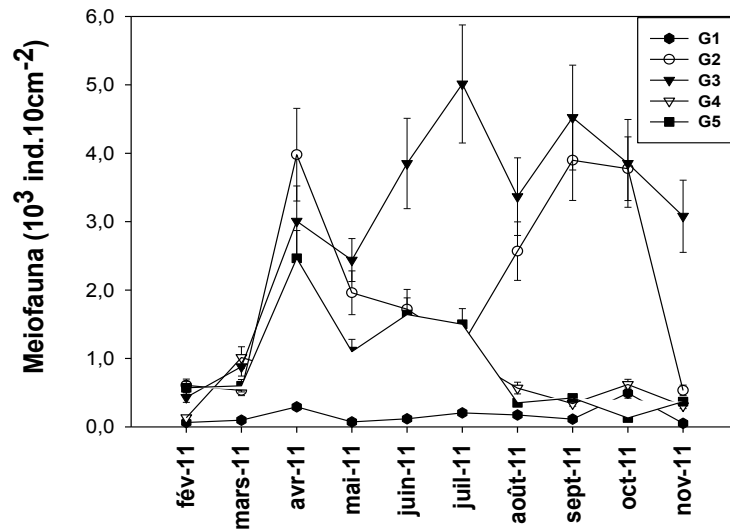


Figure 6 : Evolution spatio-temporelle de la densité totale de la méiofaune (moyennes \pm ES) par station dans la Garonne estuarienne (G1 : Ambès, G2 : Bacalan, G3 : Bordeaux, G4 : Bègles, G5 : Langoiran).

Hormis le mois de juin, les densités de méiofaune sont plus élevées au sein de la zone intertidale que dans la zone subtidale (Figure 6). Les variations de densités des nématodes permettent de différencier les deux zones. Les teneurs plus élevées en carbone organique et des concentrations également plus élevées en phéophytine *a* et *c* sont les facteurs responsables de cette différenciation entre les domaines subtidal et intertidal.

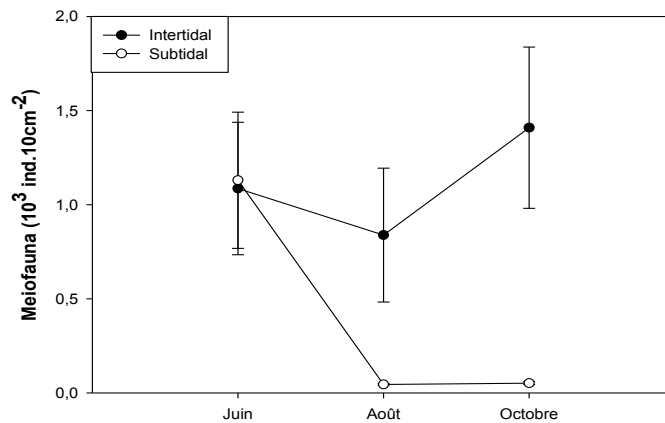


Figure 6 : Variation annuelle de la densité totale de la méiofaune (moyennes \pm ES) dans les zones subtidale (blanc) et intertidale (noir).

3-4. Communautés benthiques : la macrofaune

La macrofaune est constituée uniquement d'Annélides Oligochètes (espèces en cours de détermination). La variabilité spatiale est également marquée, avec des abondances moyennes (sur les 3 dates d'échantillonnage) de $27380 \pm 6154 \text{ ind.m}^{-2}$ et $9614 \pm 2014 \text{ ind.m}^{-2}$ respectivement dans la Garonne et la Dordogne estuariennes (Figure 7). **Les stations de Bacalan (G2) et de Bordeaux (G3) se démarquent** une nouvelle fois par une dynamique différente (station de Bacalan) et des abondances plus élevées que dans les autres stations (Dordogne comprise) (Figure 8). **Aucun organisme macrofaunique n'a été retrouvé dans la zone subtidale des deux estuaires fluviaux, quelle que soit la station.**

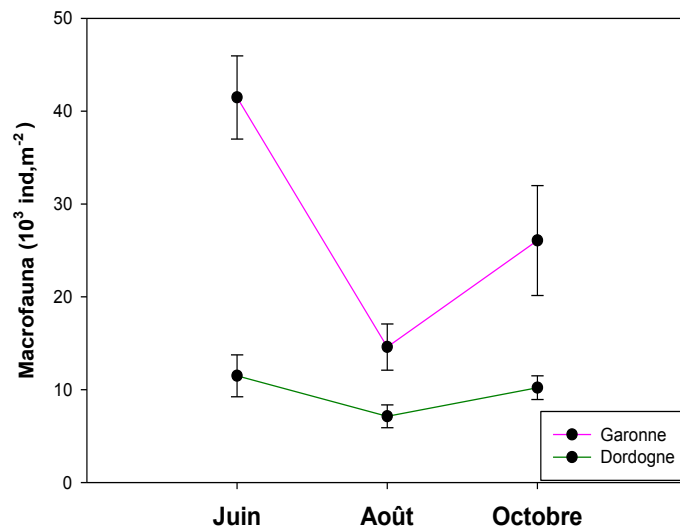


Figure 7 : Variation annuelle de la densité totale de la macrofaune (moyennes \pm ES) dans la Garonne (en rose) et la Dordogne (en vert) estuariennes.

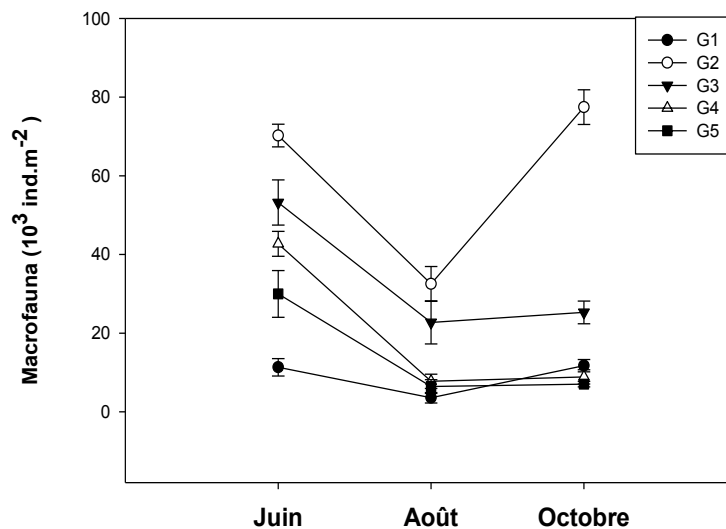


Figure 8 : Evolution spatio-temporelle de la densité totale de la macrofaune (moyennes \pm ES) par station dans la Garonne estuarienne (G1 : Ambès, G2 : Bacalan, G3 : Bordeaux, G4 : Bègles, G5 : Langoiran).

3-5. Communautés planctoniques : le phytoplancton

Le phytoplancton a été déterminé à partir de la biomasse chlorophyllienne (*a*, *b* et *c*) et de l'analyse des acides gras.

La partie fluviale de l'estuaire de la Gironde est un environnement de très faible production primaire. Les chlorophylles sont dominées par la chlorophylle *a*, mais le fait marquant se situe au niveau des concentrations en phéopigments, qui sont plus élevées que celles de la chlorophylle dans les deux fleuves, ce qui indique une très forte dégradation du matériel chlorophyllien. L'analyse des acides gras dans la matière organique particulaire en suspension a permis de confirmer la quasi absence de phytoplancton, notamment de diatomées traditionnellement caractérisées par les acides gras à 16 atomes de carbone (voir plus haut). En revanche, on retrouve énormément de débris de végétaux, comme en témoignent les fortes concentrations des différents phéopigments (cf. Tableau 4).

3-6. Communautés planctoniques : le zooplancton

L'échantillonnage du plancton au sein de la Garonne et de la Dordogne estuariennes a permis de recenser des espèces communes aux deux masses d'eau :

- 2 espèces de Décapodes : *Palaemon longirostris* et *Crangon crangon*,
- 2 espèces de Mysidacés : *Mesopodopsis slabberi* et *Neomysis integer*,
- 2 genres de Rotifères : *Lecane* et *Testudinella*,
- 1 espèce de Copépode : *Eurytemora affinis*,
- 1 espèce d'Amphipode : *Gammarus zaddachi*

Une autre espèce d'Amphipode (*Gammarus insensibilis*) et une espèce de méduse (*Craspedacusta sowerbii*) n'ont été échantillonnées que dans la Dordogne estuarienne.

Eurytemora affinis est le copépode dominant (> 98%) dans cette partie de l'estuaire. Il est essentiellement présent en période de production (mars-mai) (Figures 9 et 10).

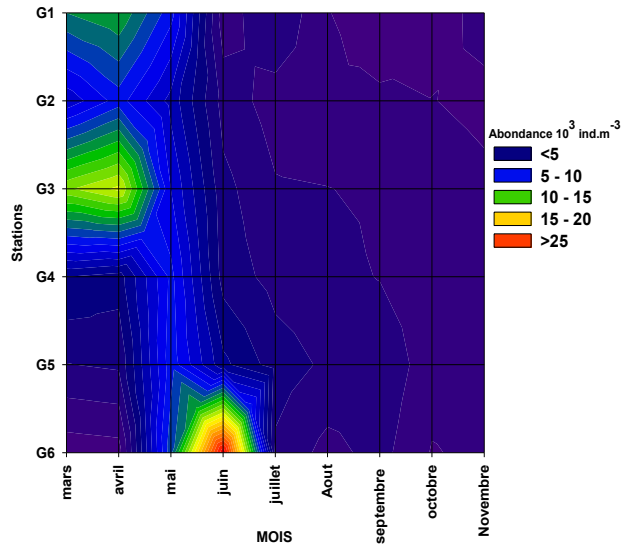


Figure 9 : Evolution spatio-temporelle de la densité d'*Eurytemora affinis* dans la Garonne estuarienne.

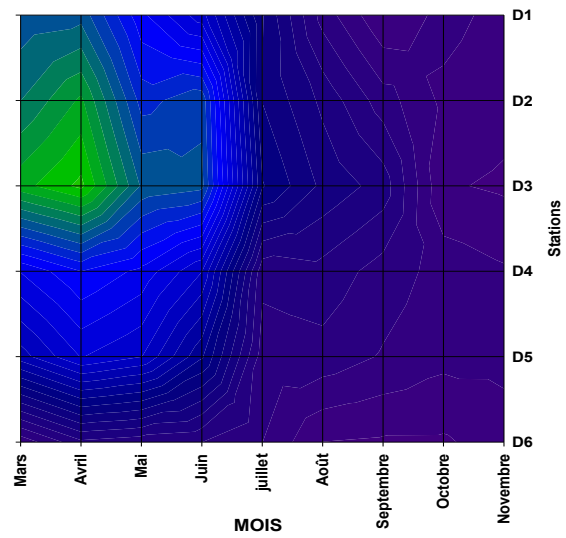


Figure 10 : Evolution spatio-temporelle de la densité d'*Eurytemora affinis* dans la Dordogne estuarienne.

Les densités d'*E. affinis* sont relativement équivalentes entre la Garonne et la Dordogne estuariennes. En revanche, la dynamique n'est pas la même avec une remontée et des densités importantes en amont dans la Garonne estuarienne au mois de juin au niveau de la station G5 (Langoiran) ; cette remontée en amont n'est pas observée en Dordogne estuarienne.

Avis scientifiques et préconisations

L'échantillonnage ainsi que les analyses sur *Eurytemora affinis* seront poursuivis durant l'été 2012 pour les stations en lien direct avec les rejets de la CUB. En comparaison avec des zones estuariennes similaires, les richesses spécifiques et taxonomiques des compartiments benthiques et pélagiques sont relativement équivalentes. Néanmoins, deux observations sont à relever : (1) l'absence totale de macrofaune dans la zone subtidale et (2) les fortes abondances de la méio- et de la macrofaune au sein des stations intertidales de Bordeaux et de Bacalan en lien avec des valeurs élevées en COP. L'année à venir sera également consacrée à l'étude d'un critère fonctionnel de qualité environnementale de l'espèce dominante (*Eurytemora affinis*), à savoir la production zooplanctonique (efficacité de développement).

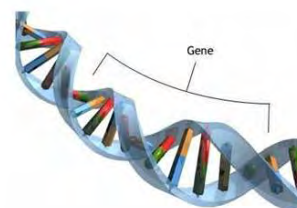
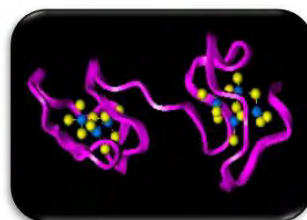
Références

- Beaugrand G.** (2009) Decadal changes in climate and ecosystems in the North Atlantic Ocean and adjacent seas. *Deep-Sea Research II* 56:656-673
- David V., Sautour B., Chardy P., Leconte M.** (2005) Long-term changes of the zooplankton variability in a turbid environment: The Gironde estuary (France). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 64:171-184
- Omori M., Ikeda T.** (1984) *Methods in Marine Zooplankton Ecology*. John Wiley, New York, 332 p.
- Quintin J.Y., Etcheber H., Sottolichio A., Oggian G., Derriennic H., Mallet C., Roux Ducept A., Sautour B., Parra R., Bachelet G., Leconte M.** (2011) Surveillance écologique du site du Blayais, année 2011. *Rapp. IFREMER RST DYNECO/AG/12-02*
- Sautour B., Castel J.** (1995) Comparative spring distribution of zooplankton in three macrotidal European estuaries. *Hydrobiologia* 311:139-151

Annexe 8

*Impact des conditions environnementales de l'estuaire de la Gironde
chez le copépode *Eurytemora affinis**

Rapport de stage de master 2 FDEA
Deroubaix Alexandre



UMR CNRS 5805 EPOC – OASU
Station Marine d'Arcachon
Université Bordeaux 1
Place du Docteur Bertrand Peyneau
33120 ARCACHON CEDEX
FRANCE

Maîtres de stage :

Prof. Baudrimont Magalie
Prof. Sautour Benoit
CR CNRS Gonzalez Patrice
Doctorant Dindinaud François

Remerciements

Je commencerais par remercier Frédéric Garabetian, pour son accueil au sein de la station marine et donc sans qui rien n'aurait été possible.

Je voudrais remercier Benoît Sautour pour m'avoir proposé ce sujet de stage.

Je tiens à remercier Magalie Baudrimont pour ces conseils, son aide et sa bienveillance concernant la mise en place des protocoles.

Je remercie Patrice Gonzalez, grand sachem de la biomol, pour m'avoir formé aux techniques ancestrales de la manipulation de l'ADN, pour sa bonne humeur quotidienne, pour son aide, ses conseils, ses critiques (positives !) et sa disponibilité.

Un grand merci à François Dindinaud, pour ses recommandations, ses suggestions, ses ordres ! pour la rédaction de ce mémoire.

Merci aussi à Cerise Daffe pour avoir complété ma formation en biomol et en biochimie.

J'en profite pour remercier toutes les personnes qui ont participé à égayer ce stage :

Emilie (avec les aventures de ces filles), Aurélie (mais d'où vient ton surnom Oupette-Nenette ?), Ludo(avec les aventures de sa crevette), Matthieu (un vrai morceau de pays basque), Chris (l'Insulaire, celui qui m'a formé à l'AMA), Kéké (le phénomène), Clem (Pipoman et Mr Biomol), Jenn (Miss Gammare et la maman de DA, DAA et DAAA (les trois poissons dans le labo 3)), Jadou (Miss Jeannot le P...nan je ne le dirai pas, celle qui m'a formé au Four (même si je ne l'ai pas utilisé), Terrine (Miss ICP, la fille qui prenait ma blouse pour un bavoir), Perrine et Sophie (Misses SSCHEEBAM, les premières victimes de mes chansons virales), Nico (le recordman des extraction sponsorisé par Coca-cola) et Elvire (La fille qui me prends pour Master-Chef).

Mais aussi Michel, Céline, Wioletta, Florence, Christelle et Canaille (le Chat) pour leurs gentilleses et leurs sourires.

Merci à tous ceux que j'oublie (ça doit en faire un paquet entre les 2 bâtiments de la station !), que j'ai croisé et qui m'ont aidé dans ces 6 mois (c'est trop court !!!) de stage.

Alex

Définitions

Bioaccumulation : Accumulation progressive d'un contaminant ou d'une substance toxique dans un organisme, provenant de diverses sources, y compris l'atmosphère, l'eau et les aliments.

Cadmium (Cd) : Élément naturel de numéro atomique $Z = 48$, présent dans certains minerais sous forme d'impuretés. Il fut utilisé pour ses caractéristiques physico-chimiques notamment dans les batteries pour la protection de l'acier contre la corrosion (cadmiage) et comme stabilisant pour les plastiques et les pigments. C'est un métal argenté qui se ternit à l'air. Il est soluble dans les acides mais pas en milieu alcalin. C'est le 65^{ème} élément naturel le plus abondant de la croûte terrestre. On le trouve dans les piles, soudures, accumulateurs, pigments de peinture, produits pour la photogravure, les engrais et les pesticides. L'intoxication au cadmium se manifeste par des vertiges, de l'anémie, des douleurs osseuses, et des lésions aux reins.

Ecotone : territoire qui marque la frontière entre deux écosystèmes. Cette zone de transition est colonisée de ce fait par des organismes appartenant aux communautés voisines et par un certain nombre d'espèces ubiquistes.

Etiage : Niveau moyen le plus bas d'un cours d'eau, parfois marqué par un zéro pour mesurer la hauteur des eaux au-dessus de ce point au moyen de chiffres inscrits sur une échelle.

Abaissement exceptionnel du débit d'un cours d'eau. (Le terme de « basses eaux » désigne un abaissement plus normal et plus fréquent.)

Euryhalin : Se dit d'un organisme aquatique capable de supporter de grandes variations de salinité (s'oppose à sténohalin) de l'eau environnante. La racine grecque *eury* signifie large.

Eurytherme : se dit des organismes dont la température du milieu, et qui s'adaptent par conséquent aux importantes variations de celle-ci.

Marée dynamique : La pénétration de l'eau de mer pendant le flot refoule l'eau douce vers l'amont jusqu'au point à partir duquel on retrouve un courant fluvial dirigé vers l'aval. C'est ce que l'on appelle la marée dynamique ; dont l'ampleur dépend du marnage, de la pente du lit

submergé, de la largeur et de la profondeur de l'estuaire, du débit fluvial. Elle n'a donc pas la même importance en vives-eaux et en mortes-eaux, en étiage, en eaux moyennes et en crues.

Métallothionéines : Protéines de faible poids moléculaire intervenant dans les phénomènes de détoxification cellulaire, résistance au stress et biodisponibilité cellulaire en métaux essentiels.

Zone oligo-haline : La zone oligohaline d'un fleuve est la zone où la salinité est comprise entre 0,5 ‰ et 3-5 ‰.

Abréviations

ACP : Analyse en Composantes Principales

Bioacc : Bioaccumulation

Cd - Cd²⁺ : cadmium

E.affinis : *Eurytemora affinis*

ETIAGE : **ET**ude **I**ntégrée de l'effet des **A**pports amont et locaux sur le fonctionnement de la **G**aronne **E**stuarienne

Irstea : Institut national de recherche en sciences et technologies pour l'environnement et l'agriculture

MES : matières en suspension

Mts : Métallothionéines

O : Oxygène dissous

RNO : Réseau National d'Observation

S : salinité

T : Température

UMR : Unité Mixte de Recherche

1. Introduction	1
2. Matériels et méthodes.....	3
2.1. Zone géographique : l'estuaire de la Gironde	3
2.2 Zone d'échantillonnage : la zone oligohaline	3
2.3 Modèle biologique	4
2.4 Stratégies d'échantillonnages	4
2.5 Prélèvements du zooplancton (<i>E.affinis</i>) pour le dosage des métallothionéines, des métaux et des analyses génétiques:	5
2.6. Dosage des métaux dans les organismes : bioaccumulation	6
2.7. Dosage des métallothionéines (MTs)	7
2.7.1. Les métallothionéines.....	7
2.7.2. Le dosage.....	7
2.8. Analyse de l'expression génétique	8
2.8.1. Extraction des ARNs	9
2.8.2. La rétro-transcription.....	9
2.8.3. Le clonage	9
2.8.4. La PCR quantitative relative (light cyclers).....	9
2.9. Traitements statistiques des données.....	10
3. Résultats	10
3.1. Liaison espèces amont-aval	10
3.2. Environnement	11
3.3. Bioaccumulation	11
3.4. Dosage des métallothionéines	13
3.5. Approche statistique globale	14
3.6. Caractérisation et expression génique	15
4. Discussion	17
4.1 Bioaccumulation du Cd.....	17
4.2. Métallothionéines et bioaccumulation	19
4.3. L'expression génique	21
5. Conclusion et perspectives de recherche	22
6. Bibliographie	23

La station marine d'Arcachon



La station marine d'Arcachon a été créée en 1867 par la société scientifique d'Arcachon. Depuis 1948, elle fait partie de l'Université Bordeaux 1 et accueille à l'heure actuelle une composante d'une unité mixte de recherche, UMR 5805 EPOC (Environnements et Paléoenvironnements Océaniques), dirigée par Antoine Grémare.

-L'équipe METHYS dont le thème est « Modélisation Expérimentation Télédétection en Hydrodynamisme Sédimentaire ».

-L'équipe PALEO dont le thème est « la dynamique passée du climat à l'échelle du Quaternaire et du Néogène et à toutes les latitudes par l'analyse des archives naturelles marines et terrestres ».

-L'équipe SEDIMENTOLOGIE dont le thème est « l'enregistrement des processus de dépôts et de construction des corps et des systèmes sédimentaires dans les environnements marins et de transition ».

-L'équipe ECOBIOC dont le thème est l'étude de la « structuration du vivant ainsi qu'à son rôle dans le fonctionnement de ces écosystèmes côtiers ».

-L'équipe Ecotoxicologie Aquatique -EA dont le thème est l'étude de « la compréhension de l'impact de son activité de l'homme, et des produits qu'il rejette, sur le fonctionnement de son environnement ».

-L'équipe TGM "Transferts Géochimiques des Métaux à l'interface continent océan" dont le thème est la compréhension des cycles des ETM (Eléments Traces Métalliques) dans les environnements aquatiques de la surface terrestre.

1. Introduction

Depuis les années 50, l'industrie s'est fortement développée dans le monde et a commencé à amplifier le phénomène naturel de réchauffement global de la planète (Le Treut, 2007 ; Beaugrand and Goberville, 2010). On observe que les zones les plus impactées par ce réchauffement climatique sont celles soumises à une forte pression anthropique telles que les systèmes littoraux (Wilson, 2002).

Donald William Pritchard a écrit : « un estuaire est constitué par une masse d'eau confinée ayant une connexion libre avec la mer ouverte et à l'intérieur duquel l'eau de mer est diluée d'une façon mesurable avec de l'eau douce issue du drainage du bassin versant. »

C'est la définition que donne en 1967, un des plus grands spécialistes en se basant sur des observations scientifiques. Pritchard, (1967), ou encore Perillo, (1995) s'accordent sur le fait que les estuaires sont des zones d'interface entre le continent et l'océan caractérisés par de fortes contraintes physico-chimiques sous l'influence de la marée. D'un point de vue écologique, ces écosystèmes sont classés comme étant les plus productifs du monde car ils sont le siège d'une forte production biologique (Guillaud et Romana, 1984). Mais, ce sont aussi des écotones* très fragiles (Modéran, 2010). Le XXe siècle a apporté de forts besoins commerciaux, maritimes, agricoles et industriels, la majorité de l'urbanisation se fait sur ces zones. Aujourd'hui, selon l'Unesco, les zones littorales couvrent seulement 20% de la surface du globe, mais plus de 50% de la population mondiale y vit. En 2025, ce chiffre atteindra 75%. A cette anthropisation a été associée une augmentation des pollutions atmosphérique, continentales et aquatiques (Beguer, 2009). Les estuaires dont celui de la Gironde font partie de ces zones impactées.

L'estuaire de la Gironde possède une zone de turbidité maximale qui est une barrière biologique (Beck *et al.*, 2001) et également un piège à particules, comme les polluants, et en particulier les éléments traces métalliques (Boutier *et al.*, 1989). Le danger de cette zone résulte dans son hypoxie qui peut exacerber l'action de certains polluants comme le cadmium, le zinc ou le cuivre. On observe surtout cela en période d'étiage* où le niveau de l'eau est au plus bas et les polluants éventuellement rejetés en rivière sont alors concentrés. A côté de ces forçages anthropiques, existent aussi des forçages physico-chimiques liés au changement global tel que les variations de salinité (phénomène de marinisation) et de température (Goberville *et al.*, 2010) .

C'est dans les années 1980 que le Réseau National d'Observation a mis en évidence la contamination polymétallique de l'estuaire de la Gironde. Il a en particulier été montré une pollution par le Cadmium (Cd) de la zone aval par dosage dans les huîtres sauvages (bassin de Marennes Oléron) ainsi qu'à l'embouchure (Boutier, 2000). Depuis 1995, l'estuaire a été classé en catégorie D (interdiction de production et de consommation de coquillages), (Marchand, (2000) ; Lavigne, (2000) ; RNO (2006)). L'origine de cette pollution vient de l'usine vieille montagne dans la région industrielle de Decazeville en Aveyron (activité minière d'extraction de zinc / raffinage de minerais), (Jozereau, 1997 ; Audry *et al.*, 2004, Strady, 2010).

Début 2011, un programme de recherche nommé « **ET**ude **I**ntégrée de l'effet des **A**pports amont et locaux sur le fonctionnement de la **G**aronne **E**stuarienne » (ETIAGE) a été développé afin d'estimer et d'évaluer l'influence et l'impact des conditions environnementales de l'estuaire de la Gironde sur les organismes aquatiques. Ce projet a été mis en œuvre par Mr Etcheber (EPOC) et Mr Gonthier (Irstea), avec 5 axes de recherche, dont l'axe 4 portant sur l'étude des impacts de la Garonne estuarienne sur les cortèges biologiques.

Dans le cas de l'estuaire de la Gironde, les effluents liés aux traitements des eaux urbaines, la salinité, la température et l'impact du bouchon vaseux sont autant de pressions étudiées par le programme du fait de leurs forts impacts sur la qualité biogéochimique des eaux, sur la toxicité du milieu et sur le développement et la survie des populations aquatiques des systèmes fluviaux estuariens.

C'est dans cette optique que s'inscrit mon sujet de stage : il s'agit d'étudier dans différents sites de l'estuaire, l'effet des éléments traces métalliques et des épisodes d'hypoxie sur une espèce clé de cet hydrosystème, le copépode calanoïde *Eurytemora affinis*. Les approches ont consisté en l'analyse de la bioaccumulation, notamment du Cd, dans les organismes, la réponse de protéines de détoxification, les métallothionéines, et l'analyse de l'expression de différents gènes dont la recherche a été nécessaire au préalable, aucun d'entre eux n'étant disponible auparavant dans les bases de données.

Les copépodes représentent le groupe d'organismes pluricellulaires le plus abondant sur terre. Ce sont les plus importants consommateurs primaires de phytoplancton, ils constituent la base des chaînes trophiques pélagiques et détritivores (Cailleaud, 2006). Dans la partie fluviale des estuaires, le copépode *E. affinis* domine fortement la communauté zooplanctonique, pouvant représenter plus de 90% de densité (Tackx *et al.*, 2005).

Dans cet estuaire, l'espèce fait face à des conditions de vie hostiles pour de nombreux organismes (très forte variation de la concentration en matière en suspension (MES), salinité, température etc...), l'obligeant notamment à des adaptations de ses dépenses énergétiques en relation avec les processus métaboliques (augmentation de la température, osmorégulation : Feurtet and Castel, 1988).

Ce genre d'étude n'a jamais été réalisé sur l'organisme *E. affinis* dans la zone oligohaline de l'estuaire de la Gironde. C'est donc avant tout, une première approche pour la plupart des techniques qui ont été employées, notamment biochimiques et génétiques. La question posée *in fine* est de tester l'utilisation potentielle de cet organisme abondant dans l'estuaire comme bioindicateur de la qualité du milieu.

2. Matériels et méthodes

2.1. Zone géographique : l'estuaire de la Gironde

Situé dans le sud ouest de la France, l'estuaire de la Gironde est formé par la confluence des réseaux hydrologique de la Dordogne et de la Garonne qui drainent un bassin versant de 71 000km² (55 000 km² Pour la Garonne et 16 000km² pour la Dordogne), les deux se rejoignant 70 km avant l'embouchure) à Ambès. La marée dynamique* se fait ressentir jusqu'à Casseuil en Garonne et à Castillon la bataille en Dordogne (Pasquaud 2006).

Long de ces 75 km, large de 12 km et couvrant une superficie de 635 km² à marée haute, il est considéré comme étant le plus vaste d'Europe occidentale (Salomon, 2002 ; Pasquaud, 2006). C'est un estuaire macrotidal caractérisé par une forte turbidité (Pasquaud, 2006). Ceci vient du fait que le conflit entre eaux douces et eaux salées provoquent un courant résiduel dirigé vers l'amont qui piège les sédiments en créant un bouchon vaseux. La formation de couches de vases très fluides appelées "crème de vase" naît de la décantation d'une partie de ce bouchon (Sottolichio, 2000).

2.2 Zone d'échantillonnage : la zone oligohaline :

Il s'agit de la zone « frontière » entre l'estuaire et le milieu continental. Les deux fleuves alimentant cet estuaire sont touchés avec des degrés différents par les activités anthropiques. La Garonne est notamment marquée par les apports de l'agglomération bordelaise. C'est un secteur qui n'a que très peu été étudié par le passé. Il s'agit d'un écosystème d'une très faible richesse spécifique (zone paucispécifique) en terme de proies (David, 2001, Pierron, 2002).

Du fait de son passé historique, maritime et touristique, notamment avec la ville de Bordeaux, la Garonne est fortement anthropisée. On y observe des pressions touristiques, avec des pollutions urbaines (CUB) avec son rôle de réservoir du bassin versant, et des pollutions industrielles avec notamment le site de Decazeville.

2.3 Modèle biologique :

L'espèce étudiée est le copépode calanoïde *Eurytemora affinis*. C'est un organisme planctonique eurytherme * et euryhalin*. Dans l'estuaire de la Gironde, il se trouve en particulier dans la zone oligo-mésohaline où il représente plus de 90 % de la population zooplanctonique (Castel veiga, 1990, Rasch *et al.*, 2003, Cailleaud 2006). Au fil des progrès de la biologie moléculaire, on peut classer *E.affinis* dans la branche des Maxillopodes des pancrustacés. (Huys et Boxshall, 1991).

E.affinis est un omnivore opportuniste (David, 2006). Il se nourrit de bactéries, de phytoplancton ainsi que de débris organiques. Son régime alimentaire dépend de la concentration et de la dimension des proies présentes dans le milieu (Cailleaud, 2006). On observe des migrations journalières vers les eaux de surface ou vers le fond (Hough et Naylor, 1992; Morgan *et al.*, 1997, Ueda, 2010). Enfin, il a une reproduction sexuée obligatoire (oviparité) toute l'année (Cailleaud, 2006). Il a surtout un cycle de vie court lui permettant de réagir rapidement aux pollutions des milieux (Souissi, 2005).

2.4 Stratégies d'échantillonnages :

J'ai travaillé sur des échantillons prélevés durant l'année 2011 (avril à novembre) par Sarah Bureau du colombier, Pierre-Yves Gourves et François Dindinaud (UMR EPOC).

Les prélèvements ont eu lieu à 4 stations différentes sur l'estuaire fluvial (Figure 1) Libourne (site de référence Dordogne), Bacalan sur la Garonne, Langoiran (référence amont de la Garonne), et Ambès, (côté Garonne).

La stratégie d'échantillonnage est basée sur les cycles tidaux. Ainsi, plusieurs prélèvements ont été réalisés sur un même site (Bacalan) en fonction du moment de marée : Basse Mer (BM), Pleine-mer (PM). Ceci permet, par la suite, d'étudier les différences entre apports océaniques et apports continentaux sur la qualité du matériel biologique récolté. Les prélèvements ont été réalisés sur une période d'une année (de Mai 2011 à Novembre 2011), à raison d'un prélèvement par mois.

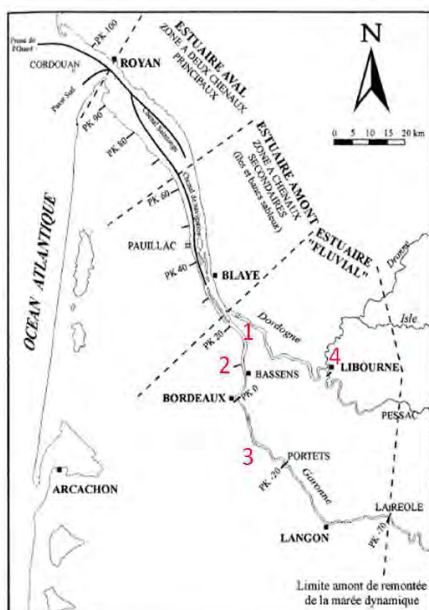


Figure 1 : Carte de l'estuaire de la Gironde et unités morphologiques (source : Port autonome de Bordeaux).

1-Ambès 2-Bacalan 3-Langoiran 4-Libourne

2.5 Prélèvements du zooplancton (*E.affinis*) pour le dosage des métallothionéines, des métaux et des analyses génétiques:

Au préalable, le matériel de conditionnement des échantillons à été décontaminé par des techniques ultrapropres (Bain d'acide pendant 24h, rinçage 3 fois à l'eau miliQ, séchage à l'étuve pendant 12H à 60°C).

- Le premier type de prélèvement nécessite un filet de type WP2 standard sans métaux (de 200 µm de vide de maille, 0.25m² d'ouverture, 2.32 m de long) Immergé pendant 10 minutes dans l'eau, l'échantillon prélevé à été passé dans un premier temps dans un tamis de 500µm afin d'éliminer les débris et les prédateurs de *E.affinis*, puis dans tamis de 200 µm. Les copépodes présents au sein des incubateurs sont récupérés par siphonage.
- Le deuxième type de prélèvement (études génétiques) nécessite du matériel exempt de métaux (filet à plancton, systèmes de filtration filtres, flacons de stockage) et ceci afin d'éviter toute contamination métallique.

Les échantillons de génétique sont conservés dans 400µL de RNA later au minimum afin d'éviter une dégradation de l'ARN, indispensable aux études de biologie moléculaire, dans des eppendorfs préalablement autoclavés. Les échantillons destinés aux dosages des métallothionéines ne doivent pas être remués auquel cas les organismes subissent un trop grand stress et donc une trop forte expression des MTs, ce qui fausse les mesures. Les copépodes sont récupérés et sont mis dans des tubes qui ont été par la suite plongés dans de

l'azote liquide, ce qui permet de figer les échantillons et d'éviter la dégradation des échantillons au contact de l'oxygène de l'air car les MTs sont extrêmement sensibles à l'O₂. Les éppendorfs sont ensuite mis sous poche remplies d'azote gazeux pour une meilleure conservation et placés à -80°C.

En parallèle de chaque échantillonnage, différents paramètres physico- chimiques ont été mesurés à l'aide de sondes (salinité, T°C, Oxygène dissous) et par filtration (Matière En Suspension).

2.6. Dosage des métaux dans les organismes : bioaccumulation

Note : dans toutes les manipulations qui vont suivre, il a fallu adapter les protocoles que l'on pouvait trouver sur d'autres organismes car ceci n'a jamais été tenté auparavant pour E.affinis. Après plusieurs tests, les protocoles définitifs sont proposés en annexes.

L'analyse du cadmium se fait par spectrométrie par torche à plasma ICP-OES 720 Agilent. La méthode consiste à ioniser l'échantillon (10mL prélevés et acidifiés à 2%) en l'injectant dans un plasma d'argon. Les atomes de la matière à analyser sont transformés en ions à une température de 10 000 °C. Pour cela, l'échantillon pénètre dans le plasma sous une forme de nébulisat, et subit les changements d'états suivants : la désolvatation puis la volatilisation, l'atomisation et l'ionisation. L'analyse de la bioaccumulation est réalisée au niveau de l'organisme entier. On utilise entre 200 et 210 mg d'échantillons prélevés (poids frais).

Pour doser la bioaccumulation des métaux, les organismes sont au préalable pesés, puis minéralisés. Pour cela les tissus frais sont séchés 48h à 50°C. Le poids sec est déterminé et 3 échantillons (triplicats) constitué pour chaque prélèvement, qui est ensuite mis en présence d'acide nitrique (HNO₃) à raison d'1 mL pour 1 réplicat et mis à l'étuve 3h à 100°C. Après refroidissement, les minéralisats sont dilués (5fois) avec de l'eau milliQ (eau ultra pure) et dosés.

De plus, la minéralisation et le dosage de 3 blancs (tube rempli uniquement de 1 mL d'HNO₃ et de 5 mL d'eau milliQ) et d'un duplicat de deux échantillons certifiés (Dolt-2 : foie de chien de mer, et Tort-2 : hépatopancréas de homard) sont nécessaires afin, d'une part de permettre de mettre en évidence une contamination éventuelle des tubes ou réactifs, et d'autre part de tester la validité de la technique de minéralisation et celle de dosage.

Afin d'exprimer les résultats en µg de métal/g de tissu frais, la formule suivante est appliquée : $[Métal] = ((M \times Vt) / \text{masse tissu}) \times 10^6$ où M : $[Métal]$ mg/L et Vt : volume du minéralisat.

2.7. Dosage des métallothionéines (MTs)

Note : dans toutes les manipulations qui vont suivre, il a fallu adapter les protocoles que l'on pouvait trouver sur d'autres organismes car ceci n'a jamais été tenté auparavant pour E.affinis. Après plusieurs tests, les protocoles définitifs sont proposés en annexe.

Les échantillons prélevés sur le terrain sont séparés en deux pools : l'une est destinée au dosage des MTs et est donc conservée sous atmosphère d'azote à -80°C, et l'autre destiné aux dosages des métaux. Le reste a été utilisé pour effectuer des analyses génétiques.

2.7.1. Les métallothionéines

Les MTs sont des protéines de faible poids moléculaire (6-7 kD). Elles ont été observées pour la première fois par Margoshes et Vallee en 1957 (Maroni, 1990 ; Kägi, 1991) puis ont été décrites dans de nombreuses espèces animales et végétales (Maroni, 1990 ; Riordan and Vallee, 1991 ; Carpenè, 1993).

Le rôle principal des MTs dans le métabolisme cellulaire est leur participation dans l'homéostasie des métaux essentiels tels que le cuivre ou le zinc (Roesijadi, 1992). Cependant, elles sont aussi impliquées dans la détoxification des métaux toxiques comme le Cd, l'Ag et le Hg du fait de leur capacité à séquestrer ces métaux et ainsi à diminuer leur biodisponibilité pour les autres ligands cellulaires. Vasak *et al* (1991) ont décrit l'affinité propre de métaux pour les MTs ($Hg \gg Cu, Ag, Bi > Cd > Pb > Zn > Co > Fe$). La plupart de ces métaux sont capables d'induire une synthèse de MTs par un système d'activation transcriptionnel, utilisant des éléments et facteurs de régulation, activés par le zinc (Roesijadi, 1992; Roesijadi and Robinson, 1994; Viarengo, 1989). Ces propriétés sont à l'origine de nombreuses études sur l'utilisation des MTs comme biomarqueurs de contamination d'espèces aquatiques par les métaux lourds.

2.7.2. Le dosage

La quantification des métallothionéines se fait par la méthode de saturation par le mercure inorganique froid (Baudrimont *et al.*, 1997) couplée à un dosage du Hg par spectrophotométrie d'adsorption atomique par traitement thermique sous flux d'O₂ (LECO AMA 254, Altec, Prague, République Tchèque, limite de détection = 1ng de Hg). Le principe

est basé sur l'affinité du Hg pour les MTs et sa capacité de déplacement des autres métaux fixés (Cu, Cd, Zn ...). Le dosage passe par 5 grandes étapes :

- 1- Broyage tissulaire sous atmosphère d'azote et sur glace (afin d'éviter l'oxydation des protéines et pour inhiber l'action des protéases) ;
- 2- Saturation en Hg (MTs-Hg + Hg) après centrifugation (élimination des débris cellulaires) ;
- 3- Récupération du Hg en excès par ajout d'hémoglobine (MTs- Hg + Hb-Hg) ;
- 4- Elimination du complexe Hb-Hg par précipitation et centrifugation ;
- 5- Dosage par SAA du surnageant final.

La concentration des MTs est estimée à partir de la quantité de Hg fixée à ces dernières. Elle est donc exprimée en nanomoles de sites de liaison du mercure par gramme de poids frais et non en nombre de moles de MTs par gramme de poids frais étant donné que la quantité exacte de sites de fixation des métaux par molécule n'est pas connue chez les organismes étudiés.

2.8. Analyse de l'expression génétique

Cette analyse permet d'évaluer l'effet des métaux sur l'expression des gènes : induction ou répression. Les gènes étudiés sont ceux impliqués dans les mécanismes mis en place par les organismes en réponse aux contraintes environnementales en fonction de leurs localisation géographiques et notamment en fonction des contaminants accumulés au long de l'année 2011.

Une étape de caractérisation de gènes par clonage et séquençage a été nécessaire. En effet, très peu de séquences étaient disponibles dans les banques de données chez *E.affinis* préalablement à mon stage. Nous avons donc été amenés à rechercher les gènes d'intérêt pour nos approches. Ainsi 14 gènes ont été ciblés au départ : *mt*, *β actine*, *rpl7*, *12S*, *nad5*, *rad 51*, *sod Mn*, *sod Cu*, *Catalase*, *g3pdh*, *Ggadd45*, *Hhsp 70 et 90*, *aco*.

Au vu des résultats des clonages, 6 gènes (avec celui de la β -actine choisi comme gène de référence) sont sélectionnés : *Cat* (Catalase) détoxification du peroxyde d'hydrogène et un effet protecteur contre le stress oxydant ; *RPL6* (code pour la protéine L6 de la sous unité 60S ribosomique) choisi comme deuxième gène de référence; *Hsp70* et *Hsp90* (Heat shock proteins) globalement aide à protéger les cellules contre le stress ; *AcO*. (acetylCoA carboxylase (métabolisme lipidique)).

2.8.1. Extraction des ARNs

L'extraction des ARNs (protocole en annexe 2) se fait à l'aide du Kit Absolutely RNA Miniprep (Agilent) et passe par 3 étapes : 1) le broyage des organes (récupération des contenus cellulaires) et élimination des débris cellulaires, 2) l'élimination des protéines et 3) l'élimination des ADNc (digestion par la DnaseI). Les ARNs étant purifiés, la reverse transcription est faite directement.

2.8.2. La rétro-transcription

La RT (protocole annexe 3) se fait à l'aide du kit « First strand cDNA synthesis » (Agilent). Ainsi une solution contenant 1 µL d'oligo dT (1 µM), 1 µL d'hexanucléotides (1 µM), 0,8 µL d'une solution de dNTP (10 mM), 2 µL de tampon d'activité 10x et 14 µL d'ARNs extraits est réalisée. Le tout est chauffé à 65°C dans un thermocycleur (Eppendorf Mastercycler). En fin de cycle la température diminue jusqu'à 45°C afin de permettre l'hybridation des amorces. Par la suite 1 µL de reverse transcriptase (1U/µL) et 0,5 µL de RNase-block sont ajoutés. La réaction de rétro transcription est effectuée pendant 1h à 42°C dans un thermocycleur. Les ADNc ainsi obtenus peuvent être utilisés lors d'analyses par PCR quantitative.

2.8.3. Le clonage

Après la RT, les ADNc sont utilisés lors de réaction de PCR avec des amorces déterminées à partir de régions conservées mises en évidence lors d'alignement de séquences (clustalW) phylogénétiquement proches trouvées dans les banques de données. Les amplifications obtenues sont ensuite purifiées à l'aide du kit « PCR Purification kit » Cette étape permet d'éliminer les dimères d'amorces qui ont pu se former durant la PCR. Puis une étape de clonage est réalisée à l'aide du plamide pGEMT (voir annexe 4). Par la suite, des bactéries JM109 sont utilisées pour l'étape de transformation bactérienne. (Cf. protocole en annexe 4). Après culture sur boîte, les souches bactériennes résistantes à l'ampicilline sont sélectionnées pour passer par une PCR T7/SP6 puis envoyées au séquençage. Les résultats montreront quels gènes ont été caractérisés.

2.8.4. La PCR quantitative relative (light cycler)

La Q-PCR a été réalisée à l'aide du MX3000P, thermocycleur permettant de suivre en temps réel l'amplification des ADNc grâce à l'ajout d'un agent intercalant fluorescent dans le milieu réactionnel : le SyberGreen. La fluorescence détectée à 530 nm, est

mesurée à la fin de chaque cycle. Ainsi la quantité de fluorescence mesurée permet de déterminer la quantité d'ADNc initial.

Les réactions de PCR sont réalisées dans des microplaques de 96 puits en utilisant le kit « Brilliant III Ultra fast Syber green QPCR mastermix » (Agilent) contenant le tampon 2x (tampon d'activité, *Taq* polymérase, $MgCl_2$, dNTP et le Syber green). Au préalable, un mix amorce pour chaque gène (2 μM d'amorces sens et 2 μM d'amorces antisens) est réalisé. Dans chaque puits sont ajoutés 17 μL de mix réactif 2X dilué, 2 μL du mix amorce et 1 μL d'ADNc. Le protocole de la réaction est le suivant : une étape d'activation de l'enzyme (95°C, 10 min) ; 50 cycles de PCR (95°C, 30s ; 60°C, 30s ; 72°C, 30s). En fin de réaction, la qualité des amplifications observées est analysée par la réalisation de courbes de fusion. Celle-ci est réalisée par une prise de fluorescence en continu lors d'une montée en température progressive de l'appareil de 60°C à 95°C. Le niveau d'expression de chaque gène est déterminé par rapport à celui du gène de référence (β -actine). La différence des moments de sortie (ΔCt) entre le gène de référence et le gène d'intérêt est calculée selon la méthode décrite par Livak *et al.* (2001).

2.9. Traitements statistiques des données

L'ensemble des données ont été traitées avec le logiciel R. Après vérification de la normalité et de l'homoscédasticité des données (test de Shapiro), des tests de Kruskal Wallis et Wilcoxon ont été réalisés afin de comparer les stations entre elles au sein d'un même mois. Deux Analyses en Composantes Principales ont été réalisées. La première, sur une matrice présentant les variables de bioaccumulations et de paramètres physico-chimiques afin d'avoir une première caractérisation de la variabilité du jeu de données et l'autre sur la même matrice en rajoutant la variable métallothionéines. Seules les variables ayant un $\cos^2 > 0,5$ ont été conservées car elles sont considérées comme représentatives lors de l'interprétation de l'analyse. L'analyse du plan de projection des variables de l'ACP a servi pour former des groupements de stations.

3. Résultats

3.1. Liaison espèces amont-aval

Durant le prélèvement, les expérimentateurs ont pu remarquer une migration non cohérente des *E.affinis* de l'aval vers l'amont. Une analyse génomique avec les amorces de qPCR des gènes HSP70 et d'actine (PCRSP6/T7) a été réalisée et prouve que c'est la même espèce de copépode que l'on retrouve en amont et en aval.

3.2. Environnement

Afin d'exploiter les résultats acquis durant le stage (bioaccumulation, dosage des métallothionéines et expression génique), les paramètres physico-chimique pris lors des journées de prélèvement ont été exploités. Ces paramètres ont été directement mesurés par des sondes sur les sites :

Température (°C)	Mai	Juin	Juillet	Août	Septembre	Octobre	Novembre
Ambes PM	18.9	24.7	20.8	22.6	21.9	17.2	14.8
Bacalan PM	20.8	22.1	21.3	24	21.8	18.3	13.7
Bacalan BM	22.7	23.7	20.3	22.8	23.9	16.5	12.7
Langoiran BM	20.9	23.7	20.5	22.5	26	13.3	11.3
Libourne BM	21.4	25.1	21	23.7	23.4	16.5	11.6
Salinité (‰)	Mai	Juin	Juillet	août	septembre	Octobre	Novembre
Ambès	0.03	0.72	1.82	1.17			
Bac Pm		1.0	1.530	1.12	3.41		
Bac bm		0.25	0.35	0.28	1.03		
Lang	0.49	0.82	1.07	0.6	2.23		0.14
Lib		0.58		0.4	2.06		
MES surface (g.l ⁻¹)	Mai	Juin	Juillet	Août	Septembre	Octobre	Novembre
Ambes	1.386	0.4914	1.61	0.903	2.856	3.99375	1.20285714
Bacalan PM	0.76	0.6785	1.1914286	0.9975	4.09428571	0.866	1.34222222
Bacalan BM	2.15	2.0286	2.622	1.93	4.56	2.659375	2.4675
Langoiran	0.39285714	0.6018	3.9833333	0.727	0.432	0.48	0.0502
Libourne	0.26685714	2.108	2.6	1.942	1.47555556	3.37333333	2.3725
O ₂ (mg/L)	Mai	Juin	Juillet	Août	Septembre	Octobre	Novembre
Ambes	5.87	5.35	6.08	5.25			
Bacalan PM		6.08	5.45	5.26	5.36		
Bacalan BM		5.89	5.77	5.19	4.34		
Langoiran	5.08	5.85	5.52	5.47	4.72		7.43
Libourne		5.84		4.39	5.21		

Figure 2 : Paramètres physico-chimique (mesures ponctuelles) des différentes stations en fonction des mois BM = Basse Mer et PM = Pleine Mer. Les blancs signifient qu'il n'y a pas eu de mesures. MES = Matières En Suspension, O = Oxygène.

La température est homogène entre les mois de mai et septembre, elle est située à une moyenne de 22.2 °C. C'est à partir d'octobre qu'elle baisse pour une moyenne de 19.9°C. Pour la salinité, tous mois confondus, on se situe entre 0.03 (mai Ambès) et 3.41‰ (septembre Bacalan PM). En ce qui concerne les MES de surface : elles varient pour un même mois et entre les sites avec une plus forte concentration entre septembre et octobre. Enfin, pour l'oxygène, pour des mesures ponctuelles, on ne note pas de fortes variabilités entre les sites et entre les mois, cependant, des mesures plus précises montrent une différence significative entre deux sites prouvant une réelle hypoxie entre août et septembre 2011. (Annexe 5)

3.3. Bioaccumulation

Comme étant la première étude de terrain sur la zone oligohaline de l'estuaire, l'étude de la bioaccumulation chez *E.affinis* s'est portée sur le polluant majoritairement présent : le cadmium (Cd).

Les résultats des dosages de Cd dans les organismes sont présentés en figure 3. Nous pouvons observer dans un premier un effet de la saison sur la bioaccumulation de ce métal. En

effet, les mois de septembre et d'octobre se distinguent des autres car les concentrations en Cd, toutes stations confondues, sont nettement supérieures à celles des mois de mai à août. Par exemple, la valeur la plus forte est obtenue au mois de septembre à Ambès (13754.6 $\mu\text{g}/\text{Kg},\text{pS}$) alors qu'il ne dépasse pas les 7000 $\mu\text{g}/\text{Kg},\text{pS}$ dans les autres mois.

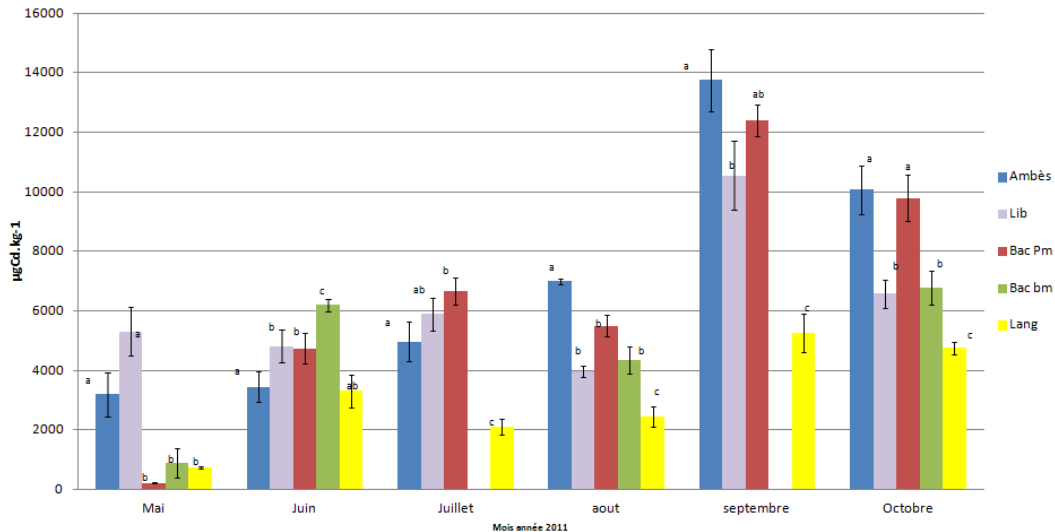


Figure 3 : Bioaccumulation du Cadmium (moyennes +/- erreur standard ; n=3) par sites et en fonction du temps (entre 2 sites dans un même mois, une même lettre signifie pas de différence significative)

Il est aussi observé que Langoiran, site qualifié de « référence » pour la partie Garonne par rapport à l'agglomération Bordelaise présente quasi systématiquement les valeurs les plus basses. Par opposition, Bacalan et Ambès sont les sites les plus contaminés. Un effet site est ainsi clairement observable (les lettres présentes sur les graphes montrent des différences statistiquement significatives entre les sites pour un même mois). En juillet, par exemple, Langoiran est statistiquement différent de Bacalan PM. Enfin, Libourne est un site intermédiaire qui nous permet de montrer que malgré son emplacement sur la Dordogne, a priori hors pollution par le Cd, il accueille quand même des organismes impactés par cette contamination.

La figure 4 représente une ACP faite sur les données des paramètres physico-chimique ainsi que sur la bioaccumulation. Elle permet de relier la bioaccumulation du Cd avec les paramètres environnementaux. Les axes 1/2 expliquent 58% de la variance totale. L'axe 1 (CP1) représente 35% de la variance totale et est principalement expliqué par la salinité et les concentrations des matières en suspension ainsi que par la bioaccumulation. Ces trois variables sont corrélées positivement sur l'axe1. L'axe 2 (CP2) représente 23% de la variance totale et est principalement expliqué par la température et l'oxygène. Ces deux variables sont

anticorrélées sur l'axe2. Nous pouvons voir qu'un groupe bien distinct se détache (cercle rouge) qui correspond au mois de septembre et octobre. Ceci est corrélé avec les résultats en figure 3 qui montrent ces mois comme étant ceux où la bioaccumulation est la plus forte.

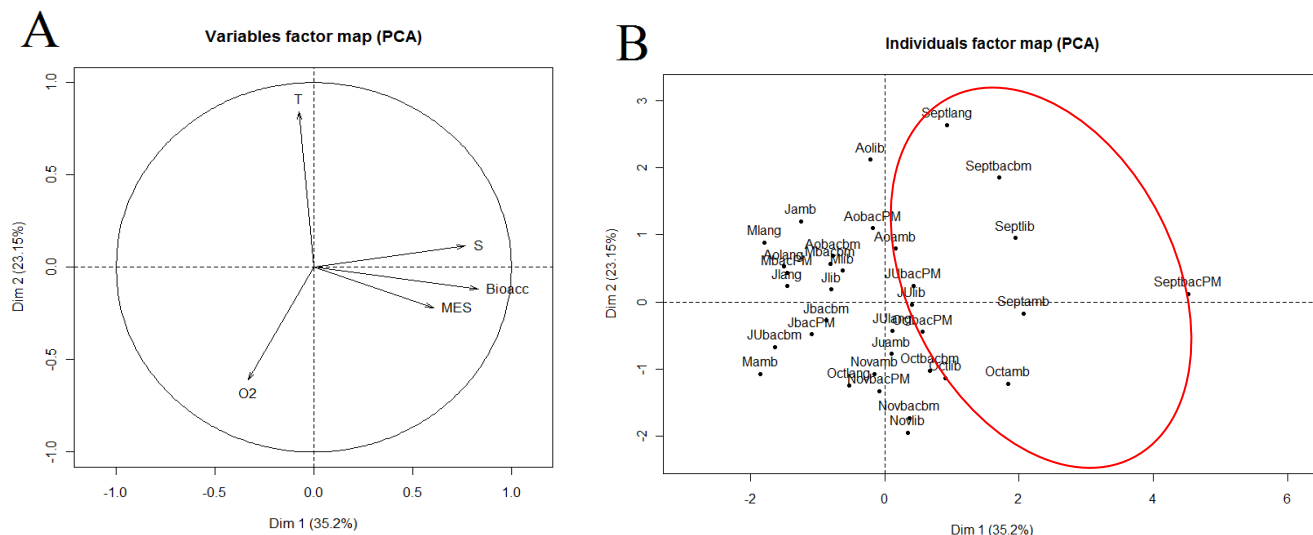


Figure 4 Les variables considérées sont les concentrations en Cadmium (Bioacc), la salinité (S), la température (T), les Matières en Suspensions (MES) et l'Oxygène (O). A= cercle des corrélations, projection des variable, B=projection des individus.

Code pour la projection des individus sur le plan factoriel : la première partie pour définir le mois (M,J,Ju,Ao,Sept, Oct et Nov), la deuxième pour le site (amb : Ambès, lib : Libourne, bac : Bacalan, lang : Langoiran). BM = basse mer et PM pleine mer. Ex : SeptbacPM = septembre Bacalan Pleine Mer.

Les résultats de cette analyse par ACP permettent d'observer une corrélation forte entre bioaccumulation de Cd, salinité du milieu et matières en suspension, qui influent grandement sur la répartition des stations de septembre et d'octobre. En effet, les stations marquées par les bioaccumulations les plus fortes ces mois-là correspondent à Bacalan et Ambès.

3.4. Dosage des métallothionéines

La figure 5 représente le dosage des métallothionéines (qui sera noté MTs dans la suite du mémoire) durant l'année 2011, les valeurs manquantes sont liées à un manque d'échantillons. Il est important de mentionner tout d'abord que c'est la première fois que ce type d'analyse est appliqué aux copépodes *E. affinis*. Nous pouvons dans un premier temps remarquer des réponses différentes en fonction des sites et des mois, avec des concentrations

comprises entre 0,5 et 20 nmol de sites Hg/g, pf, ce qui correspond à des valeurs couramment mesurées chez d'autres organismes aquatiques. En particulier, de fortes concentrations de MTs apparaissent au mois de Juin par rapport au mois de mai, le site de référence passant de 3.04 à 11 nmolHg,pf. Ambès passe le seuil de détection, mais c'est surtout à Bacalan qu'une forte induction de MTs est mesurée (de 4.24 à 20.17 entre mai et juin). Au mois de juillet, nous observons une diminution de l'induction des métallothionéines à Bacalan et Langoiran, mais une induction aux sites Ambès et Libourne. Enfin, un autre pic de production de MTs apparaît au mois d'octobre pour les deux stations échantillonnées.

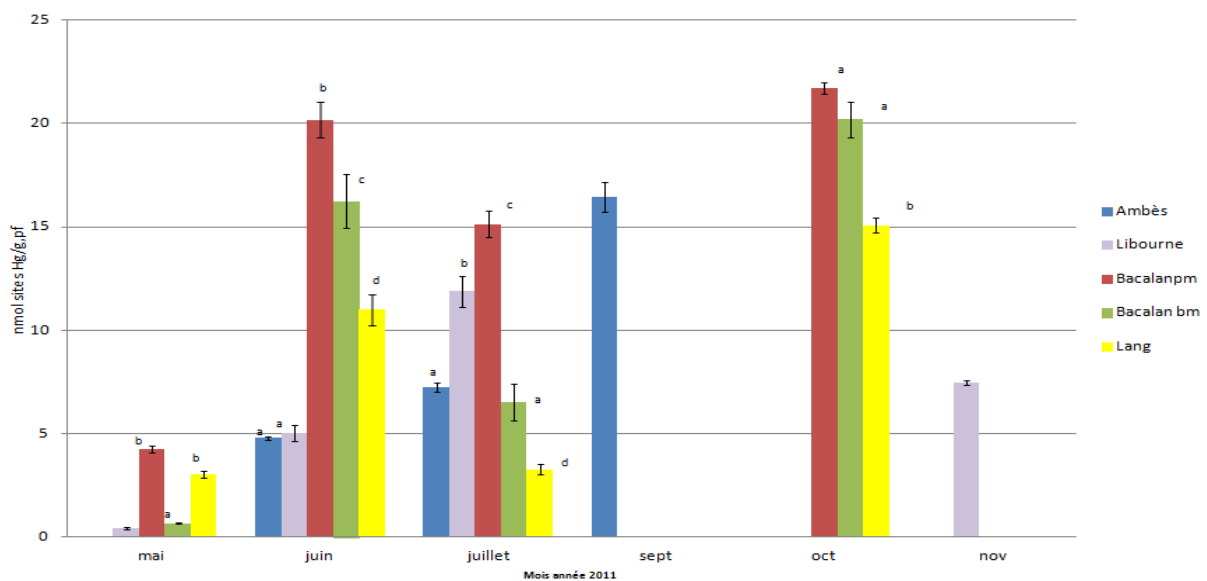


Figure 5 : Evolution des concentrations en MTs (moyennes +/- erreur standard ; n=5) dans le temps et en fonction du site de prélèvement temps (entre 2 sites dans un même mois, une même lettre signifie pas de différence significative).

Les tendances observables sont statistiquement significatives entre les sites au sein d'un même mois et entre mêmes stations le long de l'année.

3.5. Approche statistique globale

La figure 6 représente une ACP réalisée à partir de tous les résultats obtenus. Les variables considérées sont les concentrations en Cadmium (Cd) au niveau des organismes entier, les concentrations en métallothionéines (MTs) et les paramètres physico-chimiques décrits dans la figure 3. Les codes stations sont les mêmes.

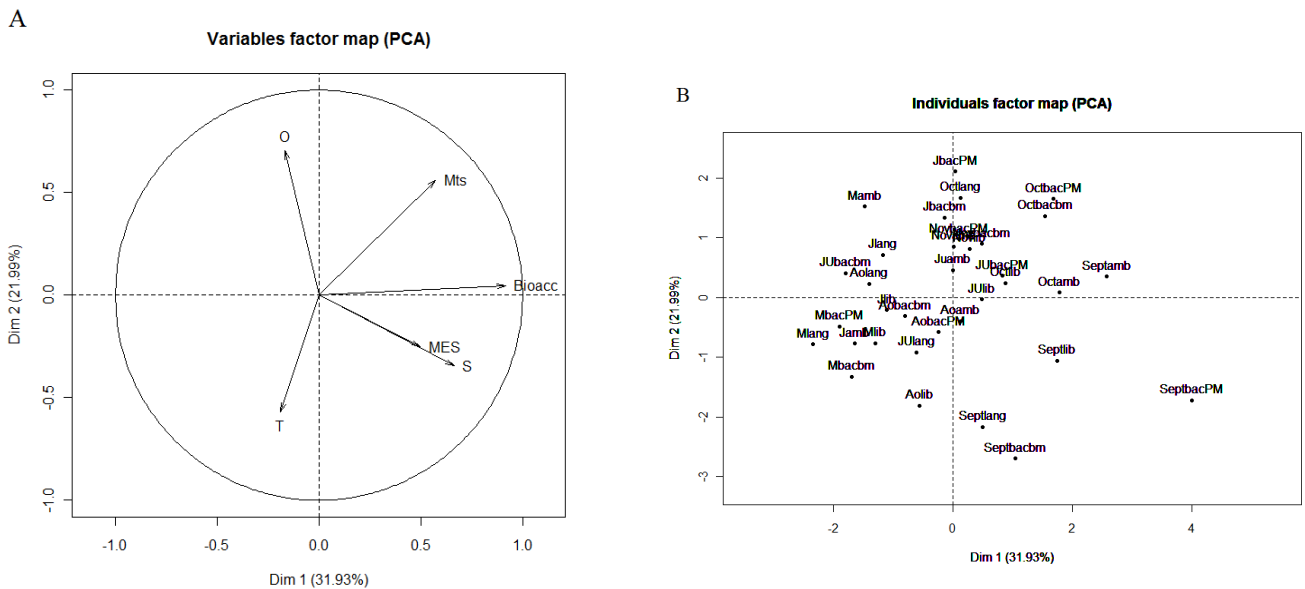


Figure 6 : Figure 4 Les variables considérées sont les concentrations en Cadmium (Bioacc), la salinité (S), la température (T), les Matières en Suspensions (MES) et l'Oxygène (O). A= cercle des corrélations, projection des variable, B=projection des individus

Les axes (CP1) et (CP2) employés expliquent 54% de la variabilité. Nous constatons que les variables bioaccumulation du Cd et MTs sont corrélées entre elles et anticorrélées à la température. Notons également que les MES et la Salinité sont anticorrélées à l'oxygène.

L'étude de la projection des individus (Figure 6 B) permet d'observer une forte variabilité temporelle. En effet, les variables Cd, MTs, MES et S expliquent la répartition des sites des mois de septembre et d'octobre sur la partie droite du graphique. Sur la partie gauche de l'axe 1, ce sont les stations de mai juin et juillet qui sont regroupées, ce qui suggère que la bioaccumulation ne joue pas un grand rôle dans leurs répartitions. Nous constatons de plus que les stations des mois de Mai, août et Septembre sont corrélées avec la salinité et les MES et anticorrélées à l'oxygène. La température a peu d'influence sur la séparation des stations.

3.6. Caractérisation et expression génique

Aucune séquence n'étant disponible dans les banques de données, nous avons caractérisé par clonage et séquençage 6 gènes chez *E. affinis* (figure 6). A partir des séquences obtenues, nous avons déterminé des amorces spécifiques utilisables en PCR quantitative en temps réel. L'analyse de l'expression de ces gènes constitue donc une première pour cette espèce sur des échantillons collectés *in situ*.

Protection stress oxydant	<i>Catalase</i>	GGATGAAATGGCGCACTTTG (s) GTTGCATGGAAATCTGGGAATTGTA (as)
Protection stress général	<i>Heat shock proteins 70</i>	CCGCCGAATGCAATGTTCT (s) CTTGTTACCCTTGATGTCCTTCT (as)
	<i>Heat shock proteins 90</i>	ATCCCCCTGCTGCATTG (s) CAAGATCCTTTACAGACTTGTCGT (as)
Métabolisme lipidique	<i>Acétyl coa carboxylase</i>	ACTCTTGCATCAGGCTGG (s) CCTCTGGAGTTTAGACTGGACAC (as)
Gène de ménage	<i>RPL6</i>	TGCCATTATCCTCGCTGGAA (s) CGGGCAAAGTAGGCGT (as)
Gène de référence	<i>Actine</i>	GCTCTGGACTTTGAGCAGG (s) CGGTGTTAGCGTACAGGT (as)

Figure 7 : Amorces spécifiques déterminées et utilisées lors de l'étude de l'expression génique en qPCR. S=sens et as = anti-sens

Les résultats de la figure 8 montrent les expressions de ces gènes chez *E.affinis*. La caractérisation des gènes ayant demandé beaucoup de temps, les résultats que nous présentons ne concerne qu'un nombre limité de gène. De plus cette approche préliminaire a été dans un premier temps limité à des prélèvements effectués sur simplement 4 sites (Langoiran, Libourne et Bacalan PM et BM). De plus, ces résultats ne concerneront que les mois de mai à juin, une trop faible quantité d'organisme ayant été obtenues en dehors de cette période pour permettre la récolte d'échantillons pour les analyses génétiques.

	Bacalan PM			Bacalan BM			Libourne	
	Mai	Juin	Juillet	Mai	Juin	Juillet	Mai	Juillet
Cat	0.176	0.010	0.221	1.741	0.053	0.004	0.281	0.023
RPL6	0.649	0.633	68.120	0.423	0.460	45.255	0.000	71.012
HSP 70	0.193	1.558	4.257	0.590	0.597	1.879	0.889	0.418
ACO	0.213	0.027	1.165	4.287	0.217	0.044	1.357	0.046
HSP 90	0.373	1.149	2.071	0.590	0.163	0.871	0.379	1.376

Figure 8 : expression relative des gènes étudiés par rapport à l'actine. Les valeurs représente les facteurs d'induction (>1) ou de répression (<1) observés à chaque site et pour chaque mois par rapport au site de référence de Langoiran

Les résultats montrent qu'au mois de mai une répression de l'expression de la quasi-totalité des gènes étudiés au niveau de Bacalan PM et Libourne. A Bacalan PM une induction d'*aco* d'un facteur 4 est observée. Au mois de juin de nombreuses répressions sont encore visibles à bacalan (PM et BM). Enfin, au mois de juillet une nette différence est observée sur les prélèvements de Bacalan. A BM la *cat* et *aco* sont sous-exprimées. Au contraire à PM, même si le gène *cat* reste réprimé, une sur-expression des gènes des deux HSP est mesurée. Au site de Libourne, les gènes restent réprimés. Il faut noter que le gène *rpl6* pris au départ

comme deuxième gène de référence, montre au cours des mois une forte variation de son expression. En conséquence, seul le gène de la β actine a été utilisé pour normaliser les niveaux d'expression des gènes étudiés.

4. Discussion

Les résultats de cette étude, pionnière nous propose différentes voies à exploiter afin de réaliser des études de biomonitoring sur le copépode *Eurytemora affinis*. Ainsi, aucune étude d'écotoxicologie n'a été réalisée sur cet organisme dans la zone oligohaline de l'estuaire de la Gironde, ce qui laisse une certaine liberté d'action dans l'interprétation des résultats.

4.1 Bioaccumulation du Cd

La bioaccumulation a donné des informations sur l'état de contamination par le cadmium du copépode *E.affinis*. Elle représente les conditions du milieu à l'instant de prélèvement des organismes. Les concentrations de métal mesurées dans les organismes entier se situent à une moyenne de $5567 \pm 484 \mu\text{Cd/Kg}$ (poids sec) le long de l'année avec une moyenne de $3994 \pm 410 \mu\text{Cd/Kg}$, pS de Cd entre mai et août et de $8888 \pm 626 \mu\text{Cd/Kg}$, pS entre octobre et novembre. Nous notons donc un effet saison. Ce sont des concentrations de Cd cohérentes avec les données antérieures qui étaient mesurées à $8000 \mu\text{Cd/Kg}$ (pS) dans l'estuaire (Programme Liteau 2002 ; Marie, 2005). Par ailleurs, Marchand et Lavigne (2001) (Figure 9) ont montrés que les copépodes *E.affinis* avaient un niveau de contamination moyen de $3000 \pm 2000 \mu\text{gCd/Kg}$ ps et fluctuaient entre 500 et 10 000 $\mu\text{gCd/KgpS}$.

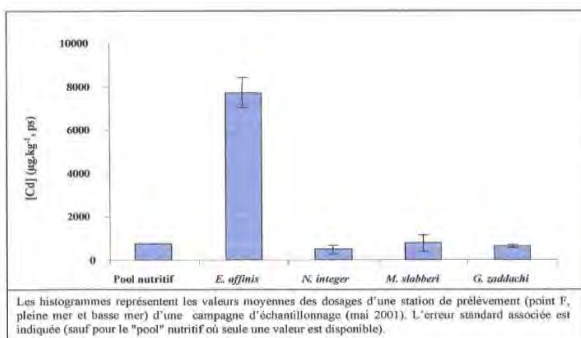
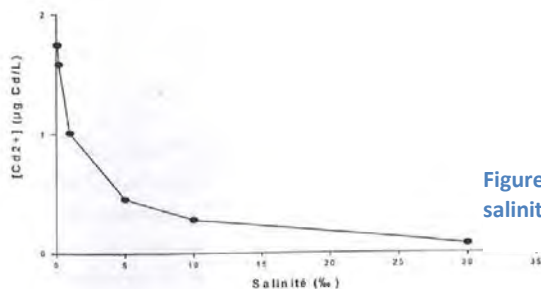


Figure 9 : Illustration de la variabilité inter-spécifique de la contamination par le Cd de la composante zooplanctonique et de la petite faune vagile de l'estuaire de la Gironde (A.Lavigne, 2001)

Le facteur « saison » exerce un effet significatif sur la contamination de ce copépode. En effet, c'est à partir du mois de septembre que les concentrations de Cd dans les organismes augmentent brutalement. Ceci s'explique car on est dans la période d'étiage de l'estuaire. Les débits sont faibles et la concentration en MES sont relativement élevées (Lapaquellerie, Maillet, Jouanneau, Coakley and Latouche, 1996). Les organismes peuvent également, à cette période, se retrouver dans des zones plus hypoxiques. Pour s'adapter, ils augmentent

leur ventilation (Le Moullac, 2008, Legeay *et al.*, 2005, Pierron *et al.*, 2007), de ce fait, les barrières naturelles contre les polluants sont plus en contact avec les xénobiotiques, et donc les copépodes bioaccumulent plus. Ces résultats sont en accord avec ceux observés chez d'autres organismes comme, par exemple, l'anguille pour laquelle une augmentation de la bioaccumulation du Cd est observée en condition hypoxique (Pierron *et al.*, 2007)

D'après le cercle des corrélations, la salinité et les MES sont deux variables associées à la bioaccumulation du Cd et interviennent dans la spéciation chimique de ce métal. La biodisponibilité des métaux en solution dépend de la forme chimique sous laquelle le métal se trouve. Dans la colonne d'eau, on trouve différentes formes de métaux : sous forme particulaire ou sous forme dissoute. Ce sont les formes dissoutes les plus biodisponibles pour les organismes aquatiques et sont responsables de la bioaccumulation des métaux dans les organismes. Selon le modèle de l'ion libre de Morel (1983) le Cd^{2+} est la forme la plus biodisponible. Plus la salinité augmente, moins le Cd^{2+} devient biodisponible, car il se fixe aux ions chlorure (Cl^-). (Figure 10).



Dans un environnement dépourvu de salinité, le Cd est fixé au MES. On assiste à un enrichissement en Cd de la phase dissoute quand la salinité augmente avec appauvrissement de la phase particulaire, par désorption de ce dernier des particules en raison de la présence des ions Cl^- (Gonzalez *et al.*, 2004). Le Cd fixé aux particules (MES) se désorbe totalement à une salinité proche de 15‰ (Kraepiel et al, 1997 ; Marchand 2001). En septembre, la salinité est de 3.41‰ à Bacalan Pleine Mer, le Cd est majoritairement sous forme dissoute Cd^{2+} et donc les organismes le bioaccumulent plus (Wildgust et al 1998, Lavigne, 2001). L'hypoxie au niveau de cette zone mesurée fin août/début septembre exacerbe encore plus cette bioaccumulation. Nous sommes clairement dans un cas de contamination par voie directe comme la majorité des espèces planctoniques de l'estuaire de la Gironde (Lavigne, 2001). Cependant, il y a différentes théories sur la voie majoritaire de contamination dans la littérature ; ainsi, Connell et Sanders (1999) prônent que la voie trophique (ingestion d'algues phytoplanktoniques contaminées par le Cd) serait majoritaire chez *E.affinis*. C'est une voie

que l'on ne doit pas négliger comme le précise Fisher et Hook (2002) : les métaux accumulés dans les tissus internes par voie trophique juste au dessus du bruit de fond peuvent avoir de grave conséquence (diminution de la reproduction d'environ 75%).

Néanmoins, dans notre cas, nous sommes dans une zone hypoxique, l'individu doit avant tout adapter son métabolisme respiratoire, c'est pourquoi la théorie de Wilgust et Jones sur la voie directe majoritaire semble être la plus appropriée.

Nous observons également un effet site sur tous les mois, avec Bacalan et Ambès comme les plus contaminés. Bacalan se situe à proximité de l'agglomération bordelaise, et reçoit la majorité des rejets issus de cette agglomération.

Ambès reçoit les eaux de la Garonne et de la Dordogne, on est à la confluence des réseaux hydrographiques de deux bassins versants, de deux fleuves, dont l'un est très pollué historiquement. Il semble donc normal qu'il y ait une bioaccumulation un peu plus faible à ce niveau, du fait de l'effet de dilution des eaux, pour les mois de juin et de juillet. A partir du mois d'août, Ambès a une bioaccumulation plus forte, car il reçoit les apports de Bordeaux, et une salinité qui est augmentée (site plus proche de l'embouchure), ce qui rend les Cd plus biodisponible pour les organismes (Marchand, 2001). Libourne a une bioaccumulation intermédiaire quelque soit le mois, nous pouvons émettre l'hypothèse que ce site reçoit des eaux contaminées provenant d'Ambès lors de la montée des eaux.

4.2. Méthallothionéines et bioaccumulation

La réponse des méthallothionéines donnée dans la figure montre 2 périodes d'induction majeures : une au mois de juin et une au mois d'octobre pour les sites Bacalan BM et PM et Langoiran (site de référence Garonne). Le rôle principal des MTs dans le métabolisme cellulaire est leur participation dans l'homéostasie des métaux essentiels tels que le cuivre ou le zinc (Roesijadi, 1992). Cependant, elles possèdent la capacité à séquestrer les métaux toxiques et ainsi à diminuer leur biodisponibilité pour les autres ligands cellulaires. Vasak et al (1991). Le Cd est capable d'induire une synthèse de MTs par un système d'activation transcriptionnelle, utilisant des éléments et facteurs de régulation activés par le zinc (Roesijadi, 1992; Roesijadi and Robinson, 1994; Viarengo, 1989). La réponse des MTs est ainsi utilisée comme biomarqueur de contamination d'espèces aquatiques par les métaux lourds.

Cependant, les MTs ont une synthèse inductible par d'autres facteurs variés comme les hormones et messagers secondaires, les antibiotiques, les vitamines, les agents cytotoxiques,

toutes sortes de formes de stress, et notamment la reproduction (Baudrimont et al 1997 ; Marie, 2005 ; Baudrimont et de Montaudouin, 2007 ; Meistertzheim 2008).

Ces sont des biomarqueurs d'exposition dont l'utilisation nécessite une parfaite connaissance des variations naturelles. Ces dernières sont fonction de l'âge, du sexe et de la maturité des gonades chez les organismes aquatiques (Chaffai *et al.*,1997). Les MTs augmentent avec la maturation de la surface gonadique chez les femelles. Ce sont des protéines qui passent dans les œufs des organismes car au cours du début du développement embryonnaire, ils sont incapables de synthétiser leurs propres MTs. C'est pourquoi nous observons un pic de MTs juste avant la ponte. La chute de MTs correspond elle à la ponte. (Baudrimont *et al.* , 1997).

Ainsi, si nous observons la bioaccumulation du cadmium, nous remarquons qu'elle est globalement constante entre les mois de mai, juin et juillet (elle ne dépasse pas 7.5 ppm,ps dans les organismes). Ceci est corroboré par l'ACP globale : les mois de mai, juin et juillet sont anticorrélés avec la variable MTs. Or, un pic de MTs est observé en Juin aux sites Bacalan PM, BM et Langoiran. Il y a bien sûr une réponse au Cd mais ce n'est pas le principal inducteur des MTs à cette période. En effet, la reproduction des copépodes se fait en 2 cycles : entre les mois d'avril et juin et entre les mois de septembre et début octobre. De ce fait, l'induction précoce de Mts en Juin correspond sans doute à un stress physiologique de l'animal : la reproduction. Puis au mois de juillet, les MTs redescendent car la phase majeure de reproduction est passée. Nous pouvons remarquer également une différence entre les sites : pour les sites d'Ambès et de Libourne, ce pic est décalé au mois de juillet. Comme aucune donnée sur la reproduction par site et par temps n'a été réalisée durant l'année 2011, on ne peut que constater a priori ce décalage dans la reproduction, ce qui n'est pas dû au Cd comme évoqué précédemment. Nous ne pouvons néanmoins pas écarter l'hypothèse de l'influence d'un autre type de contaminant métallique à cette période, donnée qui sera vérifiée par la suite.

Le deuxième pic de MTs est observé en octobre. La reproduction des copépodes joue un rôle dans cette induction mais c'est surtout la bioaccumulation du Cd qui domine cette induction à cette période.

En effet, nous avons vu que au mois de septembre et d'octobre, une très forte contamination des organismes au cadmium est mesurée. Les MTs sont induites par ce dernier. Les deux histogrammes sont donc très fortement corrélés : nous pouvons avancer qu'au mois d'octobre, le cadmium serait l'inducteur principal de la synthèse des MTs. De plus, nous nous trouvons dans une zone hypoxique, ce qui veut dire une zone de stress énorme, qui peut

également conduire à une production accrue de ces protéines, considérées de plus en plus à l'heure actuelle comme de véritables protéines de stress.

Néanmoins, l'ACP générale réalisée en fonction des paramètres physico-chimiques, montre que la température est anticorrélée aux MTs. Selon les données de la température, une baisse des valeurs est observée entre septembre et octobre, or les MTs sont induites aussi par la température (Serafim, 2002), il serait donc logique d'observer une baisse de leurs concentrations entre septembre et octobre. Cependant, ce n'est qu'une extrapolation car, malheureusement, nous n'avons pas les données du mois de septembre, qui auraient pu nous conforter dans l'idée d'une influence majeure du Cd dans la réponse de ces protéines en fin de période estivale.

4.3. L'expression génique

En ce qui concerne l'expression génique, nous resterons extrêmement prudents quant à l'interprétation des résultats compte tenu du caractère préliminaire de cette étude.

Tout d'abord, nous pouvons remarquer que RPL6 à Bacalan et Libourne est soit réprimé, soit surexprimé, or il s'agit d'un gène de ménage, sensé être stable et choisi au départ comme potentiel gène de référence pour nos analyses. Sa grande variabilité montre que ce gène n'est pas adéquat pour l'étude de l'expression génique, l'actine s'avérant plus stable donc plus appropriée. Ce résultat montre la nécessité en analyse transcriptomique de vérifier le niveau d'expression de plusieurs gènes potentiels de références en fonction des organismes étudiés et des conditions d'analyse (in situ, au laboratoire..). Cette remarque est à rapprocher d'une analyse récente montrant que selon l'espèce il faut être prudent dans le choix du gène de normalisation des résultats de qPCR (Gilsbach et al, 2006).

Nous remarquons d'autre part, entre la pleine mer et la basse mer, une grande différence dans l'expression des HSP. En pleine mer, les gènes sont surexprimés en juillet alors qu'en basse mer ils sont réprimés. Si nous comparons avec les MTs en juillet entre Bacalan PM et BM, nous observons une augmentation de la synthèse de MTs d'un facteur 3 entre BM et PM. Or, d'après la bioaccumulation, entre les mois de juin et août, nous avons vu que la bioaccumulation était quasi constante. Cette induction ne peut donc pas être due au Cd. Les HSPs sont des protéines de chocs thermique, or d'après le tableau des températures, en juillet, nous sommes autour de 20°C dans tous les sites, nous pouvons donc exclure un changement de température brutal dans cette induction de HSPs. De plus, ces protéines servent également de protection contre le stress général d'autres protéines (Schofield 1998), et dans l'estuaire de la Gironde d'autres composés que le Cd existent, tels que d'autres métaux ou des polluants

organiques comme le TBT, les HAP, les pesticides (Clayton 1998) qui peuvent réagir avec elles et les induire. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse d'une induction de ces gènes à partir d'un autre composé polluant en juillet à Bacalan PM. Pour L'acétylCoa carboxylase, nous observons une répression au mois de juin, juillet et une induction en mai. Or Pierron *et al* en 2007 ont démontré que le Cd n'avait aucun effet sur la synthèse d'acides gras, il se peut que d'autres polluants aient modulé l'expression de ce gène.

5. Conclusion et perspectives de recherche

Cette étude sur le copépode *E.affinis* est la première du genre dans la partie oligohaline de l'estuaire. Elle apporte pour la première fois des données de terrain à la fois sur la bioaccumulation du cadmium, la réponse des métallothionéines associée et sur la caractérisation de gènes spécifiques à cette espèce. Malgré son caractère exploratoire, ce travail nous a montré des réponses métallothionéines cohérentes avec le cycle de reproduction d'*E. affinis*, la bioaccumulation du Cd dans les tissus et les périodes d'hypoxie mesurées sur le terrain, entraînant des variations sur la physiologie respiratoire des organismes. Les résultats concernant la génétique sont prometteurs et des approfondissements dans cette voie seront à réaliser à l'avenir.

Notre objectif était de tester la potentialité d'utiliser un organisme abondant de l'estuaire comme bioindicateur potentiel de la qualité du milieu. Nous savons tous que le bioindicateur universel n'existe pas. Cependant, au vu des résultats, *E. affinis* s'en rapproche. En effet, il est présent dans une vaste gamme de milieux, il résiste à la dégradation de son habitat, il répond à des variations physico-chimiques de ce milieu, il est sensible aux conditions anoxiques et présente une répartition spatiale et saisonnière marquée (Souissi, 2002 ; Cailleaud, 2006). De plus, d'après la littérature, il est très utilisé en laboratoire pour l'étude de facteurs physico-chimiques tel que la température ou la salinité (Fisher et Hook, 2002 ; Devreker *et al.*, 2009). Mais avant de pouvoir l'utiliser comme organisme bioindicateur, il est indispensable de poursuivre ce travail sur plusieurs années. Pour les expérimentations futures, il serait nécessaire d'élargir le champ d'investigation en termes de bioaccumulation métallique (la Gironde comprend aussi des pollutions en plomb, cuivre, arsenic et nickel). Ces analyses multiélémentaires seront réalisées prochainement et apporteront des informations complémentaires à nos données. Il serait également intéressant de mesurer, en parallèle, la reproduction d'*E.affinis* le long de l'année car cela interagit avec la réponse des MTs, réaliser des mesures assidues de l'ensemble des paramètres physico-chimiques et développer la partie génétique : caractériser un plus grand nombre de gènes,

avec un plus grand nombre de prélèvements afin d'avoir une analyse beaucoup plus robuste en termes de reproductibilité.

6. Bibliographie

- Audry, Stéphane, Jörg Schäfer, Gérard Blanc, and Jean-Marie Jouanneau.** “Fifty-year Sedimentary Record of Heavy Metal Pollution (Cd, Zn, Cu, Pb) in the Lot River Reservoirs (France).” *Environmental Pollution* 132, 413–426.
- Audry, S., Blanc, G., Schäfer, J.,** 2004. Cadmium transport in the Lot-Garonne river system (France) – temporal variability and a model for flux estimation. *Sci. Total. Environ.* **319**, 197-213.
- Baudrimont, M., Métivaud, J., Maury-Brachet, R., Ribeyre, F. and Boudou, A.,** 1997. Bioaccumulation and metallothionein response in the asiatic clam *Corbicula fluminea* after experimental exposure to cadmium and inorganic mercury. *Environ. Toxicol. Chem.* **16**(10), 2096-2105.
- Baudrimont, M., Andres, S., Durrieu, G., Boudou, A.,** 2003. The key role of metallothioneins in the bivalve *Corbicula fluminea* during the depuration phase after in situ exposure to Cd and Zn. *Aquatic Toxicol.* **63**, 89-102.
- Baudrimont et de Montaudouin,** 2007 Metallothionein gene identification and expression in the cockle (*Cerastoderma edule*) under parasitism (trematodes) and cadmium contaminations
- Beck michael w., kenneth l. heck jr., kenneth w. able, daniel l.childers, david b. eggleson, bronwyn m. gillanders, benjamin halpern,cynthia g. hays, kaho hoshino, thomas j. minello, robert j. orth, peter f.sheridan, and michael p. Weinstein.** The identification, conservation, and management of estuarine and marinenuseries for fish and invertebrates. Source: *BioScience*, 51(8):633-641. 2001.
- Beaugrand, Grégory, and Eric Goberville.** “Conséquences des changements climatiques en milieu océanique.” Edited by Bernard Drobenko and Catherine Wadoux. *VertigO - la revue électronique en sciences de l'environnement*, no. Hors-série 8 (October 22, 2010).
- Beguer,** 2009 réponses d'une population aux forçages environnementaux et anthropiques : le suivi à long terme de la crevette palaemon longirostris de l'estuaire de la gironde (1979-2007).Thèse d'état
- Boutier, Bernard, Jean-François Chiffolleau, Jean-Louis Gonzalez, Pascal Lazure, Dominique Auger, and Isabelle Truquet.** “Influence of the Gironde Estuary Outputs on Cadmium Concentrations in the Waters: Consequences on the Marennes-Oléron Bay (France).” *Oceanologica Acta* 23, 745–757.
- Boutier B., Chiffolleau, J.F., Jouanneau, J.M., Latouche, C., Philipps, I.,** 1989. La contamination de la Gironde par le cadmium (origine, extension, importance). IFREMER (Institut Français pour la Recherche et l'Exploitation de la Mer), Nantes, France.
- Carpenè, E.,** 1993. Metallothionein in marine molluscs. In : Dallinger, R (ed). *Ecotoxicology of Metals in Invertebrates*. Boca Raton, FL: CRC Press: 55-72.
- Cailleaud,** 2006 utilisation du copépode *eurytemora affinis* pour étudier l'écodynamique et les effets biologiques des principaux contaminants organiques (pcb, hap, alkylphénols...) en estuaire de seine. 335p
- Castagnet Sandrine** 2003 “Etude expérimentale de la contamination par le cadmium de la crevette blanche (*Palaemon Longirostris*) en fonction de la salinité” 19pp
- Castel, J., and J. Veiga.** “Distribution and Retention of the copepod *Eurytemora Affinis Hirundoides* in a Turbid Estuary.” *Marine Biology* 107, 119–128.
- Chaffai, A., C. Amiard-Triquet, and A. El Abed.** 1997 “Metallothionein-Like Protein: Is It an Efficient Biomarker of Metal Contamination? A Case Study Based on Fish From the Tunisian Coast.” *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 33, 53–62.
- Clayton, Maureen E, Roland Steinmann, and Karl Fent.** “Different Expression Patterns of Heat Shock Proteins Hsp 60 and Hsp 70 in Zebra Mussels (*Dreissena Polymorpha*) Exposed to Copper and Tributyltin.” *Aquatic Toxicology* 47, no. 3–4 (January 2000): 213–226.

- Connell, D. B., and J. G. Sanders.** “Variation in Cadmium Uptake by Estuarine Phytoplankton and Transfer to the Copepod *Eurytemora Affinis*.” *Marine Biology* 133, 259–265.
- David, Valérie, Benoît Sautour, Pierre Chardy, and Michel Leconte.** “Long-term Changes of the Zooplankton Variability in a Turbid Environment: The Gironde Estuary (France).” *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 64, 171–184.
- Devreker, David, Sami Souissi, Gesche Winkler, Joëlle Forget-Leray, and François Le Boulenger.** “Effects of Salinity, Temperature and Individual Variability on the Reproduction of *Eurytemora Affinis* (Copepoda; Calanoida) from the Seine Estuary: A Laboratory Study.” *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 368, 113–123.
- Feurtet, A., and J. Castel.** “Biologie Du Copépode *Eurytemora Affinis* Hirundoides Dans La Gironde: Données Morphométriques.” In *Aspects Récents De La Biologie Des Crustacés. Concarneau (France), 6 Jun 1987, 1987.*
- Fisher, Nicholas S, and Sharon E Hook.** “Toxicology Tests with Aquatic Animals Need to Consider the Trophic Transfer of Metals.” *Toxicology* 181-182, 531–536.
 “Toxicology Tests with Aquatic Animals Need to Consider the Trophic Transfer of Metals.” *Toxicology* 181–182, 531–536.
- Giltsbach R., Kouta M., Bonisch H., Bruss M.** 2006. Comparison of in vitro and in vivo reference genes for internal standardization of real-time PCR data. *Biotech.*, 40: 173-177.
- Gonzalez,** 2004 Le cadmium. Comportement d'un contaminant métallique en estuaire. Auteur(s) : Jean-Louis Gonzalez; Editeur : IFREMER. P.32
- Goberville, Eric, Grgory Beaugrand, Benoît Sautour, Paul Trguer, and SOMLIT Team.** “Climate-driven Changes in Coastal Marine Systems of Western Europe.” *Marine Ecology Progress Series* 408, 129–148.
- Guillaud et a. romana** la gestion des estuaires en France. centre océanologique de bretagne, brest.
- Jozereau, C.,** 1997. La production de zinc dans la vallée du Lot depuis le XIXème siècle. Conséquences sur l'environnement. *Technical report. Master Diploma of University of Bordeaux I*, 21 pp.
- Kägi, J.H.R.,** 1991. Overview of metallothionein. In: Abelson, J.N., Simon, M.I. (Eds.), *Methods in Enzymology*. Academic Press, San Diego, CA, pp. 613-626.
- Legeay, Alexia, Maud Achard-Joris, Magalie Baudrimont, Jean-Charles Massabuau, and Jean-Paul Bourdineaud.** “Impact of Cadmium Contamination and Oxygenation Levels on Biochemical Responses in the Asiatic Clam *Corbicula Fluminea*.” *Aquatic Toxicology* 74, 242–253.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D.,** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25(4), 402-408.
- Lapaquellerie, Y., N. Maillet, J. M. Jouanneau, J. P. Coakley, and C. Latouche.** “Flux De Matières En Suspension Et De Cadmium Dans Le Lot.” *Hydroécologie Appliquée* 8 (1996): 173–191.
- Lavigne Amaia :** etude de la contamination par le cadmium ds premiers maillons du reseau trophique de l'estuaire de la gironde. 25pp 2000-2001
- Marchand Julien :** Etude de la contamination par le cadmium des premier maillons du réseau trophique de l'estuaire de la Gironde (approche in situ et expérimentales) DEA 43 p. 2001.
- Marie véronique :** etude de la réponse des métallothionéines chez les bivalves, *corbicula fluminea*, *dreissena polymorpha* et *crassostrea gigas*, après exposition au cadmium et au zinc- approches in situ et expérimentales – Thèse d'Etat
- Maroni, G.,** 1990. Animal metallothioneins. In: Jonathan Shaw, A. (Ed.), *Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 215-232.
- Meistertzheim, Anne-Leila, Morgane Lejart, Nelly Le Goïc, and Marie-Thérèse Thébault.** “Sex-, Gametogenesis, and Tidal Height-related Differences in Levels of HSP70 and Metallothioneins in the Pacific Oyster *Crassostrea Gigas*.” *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 152, 234–239.
- Moderan, Julien.** “Estuaire De La Charente : Structure De Communauté Et Écologie Trophique Du Zooplancton, Approche Écosystémique De La Contamination Métallique”
- Pasquaud Stéphanie** 2006 les relations trophiques : elements de structuration des peuplements ichtyologiques en milieu estuarien application à l'estuaire de la gironde. Thèse d'Etat.

- Perillo, Gerardo M.E.** “Chapter 2 Definitions and Geomorphologic Classifications of Estuaries.” In *Geomorphology and Sedimentology of Estuaries*, Volume 53:17–47. Elsevier, 1995.
- Pierron Fabien** 2007 Etudes des mécanismes de bioaccumulation du cadmium et des effets toxiques associés à différents stades de vie de l'anguille européenne (*Anguilla anguilla* L.) Thèse d'état.
- Pierron Fabien**, 2002 Etude de l'effet de la salinité sur la bioaccumulation du cadmium par voie directe et trophique chez un organisme endémique de l'estuaire de la Gironde, la crevette blanche : *Palaemon longirostris*. 10p. rapport de stage M2
- Pritchard**, (1967), What is an estuary : physicial viewpoint. Cheasepeake bay institute the john Hopkins university, Baltimore mariland 3pages
- Rasch E.M., Lee C.E., and Wyngaard G.A.** “DNA-Feulgen Cytophotometric Determination of Genome Size for the Freshwater-invading Copepod *Eurytemora Affinis*.” *Genome* 47, 559–564.
- Roesijadi, G.** “Metallothioneins in Metal Regulation and Toxicity in Aquatic Animals.” *Aquatic Toxicology* 22, 81–113
- Riordan, J.F. and Vallee, B.L.**, 1991. Metallobiochemistry. Part B. Metallothionein and related molecules. *Methods Enzymol.* **205**, 1-681.
- RNO**, 2006. Travaux du Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin. Edition 2006, IFREMER et Ministère de l'écologie et du développement durable. ISSN 1620-1124.
- Roesijadi, G.**, 1992. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* **22**, 81-114.
- Scofield, Erica, R.Terry Bowyer, and Lawrence K. Duffy.** “Baseline Levels of Hsp 70, a Stress Protein and Biomarker, in Halibut from the Cook Inlet Region of Alaska.” *Science of The Total Environment* 226, 85–88.
- Serafim, M.A, R.M Company, M.J Bebianno, and W.J Langston.** “Effect of Temperature and Size on Metallothionein Synthesis in the Gill of *Mytilus Galloprovincialis* Exposed to Cadmium.” *Marine Environmental Research* 54, 361–365.
- Souissi S., Devreker D.,Cailleaud K,Dur G.,Bonnard A., Forget-Leray J.,Budzinski H,** “Life cycle strategies and physiological adaptation of the copepod *Eurytemora affinis* : a candidate for developing a bioindicator of water quality.” Conférence : *Plankton Symposium*, Figueira da Foz : Portugal (2005)
- Sami Souissi, David Devreker, Laurent Seuront et Jean-Claude Dauvin :** « Dynamique de population du copépoede *Eurytemora affinis* dans l'estuaire aval : couplage entre les processus physiques et biologiques » Rapport final d'exercice 2002: Université des Sciences et Technologies de Lille, 49p.
- Sottolichio, Aldo** Modélisation de la dynamique des structures turbides (bouchon vaseux et crème de vase) dans l'estuaire de la Gironde 2006.
- Strady**, 2010 mécanismes biogéochimiques de la contamination des huîtres *crassostrea gigas* en cadmium en baie de marennes oléron. Thèse d'état.
- Tackx, M.L.M, P.J.M Herman, S Gasparini, X Irigoien, R Billiones, and M.H Daro.** “Selective Feeding of *Eurytemora Affinis* (Copepoda, Calanoida) in Temperate Estuaries: Model and Field Observations.” *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 56, 305–311.
- Ueda, Hiroshi, Megumi Kuwatani, and Keita W Suzuki.** “Tidal Vertical Migration of Two Estuarine Copepods: Naupliar Migration and Position-Dependent Migration.” *Journal of Plankton Research* (June 29, 2010).
- Vasak, M., 1991.** Metal removal and substitution in vertebrate and invertebrate metallothioneins. *Methods Enzymol.* **205**, 452-458.
- Viarengo, A.**, 1989. Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. *Aquat. Sci.* **1**, 295-317.
- Wildgust, M.A, and M.B Jones.** 1998. “Salinity Change and the Toxicity of the Free Cadmium Ion [Cd²⁺(aq)] to *Neomysis Integer* (Crustacea: Mysidacea).” *Aquatic Toxicology* 41, 187–192.
- Wilson, J.G.** “Productivity, Fisheries and Aquaculture in Temperate Estuaries.” *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 55, 953–967.

Annexe 1 :

Extraction Métallothionéines (MT) Chez le copépode *Eurytemora affinis*.

M.Baudrimont - A.Deroubaix

Dosage et extraction des MTs par saturation au mercure inorganique

Matériels :

- Centrifugeuse pour eppendorfs à 4°C
- Tubes eppendorfs 1.5 ml et 2 ml
- Balance
- Enceinte sous atmosphère d'azote
- vibro-broyeur MM400 Retsch
- Tampon Tris 25 mM et Tris 30 mM à 4°C
- Solution de mercure à 4°C : 50mg/l Hg(II)-TCA 10%
- Hémoglobine lyophilisée de porc ou bovine (Hb)
- Etalon MT (Aliquots d'extrait de foie de lapin congelé)
- Eau mQ, Ethanol (EtOH)

Précautions :

Allumer la centrifugeuse et la régler sur 4°C

Toute la manipulation se fait avec des gants.

Laisser les échantillons dans un bac de glace.

Manipulation :

- **Pesée des échantillons :**
 - Peser des tubes eppendorf de 2 mL
 - Trier les copépodes dans un bac en les rinçant avec de l'eau mQ (entre 1 à 3 rinçages selon le degré de saleté de l'échantillon) afin d'enlever grains de sables et autres débris, sous loupe binoculaire.
 - Récupérer une « purée » de copépode, **ne pas les mettre sur un papier absorbant !!!!** -> les organismes se colleront et il est très difficile de les récupérer, préférer un parafilm.
 - Ajouter entre 200 et 210 mg de copépodes dans les tubes et peser
 - Ajouter 500 µL de tampon Tris et peser
 - Après la pesée, laisser les échantillons dans la glace

- Ajouter 2 billes en acier inoxydable ($\varnothing = 7$ mm) préalablement passés à l'étuve, peser éventuellement.

200 mg d'organismes : 500 μ l de tampon tris 25 mM

- **Broyage sous azote:**

Les échantillons sont broyés sous azote pour éviter que les MTs ne s'oxydent et donc que la conformation des sites de fixation des métaux ne se modifie.

- Disposer les échantillons dans la glace dans l'enceinte sous azote.
- Ouvrir les éppendorfs dans la hôte afin d'évacuer tout oxygène et les refermer.

Attention à bien utiliser le sas et le détecteur d'oxygène pour ne pas faire entrer d'air dans l'enceinte. Veiller à maintenir le taux d'oxygène à 0 en rajoutant de l'azote.

- Utiliser le vibro-broyeur MM400 Retsch en veillant à ne pas ouvrir les éppendorf.

2*30 secondes + 1* 15 secondes (vitesse = 30 aller-retours/secondes)

Le vibro-broyeur MM 400 est un appareil de paillasse spécialement développé pour le broyage à sec et à l'état humide de petites quantités d'échantillons. Les bols de broyage de MM 400 produisent des vibrations en forme d'arc de cercle sur un plan horizontal. Du fait de leur inertie, les billes viennent frapper avec une énergie élevée l'échantillon situé sur les faces extérieures arrondies provoquant ainsi le broyage de ce dernier. Un intense mélange, généré par le mouvement du bol et les mouvements décrits par les billes, se produit simultanément.



- **Centrifugation**

- Centrifuger les échantillons à 20 000g, 4°C pendant 1h
- Préparer 2 séries de tubes eppendorf 1.5 ml :
 - 3 Blancs
 - 3 Etalons
 - 2 Réplicats / échantillon
- Peser une des deux séries de tubes

- **Saturation au mercure**

- Récupérer les échantillons dans la centrifugeuse et les conserver dans la glace
- Dans la série de tubes préparés précédemment (non pesés), déposer :
 - Blanc x3 : 200 µl Tampon Tris 25 mM
 - Etalon x3 : 200 µl de l'étalon MT (Aliquot d'extraits de foie de lapin congelé)
 - Echantillon x2 : 100 µl de surnageant

Attention !!! : les restes de copépodes (cuticules) sont très facilement remis en suspension : prendre les eppendorfs en douceur.
- Ajouter un volume équivalent (200µl/100µl) de solution de mercure (50 mg/l Hg(II)-TCA 10 %)
- Vortexer et laisser incuber 10 min
- Pendant ce temps, préparer la solution d'hémoglobine :
 - Ajouter 40 ml de Tampon Tris 30 mM à l'Hb lyophilisée (1g de poudre)
 - Cette préparation se **conserve 3 jours à 4°C**. Indiquer la date de préparation directement sur le flacon, ainsi que vos initiales.
- Après les 10 min d'incubation, rajouter un volume (400µl/200µl) de solution d'Hb

Attention il faut vortexer et centrifuger rapidement les tubes un par un

- Centrifuger à température ambiante 20 min à 20 000g
- Récupérer le surnageant avec une pipette (p1000) et le déposer dans la série de tubes pré pesés

Attention de ne pas prélever de paillettes d'Hb qui sont très concentrées en mercure, ni de culot

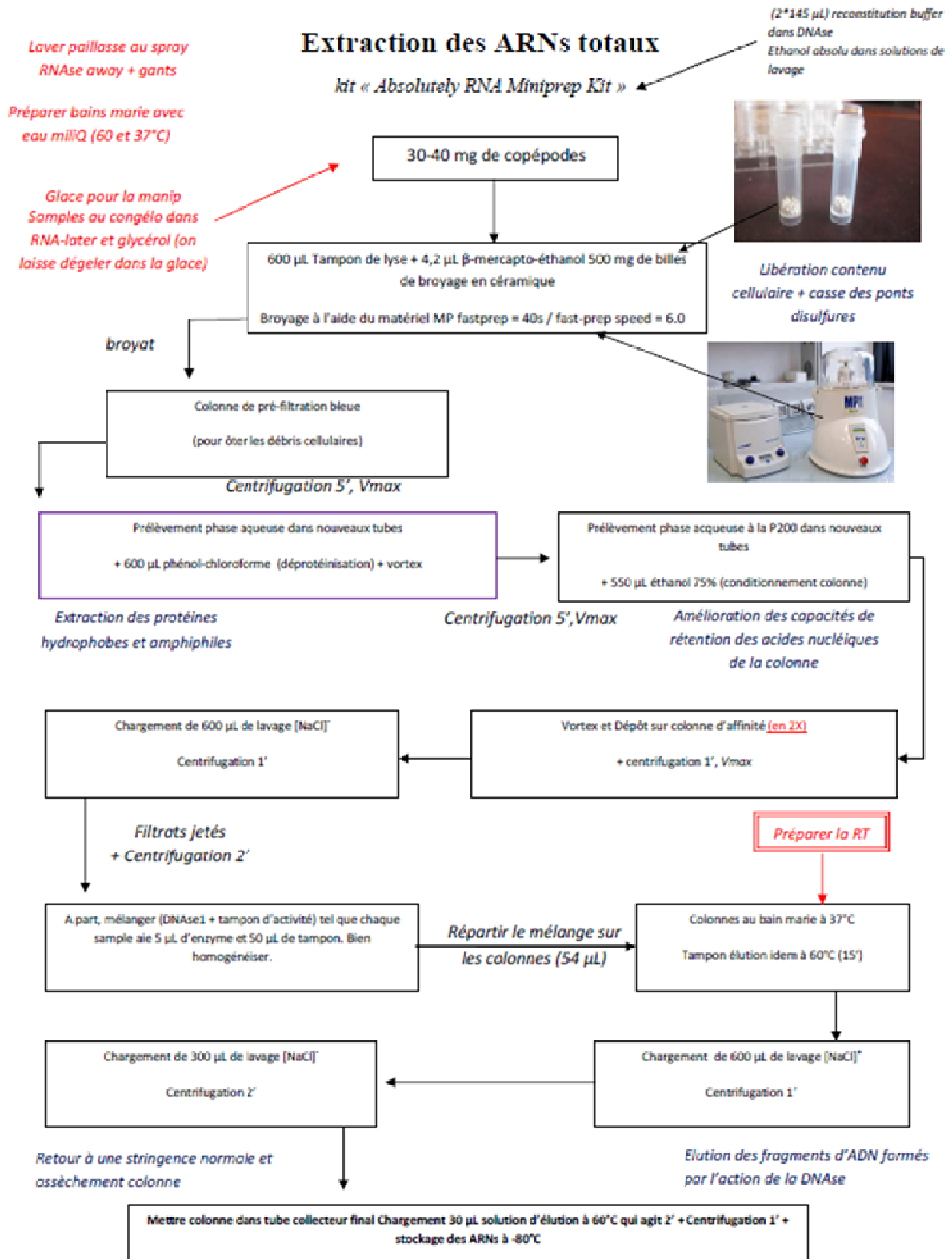
Attention : NE PAS prélever à la surface du surnageant : présence de cuticules qui peuvent être chargées en métaux et qui fausseraient les mesures.

- Peser les tubes avec le surnageant

- Stocker les tubes à 4°C jusqu'à analyse du mercure
- Récupérer les billes et les mettre dans de l'éthanol en attendant un lavage à l'éthanol 96% et au SDS 1%

- **Dosage mercure total au LECO AMA 254**

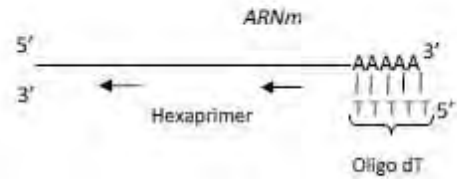
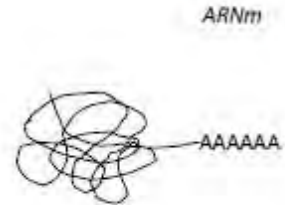
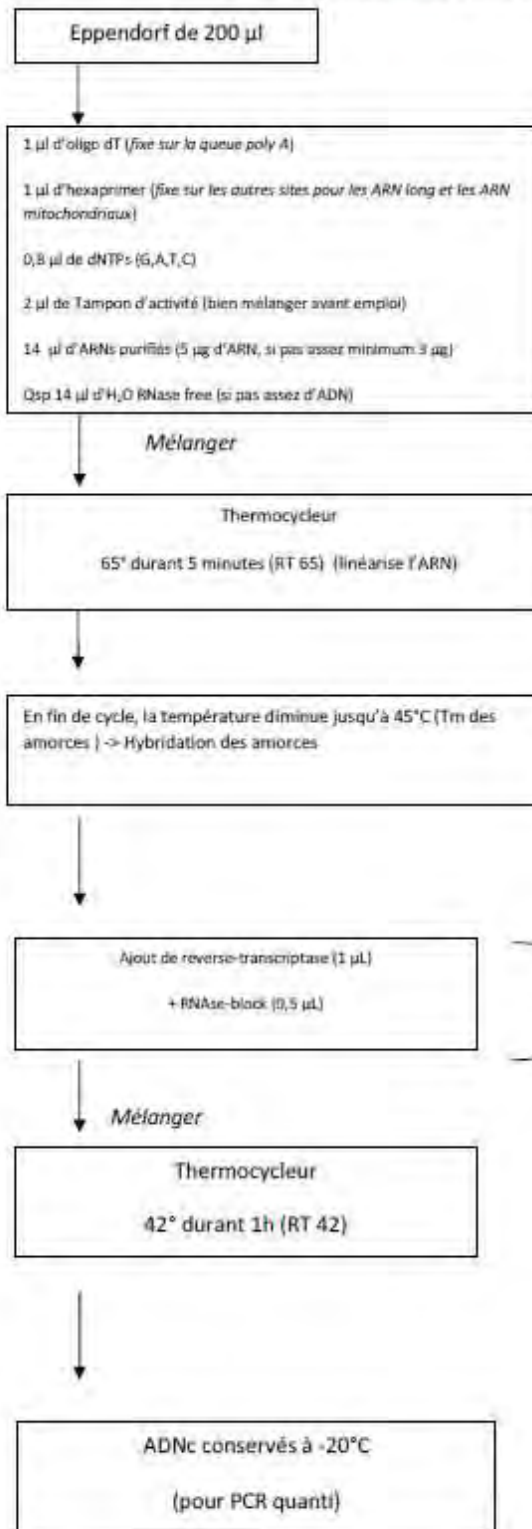
Annexe 2 :



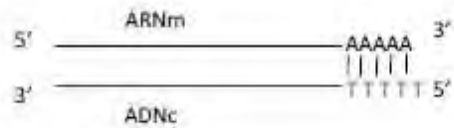
Retrotranscription

Kit : « First strand cDNA synthesis » (Stratagen Agilent)

Sortir le kit du congélateur (-20°C), ne remettre que les enzymes à -20°C jusqu'à leur utilisation / Elles seront alors conservées dans la glace.



Les enzymes doivent être conservées dans la glace pendant la manipulation



Annexe 4 :

Purification, Clonage et Transformation bactérienne

Purification ADNc

Cette étape permet d'éliminer les dimères d'amorces qui ont pu se former durant la PCR

Utilisation du kit « PCR Purification kit »

Mélange 40 µl ADNc (issus de la PCR) + 200 µl tampon PB dans un eppendorf (1,5ml) ⇔ MIX

Déposer le MIX sur les colonnes du kit (roses)

Centrifuger 1' 13.000rpm

Jeter le filtrat

Ajoute 750 µl tampon PE

Centrifuger 1' 13.000rpm

Jeter le filtrat

Centrifuger 1' 13.000rpm ⇔ Assèche la colonne

Transférer la colonne dans un eppendorf neuf (1,5ml)

Ajoute 30 µl tampon EB

Attendre 2 mins

Centrifuger 1' 13.000rpm (eppendorf ouvert et colonne rose fermée)

Jette la colonne

Garde l'eppendorf ⇔ On récupère 30 µl d'ADNc purifiés

Clonage - Ligation

Se fait dans des tubes à PCR (200 µl)

Mélanger dans chaque tube

1 µl PGEMT ⇔ plasmides

5 µl Tampon activité 2X

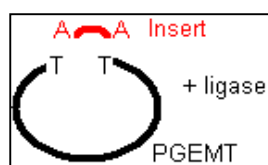
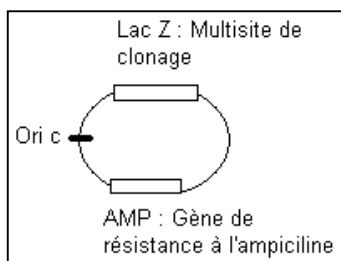
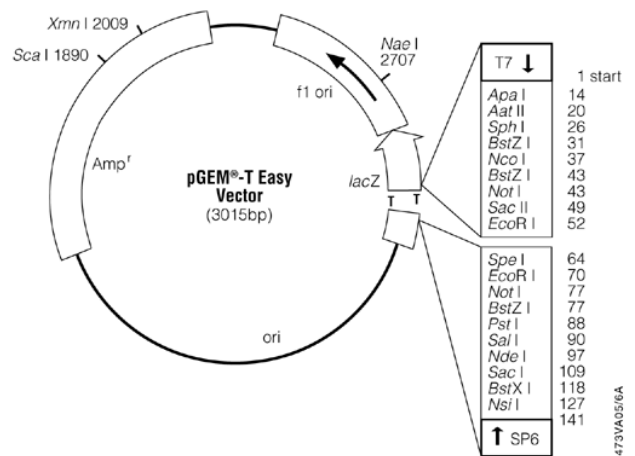
1 µl T4 DNA Ligase

3 µl ADNc purifiés

Mélange bien avec une pipette

Laisser à température ambiante pour 1H

Laisser à 4°C toute la nuit



Plasmide

Le plasmide pGEM-T Easy (Promega) a été mis au point afin de réaliser le clonage des produits PCR. Ce vecteur est fourni sous forme ouverte (coupé par EcoRV) et additionné de thymidine aux extrémités 3' terminales. Il contient de nombreux sites de restriction à l'intérieur de son MCS (Multi Cloning Site). Ces sites de restriction permettent l'extraction de l'insert par digestion. (Le vecteur pGEMT contient aussi les promoteurs pour les ARN polymérases T7 et SP6 de part et d'autre du MCS, lui-même situé à l'intérieur de la séquence codant le peptide a de la b-galactosidase. L'inactivation du peptide a par insertion permet la discrimination rapide des clones positifs. Ce vecteur contient également une origine de répllication du phage f1, pour la préparation d'ADN simple brin, et une origine de répllication procaryote.) source : REseau Lyonnais d'Ingenierie Educative

Transformation bactérienne

Les bactéries utilisées ont été rendues compétentes c'est-à-dire qu'on a fragilisé leurs parois par traitement au RbCl.

Elles sont stockées à -80°C

Préparation du matériel

Prendre un bac de glace

Prendre les bactéries et les laisser décongeler dans la glace

Allumer le bain marie à 42°C

Préparer des eppendorfs de 1,5 ml

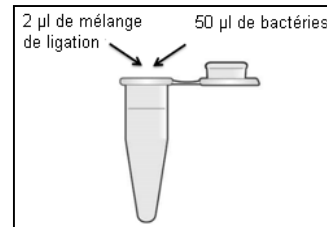
Préparer les pipettes (rose sur $2\ \mu\text{l}$ + jaune sur $50\ \mu\text{l}$) et les cones

Lorsque les bactéries ont décongelé, laver la paillasse à l'éthanol, se laver ensuite les mains

Manipulation

Allumer le bec bunsen

Mettre dans les eppendorfs $2\ \mu\text{l}$ de mélange de ligation + $50\ \mu\text{l}$ de bactéries



Agiter par tapotages sur l'eppendorf, Attention les bactéries sont fragilisées par le traitement au RbCl, ne pas pipeter pour mélanger

Mettre 20 mins dans la glace

Mettre 45 s dans le bain marie à 42°C \Leftrightarrow Choc thermique, fluidification de la membrane

Changer la température du bain marie de 42°C à 37°C

Mettre 2 mins dans la glace

Ajouter 950 μl de milieu LB liquide (20g/l)

Mettre au minimum 1 heure à 37°C au bain marie \Leftrightarrow Etape d'expression phénotypique

Multiplication bactérienne et multiplication du plasmide \Leftrightarrow expression de la protéine de résistance à l'ampiciline

Etaler 200 μl de culture bactérienne sur des boites de « LB solide + Ampiciline » (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)



→ Laisser 1 nuit à 37°C à l'étuve

Repiquage des colonies

Préparer du MIX « LB liquide + Ampiciline » (100 µg/ml)

⇔ 1 µl d'ampiciline pour 1 ml de LB liquide

Prépare des tubes à hémolyses

Répartir 2 ml du MIX dans les tubes à hémolyses

Prélever une colonie et la placer dans un tube à hémolyse

Placer les tubes à hémolyses à 37°C à l'étuve sous agitation (à 150)

Laisser pousser pendant 3h

PCR sp6/t7

Permet d'amplifier le fragment inséré dans les plasmides (eux-mêmes amplifiés par les bactéries)

Protocole identique à PCR classique SAUF

⇔ 5 µl de culture (et pas 1 µl ADNc)

⇔ 30 µl H₂O PCR (et pas 34 µl car besoin d'ajuster le volume d'eau pour atteindre 50 µl)

⇔ Utilise les amorces sp6 et t7

Rappel préparation des dNTP :

⇔ 20 µl A ⇔ 20 µl G

⇔ 20 µl T ⇔ 20 µl C

⇔ 120 µl H₂O PCR

Rappel préparation du MIX (quantité pour 1 gène) :

⇔ 1 µl dNTP

⇔ 3 µl MgCl₂

⇔ 0,2 µl Taq

⇔ 10 µl Tampon d'activité (GoTaq)

} A multiplier par le nombre de gène +

Rappel preparation des échantillons

⇔ 14,2 µl MIX

⇔ 0,5 µl amorces sens

⇔ 0,5 µl amorces anti-sens

⇔ 34 µl H₂O PCR ⇔ **ICI METTRE 29.8 µl H₂O PCR**

⇔ 1 µl ADNc ⇔ **ICI METTRE 5 µl de culture bactérienne**

Annexe 5 :

Protocole de minéralisation des copépodes :

- Peser des tubes à minéraliser vides
- Nettoyer les copépodes avec la même technique que pour l'extraction des Mts (annexe)
- Mettre en 200 et 210 mg de copépodes dans un tube à minéraliser et repeser le tube
- Mettre les tubes ouverts 48h à 50°C
- Après l'étuve, diluer avec 1mL d'acide et minéraliser 3Heures
- Rajouter 5mL d'eau

- Données O₂ (sondes Magest, Bacalan et Bègles)

Période	Durée	Sites	% données	
			< 5 mg/L	< 4 mg/L
6 juill - 28 sept	3 mois	Bacalan	35,65	6,26
		Bègles	40,21	7,02
6 juill - 3 août	1 mois	Bacalan	12,8	0
		Bègles	18,6	0,2
3 août - 31 août	1 mois	Bacalan	46,4	9,36
		Bègles	45,7	10,4
31 août - 27 sept	1 mois	Bacalan	49,81	9,43
		Bègles	58,07	10,72

→ Hypoxie (<5 mg/L) en 2011 (surtout août et septembre)

Tableau annexe : Moyennes des valeurs de données Oxygène prise par sondes Magest aux sites Bacalan et Bègles

Résumé

L'estuaire de la Gironde est le plus grand estuaire macrotidal européen et fait partie des systèmes d'interface à forte productivité biologique. Mais les deux fleuves alimentant cet estuaire sont touchés avec des degrés différents par les activités anthropiques. Il en résulte une toxicité du milieu liée à la présence d'un certain nombre de contaminants (rejets de STEP, activités industrielle et minière); mais également une sous oxygénation combinée à l'échauffement des eaux particulièrement sensible en période estivale pouvant provoquer des situations hypoxiques, voire anoxiques défavorables à la survie des espèces locales. La Garonne est notamment marquée par les apports de l'agglomération bordelaise.

Début 2011, un programme de recherche nommé « **ET**ude **I**ntégrée de l'effet des **A**pports amont et locaux sur le fonctionnement de la **G**aronne **E**stuarienne » (ETIAGE) a été développé afin d'estimer et d'évaluer l'influence et l'impact des conditions environnementales de l'estuaire de la Gironde sur les organismes aquatiques.

L'étude de l'effet des des éléments traces métalliques et des épisodes d'hypoxie sur une espèce clé de cet hydrosystème, le copépode calanoïde *Eurytemora affinis* a apporté pour la première fois des données de terrain à la fois sur la bioaccumulation du cadmium, la réponse des métallothionéines associée et sur la caractérisation de gènes spécifiques à cette espèce

La question posée *in fine* est de tester l'utilisation potentielle de cet organisme abondant dans l'estuaire comme bioindicateur de la qualité du milieu.

Malgré son caractère exploratoire, ce travail nous a montré des réponses des métallothionéines cohérentes avec le cycle de reproduction d'*E. affinis*, la bioaccumulation du Cd dans les tissus et les périodes d'hypoxie mesurées sur le terrain, entraînant des variations sur la physiologie respiratoire des organismes. Les résultats concernant la génétique sont prometteurs et des approfondissements dans cette voie seront à réaliser à l'avenir.

Mots clés : Eurytemora affinis, estuaire fluvial, Gironde, Garonne, bioaccumulation, Cadmium, Métallothionéines, QPCR, réponse génétique, clonage.

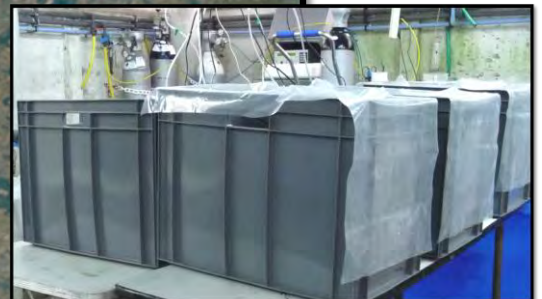
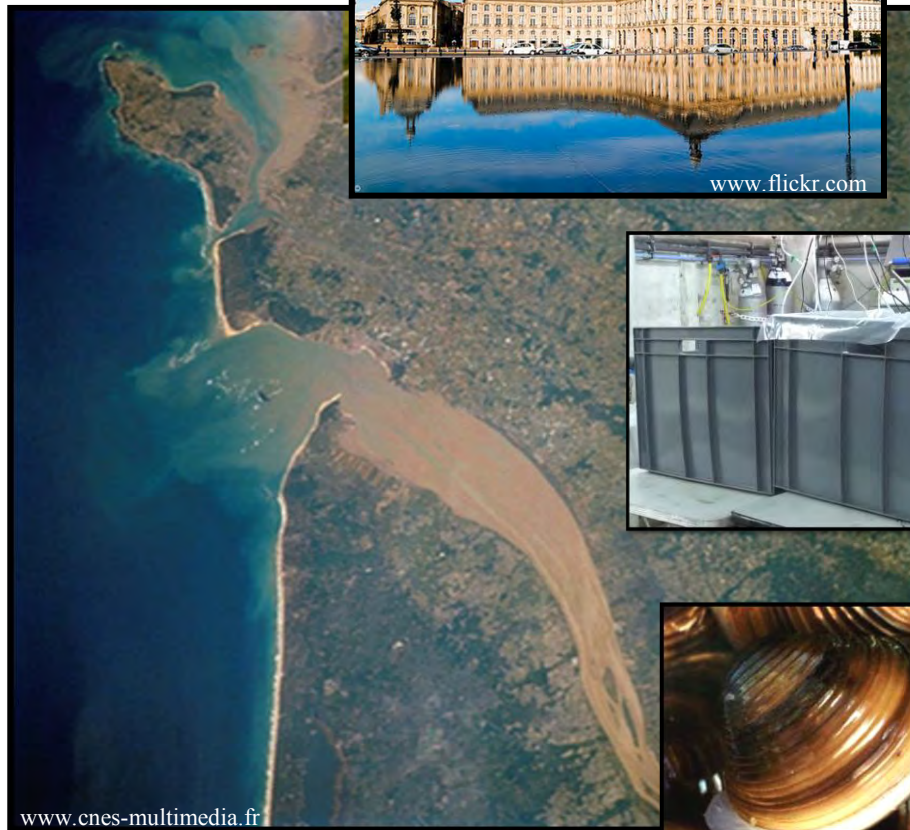
Annexe 9



MASTER 2 SCIENCES ET TECHNOLOGIES
« Fonctionnement et Dysfonctionnement des Ecosystèmes Aquatiques »
Université bordeaux 1
Année universitaire : 2011/2012
RAPPORT DE STAGE

DRANGUET Perrine

Effets isolés et combinés de l'exposition de *Corbicula fluminea* à l'hypoxie et au nickel par voie directe en laboratoire



Maîtres de stages :

- Magalie BAUDRIMONT
- Patrice GONZALEZ
- Alexia LEGEAY



Laboratoire d'accueil : Equipe EA

Station Marine d'Arcachon

UMR EPOC 5805, Université Bordeaux 1

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en premier lieu Antoine Grémare et Frédéric Garabetian pour mon accueil à la station marine d'Arcachon, et Jean Charles Massabuau pour m'avoir reçu au sein de son équipe d'Ecotoxicologie Aquatique.

Je remercie tout particulièrement mes maîtres de stage : Magalie Baudrimont, Patrice Gonzalez et Alexia Legeay, qui m'ont fait confiance pour ce sujet de stage.

Un grand merci à Magalie Baudrimont, pour sa pédagogie, son encadrement, sa confiance tout au long du stage, sa disponibilité dans les moments importants, de m'avoir suivis tout au long de mes deux stages de master et de m'avoir conforté dans mon attachement pour l'écotoxicologie.

Merci à Alexia Legeay pour son aide lors de mes longues journées de dissection et pour ma formation sur l'hypoxie.

Merci à Cerise et Patrice Gonzalez, pour m'avoir initiée à la génétique et aidée pour la rédaction de ce rapport.

J'adresse également mes remerciements à Bruno pour m'avoir aidé à montrer mon expérience. Tu as toujours été là en cas de problèmes.

Je tiens à remercier énormément Piwi pour ton investissement dans mon stage, pour la formation sur l'ICP, pour ton aide lors du montage de mon expérience, pour les longues journées de dissection, et pour ton soutien, tes conseils... Merci d'avoir toujours été là tout au long de ce stage.

Je n'oublie pas Fabien, qui m'a aidé pour les dissections, pour tes conseils et ta sympathie.

Je remercie aussi Mohamédou pour son aide en statistique.

Merci, Florence, Henri et Christian pour leurs gentilleses et leurs appuis.

Je n'oublie pas, Jade, Jennifer, Clément, Kéwin, Sophie, Perrine, Christophe, Aurélie, Alexandre et plus particulièrement Nicolas pour leur aide durant ce stage et les bons moments passés à la station.

Je remercie également Lucie pour ta bonne humeur, je t'envoie de bonnes ondes pour ta thèse.

Présentation de la station marine d'Arcachon

La station marine d'Arcachon est créée en 1867 par la société Scientifique d'Arcachon. Elle fait partie de l'Université Bordeaux 1 depuis 1948. L'Unité Mixte de Recherche (UMR) dirigée par P. Bertrand, en association avec le CNRS : « UMR » 5805 « EPOC » (Environnements et Paléoenvironnements Océaniques), lui est rattachée.

Cette UMR se compose de cinq équipes de recherche implantées sur les deux sites d'Arcachon et de Talence dont la composition est la suivante:

- Equipe METHYS, sous la responsabilité de P. Bonneton

Thème : Modélisation, Expérimentation, Télédétection en Hydrodynamique Sédimentaire

- Equipe PALEO, sous la responsabilité de F. Grousset

Thème : Paléoclimats

- Equipe Sédimentologie, sous la responsabilité de F. Grousset

Thème : Processus de dépôts et construction des corps et systèmes sédimentaires

- Equipe ECOBIOC, sous la co-responsabilité de G. Bachelet et P. Anschutz

Thème : Fonctionnement Ecologique et Biogéochimique des écosystèmes Côtiers

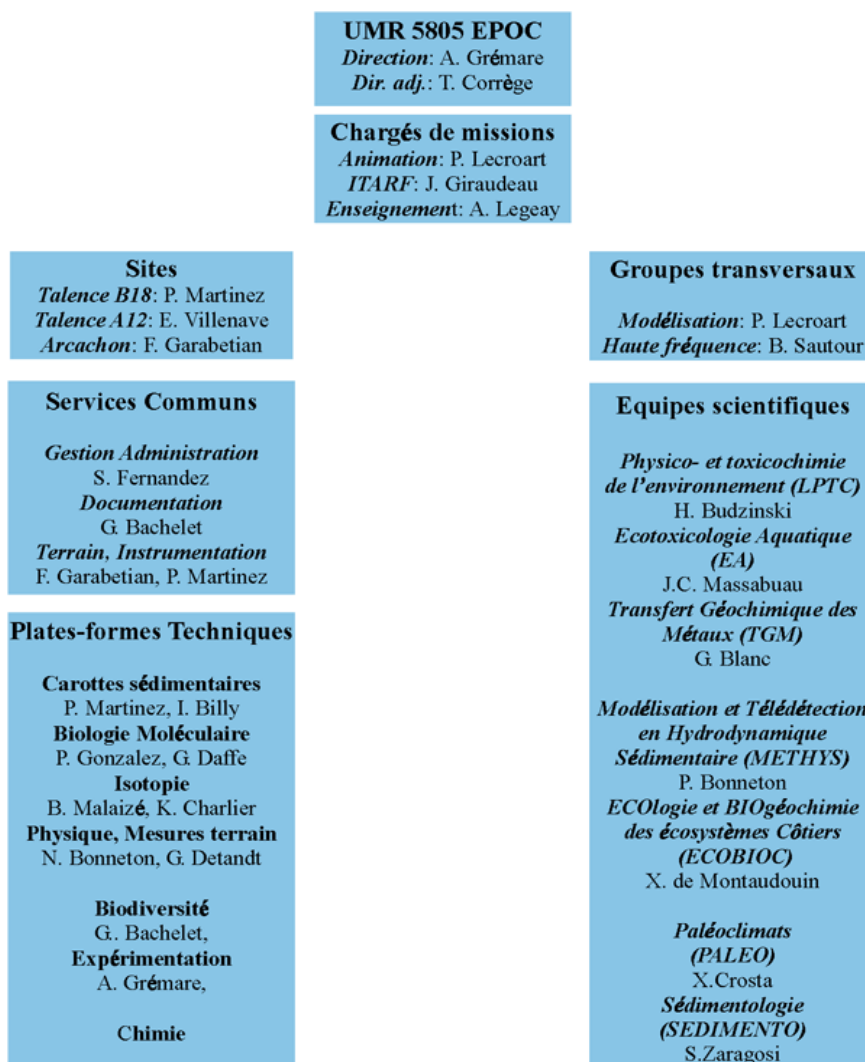
- Equipe EA, sous la co-responsabilité de J.C. Massabuau et G. Blanc

Thème : Géochimie et Ecotoxicologie des Métaux dans les systèmes Aquatiques

Organigramme

L'organigramme de l'UMR EPOC comprend quatre niveaux de responsabilités :

1. La cellule de direction composée du Directeur, Directeur adjoint et Administrateur,
2. Les chargés de mission (Animation scientifique, Enseignement et Personnels ITARF) rattachés à cette cellule,
3. Les responsables de site,
4. Les responsables d'équipes scientifiques.



SOMMAIRE

1	INTRODUCTION	1
2	MATERIELS ET METHODES	3
2.1	Le modèle biologique	3
2.2	Exposition expérimentale	4
2.2.1	Constitution des unités expérimentales	4
2.2.2	La composante biologique.....	4
2.2.3	Protocole expérimental	4
2.2.4	Régulation des paramètres physico-chimiques.....	5
2.2.5	Procédure de contamination des unités expérimentales	6
2.3	Méthodes analytiques	6
2.3.1	Dosage du nickel par spectrophotometrie d'émission optique couplée à un plasma inductif (ICP-OES)	6
2.3.2	Dosages des métallothionéines (MTs).....	7
2.3.3	Mesure de l'expression génétique	8
2.3.3.1	Choix des gènes	8
2.3.3.2	Extraction des ARN totaux	8
2.3.3.3	Rétro-transcription (RT)	8
2.3.3.4	PCR-quantitative	9
2.3.4	Traitement des données	9
3	RESULTATS.....	10
3.1	Suivi métallique durant la phase de contamination	10
3.2	Bioaccumulation dans les organes.....	10
3.3	Les métallothionéines	13
3.4	Réponse génétique.....	14
4	DISCUSSION.....	18
4.1	Effet de la pression métallique	18
4.2	Effet de l'hypoxie	20
4.3	Effet du nickel en hypoxie.....	21
5	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	22
6	BIBLIOGRAPHIE.....	23
	ANNEXES	26
A.	COMPOSITION DU MILIEU DAUTA	26
B.	EVOLUTION DE LA CONCENTRATION EN OXYGENE	27
C.	COUPLES D'AMORCES SPECIFIQUES POUR LES SIX GENES DE <i>C. fluminea</i>	28

FIGURES

Figure 1 : Schéma d'une unité expérimentale	4
Figure 2 : Schéma du dispositif expérimental	5
Figure 3 : Bioaccumulation du nickel au niveau des trois ensembles tissulaires de <i>C.fluminea</i> en fonction du temps (moyennes \pm erreur standard ; n=4). Des lettres différentes sur les graphiques montrent une différence significative en fonction des conditions de contamination.	11
Figure 4 : Concentrations en métallothionéines dans les deux ensembles tissulaires, branchie et masse viscérale de <i>C.fluminea</i> , en fonction du temps pour les différentes conditions (moyenne \pm erreur standard ; n=4). Des lettres différentes sur les graphiques montrent une différence significative entre les conditions à chaque temps de prélèvement (p<0,05 ; test de Kruskal Wallis et test de Wilcoxon).	13

TABLEAUX

Tableau I : Concentration métallique moyenne de l'eau ($\mu\text{g/L} \pm \text{ET}$) dans les six unités expérimentales lors des 21 jours de contamination	10
Tableau II : Facteur d'expression basal de T0.....	14
Tableau III : Facteurs d'expression des six gènes étudiés chez <i>C.fluminea</i> par rapport aux témoins en normoxie (>2 : induction, <0,5 : répression, moyennes \pm erreur standard ; n=4)	15
Tableau IV : Facteurs d'expression des six gènes étudiés chez <i>C.fluminea</i> en hypoxie par rapport à la normoxie (>2 : induction, <0,5 : répression, moyennes \pm erreur standard ; n=4)	16
Tableau V : Facteurs d'expression des six gènes étudiés chez <i>C.fluminea</i> par rapport au témoin hypoxie(>2 : induction, <0,5 : répression, moyennes \pm erreur standard ; n=4)	17

Liste des abréviations

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire. Fragment obtenu par rétro-transcription de l'ARN messenger.

Ag : Argent.

cat : gène codant pour la catalase.

Cd : cadmium.

cox I : gène codant pour la sous unité I de la cytochrome c oxydase.

CO₂ : dioxyde de carbone.

Cu : cuivre.

ET : écart type.

Fe : fer.

gst : gène codant pour la glutathion-s-transférase.

GPx : Glutathion-péroxydase.

Hg : mercure.

HNO₃ : acide nitrique.

ICP-OES : spectrophotométrie d'émission optique couplée à un plasma inductif.

kPa : unité de mesure de la pression partielle d'oxygène. 1kPa~ 1% d'oxygène dans l'air, dans une eau équilibrée à l'air la fraction d'oxygène est de 21%, la pression partielle d'oxygène, PO₂, est donc égale à 21 kPa.

mt : gène codant pour les métallothionéines.

MTs : métallothionéines.

MXR : multi-xenobiotic resistance.

N : azote.

Ni : nickel.

O₂ : oxygène.

Pb : plomb.

PCBs : Poly-chloro-byphényles.

PCR : « Polymerase Chain Reaction », réaction d'amplification en chaîne de l'ADN.

ppb: abréviation de l'anglais « part per billion », partie par milliard.

ppm : partie par million.

R-T : rétro-transcription.

ROS : espèces réactives de l'oxygène « Reactive Oxygen Species ».

SOD : superoxyde-dismutase.

sod : gène codant pour la superoxide dismutase à manganèse mitochondrial = *sod*.

T°C : température.

UE : unité expérimentale.

Zn : zinc.

12s : gène ribosomique, marqueur du nombre de mitochondries.

1 INTRODUCTION

A l'heure actuelle, il existe très peu d'écosystèmes non perturbés par l'action de l'Homme. Les milieux les plus sensibles et les plus préoccupants sont les milieux aquatiques, car l'eau est essentielle à toute forme de vie sur notre planète. Nos bassins, estuaires, rivières sont souvent pollués par l'augmentation de la présence de métaux. Ceci est dû à l'évolution de notre mode de vie, l'obsession du bien être, et aux avancées technologiques... La présence de métaux dans les écosystèmes suscite de nombreuses inquiétudes auprès de la population humaine. En effet, ces éléments peuvent provoquer des modifications structurelles et fonctionnelles des différents écosystèmes, et peuvent avoir des répercussions sur les aspects sanitaire et économique. Les estuaires exigent une attention particulière car ils ont un intérêt écologique, commercial et patrimonial, mais ils sont soumis à un risque de pollution considérable du fait de la proximité accrue des industries, des activités urbaines et agricoles. Dans ce type de milieu, les micropolluants organiques ou métalliques peuvent être rejetés et se transformer chimiquement en éléments plus « bio-assimilables » par les organismes aquatiques.

L'estuaire de la Gironde reste l'estuaire le moins pollué d'Europe, mais par son fonctionnement, ce système fluvio-estuarien mérite une attention particulière car il est très représentatif du mode de fonctionnement d'un grand nombre d'estuaires européens. Il subit néanmoins une contamination historique en métaux et notamment en Cd (Boutier et al, 1989) ayant conduit au classement en zone « D » de ses eaux, interdisant toute récolte ou production de coquillages dans la zone aval de l'estuaire. Il présente également des contaminations importantes en poly-chloro-biphényles (PCBs) ayant conduit à l'interdiction de pêche des anguilles dans la Garonne depuis 2007 en raison des risques sanitaires que la consommation d'anguilles représente.

Autour de l'agglomération bordelaise, en plus des pressions urbaines et industrielles inhérentes à la présence de la ville de Bordeaux, l'estuaire est soumis à des épisodes de plus en plus fréquents d'hypoxie en période estivale. En effet, ses eaux sont fortement turbides avec la présence d'un bouchon vaseux très important. L'augmentation des T°C de l'estuaire, l'allongement des périodes d'étiages et la diminution des débits, favorisent de plus la sous-saturation en oxygène de l'eau. L'hypoxie, *via* l'hyperventilation qu'elle génère chez les organismes aquatiques, peut entraîner une accumulation significativement plus importante des contaminants et notamment des métaux au niveau branchial des organismes aquatiques (Pierron et al., 2007).

Dans ces conditions très particulières rencontrées dans l'estuaire de la Gironde, il devient capital de comprendre l'effet des actions combinées des phases d'hypoxie et de contamination métallique sur d'une part les processus de bioaccumulation et d'autre part les effets toxiques engendrés chez les organismes aquatiques.

Pour répondre à ces questions, nous avons réalisé des études en laboratoire visant à exposer des bivalves filtreurs d'eau douce *Corbicula fluminea* à un effet combiné d'hypoxie et de contamination par le nickel. Les bivalves filtreurs sont d'excellents indicateurs de la contamination des milieux, de par leur grande capacité de filtration de la colonne d'eau à des fins respiratoires et nutritionnelles, conduisant à une forte accumulation des polluants présents dans l'eau (Baudrimont et al., 1997 ; Tran et al., 2001). Leur caractère sédentaire, leur facilité de maintien en laboratoire et leur grande résistance aux stress chimiques fait qu'ils représentent des modèles biologiques de choix pour les études en écotoxicologie, et notamment *C. fluminea* en eau douce. Le nickel est un métal très utilisé, il est retrouvé partout dans les bijoux fantaisies, les pièces de 1€ et 2€, les amalgames dentaires, les pneus, la garniture des freins.... C'est un métal connu comme étant le plus allergisant, et il est suspecté d'être cancérigène (Krob et al., 2004, fiche toxicologique inrs, édition 2009). Cependant, il est très peu étudié en écotoxicologie, alors qu'il fait partie des dix métaux les plus toxiques (Islam et al., 2004). Notre choix s'est porté sur ce métal, car lors d'études précédentes menées en milieu naturel après exposition des *C. fluminea* par la méthode de caging *in situ* (programme Défi Cd, 2009), des accumulations très importantes de ce métal ont été révélées chez ces organismes au niveau de l'agglomération bordelaise, comparativement à tous les autres sites étudiés du réseau hydrographique Lot-Garonne-Dordogne-Gironde-Charente. Les mêmes tendances ont été récemment retrouvées lors des études *in situ* qui se sont poursuivies dans le cadre du projet ETIAGE (Etude Intégrée de l'effet des Apports amont et locaux sur le fonctionnement de la Garonne Estuarienne), dans lequel s'intègre ce stage. Ce projet se décline en cinq axes. Notre travail s'insère dans l'axe quatre « Approche de l'impact des conditions physico-chimiques affectant la masse d'eau estuarienne garonnaise sur les cortèges biologiques ». La finalité de ce programme est d'atteindre le « Bon état écologique des eaux » et d'obtenir des outils permettant aux gestionnaires de prendre des décisions adéquates pour la gestion de la qualité des eaux.

L'objectif de ce stage a donc été d'étudier les effets isolés et combinés de l'exposition des *C. fluminea* à l'hypoxie et au Ni par la voie directe de contamination en laboratoire, sur une période de 21 jours. Les processus de bioaccumulation du Ni au niveau de différents organes ont été étudiés, ainsi que les effets toxiques engendrés au niveau cellulaire. Il existe différents mécanismes pouvant être impliqués dans la détoxification des métaux. Parmi ceux-ci, l'un repose sur des protéines de

faible poids moléculaire riches en cystéines les métallothionéines (MTs). Ces protéines interviennent dans l'homéostasie et la détoxification des métaux, puisqu'elles ont la capacité de chélater 7 ions (Zn ou Cd) grâce à leurs groupements thiols (Chan et al., 2002). Il a été prouvé que les MTs jouent un rôle clef dans la séquestration des métaux thioloprives (Baudrimont et al., 1997). Les MTs sont synthétisées en présence de métaux, mais il existe d'autres facteurs tels que les hormones, les messagers secondaires, les agents cytotoxiques ou les conditions de stress qui sont capables d'induire leur synthèse. La réponse protéique et génétique de ces protéines a été étudiée. Parallèlement à ces processus de détoxification, les organismes soumis à une contamination métallique peuvent subir des effets toxiques liés au stress oxydatif, phénomène physiologique naturel, qui peut être induit par l'apport d'éléments exogènes à l'organisme. Celui-ci consiste en la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) pouvant conduire à la dégradation des acides gras de la membrane cellulaire et peut être responsable à terme d'une diminution de fluidité membranaire. Viarengo et al. (1980) ont démontré l'effet néfaste des métaux sur ce processus. Afin de lutter contre le stress oxydant, les cellules possèdent des systèmes de défense impliquant des enzymes telles que la catalase, les superoxyde-dismutases (SOD), ou encore la glutathion-péroxydase (GPx) (Stoghs S.J and Bagchi D, 1995). Ainsi, au cours de notre étude, nous nous sommes intéressés également à la réponse d'un certain nombre de gènes d'intérêt impliqués dans cette lutte contre le stress oxydant (*sod*, *cat* ou *gst*), mais également dans la perturbation du métabolisme mitochondrial (*cox1*, 12S) par PCR quantitative en temps réel, avec comme gène de référence, la β actine.

2 MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Le modèle biologique

La palourde asiatique *Corbicula fluminea* est un mollusque bivalve filtreur d'eau douce, appartenant à l'ordre des Eulamellibranchia, à la famille des Corbiculidae et au genre *Corbicula*. Ce bivalve vit à l'interface de la colonne d'eau et du sédiment, c'est une espèce ubiquiste, sédentaire, allochtone. Elle fut décrite pour la première fois dans l'estuaire de la Gironde en 1978 et dans le Tage, au Portugal, en 1980 (Mouthon 1981). De plus *C. fluminea* est capable d'accumuler les métaux, ces différentes caractéristiques font qu'il s'agit d'une espèce bioindicatrice.

Corbicula fluminea a une durée de vie de 2 à 4 ans, la longueur maximale de la coquille est de 50 mm. C'est un être hermaphrodite protandre, il peut avoir deux périodes de pontes en saisons chaudes. Le niveau d'oxygène d'un milieu peut modifier les processus de contamination par un

métal. En effet, *C. fluminea* en milieu hypoxique se contamine trois fois plus vite qu'en normoxie ou hyperoxie (Tran D et al., 2001).

2.2 Exposition expérimentale

2.2.1 Constitution des unités expérimentales

Toutes les unités expérimentales sont composées de deux compartiments : un biotope mixte avec le substrat et la colonne d'eau, et la composante biologique. Nous avons utilisé des bacs en plastique qui ont été préalablement rincés à l'eau douce durant 24h.

Pour chaque bac, nous avons mis une résistance de 300 Watts afin de maintenir une température constante. Au fond des bacs, une couche de sable ultra pur d'environ 5 cm est déposée pour permettre aux organismes de s'enfouir (Figure 1). Les bacs sont remplis avec 50 L d'eau du réseau puis sont mis à buller pendant 24h pour déchlorer l'eau, avant d'introduire la composante biologique.

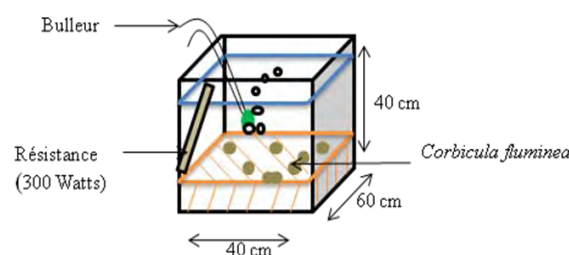


Figure 1 : Schéma d'une unité expérimentale

2.2.2 La composante biologique

Des *C. fluminea* ont été prélevés dans la rivière Isle à Saint Seurin et furent stabilisés un mois en animalerie à la station marine. Au cours des phases d'acclimatation et de contamination, les organismes ont été nourris deux fois par semaine à partir d'une culture d'algue de *Scenedesmus subspicatus* cultivées en laboratoire. La production d'algues a été réalisée dans des erlenmeyer en verre de 3L, dans un milieu de culture « Dauta ». Puis les apports ont été quantifiés par des mesures indirectes de chlorophylle « a » à 750 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Pour chaque apport, il y avait 5 µg de chlorophylle pour 15 individus. L'activité de filtration des mollusques est estimée en moyenne entre 5 et 10 L/individu/jour (Den Hartog et al., 1992), par conséquent les algues ne sont présentes qu'un bref moment dans la colonne d'eau.

2.2.3 Protocole expérimental

Lors de l'expérience six conditions furent étudiées : deux témoins, deux unités à 4 µg/L (ppb) de Ni, et deux autres à 40 µg/L de Ni pendant trois semaines. Les niveaux de concentrations en Ni ont été choisis en fonction des données de la littérature, de façon à encadrer les valeurs mesurées en milieu

naturel comme par exemple pour l'estuaire de Seine où les valeurs sont estimées à 4 µg/L (rapport IFREMER, édition 2001), alors qu'aucune donnée n'existe encore pour l'estuaire de la Gironde.

Lors de la première semaine (T0-T7) tous les bacs ont été placés en normoxie (pression ambiante à 21 kPa), puis lors de la seconde semaine (T7-T14), 3 bacs : témoin, 4 µg/L et 40 µg/L ont été placés en hypoxie (régulation à 4 kPa) alors que les 3 autres sont laissés en normoxie (Figure 2). Enfin, lors de la dernière semaine (T14-T21), tous les bacs furent replacés en normoxie, afin de mimer les phases hypoxiques temporaires observées dans l'estuaire de la Gironde.

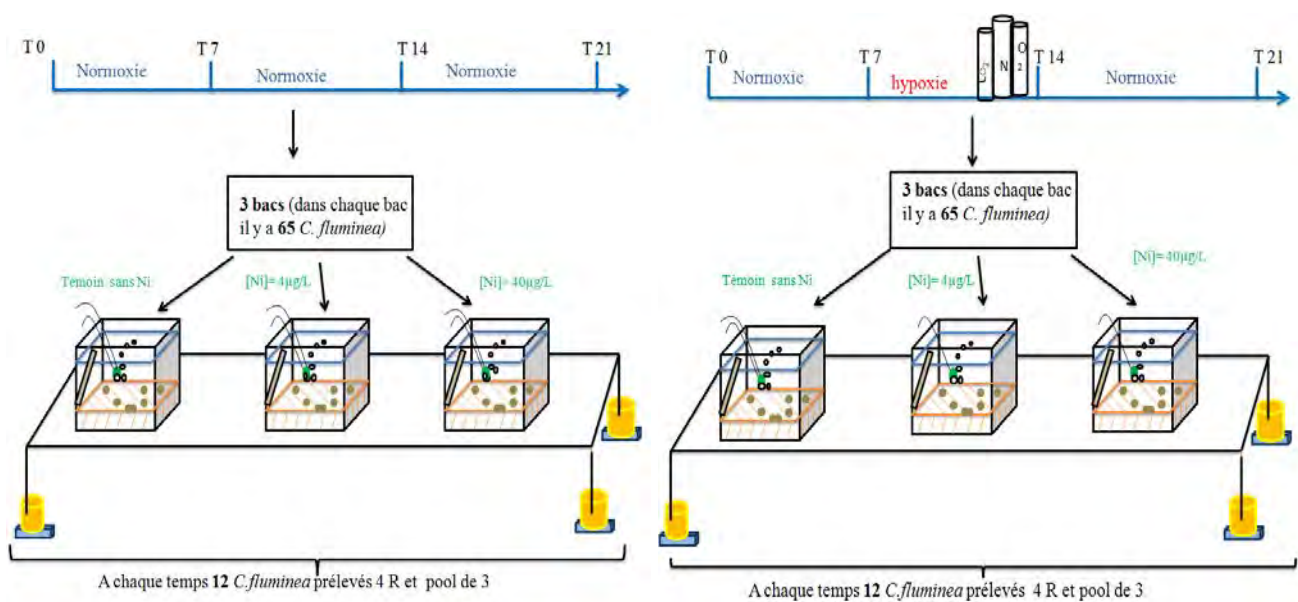


Figure 2 : Schéma du dispositif expérimental

A chaque temps de prélèvement, 12 individus sont prélevés par bac, conduisant à l'analyse de 4 réplicats par condition, constitués de pools de 3 individus chacun. Les individus prélevés sont immédiatement disséqués en 3 organes : branchies, masse viscérale et reste du corps et sont stockés après congélation à -80°C sous azote pour les analyses de MTs, à -80°C dans du RNA later pour les analyses génétiques et à -20°C pour les dosages métalliques. Chaque analyse est réalisée sur le même pool d'individus de façon à pouvoir comparer strictement les différentes réponses entre elles.

2.2.4 Régulation des paramètres physico-chimiques

Au cours de l'expérience, les bacs étaient exposés à une photopériode naturelle, les paramètres physico-chimiques (température, oxygène et pH) ont été suivis quotidiennement. Les *C. fluminea* ont été maintenus dans l'eau douce à 14 ±1,1 °C. Les unités expérimentales étaient en circuit fermée ; pour l'ensemble des bacs, la moitié du volume d'eau total (25L) fut renouvelé une fois par

semaine, grâce à une réserve d'eau chauffée et aérée. Les conditions hypoxiques ont été assurées grâce à l'injection d'un mélange de 3 gaz : N₂, O₂ et CO₂ via des débitmètres massiques (model FC-260, Tylan General), régulé par une unité centrale programmable fabriquée au laboratoire par Pierre Ciret, dans les proportions suivantes : 95,9% d'azote, 4% d'oxygène et 0,1% de dioxyde de carbone.

2.2.5 Procédure de contamination des unités expérimentales

La méthode dite « d'ajouts compensés » a ici été utilisée afin de maintenir des concentrations constantes dans les bacs. Cette démarche consiste à ajouter toutes les 24h, deux fois la décroissance de la concentration en métal dans l'eau. Les premiers jours de contamination, la décroissance est plus marquée car le Ni est adsorbé au matériel (parois des bacs, bulleurs, résistances) et absorbé par la composante biologique. Au fur et à mesure du temps, les sites de fixation des métaux se saturent stabilisant donc la concentration des métaux dans l'eau. Pour cela, tous les jours et pour chaque bac, de l'eau a été prélevée puis analysée au spectromètre d'émission optique couplé à un plasma inductif (ICP-OES), puis les concentrations ont été ajustées en fonction de la décroissance en Ni mesurée dans les bacs. L'ajout de nickel est réalisé au moins deux heures après l'alimentation des bivalves, afin de limiter la contamination par voie trophique.

2.3 Méthodes analytiques

2.3.1 Dosage du nickel par spectrophotométrie d'émission optique couplée à un plasma inductif (ICP-OES)

- Préparation des échantillons pour le dosage:

Les échantillons biologiques sont préalablement séchés dans des tubes en polypropylène durant 48h à 55°C. Ensuite, les tissus secs sont digérés à l'acide nitrique (HNO₃) chauffé pendant 3h à 100°C puis les digestats sont dilués 5 fois dans de l'eau ultra pure. Afin de valider cette méthode de dosage, un échantillon de référence certifié (TORT-2 : hépatopancréas de homard) dont la concentration en nickel totale est connue (2,50±0,19 mg/Kg) est utilisé et soumis au même traitement que les échantillons biologiques. De plus, des blancs (acide pur) sont effectués afin de voir une éventuelle contamination de l'acide nitrique.

Quant au dosage du Ni dans l'eau, les échantillons sont acidifiés entre 2-20% par de l'acide nitrique afin d'optimiser la lecture d'absorbance au spectromètre d'absorption atomique. Enfin, comme précédemment, des échantillons certifiés et des blancs sont minéralisés pour chaque série de dosage.

- Dosage du Ni:

Le dosage des échantillons a été réalisé par spectrométrie d'absorption optique. Cette technique d'analyse est basée sur la dissociation des molécules thermiquement en atomes et en ions, et de leurs états excités. Les atomes à l'état fondamental absorbent une partie de l'énergie du plasma et passent dans un état excité. Durant l'absorption, l'électron de la couche périphérique passe une couche supérieure d'énergie plus élevée. L'atome est instable et libère de l'énergie sous forme d'une radiation lumineuse, appelée raie atomique. Ce principe est identique pour les ions, à la différence que la transition d'émission est appelée raie ionique. Les radiations lumineuses émises sont quantifiées en ICP, et l'intensité dépend directement de la concentration de l'élément dans l'échantillon et des solutions d'étalon.

L'échantillon est introduit dans la chambre à nébulisation, par l'intermédiaire du passeur et de la pompe péristaltique, où l'échantillon est nébulisé par l'argon, gaz inerte. L'aérosol formé de microgouttelettes est expédié dans une torche à plasma d'argon à très haute température (10 000°C) pour atomiser, ioniser la plupart des éléments. Après excitation des ions et des atomes contenus dans l'échantillon, une lumière est émise avec une longueur d'onde caractéristique. La lumière est transmise par l'intermédiaire du système optique vers un détecteur qui permet le dosage. La limite détectable du nickel est de 1 µg/L.

2.3.2 Dosages des métallothionéines (MTs)

Les métallothionéines des branchies et de la masse viscérale sont dosées par la méthode de saturation par le mercure inorganique sous atmosphère d'azote, couplée à un dosage de Hg par spectrophotométrie d'absorption atomique par traitement thermique sous flux d'O₂ (LECO AMA 254, Altec, Prague, République Tchèque). Les MTs ont un degré d'affinité plus important à l'égard de certains métaux (Hg > Cu > Ag > Bi > Cd > Pb > Zn > Co > Fe). Le principe est basé sur l'affinité du Hg pour les métallothionéines et sa capacité de déplacement des autres métaux fixés sur ces protéines (Cu, Cd, Zn ...). La concentration en MTs est donc estimée à partir de la quantité de Hg fixée à ces dernières. Elle sera donc mesurée en équivalent nmol de sites de fixation Hg par gramme de poids frais. La méthode de dosage du Hg employée permet de doser le mercure total présent dans un échantillon liquide ou solide. Les différentes formes chimiques du mercure contenues dans l'échantillon sont libérées et atomisées grâce à un flux d'oxygène à 150°C. Ce mercure atomisé va s'amalgamer avec le piège d'or contenu dans la machine, puis sera chauffé à 800°C pour être acheminé jusqu'à la chambre de lecture où l'absorbance sera mesurée. La longueur d'onde spécifique au mercure est : 253,7 nm. Le mercure va absorber la lumière de façon proportionnelle à sa concentration dans l'échantillon. La limite de détection de l'appareil est de 1 ng de mercure.

Tout comme le dosage à l'ICP, un échantillon de référence (TORT 2) dont la concentration en mercure total est connue ($0,27 \pm 0,06$ ppm) est utilisé.

2.3.3 Mesure de l'expression génétique

2.3.3.1 Choix des gènes

Sept gènes furent sélectionnés pour *C. fluminea*, dont la β actine qui sert de référence. Les six autres gènes codent pour des protéines impliquées dans les mécanismes de défense, *sod* (superoxyde dismutase cytoplasmique), *cat* (catalase), *gst* (glutathion-s-transférase) codent pour des protéines anti-oxydantes, *mt* (métallothionéine) pour la chélation des métaux, *cox1* (sous-unité 1 de la cytochrome c oxydase) intervient dans le métabolisme mitochondrial ainsi que le gène ribosomique 12S qui est un marqueur du nombre de mitochondries (Renault et al., 2008).

2.3.3.2 Extraction des ARN totaux

L'extraction des ARN totaux a été réalisée grâce à un kit « Absolutely RNA extraction » (Stratagen Agilent) à partir de 20 à 40 mg de de branchie et de masse viscérale. Les échantillons sont placés dans des tubes eppendorf avec une solution de β -mercapto-éthanol et du tampon de lyse puis sont broyés. Le broyat est ensuite placé sur une première colonne et est centrifugé à 13500 rpm (8000 g) pendant 5 minutes à température ambiante, cette étape permet de retenir les débris cellulaires (membrane...). Le filtrat est mélangé avec une solution de phénol-chloroforme alcool isoamilique (25 :24 :1) sous sorbonne puis centrifugé, la phase aqueuse est récupérée, afin de garder les acides nucléiques et d'éliminer les protéines hydrophobes et amphiphiles. De l'éthanol à 75% (dilution avec de l'éthanol absolu et de l'eau DEPC) fut ajouté à la phase aqueuse pour favoriser les liaisons entre les acides nucléiques et la colonne d'affinité (fixe l'ADN et l'ARN). Après centrifugation, la colonne est nettoyée avec une solution faiblement concentrée en sel. Pour éliminer toute trace d'ADN une solution de DNaseI est appliquée sur la colonne puis est incubée à 37°C. Après 15 minutes au bain marie, deux lavages sont effectués pour éliminer l'ADN. Les colonnes sont placées dans d'autres tubes où l'ARN sera décroché par une solution d'éluion préalablement chauffée à 60°C.

2.3.3.3 Rétro-transcription (RT)

La RT permet d'obtenir des ADN complémentaires à partir des ARN ceci grâce à au kit « Stratascript first strand synthesis system ». Dans des tubes de 0,2 mL, le mélange suivant a été réalisé 1 μ L d'oligo dT (1 μ M), 1 μ L d'hexanucléotides (1 μ M), 0,8 μ L d'une solution de dNTP (10 mM), 2 μ L de tampon d'activité 10x et enfin 14 μ L de la solution d'ARN purifié. Le tout est chauffé à 65 °c dans le thermocycleur pendant 5 minutes. Ensuite, 0,1 μ L de Réverse Transcriptase

(1 U/ μ L) a été ajoutée ainsi que la RNase block (0,5 μ L, 8 U/ μ L) et le mélange a été incubé à 42°C pendant 1 heure. Les échantillons ont ensuite été stockés à -20°C.

2.3.3.4 PCR-quantitative

La PCR quantitative a été réalisée avec le MX3000P (Stratagene) qui est un thermocycleur permettant le suivi en temps réel de l'amplification des ADNc grâce à l'ajout d'un agent intercalant fluorescent dans le milieu réactionnel: le SyberGreen. La fluorescence est alors détectée à 530 nm par un spectrophotomètre intégré à l'appareil et mesurée à la fin de chaque cycle. La quantité de fluorescence mesurée est donc en relation avec la quantité de produits d'amplification obtenus, qui est elle-même proportionnelle à la quantité d'ADNc initial.

Chaque réaction de PCR est réalisée dans des microplaques de 96 puits en utilisant le kit « Billant III Ultra fast Sybr green QPCR mastermix ». Ce kit contient un tampon 2x (tampon d'activité, *Taq* polymérase, MgCl₂, dNTP, et le Syber green). Un mix d'amorce est préparé pour chaque gène (2 μ M final d'amorces sens et anti sens). Dans chaque puits de la microplaque il y a 17 μ L de mix réactif 2X dilué, 2 μ L de mix d'amorce du gène étudié et 1 μ l d'ADNc.

La PCR commence par une étape d'activation de l'enzyme à 95°C pendant 10 min, puis 50 cycles de PCR (95°C, 30s ; 60°C, 30s ; 72°C, 30s) sont réalisés.

Une analyse par courbe de fusion a ensuite été menée par augmentation progressive de la température de 60°C à 95°C ; la fluorescence étant mesurée entre chaque transition de température (0,5°C/seconde). Cette étape a permis de vérifier la qualité des amplifications obtenues dans chaque tube.

La variable mesurée pour la quantification du taux de transcription est le cycle d'entrée en phase exponentielle. En effet, ce paramètre, appelé « Ct » est proportionnel à la quantité d'ADNc cible présent initialement. Celle-ci est d'autant plus grande que le cycle d'entrée en phase exponentielle est précoce. Afin de pouvoir comparer les résultats entre eux, la valeur de « Ct » obtenue pour la β actine a été retranché à la valeur du « Ct » des autres gènes. Un « Δ Ct » est alors obtenu. La différence des moments de sortie (Δ Ct) entre le gène de référence et le gène d'intérêt est calculée selon la méthode décrite par Livak et Schmittgen (2001), ce qui permet de savoir si un gène est induit ou réprimé.

2.3.4 Traitement des données

Afin d'analyser l'effet des contaminants pour chaque temps, le test non paramétrique de Kruskal Wallis a été appliqué pour l'analyse de la bioaccumulation, la réponse des métallothionéines, ainsi

que pour la génétique. Lorsque le test conclut à une différence entre les variables analysés, le test de Wilcoxon a été utilisé afin de connaître les paires de variables qui sont différentes.

Pour l'ensemble des analyses statistiques, le seuil de significativité est fixé à $\alpha = 0,05$ et a été réalisé grâce au logiciel R.

3 RESULTATS

3.1 Suivi métallique durant la phase de contamination

Grâce à la méthode dite « d'ajouts compensés », les *C.fluminea* ont été maintenus à une contamination stable en nickel dans le temps. Les unités expérimentales témoin n'ont pas été contaminées et se trouvent en dessous du seuil de détection de l'ICP-OES.

Tableau I : Concentration métallique moyenne de l'eau ($\mu\text{g/L} \pm \text{ET}$) dans les six unités expérimentales lors des 21 jours de contamination

	Ni ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
UE témoin	<dl
UE 4 $\mu\text{g/L}$	4,75 \pm 1,8
UE 40 $\mu\text{g/L}$	40,60 \pm 1,42
UE témoin H	<dl
UE 4 $\mu\text{g/L}$ H	5,06 \pm 2
UE 40 $\mu\text{g/L}$ H	40,68 \pm 1,47

3.2 Bioaccumulation dans les organes

La bioaccumulation en nickel chez *C.fluminea* (branchies, masse viscérale, reste du corps) a été analysée à T0, T7, T14 et T21. A T14 les bacs ont été séparés en deux conditions normoxie et hypoxie. Les unités subissant l'hypoxie ont une appellation avec un « H », afin de les différencier des unités restées tout au long de la manipulation en normoxie.

La figure 3 montre de manière générale que les trois ensembles tissulaires à T0 présentent une concentration très proche de 0.

L'utilisation de lettres différentes sur les graphiques met en évidence une différence significative entre les conditions à chaque temps de prélèvement ($p < 0,05$; test de Kruskal Wallis et test de Wilcoxon).

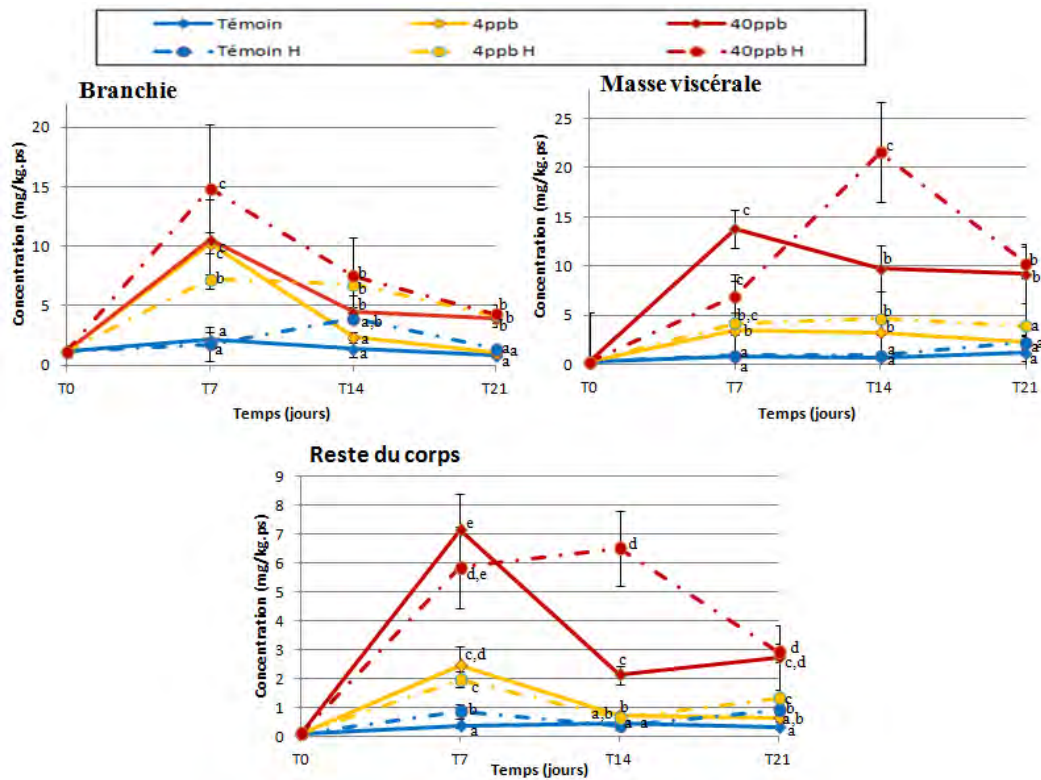


Figure 3 : Bioaccumulation du nickel au niveau des trois ensembles tissulaires de *C. fluminea* en fonction du temps (moyennes \pm erreur standard ; n=4).

- **Bioaccumulation à T7 (normoxie pour toutes les conditions)**

Après 7 jours de contamination, les branchies des organismes exposés à 4 et 40 $\mu\text{g/L}$ ont une plus forte concentration en nickel par rapport aux témoins (respectivement $8,7 \pm 2,2$; $12,7 \pm 2,9$ et $1,9 \pm 0,9$ mg.kg^{-1}). Les unités à 4 $\mu\text{g/L}$, 40 $\mu\text{g/L}$ et 40 $\mu\text{g/L}$ H ne présentent pas de différences significatives entre elles, avec des concentrations mesurées les plus élevées. Alors que la condition 4 $\mu\text{g/L}$ H est significativement différente de 40 $\mu\text{g/L}$ et 40 $\mu\text{g/L}$ H, avec des valeurs plus basses.

La bioaccumulation mesurée chez les individus exposés à 4 $\mu\text{g/L}$ dans la masse viscérale est d'environ $3,85 \text{ mg.kg}^{-1}$, $10,35 \text{ mg.kg}^{-1}$ pour les individus dans les bacs à 40 $\mu\text{g/L}$ et de $0,85 \text{ mg.kg}^{-1}$ pour les témoins. Tout comme pour les branchies, ces résultats montrent que la bioaccumulation est étroitement dépendante du niveau de contamination appliqué à la colonne d'eau. Les deux conditions à 40 $\mu\text{g/L}$ et celle à 4 $\mu\text{g/L}$ H sont statistiquement identiques.

Dans le reste du corps, les individus exposés aux deux pressions métalliques ont plus accumulé le nickel par rapport aux témoins (témoin $\sim 0,59 \text{ mg.kg}^{-1}$; 4 $\mu\text{g/L} \sim 2,26 \text{ mg.kg}^{-1}$; 40 $\mu\text{g/L} \sim 6,48 \text{ mg.kg}^{-1}$).

- **Bioaccumulation à T14**

- ✓ Condition en normoxie

Pour les branchies, la concentration chez le témoin reste proche de zéro, et celles de 4 µg/L et 40 µg/L diffèrent du témoin, avec des concentrations mesurées respectivement de 2,3 mg.kg⁻¹ et 4,4 mg.kg⁻¹. Un effet dose est observé (les individus exposés à la forte concentration, sont ceux qui ont le plus bioaccumulé).

Concernant la masse viscérale, pour les deux concentrations testées, l'accumulation du nickel chez *C.fluminea* ne diffère pas statistiquement.

Le graphique illustrant la bioaccumulation du nickel dans le reste du corps, montre le même effet qu'au niveau des branchies (UE à 4 µg/L~0,72 mg.kg⁻¹; UE à 40 µg/L~2,1 mg.kg⁻¹).

- ✓ Condition en hypoxie

Après une semaine d'hypoxie, les individus témoins ont légèrement plus bioaccumulé au niveau branchial que les individus en normoxie. Aucune différence significative pour la masse viscérale et le reste du corps n'est observée.

Contrairement à la normoxie, la bioaccumulation au niveau des branchies n'est pas significativement différente pour le témoin et les deux concentrations testées en nickel.

A l'inverse pour la masse viscérale, la concentration dans les *C.fluminea* exposés à 4 µg/L est de 4,7 mg.kg⁻¹, et celle pour les organismes exposés à 40 µg/L est de 21,5 mg.kg⁻¹, avec uniquement pour la condition à 40µg/L une différence significative comparativement à la même condition en normoxie. Un effet dose significatif est observé, plus la pression de contamination est élevée plus la bioaccumulation est importante.

Pour le reste du corps, les résultats obtenus pour la contamination à 4 µg/L sont analogues à ceux du témoin. En revanche, la concentration mesurée pour les organismes exposés à 40 µg/L est 6 fois supérieure à celle mesurée chez le témoin, avec là encore un effet significatif de l'hypoxie sur la bioaccumulation du Ni.

- **Bioaccumulation à T21 (retour à des conditions normoxiques)**

- ✓ Condition normoxie

Après 21 jours de contamination, la bioaccumulation du témoin est similaire à la contamination à 4 µg/L, et l'unité exposé à 40 µg/L présente de plus fortes concentrations en nickel pour les 3 organes.

✓ Condition hypoxie

Les organismes témoins soumis à l'hypoxie ont la même concentration en nickel que les témoins normoxie au niveau branchial. Les palourdes à 4 µg/L et 40 µg/L ne sont pas différentes statistiquement l'une de l'autre, mais le sont du témoin. Comme au niveau des branchies en normoxie, en hypoxie il y a un effet dose. Pour la masse viscérale et le reste du corps les individus qui ont subi l'hypoxie, ont les mêmes concentrations en nickel que ceux qui ont été en normoxie.

3.3 Les métallothionéines

Les concentrations en métallothionéines (MTs) chez *C.fluminea* en fonction du temps pour les différentes conditions pour deux ensembles tissulaires sont présentées sur le Figure 4. Des lettres différentes sur les graphiques montrent une différence significative entre les conditions à chaque temps de prélèvement ($p < 0,05$; test de Kruskal Wallis et test de Wilcoxon).

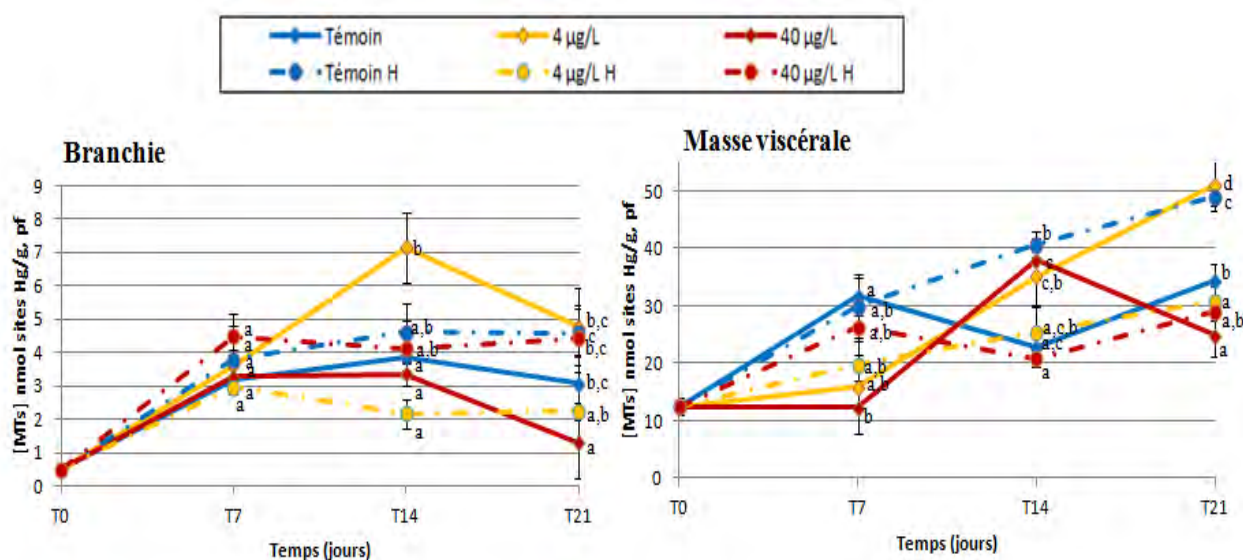


Figure 4 : Concentrations en métallothionéines dans les deux ensembles tissulaires, branchie et masse viscérale de *C.fluminea*, en fonction du temps pour les différentes conditions (moyenne±erreur standard ;n=4).

La masse viscérale est l'organe le plus concentré en MTs, avec des valeurs comprises entre 10 et 50 nmol sites Hg/g.pf alors que les concentrations dans les branchies sont inférieures à 9 nmol sites Hg/g.pf.

Après 7 jours de contamination, la réponse des MTs dans les deux organes ne sont pas significativement différentes des témoins.

Lors de la seconde semaine d'exposition pour les bacs en normoxie, la quantité de MTs dans la condition témoin et 40 µg/L sont identiques alors que celle dans la condition 4 µg/L est presque

deux fois plus importante au niveau branchial. La quantité de MTs hépatique quant à elle est identique pour les trois conditions ($p < 0,05$).

Concernant les bacs en hypoxie, la concentration en MTs est analogue pour les trois conditions dans les branchies à T14 et seule la condition à 40 µg/L dans la masse viscérale est différente du témoin, avec une concentration significativement plus faible (inhibition de synthèse de ces protéines ou dégradation prématurée).

A la fin de la contamination, il y a une diminution de la quantité des MTs dans les deux organes pour la concentration à 40 µg/L en normoxie, 24 nmol sites Hg/g,pf pour les branchies et 1,3 nmol sites Hg/g,pf dans la masse viscérale. La quantité de MTs à 4 µg/L est similaire à celle du témoin pour les branchies, et elle est supérieure au témoin dans la masse viscérale.

A T21 pour les conditions ayant subi l'hypoxie, les niveaux de MTs mesurés dans les branchies témoin et exposées à 40 µg/L sont identiques, alors qu'à 4 µg/L, deux fois moins de MTs sont mesurées par rapport au témoin. Dans la masse viscérale, il y a deux fois moins de MTs dans les unités à 4 et 40 µg/L vis-à-vis du témoin (à nouveau inhibition ou dégradation de ces protéines).

3.4 Réponse génétique

Tableau II : Facteur d'expression basal de T0.

Organes	Gènes	T0
Branchies	<i>sod</i>	0,1
	<i>cat</i>	0,01
	<i>gst</i>	5
	<i>mt1</i>	23
	<i>cox1</i>	0,002
	12S	199
Masse viscérale	<i>sod</i>	0,1
	<i>cat</i>	0,2
	<i>gst</i>	12
	<i>mt1</i>	93
	<i>cox1</i>	0,003
	12S	219

Le tableau suivant illustre l'expression génétique basale de *C.fluminea* pour les deux ensembles tissulaire, branchie et masse viscérale. Globalement, le niveau d'expression des gènes étudiés est plus important dans la masse viscérale.

- Effet de la pression métallique

Tableau III : Facteurs d'expression des six gènes étudiés chez *C.fluminea* par rapport aux témoins en normoxie (>2 : induction, <0,5 : répression, moyennes \pm erreur standard ; n=4)

Organes	Gènes	Effet du Ni en normoxie					
		Facteur induction par rapport témoin normoxie					
		T7		T14		T21	
	4 μ g/L	40 μ g/L	4 μ g/L	40 μ g/L	4 μ g/L	40 μ g/L	
Branchies							
	<i>sod</i>	3	2,3	0,3	0,3	/	0,4
	<i>cat</i>	/	/	0,1	0,4	/	/
	<i>gst</i>	/	/	0,3	0,3	/	/
	<i>mt1</i>	/	/	0,2	0,1	/	/
	<i>cox1</i>	3	/	/	/	/	0,4
	12S	/	/	/	0,4	/	0,3
Masse viscérale							
	<i>sod</i>	/	/	/	0,3	/	/
	<i>cat</i>	/	/	/	6	/	/
	<i>gst</i>	/	/	/	3	/	/
	<i>mt1</i>	/	/	/	2	/	/
	<i>cox1</i>	/	/	/	/	/	/
	12S	/	/	/	/	/	/

/: identique au niveau des individus du témoin

Au début de la contamination (T7), les organismes présentent peu de différence au niveau de la réponse génétique pour les branchies par rapport au témoin. A 4 μ g/L, seule une induction du gène *cox1* est observée au niveau du métabolisme mitochondrial, ainsi que le gène de la *sod*, signant la présence d'un stress oxydant. A 40 μ g/L, seule une induction de l'expression de *sod* est mesurée, marquant également un stress oxydant. Aucune réponse n'est observée dans la masse viscérale.

Après deux semaines de contamination (T14) dans les branchies, les gènes codant pour les protéines anti-oxydantes et les protéines de détoxication sont sous exprimés pour les deux pressions de contamination. La seule différence concerne la répression du gène 12S pour les individus exposés à 40 μ g/L. A l'inverse, dans la masse viscérale, les individus exposés à 4 μ g/L ne présentent pas de réponse en termes d'expression génétique, alors que les individus exposés à 40 μ g/L montrent une surexpression du gène *cat*, *gst*, *mt1*, de même qu'une diminution de *sod*.

Suite à une exposition au nickel pendant 21 jours, le tableau montre une absence de réponse pour les *C. fluminea* exposées à 4 μ g/L. Dans l'unité exposée à 40 μ g/L, les individus présentent une répression des gènes du métabolisme mitochondrial, mais également du gène codant pour la *sod*.

- Effet de l'hypoxie

Tableau IV : Facteurs d'expression des six gènes étudiés chez *C.fluminea* en hypoxie par rapport à la normoxie (>2 : induction, <0,5 : répression, moyennes \pm erreur standard ; n=4)

Organes	Gènes	Effet de l'hypoxie					
		Facteur induction hypoxie/normoxie					
		T14			T21		
	témoin hypoxie	4 μ g/L	40 μ g/L	témoin hypoxie	4 μ g/L	40 μ g/L	
Branchies							
	<i>sod</i>	0,2	/	/	/	/	4
	<i>cat</i>	0,1	0,2	/	0,3	0,4	2,1
	<i>gst</i>	0,1	/	/	/	/	2,5
	<i>mt1</i>	0,04	/	/	/	3	3,4
	<i>cox1</i>	/	0,1	/	0,2	0,2	9
	12S	/	/	/	0,2	0,3	3
Masse viscérale							
	<i>sod</i>	0,3	/	/	/	/	/
	<i>cat</i>	14	11	/	/	/	/
	<i>gst</i>	2	/	/	2,5	/	/
	<i>mt1</i>	/	/	/	7	/	/
	<i>cox1</i>	2,5	3	/	0,4	0,3	18
	12S	/	/	/	/	/	/

/: identique au niveau des individus exposés en normoxie

Après une semaine d'hypoxie, les organismes non contaminés voient dans leurs branchies une diminution de l'expression des gènes codant pour les protéines anti-oxydantes et détoxifiantes. Cette réponse est proche de celle des individus exposés au nickel après 14 jours à 4 μ g/L. En effet, nous pouvons noter une répression de l'activité mitochondriale couplée à la répression de la *cat* au niveau branchial. Au niveau de la masse viscérale pour les organismes témoins et exposés à 4 μ g/L, le métabolisme mitochondrial a augmenté ainsi que la réponse génétique des protéines anti-oxydantes. A 4 μ g/L, seules la catalase et la sous-unité 1 de la cytochrome c oxydase sont induites. Comme pour les branchies, aucune réponse n'est observée à 40 μ g/L dans la masse viscérale.

Après une semaine d'hypoxie puis de normoxie (T21), la réponse génétique des organismes témoins indique une diminution du métabolisme mitochondrial pour les branchies. La réponse obtenue pour les organismes contaminés à faible concentration présente de manière générale les mêmes réponses que les témoins pour les branchies, hormis une surexpression de la *mt1*. A 40 μ g/L, tous les gènes dans les branchies sont induits. Pour la masse viscérale, la réponse génétique met en avant une diminution du métabolisme mitochondrial, et une augmentation du gène *mt1* et de la *gst*. En revanche, après contamination par le Ni, il y a une diminution du gène *cox1* dans cet organe à 4 μ g/L et une surexpression au contraire à 40 μ g/L.

- Effet du nickel couplé à l'hypoxie

Tableau V : Facteurs d'expression des six gènes étudiés chez *C.fluminea* par rapport au témoin hypoxie (>2 : induction, <0,5 : répression, moyennes \pm erreur standard ; n=4)

Organes	Gènes	Effet du Ni en hypoxie			
		Facteur d'induction par rapport au témoin hypoxie			
		T14		T21	
		4 μ g/L	40 μ g/L	4 μ g/L	40 μ g/L
Branchies					
	<i>sod</i>	/	/	/	2,6
	<i>cat</i>	0,2	0,4	/	3,6
	<i>gst</i>	/	/	/	/
	<i>mt1</i>	/	2,8	/	/
	<i>cox1</i>	0,08	/	/	16
	12S	/	/	/	5,5
Masse viscérale					
	<i>sod</i>	/	/	/	/
	<i>cat</i>	/	0,13	19	10
	<i>gst</i>	/	/	/	/
	<i>mt1</i>	/	2,7	/	0,34
	<i>cox1</i>	/	/	2,6	31
	12S	/	2,6	/	/

/: identique au niveau des individus du témoin

Suite à une semaine d'hypoxie, les organismes contaminés à 4 μ g/L ont une diminution du gène *cox1* et *cat*. La réponse génétique des individus exposés à 40 μ g/L met en avant une augmentation des gènes des métallothionéines et une répression de la catalase. Concernant la masse viscérale, la catalase est toujours réprimée et les métallothionéines induites, de même que le gène 12S.

Après une semaine d'hypoxie suivie d'une semaine de normoxie (T21), les individus exposés à 4 μ g/L surexpriment deux gènes dans la masse viscérale (*cat* et *cox1*). Le même type de réponse est observé dans cet organe après exposition à 40 μ g/L, où une répression de *mt1* est également observée. Dans les branchies de *C.fluminea* exposés à 40 μ g/L, le tableau souligne une forte augmentation du métabolisme mitochondrial et de la réponse des gènes induits dans le stress oxydant.

4 DISCUSSION

L'impact des métaux sur les organismes aquatiques dépend de nombreux facteurs environnementaux (température, pH, concentration en oxygène...). Les études en laboratoire permettent de fixer des paramètres physico-chimiques et de les faire varier. Ces variations permettent d'évaluer et de comprendre la réponse des organismes à ces facteurs et les impacts occasionnés sur les écosystèmes aquatiques.

4.1 Effet de la pression métallique

A l'heure actuelle, il existe une carence d'informations concernant l'effet du nickel sur les organismes aquatiques, et en particulier sur son impact potentiel vis à vis de *C. fluminea*. Peu d'études permettent de réellement déterminer si ce métal est essentiel ou non pour les organismes aquatiques. Il a été démontré qu'il est essentiel pour des plantes ainsi que pour des bactéries (Dixon et al., 1975), mais à notre connaissance, rien n'est décrit en ce sens chez les mollusques bivalves.

Au début de la contamination au nickel chez *C. fluminea*, nos résultats montrent que le nickel est bioaccumulé dans les trois ensembles tissulaires étudiés, avec un effet dose observable. De même, ces données soulignent une concentration plus importante au niveau des branchies et de la masse viscérale, par rapport au reste du corps. De même, Alikhan et son équipe en 1989 ont mesuré le nickel dans différents organes de l'écrevisse. Leurs conclusions indiquaient que les organes les plus concentrés étaient les branchies et le tube digestif. Pour la réponse protéique des métallothionéines à T7, il n'y a pas de différence pour les diverses conditions. Elles ne peuvent donc pas jouer leur rôle de protéines de détoxification et expliquent en partie la forte bioaccumulation après 7 jours d'exposition. Au niveau des réponses génétiques, les gènes *cox1* et *sod* sont surexprimés. Le gène *cox1* code pour la sous unité 1 de la cytochrome c-oxydase qui permet, lors de la respiration mitochondriale, le transfert des électrons du cytochrome c à l'oxygène pour la production d'ATP (Achard-Joris et al. 2006). Le Cd, métal divalent tout comme le nickel, est capable de perturber ce transfert d'électrons et d'entraîner la synthèse de ROS pouvant être à l'origine d'atteintes de l'ADN. Pour cette raison, il est souvent observé une augmentation des gènes *cox1* et *sod* face à une contamination au cadmium. Pour le nickel, l'expression génétique mesurée chez *C. fluminea* à T7 suggère le même effet que celui du cadmium.

Après deux semaines d'exposition au Ni, l'effet dose est toujours observable, la quantité de MTs est importante pour la faible concentration testée alors qu'il n'y aucune réponse des MTs pour la solution à 40 µg/L. Pour les individus exposés, les résultats de l'expression génétique indiquent une répression des gènes codant pour les protéines anti-oxydantes ainsi que du métabolisme

mitochondrial. A l'inverse, une augmentation du gène *mt1* pour les individus du bac à 40 µg/L est observée au niveau de la masse viscérale. Ces résultats obtenus sont en accord avec ceux de la littérature, en effet Dondero et al en 2011 ont remarqué que le Ni réprimait plus les gènes qu'il ne les induisait.

Le fait d'avoir une induction du gène des MTs non suivie de la synthèse protéique, peut en partie s'expliquer par un décalage dans le temps entre l'expression du gène et la synthèse protéique, ce qui a déjà été remarqué plusieurs fois dans la littérature, notamment à court terme (Paul-Pont et al, 2010). La non corrélation, entre l'induction du gène des métallothionéines et la réponse protéique, indique que la synthèse des métallothionéines chez les coques est régulée au niveau transcriptionnel mais également traductionnel. Ce décalage dans le temps a été observé également pour la moule *Mytilus edulis* (Lemoine et Laulier, 2003). Une autre hypothèse pourrait expliquer l'induction du gène *mt1* sans la réponse protéique. En effet, à forte concentration, le Ni pourrait perturber la traduction des protéines ce qui a déjà été montré chez la perchaude (Pierron et al., 2009) ou pour le Cd chez le poisson zèbre *Danio rerio* (Gonzalez et al., 2006). La dégradation des protéines pourrait alors être exacerbée en présence de Ni, contrairement à leur synthèse, ce qui conduirait à une diminution des concentrations en ces protéines.

Lors de la dernière semaine d'exposition, les individus exposés à 4 µg/L sont revenus à un niveau stable, leur bioaccumulation pour les trois ensembles tissulaires ne diffère pas de ceux du témoin de même pour l'expression génétique. Ainsi, après 21 jours d'exposition à 4 µg/L, les organismes ont réussi à mettre en place des mécanismes de régulation des concentrations en Ni, au même titre qu'un métal essentiel. Cette réponse ressemble étrangement à celle observée pour les *C.fluminea* exposés au zinc, métal essentiel reconnu chez cette espèce (Marie et al., 2006). Les MTs sont en effet capables de réguler l'homéostasie du zinc (Viarengo and Nott, 1993).

Pour la plus forte concentration étudiée (40 µg/L), les organismes ne sont pas revenus à un niveau stable, leur quantité de MTs au niveau des branchies et de la masse viscérale est inférieure aux témoins. L'expression génétique ne met en avant qu'une répression du métabolisme mitochondrial et du gène *sod* dans les branchies. La non réponse des MTs à cette concentration, voire la diminution de leurs concentrations peut indiquer la mise en place potentielle d'autres processus de détoxification pour éliminer ce métal. En effet, une augmentation du nombre de protéines transmembranaires des transporteurs ABC a été montrée après une exposition au Cd ou au Zn (Achard-Joris et al., 2004).

4.2 Effet de l'hypoxie

De nombreux systèmes aquatiques sont sujets à des phases hypoxiques, notamment lors de périodes estivales. C'est le cas de l'estuaire de la Gironde. Dans cette étude, l'alternance imposée, une semaine d'hypoxie suivie d'une semaine en normoxie, fut choisie afin de reproduire les conditions de l'environnement. En général, les périodes hypoxiques ne durent pas dans le temps.

Pour les *C.fluminea* en condition non contaminée, soumis à l'hypoxie, leur capacité à maintenir constante leur consommation en oxygène grâce à l'ajustement de leur ventilation et non pas de leur débit cardiaque a été démontrée (Tran et al., 2000).

Suite à la semaine d'hypoxie, de manière globale, les organismes ont plus bioaccumulé par rapport aux organismes restés en normoxie. En effet des études montrent que *C.fluminea* en hypoxie lors de contamination se contaminent trois fois plus vite, que celles qui sont en normoxie (Tran D et al., 2001). Ceci fut prouvé également par Pierron et al en 2007 chez la civelle, et par Legeay et al en 2005 à nouveau chez *C. fluminea*. La concentration en MTs chez les témoins soumis à l'hypoxie est supérieure à ceux qui n'ont pas été exposés. Ce phénomène est déjà connu chez *C.fluminea* l'hypoxie engendre l'augmentation des MTs (Legeay 2005). Cette observation peut être justifiée par le fait qu'en plus d'être des protéines de détoxification des métaux, elles ont un pouvoir antioxydant (Thornalley PJ and Vasak, 1985). Ce phénomène a également été observé chez *Crassostrea gigas* (Anderson et al., 1999).

Au niveau de la masse viscérale, pour les témoins et les organismes exposés à 4 µg/L, il y a une induction des gènes codant pour le métabolisme mitochondrial ainsi que des protéines anti-oxydantes. L'hyperventilation par manque d'oxygène favorise la présence de ROS. Pour lutter contre les espèces réactives de l'oxygène, l'organisme met en place des réponses adéquates. Or, ces résultats ne sont pas visibles pour les espèces exposées à 40 µg/L. Dans ce cas, l'effet de la pression de contamination masque probablement les effets de l'hypoxie.

L'expression génétique mesurée à T14 chez les organismes exposés au Ni seul, semble montrer qu'il mime l'effet de l'hypoxie.

Après le passage de la semaine d'hypoxie à la semaine de normoxie, la bioaccumulation mesurée illustre que les individus témoins ont récupéré de l'hypoxie ainsi que ceux contaminés à 40 µg/L, car leur niveau de concentration en Ni dans leur ensemble est redevenue identique à ceux qui n'ont pas subi d'hypoxie. Au niveau protéique, il reste une différence dans la masse viscérale pour les témoins avec une plus forte quantité de MTs ainsi que pour les branchies à 40 µg/L. Puis de manière plus générale, l'expression génétique révèle pour le témoin et les organismes exposés à 4 µg/L, une répression du métabolisme mitochondrial ainsi que des protéines anti-oxydantes. Ceci

serait dû à la semaine d'hypoxie au cours de laquelle les organismes ont dû augmenter leur métabolisme considérablement de façon transitoire, ainsi, après une semaine à nouveau de normoxie, le métabolisme est ralenti de façon à diminuer la production de ROS qui a déjà été intense en phase hypoxique. En ce qui concerne l'unité expérimentale à 40 µg/L, une augmentation de tous les gènes au niveau branchial a été observée. Il semblerait dans ce cas que les répercussions de l'hypoxie au niveau génétique persisteraient une semaine après l'exposition à l'hypoxie chez les organismes.

4.3 Effet du nickel en hypoxie

Le manque d'oxygène en présence de contaminant métallique mène à une augmentation de la ventilation des organismes aquatiques et par conséquent augmente la bioaccumulation du contaminant. Afin de voir l'effet synergique de l'hypoxie couplée à la pression métallique, il faut étudier les réponses observées pour les individus contaminés en hypoxie face aux individus témoins en hypoxie eux aussi.

Tout comme l'étude sur la pression métallique seule du nickel, en hypoxie, un effet dose est remarqué niveau de la bioaccumulation. Les organismes exposés à la forte pression de contamination accumulent le plus. En effet, l'effet de l'hypoxie est d'augmenter la ventilation des organismes, ainsi en contamination par voie directe, il est normal de toujours voir cet effet dose. En revanche la concentration en métallothionéines montre une diminution par rapport au témoin, ceci est dû au fait que les témoins ont eu une forte augmentation des MTs pour faire face aux espèces réactives de l'oxygène. Les hypothèses concernant le décalage dans le temps des MTs sont ici confortées ainsi qu'à forte concentration le nickel puisse perturber la traduction des MTs car les résultats obtenus suggèrent la même chose. De même au niveau génétique, la faible concentration en nickel en hypoxie réprime le métabolisme mitochondrial et le gène codant pour la catalase. A 40 µg/L au niveau de la masse viscérale, le nickel en condition d'hypoxie, augmente le nombre de mitochondries.

Ce qui diffère des résultats en présence de Ni seul, c'est que les organismes exposés à 4 µg/L et à l'hypoxie ne sont pas identiques au témoin. Ici, l'hypoxie a empêché les organismes de retrouver un état semblable au témoin après 21 jours d'exposition. Au niveau de la réponse génétique, pour l'unité à 40 µg/L, il y a une induction du métabolisme mitochondrial et des protéines anti-oxydantes, cette forte induction doit être due à l'effet synergique de la pression métallique et de la semaine d'hypoxie subie.

5 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les résultats obtenus au cours de ce stage montrent de manière générale que la bioaccumulation de Ni est organo-dépendante et qu'elle suit globalement un effet dose. La contamination chronique *via* le Ni à faible dose semble être régulée de la même manière que le zinc.

De plus, une augmentation de la bioaccumulation du Ni en hypoxie est mise en évidence.

Ces analyses en laboratoire soulignent l'importance de l'étude de la bioaccumulation des métaux en hypoxie pour comprendre les variations de la biodisponibilité des métaux, ainsi que leurs impacts.

De ce fait, il est capital de comprendre également le rôle de certains facteurs physicochimiques chez les espèces bioindicatrices. Ces travaux confirment donc la nécessité d'étudier en laboratoire les contaminations aux métaux afin de mieux comprendre la réalité du terrain.

La période de décontamination réalisée à la suite de cette expérience, et non présentée dans ce mémoire, permettra de confirmer la régulation du Ni chez *C.fluminea*. Il serait intéressant de mesurer d'autre part la synthèse des protéines anti-oxydantes étudiées en génétique dans le but de vérifier une possible corrélation entre les réponses génétiques, protéiques et celles des protéines MXR. De plus, il serait intéressant d'étudier la valvométrie afin de vérifier les modulations en termes de ventilation des organismes.

Les résultats de ce stage pourront par la suite être comparés à ceux obtenus sur le terrain, en conditions estivales soumises à la fois à l'hypoxie et aux contaminations métallique notamment en Ni dans la Garonne. Il serait intéressant de voir si les tendances observées sont identiques, et si le Ni représente un contaminant majeur des rejets issus de l'agglomération bordelaise.

6 BIBLIOGRAPHIE

- Achard-Joris, M., Baudrimont, M., Boudou, A., Bourdineaud, J.P.** 2004. Induction of a multixenobiotic resistance protein (MXR) in the Asiatic clam *Corbicula fluminea* after heavy metals exposure. *Aquatic Toxicology*, 67, 347-357.
- Achard-Joris, M., Gonzalez, P., Marie, V., Baudrimont, M., & Bourdineaud, J.** 2006. Cytochrome c oxydase subunit I gene is up-regulated by cadmium in freshwater and marine bivalves. *BioMetals*, 19, 237-244 pp.
- Anderson RS, Patel KM, Roesijadi G**, 1999. Oyster metallothionein as an oxyradical scavenger: implications for hemocyte defense responses. *Dev. Comp. Immunol.* 23, 443-449
- Alikhan, M.A., Bagatto, G., and Zia, S.**1990. The crayfish as a “biological importance of nickel in the food chain. *Fresenius’ J. Anal. Chem.* 352:92-96.
- Baudrimont M.** (1997). Etude du rôle des métallothionéines à l'égard des mécanismes de bioaccumulation du cadmium, du mercure et du zinc par les organismes aquatiques (mollusque bivalve d'eau douce : *Corbicula fluminea*, poissons Cyprinidés) - Approches expérimentales et in situ. Université Bordeaux 1, Talence, Thèse de Doctorat, pp. 230
- Boutier B., Chiffolleau J-F., Jouanneau J.-C., Latouche C. & Philipps I.**, 1989. La contamination de la Gironde par le cadmium. Origine, extension, importance. Rapport Sci Tech. IFREMER, n°14, 105 p.
- Chan J., Huang Z., Merrifield M.E., Salgado M.T., Stillman M.J.**, 2002; Studies of metal binding reactions in metallothioneins by spectroscopic, molecular biology, and molecular modeling techniques. *Coord. Chem. Rev.* 233-234, 319-339.
- Den Hartog C., Van Den Brink F.W.B and Van Der Velde G.**(1992). Why was the invasion of the river Rhine by *Corophium curvispinum* and *Corbicula fluminea* species so successful? *J. Nat. History*, 26, p.1121-1129.
- Dixon NE, Gazzola C, Blakely RL Zerner B** (1975) Jack-bean urease (E.C. 3.5.1.5.3). A metalloenzyme. A simple biological role for nickel. *J Am Chem Soc* 97: 4131-4133.
- Dondero, F., Banni, M., Negri, A., Boatti, L., Dagnino, A., Viarengo, A.** 20011. Interactions of a pesticide/heavy metal mixture in marine bivalves: a transcriptomic assesement. *BMC Genomics*, 12:195.
- Gonzalez, P., Baudrimont, M., Boudou, A., & Bourdineaud, J.** 2006. Comparative effects of direct cadmium contamination on gene expression in gills, liver, skeletal muscles and brain of the zebrafish (*Danio rerio*). *BioMetals*, 19, 225-235 pp.

Ifremer, 2001 Surveillance du Milieu Marin. Travaux du Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin.

INRS, 2009 fiche toxicologique du nickel et ses oxydes.

Islam, M.S., Tanaka, M., 2004. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: A review and synthesis. *Marine Pollution Bulletin* 48, 624-649

Krob HA, Fleischer AB Jr, D'Agostino R Jr, Haverstock CL, Feldman S. Prevalence and relevance of contact dermatitis allergens: a meta-analysis of 15 years of published T.R.U.E. test data. *J Am Acad Dermatol.* 2004 Sep;51(3):349-53

Legeay, A., Achard-Joris, M., Baudrimont, M., Massabuau, J.C., & Bourdineaud J. 2005. Impact of cadmium contamination and oxygenation levels on biochemical responses in the Asiatic clam *Corbicula fluminea*. *Aquatic Toxicology* 74, 242-253

Lemoine, S., Laulier, M., 2003. Potential use of the levels of the mRNA of a specific metallothionein isoform (MT-20) in mussel (*Mytilus edulis*) as a biomarker of cadmium contamination. *Marine Pollution Bulletin* 46, 1450-1455.

Livak, K. J., & Schmittgen, T.D.(2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25,402-408pp.

Marie, V., Gonzalez, P., Baudrimont, M., Bourdineaud, J.P., Boudou, A., 2006. Metallothionein response to cadmium and zinc exposures compared in two freshwater bivalves, *Dreissena polymorpha* and *Corbicula fluminea*. *Biometals* 19, 399-407.

Mouthon J.1981. Sur la présence en France et au Portugal de *Corbicula fluminea* (Bivalvia :Corbiculidae) originaire d'Asie. *Basteria*.45 :109-116.

Pierron, F., Baudrimont, M., Gonzalez, P., Bourdineaud, J.P., Elie, P., Massabuau, J.C.,(2007). Etudes des mécanismes de bioaccumulation du cadmium et des effets toxiques associés à différents stades de vie de l'anguille européenne (*Anguilla anguilla* L.). *Environ.Sci.Technol*, 41, 3005-3011.

Pierron, F., Bourret, V., St-Cyr, J., G.C. Campbell, P., Bernatchez, L., Couture, P., 2009. Transcriptional responses to environmental metal exposure in wild yellow perch (*Perca flavescens*) collected in lakes with differing environmental metal concentrations (Cd,Cu,Ni). *Ecotoxicology*. 18: 620-631.

Paul-Pont I. (2010). Sensibilité et adaptation de populations de bivalves maris soumis à des stress multiples : infestation parasitaire, contamination microbienne et pollution métallique. Université Bordeaux 1, Talence, Thèse de doctorat. 203-205.

- Renault, S., Baudrimont, M., Mesmer-Dudons, N., Gonzalez, P., Mornet and Brison, A.** 2008. Impacts of gold nanoparticule exposure on two freshwater species : a phytoplanktonic alga (*Scenedesmus subspicatus*) and a benthic bivalve (*Corbicula fluminea*).
- Stoghs S.J and Bagchi.,** 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions free radical Biology&Medecine, 18: 321-336.
- Thornalley PJ, Vasak M.** 1985. Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress.kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. Biochim. Biophys. Acta. 872,36-44
- Tran D., Boudou, A., Massabuau, .J.** 2000. Mecanism for maintaining oxygen consumption under varying oxygenation levels in the freshwater clam *Corbicula fluminea*.
- Tran D., Boudou A., Massabuau J.C.** (2001) How water oxygenation level influences cadmium accumulation pattern in the Asiatic clam *Corbicula fluminea* : a laboratory and field study, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 2073-2080.
- Viarengo, A., and Nott, J. A.** 1993. Mechanisms og heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. Comp. Biochem. Physiol. C 104 : 335-372.

ANNEXES

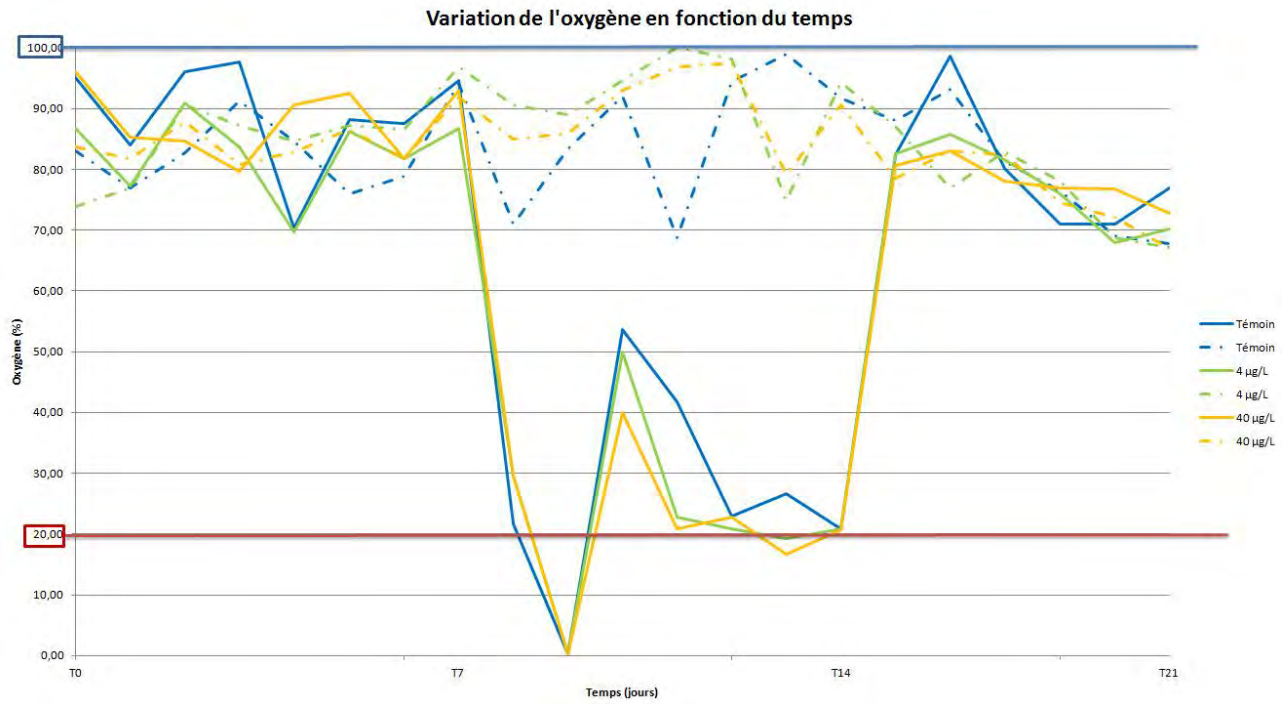
A. COMPOSITION DU MILIEU DAUTA

Milieu de base	mg/L
Na ₂ EDTA	1
FeSO ₄ , 7H ₂ O	1
NaHCO ₃	50
Na ₂ CO ₃	5
MgSO ₄ , 7H ₂ O	25
CaCl ₂ , 2H ₂ O	25

Oligoéléments	mg/L
ZnSO ₄	0,02
CuCl ₂ , 2H ₂ O	0,02
MnCl ₂ , 4H ₂ O	0,4
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0,01
H ₃ Bo ₃	0,001
Na ₂ Mo ₄	0,035

Nutriments	mg/L
KNO ₃	200
K ₂ HPO ₄	25

B. EVOLUTION DE LA CONCENTRATION EN OXYGENE



C. COUPLES D'AMORCES SPECIFIQUES POUR LES SIX GENES DE *C. fluminea*

Gène	Amorces (5'-3')
<i>β-actine</i>	CCTTTACCACAACAGCCGA ^a AGCATAGCCTCAGGGCA ^b
<i>cat</i>	CCTTCAGTGCGTAGTCTGG ^a CCTGTTCTCTGACCGTGG ^b
<i>cox1</i>	GTTGAGAGRGGTGCTGGG ^a TGTAGTCCGAATTAGCTTTTGCG ^b
<i>gst</i>	GCCAGGCTATCCGCTATCT ^a TGTCCACCTTTAGGGCCTC ^b
<i>mt</i>	CGGCTATCTCCCGCA ^a AGCTTTTACCAGAACCAAACAGT ^b
<i>sodMn</i>	CTGTAGGTAGTAAGCGTGCTCC ^a GGATCATTGACGAGATGAAGGC ^b
RNA 12S	AGCATTACTATGTTACGACTTACCTCA ^a AGTTCAGGTAGACGTGTAGGG ^b