

**UNIVERSITÉ DE NANTES**  
**FACULTÉ DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

—  
**ÉCOLE CHIMIE BIOLOGIE**

Année 2006

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Recherche d'indicateurs de l'état physiologique  
de l'annélide polychète endogée *Nereis diversicolor*  
en relation avec la qualité du milieu

—  
**THÈSE DE DOCTORAT**  
**Mention Sciences de la Vie et de la Santé**

**Discipline : Pharmacie**

**Spécialité : Écotoxicologie**

*Présentée  
et soutenue publiquement par*

**Cyril DUROU**

*Le 23 octobre 2006, devant le jury ci-dessous*

<i>Président</i>	Mme VASSEUR, Paule, professeur, Université de Metz
<i>Rapporteurs</i>	Mme VASSEUR, Paule, professeur, Université de Metz M. MINIER, Christophe, professeur, Université du Havre
<i>Examineurs</i>	M. BOUTONNET, Jean-Charles, Head of Toxicology Environment Department, ARKEMA M. SIMONET, François, Sous Directeur de la Connaissance et de la Plannification, Agence de l'Eau Adour-Garonne
<i>Invité</i>	Mr POUCHUS, Yves-François, professeur, Université de Nantes

*Directrice de thèse* Mme MOUNEYRAC, Catherine, professeur, Université de Nantes

*Co-directrice* Mme AMIARD-TRIQUET, Claude, Directrice de Recherche, Université de Nantes

## LISTE DES TRAVAUX

## PUBLICATIONS

## JOURNAUX INTERNATIONAUX AVEC COMITÉ DE LECTURE

**Durou, C.**, Poirier, L., Mouneyrac, C., Gnassia-Barelli, M., Roméo, M., Budzinski, H., Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C. 2007. Biomonitoring in a clean and multi-contaminated estuaries based on biomarkers and chemical analyses in the endobenthic worm *Nereis diversicolor*. *Environmental Pollution*, **Accepted**.

**Durou, C.**, Mouneyrac, C. 2007. Linking steroid hormone levels to sexual maturity index and energy reserves in *Nereis diversicolor* from clean and polluted estuary. *General and Comparative Endocrinology*. **150** (1): 106-113.

**Durou, C.**, Smith, B.D., Roméo, M., Rainbow, P.S., Mouneyrac, C., Mouloud, M., Gnassia-Barelli, M., Gillet, P., Deutsch, B., Amiard-Triquet, C. 2007. From biomarkers to population responses in *Nereis diversicolor*: assessment of stress in estuarine ecosystems. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **Sous presse**, disponible sur <http://www.sciencedirect.com/>

Ait Alla, A., Mouneyrac, C., **Durou, C.**, Moukrim, A., Pellerin, J. 2006. Tolerance and biomarkers as useful tools for assessing environmental quality in the Oued Souss estuary (Bay of Agadir, Morocco). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. **143** (1): 23-29.

Mouneyrac, C., Pellerin, J., Moukrim, A., Ait Alla, A., **Durou, C.**, Viault, N. 2006. In situ relationship between energy reserves and steroid hormone levels in *Nereis diversicolor* (O.F. Müller) from clean and contaminated sites. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **65**(2) : 182-187.

**Durou, C.**, Mouneyrac, C., Amiard-Triquet, C. 2005. Tolerance to metals and assessment of energy reserves in the polychaete *Nereis diversicolor* in clean and contaminated estuaries. *Environmental Toxicology* **20** (1): 23-31.

## COMMUNICATIONS

## COMMUNICATIONS ORALES DANS DES CONGRÈS INTERNATIONAUX

Reydel, J., Mouneyrac, C., Durou, C., Minier, C., Amiard-Triquet, C., Pellerin, J. 2006. Biochemical parameters in the intra-sedimentary deposit-feeder bivalve, *Scrobicularia plana*, in relation to gametogenesis. *Global environment and sustainability sound science in a world of diversity*. SETAC North America 27<sup>th</sup> Annual Meeting, 5-9 novembre 2006, Québec, Canada, accepté.

Amiard-Triquet, C., **Durou, C.**, Jean-Claude Amiard, J.-C., Berthe, T., Billon, G., Budzinski, H., Damiens, G., Debenay, J.-P., Deloffre, J., Denis, D., Denis, L., Ferrero, T., Gillet, P., Gnassia-Barelli, M., Hummel, H., Mouneyrac, C., Ouddane, B., Petit P., Poirier, L., Quillet, L., Roméo, M., Smith, B. D., Sylvestre, F., Thoumelin, G. 2006. Sediments : a key compartment for the assessment of interactions between chemicals and biota in estuaries. *Benthic Ecology Meeting*. Université Laval. Québec, Canada, 8-12 mars 2006.

Mouneyrac, C., Pellerin, J., Ait Alla, J., **Durou, C.**, Moukrim, A. 2005. Approche multi-marqueur à différents niveaux d'organisation biologique chez l'Annélide Polychète *Nereis diversicolor* originaire de sites contaminé et sain de la côte atlantique marocaine. *Problématiques environnementales : le rôle des citoyens, des scientifiques et des décideurs*. 9<sup>e</sup> Colloque annuel du Chapitre Saint-Laurent. Montréal. Québec, 2-3 juin 2005.

**Durou, C.**, Mouneyrac, C., Rainbow, P., Smith, B.D., Gillet, P., M., Mouloud, M., Amiard-Triquet, C. 2005. Linking The Physiological And Population Status Of Worms *Nereis diversicolor* From A Clean And A Multi-polluted Estuary. *The Reason d'être of Environmental Toxicology and Chemistry*. SETAC Europe 15<sup>th</sup> Annual Meeting. Lille, France, 22-26 mai 2005.

Amiard-Triquet, C., Gillet, P., **Durou, C.**, Roméo, M., Rainbow, P., Smith, B.D., Gnassia-Barelli, M., Mouloud, M., Amiard, J.C., Mouneyrac, C. 2004. Régression de la population d'une espèce clé pour le fonctionnement de l'écosystème estuarien : l'Annélide Polychète *Nereis (Hediste) diversicolor* en Seine. *Changes in land uses : consequences on estuaries and coastal zones*. 38<sup>ème</sup> Symposium ESCA. Rouen, France, 13-17 septembre 2004.

Gillet, P., Mouloud, M., **Durou, C.**, Deutsch, B. 2004. Pollution impacts on the populations of *Hediste diversicolor* (Polychaeta, Nereidae) in the bay of Authie and the bay of Seine, France. *VIII International Polychaete Conference*. North American Benthological Society. Madrid, Espagne, 5-9 juillet 2004.

**Durou C.**, Mouneyrac C., Amiard-Triquet C. 2004. Réponses d'une espèce-clé des milieux estuariens, l'annélide *Nereis (=Hediste) diversicolor* (O. F. Müller, 1776), aux variations naturelles du milieu et aux stress chimiques. *21<sup>e</sup> Forum des jeunes océanographes – 1<sup>er</sup> Forum européen des jeunes océanographes*. Union des Océanographes de France, Associazione Italiana di Oceanologia e Limnologia et Observatoire Océanologique de Villefranche-sur-mer, Université Pierre et Marie Curie. Villefranche-sur-mer, France, 13-14 mai 2004.

Amiard-Triquet, C., **Durou, C.**, Gillet, P., Gnassia-Barelli, M., Mouloud, M., Mouneyrac, C., Rainbow, P.S., Roméo, M., Smith, B. D. 2003. What about the ecological value of biochemical responses in worms *Hediste diversicolor* living in a multi-polluted estuary? *Bioindicators for Environmental Management*. 12<sup>th</sup> International Symposium on Biological Indicators. Hong Kong, 2-5 décembre 2003.

Mouneyrac, C., Pellerin, J., **Durou, C.**, Amiard-Triquet, C., Rainbow, P. S. 2003. Progesterone levels in a key species in coastal sediments, the annelid polychaete *Hediste diversicolor*, Aquatic Toxicology Workshop, Ontario, Canada, 28 septembre-1<sup>er</sup> octobre 2003.

Amiard-Triquet, C., Deutsch, B., **Durou, C.**, Gillet, P., Gnassia-Barelli, M., Mouloud, M., Mouneyrac, C., Rainbow, P.S., Roméo, M., Smith, B. D. 2003. The worm *Hediste diversicolor* as a biological model in health assessment of estuarine ecosystems: from biomarkers to population response. *Environmental Contaminants and Biodiversity*. 5<sup>th</sup> Iberian Congress and 2<sup>nd</sup> Iberoamerican on Environmental Contamination and Toxicology, CICTA. Porto, Portugal, 22-24 septembre 2003.

Amiard-Triquet, C., Deutsch, B., **Durou, C.**, Gillet, P., Gnassia-Barelli, M., Mouloud, M., Mouneyrac, C., Rainbow, P.S., Roméo, M., Smith, B.D. 2003. Réserves énergétiques, reproduction et croissance de l'annélide polychète *Hediste diversicolor*: effets potentiels de la salinité et de la contamination chimique. *Les incertitudes en gestion environnementale*. Chapitre Saint-Laurent, 7<sup>ème</sup> Colloque annuel, SETAC-SRA. Montréal, Québec, Canada, 15-16 mai 2003.

#### COMMUNICATIONS AFFICHÉES DANS DES CONGRÈS INTERNATIONAUX

**Durou, C.**, Mouneyrac, C. 2006. Linking steroid hormone levels to sexual maturity index and energy reserves in the ragworm *Nereis diversicolor* from clean and polluted estuaries. *Controversies and Solutions in Environmental Sciences*. SETAC Europe 16<sup>th</sup> annual Meeting. La Haye, Pays-Bas, 7-11 mai 2006.

#### COMMUNICATIONS ORALES CONGRÈS NATIONAUX

**Durou C.**, Mouneyrac C., Amiard-Triquet C. 2006. Les indicateurs de condition chez l'annélide endogée *Nereis diversicolor* : des outils pour l'évaluation de la santé de l'écosystème estuarien ? *Impacts de l'environnement marin sur la santé de l'Homme, des organismes et des écosystèmes marins*. 31<sup>e</sup> Congrès annuel de l'Union des Océanographes de France. *Accepté*.

**Durou, C.**, Mouneyrac, C., Hummel, H., Lardy, S., Peluhet, L., Budzinski, H., Amiard-Triquet, C. 2005. Perturbations de la reproduction : des outils pour une évaluation précoce de la dégradation de la qualité du milieu estuarien et côtier. *Écologie Aquatique et Directive Cadre Européenne sur l'Eau*. 6<sup>ème</sup> Conférence Internationale des Limnologues et Océanographes, CILO. Lyon, France, 4-7 juillet 2005.

**Durou, C.**, Mouneyrac, C., Amiard-Triquet, C. 2005. Marqueurs physiologiques chez une espèce-clé des milieux estuariens, *Nereis diversicolor*, en réponse aux contaminants chimiques. Forum des Doctorants de l'École Doctorale de Chimie-Biologie de l'Université de Nantes. Nantes, France, 24 mai 2005.

**Durou, C.**, Mouneyrac, C., Ait-Alla, A., Moukrim, A., Pellerin, J. 2004. Estimation de la tolérance vis-à-vis des métaux lourds et approche multi-biomarqueur chez l'annélide polychète, *Nereis (Hediste) diversicolor* (O.F. Müller, 1776), originaire de l'estuaire de l'Oued Souss (Baie d'Agadir, Maroc). *Journées de l'écologie marine*. Colloque et Assemblée Générale de la Société Française d'Écologie. Nantes, France, 23-24 juin 2004.

LIEUX DE RATTACHEMENT ET CADRE DE LA THÈSE

**CENTRE D'ÉTUDES ET DE RECHERCHE SUR LES ÉCOSYSTÈMES AQUATIQUES (CEREA)**

Université de rattachement : Université Catholique de l'Ouest,

Institut : Institut de Biologie et d'Écologie Appliquée,

Direction: Catherine Mouneyrac ([catherine.mouneyrac@uco.fr](mailto:catherine.mouneyrac@uco.fr)).

Le champ de recherche du CEREA, groupe de recherche constitué par les enseignants-chercheurs permanents de l'Institut de Biologie et d'Écologie Appliquée (IBEA), se situe à l'interface de la biologie, de l'écologie et de l'écotoxicologie dans le domaine aquatique et les zones humides voisines. La thématique de recherche porte sur « L'Étude des écosystèmes aquatiques à différents niveaux d'intégration biologique dans une perspective de développement durable et de conservation de la biodiversité ».

Différents outils sont développés selon les écosystèmes étudiés : dulçaquicoles, estuariens et marins. Ils permettent d'estimer, à différents niveaux de l'organisation biologique, les effets biologiques liés aux contraintes anthropiques (nouveaux aménagements, apports de contaminants, introduction d'espèces, ...) ou naturels (variations des paramètres physico-chimiques) chez les macrophytes et les macroinvertébrés. En effet, la réaction du compartiment biologique peut être approchée à travers l'étude des effets au niveau individuel et infra-individuel (biomarqueurs), populationnel (structure dynamique, croissance, production), communautaire (structure, richesse, bioindicateurs) et écosystémiques. Une approche multi-marqueurs est souvent adoptée afin de fournir un indice global de la qualité de ces milieux. Dans ce contexte la problématique de recherche novatrice sur les perturbateurs endocriniens permet de faire le lien entre les effets des contaminants aux niveaux individuel et populationnel.

**LABORATOIRE DES SUBSTANCES MARINES À ACTIVITÉ BIOLOGIQUE (SMAB)**

Université de rattachement : Université de Nantes

UFR : Sciences Pharmaceutiques

Direction SMAB: Yves-François Pouchus ([Yves-Francois.Pouchus@univ-nantes.fr](mailto:Yves-Francois.Pouchus@univ-nantes.fr)).

Le laboratoire des Substances Marines à Activité Biologique (SMAB) développe trois thématiques principales gravitant autour d'une thématique générale portant sur les substances provenant du monde marin en matière de santé et sécurité alimentaire.

Les trois thématiques soutenues par le SMAB s'organisent de la manière suivante :

- ***Substances marines et organismes marins.*** Elle consiste à connaître le potentiel métabolique des organismes marins en réalisant un inventaire de séries chimiques pour tracer une carte de la chimio-biodiversité des organismes étudiés. Le but est une meilleure connaissance de ces organismes ainsi que la détermination de molécules potentiellement valorisables pour leurs activités biologiques ou leurs qualités nutritives.
- ***Substances marines et Homme.*** Elle est une application directe de l'étude précédente. Précisément, elle cible la santé humaine : la recherche de nouvelles molécules à vertu thérapeutique (médicaments), la recherche de métabolites à action positive utilisables en nutrition, l'étude des toxines produites par les organismes marins et que l'on retrouve dans la chaîne alimentaire humaine.
- ***Substances marines et Environnement Marin.*** Cette troisième thématique s'intéresse aux contaminations d'organismes marins consommables par l'homme et leurs réponses à ces agressions souvent d'origine humaine. Elle s'intéresse particulièrement à la bioaccumulation de contaminants, l'acquisition de phénomènes de tolérance de la part des organismes marins et la mise en évidence de biomarqueurs, les indicateurs les plus précoces qui soient quant aux perturbations de l'environnement.

#### **FINANCEMENT DE LA THÈSE**

Le présent travail de thèse a bénéficié d'un financement par le **Comité Angevin pour le Développement de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur (CADRES)**.

#### **PROGRAMME NATIONAL D'ÉCOTOXICOLOGIE**

Le **Programme National d'Écotoxicologie (PNETOX)** a été créé en 1995 à la suite de consultations initiées par le ministère en charge de l'environnement, des organismes de recherche, du club Ecrin-Environnement et de l'ADEME. Ce programme a pour but de répondre aux interrogations des pouvoirs publics et des industriels en matière d'évaluation du risque.

Compte tenu de l'évolution réglementaire (Directive cadre et loi sur l'eau, Directive biocides), le PNETOX est par la suite entré dans une seconde phase (PNETOX II, 2000-2004). Il s'agit, dans un contexte pluridisciplinaire, d'étudier le devenir et les effets biologiques (depuis le niveau cellulaire jusqu'au niveau populationnel) des contaminants et plus particulièrement les polluants persistants dispersés dans les milieux récepteurs (atmosphériques, terrestres et aquatiques).

Dans ce contexte, le présent travail de thèse a contribué à la réalisation d'un projet intitulé « Les sédiments : un compartiment clé pour l'évaluation des interactions entre contaminants chimiques et biota dans les écosystèmes estuariens » (Coordinatrice : Claude Amiard-Triquet).

## TABLE DES MATIÈRES

Introduction générale.....	26
<u>I Chapitre I : Évaluer l'état de qualité de l'environnement.....</u>	<u>32</u>
I.1 L'approche chimique.....	32
I.2 Les niveaux d'organisation et les réponses biologiques.....	32
I.3 Les indices biotiques.....	37
I.4 Les espèces bioaccumulatrices.....	39
I.5 Les biomarqueurs.....	39
I.5.1 Définitions.....	39
I.5.2 Classifications.....	41
I.5.3 Les biomarqueurs utilisés en écotoxicologie.....	42
I.5.4 Les approches multi-marqueurs.....	45
I.5.5 Les limites de l'approche biomarqueur.....	47
I.6 Concepts de l'allocation des ressources, du stress et de la tolérance.....	50
I.6.1 L'allocation des ressources.....	50
I.6.2 Effets des stress et tolérance.....	51
I.6.3 Les coûts de la tolérance.....	54
I.7 Le métabolisme et la bioénergétique.....	56
I.7.1 Le métabolisme intermédiaire.....	57
I.7.2 Indicateurs en relation avec le métabolisme et la bioénergétique.....	59
I.1.1.1 La charge énergétique en adénylates.....	59
I.1.1.2 Les enzymes du métabolisme intermédiaire.....	61
I.1.1.3 Les réserves énergétiques.....	62
I.1.1.4 Le rapport oxygène : azote.....	67
I.1.1.5 L'allocation énergétique cellulaire.....	67
I.1.1.6 L'allocation énergétique à la croissance et à la reproduction.....	69
I.1.1.7 Les indices de condition.....	70
I.8 Les perturbations de la reproduction.....	73
I.8.1 Les hormones stéroïdiennes.....	73
I.1.1.8 Chez les vertébrés.....	73
I.1.1.9 Chez les invertébrés.....	73
I.1.1.10 La stéroïdogenèse.....	75
I.8.2 Les perturbations endocriniennes.....	76
I.1.1.11 Les mécanismes d'action.....	77
I.1.1.12 Les impacts sur les organismes.....	79
I.1.1.13 Les perturbateurs endocriniens en Seine.....	81
I.9 Conclusion Partielle.....	81
<u>II Chapitre II : Le modèle biologique N. diversicolor.....</u>	<u>84</u>
II.1 Classification systématique.....	84
II.2 Caractéristiques écologiques.....	84
II.3 Physiologie de la reproduction et cycle de vie.....	87
II.3.1 Physiologie de la reproduction.....	87
II.3.2 Cycle de vie et croissance.....	90
II.4 Tolérance aux stress environnementaux.....	90
II.4.1 Tolérance aux stress naturels.....	90
II.4.2 Tolérance aux stress chimiques.....	91
II.4.3 Utilisation en tant que bioindicateur.....	93
II.5 Conclusion Partielle.....	94

III Chapitre III : Matériels et Méthodes.....	96
III.1 Les sites d'études.....	96
III.1.1 Niveaux de contamination des sites d'étude.....	96
III.1.2 Caractéristiques des sites d'étude.....	102
III.1.3 L'estuaire d'Authie.....	103
III.1.4 L'estuaire de Seine.....	104
III.2 Prélèvements.....	105
III.2.1 Plan d'échantillonnage.....	105
III.2.2 Température et salinité des sites d'étude.....	106
III.2.3 Prélèvement des animaux.....	107
III.3 Étude expérimentale des effets de variations de température sur les niveaux en réserves énergétiques.....	107
III.4 Étude in situ et expérimentale des effets de variations de salinité sur les niveaux en réserves énergétiques.....	108
III.5 Les mesures biométriques.....	108
III.6 Détermination de critères caractérisant le statut reproducteur.....	109
III.6.1 Détermination du stade de maturité sexuelle des femelles.....	109
III.6.2 Détermination du nombre d'ovocytes.....	110
III.7 Quantification des réserves énergétiques.....	110
III.7.1 Préparation des échantillons.....	110
III.7.2 Quantification du glycogène.....	111
I.1.1.14 Principe du dosage.....	111
I.1.1.15 Réalisation du dosage.....	111
III.7.3 Quantification des lipides.....	112
I.1.1.16 Principe du dosage.....	112
I.1.1.17 Réalisation du dosage.....	112
III.8 Quantification de la progestérone, du 17 $\beta$ -œstradiol et de la testostérone.....	113
III.8.1 Détection préliminaire des hormones stéroïdiennes chez <i>N. diversicolor</i> .....	113
III.8.2 Préparation des échantillons et extraction des hormones stéroïdiennes.....	114
I.1.1.18 Préparation des échantillons.....	114
I.1.1.19 Déconjugaison des hormones stéroïdiennes.....	114
I.1.1.20 Partage phase aqueuse - phase organique.....	115
I.1.1.21 Élimination du solvant.....	115
III.8.3 Dosage de la progestérone, du 17 $\beta$ -œstradiol et de la testostérone.....	115
I.1.1.22 Principe du dosage.....	115
I.1.1.23 Réalisation du dosage.....	116
I.1.1.24 Traitement et expression des résultats.....	116
III.9 Analyses statistiques.....	117
IV Chapitre IV : Croissance et condition chez <i>N. diversicolor</i> .....	120
IV.1 Teneur en eau et variables biométriques.....	121
IV.1.1 Teneur en eau des organismes.....	121
IV.1.2 Étude des variables biométriques.....	121
IV.2 Relations entre les variables d'allongement et la masse.....	123
IV.3 Variations intersites des relations taille - masse.....	125
IV.4 Discussion partielle.....	127
V Chapitre V : Réserves énergétiques chez <i>N. diversicolor</i> .....	132
V.1 Variations intrapopulationnelles et intersites.....	133
V.1.1 Année 2002.....	133
V.1.2 Années 2003 et 2004.....	134

<u>V.2 Variations temporelles.....</u>	<u>139</u>
I.1.1.25Spécimens MEA de l'Authie.....	139
I.1.1.26Spécimens MFA de l'Authie.....	142
I.1.1.27Spécimens Se de la Seine.....	144
<u>V.3 Effets de variations de salinité et de température.....</u>	<u>147</u>
<u>V.3.1 Effets de variations de salinité.....</u>	<u>147</u>
<u>V.3.2 Effets de variations de température.....</u>	<u>149</u>
<u>V.4 Discussion des résultats.....</u>	<u>151</u>
<u>VI Chapitre VI : Physiologie de la reproduction de N. diversicolor.....</u>	<u>158</u>
<u>VI.1 Définition des stades de maturité sexuelle chez les femelles.....</u>	<u>159</u>
<u>VI.2 Variabilité de la maturité sexuelle.....</u>	<u>161</u>
<u>VI.2.1 Variations intrapopulationnelles et temporelles.....</u>	<u>161</u>
I.1.1.28Site d'Authie.....	161
I.1.1.29Site de Seine.....	164
<u>VI.2.2 Variations intersites.....</u>	<u>165</u>
<u>VI.3 Variabilité du nombre d'ovocytes.....</u>	<u>167</u>
<u>VI.3.1 Évolution au cours du processus de maturation sexuelle.....</u>	<u>167</u>
<u>VI.3.2 Relations entre les variables biométriques et le nombre d'ovocytes.....</u>	<u>167</u>
<u>VI.3.3 Variations temporelles et intersite de la fécondité globale et relative.....</u>	<u>168</u>
<u>VI.4 Variations des concentrations en hormones stéroïdiennes.....</u>	<u>170</u>
<u>VI.4.1 Variations en fonction du stade de maturité sexuelle.....</u>	<u>170</u>
<u>VI.4.2 Variations intersites.....</u>	<u>172</u>
<u>VI.5 Relations hormones stéroïdiennes, réserves énergétiques et indice de maturité sexuelle.....</u>	<u>172</u>
<u>VI.6 Discussion des résultats.....</u>	<u>174</u>
<u>VII Discussion générale.....</u>	<u>180</u>
<u>VIII Conclusions et Perspectives.....</u>	<u>192</u>
<u>IX Références bibliographiques.....</u>	<u>196</u>
<u>Annexes.....</u>	<u>228</u>

LISTE DES ABRÉVIATIONS

2,4D :	Dichlorophénol	ELISA :	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
AChE :	Acétylcholinesterase	EROD :	Éthoxyrésorufine-o-dééthylase
ADN :	Acide désoxyribonucléique	Fe :	Fer
ADP :	Adénosine diphosphate	GPI :	Glucose-6-phosphate isomérase
AEC :	Allocation énergétique cellulaire	GPx :	Glutathion peroxydase
AECR :	Allocation énergétique à la croissance et à la reproduction	GSH :	Glutathion réduit
AFNOR :	Association française de normalisation	GSSG :	Glutathion oxydé
Ag :	Argent	GST :	Glutathion-S-transférase
ALD :	Aldolase	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	Peroxyde d'hydrogène
AMP :	Adénosine monophosphate	HAP :	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
ANOVA :	Analysis of variance	Hg :	Mercure
ATP :	Adénosine triphosphate	I2EC :	Indice d'évaluation de l'endofaune côtière
BEQUALM :	<i>Biological effects quality assurance in monitoring programmes</i>	IBD :	Indice biologique diatomées
Ca :	Calcium	IBGN :	Indice biologique global normalisé
CAT :	Catalase	IBMR :	Indice biologique macrophytique en rivière
Cd :	Cadmium	Ifremer :	Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer
CEA :	Charge énergétique en adénylates	IMS :	Indice de maturité sexuelle
Cr :	Chrome	IOBS :	Indice oligochète de bioindication des sédiments
Cu :	Cuivre	IOBL :	Indice oligochète de bioindication lacustre
DDE :	Dichlorodiphényldi-chloroéthylène	IPR :	Indice poisson rivière
DDT :	Dichloro-diphényl-trichloréthane		

ITS 1 :	<i>Internal transcribed spacers 1</i>	TBARS :	<i>Thiobarbituric acid reactive substances</i>
L3 :	Longueur des trois premiers segments	TBT:	<i>Tributyltin</i> (TriButylétain)
LDH :	Lactate déshydrogénase	TGD :	<i>Technical guidance document</i>
MDA :	Malondialdéhyde	S:	Soufre
MEA :	Spécimens de masse élevée de l'Authie	SDH :	sorbitol déshydrogénase
MES:	Matières en suspension	Se :	Spécimens de Seine
MFA :	Spécimens de masse faible de l'Authie	SOD :	Superoxyde dismutase
MPI 2 :	Mannose phosphate isomérase 2	Zn :	Zinc
MT:	Métallothionéine		
NADH:	Nicotinamide-adénine-dinucléotide réduit		
NRC :	<i>National Research Council</i>		
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> :	Anion superoxyde		
P:	Phosphate inorganique		
Pb:	Plomb		
PBDE :	Polybromodiphényléther		
PCB:	Polychlorobiphényles		
PCP:	Pentachlorophénol		
PE:	Perturbateur endocrinien		
PNEC :	<i>Predicted no effect concentrations</i>		
PNETOX :	Programme National d'Écotoxicologie		
ppb :	Partie par milliard		
QH <sub>2</sub> :	Coenzyme Q réduit (ubiquinol)		
RNO :	Réseau national d'observation de la qualité du milieu marin		

## LISTE DES FIGURES

Figure 1: Domaines respectifs de l'écologie et de la biologie réductionniste; modifié d'après Ramade (1993).....	33
Figure 2: Organisation et propriétés des réponses biologiques aux stress induits par l'exposition à des polluants ; modifié d'après Adams et al. (1989).....	34
Figure 3: Caractère intégrateur de l'approche multi-marqueurs ; modifié d'après Flammarion (2000).....	45
Figure 4: Les différents types de courbe dose-réponse ; modifié d'après Cairns (1992).....	48
Figure 5: Variabilité de la réponse biologique : "bruit de fond" et "signal de perturbation" ; modifié d'après Cairns (1992). A : rapport « signal/bruit » de fond fort ; B : rapport « signal/bruit de fond » faible.....	49
Figure 6: Représentation schématique de l'allocation des ressources chez les animaux ; modifié d'après Barnes et al. (1988).....	50
Figure 7: Représentation hypothétique de l'état de santé d'un organisme en relation avec la dégradation de son état physiologique consécutivement à l'exposition à un stress croissant ; modifié d'après Depledge (1994).....	52
Figure 8: Vue générale du métabolisme intermédiaire.....	58
Figure 9: Synthèse des stéroïdes sexuels. Modifié d'après Whitehead et Rice, 2006.....	75
Figure 10: Schématisation des mécanismes d'action probable des PE.....	78
Figure 11: <i>N. diversicolor</i> (O.F. Müller, 1775).....	84
Figure 12: (A) Représentation schématique de <i>N. diversicolor</i> dans sa galerie (modifié d'après Scaps, 2002) : ❶ : mouvement de l'eau, ❷ : sédiment de surface oxygéné, ❸ : galerie, ❹ : sédiment oxydé par l'oxygénation générée par la ventilation de l'individu, ❺ : sédiment anoxique ; (B) photographie d'une galerie de <i>N. diversicolor</i> .....	85
Figure 13: Sites d'étude retenus dans le cadre du programme PNETOX II 2002-2004.....	96
Figure 14: Relevés décennaires de la température de l'air à Vron (station météorologique à proximité de l'estuaire d'Authie) et à Sainte Adresse (station météorologique à proximité de l'estuaire de la Seine) au cours de la période 2002-2003.....	103
Figure 15: Stations de prélèvement sur l'estuaire d'Authie. ❶ : Berck ; ❷ : vasière nord (station principale, 50° 23' 44'', 1°, 33' 46'') ; ❸ : port d'Authie ; ❹ : vasière sud.....	104
Figure 16: Station de prélèvement sur l'estuaire de Seine. ❶ : Le Havre ; ❷ : station de prélèvement (49° 25' 12'', 0° 14' 05'').....	105

Figure 17: Détection de la progestérone et de la testostérone dans les tissus de <i>N. diversicolor</i> par le laboratoire de chimie marine et spectrométrie de masse (Émilien Pelletier et coll., LCM-S, Institut des Sciences de la Mer de Rimouski, Québec).....	113
Figure 18: Teneur en eau des spécimens d'Authie et de Seine.....	121
Figure 19: Mesures biométriques sur <i>N. diversicolor</i> (A- masse fraîche, B- nombre de segments, C - longueur totale, D - longueur de la mâchoire, E - longueur L3) originaires des estuaires d'Authie et de Seine au cours de six campagnes de prélèvement.....	122
Figure 20: Relations entre les variables d'allongement (A - longueur totale, B - longueur L3, C - longueur de la mâchoire, D - nombre de segments) et la masse fraîche des animaux collectés sur les sites d'Authie et de Seine au cours de l'ensemble des périodes de prélèvement.....	124
Figure 21: Concentrations (moyenne $\pm$ écart-type, N = 12) en glycogène (A) et lipides (B) (mg.g-1) des spécimens MEA d'Authie ( $121 \pm 47$ mg) et Se de Seine ( $160 \pm 76$ mg) ou de MFA d'Authie ( $420 \pm 126$ mg).....	135
Figure 22: Variations des concentrations (moyenne $\pm$ écart-type) en glycogène et lipides (mg.g-1) en fonction de la classe de masse des spécimens d'Authie (A) ou de Seine (B).....	138
Figure 23: Variations temporelles des concentrations (moyenne $\pm$ écart-type) en glycogène (mg.g-1) des spécimens MEA d'Authie. ....	140
Figure 24: Variations temporelles des concentrations (moyenne $\pm$ écart-type) en lipides totaux (mg.g-1) des spécimens MEA d'Authie. ....	140
Figure 25: Variations temporelles des proportions relatives des constituants de réserves énergétiques des spécimens MEA d'Authie.....	141
Figure 26 : Variations temporelles des concentrations (moyenne $\pm$ écart-type) en glycogène (mg.g-1) des spécimens MFA d'Authie.....	142
Figure 27: Variations temporelles des concentrations (moyenne $\pm$ écart-type) en lipides totaux (mg.g-1) des spécimens MFA d'Authie.....	143
Figure 28: Variations temporelles des proportions relatives des constituants de réserves énergétiques des spécimens MFA d'Authie.....	144
Figure 29: Variations temporelles des concentrations (moyenne $\pm$ écart-type) en glycogène (mg.g-1) des spécimens Se de Seine. ....	145
Figure 30: Variations temporelles des concentrations (moyenne $\pm$ écart-type) en lipides totaux (mg.g-1) des spécimens Se de Seine.....	145
Figure 31: Variations temporelles des proportions relatives des constituants de réserves énergétiques des spécimens Se de Seine. ....	146

Figure 32: Étude en laboratoire des effets de variations de la salinité et de la durée de maintien sur les concentrations (mg.g-1) en glycogène (moyenne ± écart-type, N = 12).....	148
Figure 33: Étude en laboratoire des effets de variations de la salinité et de la durée de maintien sur les concentrations (mg.g-1) en lipides (moyenne ± écart-type, N = 12).....	148
Figure 34: Étude en laboratoire des effets de variations de la température et de la durée de maintien sur les concentrations en glycogène des animaux prélevés à une température faible (28/01/05 : T° = 8 °C). Les astérisques indiquent un effet significatif de la température sur les concentrations en glycogène (Test de Tukey, seuil de risque fixé à 5%).....	150
Figure 35: Variations intrapopulationnelles sur l'Authie des proportions relatives (%) des femelles au sein de quatre stades de maturité sexuelle (□ : indifférencié, ■ : développement, ■ : vitellogénèse, ■ : mature) et de l'indice de maturité sexuelle durant l'étude.....	162
Figure 36: Variations temporelles sur l'Authie des proportions relatives (%) des femelles au sein de quatre stades de maturité sexuelle (□ : indifférencié, ■ : développement, ■ : vitellogénèse, ■ : mature).....	163
Figure 37: Variations intrapopulationnelles sur la Seine des proportions relatives (%) des femelles au sein de cinq stades de maturité sexuelle (□ : indifférencié, ■ : développement, ■ : vitellogénèse, ■ : mature, ■ : passé) et de l'indice de maturité sexuelle durant l'étude..	164
Figure 38: Variations temporelles sur la Seine des proportions relatives (%) des femelles au sein des cinq stades de maturité sexuelle (□ : indifférencié, ■ : développement, ■ : vitellogénèse, ■ : mature, ■ : passé) et de l'indice de maturité sexuelle.....	165
Figure 39: Variations intersites de l'indice de maturité sexuelle pour trois classes de masse ([< 100 mg], [100 – 200 mg], [200 – 300 mg]) au cours de six campagnes de prélèvement. Remarque : [200 < Masse < 300 mg] : pas d'échantillons disponibles dans cette classe de masse en Seine en août 2003, février 2004 et novembre 2004.....	166
Figure 40: Variations temporelles du nombre d'ovocytes des femelles d'Authie (A) et de Seine (B). Les moyennes désignées par la même lettre ne diffèrent pas significativement (Test de Tukey, seuil de risque 5%).....	169
Figure 41: Variations intersites de la fécondité relative des femelles au cours de six périodes de prélèvement. Un astérisque indique une différence significative (Test t de Student, seuil de risque 5 %).....	170
Figure 42: Variations des niveaux en hormones stéroïdiennes (moyenne ± écart-type à la moyenne) en fonction du stade de maturité sexuelle (indifférencié, développement, vitellogénèse, mature). Pour chaque hormone, les moyennes désignées par la même lettre ne diffèrent pas significativement (Test de Tukey, seuil de risque 5 %).....	171

Figure 43 :Représentation des variables (●) et des observations (◆) dans le premier plan principal. Les concentrations en 17β-œstradiol, testostérone, glycogène et lipides sont significativement corrélées à l'axe 1, les concentrations en lipides, progestérone et l'IMS à l'axe 2. Les observations sont codées de la manière suivante : initiale du site -S (Seine) ; A (Authie) -, période de prélèvement - 53 (mai 2003) ; 83 (août 2003) ; 113 (novembre 2003) ..etc .....174

Figure 44: Cercle des corrélations des variables aux axes 1 et 2. Les variables IMS, fécondité, diamètre (ovocyttaire), L3, masse (fraîche), lipides et glycogène sont significativement corrélées à l'axe 1 ; les concentrations en 17β-œstradiol et testostérone à l'axe 2..... 176

Figure 45: Représentation des observations de l'Authie (●) et de la Seine (●) dans le plan principal 1 - 2..... 177

Figure 46: Analyse en composantes principales (A : plan 1-2 ; B : plan 1-3). Les observations sont codées avec l'initiale du site (A = Authie, S = Seine), le numéro du mois (F = février, M = mai, A = août, N = Novembre) et de l'année (2 pour 2002, etc) de prélèvement. Le cercle des corrélations est présenté en « vignette »..... 188

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Enzymes limitantes impliquées dans le métabolisme et proposées comme indicateurs généraux de stress.....	61
Tableau 2: Exemples d'études de la réponse des réserves énergétiques à l'exposition à des contaminants en laboratoire.....	65
Tableau 3: Exemples d'études de la réponse des réserves énergétiques à l'exposition chronique à des contaminants in situ.....	66
Tableau 4: Exemples d'études de la réponse de l'AEC à l'exposition à des contaminants in situ ou en laboratoire.....	68
Tableau 5: Exemples d'études des réponses de l'AECR à l'exposition à des contaminants in situ ou en laboratoire.....	70
Tableau 6: Exemples d'études des réponses des indices de condition à l'exposition à des contaminants in situ ou en laboratoire.....	71
Tableau 7: Rapports de concentration (SCR) et de bioaccumulation (BAR) des contaminants organiques (HAP totaux ou PCB totaux). D'après Amiard et Budzinski (PNETOX II Rapport final).* pas de prélèvement en Seine. ....	98
Tableau 8: Rapports de concentration (SCR) et de bioaccumulation (BAR) des métaux (Ag, Cd, Cu, Pb et Zn) (PNETOX II Rapport final).....	99
Tableau 9: Comparaison des concentrations maximales relevées dans les estuaires d'Authie et de Seine (pour les eaux: ng.L-1, pour les sédiments*: ng.g-1 de sédiment sec). Source : a : PNETOX II: rapport final ; b Tronczynski et al., 1999.....	99
Tableau 10: Comparaison des concentrations de médicaments (ng L-1) mesurées dans les estuaires d'Authie (station port de l'Authie) et de Seine. D'après Budzinski et collaborateurs, PNETOX II Rapport final.....	100
Tableau 11: Comparaison des concentrations en alkylphénols (ng.g-1 de matières en suspension) mesurées dans la phase particulaire des eaux d'Authie et de Seine. D'après Budzinski et collaborateurs, PNETOX II Rapport final.....	101
Tableau 12: Dimensions des estuaires d'Authie et de Seine. Source : Bragigand, 2005.....	102
Tableau 13: Caractéristiques sédimentaires des vasières des estuaires d'Authie et de Seine. D'après Deloffre et Lafite (PNETOX II Rapport final).....	102
Tableau 14: Dates des campagnes de prélèvements sur les stations d'Authie et de Seine.....	106

---

Tableau 15: Température et salinité des eaux d'Authie et de Seine mesurées à marée basse au cours des campagnes de prélèvements.....	106
Tableau 16: Températures des eaux du milieu naturel et des aquariums de laboratoire lors de l'étude des effets de variations de température sur les niveaux en réserves énergétiques.....	108
Tableau 17: Coefficients de corrélation de Spearman entre les variables biométriques mesurées sur les spécimens de l'Authie et de Seine. Les corrélations sont significatives au seuil de risque 5 %.....	123
Tableau 18: Relations entre les variables d'allongement et la masse fraîche chez des animaux originaires des sites d'Authie et de Seine. A - longueur totale, B - longueur L3, C - longueur de la mâchoire, D - nombre de segments.....	123
Tableau 19: Comparaison intersite des relations taille - masse.....	126
Tableau 20 : Masse, concentrations en glycogène et lipides (moyenne $\pm$ écart-type, N = 20) des spécimens collectés sur les sites d'Authie et de Seine au cours de l'année 2002.....	133
Tableau 21 : Comparaison des concentrations moyennes en glycogène et lipides (illustrées dans la Figure 20) des animaux en fonction du site d'origine (MFA : Authie - $121 \pm 47$ mg ; Se : Seine - $160 \pm 76$ mg) et de la masse des spécimens (MEA : Authie - $420 \pm 126$ mg) (ANOVA, test de Tukey, seuil de risque 5%).....	136
Tableau 22: Comparaison (Test de Tukey, seuil de risque 5 %) des concentrations moyennes en glycogène et lipides (illustrées dans la Figure 22A) des animaux d'Authie en fonction de la classe de masse. Les moyennes significativement différentes sont désignées par des lettres différentes.....	138
Tableau 23: Comparaison des concentrations moyennes en glycogène et lipides (illustrées dans la Figure 22B) des animaux de Seine en fonction de la classe de masse. Les moyennes significativement différentes sont désignées par des lettres différentes.....	139
Tableau 24 : Étude in situ des effets de variations de la salinité sur les concentrations (moyenne $\pm$ écart-type) en réserves énergétiques (glycogène et lipides) des animaux (N = 12) collectés en septembre 2002 sur trois stations de l'estuaire de l'Authie (Authie Port, Authie Nord, Authie Sud).....	147
Tableau 25: Étude en laboratoire des effets de variations de la température et de la durée de maintien sur les concentrations en glycogène (mg.g-1) des animaux prélevés à une température élevée (09/09/04 : $T^{\circ} = 17^{\circ}\text{C}$ ).....	149
Tableau 26: Étude en laboratoire des effets de variations de la température et de la durée de maintien sur les concentrations en lipides totaux (mg.g-1) des animaux prélevés à une température élevée (09/09/04 : $T^{\circ} = 17^{\circ}\text{C}$ ).....	149

Tableau 27: Étude en laboratoire des effets de variations de la température et de la durée de maintien sur les concentrations en lipides totaux (mg.g-1) des animaux prélevés à une température faible (28/01/05 : T° = 8 °C).....	151
Tableau 28: Proportions relatives des femelles dans les populations d'Authie et de Seine au cours de six périodes de prélèvement.....	160
Tableau 29: Critères de détermination des stades de maturité sexuelle chez les femelles de <i>N. diversicolor</i> . ....	160
Tableau 30: Caractéristiques du diamètre ovocytaire en fonction du stade de maturité sexuelle des femelles. ....	161
Tableau 31: Effectifs des femelles d'Authie analysées pour l'étude des proportions relatives au sein des quatre stades de maturité sexuelle et le calcul de l'IMS pour chacune des classes de masse.....	162
Tableau 32: Effectifs des femelles d'Authie analysées pour l'études des proportions relatives au sein des quatre stades de maturité sexuelle pour chacune des périodes de prélèvement...	163
Tableau 33: Effectifs des femelles de Seine analysées pour l'études des proportions relatives au sein des quatre stades de maturité sexuelle et le calcul de l'IMS pour chacune des classes de masse.....	164
Tableau 34: Effectifs des femelles de Seine analysées pour l'études des proportions relatives au sein des cinq stades de maturité sexuelle pour chacune des périodes de prélèvement.....	165
Tableau 35: Effectifs des femelles analysées pour la comparaison intersite de l'IMS. ....	166
Tableau 36: Variations du nombre d'ovocytes en fonction du stade de maturité sexuelle des femelles (développement, vitellogenèse et mature) sur les sites d'Authie et de Seine.....	167
Tableau 37: Relations entre le nombre d'ovocytes des femelles (Y) et les variables biométriques (X : masse fraîche, nombre de segments, longueur L3, longueur totale) chez les femelles d'Authie (N = 79) et de Seine (N= 74).....	168
Tableau 38: Comparaison (probabilités des test t de Student) intersite (A : Authie ; S : Seine) des concentrations en hormones stéroïdiennes.....	172

## LISTE DES ÉQUATIONS

Équation 1: Calcul de la charge énergétique en adénylates (CEA) où ATP, ADP et AMP représentent respectivement les concentrations en adénosines triphosphate, diphosphate et monophosphate.....	59
Équation 2: Calcul de l'allocation énergétique cellulaire où $E_a$ représente l'énergie disponible au sein de l'organisme (la somme des contributions énergétiques des trois constituants de réserves énergétiques: sucres, lipides, protéines), $E_c$ l'énergie consommée, $t$ la durée d'exposition.....	67
Équation 3: Calcul de l'AEER: P désigne la production, l'énergie disponible pour la croissance et la reproduction - A désigne l'énergie assimilée par la nourriture - R désigne l'énergie utilisée pour la respiration - E désigne l'énergie perdue par excrétion en particulier les dérivés azotés.....	69
Équation 4: Calcul des rapports de concentration d'un contaminant C dans les sédiments (SCR: sediment concentration ratio) ou dans les vers (BAR: bioaccumulation ratio) définis par Ruus et al. (2005).....	97
Équation 5: Calcul du taux de fixation (noté %B/ B0) de l'hormone.....	116
Équation 6: Modèle de régression linéaire utilisé pour l'étude des différence intersites des relations taille - masse.....	125
Équation 7: Calcul de l'indice de maturité sexuelle (IMS) où $n_i$ représente le nombre de femelles présentant le stade $i$ , $v_i$ la valeur du stade $i$ , et N le nombre total de femelles.....	159



## Introduction générale

Le développement démographique induit un accroissement des activités anthropiques (agriculture, urbanisation et industrialisation). Ces activités ont pour conséquence directe la modification physique de l'environnement mais aussi le rejet d'effluents contribuant ainsi à **la dispersion de contaminants dans l'environnement**. Ces apports dans les écosystèmes ne sont pas sans effet. Les contaminants affectant de manière néfaste les systèmes biologiques sont alors qualifiés de **polluants**. La prise de conscience de l'opinion scientifique puis récemment de l'opinion publique des perturbations de l'environnement a pour incidence le développement des disciplines aptes à surveiller et déterminer **l'état de qualité de l'environnement**. Précisément, l'**écotoxicologie** est définie, pour la première fois, par Truhaut (1974) comme la branche de la toxicologie concernée par l'étude des effets toxiques, causés par des polluants naturels ou de synthèse, sur les constituants des écosystèmes, animaux (incluant l'homme), végétaux et microbiens, dans une approche intégrée. Cette discipline est donc concernée par des études **physico-chimiques** afin de caractériser l'environnement perturbé, des études **chimiques** pour détecter et évaluer la présence de contaminants/polluants dans le milieu, et **biologiques** pour déterminer les atteintes portées aux systèmes biologiques depuis les macromolécules jusqu'à l'écosystème. La préoccupation première de l'écotoxicologie concerne **l'évaluation de la toxicité** potentielle de produits chimiques en se basant sur leurs propriétés physico-chimiques, leurs similarités avec des produits déjà répertoriés mais aussi et surtout à l'aide de **tests de toxicité/écotoxicité** réalisés en laboratoire. L'écotoxicologie recherche également les effets biologiques des toxiques, **des indicateurs de nature biologique et/ou chimique** aptes à mesurer les perturbations dans l'environnement. Un objectif de cette recherche est l'utilisation de ces indicateurs dans la **surveillance de la qualité de l'environnement** afin d'évaluer l'état de santé, déterminer une éventuelle perturbation et si tel est le cas d'évaluer le niveau de dégradation du milieu. C'est **l'évaluation du risque**. Enfin, lorsque les perturbations de l'environnement sont établies et significatives, l'écotoxicologie joue un rôle pour évaluer le succès de la remédiation et du réaménagement des milieux.

**La surveillance *in situ*** des niveaux de contaminants et d'effets biologiques sont longues et coûteuses mais se révèlent pertinentes pour l'évaluation de la qualité de l'environnement. Le premier effort consiste à identifier les milieux dont le potentiel

d'exposition est le plus élevé. **Le milieu aquatique** continental draine des régions plus ou moins densément peuplées et reçoit nombre d'effluents domestiques, industriels et agricoles. De ce fait, l'écotoxicologie s'est, dès ses débuts, intéressée à ce milieu. La plupart des contaminants introduits dans l'environnement s'associent aux matières en suspension (MES) dans la colonne d'eau. **Du fait de l'importance des processus de sédimentation le compartiment sédimentaire constitue une zone de stockage à long terme de polluants (Gagnon et Fisher, 1997; Mora, 1999).**

Les eaux douces apportent des éléments nutritifs et de la matière organique dans les estuaires mais collectent également les effluents. **Des contaminants sont ainsi transportés vers les estuaires où ils sont le plus souvent stockés dans les sédiments.** Parallèlement, les estuaires sont une zone d'ouverture sur le milieu maritime et le site privilégié pour l'implantation de zones portuaires, urbaines et industrielles. À l'échelle de la planète, les estuaires représentent une surface très limitée. Il est estimé que d'ici 2020, plus de 75 % de la population humaine mondiale vivra à moins de soixante kilomètres du littoral côtier (Kennish, 2002). Les estuaires sont une zone géographique vitale pour la région voire pour la société dans son ensemble, par exemple, le bassin versant de l'estuaire de la Seine concentre 40 % de l'activité économique de la France. **En conséquence de quoi, les milieux estuariens sont des environnements soumis à une forte pression humaine.**

À l'interface entre milieux aquatiques continental et marin, les **estuaires** se situent en partie terminale des fleuves et des cours d'eau évacuant les eaux douces vers le milieu marin. Ils constituent un écotone entre milieux continental et marin. Les estuaires sont le siège de l'accumulation de substances nutritives apportées par les eaux douces et nécessaires au développement des organismes vivants, conduisant à de fortes productions biologiques. À l'échelle planétaire, les estuaires comptent pour une surface inférieure à 4 ‰ ( $1,4 \times 10^6 \text{ km}^2$ ) de celle du milieu marin. Cependant, du fait de leur singularité écologique, les zones estuariennes contribuent à hauteur de 39 ‰ ( $2,1 \times 10^9 \text{ t}$ ) à la productivité primaire nette annuelle du milieu marin dans son ensemble ( $55,0 \times 10^9 \text{ t}$ ). De plus, les estuaires concentrent environ 36 ‰ ( $1,4 \times 10^9 \text{ t}$ ) de la biomasse totale du milieu marin ( $3,9 \times 10^9 \text{ t}$ ) (Begon et al., 1996). **Malgré leur superficie restreinte à l'échelle du globe, les zones estuariennes concentrent et produisent une biomasse significativement très élevée.**

Du point de vue physico-chimique, les estuaires sont caractérisés par de grandes variations de la **salinité**, de la **température**, du pH, de la teneur en oxygène; en cela, ils sont uniques. D'un point de vue écologique il s'agit de zones privilégiées : des biomasses élevées,

une production biologique forte, une réserve nutritive pour le biota en particulier en ce qui concerne la reproduction des poissons, la migration des oiseaux. Pour la société, cela correspond à une ouverture sur le domaine maritime, une voie de communication, un site d'intérêt économique. **La surveillance et la gestion adéquate de cet environnement singulier apparaissent donc comme une priorité.** La faune benthique des milieux estuariens est en contact étroit avec le sédiment et, de ce fait, est exposée à un grand nombre de produits potentiellement toxiques. Elle constitue donc une biocénose pertinente quant à l'étude et à la recherche des atteintes portées aux systèmes biologiques. Cependant du fait de la complexité du milieu estuarien (physico-chimie, écologie) et de sa variabilité (spatiale, temporelle), la démarche à adopter doit être spécifique (Chapman et Wang, 2001). Actuellement, il est urgent de développer des stratégies pour **l'évaluation du risque dans les estuaires**. Pour cela, il est nécessaire d'une part de **sélectionner des espèces clés représentatives du compartiment sédimentaire** et d'autre part d'identifier les **réponses biologiques écologiquement pertinentes**.

Les réponses biologiques peuvent être envisagées à différents niveaux d'organisation depuis les molécules jusqu'aux peuplements des écosystèmes (Adams et al., 1989). Des changements à l'échelle des peuplements renseignent de manière tardive sur des perturbations profondes de l'écosystème. Les biomarqueurs sont des réponses biologiques (biochimique, cellulaire, physiologique ou comportementale) qui, dans un tissu, dans les liquides corporels ou au niveau d'un organisme dans son ensemble, fournissent une mesure de l'exposition à un toxique et/ou d'effets produits par un ou plusieurs polluants (Depledge, 1994). Les réponses des biomarqueurs à une perturbation du milieu sont précoces (Walker et al., 1996). Cependant, leurs capacités à rendre compte de **l'état de santé des individus** et leurs **valeurs écologiques** sont actuellement discutées.

Lorsqu'un contaminant pénètre dans un organisme, il engendre un certain nombre de **réponses biologiques** comme des **mécanismes de défense** mais aussi des **effets délétères** consécutifs aux stress chimiques endurés (Walker et al., 1996). **L'état de santé des organismes** se dégrade en fonction de la durée et de l'intensité du stress (Depledge, 1994). Ces derniers sont bien entendu capables d'acclimatation physiologique ou encore d'adaptation génétique. **La tolérance aux stress chimiques** est supportée par un ensemble de mécanismes de défense. Dans le cas des métaux, le sujet a donné lieu à plusieurs synthèses bibliographiques (Klerks et Weiss, 1987 ; Amiard-Triquet, 1989 ; Mason et Jenkins, 1995 ; Newman et Unger, 2003). S'il est vrai que la tolérance à un contaminant particulier renseigne sur la présence de ce dernier, elle ne peut avérer l'état de santé des organismes. Les

organismes exposés chroniquement aux contaminants épuisent-ils leurs capacités ou sont-ils au contraire plus adaptés à supporter des stress chimiques ? L'**allocation des ressources** est un concept-clé réglant la biologie de tout individu (Barnes et al., 1988 ; Congdon et al, 2001 ; Kooijman, 2000 ; Newman, 2001). Ces ressources, présentes en quantité finie, sont-elles encore disponibles pour la croissance, la reproduction ou les organismes endurent-ils un **coût de tolérance**? Il est donc nécessaire d'identifier des **indicateurs physiologiques** permettant d'attester de l'état de santé des organismes dans leur milieu. Les indicateurs en relation avec le **métabolisme**, la **croissance** ou la **reproduction** des organismes apparaissent prometteurs dès lors qu'ils sont suspectés de fournir un **pronostic au niveau populationnel**. Une connaissance très complète du modèle biologique est un atout précieux pour interpréter correctement les informations recueillies.

L'annélide polychète *Nereis diversicolor* (O.F. Müller, 1775) est une espèce intrasédimentaire **communément présente dans les milieux estuariens en densités et biomasses élevées** (Scaps, 2002). L'activité galérique (remaniement du sédiment, apport d'oxygène par la ventilation des galeries) contribue au phénomène de bioturbation influençant grandement les cycles biogéochimiques des nutriments et des contaminants présents dans le sédiment (Davey et Watson, 1995 ; Gunnarsson et al., 1999 ; Banta et Andersen, 2003 ; Gérino et al., 2003). Par ailleurs, cette espèce est une source nutritive pour les crustacés, poissons, oiseaux (Mc Lusky, 1989 ; Masero et al., 1999 ; Moreira, 1999). Ainsi, *N. diversicolor* est une **espèce clé du milieu estuarien**. De plus, elle est reconnue comme une **espèce bioindicatrice de la fraction biodisponible des contaminants métalliques et organiques** du sédiment et recommandée dans les programmes de biosurveillance de la qualité du milieu (Diez et al., 2000 ; Galloway et al., 2004 ; Poirier et al., 2006). Du fait de ses caractéristiques écologiques et des capacités bioindicatrices, *N. diversicolor* est retenue comme modèle biologique dans le cadre du Programme National d'Écotoxicologie (PNETOX II 2002 - 2004 : Coordinatrice C. Amiard-Triquet).

Depuis plusieurs années, les programmes de surveillance de la **qualité de l'eau dans l'estuaire de la Seine** comme le suivi de la qualité des eaux en aval de Poses réalisé par la cellule antipollution de Rouen et le Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin (RNO) conduit par Ifremer, signalent des niveaux élevés en contaminants organiques en baie et estuaire de Seine. Ce **constat de dégradation de la qualité des eaux dans l'estuaire de Seine** a trait aux rôles fondamentaux de cette région : une voie d'ouverture et de communication avec le domaine maritime, un bassin versant densément peuplé et urbanisé. Le constat de cette dégradation a donné lieu à une prise de conscience par les gestionnaires de

l'estuaire, ce qui a conduit notamment à la mise en place du programme Seine-Aval (1993-1995). L'objectif de ce programme est de mieux comprendre un écosystème aussi complexe que l'estuaire de la Seine et d'utiliser les compétences scientifiques pour surveiller, gérer au mieux l'estuaire de la Seine.

Un des objectifs du PNETOX est d'étudier les effets des xénobiotiques organiques et inorganiques sur le biota dans des sites comparativement contaminé et indemne d'atteinte. Ainsi l'estuaire de Seine a été retenu comme site contaminé par des micropolluants chimiques et l'estuaire d'Authie comme site de référence. Les milieux estuariens sont caractérisés par une pollution multifactorielle et diffuse. De plus, de nombreux polluants qualifiés d'« émergents » apparaissent dans l'environnement (les polluants organiques persistants tels les pentabromodiphényléthers, les modulateurs d'activités endocriniennes, les nanoparticules, les substances pharmaceutiques) (Chapman, 2006). Des effets biologiques pernicieux en relation avec la croissance, la reproduction du biota du milieu naturel sont suspectés voire avérés. **Établir un lien entre les effets des contaminants sur les organismes et les conséquences au niveau de la population est un des principaux défis pour l'avenir de l'écotoxicologie (Maltby et al., 2001).**

Une synthèse bibliographique établira l'état de l'art quant à **l'évaluation de la qualité de l'environnement** aquatique et plus précisément du littoral marin. Initialement, la surveillance de la qualité du milieu reposait avant tout sur la quantification des contaminants dans les milieux physiques (eau, sédiment). Actuellement, les effets biologiques de la contamination du milieu sont détectés et recherchés à plusieurs niveaux de **l'organisation biologique**. Au niveau des écosystèmes, les **indices biotiques** permettent d'établir l'état de qualité du milieu. Au niveau spécifique, les **espèces bioaccumulatrices** permettent de renseigner la fraction biodisponible des contaminants du milieu. Au niveau sub-organismal, les **biomarqueurs** constituent des réponses biologiques précoces de la détérioration du milieu. La **bioénergétique** et la **reproduction** constituent le lien entre les niveaux individuels et populationnels. Néanmoins, une bonne connaissance du modèle biologique est un préalable ; la description de la biologie de *N. diversicolor* est l'objet d'un second chapitre. Les moyens mis en oeuvre au cours de cette étude sont décrits dans le chapitre III.

Cette étude est ensuite subdivisée en trois grands thèmes :

- 1- **La recherche d'un indicateur général de condition chez *N. diversicolor*.** Pour cela, la biologie de la croissance est étudiée sur des spécimens originaires de sites de degré d'exposition significativement différents. L'objectif consiste à rechercher des indices de l'état général des organismes qui existent pour un bon nombre de modèles biologiques comme les poissons, les mollusques bivalves mais qui font défaut chez les annélides.
- 2- **L'utilisation des réserves énergétiques en tant que biomarqueur physiologique de l'état de santé chez *N. diversicolor*.** L'objectif est de tester *in situ* et sur une longue période des paramètres du métabolisme énergétique (réserves en glycogène et en lipides totaux) comme biomarqueurs de contamination.
- 3- **La physiologie de la reproduction est étudiée au travers de la détermination de stades de maturité sexuelle, de l'étude de la fécondité des femelles et de la modulation de la reproduction par les hormones stéroïdiennes.** Actuellement, l'évaluation du risque en milieu naturel à l'égard des perturbateurs endocriniens (PE) stimule les activités de recherche sur la physiologie de la reproduction des invertébrés. Notre objectif est de contribuer à combler les lacunes concernant *N. diversicolor*. Au terme de ce chapitre, les variables physiologiques sont examinées afin d'identifier les différences intersites afin de proposer des indicateurs physiologiques chez *N. diversicolor* pour établir l'état de qualité biologique du milieu estuarien.

L'approche multiparamétrique mise en œuvre chez *N. diversicolor*, espèce clé du milieu estuarien, dans le cadre du PNETOX est discutée. Des différences intersites observées *in situ* sont mises en évidence concernant des **biomarqueurs de défense et d'effets délétères** classiquement utilisés en écotoxicologie, la **tolérance à un métal, le Zn**, les **indicateurs physiologiques** étudiés dans le présent travail. De plus, la **physiologie de la reproduction** de cette espèce est significativement renseignée. Ainsi, des outils pour l'évaluation du risque écologique en milieu estuarien sont proposés.

# I Chapitre I : Évaluer l'état de qualité de l'environnement

## I.1 L'approche chimique

La surveillance du milieu marin a d'abord été basée sur l'analyse chimique des polluants dans le milieu physique (eau, sédiment) et biologique. Au niveau de la colonne d'eau, les résultats sont soumis à de grandes variations temporelles et spatiales (Förstner, 1979) dues aux mouvements perpétuels des masses d'eaux, en particulier en milieu estuarien où les conditions varient rapidement (marées, apport d'eaux douces). En revanche, les **sédiments représentent la matrice de premier choix puisqu'ils constituent le compartiment de stockage à long terme des polluants**. Toutefois ces mesures dans le compartiment sédimentaire ne permettent en aucun cas d'évaluer l'exposition effective des organismes et des écosystèmes car **une fraction seulement des polluants est biodisponible**. C'est pourquoi, les programmes de surveillance des milieux estuarien et côtier comme le *Mussel Watch* aux États-Unis (Bayne, 1989) et le RNO crée en France en 1974 utilisent des organismes bioaccumulateurs de polluants (moules et huîtres).

Les niveaux de contamination obtenus n'ont d'intérêt que s'ils peuvent être mis en relation avec les réponses des systèmes biologiques. Des niveaux seuils tels que les PNEC (*Predicted No Effect Concentrations*) peuvent être dérivés des données écotoxicologiques. Toutefois, l'écotoxicité des contaminants à l'égard des organismes estuariens et côtiers est relativement peu documentée comparée à la littérature sur les organismes d'eau douce. Même si le TGD (*Technical Guidance Document* qui fournit des méthodologies pour l'évaluation du risque environnemental en accord avec la réglementation européenne) propose des stratégies pour faire face à cette situation, de nombreuses incertitudes sont identifiées. Une limite majeure tient à ce que les paramètres de toxicité sont pratiquement toujours déterminés pour une seule substance, négligeant les interactions potentielles (antagonisme, synergie) entre différents produits chimiques ou classes de produits, présents dans l'environnement. **Dans le cas des estuaires dans lesquels des mélanges complexes de contaminants sont présents, avec de nombreuses classes de composés qui ne sont pas encore accessibles aux analystes ou à des coûts extrêmement élevés, il est nécessaire de développer des stratégies permettant d'évaluer les niveaux de stress auxquels sont confrontés les écosystèmes.**

## I.2 Les niveaux d'organisation et les réponses biologiques

Depuis les **systèmes** sub-atomiques à l'univers, les scientifiques organisent ces systèmes en **niveaux hiérarchiques** caractérisés par une **complexité croissante** depuis l'infiniment petit vers l'infiniment grand. À chaque niveau hiérarchique, une somme d'**interrelations** et d'**interdépendances** entre les composantes du système en régit la **structure** et le **fonctionnement**. En ce qui concerne les **sciences du vivant**, les changements d'échelle s'étendent depuis les **macromolécules biologiques** (les acides nucléiques et les protéines par exemple) jusqu'à l'**écosphère** (la planète) (Ramade, 1993). L'écologie s'intéresse à plusieurs niveaux hiérarchiques d'organisation biologique: la population, les peuplements, l'écosystème et l'écosphère. La biologie dite réductionniste s'intéresse aux niveaux d'organisation individuels et sub-individuels. C'est le cas de la biologie moléculaire, de la biologie cellulaire, de la physiologie des organes (Figure 1).

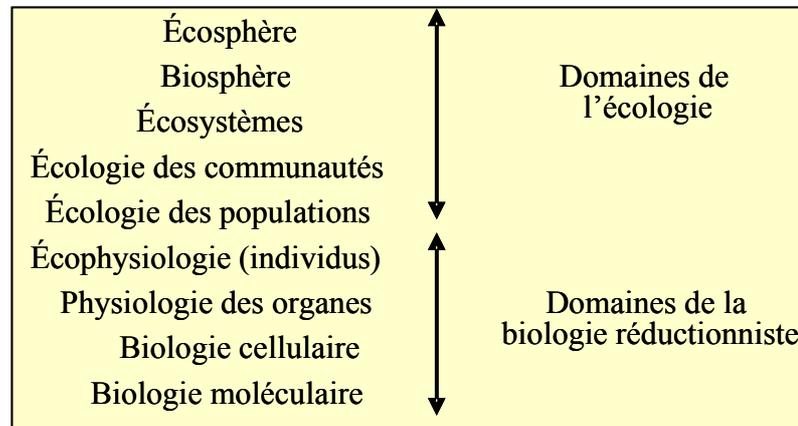


Figure 1: Domaines respectifs de l'écologie et de la biologie réductionniste; modifié d'après Ramade (1993).

Un **niveau d'organisation biologique** est donc l'objet d'étude d'un niveau d'observation c'est-à-dire d'une discipline scientifique. L'écotoxicologie est, quant à elle, une discipline transversale en raison du fait que l'objet de son étude se situe à des niveaux d'organisation biologique variés (cellulaire, individuel, populationnel par exemple). La recherche en écotoxicologie a notamment pour objet d'étude les variations dans la structure et le fonctionnement des systèmes biologiques en relation avec les conditions de l'environnement.

La Figure 2 (Adams et al., 1989) fait état des propriétés des **réponses biologiques** en fonction du niveau d'organisation biologique considéré. Très clairement, les effets à des niveaux d'organisation biologique élevés comme la communauté ou l'écosystème sont chronologiquement précédés d'effets à des niveaux d'organisation biologique beaucoup plus faible (moléculaire, cellulaire, individuel, par exemple).

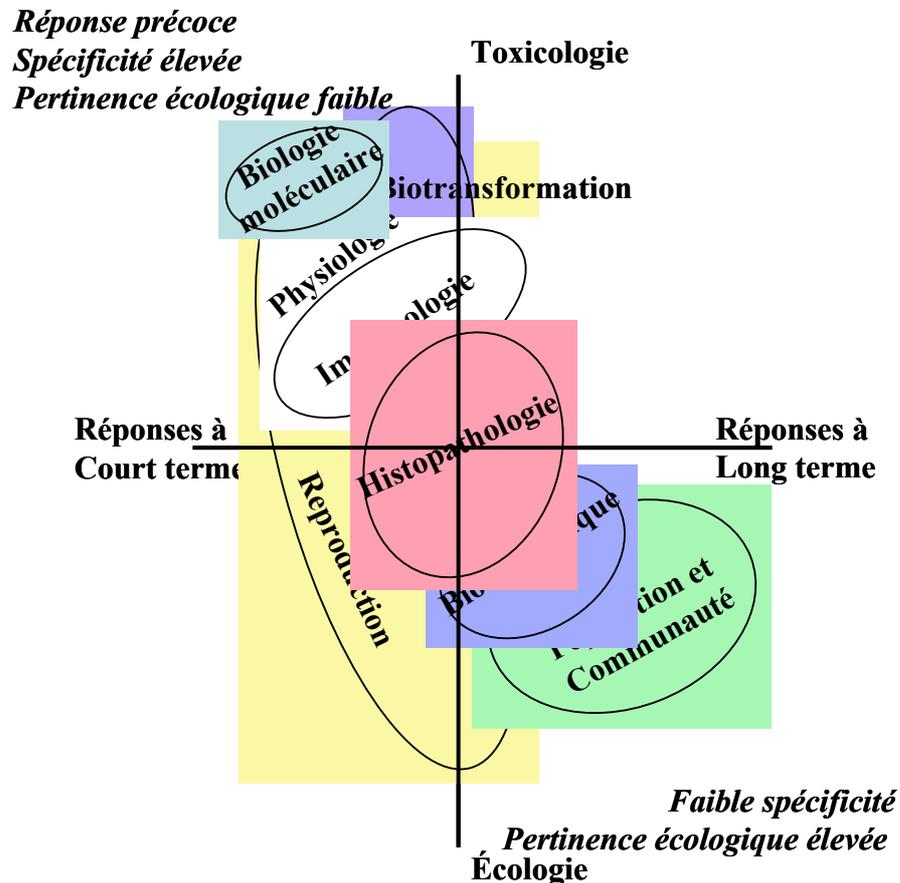


Figure 2: Organisation et propriétés des réponses biologiques aux stress induits par l'exposition à des polluants ; modifié d'après Adams et al. (1989).

Si quelques macromolécules seulement sont affectées par la contamination environnementale, cela peut être sans conséquence au niveau de la cellule ou du tissu. Dans le cas d'une exposition croissante, un plus grand nombre de macromolécules sont affectées, des altérations cellulaires ou tissulaires vont vraisemblablement se produire. Mais de nouveau, si un nombre suffisant de cellules est encore fonctionnel, les fonctions majeures peuvent être maintenues ; l'individu est capable de **tolérer le stress chimique**. Cet argument peut être poursuivi aux niveaux successifs de l'organisation biologique conduisant de l'individu à la population, la communauté et l'écosystème. Au niveau supra-organismal, le **facteur temps** devient très important, les effets au niveau des populations et des communautés n'étant souvent avérés qu'après des années voire des dizaines d'années d'exposition. Dans une telle

situation, il est impossible d'attribuer précisément les effets observés à un stress spécifique parce que les changements environnementaux ont été multiples et ont potentiellement agi en interaction. Or il s'agit là de la situation généralement rencontrée dans la quasi-totalité des milieux estuariens et côtiers des pays développés.

Pourquoi un tel temps de latence dans la réponse écologique? Les niveaux d'organisation biologique supérieurs tels que les niveaux population et communauté possèdent des **propriétés émergentes** en comparaison au niveau individuel ou sub-individuel. Ces propriétés émergentes sont le fait d'interactions variées et nombreuses entre les individus et les populations. De ce fait, ces niveaux ne peuvent pas être définis comme la simple somme de niveaux hiérarchiques immédiatement inférieurs. Tout niveau d'organisation biologique est susceptible de « compenser » des détériorations subies par une perturbation. **L'accumulation successive de niveaux hiérarchiques et donc d'aptitudes à compenser les perturbations explique ainsi le temps de latence dans la réponse écologique.**

Des changements observés dans la composition spécifique d'une communauté sont le résultat de l'évolution d'une situation perturbée depuis longtemps. Par contre, un changement d'ordre biochimique ou physiologique constitue une réponse biologique précoce et peut être considéré comme système d'alerte. Il est souvent difficile de mettre en relation les réponses précoces (au niveau des macromolécules) et des conséquences aux niveaux d'organisation biologique plus élevés (population, communauté). Dans la schématisation de l'organisation des réponses biologiques d'Adams et al. (1989), la **bioénergétique** et la **reproduction** occupent des emplacements très particuliers. La **bioénergétique** constitue le maillon entre les niveaux sub-individuels et population, communauté. Quant à la **reproduction**, elle tisse une transversalité tout au long de l'organisation des réponses biologiques.

**Pour évaluer l'état de qualité de l'environnement, plusieurs méthodologies sont envisagées selon le niveau d'organisation biologique considéré :**

- au niveau des **écosystèmes** : les **indices biotiques**. Soumises à l'ensemble des facteurs environnementaux (la pollution notamment) les biocénoses aquatiques sont très représentatives de l'écosystème et constituent des indicateurs de choix pour l'évaluation de la qualité écologique des cours d'eau. Les principales communautés utilisées en milieux aquatiques sont les **macroinvertébrés benthiques**, les diatomées, les poissons, les macrophytes et le phytoplancton.

- au niveau **spécifique** : les **bioindicateurs** témoignent par leur présence ou absence et par leur abondance relative des conditions de l'environnement. Les espèces **bioaccumulatrices** accumulent en quantités significatives des contaminants dans leurs tissus et donc permettent d'évaluer la présence de ces derniers dans le milieu.
- aux niveaux **infraspécifiques** (individuel, tissulaire, cellulaire) : les **biomarqueurs** (biochimiques, cytologiques et physiologiques) rendent compte de l'état physiologique ou de santé des organismes étudiés.

Dans le domaine de la surveillance de l'environnement la terminologie pour désigner les organismes ou les groupes d'organismes est riche (marqueur, indicateur, indice) et prête parfois à confusion. Blandin (1986) définit un **bioindicateur** de la manière suivante « Un indicateur biologique (ou bioindicateur) est un organisme ou un ensemble d'organismes qui (par référence à des variables biochimiques, cytologiques, physiologiques, éthologiques ou écologiques) permet, de façon pratique et sûre, de caractériser l'état d'un écosystème ou d'un écosystème et de mettre en évidence aussi précocement que possible leurs modifications, naturelles ou provoquées ». Cette notion d'**indicateur biologique** ne saurait être confondue avec celles d'**espèces caractéristiques** et **espèces indicatrices**. Ces espèces permettent la description des structures écologiques assimilables aux peuplements ou communautés (ou biocénoses). Néanmoins, la notion d'indicateur biologique pourrait être rapprochée de celle d'"**espèce sentinelle**" ; une espèce sentinelle est une espèce qui, par sa seule présence ou par sa présence et son abondance relative, renseigne sur les déséquilibres du milieu ou de distorsions dans le fonctionnement de la communauté. Lorsque plusieurs indicateurs peuvent être employés pour interpréter des phénomènes, ils peuvent être combinés sous formes d'indices. Selon Blandin (1986) il est important de faire la différence entre indices de diversité "constitué sur des bases théoriques (théorie de la structure des guildes, par exemple)" et indices numériques composés empiriquement et calculés soit à partir de dénombrement soit selon un système arbitraire de notation. Il donnait à ce dernier type d'indice l'appellation d'indice biotique que nous retiendrons.

### ***1.3 Les indices biotiques***

Plusieurs **indices biotiques** pour l'**évaluation de la qualité du milieu aquatique** sont développés. Pour le milieu dulçaquicole ces indices biotiques sont basés sur la composition en espèce des biocénoses et font l'objet d'une normalisation. À titre d'exemple, les indices couramment utilisés sont l'indice biologique global normalisé (IBGN : NF T90-350), l'indice biologique macrophytique en rivière (IBMR : NF T90-395), l'indice oligochète de bioindication des sédiments (IOBS : NF T90-390), l'indice oligochète de bioindication lacustre (IOBL : NF T90-391), l'indice biologique diatomées (IBD : NF T90-354), l'indice poisson rivière (IPR : NF T90-354).

**L'évaluation des conditions environnementales dans les milieux côtiers (marins et estuariens) repose sur l'analyse de la composition et de la structure des peuplements des sédiments meubles.** Il s'agit de méthodes d'évaluation quantitative qui se fondent sur la distinction, au sein de la macrofaune côtière, de cinq groupes d'espèces en fonction de leur sensibilité à un gradient croissant de stress environnemental (enrichissement en matière organique, appauvrissement en oxygène...) :

- groupe I : les espèces sont sensibles à une hypertrophisation et sont les premières à disparaître lors d'un enrichissement du milieu,
- groupe II : les espèces sont peu influencées par un enrichissement du milieu en matière organique,
- groupe III : les espèces sont naturellement présentes dans les vases et sont tolérantes à une hypertrophisation du milieu. Leur prolifération est un signe de déséquilibre du milieu,
- groupe IV : les espèces sont des dépositores de surface qui ont un cycle de vie court (espèces opportunistes de second ordre),
- groupe V : les espèces sont des dépositores qui se développent sur toute l'épaisseur du sédiment (espèces opportunistes de premier ordre).

Initialement, la méthode des groupes écologiques a été mise au point par Hily (1984) sur des vasières de la rade de Brest. Par la suite, la technique est élargie à d'autres sites et situations environnementales. Ainsi Borja et al. (2000) ont amélioré cette technique et mis au point un **index biotique marin** qui permet, à l'aide d'une formule simple, de calculer un

coefficient biotique dont les valeurs sont continues et varient de 0 (site de référence) à 7 (extrêmement pollué). Les auteurs proposent l'utilisation de cet indice en complément des études toxicologiques et chimiques pour l'évaluation de la qualité écologique des côtes européennes. Du fait de la mise en place de la Directive Européenne Cadre sur l'eau (2000/60/EC), Borja et al. (2003) ont évalué l'index biotique marin sur une plus grande échelle spatiale depuis des sites sur l'Atlantique (mer du Nord; baie de Biscay; sud de l'Espagne) jusqu'à des sites en mer Méditerranée (Espagne et Grèce). Les résultats sont cohérents avec les indicateurs couramment employés (abondance, richesse spécifique...etc). Cet indice d'évaluation permet donc de comparer la qualité écologique de sites sur une grande échelle spatiale.

Sur le territoire français, Ifremer (Grall et Glémarec, 2003) a développé l'**indice d'évaluation de l'endofaune côtière (I2EC)** basé sur la reconnaissance des cinq groupes écologiques pour cinq types d'habitats (vasières côtières, sables fins et moyens, sables grossiers et graviers, sables fins et moyens, **estuaires**). Dans le modèle d'évaluation de l'endofaune côtière, quatre grandes étapes sont reconnues permettant d'attribuer une note d'évaluation de la qualité biologique du sédiment :

- I2EC = 0 : les espèces sensibles (groupe I) dominant,
- I2EC = 2 : les espèces tolérantes (groupe III) dominant les espèces sensibles, la première étape de déséquilibre. **Les estuaires, milieux naturellement stressés sont préférentiellement colonisés par ce type d'espèces,**
- I2EC = 4 : les espèces opportunistes de second ordre (groupe IV) sont susceptibles de proliférer et sont le premier signal de pollution,
- I2EC = 6 : c'est l'étape de pollution maximale caractérisée par quelques espèces opportunistes de premier ordre qui atteignent des densités exceptionnelles (100000 individus au mètre carré).

**Pour le milieu côtier, le nombre d'indices biotiques d'évaluation de la qualité du milieu est relativement limité et aucun indice universel n'est disponible. Dans le cas des estuaires, les peuplements de l'écosystème se résument le plus souvent à des populations isolées. Évaluer l'état de santé des populations estuariennes pourrait constituer une stratégie d'évaluation du risque en milieu estuarien.**

## ***1.4 Les espèces bioaccumulatrices***

Dans le contexte de la surveillance de la qualité de l'environnement, les **espèces bioaccumulatrices** désignent une catégorie particulière d'espèces susceptibles d'être utilisées pour révéler la présence d'au moins un contaminant et d'évaluer les effets de ce (s) dernier (s) dans l'environnement (Lagadic et al., 1998). Les exigences de la surveillance à l'égard de ces espèces sont la facilité de prélèvement, une large répartition géographique, une bonne connaissance de la physiologie et des processus de bioaccumulation des contaminants, une tolérance aux variations importantes de température et salinité, une résistance à la déshydratation (pour supporter le transport). Aux États-Unis, le *Mussel Watch*, en France le Réseau National d'Observation du milieu marin (RNO) sont des réseaux de surveillance de l'écosystème côtier et marin. Dans ce contexte, des espèces sentinelles (huîtres, moules) sont collectées et des analyses chimiques permettent d'évaluer la présence et les niveaux des contaminants dans le milieu.

## ***1.5 Les biomarqueurs***

### **1.5.1 Définitions**

Les biomarqueurs tirent leur origine de la toxicologie humaine (Forbes et al., 2006) et sont définis comme « *Biological markers are indicators signaling events in biological systems or samples* » (NRC, 1987). L'essor de l'approche « biomarqueur » tient notamment du **développement de techniques analytiques** permettant de doser des électrolytes, des métabolites, des activités enzymatiques, indicateurs pertinents de la condition physiologique mais auparavant inaccessibles. De plus, cette méthodologie repose sur l'analyse d'un **échantillon biologique** prélevé par biopsie ou une prise de sang. La définition initiale est par la suite, précisée de la manière suivante « *A biomarker is a parameter measured at a molecular, cellular or functional level on individuals from a population and indicating either an exposition to some toxic or pollutant, or that the individual is having some pathological effect with or without latency* » (NRC, 1989). Cette définition insiste particulièrement sur le **système biologique** considéré (molécule, cellule) et sur l'**information révélée** (exposition, effet).

L'**écotoxicologie** s'est inspirée de cette méthodologie. Face à la dégradation de certains écosystèmes, la communauté scientifique possédait peu de connaissances sur la

manière de procéder quant à la restauration de ces derniers. La stratégie de surveillance de l'environnement apparaissait alors inadéquate (Depledge, 1994). Afin de remédier à cette situation et d'**évaluer le risque** encouru par les écosystèmes de la façon la plus précoce qui soit, les biomarqueurs sont apparus comme une méthodologie prometteuse. Les biomarqueurs sont l'objet, depuis une vingtaine d'année, d'un intérêt scientifique particulier et d'une intense activité de recherche.

Depledge (1994) définit les **biomarqueurs écotoxicologiques** comme suit « *An ecotoxicological biomarker is a biochemical, cellular, physiological or behavioural variation that can be measured in tissue or body fluid samples or at the level of whole organisms (either individuals or populations) that provides evidence of exposure to and/or effects of one or more chemical pollutants (and/or radiations)* ». C'est la première définition d'un biomarqueur dans le contexte de l'écotoxicologie. Par la suite, Lagadic et al. (1997) précisent cette définition de la manière suivante : « *un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant* ». De façon claire, les auteurs mettent en évidence le **facteur temps** et de ce fait le besoin d'une **référence chronologique** dans le but d'une interprétation correcte du biomarqueur envisagé.

Les biomarqueurs sont des variables de nature biologique dont l'intérêt scientifique est suscité par plusieurs de leurs propriétés :

- le **caractère non exhaustif des analyses physico-chimiques**, l'incapacité à mesurer certains polluants « émergents » ou bien une mesure accessible à un coût onéreux, confèrent à l'approche chimique un caractère limitant, notamment dans le cas de milieux où des mélanges complexes de contaminants sont présents. En comparaison, les biomarqueurs fournissent une information biologique.
- l'utilisation de biomarqueurs sur des organismes issus directement du milieu confère à ces derniers un **caractère intégrateur**. Au sein de l'écosystème règnent des conditions, favorables et/ou défavorables que l'organisme biologique « enregistre » littéralement. Les biomarqueurs intègrent donc notamment un ensemble de stress naturels ou d'origine anthropique endurés par les organismes et permettent de prendre en compte les **effets cumulatifs, synergiques ou antagonistes** mais aussi la **biodisponibilité des polluants**.

- les biomarqueurs sont mesurés dans les organes, les tissus ou les cellules. Ce **signal sub-individuel** leur confère un **caractère précoce** en comparaison aux changements au niveau communauté dont la réponse est bien trop souvent tardive (Walker et al., 1996).

En écotoxicologie, les méthodologies biomarqueurs connaissent un développement considérable. Ces derniers sont caractérisés par certaines propriétés : approche prédictive de perturbations fonctionnelles de l'écosystème, sensibilité aux polluants, diagnostic de l'état de santé des organismes, rapidité et maintien de la réponse. Les classifications des biomarqueurs reposent sur l'information qu'ils fournissent.

### **I.5.2 Classifications**

En 1989, le *NRC* (États-Unis) classe les biomarqueurs au sein de trois catégories :

- **biomarqueur d'exposition** : ce type de biomarqueurs révèle une **exposition**. Il peut s'agir d'une substance exogène ou d'un métabolite de cette dernière, d'un produit chimique résultant de l'interaction d'un xénobiotique avec une molécule ou bien une cellule cible.
- **biomarqueur d'effet** : il s'agit d'une **altération** de nature biochimique, physiologique, comportementale ou autre rendant compte ou préliminaire d'une diminution de l'état de santé de l'individu considéré.
- **biomarqueur de sensibilité** : il s'agit d'une **aptitude propre ou acquise** d'un individu de faire face à l'exposition à un xénobiotique particulier.

Depledge (1994) propose la classification suivante pour les biomarqueurs utilisés spécifiquement en écotoxicologie :

- **biomarqueur d'exposition** : il signale l'exposition d'un organisme, d'une population ou bien d'une communauté à un contaminant ou à un groupe de contaminants.
- **biomarqueur d'effet** : il traduit l'altération d'un organisme, d'une population ou bien d'une communauté par un contaminant ou un groupe de contaminants. Ce type de biomarqueur ne fournit pas d'information sur la nature du ou des contaminants(s) en question.

- **biomarqueur mixte d'effet et d'exposition** : il établit une causalité entre une exposition et une altération.
- **biomarqueur d'effets chroniques** : il indique que des organismes, apparemment sains, ont été exposés à un contaminant.

Selon les auteurs, la terminologie employée pour qualifier un biomarqueur varie et en obscurcit le discours. La terminologie « *biomarqueurs d'effets* » et « *biomarqueurs d'exposition* » est selon De Lafontaine et al. (2000) parfois trompeuse puisqu'elle suggère une relation de causalité entre ces derniers alors que ce n'est pas toujours le cas. De ce fait ces auteurs distinguent deux classes de biomarqueur :

- **biomarqueur de défense** : il traduit une adaptation au stress chimique comme la mise en place, par l'organisme exposé, de systèmes de détoxification ou de dégradation des contaminants. Ces biomarqueurs diminuent ou interdisent les effets délétères au niveau individuel et par conséquent leur éventuelle répercussion au niveau populationnel. Exemple : la **métallothionéine (MT)**, l'**activité ÉthoxyRésorufine-O-Dééthylase (EROD)**,
- biomarqueurs de dommage : il traduit une altération biologique de l'organisme comme l'inhibition de l'acétylcholinestérase, les cassures de l'ADN, la peroxydation lipidique, la vitellogénine.

### **I.5.3 Les biomarqueurs utilisés en écotoxicologie**

Plusieurs biomarqueurs de pollution sont couramment utilisés et recommandés (Lagadic et al., 1998 ; BEQUALM) en écotoxicologie.

Les **MT** sont des protéines de type métalloprotéines en raison du fait qu'elles possèdent dans leur structure des ions métalliques. Elles sont de faible masse moléculaire (6 à 7 kDa), thermorésistantes et ont une forte teneur en cystéine. Cette forte teneur en cystéine implique la présence de plusieurs groupements thiols (-SH) responsables de la fixation des métaux ; l'atome de S ayant une forte affinité pour les ions métalliques (Geffard, 2001). La classification et la nomenclature de ces molécules sont relativement complexes. Deux rôles fondamentaux leur sont attribués : l'**homéostasie d'éléments métalliques essentiels**, la **détoxification des métaux** essentiels et non-essentiels. Il est démontré que la synthèse des MT

et des protéines de type MT est induite suite à l'exposition aux **métaux** chez différentes espèces, *in situ* et en laboratoire (Amiard et al., 2006). **La MT est considérée comme un biomarqueur de défense (De Lafontaine et al., 2000)**. La MT fait partie des biomarqueurs reconnus de pollution métallique et a d'ores et déjà été intégrée dans les exercices d'intercalibration organisés au niveau européen (BEQUALM). Les espèces les plus couramment préconisées pour l'application de ce biomarqueur à la surveillance sont, en dehors des vertébrés (foie des poissons), les différentes espèces de moules.

Les **monooxygénases à cytochrome P450** sont présentes chez la plupart des êtres vivants : les archaebactéries, les eubactéries, les plantes, les animaux. Ce sont des enzymes clés dans les mécanismes de **biotransformation des xénobiotiques**. Ces enzymes catalysent la transformation d'un substrat hydrophobe en un produit hydrophile. Elles sont d'ailleurs un oxydant très puissant et ne sont pas spécifiques d'un substrat pouvant ainsi catalyser la transformation de milliers de composés exogènes (xénobiotiques) ou endogènes (hormones par exemple). Leurs activités permettent d'augmenter la solubilité des polluants qui sont ensuite excrétés dans l'urine et la bile. La plupart des formes de cytochrome P450 (à l'exception de celles participant à la biosynthèse d'hormones) peuvent être induites ou réprimées par différents xénobiotiques. Ceci est souvent la cause d'effets secondaires des médicaments. Les **HAP** (hydrocarbures aromatiques polycycliques), les **PCB** (polychlorobiphényles), les **organochlorés** (DDT, lindane...) sont des inducteurs reconnus de ce système enzymatique. **Les monooxygénases à cytochrome P450 sont considérées comme des biomarqueurs de défense. L'activité EROD supportée par les monooxygénases à cytochrome P450 constitue le seul biomarqueur faisant l'objet d'une normalisation (chez le poisson, norme AFNOR : NF T90-385).**

L'**acétylcholinestérase** (AChE) hydrolyse la liaison ester entre le groupe acétyl- et la choline du neuromédiateur acétylcholine. Ce rôle a pour but de limiter la concentration du neuromédiateur dans certaines fentes synaptiques. Son activité est donc essentielle dans la transmission des influx nerveux. L'inhibition de l'AChE constitue un **biomarqueur de neurotoxicité**. Elle est utilisée pour détecter et mesurer les effets biologiques néfastes des composés organophosphorés et des carbamates (Galgani et Bocquené, 1989). Cependant, il semble de plus en plus évident que l'activité AChE pourrait être inhibée par d'autres contaminants comme des produits de biotransformation des PCB ou des métaux tels le Cd (Payne et al., 1996 ; Amiard-Triquet et al., 1998). **L'inhibition de l'AChE est considérée comme un biomarqueur de dommage.**

Les **glutathion-S-transférases** (GST) sont une famille d'enzymes multiples. Celles-ci sont impliquées dans les mécanismes de biotransformation des xénobiotiques et plus particulièrement des contaminants organiques comme les **organochlorés** et les **PCB** (Hoarau et al., 2001 ; Roméo et al., 2003). Précisément, elles catalysent la conjugaison d'un groupement glutathion sur un accepteur au cours des réactions de phase II des mécanismes de biotransformations. Ces mécanismes tendent à inactiver les xénobiotiques ou du moins à rendre ces molécules plus hydrosolubles de manière à pouvoir les excréter par la suite, limitant ainsi leur toxicité. L'induction de l'activité des isoformes de la glutathion-S-transférase en réponse à l'exposition à des **pesticides** est considérée comme un **biomarqueur de défense** (Bebianno et al., 2004).

Le dosage des **TBARS** (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*) incluant le malondialdéhyde (MDA) rend compte du taux de peroxydation des lipides notamment membranaires à la suite d'un stress oxydant (Knight et al., 1988). Ce type de stress peut être occasionné par la présence de certains composés tels les PCB, certains métaux (Cu, Fe...) et certains pesticides. Les systèmes enzymatiques cellulaires de défense contre le **stress oxydant** englobent plusieurs enzymes ou familles d'enzyme: la **superoxyde dismutase** (SOD), la **catalase** (CAT) et les **glutathions peroxydases** (GPx). Ces activités enzymatiques permettent de limiter la toxicité et les effets biologiques néfastes des **espèces réactives de l'oxygène** ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ , peroxydes organiques et inorganiques). La **SOD** catalyse la dismutation de l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ) en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). La **CAT** est impliquée dans les premiers mécanismes de défense contre le stress oxydant (Pellerin-Massicotte, 1997). Précisément elle catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène en eau. Les **GPx** catalysent la dégradation des peroxydes inorganiques ou organiques en utilisant le glutathion (GSH) comme réducteur, elles produisent par conséquent du glutathion oxydé (GSSG). Ces différents systèmes enzymatiques sont considérés comme des **biomarqueurs de défense**.

Les biomarqueurs présentés ici sont couramment utilisés dans les programmes de biosurveillance ou dans le cas de l'étude de la toxicité de certains composés en laboratoire. Cependant, de nombreux autres biomarqueurs attestant de l'intégrité de l'ADN, de la stabilité des membranes cellulaires ou des organites (lysosome) sont également disponibles. Actuellement, beaucoup de travaux concernent la recherche de biomarqueurs de perturbations endocriniennes notamment chez les invertébrés des compartiments aquatique et sédimentaire. Ces biomarqueurs sont notamment les taux en hormones stéroïdiennes impliquées dans la reproduction, et la vitellogénine constituant de réserve des œufs de poisson et certains invertébrés notamment.

Compte tenu de l'importance du compartiment sédimentaire dans le stockage des polluants, il paraissait pertinent dans le cadre du PNETOX II de proposer une matrice biologique représentative telle que l'annélide *N. diversicolor* pour tester des biomarqueurs en milieu naturel et sur une longue période.

#### I.5.4 Les approches multi-marqueurs

La réponse d'un biomarqueur n'est pas, en général, exclusivement observée pour un contaminant particulier (Figure 3). Ainsi, le diagnostic de l'état de qualité de l'environnement à l'aide de biomarqueurs ne peut reposer sur la mesure d'une seule variable. Par conséquent, la méthode aujourd'hui préconisée conçoit l'utilisation conjointe de biomarqueurs en raison de la complexité des sources de pollution dans le milieu et du fonctionnement des écosystèmes (De Lafontaine et al., 2000 ; Beliaeff et Burgeot 2002 ; Lam et Gray, 2003 ; Leiniö et Lehtonen, 2005 ; Damiens et al. 2006).

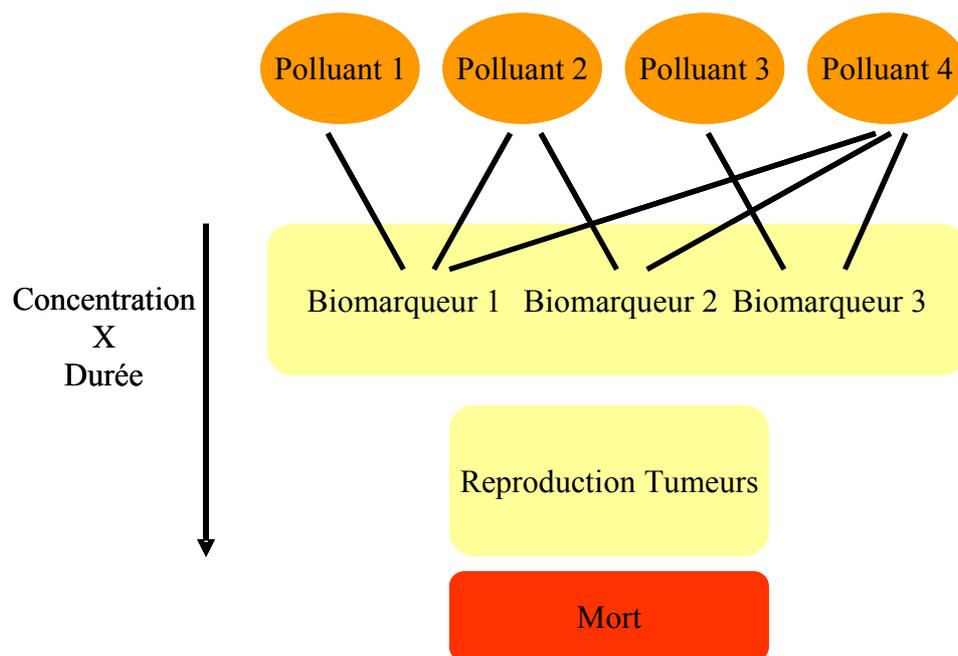


Figure 3: Caractère intégrateur de l'approche multi-marqueurs ; modifié d'après Flammarion (2000).

Le programme de recherche ECOMAN (« *Ecosystem management* ») a été initié en raison de la **nécessité de diagnostiquer** l'état de qualité de l'environnement et par **le besoin de techniques d'évaluation**. Galloway et al. (2004) préconisent ainsi l'utilisation de modèles biologiques complémentaires. Les espèces sélectionnées doivent réunir certaines conditions :

- être communes en milieu côtier,
- facilement reconnaissables,

- représentées dans des habitats et des stratégies d'alimentation différents.

Dans le cadre de ce programme de recherche, les auteurs insistent sur le fait que les réponses biologiques doivent être recherchées à des **niveaux d'organisation biologique variés, cellulaire, physiologique, comportemental en relation avec des biomarqueurs différents** : activité lysosomale, immunocompétence, ...etc. **L'objectif est d'intégrer l'ensemble des effets des stress chimiques.**

L'utilisation d'une batterie de biomarqueurs pour évaluer les effets de la contamination chimique du milieu est reconnue pour son caractère intégrateur. Cependant, Beliaeff et Burgeot (2002) soulignent les **difficultés inhérentes aux approches de terrain**, dans le cas de programme de biosurveillance dans la durée ou bien sur différentes zones géographiques, comme, par exemple, le manque ou l'absence de matériel biologique. Selon eux, ce type de difficultés rend délicat le traitement des données et l'analyse statistique via les méthodes multivariées. Ces auteurs proposent donc le calcul d'un **indice** (« *Integrated Biomarker Response, IBR* ») à partir des **biomarqueurs analysés comme outils d'évaluation du risque écologique**. Les valeurs des indices sont représentées à l'aide de graphiques en radar et rendent compte visuellement de la réponse spatiale ou temporelle de l'indice. **L'avantage de cet indice est de capitaliser et de synthétiser l'ensemble des informations.**

Leiniö et Lehtonen (2005) utilisent l'IBR défini par Beliaeff et Burgeot (2002). Cet indice permet de dresser de manière synthétique l'état de santé des populations de bivalves *Mytilus edulis* et de *Macoma balthica* en mer Baltique. L'indice rend compte très clairement d'une période de stress au printemps - début été des animaux coïncidant avec une disponibilité alimentaire élevée et éventuellement la période de reproduction de ces deux espèces. Damiens et al. (2006) ont transplanté des moules originaires d'un site de référence sur quatre stations de degré de contamination différent en baie de Cannes. Afin d'évaluer l'état de qualité de ces milieux, les auteurs ont mesuré sur ces moules et après un mois de transplantation les réponses de plusieurs biomarqueurs (les activités AChE, GST et CAT, les concentrations en TBARS et MT) ainsi que les niveaux de contaminants (Cd, Cu, Zn, PCB et HAP) bioaccumulés. L'expérimentation a été répétée trois années consécutives à la même période de l'année. L'IBR calculé répondait avant tout à la pollution au Cu et aux PCB mais pas aux HAP. Ainsi l'utilisation de l'IBR est grandement fonction du choix des biomarqueurs déterminés, l'utilisation d'une plus grande batterie de biomarqueurs permettrait de prendre en considération les stress issus des HAP.

Plusieurs auteurs préconisent une approche multi-marqueur (De Lafontaine et al., 2000 ; Beliaeff et Burgeot 2000 ; Leiniö et Lehtonen, 2005 ; Damiens et al., 2006) pour évaluer la qualité de l'environnement. Ainsi, l'approche multi-marqueur préconisée dans les programmes de surveillance de l'environnement suscite de plus en plus la nécessité d'un indice biomarqueur afin d'évaluer l'effet de stress global généré par l'ensemble des contaminants mais aussi de fournir une donnée synthétique dont l'interprétation serait beaucoup plus simple.

### **I.5.5 Les limites de l'approche biomarqueur**

Les biomarqueurs permettent l'acquisition d'informations sur la nature du stress enduré par les organismes et de mesurer les effets de ce dernier. Cependant, l'interprétation de ces biomarqueurs est souvent délicate tant un grand nombre de facteurs de confusion peuvent potentiellement biaiser la réponse de ces indicateurs : la **saison**, la **charge nutritionnelle** du milieu, le **sexe** et l'**âge** des spécimens collectés, ...etc (Lagadic et al., 1997). Du fait de ces facteurs de confusion, l'utilisation des biomarqueurs en milieu naturel est souvent délicate. Ainsi, depuis une décennie, l'écotoxicologie s'est enfermée dans un débat sur la valeur ou l'absence de valeur écologique notamment en raison du fait que certains membres de la communauté scientifique ont réduit le concept de biomarqueur aux marqueurs strictement moléculaires.

Un certain nombre de critiques sont donc actuellement formulées à l'encontre des biomarqueurs (Forbes et al., 2006) :

- **manque de pertinence écologique** : la difficulté de relier des informations fournies par les biomarqueurs aux effets à l'échelle populationnelle conduit certains auteurs à penser que les biomarqueurs ne sont pas de bons prédicteurs d'effets à long terme,
- **variabilité de la réponse** en fonction de l'espèce considérée notamment mais aussi de la durée de l'exposition et de la dose d'exposition,
- **manque de modèles mécanistiques** reliant les causes de la perturbation et la réponse du biomarqueur envisagé,
- **les interactions entre contaminants** lorsque les biomarqueurs sont appliqués de manière singulière.

La variabilité de la réponse de la réponse biologique est une difficulté reconnue depuis longtemps (Cairns, 1992). La **réponse** d'un biomarqueur est fonction d'un grand nombre de

paramètres. Les paramètres les plus souvent mentionnés sont la **dose**, la **durée** d'exposition. Cairns (1992) discute des différents types de **courbe dose-réponse** et notamment de **l'existence ou non d'un seuil dans la réponse biologique**. La Figure 4 présente quatre types de réponse biologique en fonction d'une dose croissante. La Figure 4A illustre, par une variation évidente dans la réponse biologique, la notion de seuil. En opposition, la Figure 4D traduit une réponse biologique linéaire depuis des stress minimaux jusqu'à des stress sévères. Dans le cas de la courbe 4B, un effet positif et transitoire est observé pour des doses faibles alors que dans la courbe 4C, il n'y a pas de seuil clairement défini.

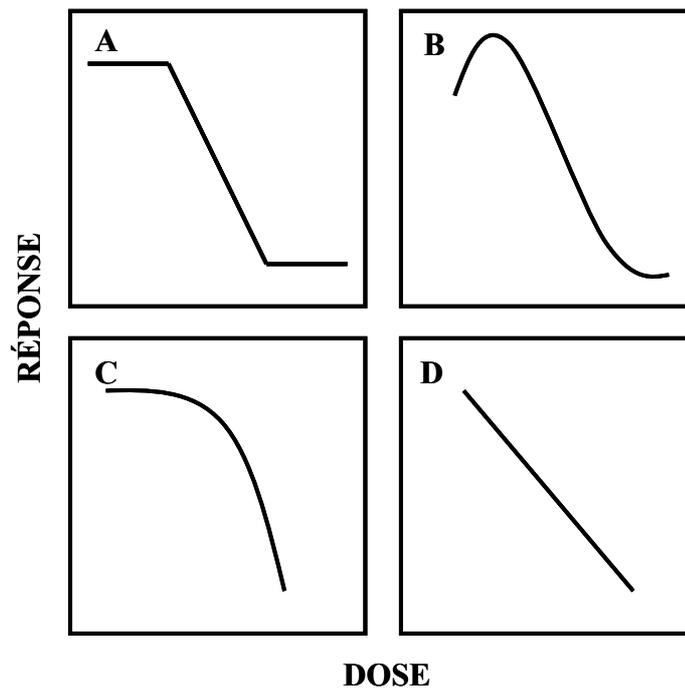


Figure 4: Les différents types de courbe dose-réponse ; modifié d'après Cairns (1992).

La réponse d'un biomarqueur de pollution doit être une variation supérieure (« un signal ») à la variation naturelle du biomarqueur (« le bruit de fond »). Dans certains cas, l'effet observé est évident, il se traduit par un rapport « **signal/bruit de fond** » **fort** (Figure 5A) ; ainsi suite à un stress, une réponse hautement significative du biomarqueur est observée. Par contre, dans d'autres cas le rapport « **signal/bruit de fond** » est **faible** bien qu'une tendance soit observée (Figure 5B). Ces figures illustrent toute la difficulté associée à l'utilisation des biomarqueurs ; très souvent des tendances sont observées mais ne sont pas assez fortes pour être significatives et validé l'utilisation du biomarqueur. Aussi, **il apparaît primordial de disposer d'un suivi de longue durée pour distinguer la variabilité naturelle du biomarqueur de celle induite par le stress chimique**. Cette variabilité de la réponse biologique peut également être appréhendée dans le cas de la surveillance des

niveaux des contaminants des tissus d'espèces bioaccumulatrices. Dans ce cas-là la variabilité est essentiellement spatiale et temporelle.

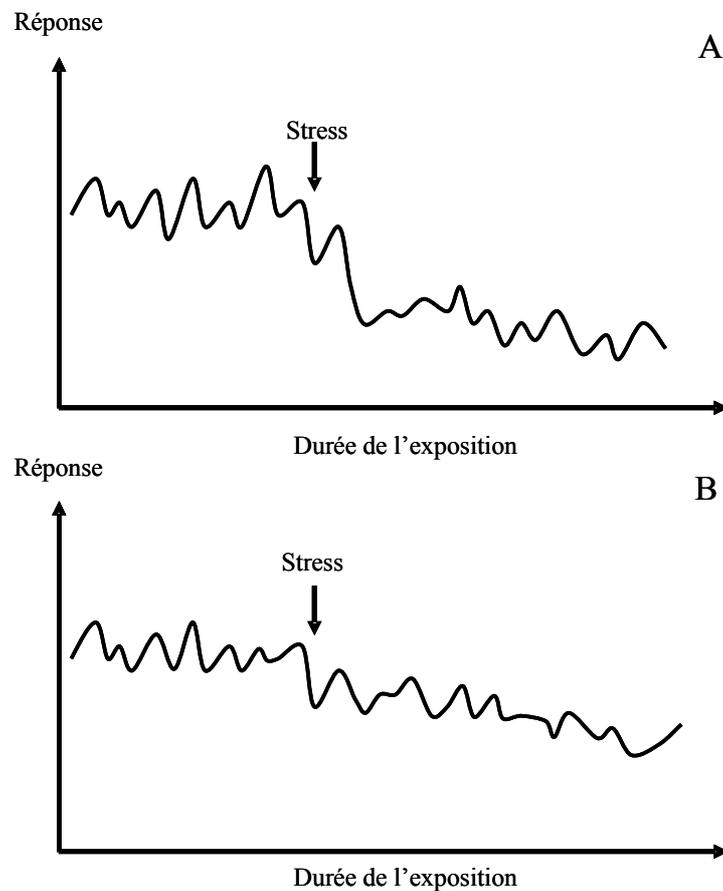


Figure 5: Variabilité de la réponse biologique : "bruit de fond" et "signal de perturbation" ; modifié d'après Cairns (1992). A : rapport « signal/bruit » de fond fort ; B : rapport « signal/bruit de fond » faible.

Pour évaluer précocement les atteintes à l'environnement la méthodologie *biomarqueur* et plus encore l'approche multi-marqueur sont préconisées. Pour valider l'utilisation d'une variable biologique comme biomarqueur, le signal mesuré suite à la perturbation doit être supérieur à la variabilité naturelle. Cette variabilité de la réponse biologique est certainement le plus grand obstacle à la validation de biomarqueurs. De plus, il est actuellement urgent de relier les réponses des biomarqueurs à des conséquences à l'échelle populationnelle. Dans cette optique, les variables biologiques en relation avec la bioénergétique et la reproduction constituent des maillons-clés dans les réponses biologiques successives suite à l'exposition.

## I.6 Concepts de l'allocation des ressources, du stress et de la tolérance

### I.6.1 L'allocation des ressources

Tout animal vivant utilise les **ressources à sa disposition** dans le but de **produire** ou **renouveler** ses tissus constitutifs (somatiques et germinaux) nécessaires au développement, à la **croissance** et à la **reproduction**. Par ailleurs, ces ressources constituent également le **carburant** essentiel au bon fonctionnement de ces processus. Précisément, les animaux tirent ces ressources de la **nutrition**. La locomotion, la prospection pour la nourriture sont aussi des mécanismes nécessitant de l'énergie et font partie d'un ensemble d'**activités** assurant le maintien et la survie de l'organisme dans son milieu.

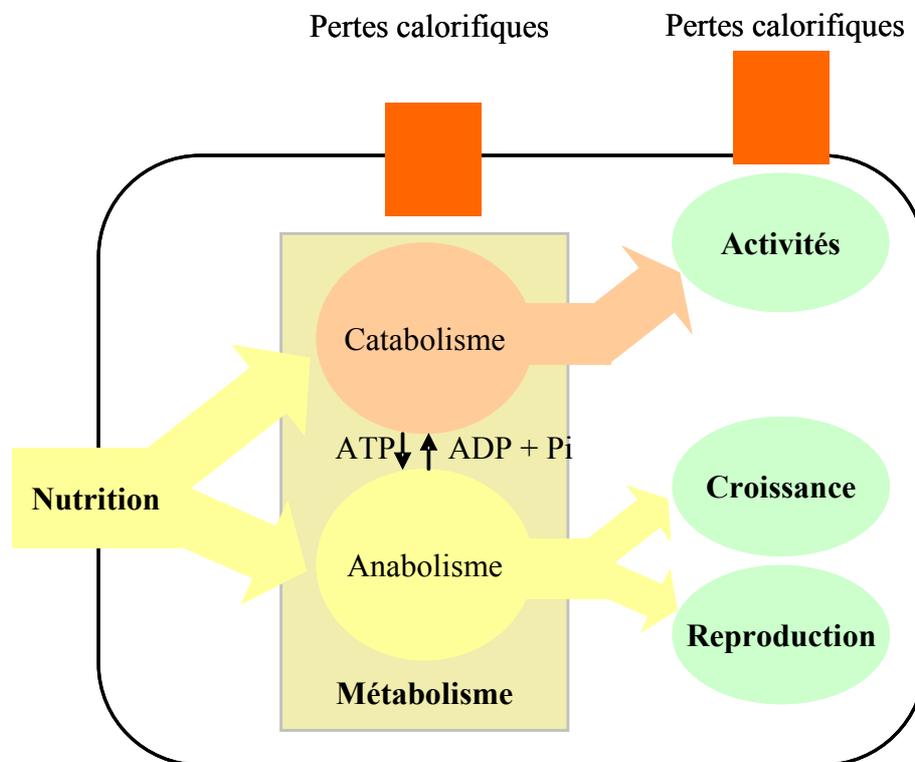


Figure 6: Représentation schématique de l'allocation des ressources chez les animaux ; modifié d'après Barnes et al. (1988).

Au cours de la digestion, les molécules sont dégradées par des enzymes en formes plus simples afin d'être absorbées par les tissus les nécessitant. Par la suite, ces formes simples sont utilisées pour synthétiser des macromolécules biologiques (**anabolisme**) ou pour libérer de l'énergie (**catabolisme**). Ces mécanismes sont décrits dans la Figure 6.

Plusieurs principes régissent l'allocation des ressources :

- la **quantité de nourriture absorbée** par l'organisme est une variable finie. Elle dépend bien sûr de la charge nutritionnelle disponible dans le milieu environnant l'organisme mais elle reste limitée par les mécanismes d'acquisition, de prospection mis en jeu par l'organisme.
- les ressources sont allouées entre différentes fonctions physiologiques. Plus l'**allocation** envers une fonction particulière est élevée, moins de ressources sont par conséquent disponibles pour d'autres fonctions.
- cette allocation différentielle conditionne bien entendu l'état de l'individu. L'allocation entre catabolisme et anabolisme conditionne la **physiologie** ; l'allocation entre diverses activités conditionne le **comportement** ; l'allocation entre croissance et reproduction conditionne la **stratégie reproductive** et le **cycle de vie**.

L'**allocation des ressources** est un processus clé réglant la **biologie de l'individu**. Concrètement, elle influence directement l'aptitude de l'individu dans son environnement.

## I.6.2 Effets des stress et tolérance

L'environnement d'un organisme vivant est caractérisé par un nombre considérable de facteurs abiotiques et biotiques. Ces facteurs constituent le cadre de vie de l'individu. Parmi eux, certains facteurs constituent un **système de contraintes** entraînant des réactions de **stress** de l'organisme vivant. Les **facteurs de stress** peuvent être naturellement présents (disponibilité alimentaire, salinité de l'eau, température, taux d'oxygénation,...) ou d'origine anthropique (contamination du milieu, modification physique de l'environnement...).

D'après Depledge (1994), les effets des stress peuvent être représentés à l'aide d'une courbe décrivant l'état de santé des organismes (sain, stressé, affecté) en fonction de l'état physiologique (Figure 7). Si le stress est transitoire ou si l'intensité de celui-ci est modérée, un ajustement homéostatique permet à l'organisme de retrouver un fonctionnement normal. L'**homéostasie** traduit la capacité de l'organisme à conserver un fonctionnement normal en dépit des contraintes extérieures jusqu'à une certaine limite. Dans cet état, l'organisme est **sain et sa santé n'est pas détériorée**. Si le stress persiste ou si l'intensité de ce dernier augmente, l'organisme met en place des **mécanismes de compensation** de manière à faire

face aux détériorations qu'il subit (**biomarqueurs de défense**). Si l'intensité du stress continue d'augmenter, les mécanismes de compensation sont supplantés et l'individu est incapable de compenser le stress et souffre d'affections curables ou non (**biomarqueurs de dommages**). C'est la **phase de non compensation**. Dans les cas les plus extrêmes, la mort survient.

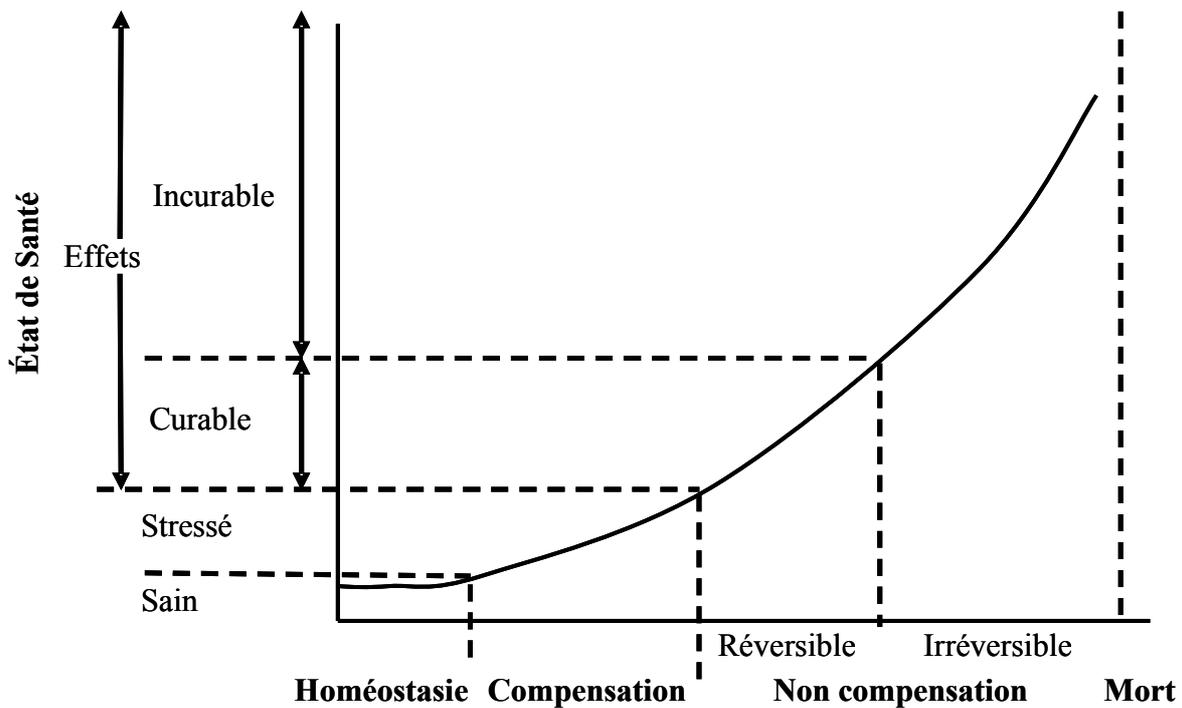


Figure 7: Représentation hypothétique de l'état de santé d'un organisme en relation avec la dégradation de son état physiologique consécutivement à l'exposition à un stress croissant ; modifié d'après Depledge (1994).

**La tolérance peut être définie par l'ensemble des mécanismes mis en place par les êtres vivants pour faire face à la pression exercée par des facteurs externes environnementaux.** Quels sont les mécanismes impliqués dans la tolérance des organismes à l'égard des stress chimiques ? Les mécanismes sont de nature diverse et assez largement décrits. Ils impliquent, à titre d'exemple, la production d'antioxydants qui permettent aux organismes de lutter contre le stress oxydant (Cossu et al., 1997), des enzymes responsables des biotransformations des contaminants lipophiles afin de faciliter leur élimination (Newman et Unger, 2003), des processus de régulation et de détoxification des métaux (Mason et Jenkins, 1995). La tolérance est supportée par deux origines possibles (Klerks et Weiss, 1989). L'exposition à des niveaux sublétaux à des contaminants peut entraîner une **acclimatation physiologique** de l'organisme ; la tolérance n'est dans ce cas-là pas transmissible à la

descendance. La tolérance peut être par contre supportée par une **adaptation génétique**, transmissible à la descendance (Holloway et al., 1990 ; Maltby et al., 2001 ; Marchand et al., 2004).

La **tolérance** est un concept largement étudié en ce qui concerne les **métaux**. Ce phénomène est mis en évidence chez différentes espèces animales, végétales ou bactériennes exposées de manière chronique dans leur milieu de vie à des contaminations métalliques (Klerks et Weis, 1987 ; Amiard-Triquet, 1989 ; Newman et Unger, 2003). Une méthode classique pour évaluer la tolérance d'organismes à l'égard de contaminants métalliques consiste en la réalisation de tests toxicologiques en soumettant à des conditions expérimentales identiques, des animaux originaires de sites sains et contaminés. **L'existence du phénomène de tolérance est en lui-même un indicateur de contamination**. Dans le cas d'un estuaire comme la Restronguet Creek (Angleterre) particulièrement contaminé par les métaux, différentes espèces se révèlent tolérantes : l'algue *Fucus vesiculosus* (Bryan et Gibbs, 1983), le mollusque *Scrobicularia plana* et l'amphipode *Corophium volutator* vis-à-vis du Cu (Bryan, 1976) l'annélide polychète *N. diversicolor* vis-à-vis des métaux (Bryan, 1976 ; Grant et al., 1989 ; Hateley et al., 1989 ; Mouneyrac et al., 2003a). Les **mécanismes** qui soutiennent la **tolérance à l'égard des métaux** sont particulièrement bien décrits (Mason et Jenkins, 1995) et réunis en trois grandes stratégies de défense :

- la **réduction de la prise** : les organismes sécrètent des agents chélateurs diminuant ainsi la biodisponibilité du métal dans leur proche environnement, augmentent les barrières face à l'entrée du métal (carapace, téguments, coquille),
- l'**augmentation de l'excrétion** : excrétion cellulaire (pompes membranaires) excrétion urinaire,
- la **détoxication** : il s'agit de contrôler la biodisponibilité du métal au niveau intracellulaire à l'aide de ligands.

En ce qui concerne les **contaminants organiques et lipophiles**, la tolérance est notamment supportée par la mise en place de mécanismes de biotransformation. Ces mécanismes ont pour but de diminuer la toxicité, d'augmenter l'hydrosolubilité du contaminant pour faciliter son élimination. Parmi les enzymes responsables des

biotransformations de contaminants lipophiles, les cytochromes P-450 catalysent un nombre considérable de réactions chimiques notamment des biotransformations de xénobiotiques (Mansuy, 1998). Ces complexes permettent la métabolisation de composés exogènes de type HAP, pesticides par exemple. L'existence de cytochromes P-450 chez différentes espèces de polychètes est bien connue (Lee, 1998). La caractérisation de gènes codant pour des cytochromes P-450 et leur induction suite à l'exposition à des xénobiotiques est avérée chez une espèce proche de *N. diversicolor*, *N. virens* (Rewitz et al., 2004 ; Jørgensen et al., 2005). La bioaccumulation, la métabolisation contaminants et l'élimination de métabolites a été démontrée chez *N. diversicolor* (Goerke et Weber, 1990 ; Driscoll et McElroy, 1996 ; Christensen, 2002 ; Giessing et al., 2003).

Chez les populations exposées chroniquement à des polluants, l'apparition de la tolérance permet le maintien de l'espèce dans son milieu et de sauvegarder la biodiversité de l'écosystème. Cependant, il est impossible d'établir que ce phénomène soit une réponse générale du biota à l'égard des contaminants. Par contre, les organismes tolérants ont la capacité d'accumuler des quantités significatives de contaminants introduisant ainsi des maillons trophiques hautement contaminés dans les réseaux trophiques des écosystèmes (Rainbow et al., 2004). Quels sont les effets de l'apparition de la tolérance sur l'allocation des ressources ? Est-ce que la mise en place et le maintien de mécanismes de défense et de réparation altère l'aptitude des organismes à croître, se reproduire ?

### **I.6.3 Les coûts de la tolérance**

Il est généralement admis que la mise en place des mécanismes de tolérance et le maintien de ces derniers modifient l'allocation des ressources et plus particulièrement de l'énergie (Holloway et al., 1990 ; Calow, 1991 ; Postma et al., 1995). L'énergie est donc moins disponible pour des fonctions physiologiques précédemment citées (Figure 6), diminuant ainsi l'aptitude de l'individu à survivre, croître et se reproduire dans son environnement. **Ces coûts de tolérance peuvent être appréhendés en étudiant différents traits de vie des individus : le taux de survie, le taux de croissance, la performance de reproduction (maturation des gamètes, fécondité), la longévité.**

De nombreux travaux de recherche tentent d'identifier ces coûts de tolérance. Parmi ceux-ci, certains s'intéressent à identifier les réponses biochimiques, physiologiques de génotypes « sensibles » et « tolérants/résistants » présents dans des populations de sites relativement sain ou impactés. Ainsi, Marchand et al. (2004) étudient des variables physiologiques telles que le taux de croissance, la fécondité relative à la masse, le facteur de condition (rapport masse/taille<sup>3</sup>) chez le flet, *Platichthys flesus*, originaire de trois sites contaminés (estuaires de Loire, de Seine ou de Gironde) ou d'un site modérément contaminé (estuaire du Ster). **Une diminution générale de la fécondité relative, du taux de croissance et du facteur de condition caractérisent les spécimens originaires des sites contaminés par rapport à ceux de l'estuaire du Ster.** Selon les auteurs, la survie des flets originaires des sites contaminés impliquerait des mécanismes de détoxification et/ou de défense contre les contaminants présents dans le milieu. Leur survie serait donc permise au détriment de l'allocation de ressources envers certaines fonctions physiologiques. Les flets issus des sites contaminés (Loire, Gironde) présentent des fréquences alléliques pour des loci spécifiques liés au métabolisme général (PGM 85, AAT1) supérieures à celles de flets de l'estuaire du Ster. Dans le cas de la Seine, les génotypes tolérants sont moins fréquents du fait de la proximité de populations de flets comparativement moins exposées et d'échanges génétiques entre ces dernières. **Cette étude met donc clairement en évidence la sélection de certains génotypes spécifiques en relation avec la tolérance/résistance face aux stress chimiques et les coûts de tolérance.**

Si la survie des animaux dans des environnements pollués est permise par la tolérance et que celle-ci est supportée génétiquement, quel est le statut de la descendance ? Est-ce que les coûts de tolérance perdurent ou s'amointrissent-ils ?

Si la tolérance est classiquement estimée chez des populations naturelles à l'aide de tests toxicologiques, il est assez rare d'étudier la mise en place d'un tel phénomène. Xie et Klerks (2003) démontrent qu'il est possible d'induire une résistance au Cu chez le poisson moustique (*Heterandria formosa*) par la mise en place d'une sélection par le Cd. Concrètement, les auteurs réalisent une sélection artificielle par le Cd au cours de six générations successives de poissons. L'apparition de la tolérance en réponse à la sélection par le Cd est rapide : dès la seconde génération, deux des trois lignées de poissons testées présentent une tolérance à l'égard du Cu. Par la suite, Xie et Klerks (2004) démontrent qu'à la sixième génération, les trois lignées sélectionnées sont trois fois plus tolérantes au Cd en comparaison aux trois lignées de référence. **Les populations tolérantes diffèrent par contre**

**des populations de référence par certains traits de vie : délai dans la reproduction, taille réduite à la première ponte, fécondité en moyenne réduite, longévité également réduite.**

Postma et al. (1995) étudient certains traits de vie de populations de chironomes, *Chironomus riparius*, respectivement tolérantes et non tolérantes au Cd. Les auteurs démontrent que les coûts de tolérance expérimentés par la population tolérante au Cd sont maintenus même lorsque les animaux sont élevés en absence du métal. Ces derniers souffrent de **taux de mortalité plus élevés, présentent des taux de croissance et un succès reproducteur réduit** en comparaison à la population non tolérante. Ces coûts de tolérance sont le résultat d'une accumulation de Zn considérable en comparaison aux organismes non tolérants. Les auteurs concluent que l'exposition prolongée des organismes au Cd génère une tolérance au métal se traduisant par une accumulation significative de Zn ayant pour conséquence les altérations de croissance et de reproduction.

**L'apparition de la tolérance affecte la capacité des individus à croître et se reproduire. Ces coûts de tolérance peuvent avoir des conséquences directes au niveau de la population comme la disparition de certaines classes d'âge ou taille/masse. Ainsi, détecter au niveau des individus les signaux précoces d'une réallocation des ressources pourrait constituer une méthodologie prédictive des changements à l'échelle populationnelle.**

## ***1.7 Le métabolisme et la bioénergétique***

En réponse à l'exposition à des polluants, les ajustements homéostatiques modifient la composition cellulaire qualitativement et quantitativement et, par conséquent, influencent le métabolisme. Le maintien de l'homéostasie à un niveau compatible avec un fonctionnement normal de l'organisme est coûteux énergétiquement. Une multitude de réponses biologiques au stress en relation avec le métabolisme et l'énergie des êtres vivants peuvent être recherchées (Mayer et al., 2002).

### I.7.1 Le métabolisme intermédiaire

Au sein des cellules, de multiples réactions biochimiques se déroulent et constituent le **métabolisme**. Les composés impliqués sont appelés des **métabolites**, les successions ordonnées de réactions biochimiques des **voies métaboliques** (Figure 8). Pour vivre et fonctionner, les cellules vivantes ont besoin en permanence de matières organique et inorganique, d'énergie chimique. Les matières organiques et inorganiques sont tirées de l'**alimentation**. Les polymères contenus dans la nourriture (protéines, polysaccharides, acides nucléiques et lipides) sont dégradés en monomères (acides aminés, glucose, pentose, acides gras) au cours de la digestion. Une grande partie de ces monomères est, par la suite, dégradée en fragments plus petits au cours de réactions du **catabolisme** (voies cataboliques). Les métabolites ainsi formés vont aboutir à la formation d'énergie et sont intégrés au sein de molécules biologiques beaucoup plus complexes (protéines, polysaccharides, acides nucléiques et lipides) au cours des réactions de l'**anabolisme** (voies anaboliques). Les molécules comme le **pyruvate**, l'**acétyl-coenzyme A** et le **glycérol** constituent des liens entre les **métabolismes respectifs des protéines, des sucres et des lipides**.

Au niveau cellulaire, la **forme de réserve de l'énergie chimique la plus importante est l'ATP**. L'hydrolyse de l'ATP en ADP et P libère une grande quantité d'énergie de l'ordre de  $50 \text{ kJ.mol}^{-1}$ . Il s'agit-là d'une molécule biologique-clé. La formation de l'ATP consomme de l'énergie. La synthèse d'ATP nécessite un résidu P et l'association de celui-ci à un ADP. Les événements qui conduisent à l'apparition de résidus P sont des phosphorylations de chaînes de substrats. Ce type de réactions existe au sein de différentes voies métaboliques : la **glycolyse** (dégradation du glucose), le **cycle de l'acide citrique** (fournit des précurseurs pour les voies anaboliques du glucose, des acides aminés et des acides gras) mais la voie la plus importante de formation de l'ATP est la **phosphorylation oxydative** qui nécessite la présence d'oxygène. Au cours de celle-ci, les voies cataboliques engendrent des cofacteurs réduits (NADH,  $\text{QH}_2$ ). En milieu aérobie, les cellules animales sont capables de « respirer » et de dégrader complètement divers types d'aliments (protéines, sucres, lipides) par des processus oxydatifs engendrant la formation d'ATP. Par contre, en milieu anaérobie, seule la glycolyse peut servir à la formation d'ATP. Ce mode de formation de l'ATP en milieu anaérobie est une fermentation avec un rendement beaucoup plus faible que celui de la respiration (2 ATP formés au cours de la fermentation lactique contre 32 au cours de la respiration et ce à partir d'une molécule de glucose).

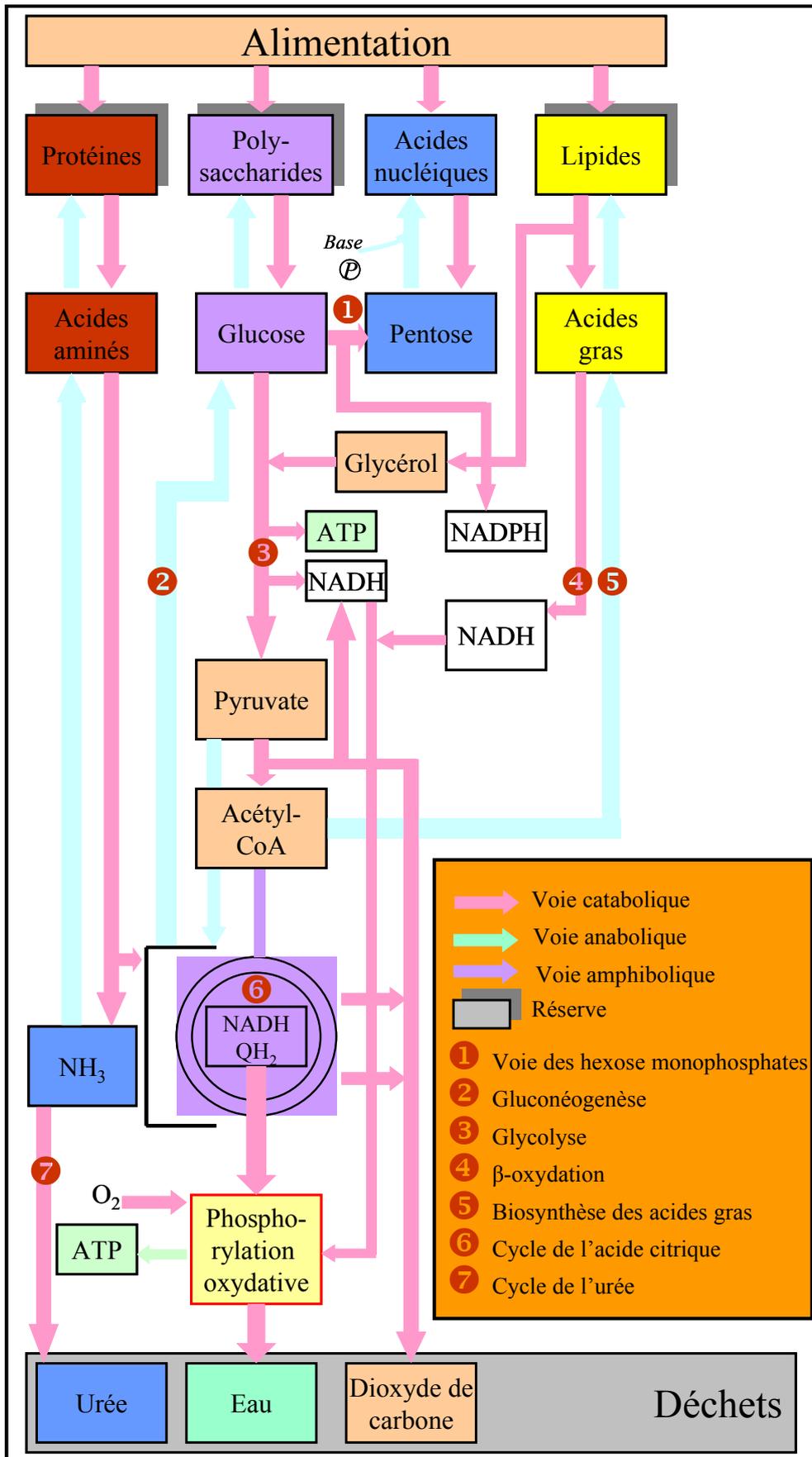


Figure 8: Vue générale du métabolisme intermédiaire.

## I.7.2 Indicateurs en relation avec le métabolisme et la bioénergétique

Plusieurs paramètres énergétiques sont proposés comme indicateurs de l'état de santé des organismes (Le Gal et al., 1997 ; Mayer et al., 2002) :

- **la charge énergétique en adénylates** qui permet de mesurer l'énergie chimique nécessaire au métabolisme intermédiaire,
- **les réserves énergétiques** (glycogène, lipides, protéines) et le **contenu calorique d'un organisme**,
- **l'activité d'enzymes clés** des voies métaboliques qui permet d'identifier les dysfonctionnements dans les voies métaboliques,
- **l'allocation énergétique cellulaire** qui permet d'établir le budget énergétique net de la cellule,
- **l'allocation énergétique à la croissance et à la reproduction** qui permet d'évaluer l'allocation de l'énergie et des ressources,
- **les indices de condition** qui renseignent sur l'état général des organismes.

### I.1.1.1 La charge énergétique en adénylates

La CEA est un système ubiquiste chez les animaux et classiquement utilisée pour mesurer l'énergie métabolique potentiellement disponible au sein d'un organisme vivant. Cette variable est basée sur la mesure des concentrations en ATP, ADP et AMP:

$$CEA = \frac{ATP + \frac{1}{2}ADP}{ATP + ADP + AMP}$$

**Équation 1: Calcul de la charge énergétique en adénylates (CEA) où ATP, ADP et AMP représentent respectivement les concentrations en adénosines triphosphate, diphosphate et monophosphate.**

Les variations de la CEA en réponse à des facteurs naturels, à l'exposition à des contaminants en laboratoire ou *in situ* sont décrites dans plusieurs synthèses (Le Gal et al., 1997 ; Mayer et al., 2002). Par définition, la CEA varie de zéro (si tous les adénylates sont stockés sous la forme AMP) à un (si tous les adénylates sont stockés sous la forme ATP). Dans les conditions optimales, un équilibre s'établit entre la dégradation et la régénération de l'ATP qui semble maintenir les valeurs de la CEA autour de 0,80. Les valeurs de la CEA sont

mises en relation avec l'aptitude des organismes à survivre, croître et se reproduire. Ainsi, en absence de perturbations ( $0,75 < \text{CEA} < 0,90$ ) le taux de croissance est élevé, la survie et la reproduction assurées. Dans le cas de perturbations partielles ( $0,50 < \text{CEA} < 0,75$ ), la survie est assurée, mais la croissance et la reproduction sont diminuées ou arrêtées ; pour autant une restauration est possible. Dans le cas de perturbations sévères ( $\text{CEA} < 0,50$ ), croissance et reproductions sont interdites, la viabilité est diminuée même après retour à des conditions optimales.

Les études utilisant la CEA sont majoritairement réalisées sur des organismes aquatiques de divers groupes taxonomiques (annélides, mollusques, crustacés, poissons). **La CEA est généralement réduite suite à l'exposition en laboratoire ou *in situ* à des métaux et des contaminants lipophiles** (pesticides, PCB, hydrocarbures). Chez *N. virens*, Haya et Waiwood (1983) démontrent qu'une exposition à l'endosulfan pendant 72 à 96 h entraîne une diminution de la CEA. Toutefois, les mesures effectuées sur des organismes prélevés dans des estuaires, expérimentant l'exposition à des contaminants depuis de multiples générations, révèlent que la CEA n'est pas modifiée vraisemblablement du fait de processus de sélections. Cela a été observé chez *N. diversicolor* (Verschraegen et al., 1985).

Des corrélations strictes entre les variations de la CEA et les aptitudes à la survie des organismes ne sont pas toujours observées. Une baisse de la CEA indique que l'organisme réagit au stress par une consommation de l'énergie. Par contre, lorsque les capacités de l'organisme sont dépassées, les valeurs des mesures de CEA sont très dispersées. Le stress est, à ce moment-là, à l'origine de perturbations profondes de la physiologie de l'organisme et des mortalités à l'échelle de la population sont enregistrées.

**Outre la présence de stress chimiques dans le milieu, les facteurs de stress naturels tels que la température, la salinité, le pH et la concentration en oxygène modifient la CEA (Le Gal et al., 1997). Les facteurs abiotiques du milieu sont autant de sources naturelles de stress pour les organismes et leur influence potentielle sur le métabolisme énergétique doit donc être prise en considération.**

I.1.1.2 Les enzymes du métabolisme intermédiaire

Les contaminants peuvent interagir avec ces enzymes selon différents modes d'action (Mayer et al., 2002) :

- inhibition de l'enzyme,
- induction de l'enzyme par des contaminants spécifiques,
- augmentation de la concentration de l'enzyme dans le milieu intérieur de l'organisme suite à sa libération en raison de dommages cellulaires,
- altération de l'activité enzymatique suite à des changements d'ordre métabolique.

Des ajustements de l'homéostasie en réponse à l'exposition à des contaminants peuvent entraîner des changements dans les voies métaboliques : activation du catabolisme (glycogénolyse, glycolyse, lipolyse) et/ou stimulation des voies anaboliques (synthèse de protéines pour la réparation tissulaire). C'est précisément dans cette optique que plusieurs enzymes du métabolisme sont proposées comme indicateurs généraux de stress (Tableau 1).

**Tableau 1: Enzymes limitantes impliquées dans le métabolisme et proposées comme indicateurs généraux de stress.**

Enzyme	Voie métabolique	Effet
Glycogène phosphorylase	Glycogénolyse	Mobilisation du glycogène
Hexokinase	Glycolyse	Synthèse d'ATP
Phosphofructokinase	Glycolyse	Synthèse d'ATP
Pyruvate kinase	Glycolyse	Synthèse d'ATP
Isocitrate déshydrogénase	Cycle de l'acide citrique	Synthèse de précurseurs pour les voies anaboliques, de métabolites réduits pour les phosphorylations oxydatives
Glutamate déshydrogénase	Métabolisme des acides aminés	Dégradation d'acides aminés
Aspartate aminotransférase	Métabolisme des acides aminés	Dégradation d'acides aminés
Glucose-6-phosphate déshydrogénase	Voie des hexoses monophosphates	Fournit du pouvoir réducteur (NADPH)
Lactate déshydrogénase	Fermentation lactique	Maintien du pouvoir redox

**Parmi les enzymes du métabolisme énergétique proposées comme indicateurs généraux de stress, certaines sont impliquées dans la régulation du glucose et notamment de la mobilisation du glycogène.**

### *1.1.1.3 Les réserves énergétiques*

Un grand nombre de stress (physiques, chimiques), de fonctions physiologiques (croissance, reproduction) peuvent entraîner la mobilisation des réserves énergétiques. Lorsque l'assimilation d'énergie est supérieure aux demandes, l'énergie est stockée sous forme de glycogène et/ou de lipides. Les protéines peuvent également être mobilisées mais cette mobilisation se fait au dépens de leur rôle dans la structure et le fonctionnement de l'organisme.

#### *Les constituants de réserves énergétiques*

Le *glycogène* est un polysaccharide, représentant chez les animaux la **forme majeure de stockage du glucose**, élément central du métabolisme intermédiaire notamment quant à la formation d'ATP. Le glucose n'est pas stocké à l'état libre car une forte concentration en glucose rendrait le contenu cellulaire hypertonique et entraînerait une entrée massive d'eau dans la cellule. Par contre, le glycogène est lui peu soluble dans l'eau et presque inactif sur le plan osmotique. Chez les vertébrés, le foie est le premier organe de stockage du glycogène, viennent ensuite les muscles ; le contenu en glycogène dans les autres organes étant très faible. Chez les invertébrés, le glycogène a été étudié plus particulièrement chez les bivalves et les crustacés. Chez les moules, les organes principaux de stockage sont l'hépatopancréas et le manteau.

Les *lipides* sont un vaste groupe de substances biologiques généralement divisées en substances hydrolysables et substances non hydrolysables. De manière succincte, les lipides hydrolysables regroupent des esters (graisses, cires), des phospholipides, des sphingolipides alors que les lipides non hydrolysables sont des hydrocarbures (alcanes, caroténoïdes). Les rôles biologiques des lipides sont divers : matériau dans la formation des membranes cellulaires (phospholipides, glycolipides, cholestérol), isolant thermique mais aussi mécanique et également d'hormone, de médiateur, de second messenger. Ils sont, avant tout cela, un formidable combustible et constituent la réserve d'énergie la plus importante chez les animaux. Dans ce rôle-ci, ils sont stockés sous forme de gouttelettes lipidiques dans des cellules spécialisées, les adipocytes.

Les *protéines* jouent un rôle structural et fonctionnel dans les organismes biologiques : la formation et le maintien des structures (tissus, organes), le transport d'autres substances (par exemple l'hémoglobine comme transporteur d'oxygène moléculaire), la défense et la protection de l'organisme (les immunoglobulines, protéines de détoxications, enzymes de biotransformations) contre les agents étrangers, le contrôle et la régulation de processus physiologiques (les hormones), la catalyse de réactions biochimiques (enzymes), les mouvements (protéines des fibres musculaires) et dans une moindre mesure de réserve énergétique.

Le glycogène et les lipides sont toujours utilisés en premier ; dans le cas de **stress sévères**, les protéines peuvent être mobilisées. **Quel que soit le constituant de réserve considéré, plusieurs facteurs intrinsèques (âge, sexe, état reproducteur) ou extrinsèques (disponibilité alimentaire, saison) influencent le niveau en réserves énergétiques.**

#### *Le contenu calorique d'un organisme*

Les constituants des réserves énergétiques peuvent être mesurés individuellement au sein d'un organisme, d'un organe, d'un tissu ou bien conjointement. Afin d'estimer au mieux la quantité d'énergie présente dans un organisme les contributions énergétiques des constituants de réserves peuvent être sommées en utilisant les énergies de combustion propres à chacun des constituants : 17,5 kJ.g<sup>-1</sup> pour le glycogène, 24 kJ.g<sup>-1</sup> pour les protéines, 39,5 kJ.g<sup>-1</sup> pour les lipides.

#### *Utilisation des réserves énergétiques en tant que biomarqueurs*

Au regard des données de la bibliographie (Tableaux 2 et 3 ; Le Gal et al., 1997. Mayer et al., 2002), les **réserves énergétiques** sont utilisées chez des organismes de groupes taxonomiques très variés (poissons, mollusques bivalves, arthropodes, annélides) dans les milieux aquatiques ou terrestres. Ces réserves sont analysées individuellement ou conjointement dans certains organes (muscle, gonade, manteau, hépatopancréas, glande digestive) ou dans l'organisme entier.

D'une manière générale, que ce soit en laboratoire (Tableau 2) ou *in situ* (Tableau 3) **la réponse à l'exposition aux métaux** (Cu, Zn, Hg, Cd, Pb), aux **organochlorés** (lindane, endosulfan), aux **organophosphorés** (parathion), aux **PCB**, aux **effluents** domestiques et/ou industriels ou aux sédiments collectés en zones polluées est une **diminution des réserves énergétiques**. Les réponses des réserves énergétiques ne sont mesurables qu'après plusieurs heures ou jours d'expositions. Ce délai relatif dans la réponse a l'avantage de ne pas prendre en compte le stress lié à la manipulation des organismes. Par ailleurs, les variations détectées se maintiennent pendant plusieurs jours (Gimeno et al., 1995). **Les diminutions en réserves**

**énergétiques sont éventuellement associées à d'autres indicateurs généraux de stress comme une diminution du taux de croissance** (Ribeiro et al., 2001 ; Mosleh et al., 2005), **une diminution des tailles/masses des organismes** (Maryanski et al., 2002).

Le glycogène est le premier constituant de réserves mobilisé pour subvenir aux besoins en énergie des organismes exposés. Les lipides et les protéines sont par la suite mobilisés via des voies cataboliques du métabolisme intermédiaire. Par exemple, Ribeiro et al. (2001) démontrent une mobilisation du glycogène et des lipides lors de l'exposition des organismes à l'endosulfan (0,1 à 500  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) alors que les niveaux en protéines restent inchangés. En revanche, les auteurs rapportent des diminutions significatives des protéines suite à l'exposition au parathion. **La mobilisation des réserves énergétiques est donc fonction du type de stress.**

Outre les variations liées à l'exposition à des toxiques, la variabilité des concentrations en réserves énergétiques des organismes est fonction de nombreux facteurs : les **différences interspécifiques** (Schill et Köhler, 2004), l'**acclimatation physiologique** (Bossuyt et Janssen, 2003 ; Canli, 2005) et l'**état nutritionnel** (Leung et Furness, 2001) des organismes.

Bossuyt et Janssen (2003) démontrent que l'acclimatation au Cu (de 0,5 à 100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) conditionne les niveaux en réserves énergétiques des organismes élevés en laboratoire. À la troisième génération, les individus présentent une tolérance accrue au Cu et des niveaux en réserves énergétiques plus élevés en comparaison aux organismes de la première génération. Canli (2005) démontre, chez *D. magna*, que les animaux pré-exposés au Zn et ayant acquis une tolérance pour le métal ne mobilisent pas les réserves énergétiques suite à l'exposition en laboratoire au Zn (0,1 et 1,0  $\mu\text{M}$ ) par comparaison avec les organismes non exposés.

Les travaux de Leung et Furness (2001) mettent en évidence, chez *Nucella lapillus*, que la **nutrition et surtout la qualité** de cette dernière permettent aux organismes de supporter l'action toxique du Cd et de maintenir des réserves en glycogène à des niveaux convenables. Ainsi, les auteurs n'observent pas de diminutions des concentrations en glycogène suite à l'exposition au Cd. Par contre, le jeûne prolongé des organismes exposés au Cd induit une perte de masse, des concentrations métalliques plus élevées résultant en une augmentation de la mortalité. Les auteurs insistent sur la nécessité de prendre en considération la croissance (dilution pondérale des toxiques), la condition et la qualité de la nourriture des organismes pour l'interprétation des résultats.

**Tableau 2: Exemples d'études de la réponse des réserves énergétiques à l'exposition à des contaminants en laboratoire.**

Contaminant	Espèce	Conditions d'exposition	Variable	Matériel utilisé pour les dosages	Réponse des réserves énergétiques	Référence
Zn	<i>Daphnia magna</i>	Laboratoire Doses : 0,1-1,0 µM	Protéines, sucres, lipides	Organisme entier	Augmentation après pré exposition	Canli, 2005
Zn, Cd	<i>Poecilius cupreus</i>	Laboratoire, nourriture contaminée	Contenu calorique	Organisme entier	Diminution pour les deux métaux	Maryanski et al., 2002
Cd	<i>Macoma balthica</i>	Laboratoire pendant 5 semaines Doses : 0-10-30-100-300 ppb	Glycogène	Organisme entier	Diminution	Duquesne et al., 2004
Cd	<i>Nucella lapillus</i>	Laboratoire pendant 80 jours Dose : < 0,01 et 400 µg.L <sup>-1</sup>	Glycogène	Glande digestive, gonade	Pas d'effet	Leung et Furness, 2001
Cd	<i>Nereis virens</i>	Laboratoire, de 2 à 80 jours, Doses : de 0,5 à 40 mg.L <sup>-1</sup>	Glycogène	Segments postérieurs	Diminution sur longue durée	Carr et Neff, 1982
Cu	<i>Daphnia magna</i>	Laboratoire, Doses : 0,5-1-5-12-35-100 µg.L <sup>-1</sup>	Réserves énergétiques (Protéines, glycogène, lipides)	Organisme entier	Diminution significative des réserves énergétiques chez les spécimens de la première génération en comparaison aux spécimens de la troisième	Bossuyt et Janssen, 2003
Pb	<i>Porcellio scaber</i>	Laboratoire, de 7 à 80 jours, Doses : 1 à 100 mg.L <sup>-1</sup>	Protéine, Glycogène	Organisme entier	Diminution	Knigge et Köhler, 2000
Hg	<i>Daphnia magna</i>	Laboratoire pendant 96 heures	Poly-saccharides	Organisme entier	Diminution	De Coen et Janssen, 1997
Lindane	id.	Hg : 1,8-3,2-5,6-10-18-24-32 µg.L <sup>-1</sup>	Lipides	id.	Diminution	id.
	id.	Lindane : 0,056-0,10-0,18-0,32-0,56-0,75 mg.L <sup>-1</sup>	Protéines	id.	Diminution	id.
Endosulfan	<i>Anguilla anguilla</i>	Laboratoire pendant 12, 24, 48, 72, 96 heures à 4,1-	Glycogène	Muscle	Diminution	Gimeno et al., 1995

Parathion	<i>Porcellio dilatatus</i>	8,2 µg.L <sup>-1</sup>				
Endosulfan	Id.	Laboratoire Pendant 21 jours à 0,1-1- 10-25-50- 100-250-500 µg.g <sup>-1</sup>	Glycogène Lipides Protéines Id.	Organisme entier  id.	Diminution Diminution Diminution Diminution Pas d'effet	Ribeiro et al., 2001
Fenhexamide	<i>Tubifex tubifex</i>	Laboratoire pendant 2, 4 et 7 jours 0,1-1-10 mg.L <sup>-1</sup>	Glycogène, Protéines	Organisme entier	Diminution significative dès 2 à 4 jours d'exposition	Mosleh et al., 2005
PCBs	<i>Crassostrea virginica</i>	Laboratoire pendant 8 semaines 0,35-3,5µg	Glycogène	Muscle adducteur Manteau Gonade	Diminution  Pas d'effet Pas d'effet	Encomio et Chu, 2000

**Tableau 3: Exemples d'études de la réponse des réserves énergétiques à l'exposition chronique à des contaminants *in situ*.**

Contaminant	Espèce	Conditions d'exposition	Variable	Matériel utilisé pour les dosages	Réponse des réserves énergétiques	Référence
Pollution métallique	<i>Oniscus asellus</i> <i>Porcellio scaber</i>	<i>in situ</i>	Glycogène	Hépatopancréas	Diminution Pas d'effet	Schill et Köhler, 2004
	<i>Oniscus asellus</i> <i>Porcellio scaber</i>	id.	Lipides	id.	Diminution Pas d'effet	id.
Pollution métallique	<i>Porcellio scaber</i>	<i>in situ</i>	Réserves énergétiques (Protéines, sucres, lipides)	Hépatopancréas	Diminution chez les spécimens aux concentrations métalliques maximales	Donker, 1992
Effluents domestiques et industriels	<i>Dreissena polymorpha</i>	<i>in situ</i> , gradient de pollution	Glycogène Lipides Protéines	Organisme entier	Diminution	Smolders et al., 2004
Effluents	<i>Nereis virens</i>	<i>in situ</i> , comparaison entre sites de référence et impacté	Glycogène Lipides	Segments postérieurs	Diminution du glycogène et augmentation des lipides chez les spécimens du site impacté	Carr et Neff, 1984a

Les variations naturelles les plus importantes en réserves énergétiques et notamment en glycogène sont indiscutablement liées aux **variations saisonnières** (Le Gal et al., 1997). La saison, au travers des variations de **température** et de **photopériode**, influence significativement l'**état reproducteur** des organismes en milieu naturel qui accumulent de manière saisonnière des réserves énergétiques pour satisfaire les demandes de la reproduction

(Pellerin-Massicotte et al., 1994). Par ailleurs, la saison influence également la **charge nutritionnelle du milieu**.

Chez *N. virens*, espèce voisine de *N. diversicolor* les réponses des réserves énergétiques (glycogène, lipides) sont observées lors d'expositions en laboratoire et *in situ*. **Ainsi, l'utilisation des réserves énergétiques chez *N. diversicolor* paraît prometteuse.**

#### I.1.1.4 Le rapport oxygène : azote

L'importance relative des constituants de réserves dépend grandement de l'état du métabolisme intermédiaire de l'organisme considéré. Dans des conditions de stress sévères, les protéines sont catabolisées générant une stimulation du cycle de l'urée et, par conséquent, une augmentation des déchets azotés. De ce fait, le rapport *oxygène : azote* a été proposé pour mesurer le taux d'utilisation des protéines. Plus les protéines sont mobilisées, plus le rapport oxygène : azote diminue (Mayer et al., 2002).

#### I.1.1.5 L'allocation énergétique cellulaire

La méthodologie de l'AEC (« *Cellular Energy Allocation* ») est définie récemment (De Coen et Janssen, 1997) :

$$AEC = \frac{\int_0^t E_{adt} - \int_0^t E_{cdt}}{t}$$

**Équation 2: Calcul de l'allocation énergétique cellulaire où  $E_a$  représente l'énergie disponible au sein de l'organisme (la somme des contributions énergétiques des trois constituants de réserves énergétiques: sucres, lipides, protéines),  $E_c$  l'énergie consommée,  $t$  la durée d'exposition.**

Ce paramètre rend compte du budget énergétique net d'un organisme biologique. L'utilisation de l'AEC est récente ; ainsi peu d'exemples de l'utilisation de ce paramètre en réponse à l'exposition à des contaminants sont disponibles dans la littérature (Tableau 4). Les études disponibles ont été effectuées sur des invertébrés aquatiques exposés à divers types de contaminants (organochloré, métaux) en laboratoire ou *in situ*. Pour chacune des études, **une diminution du budget énergétique cellulaire est observée en réponse à l'exposition à des polluants.**

Chez *Neomysis integer*, Verslycke et al. (2004a) observent une diminution de l'AEC pour toutes les concentrations testées (0,038-0,056-0,072 et 0,100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) et les deux durées

d'exposition (48 et 196 heures). Les auteurs mettent en évidence une diminution nette quelle que soit la concentration testée et n'observent pas de courbe réponse dépendante de la dose d'exposition. Ainsi, l'AEC **constitue un paramètre énergétique sensible**. Smolders et al. (2004) étudient les réponses de l'AEC chez des moules dréissènes (*Dreissena polymorpha*) originaires d'un site sain et transplantées dans plusieurs localités polluées pendant 1, 3, 7, 14 et 28 jours. Les auteurs démontrent que les budgets énergétiques cellulaires sont les **marqueurs biochimiques les plus rapides et les plus sensibles**. Par ailleurs, ces auteurs mettent en relation ces mesures à l'échelle cellulaire avec des **altérations tissulaires** (teneur en eau) après 28 jours de maintien dans les localités polluées.

Chez la daphnie (*Daphnia magna*), qui a un cycle de vie très court, la pertinence écologique de ce paramètre énergétique peut être étudiée. Ainsi, une diminution du budget énergétique cellulaire a des conséquences sur la taille des organismes à maturité sexuelle et la quantité de progéniture (De Coen et Janssen, 1997 ; De Coen et Janssen, 2003). **Selon ces auteurs, les paramètres en lien avec le métabolisme énergétique constituent le lien (« The missing biomarker link ») entre des réponses suborganismales et les réponses individuelles qui sont des prédicteurs d'effets à l'échelle populationnelle.**

Tableau 4: Exemples d'études de la réponse de l'AEC à l'exposition à des contaminants *in situ* ou en laboratoire.

Exposition	Espèce	Matériel utilisé pour les dosages	Effet	Référence
Hg Lindane	<i>Daphnia magna</i>	Organisme entier	Diminution Diminution	De Coen et Janssen, 1997
<i>in situ</i> (transplantation), gradient de pollution	<i>Dreissena polymorpha</i>	Organisme entier	Diminution	Smolders et al., 2004
Chlorpyrifos	<i>Neomysis integer</i>	Organisme entier	Diminution	Verslycke et al., 2004a
Cd Cr TBT 2, 4 D Lindane PCP	<i>Daphnia magna</i>	Organisme entier	Diminution Diminution Diminution Diminution Diminution	De Coen et Janssen, 2003

**L'étude des réponses de l'AEC aux expositions à des polluants met clairement en évidence que les paramètres énergétiques constituent des marqueurs pertinents de l'exposition. De plus les variations de l'AEC peuvent être utilisées pour appréhender l'état de condition des organismes et prédire des conséquences à des niveaux d'organisation biologique supérieurs (« *The missing biomarker link* »).**

#### *1.1.1.6 L'allocation énergétique à la croissance et à la reproduction*

Cette variable est généralement plus connue sous sa dénomination anglaise « *scope for growth* » (Le Gal et al., 1997). Elle rend compte de la quantité d'énergie disponible pour la croissance et la reproduction une fois que les besoins du métabolisme basal sont couverts. Elle est définie comme suit :

$$P = A - (R + E)$$

**Équation 3: Calcul de l'AECR: P désigne la production, l'énergie disponible pour la croissance et la reproduction - A désigne l'énergie assimilée par la nourriture - R désigne l'énergie utilisée pour la respiration - E désigne l'énergie perdue par excrétion en particulier les dérivés azotés.**

Cette méthode nécessite de transporter des animaux au laboratoire afin de pouvoir mettre en œuvre les différentes mesures. La respiration ou la consommation d'oxygène, l'excrétion de dérivés azotés peuvent être suivis en continu. L'énergie ingérée via la nutrition nécessite de connaître la quantité réellement absorbée par le tube digestif. Par la suite, les paramètres mesurés (A, R et E) doivent être convertis en équivalents énergétiques (joules par heure). **Un grand nombre de facteurs influence l'AECR : température, oxygène dissous, disponibilité alimentaire, taille/masse, la période de reproduction (Mayer et al., 2002).**

Cependant elle est proposée depuis longtemps pour mesurer les effets *in situ* des contaminants sur les organismes biologiques (Smaal et Widdows, 1994 ; Tableau 9). Cette méthode est beaucoup utilisée chez les moules en raison de la sédentarité de ces animaux (Smaal et Widdows, 1994 ; Widdows et al., 1997, Widdows et al., 2002). Widdows et al. (1997) mesurent des corrélations négatives et significatives entre l'AECR et les concentrations en PCB, DDT et organochlorés des tissus de moules exposées dans la lagune de Venise mais pas dans le cas de métaux. De même Widdows et al. (2002) démontrent que les diminutions significatives de l'AECR sont essentiellement liées à la présence des HAP.

**Tableau 5: Exemples d'études des réponses de l'AECR à l'exposition à des contaminants in situ ou en laboratoire.**

Contaminant	Espèce	Conditions d'exposition	Réponse	Référence
Chlorpyrifos	<i>Neomysis integer</i>	Laboratoire pendant 48, 96 et 168 heures, Doses: 0,038-0,056-0-072-0,100 µg.L <sup>-1</sup>	Diminution	Verslycke et al., 2004a
Métaux, PCBs, DDT, Organochlorés Biomonitoring 38 stations explorées	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	<i>in situ</i>	Diminution	Widdows et al., 1997
	<i>Mytilus edulis</i>	<i>in situ</i>	Diminution Influence HAP majoritaire	Widdows et al., 2002

#### I.1.1.7 Les indices de condition

Des mesures morphologiques et/ou biométriques peuvent être utilisées pour déterminer des indices de condition chez divers organismes (Tableau 6 ; Mayer et al., 2002). Les **indices hépatosomatiques** et **gonadosomatiques** consistent en le rapport de la masse de l'organe (foie, gonade) par la masse de l'organisme sans les organes reproducteurs. Ces indices sont utilisés chez les poissons, les oiseaux et les mammifères, les mollusques bivalves. Plusieurs **indices de condition générale** (indice de condition, facteur de condition) basés sur la mesure des masses et longueur des organismes sont utilisés pour avérer leur état de santé général. Ces indices sont notamment développés chez les poissons et les mollusques bivalves.

Dans le cas d'une exposition au Cd (5 jours, doses : 0-10-30-100-300 ppb) Duquesne et al. (2004) notent une diminution de l'indice de condition chez *Macoma balthica*. Cependant **l'utilisation de ce type d'indicateurs est surtout développée in situ**. Chez *Mya arenaria*, mollusque bivalve **intrasédimentaire**, des **diminutions de la condition et de l'indice gonadosomatique** sont observées chez des spécimens collectés sur des stations impactées par des effluents portuaires (Blaise et al., 2002 ; Gagné et al., 2002, 2003 ; Gauthiec-Clerc et al., 2002 ; Siah et al., 2003). Marchand et al. (2004) observent **une diminution générale de la fécondité relative du facteur de condition chez des poissons plats prélevés dans des estuaires impactés** (Loire, Seine ou Gironde) en comparaison à ceux d'un estuaire de référence (estuaire du Ster). Chez la moule dréissène (*Dreissena polymorpha*), Minier et al. (2006) notent une diminution de la condition des organismes dans l'estuaire de Seine.

**Tableau 6: Exemples d'études des réponses des indices de condition à l'exposition à des contaminants *in situ* ou en laboratoire.**

Exposition	Espèce	Indice	Réponse	Référence
Laboratoire pendant 5 semaines. Cd: 0-10-30-100-300 ppb	<i>Macoma balthica</i>	Indice de condition	Diminution à la plus forte dose	Duquesne et al., 2004
<i>in situ</i> , gradient de pollution, effluents industriels et urbains	<i>Mya arenaria</i>	Facteur de condition	Diminution sur le site le plus impacté (port)	Baise et al., 2002
<i>in situ</i> , gradient de pollution, effluents municipaux, marina, site de référence	<i>Mya arenaria</i>	Facteur de condition	Diminution dans le cas de la marina	Gagné et al., 2002
<i>in situ</i> , deux stations de référence, une station impactée	<i>Mya arenaria</i>	Facteur de condition, Gonado-somatique	Diminution dans le site impacté	Gagné et al., 2003
<i>in situ</i> , deux stations de référence, une station impactée	<i>Mya arenaria</i>	Facteur de condition, Gonado-somatique	Diminution	Gauthier-Clerc et al., 2002
<i>in situ</i> , quatre sites	<i>Mya arenaria</i>	Indice gonadosomatique	Diminution chez les organismes collectés dans le port	Siah et al., 2003
<i>in situ</i> , un estuaire de référence et trois contaminés	<i>Platichthys flesus</i>	Gonado-somatique indice Fécondité relative	Diminution	Marchand et al., 2004
<i>in situ</i> , estuaire de Seine, station de référence	<i>Dreissena polymorpha</i>	Indice de condition	Diminution chez les organismes de l'estuaire de Seine	Minier et al., 2006

Remarques :

- Blaise et al. (2002) :  
Facteur de condition = (Masse fraîche)/(Longueur)<sup>3</sup>
- Duquesne et al. (2004); Minier et al. (2006) :  
Indice de condition = (Masse fraîche)/(Longueur)
- Gagné et al. (2002, 2003):  
Facteur de condition = (Masse)/(Longueur)
- Gauthier-Clerc et al. (2002) ; Gagné et al. (2003) ; Siah et al. (2003):  
Indice gonadosomatique = (Masse gonade)/(Masse des tissus)
- Marchand et al., 2004:  
Indice gonadosomatique = (Masse gonade)/(Masse Somatique)  
Fécondité relative = (Fécondité Absolue)/(Masse Somatique)  
Facteur de condition = (Masse Somatique)/(Longueur)<sup>3</sup>

Ces indicateurs généraux de la condition des organismes renseignent sur l'état de santé des organismes collectés en milieu naturel. Pour deux espèces (le flet *P. flesus* et la moule *D. polymorpha*) utilisées dans des programmes de biosurveillance ces indicateurs témoignent d'une condition altérée chez des spécimens collectés dans l'estuaire de Seine. Ce type d'indicateur n'existe actuellement pas chez *N. diversicolor*, aussi il apparaît pertinent d'étudier les variables biométriques qui pourraient au niveau individuel avérer de l'état général des organismes.

**L'énergie** est allouée notamment entre métabolisme de base, croissance et reproduction constituant une variable d'étude privilégiée. Kooijman et al. (2000) propose dans sa théorie de *Dynamic Energy Budget* (DEB) une approche intégrée de celle-ci par des modèles mathématiques réalistes intégrant les grandes fonctions biologiques des organismes (nutrition, digestion, croissance, métabolisme, reproduction et vieillissement). En écotoxicologie, plusieurs paramètres en relation avec le métabolisme et la bioénergétique permettent d'évaluer les effets biologiques délétères en réponses aux stress chimiques induits par l'exposition à des polluants en laboratoire ou *in situ*. Actuellement, il est urgent de relier *les effets délétères sub-individuels* (réserves énergétiques) ou *individuels* (indices de condition) et des *conséquences à l'échelle populationnelle* (Maltby et al., 2001). Pour cela, il convient de définir les variations naturelles des marqueurs potentiels notamment en relation avec des *paramètres physico-chimiques du milieu* (température, salinité). La *durée de l'exposition* est également prépondérante dans l'amplitude de variations. Ainsi, dans le cadre d'études *in situ*, il convient de disposer d'un suivi de longue durée afin d'être le plus apte à interpréter les signaux enregistrés.

## ***1.8 Les perturbations de la reproduction***

De nombreux processus impliqués dans la reproduction des animaux comme la **différenciation sexuelle**, la **gamétogenèse**, la **vitellogénèse**, la **maturation finale des produits génitaux**, la **fécondité**, sont **sous contrôle hormonal**. Chez les vertébrés, le contrôle hormonal de ces processus est bien établi alors que chez les invertébrés il est encore à l'étude. Des facteurs **naturels environnementaux** (photopériode, température...) et **endogènes** (métabolisme...) modulent ces contrôles hormonaux. Récemment les **facteurs de contamination** du milieu sont avérés ou soupçonnés d'interférer avec le système endocrinien modulant la reproduction des organismes.

### **I.8.1 Les hormones stéroïdiennes**

#### *1.1.1.8 Chez les vertébrés*

Deux types d'hormones de nature protéique et stéroïdienne sont impliqués dans la reproduction. Les protéines, de haut poids moléculaire et hydrophiles, ne pénètrent pas dans les cellules ; leurs récepteurs sont membranaires. Elles sont véhiculées par l'appareil circulatoire depuis les tissus endocrines vers des tissus cibles de leur action. Les principales hormones protéiques impliquées dans la reproduction sont les gonadotrophines et la prolactine (mammifère). Leurs rôles respectifs sont de réguler l'activité des gonades (ovaire et testicule) et le développement mammaire et la lactation. En comparaison, les stéroïdes sexuels - **les œstrogènes, les androgènes et la progestérone** - sont de faibles poids moléculaire et liposolubles. Ils ne circulent pas librement dans l'appareil circulatoire mais complexés à des protéines non spécifiques ou spécifiques. Leurs récepteurs sont membranaires ou intracellulaires. La liaison des stéroïdes sexuels aux récepteurs hormonaux induit l'expression de gènes spécifiques et des réactions physiologiques correspondantes. Parmi les hormones stéroïdiennes, la **progestérone**, la **testostérone** et le **17 $\beta$ -œstradiol** jouent des rôles prépondérants dans la physiologie de la reproduction.

#### *1.1.1.9 Chez les invertébrés*

Parmi les invertébrés, les annélides, les échinodermes, les mollusques et les insectes représentent les groupes taxonomiques les plus étudiés. Historiquement, les mécanismes **neurohormonaux** sont étudiés en premier chez ces groupes taxonomiques puis des **glandes endocrines et des hormones sont mises en évidence** chez les mollusques et les annélides

(LaFont, 2000). Les **neurohormones** et les **hormones** sont impliquées dans les mécanismes de développement et de **reproduction**. La complexité des systèmes endocriniens chez les invertébrés fait intervenir des contrôles multiples du développement, de la croissance et de la reproduction.

L'intérêt pour l'étude des **stéroïdes sexuels** chez divers groupes d'invertébrés (échinodermes, mollusque) remonte aux années 1960-1970 (Wotiz et al., 1960 ; Créange et Szeco, 1967 ; De Longchamp et al., 1974). Plusieurs travaux reportent l'existence du cholestérol, de stéroïdes sexuels (progestérone, testostérone et  $17\beta$ -œstradiol) et de mécanismes de biotransformation de ces molécules dans les gonades des échinodermes et des mollusques. Les stéroïdes sexuels (progestérone, testostérone et  $17\beta$ -œstradiol) sont identifiés chez plusieurs groupes d'invertébrés (Oetken et al., 2004): les tuniciers, les échinodermes, les crustacés, les mollusques.

Chez les échinodermes, les stéroïdes sexuels sont identifiés et quantifiés dans les gonades mâles et femelles d'*Asterias vulgaris* (Hines et al., 1992). Ces animaux présentent des cycles saisonniers de développement des gonades en relation avec l'accumulation et la maturation des gamètes. Les taux en progestérone et testostérone augmentent lors de la spermatogenèse. Chez les femelles, les taux en testostérone et  $17\beta$ -œstradiol sont maximaux à l'initiation de l'ovogenèse. Selon ces auteurs, ces stéroïdes sexuels jouent un rôle de modulateur de la reproduction chez cette espèce.

Chez les mollusques et précisément chez les bivalves, les données sont plus abondantes. Matsumoto et al. (1997) identifient et quantifient les œstrogènes ( $17\beta$ -œstradiol, estrone et estriol) chez deux espèces de bivalve, *Crassostrea gigas* et *Patinopecten yessoensis*. Dans les gonades femelles, les  $17\beta$ -œstradiol, estrone et estriol sont présents alors que dans les gonades mâles seul le  $17\beta$ -œstradiol est présent. Les profils saisonniers en œstrogène sont clairement illustrés et varient en concomitance avec l'indice gonadique : le taux d'œstrogènes augmente avec la maturation sexuelle des produits génitaux et chute brusquement en période de ponte. Par ailleurs, les activités enzymatiques aromatasase P-450 dépendante et  $17\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase sont détectées dans les gonades. Ces résultats démontrent clairement que les œstrogènes sont produits dans la gonade et que ces derniers stimulent la maturation des produits sexuels.

1.1.1.10 La stéroïdogénèse

La synthèse des stéroïdes sexuels, la **stéroïdogénèse**, fait intervenir plusieurs réactions enzymatiques (Figure 9) dépendantes des complexes cytochromes (Whitehead et Rice, 2006).

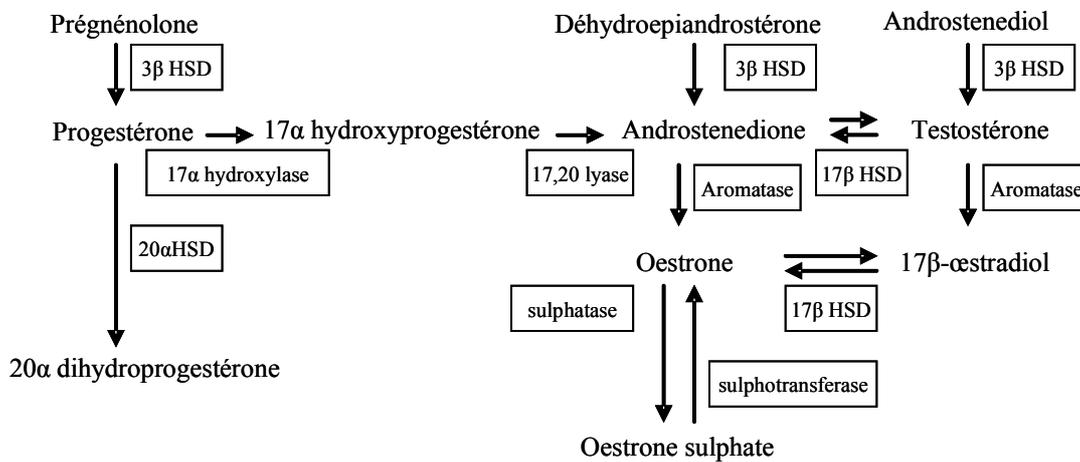


Figure 9: Synthèse des stéroïdes sexuels. Modifié d'après Whitehead et Rice, 2006.

Le cholestérol est converti en prégnénolone dans la mitochondrie. Parmi les enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse, les hydroxystéroïdes déshydrogénases (HSD) et l'aromatase sont beaucoup étudiées. La prégnénolone est convertie par l'isomérase 3β-HSD en progestérone, le précurseur des oestrogènes et des androgènes. La progestérone est ensuite convertie en testostérone (androgène). L'aromatase convertit les androgènes en oestrogènes. La testostérone est prédominante chez les mâles et induit le développement de caractères sexuels et la spermatogénèse. Le 17β-œstradiol induit le développement de caractères sexuels, la prolifération et la maturation des gamètes chez les femelles.

Les réactions et les activités enzymatiques sont très bien connues pour les vertébrés et particulièrement pour les mammifères. Chez les bivalves les différentes enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse sont identifiées (Gauthier-Clerc, 2004). Les hormones stéroïdiennes sont reconnues comme modulateurs de la **vitellogenèse** (Gauthier-Clerc et al., 2006). Si beaucoup d'informations existent sur la synthèse des hormones stéroïdiennes chez ces espèces, **peu d'informations existent à l'égard des annélides polychètes et particulièrement de *N. diversicolor***. Le **cholestérol** a été identifié chez différentes espèces de **polychètes** (Voogt, 1974 ; Zeeck et al., 1994 ; Lee et al., 2005). Les cytochromes ont été identifiés chez les annélides et sont reconnus pour leur rôle dans le métabolisme des stérols et

des hormones (Lee, 1998). Récemment, le  $17\beta$ -œstradiol est révélé et quantifié chez une espèce proche de *N. diversicolor*, *N. virens* (Garcia-Alonso et Rebscher, 2005). La progestérone, la testostérone et le  $17\beta$ -œstradiol sont quantifiés chez *N. diversicolor* (Mouneyrac et al., 2003b ; Mouneyrac et al., 2006). **Établir le lien entre les niveaux en hormones stéroïdiennes et le cycle reproducteur permettra de contribuer majoritairement à la compréhension de la physiologie de la reproduction de cette espèce.**

## I.8.2 Les perturbations endocriniennes

Actuellement, la présence de composés chimiques capables de moduler ou d'entraîner des dysfonctionnements des systèmes endocriniens est une préoccupation majeure de l'écotoxicologie. La question des PE et de leurs effets sur la santé humaine et de l'environnement est prise en considération par les agences de protection de l'environnement gouvernementales et internationales, par l'industrie chimique. Les PE sont définis tels que: « *An endocrine disrupter is an exogenous substance or mixture that alters function (s) of the endocrine system and consequently causes adverse health effects in an intact organism, or its progeny, or (sub)populations* » (Vos et al., 2000).

Les altérations des fonctions endocriniennes peuvent être causées par une interférence des PE avec la synthèse, la sécrétion, le transport, la liaison, l'action, ou l'élimination des hormones naturelles de l'organisme impliquées dans l'homéostasie, la reproduction, le développement et/ou le comportement (Vos et al., 2000). Compte tenu des risques encourus par les populations et en raison de l'importance donnée depuis ces dernières années aux effets biologiques liés à l'exposition des organismes aux PE, les connaissances progressent énormément (Tyler et al., 1998 ; Sumpter et Johnson, 2005).

**Quelles sont les substances avérées ou soupçonnées d'effets PE ?** Un grand nombre de substances d'origine et de structure chimique très diverses sont décrites ou soupçonnées d'effets PE. Dans le milieu naturel, les premières substances à effets PE identifiées sont les **oestrogènes de synthèse** issues des activités domestiques comme le  $17\alpha$ -éthinyloestradiol (pilule anti-conceptionnelle). Par la suite de nombreuses molécules de synthèse ou naturelles sont identifiées comme PE. Les **phyto-œstrogènes** sont des molécules naturellement produites (flavones, isoflavones, les lignines, les mycotoxines...) par des organismes

végétaux dont la structure chimique présente des similitudes de celles des androgènes et des oestrogènes (Whitehead et Rice, 2006). Les **xéno-œstrogènes** appartiennent à un grand nombre de catégories de produits chimiques (Kavlock et al., 1996 ; Depledge et Billingham, 1999 ; Whitehead et Rice, 2006): les pesticides (DDT, DDE, metoxychlor, lindane), herbicides (atrazine, simazine, alachlor), les fongicides, les plastifiants et les surfactants (bisphenol A, phtalate), les alkylphénols, les PCB.

Du fait de la diversité des structures chimiques des substances avérées d'effets PE, un grand nombre de molécules d'origine industrielle ou agricole sont soupçonnées. L'état de contamination et de perturbation des cours d'eau français reste très mal connu. Depuis une dizaine d'années, la présence de PE dans l'environnement et leurs effets sur l'homme et les écosystèmes est une préoccupation de premier ordre.

#### *1.1.1.11 Les mécanismes d'action*

Les effets des PE tiennent au fait que ces substances présentent des similitudes de structure avec les hormones naturelles synthétisées par l'organisme. Dans le cas d'un fonctionnement normal, la molécule à effet PE étant absente, l'hormone se lie au récepteur et entraîne une réaction (Figure 10 A). Lorsque la molécule à effet PE est présente dans l'organisme, elle interagit avec le récepteur de l'hormone ; elle peut soit : augmenter l'activité de l'hormone (Figure 10 B), inhiber l'activité de l'hormone (Figure 10C), interdire l'activité de l'hormone (Figure 10 D).

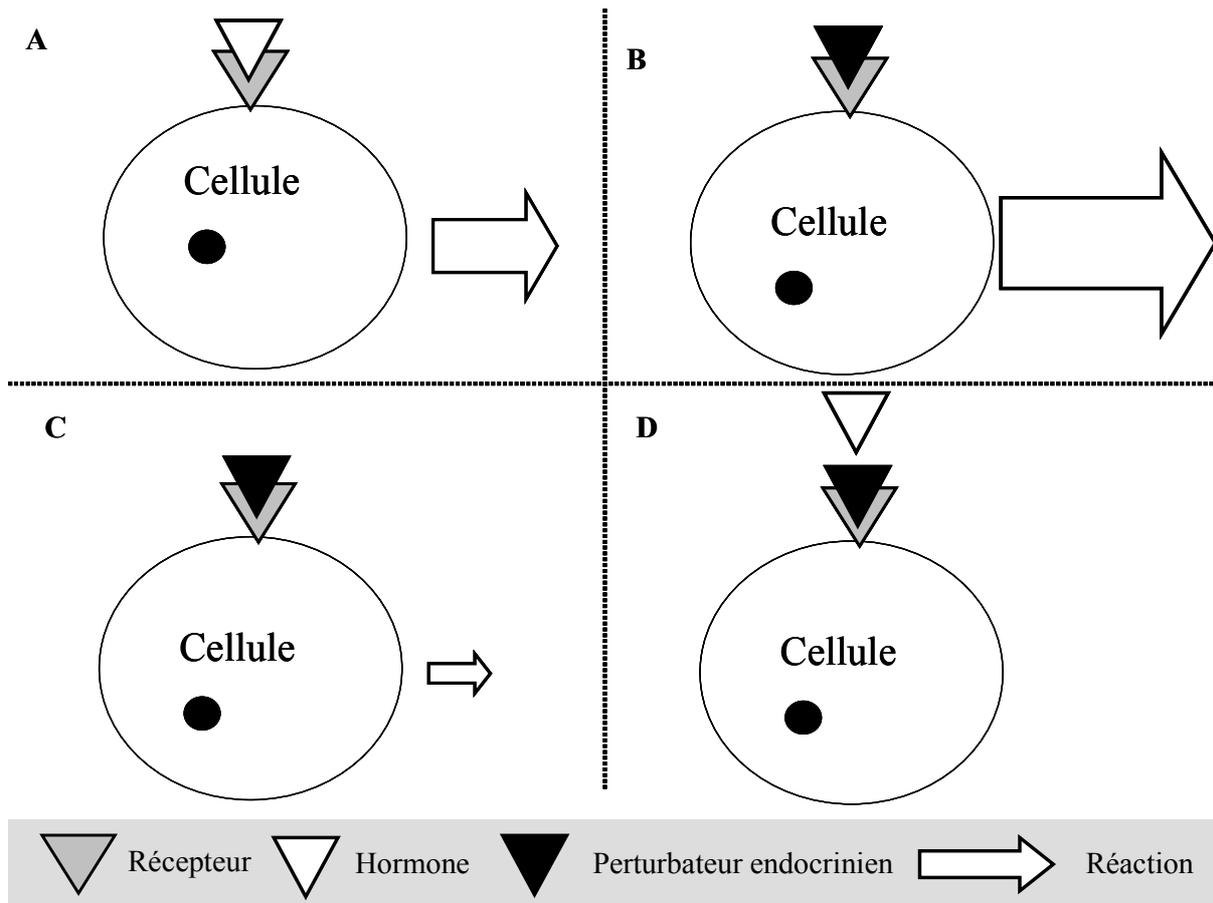


Figure 10: Schématisation des mécanismes d'action probable des PE.

Ces substances à effets PE peuvent causer des effets néfastes sur la santé d'un organisme ou sa descendance secondairement à des changements de la fonction endocrine (OCDE, 1997). Les PE peuvent potentiellement agir sur l'ensemble des étapes de la régulation endocrine depuis la synthèse des hormones jusqu'à la réponse des cellules cibles (Kavlock et al., 1996). Les effets biologiques induits par les PE vont des réponses primaires moléculaires et cellulaires aux réponses secondaires tissulaires, morphologiques ou comportementales qui affectent la reproduction des individus et par conséquent mettent en péril le maintien de la population, de la communauté et de l'écosystème.

I.1.1.12 Les impacts sur les organismes

Dans le milieu naturel, les PE sont soupçonnés d'interférer avec les mécanismes impliqués dans la reproduction de nombreuses espèces. Les **voies d'exposition** aux PE sont la **voie directe**, la **voie trophique** mais également via les réserves lipidiques accumulées dans les ovocytes. **Ainsi, les organismes peuvent être exposés aux PE à différentes étapes de leur cycle de vie.**

Les effets des PE sont avérés chez plusieurs groupes taxonomiques (revues de Vos et al., 2000 ; Jobling et al., 2002 ; Oetken et al., 2004): mammifères, oiseaux, reptiles, amphibiens, poissons et invertébrés. Parmi ceux-ci, les mammifères et les oiseaux se nourrissant de poissons accumulent des quantités importantes de PE. Chez les mammifères aquatiques, les principaux symptômes observés *in situ* sont : des niveaux réduits en testostérone chez les mâles, la masculinisation des femelles, la cryptorchidie, une diminution de la fécondité, la stérilité. Les PCB sont les principaux contaminants associés à ces effets. Chez les oiseaux, l'exemple le mieux renseigné est l'amincissement de la coquille des œufs suite à l'exposition au DDE ayant pour conséquence des déclinés importants des populations. Chez les poissons les anomalies principales observées sont l'induction de la vitellogénine plasmatique chez les mâles et les juvéniles, l'inhibition de la croissance ovarienne et testiculaire, un retard dans la maturité sexuelle, la présence d'individus intersexués, la féminisation ou la masculinisation des caractères sexuels secondaires, des concentrations anormales en hormones stéroïdiennes circulantes.

**Les invertébrés représentent plus de 95 % des espèces animales (Hutchinson, 2002).** Pour autant, peu d'études en France sur l'impact des PE concernent ces derniers alors qu'ils occupent un rôle essentiel dans la structure et le fonctionnement des écosystèmes aquatiques. **Ainsi, la gestion adéquate des écosystèmes est concernée par le bon état de santé des populations clés d'invertébrés.** Les perturbations endocriniennes chez les invertébrés sont mises en évidence en laboratoire mais aussi dans le milieu naturel (revue d'Oetken et al., 2004 ; Langston et al., 2005). Cependant, le mode d'action reste inconnu. Le cas le mieux connu concerne le tributyl-étain (TBT) et l'inhibition de l'aromatase qui catalyse la conversion des androgènes (testostérone) en oestrogènes (17 $\beta$ -œstradiol). Ce cas est spécifique aux gastéropodes et induit le phénomène d'imposex (masculinisation des femelles : développement d'un pénis, d'un vase déférent et de tubules séminifères) chez plusieurs

espèces de gastéropodes marins et dulçaquicoles (Spooner et al., 1991 ; Matthiessen et Gibbs, 1998 ; De Fur et al., 1999).

Les effets de l'exposition aux PE sont montrés sur le métabolisme de la testostérone chez les **crustacés** (Verslycke et al., 2004b ; Janer et al. 2005). Au niveau de l'individu, des effets sur la reproduction (fécondité, intersexualité, anomalies morphologiques), la croissance (mue) et le comportement (accouplement) peuvent être observés selon les espèces, marines (Barbeau et Grecian, 2003 ; Ford et al., 2005 ; Forget-Leray et al., 2005) et dulçaquicoles dont *Gammarus pulex* (Cold et Forbes, 2004; Gross et al., 2001 ; Watts et al., 2002), *Daphnia magna* (Baldwin et al., 1997). Au niveau de la population, des effets peuvent être détectés sur la répartition des classes d'âge et le sex-ratio (Watts et al. 2002 chez *Gammarus pulex* ; Forget-Leray et al., 2005 chez *Eurythemora affinis*). Ces études concernent principalement des expositions en laboratoire, en conditions contrôlées, souvent peu représentatives des types et niveaux de contamination rencontrés dans le milieu naturel. En milieu dulçaquicole, seuls les travaux de Gross et al. (2001) ont mis en évidence des anomalies du développement sexuel chez des *Gammarus pulex* exposés à un rejet de station d'épuration.

Gauthier-Clerc et al. (2002) ont étudié le cycle gamétogénique de *Mya arenaria* originaire du fjord de Saguenay au Canada sur plusieurs stations (nord de la côte de l'estuaire du Saint-Laurent). Des effets PE sont soupçonnés chez les organismes collectés sur la station impactée par des contaminations multiples : **décalage de la maturation sexuelle, diminution de l'indice de condition et de l'indice gonadosomatique, perturbation de la vitellogénèse**. Siah et al. (2003) étudient les effets *in situ* de l'exposition aux métaux et aux butylétains sur le même site. Les organismes qui présentaient les concentrations en tri- et di- butylétain ont un indice gonadosomatique réduit, des niveaux réduits en progestérone en comparaison au site de référence. Les organismes collectés sur des stations de contamination intermédiaire présentaient des réponses intermédiaires pour les niveaux en hormones stéroïdiennes et le statut reproducteur.

La détermination des causes des effets observés en milieu naturel est délicate dès lors que les organismes sont exposés à des mélanges complexes de contaminants qui peuvent avoir des effets antagonistes ou synergiques. **Chez les invertébrés, le nombre limité d'exemples de perturbations endocrines est principalement dû au fait que leur système hormonal est très peu connu par rapport à celui des vertébrés, ce qui limite d'autant plus le développement de biomarqueurs spécifiques de l'impact de cette classe de contaminants (Rotchell et Ostrander, 2003).**

### *1.1.1.13 Les perturbateurs endocriniens en Seine*

La présence dans la Seine de nombreux PE est bien documentée, qu'elle soit suivie depuis de nombreuses années comme celle des PCB mesurés dans le cadre du RNO (1995, 2001) ou qu'il s'agisse de molécules qui ne sont que récemment accessibles à l'analyse aux concentrations environnementales comme les alkylphénols ou les médicaments étudiés par le LPTC (Laboratoire de Physico-Toxico-Chimie, Université Bordeaux I, Budzinski et coll.) dans le cadre du programme PNETOX II et du Programme Seine-Aval. Dans cette zone, l'effet des perturbateurs endocriniens est manifeste et conduit à la féminisation (présence d'ovotestis) de différentes espèces de poissons, gardons, goujons et chevaines (Minier et al., 2000a). Des flets, espèce euryhalines, pêchés dans la baie de Seine, montrent aussi de telles altérations du développement gonadique, avec (en 1998) 8% des flets mâles intersexués (Minier et al., 2000b). Le suivi de l'activité œstrogénique du milieu à l'aide de modèles cellulaires a permis de montrer la présence de xéno-œstrogènes de forte affinité pour le récepteur dans l'eau de Seine (Pillon et al., 2005).

Quels sont les mécanismes d'actions et les effets de ces substances sur les organismes? Comment prédire correctement des effets biologiques à des degrés d'organisation biologique supérieurs comme les populations? **Avant tout, l'évaluation de l'impact *in situ* des PE passe par une connaissance approfondie de la physiologie de la reproduction des organismes potentiellement exposés**, une description de leur exposition, la recherche de biomarqueurs d'effets pour lesquels il existe un lien mécanistique avec la fonction de reproduction.

## ***1.9 Conclusion Partielle***

**Des indices biotiques sont développés pour évaluer l'état de qualité de l'environnement. Pour le milieu côtier, les indices biotiques sont basés sur la composition des peuplements. Sur nos côtes, les estuaires apparaissent comme particulièrement impactés par des pollutions multifactorielles et diffuses. Par ailleurs, dans ces milieux naturellement stressés, l'écosystème se résume plus souvent à des populations isolées qu'à des peuplements. Dès lors il est nécessaire de développer des méthodologies pour évaluer l'état de santé des populations notamment celles d'invertébrés jouant un rôle prépondérant dans l'écosystème. Dans la hiérarchisation des réponses biologiques face à l'exposition à des contaminants les paramètres en lien**

avec le métabolisme énergétique et la reproduction, mesurés au niveau individuel, constituent des maillons clés avec le niveau populationnel. La recherche d'effets délétères à ces niveaux individuels et la mise en relation avec des conséquences à l'échelle populationnelle est une des priorités de l'écotoxicologie. Cependant pour valider des biomarqueurs de pollution il est nécessaire que le signal résultant de la perturbation du milieu soit supérieur au bruit de fond. Par conséquent, l'interprétation des observations est grandement dépendante du niveau de connaissance du modèle biologique.



## II Chapitre II : Le modèle biologique *N. diversicolor*

### II.1 Classification systématique

Le groupe des annélides est constitué d'animaux à l'aspect vermiforme ayant un corps segmenté et se répartit en trois groupes : les achètes, les oligochètes et les polychètes. *N. diversicolor* est une espèce de la classe des polychètes, de l'ordre des phyllocidés et de la famille des néréidés (Scaps, 2002). *N. diversicolor* (Figure 11) est décrite pour la première fois par O.F. Müller en 1775 sous le nom de genre *Nereis* puis une seconde fois par Malmgren (1867) sous le nom de genre *Hediste* (Marty, 1997). Actuellement l'espèce est présentée sous les deux noms de genre. Dans le cadre du présent travail, l'appellation *N. diversicolor* est retenue.



Figure 11: *N. diversicolor* (O.F. Müller, 1775).

### II.2 Caractéristiques écologiques

*N. diversicolor* vit dans le compartiment sédimentaire de zones d'eaux marines ou saumâtres peu profondes (Scaps, 2002). Précisément elle occupe des vasières de fonds de baies et plus particulièrement de **milieu estuarien** entre la surface et quelques dizaines de centimètres de profondeur. La préférence de l'espèce vis-à-vis de la texture du sédiment est un substrat vaseux voire sablo-vaseux.

Les individus, sédentaires au sein du sédiment, construisent des galeries en forme de « U » ou bien d' « Y » (Figure 12). Ce terrier est ventilé par un courant d'eau, généré par l'individu, permettant l'oxygénation de la galerie et l'apport d'aliments (cette stratégie d'alimentation n'étant pas exclusive).

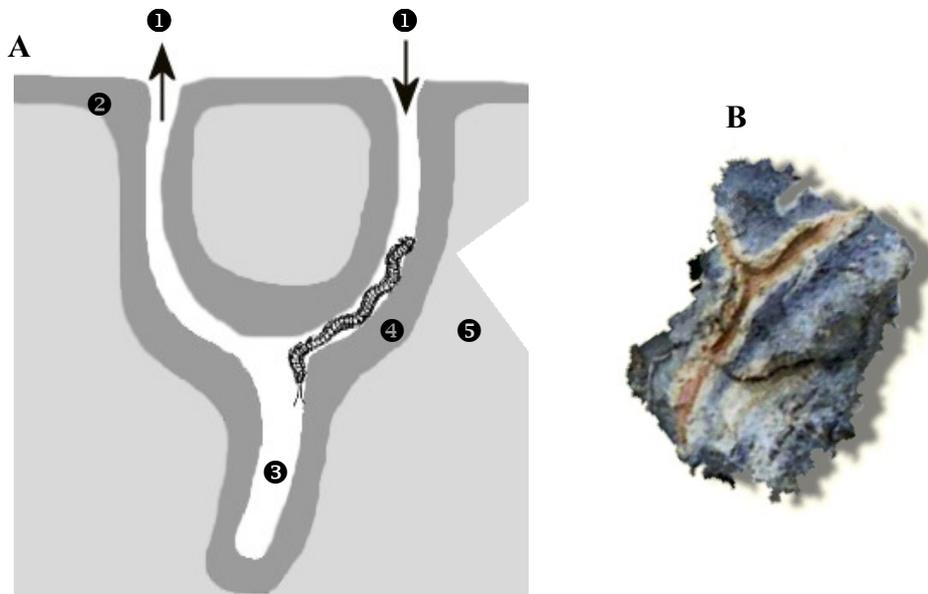


Figure 12: (A) Représentation schématique de *N. diversicolor* dans sa galerie (modifié d'après Scaps, 2002) : ❶ : mouvement de l'eau, ❷ : sédiment de surface oxygéné, ❸ : galerie, ❹ : sédiment oxydé par l'oxygénation générée par la ventilation de l'individu, ❺ : sédiment anoxique ; (B) photographie d'une galerie de *N. diversicolor*.

*N. diversicolor* est rencontrée dans un grand nombre d'habitats, particulièrement variables en ce qui concerne les facteurs environnementaux (salinité, température, oxygénation du milieu). Sa présence est attestée depuis les côtes marocaines jusqu'aux côtes finlandaises (Smith, 1955 ; Chambers et Milne, 1975 ; Olive et Garwood, 1981 ; Gillet, 1986 ; Arias et Drake, 1995 ; Marty, 1997 ; Fidalgo e Costa et al., 1998).

Selon la littérature, les densités des individus en milieu naturel varient de 35 à 3700 individus par m<sup>2</sup> (Scaps, 2002). *N. diversicolor* est donc une **espèce relativement abondante** dans les milieux qu'elle habite mais les populations présentent de fortes fluctuations de la densité. Selon Scaps (2002), ces fluctuations sont à mettre en relation avec les conditions environnementales particulières rencontrées dans un habitat donné et correspondant plus ou moins aux préférences de l'espèce. Les biomasses, en milieu naturel, varient de moins d'1 g.m<sup>-2</sup> jusqu'à 39 g.m<sup>-2</sup> (Scaps, 2002).

Du fait de son corps mou, *N. diversicolor* constitue **une proie facile à ingérer pour les prédateurs** (Mc Lusky, 1989). Par conséquent et en regard des densités et biomasses auxquelles est rencontrée l'espèce en milieu naturel, *N. diversicolor* représente une réserve alimentaire considérable. Elle est donc la **proie privilégiée d'un grand nombre de prédateurs** épibenthiques (crabes, poissons) mais aussi d'oiseaux, d'échassiers par exemple (Masero et al., 1999 ; Moreira, 1999).

Du fait de son activité galéicole (création de terriers, prospection pour la nourriture, irrigation du terrier), *N. diversicolor* participe au phénomène de bioturbation dans son environnement et ce d'autant plus que la densité de la population est élevée :

- la présence de galeries dans le sédiment modifie la surface d'échange de l'interface eau - sédiment (d'un facteur de 3,22 à 4,25) et augmente les échanges entre l'eau et le sédiment (Gerino et Stora, 1991).
- l'activité galéicole entraîne un remaniement sédimentaire induisant une redistribution des composés chimiques (matière organique, sels nutritifs, contaminants) au sein de la colonne sédimentaire. Par exemple, de la matière organique située en profondeur est déplacée vers la surface (zone oxygénée) favorisant ainsi sa dégradation (Banta et Andersen, 2003). De la même manière, *N. diversicolor* influence les flux de sels nutritifs au sein de la colonne sédimentaire (Davey et Watson, 1995).
- l'irrigation créée par les individus apporte de l'oxygène dans la galerie. Ceci a deux conséquences, l'une entraînant une oxydation du sédiment (apparition d'une couche de sédiment oxydé entourant la galerie) l'autre stimulant les processus microbiologiques (pour les bactéries aérobies) de dégradation de la matière organique (Banta et Andersen, 2003).

Mermillod-Blondin et al. (2005) étudient expérimentalement l'impact de la biodiversité des invertébrés benthiques sur les processus physico-chimiques (distribution verticale de la matière organique, de sels nutritifs, flux d'oxygène...) à l'interface eau - sédiment. Quelles que soient les espèces de macroinvertébrés qui sont associées à *N. diversicolor*, l'activité bioturbatrice des animaux augmente significativement l'impact des autres espèces.

## II.3 Physiologie de la reproduction et cycle de vie

### II.3.1 Physiologie de la reproduction

Les polychètes représentent une composante majeure de la classe des annélides regroupant plus de 5000 espèces. C'est la raison pour laquelle une littérature abondante concernant notamment la physiologie de la reproduction est disponible (Olive et Clark, 1978; Olive, 1983). Celle-ci est sous le contrôle de facteurs environnementaux et endocriniens (Andries, 2001).

Au sein des polychètes, la famille des néréidés est la mieux connue ; ces connaissances reposant surtout des expérimentations en laboratoire (Andries, 2001). Parmi les différentes espèces de néréidés (*Nereis pelagica*, *Perinereis cultrifera* notamment), certaines subissent des changements morphologiques en période de reproduction (épitoquie). En revanche, *N. diversicolor* ne subit pas de changements morphologiques en période de reproduction et se reproduit à l'état atoque. Chez ces espèces, **l'effort de reproduction est important** : 75 à 79 % de l'énergie est allouée aux tissus reproducteurs chez *N. pelagica* (Olive et al., 1984), 62 % chez *Perinereis rullieri* (Cassai et Prevedelli, 1998) et 70 % chez *N. diversicolor* (Olive, 1983 ; Grémare et Olive, 1986). **Ces animaux sont très féconds**. Les femelles de *P. cultrifera* peuvent porter de  $17 \times 10^3$  à  $130 \times 10^3$  ovocytes pour des masses fraîches de 0,8 à 4,8 g (Scaps, 1992). Cette fécondité dépend notamment de la masse des organismes et de l'âge à maturité sexuelle

Chez *N. diversicolor*, les sexes sont séparés (espèce gonochorique) et **le sexe-ratio est largement en faveur des femelles ; de l'ordre de 80 %** (Dales, 1950 ; Olive et Garwood, 1981 ; Mettam et al., 1982 ; Abrantes et al., 1999). La femelle incube sa progéniture pendant plusieurs semaines à l'intérieur de sa galerie, assurant une bonne ventilation de celle-ci (oxygénation, apports de substances nutritives, élimination des déchets du métabolisme). Les individus se reproduisent une fois par cycle de vie (Olive et Garwood, 1981) ; cela signifie que les individus atteignent la maturité sexuelle à un âge compris entre 1 et 3 ans puis succombent après s'être reproduits. Selon Marty (1997), les mâles libèrent les produits génitaux par déchirure du tégument et meurent peu de temps après (24 heures) tandis que les femelles survivent plus longtemps, de l'ordre de quelques semaines, et ventilent la galerie durant les premiers jours de développement de la ponte.

**Chez *N. diversicolor* les produits sexuels se trouvent libres dans la cavité coelomique.** Étant donné la part importante de femelles dans la population et la facilité

d'échantillonnage des ovocytes, des données abondantes sont disponibles quant au cycle ovogénique des femelles (Garwood et Olive, 1981 ; Mettam, 1982 ; Arias et Drake, 1995 ; Abrantes et al., 1999 ; Fidalgo e Costa, 2003). **Dans le cadre de ces études, le diamètre ovocytaire est utilisé pour estimer l'état d'avancement de la maturité sexuelle des femelles.** En effet, Clark (1965) précise que les ovocytes sont libérés dans le cœlome à un diamètre d'environ 15 à 20  $\mu\text{m}$ , qu'ils entrent par la suite dans une phase de croissance afin d'atteindre un diamètre maximal d'environ 200  $\mu\text{m}$ . La croissance des ovocytes est une phase caractéristique de l'ovogenèse ; par conséquent, les **dimensions des ovocytes** sont un **critère fiable** pour déterminer le degré d'avancement dans le processus de gamétogenèse des femelles. **Cependant, il a été avancé que l'aspect et la morphologie des ovocytes serait un meilleur indicateur que le diamètre ovocytaire des processus hormonaux contrôlant la vitellogénèse (Schroeder, 1977 cité dans Olive, 1983).**

Les études concernant la régulation endocrine de la physiologie de la reproduction ont eu principalement trait à des aspects neuroendocriniens (Porchet et Cardon, 1976 ; Andries, 2001). La croissance et la gamétogenèse sont contrôlées par une neurohormone sécrétée par le système neuroendocrinien cérébral (Golding, 1983 ; Golding, 1987). Durant, les premières phases du cycle de vie, l'activité neuroendocrinienne est élevée (Golding et Yuwono, 1994). Les animaux se nourrissent, se développent et sont capables de régénérer des segments amputés. La croissance somatique est donc privilégiée. En parallèle, des ovocytes très hétérogènes et de petite taille sont présents dans la cavité cœlomique. Le maintien d'une activité neuroendocrinienne inhibe la gamétogenèse (Durchon, 1978) mais est également caractéristique des premières étapes de celle-ci (Golding, 1983 ; Golding, 1987 ; Golding et Yuwono, 1994). Par la suite, l'activité neuroendocrinienne se réduit et les ovocytes s'accumulent librement dans la cavité cœlomique. **À ce moment-là, la croissance somatique s'atténue, les ressources sont peu à peu investies dans la reproduction (production et maturation des gamètes).**

L'ovogenèse est un processus relativement long, de l'ordre de plusieurs mois (Rees et Olive, 1999). Au cours de celle-ci, quatre étapes sont classiquement identifiées chez les polychètes: un stade **ovogonie** (multiplication mitotique), une **phase pré-méiotique**, une **phase pré-vitellogénique** et une **phase vitellogénique** (Olive et Clark, 1978 ; Andries, 2001). L'origine des cellules germinales, qui engendrent par la suite les ovogonies (Dales, 1950), est souvent mal établie chez les polychètes et conduit les auteurs à admettre une conception ancienne selon laquelle ces dernières dériveraient de la paroi péritonéale (Porchet et al., 1989). Les ovogonies sont reliées par des ponts cytoplasmiques et se multiplient par mitose.

Une fois que la méiose est amorcée, des ovocytes apparaissent encore inclus dans le tissu germinal au sein duquel ils se sont différenciés ou sont émis dans le fluide cœlomique (« *ovulation* »). La **phase pré-vitellogénique** correspond à la libération des ovocytes dans le fluide cœlomique ; l'activité neuroendocrinienne est élevée. Au cours de la **phase vitellogénique**, les ovocytes sont complètement libres dans le fluide cœlomique et vont accumuler des ressources nutritives. Les **nutriments** (acides aminés, acides gras, monosaccharides en particulier) à l'origine des réserves nutritives à l'intérieur des ovocytes sont **puisés directement dans le fluide cœlomique** (Porchet et al., 1989 ; Fischer et Hoeger, 1993). Une catégorie particulière de cœlomocytes, **les éléocytes**, prennent une part active dans le **transfert de nutriments** depuis les tissus somatiques vers les ovocytes en phagocytant des éléments du soma, en recyclant ces derniers en nutriments plus simples, incorporables par les ovocytes (Fischer et Hoeger, 1993). Ces éléocytes sont des cellules spécialisées reconnues pour stocker et sécréter des lipides, des sucres, des nucléotides (Fischer et Hoeger, 1993). Au cours de la **phase vitellogénique**, la vitellogénine (précurseur du constituant majeur des réserves des ovocytes) est sécrétée par les éléocytes et absorbée par les ovocytes au cours de la vitellogenèse (Bonnier et Baert, 1992). Ce processus d'absorption est une endocytose médiée par un récepteur (Rees et Olive, 1999). Dans les ovocytes, un processus de conversion, impliquant notamment des clivages protéiques, transforme le précurseur (la vitellogénine incorporée) en **vitelline** (Baert, 1985 ; Baert et Slomianny, 1987 ; Porchet et al., 1989 ; Rees et Olive, 1999 ; Andries, 2001). La vitelline, **glycolipophosphoprotéine** de haut poids moléculaire, est accumulée au sein de granules dans les ovocytes (Rees et Olive, 1999). Cette dernière est le constituant majeur de réserves des ovocytes pour le futur développement de l'œuf. Les ovocytes croissent en incorporant progressivement des réserves. Lorsque l'incorporation des réserves est terminée, ils entament un processus de maturation finale, la **corticogénèse**, et deviennent très homogènes en taille pour atteindre un diamètre maximal de l'ordre de 200 µm (Olive et Garwood, 1981 ; Scaps, 2002). Au terme de la gamétogenèse, les ovocytes matures sont parfaitement sphériques et remplissent la cavité cœlomique. À ce stade, les animaux perdent complètement l'aptitude de régénérer des segments amputés par blessure ou autotomie et cessent de s'alimenter. Ils sont matures sexuellement et les produits génitaux sont émis dans le milieu lorsque la reproduction est déclenchée.

### II.3.2 Cycle de vie et croissance

En ce qui concerne le cycle de vie, la littérature est abondante notamment en regard des différentes étapes de croissance de l'espèce (Scaps, 2002). Suite à la fécondation, la segmentation de l'œuf puis les différents stades larvaires (trochophore 1 - trochophore 2 - métatrochophore - erpochète) ont lieu dans la galerie des géniteurs (Marty, 1997). La sortie des individus de leurs galeries s'opère lorsque ces derniers ont élaboré entre 3-4 et 10 segments selon les auteurs (Marty, 1997). Les animaux initient leur croissance. Selon la littérature (Barnes et al., 1988), la croissance des néréidés se déroule en deux phases. Durant une première phase, les organismes s'allongent en longueur par production de nouveaux segments ; c'est la **phase de croissance segmentaire**. Pendant une seconde phase, les segments des organismes s'allongent et la prolifération segmentaire est extrêmement réduite ; c'est la **phase de croissance pondérale**. Adultes, les animaux ont entre 90 et 120 segments et mesurent entre 6 et 12 cm de longueur totale.

## II.4 Tolérance aux stress environnementaux

### II.4.1 Tolérance aux stress naturels

La **température** est un facteur écologique prépondérant. Ce dernier varie géographiquement et de manière saisonnière. Les températures létales pour *N. diversicolor* ne sont actuellement pas connues. Du fait d'une répartition cosmopolite, *N. diversicolor* colonise des milieux très différents (littoral nord africain, scandinave, européen) au regard des températures environnementales, témoignage d'une tolérance certaine aux variations de température.

Oglesby (1978) fait état des mécanismes osmorégulateurs chez les annélides et notamment de *N. diversicolor*. Ces mécanismes débutent pour une **salinité** de l'ordre de 25 à 35 % de celle de l'eau de mer (soit une salinité comprise entre 8,75 et 12,25). En deçà de cette valeur les individus sont hyper-ioniques ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ) et au-dessus osmoconformes. La salinité critique est de l'ordre de 1-2 % de celle de l'eau de mer (soit une salinité de 0,35-0,70). *N. diversicolor* est donc une espèce largement euryhaline.

*N. diversicolor* est également reconnue pour son aptitude à supporter des variations importantes de l'oxygénation du milieu (Kristensen, 1983a ; Scaps, 2002). Kristensen (1983b) précise les mécanismes de régulation mis en place par l'espèce pour supporter l'hypoxie. *N.*

*diversicolor* est capable de réguler l'absorption d'O<sub>2</sub> selon deux voies de régulation : de manière comportementale en augmentant son activité de ventilation et de manière physiologique en maintenant une activité de ventilation constante mais en augmentant la part d'O<sub>2</sub> extraite de l'eau.

#### II.4.2 Tolérance aux stress chimiques

Parallèlement à sa capacité de supporter les variations de facteurs naturels comme la salinité, la température ou l'hypoxie, une littérature fournie décrit la **tolérance de *N. diversicolor*** au Cu et au Zn dans le cas d'une population d'une zone très contaminée de l'estuaire de la Restronguet Creek (Angleterre) (Bryan et Hummerstone, 1971 ; Bryan et Hummerstone, 1973 ; Grant et al., 1989). Hateley et al. (1989) démontrèrent **la base génétique de cette tolérance** en obtenant, au laboratoire, des juvéniles présentant cette tolérance. Malgré la cessation des activités minières, des travaux récents (Mouneyrac et al., 2003a) confirment la tolérance à la contamination métallique (Cd, Cu et Zn) de la population de la Restronguet Creek comparativement à une population provenant d'un site relativement indemne de pollution (Blackwater). Le site de Restronguet Creek, contaminé pendant la seconde moitié du 19<sup>ème</sup> siècle par des rejets d'activités minières, est largement reconnu quant à ses niveaux de pollution très élevés (Bryan et al., 1987).

**Quels sont les mécanismes de détoxication qui supportent la tolérance des organismes aux métaux ?** La détoxication des **métaux** implique leur **liaison à différents ligands** afin de limiter leur biodisponibilité et par conséquent leurs effets délétères (Mason et Jenkins, 1995). Mouneyrac et al. (2003a) étudient ces **mécanismes** chez *N. diversicolor* originaires de la Restronguet Creek et de la Blackwater. Les organismes de la Restronguet Creek présentent une tolérance au Zn, Cu et Cd mais pas à l'Ag en comparaison à ceux de la Blackwater. Lors d'expositions au Cu et à l'Ag, les animaux de la Restronguet Creek sécrètent de grandes quantités de **mucus** dans les unités expérimentales; une particularité qui n'est observée pour les spécimens du site de référence. Par ailleurs, les observations au microscope électronique après détection histochimique révèlent que les **cellules sécrétrices de mucus** sont plus abondantes chez les spécimens de la Restronguet Creek que chez les spécimens du site de référence de la Blackwater. Les cellules sécrétrices de mucus sont également présentes chez les spécimens des deux sites exposés aux Cd et Zn. **La sécrétion de**

**mucus comme chélateur des métaux est donc une réponse spécifique aux expositions au Cu et à l'Ag (Mouneyrac et al., 2003a).**

Au cours des expérimentations, les animaux de la Restronguet Creek tolérants aux métaux (Cd, Cu, Zn) présentent des concentrations en composés de type MT plus faibles que les animaux du site de référence. Ces composés lient les métaux, contribuant ainsi au contrôle de leur biodisponibilité dans la cellule. Ces composés sont, par la suite, dégradés dans les lysosomes assurant ainsi la **biominéralisation des métaux et leur séquestration sous forme de granules** riches en S.

Quelques références mentionnent des inclusions métalliques dans les cellules de *N. diversicolor*. De grandes quantités de Cu sont détectées dans des **vésicules au niveau de l'épiderme et des néphridies** (Bryan et Hummerstone, 1971 ; Brown, 1982 ; Bryan et Gibbs, 1983). Ce type de granules pourrait correspondre au produit final de dégradation des lysosomes. La biominéralisation des métaux pourrait rendre compte d'un taux de dégradation des composés type MT plus élevé. Mouneyrac et al. (2003a) démontrent que les animaux tolérants présentaient au niveau de l'épicuticule sous-épidermique des **granules intra- et extra-cellulaires riches en S et Cu** plus abondants et plus volumineux que les animaux originaires du site de référence.

Dans le cas du Zn, le métal est présent dans les lysosomes contenant une grande variété d'éléments. Le métal est également présent dans des sphérocristaux au niveau des cellules de la paroi intestinale. Ces **sphérocristaux** ne contenaient que du S et du Ca. Les sphérocristaux étaient plus abondants chez les animaux de la Restronguet Creek *que* ceux originaires de la Blackwater. **Les sphérocristaux constituent la voie de détoxification du Zn majoritaire chez les animaux de la Restronguet Creek.**

La tolérance aux métaux des organismes originaires de la Restronguet Creek est supportée génétiquement (Hately et al., 1989). Récemment, Virgilio et al. (2003) étudient le patrimoine génétique pour dix-neuf loci codant pour des systèmes enzymatiques chez *N. diversicolor* originaires des lagunes de Pialassa (nord de l'Adriatique). Pour trois de ces loci (LDH, GPI, SDH,) des différenciations (fréquence des allèles, fréquence génotypique) pourraient être reliées aux niveaux de contamination du milieu. Par la suite, ces auteurs démontrent que dans le cas d'une exposition au Cu, les spécimens présentant des génotypes particuliers pour deux loci (ALD<sup>100/100</sup> et GPI<sup>102/102</sup>), souffrent de mortalités réduites en comparaison aux spécimens présentant des génotypes différents (Virgilio et Abbiati, 2004).

Dans le cadre du PNETOX la diversité génétique des populations de *N. diversicolor* de Seine et d'Authie (Authie port, Authie Nord, Authie Sud) est analysée en considérant le génome fonctionnel (isoenzymes intervenant dans le métabolisme) et non fonctionnel (marqueur neutre non impliqué dans des processus métaboliques: ITS 1) (Denis, comm. pers.). **Les séquences ITS 1, non soumises à la sélection, permettent de distinguer une population de Seine qui est génétiquement plus éloignée des populations de l'Authie.** Pour deux loci du métabolisme énergétique - GPI et MPI 2 - la population de Seine (vasière Nord) présente des caractéristiques spécifiques. Parmi celles-ci, le **taux de polymorphisme** calculé à partir des analyses réalisées sur les échantillons collectés sur la vasière Nord de Seine était plus élevé que pour les autres populations. Le locus GPI est aussi l'un de ceux considérés comme structurant dans l'étude de Virgilio et al. (2003). La variabilité génétique est associée à la présence de Cu dans l'environnement en conditions contrôlées (Virgilio et Abbiati, 2004) et à la tolérance différentielle des individus selon leur génotype. Ces résultats sont en accord avec les hypothèses de Kramer et Newman (1994) **selon laquelle le locus GPI pourrait être un marqueur non spécifique de la tolérance à la pollution.** Des études sur d'autres taxons soulignent la relation entre le génotype au locus GPI et la tolérance aux métaux chez les bivalves (Moraga et al., 2002) et les gastéropodes (Lavie et Nevo, 1986). **GPI pourrait donc être révélateur d'une différenciation entre les estuaires de Seine et d'Authie.**

**La population de Seine présente un profil de sélection tant au niveau de la structure d'allèles biochimiques, au locus GPI, que de celle des haplotypes génomiques de la séquence ITS 1.**

### **II.4.3 Utilisation en tant que bioindicateur**

L'espèce est caractérisée par une large distribution géographique et habitant des zones côtières et estuariennes, régions généralement soumises aux rejets d'effluents. En raison de ses capacités bioaccumulatrices, l'espèce est utilisée pour évaluer les niveaux de contamination en métaux et contaminants lipophiles (Diez et al., 2000 ; Berthet et al. 2003 ; Porier et al., 2006 ; PNETOX II). Par ailleurs, plusieurs biomarqueurs classiquement utilisés en écotoxicologie (GST, AChE, CAT, GPx) sont mesurés chez cette espèce (Scaps et al., 1997 ; Pérez et al., 2004 ; Ait Alla et al., 2006 ; Moreira et al., 2006 ; PNETOX II). Ainsi l'utilisation de *N. diversicolor* est recommandée comme espèce bioindicatrice de la qualité du milieu dans les programmes de biosurveillance à grande échelle (Diez et al., 2000 ; Galloway

et al., 2004 ; Poirier et al., 2006) ; ainsi que la mesure de l'AChe chez cette espèce du milieu estuarien (Scaps et al., 1997).

## ***II.5 Conclusion Partielle***

***N. diversicolor*** est une espèce cosmopolite, d'identification relativement aisée, facile à échantillonner et disponible tout au long de l'année. Sur le plan écologique, l'espèce joue un rôle fondamental dans le fonctionnement de l'écosystème. Son activité bioturbatrice est prépondérante dans les échanges eau - sédiment. Par ailleurs, du fait de son corps mou et des densités élevées en milieu naturel elle constitue une réserve nutritive considérable pour les prédateurs. Elle est également une espèce tolérante à un grand nombre de facteurs naturels tels que la température, la salinité et l'hypoxie. Son habitat intrasédimentaire, compartiment le plus contaminé des milieux aquatiques, implique un contact étroit avec les contaminants du milieu. Ainsi, sa capacité à bioaccumuler les métaux et les contaminants lipophiles constituent des critères de choix quant à sa sélection comme modèle biologique dans le contexte de programmes de biosurveillance de la qualité du milieu. En plus de ses caractéristiques écologiques, une littérature relativement bien fournie est disponible quant à différents aspects de la physiologie (métabolisme, reproduction, croissance) de l'espèce.



## III Chapitre III : Matériels et Méthodes

### III.1 Les sites d'études

#### III.1.1 Niveaux de contamination des sites d'étude

Les travaux du RNO (1995, 2001) révèlent des niveaux de contamination en contaminants lipophiles, notamment en PCB, particulièrement élevés dans les tissus des moules et des huîtres. Dans le cadre du **programme Seine-Aval**, la contamination chronique de l'estuaire de Seine constitue une préoccupation majeure. Ainsi, la présence de grands groupes de contaminants tels que les pesticides organochlorés, les herbicides du groupe des triazines, les HAP et les PCB est évaluée dans la colonne d'eau, les sédiments et les organismes (poissons, invertébrés). **Les données obtenues confirment que l'estuaire de la Seine figure parmi les grands estuaires européens l'un des plus contaminés au même titre que l'Escaut ou le Rhin (Abarnou et al., 1999).**

Le présent travail est réalisé dans le cadre du **Programme National d'Écotoxicologie (PNETOX II 2002-2004)** sous l'égide du Ministère de l'Écologie et du Développement Durable. Deux sites sont sélectionnés sur la côte de la Manche (Figure 13): **l'estuaire de l'Authie**, site considéré comme relativement indemne d'atteinte et **l'estuaire de la Seine** site reconnu pour sa contamination multiple par des micropolluants.



Figure 13: Sites d'étude retenus dans le cadre du programme PNETOX II 2002-2004.

Dans ce contexte, les données existantes sur la contamination des sites d'étude sont revisitées notamment pour tenir compte des interactions potentielles (synergies, antagonisme) des contaminants. L'évaluation de l'exposition aux contaminants est basée sur la surveillance chimique (PBDE, HAP, PCB, métaux, pesticides, substances pharmaceutiques, alkylphénols) dans les sédiments et dans les tissus de *N. diversicolor*.

Parmi les contaminants « émergents », les **PBDE** sont des retardateurs de flamme bromés utilisés dans la conception d'un grand nombre de matériaux plastiques, textiles, électriques et électroniques pour prévenir les risques d'incendie. Les PBDE constituent une famille de 209 congénères qui sont détectés dans les différents compartiments des estuaires et pour lesquels peu d'informations écotoxicologiques sont actuellement disponibles (Bragigand, 2005 ; Bragigand et al., 2006). Bragigand et al. (2006) étudient les niveaux de contamination et les transferts trophiques des PBDE dans deux estuaires (Loire et Seine) chez huit espèces d'organismes, consommateurs primaires, omnivores et carnivores (*N. diversicolor*, le bivalve *Scrobicularia plana*, les crevettes *Crangon crangon*, *Palaemon elegans* et *P. serratus*, les poissons plats *Platichthys flesus* et *Solea solea*, l'anguille *Anguilla anguilla*). **Des concentrations plus élevées sont détectées en Seine et ce pour toutes les espèces étudiées. Dans les deux réseaux trophiques, les auteurs démontrent que les PBDE sont biomagnifiés. Considérant la comparaison Authie - Seine, les degrés de contamination des sédiments par les PBDE sont plus élevés en Seine qu'en Authie**, les concentrations restant notablement moins fortes que celles qui peuvent être rencontrées dans de nombreuses zones polluées de part le monde (Bragigand, 2005).

Pour les contaminants organiques - **HAP, PCB** - et les métaux - **Ag, Cd, Cu, Pb et Zn** - la comparaison intersite est basée sur la procédure de Ruus et al. (2005) qui calculent les rapports suivants :

$$SCR_C = \frac{[C_{Seine}]}{[C_{Authie}]} \quad BAR_C = \frac{[C_{org,Seine}]}{[C_{org,Authie}]}$$

**Équation 4: Calcul des rapports de concentration d'un contaminant C dans les sédiments (SCR: *sediment concentration ratio*) ou dans les vers (BAR: *bioaccumulation ratio*) définis par Ruus et al. (2005).**

Les **PCB** sont des composés organochlorés qui, en raison de leur stabilité et leur ininflammabilité, ont été utilisés comme diélectriques dans les transformateurs et les condensateurs, fluides caloporteurs ou isolants. Les PCB causent des effets néfastes chez l'animal, notamment la toxicité pour la reproduction, l'immunotoxicité et cancérogénicité. Les **HAP** entrent dans la composition des pétroles bruts mais sont également retrouvés dans les résidus de combustion de produits pétroliers. Les SCR des PCB, sont toujours supérieurs à un atteignent une moyenne de 10,90. Par contre en ce qui concerne les HAP certaines valeurs sont inférieures à un. Cette moindre différence intersite s'explique par la stabilité plus faible des HAP et par l'important bruit de fond d'origine anthropique (Tableau 7). En ce qui

concerne les BAR, les valeurs sont toujours supérieures à un. Sur les trois années de prélèvement les rapports atteignent, respectivement pour les HAP et les PCB, 3,59 et 8,32.

**Tableau 7: Rapports de concentration (SCR) et de bioaccumulation (BAR) des contaminants organiques (HAP totaux ou PCB totaux). D'après Amiard et Budzinski (PNETOX II Rapport final).\*** *pas de prélèvement en Seine.*

	SCR		BAR	
	PCB Totaux	HAP Totaux	PCB Totaux	HAP Totaux
Février 2002	2,77	1,10	3,80	2,16
Avril 2002	41,18	4,02	11,63	3,79
Juillet 2002	10,17	0,82	9,74	2,25
Septembre 2002	14,12	1,87	9,82	1,62
Février 2003	3,92	0,87	3,27	9,92
Mai 2003	12,27	3,34	7,72	3,76
Août 2003	1,80	0,41	4,32	5,10
Novembre 2003*	9,33	1,15		
Février 2004	11,09	2,81	4,81	2,72
Mai 2004	3,07	0,65	17,75	3,68
Août 2004	16,91	5,51	10,15	2,77
Novembre 2004	4,20	1,31	8,10	1,68
<b>Moyenne</b>	<b>10,90</b>	<b>1,99</b>	<b>8,02</b>	<b>3,61</b>

Les degrés de contaminations **métalliques (Ag, Cd, Cu, Pb et Zn)** sont étudiés dans les sédiments superficiels et les tissus de *N. diversicolor* (Berthet et al., 2003 ; Poirier et al., 2006). Excepté pour le Cd, les SCR des métaux sont toujours supérieurs à 1. Les BAR de l'Ag et du Cd sont toujours supérieures à 1 tandis que pour le Cu, le Pb et le Zn, certaines valeurs sont inférieures à 1 (Tableau 8).

**Tableau 8: Rapports de concentration (SCR) et de bioaccumulation (BAR) des métaux (Ag, Cd, Cu, Pb et Zn) (PNETOX II Rapport final).**

	SCR					BAR				
	Ag	Cd	Cu	Pb	Zn	Ag	Cd	Cu	Pb	Zn
Février 2002	2,24	1,18	1,24	1,60	1,25	7,92	28,60	16,12	0,58	1,47
Avril 2002	2,06	2,36	4,58	6,73	3,51	3,18	12,69	22,63	1,68	2,20
Juillet 2002	2,65	0,64	1,41	1,86	1,03	10,15	13,10	1,63	0,25	1,65
Septembre 2002	1,35	1,40	3,18	3,33	2,28	22,24	14,50	0,80	1,63	2,02
Février 2003	1,48	1,07	2,07	2,90	1,83	47,37	8,37	1,35	6,18	1,08
Mai 2003	2,23	2,15	5,01	5,72	3,14	6,14	8,89	1,09	0,22	0,98
Août 2003	2,79	0,61	1,29	2,10	1,28	39,70	31,80	1,26	0,92	1,92
Novembre 2003	2,32	1,17	1,55	1,98	1,20	24,22	17,22	3,11	1,62	1,48
Février 2004	2,10	1,67	2,92	3,10	2,72	11,35	25,25	2,55	6,45	1,82
<b>Moyenne</b>	<b>2,14</b>	<b>1,36</b>	<b>2,58</b>	<b>3,26</b>	<b>2,03</b>	<b>19,14</b>	<b>17,82</b>	<b>5,61</b>	<b>2,17</b>	<b>1,62</b>

Pour les **pesticides** dont la persistance est limitée, des analyses dans l'eau sont réalisées. Ces molécules apparaissent considérablement moins concentrées dans l'estuaire de l'Authie que dans l'estuaire de la Seine (Tableau 9).

**Tableau 9: Comparaison des concentrations maximales relevées dans les estuaires d'Authie et de Seine (pour les eaux: ng.L<sup>-1</sup>, pour les sédiments\*: ng.g<sup>-1</sup> de sédiment sec). Source : <sup>a</sup>: PNETOX II: rapport final ; <sup>b</sup> Tronczynski et al., 1999.**

	Herbicides organoazotés	Insecticides organophosphorés	Insecticides organochlorés
Authie	150 <sup>a</sup>	24 <sup>a</sup>	0,3-0,6* <sup>a</sup>
Seine	1000 <sup>b</sup>	-	10 <sup>b</sup>

Les **substances pharmaceutiques** sont incomplètement dégradées par l'organisme et de même par les stations d'épuration. Ces molécules, potentiellement actives et dont la toxicité à l'égard du biota est peu documentée, se retrouvent donc dans l'environnement. Au cours des campagnes PNETOX, des antidépresseurs (carbamazépine, diazépam), des analgésiques (naproxène, aspirine, diclofénac, caféine, kétoprofène, ibuprofène, paracétamol), des  $\beta$ -mimétiques (salbutamol, terbutaline) et des hypolipémiants (gemfibrozil,) sont recherchés dans des prélèvements d'eau de la Seine (Honfleur) et de l'Authie. Diazépam, salbutamol, terbutaline ne sont jamais révélés sur aucun des deux sites. Dans l'estuaire de l'Authie, quatre produits sont mis en évidence au moins une fois au cours de l'étude qui sont aussi ceux le plus fréquemment mis en évidence en Seine (Tableau 10). En Seine, cinq produits supplémentaires sont rencontrés occasionnellement à des niveaux détectables (limite de détection généralement égale à 2 ng L<sup>-1</sup>).

**Tableau 10: Comparaison des concentrations de médicaments (ng L<sup>-1</sup>) mesurées dans les estuaires d'Authie (station port de l'Authie) et de Seine. D'après Budzinski et collaborateurs, PNETOX II Rapport final.**

<b>Honfleur</b>	<b>Mars 2003</b>	<b>Novembre 2003</b>	<b>Février 2004</b>	<b>Mai 2004</b>	<b>Septembre 2004</b>	<b>Novembre 2004</b>
Aspirine	11,02	<2	<2	<2	<2	10,21
Diclofénac	4,29	3,28	4,69	5,06	<2	9,20
Naproxen	10,63	nd	5,69	6,03	<2	9,53
Ibuprofen	7,36	nd	2,6	3,02	<2	5,33
Ketoprofène	4,46	6,74	<2	2,05	<2	<2
Gemfibrozil	<2	<2	<2	2,03	<2	3,02
Paracétamol	NA	NA	<4	2,09	<4	3,11
Caféine	3,25	5,11	7,49	11,58	11,38	19,38
carbamazépine	2,1	3,75	<2	6,23	7,08	7,59
<b>Authie</b>	<b>Mars 2003</b>	<b>Novembre 2003</b>	<b>Février 2004</b>	<b>Mai 2004</b>	<b>Septembre 2004</b>	<b>Novembre 2004</b>
Diclofénac	<2	<2	1,96	3,16	4,07	3,56
Naproxen	<2	<2	3,88	2,09	3,77	<2
Caféine	<2	<2	3,09	2,06	4,32	3,57
Carbamazépine	<2	<2	2,01	<2	<2	<2

L'activité oestrogénique des alkylphénols est bien documentée chez les mammifères, suggérant qu'ils pourraient jouer le rôle de PE dans les milieux aquatiques. Les alkylphénols sont rejetés dans l'environnement au niveau des stations d'épuration. La biotransformation aérobie et anaérobie des alkylphénols conduit à des métabolites persistants, lipophiles et plus toxiques que les composés parents. Ils sont susceptibles de s'accumuler dans les organismes. Les concentrations dans la phase particulaire sont éminemment variables avec toutefois plus fréquemment des valeurs indétectables en Authie et des maxima plus élevés pour les composés analysés en Seine (Tableau 11).

**Tableau 11: Comparaison des concentrations en alkylphénols (ng.g<sup>-1</sup> de matières en suspension) mesurées dans la phase particulaire des eaux d'Authie et de Seine. D'après Budzinski et collaborateurs, PNETOX II Rapport final.**

	Site	Février 2003	Novembre 2003	Février 2004	Mai 2004	Août 2004	Novembre 2004
Nonylphénol- Monoethoxylé	Authie	170	88	21	<30	57	177
	Seine	40	128	121	69	93	172
Nonylphénol- Diethoxylé	Authie	80	86	25	<30	89	54
	Seine	20	72	227	46	19	79
Acide (Nonylphenoxy) acétique	Authie	109	<32	11	<32	<32	<32
	Seine	80	266	31	29	<32	<32
Nonylphenol	Authie	1000	508	96	51	1337	110
	Seine	110	217	534	68	3182	628

**Sur une période d'étude de trois ans (2002-2004) le choix des estuaires – multi-pollué de la Seine et estuaire de référence de l'Authie – est justifié par les résultats acquis. Les différences intersites sont modestes pour les HAP dans les sédiments et dans les tissus de *N. diversicolor*, témoignant d'un bruit de fond général lié à l'importance de la dispersion de ces contaminants, de même que du Pb, par voie atmosphérique. Par contre, les résultats concernant les autres métaux (Ag, Cd, Cu, et Zn), les PCB, les PBDE, les pesticides ou les médicaments contrastent bien les estuaires. Toutefois, les prélèvements sont effectués en Authie à proximité d'un petit affluent qui reçoit à quelques kilomètres en amont les eaux épurées par la station de Berck sur Mer ce qui est probablement à l'origine de contaminations occasionnelles (alkylphénols, en particulier au niveau de la phase particulaire).**

### III.1.2 Caractéristiques des sites d'étude

Les sites relativement indemnes de pollutions correspondent généralement à des aires relativement restreintes, ce qui conduit à la comparaison de sites comparativement sains et pollués qui diffèrent aussi par leurs tailles comme c'est précisément le cas entre les estuaires d'Authie et de Seine (Tableau 12). Or, un impératif majeur est la comparaison de sites dont les caractéristiques écologiques sont voisines. Dans le présent travail, la zone d'intérêt concerne les vasières dans lesquelles l'annélide endogée *N. diversicolor* est communément rencontrée. À ce niveau-ci, les **caractéristiques du sédiment des deux estuaires sont relativement comparables** (Tableau 13).

**Tableau 12: Dimensions des estuaires d'Authie et de Seine. Source : Bragigand, 2005.**

<b>Dimensions</b>	<b>Authie</b>	<b>Seine</b>
Longueur du fleuve (km)	98	776
Débit du fleuve (m <sup>3</sup> .s <sup>-1</sup> )	4	450 - 500
Longueur de l'estuaire (km)	20	170
Superficie de l'estuaire (km <sup>2</sup> )	20	50
Superficie du bassin versant (km <sup>2</sup> )	984	79 000

**Tableau 13: Caractéristiques sédimentaires des vasières des estuaires d'Authie et de Seine. D'après Deloffre et Lafite (PNETOX II Rapport final).**

<b>Caractéristiques</b>	<b>Authie</b>	<b>Seine</b>
Teneur en carbonates (%)	28 - 40	20 - 50
Teneur en matière organique (%)	12,5 - 19,0	13,0 - 15,5
Granulométrie (µm)	15 - 90	18 - 98
Sables (µm)	200 - 800	200
Teneur en eau (%)	70 - 130	75 - 250

La température est un facteur écologique modulant grandement la biologie des espèces en milieu naturel. Dans le présent cas, les relevés décennaux de la température de l'air à proximité des sites d'étude (Figure 14) ne font **pas apparaître de différence intersite de la température.**

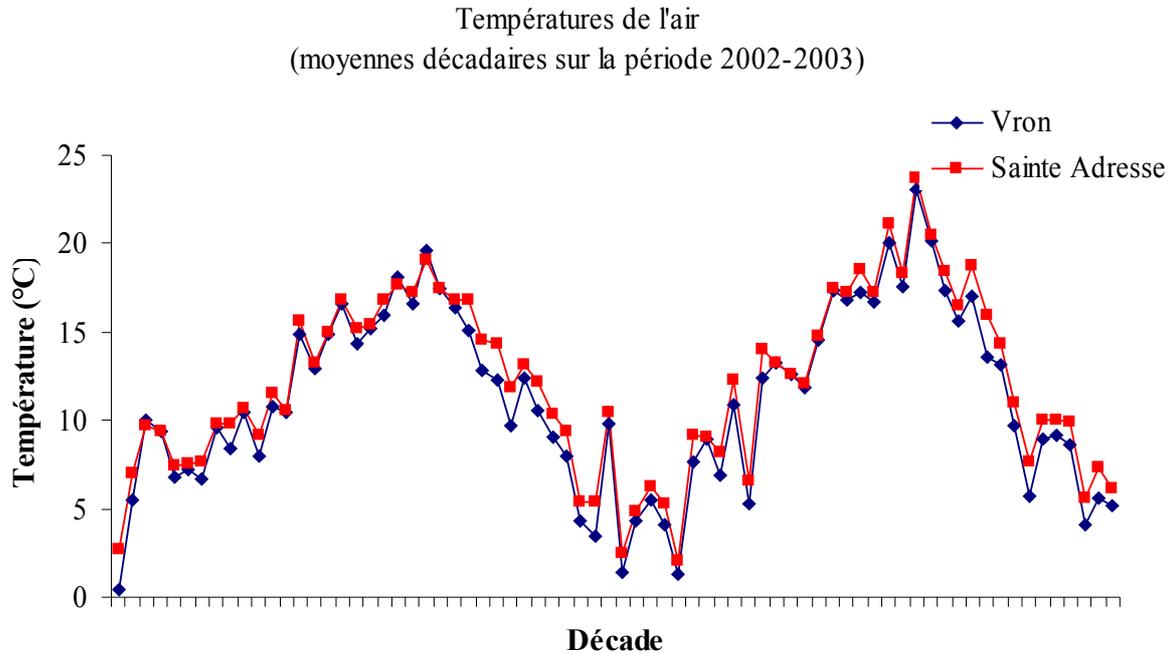


Figure 14: Relevés décennaux de la température de l'air à Vron (station météorologique à proximité de l'estuaire d'Authie) et à Sainte Adresse (station météorologique à proximité de l'estuaire de la Seine) au cours de la période 2002-2003.

### III.1.3 L'estuaire d'Authie

Peu d'activités anthropiques sont développées dans le bassin versant de l'estuaire de l'Authie. La population du bassin versant est de 96 000 habitants. La station principale de prélèvement est située sur la vasière nord (Figure 15 : ②). D'autres stations (③ : port de l'Authie ; ④ : vasière sud) ont été prospectées et échantillonnées, notamment pour évaluer l'influence de la salinité sur les réponses biologiques des individus et populations de *N. diversicolor*.



Figure 15: Stations de prélèvement sur l'estuaire d'Authie. ❶ : Berck ; ❷ : vasière nord (station principale, 50° 23' 44", 1°, 33' 46") ; ❸ : port d'Authie ; ❹ : vasière sud.

### III.1.4 L'estuaire de Seine

Le bassin versant de l'estuaire de Seine couvre 14 % de la surface du territoire français. La démographie s'élève à 16 millions d'habitants (26 % de la population française). L'estuaire de la Seine constitue une ouverture sur le domaine maritime de premier choix comme en atteste la présence du port autonome du Havre (1<sup>er</sup> complexe portuaire français) et du port autonome de Rouen. Le bassin versant de l'estuaire est d'une importance considérable

puisqu'il génère 40 % de l'activité économique de la France. La station de prélèvement est située sur la vasière nord (Figure 16 : ②).

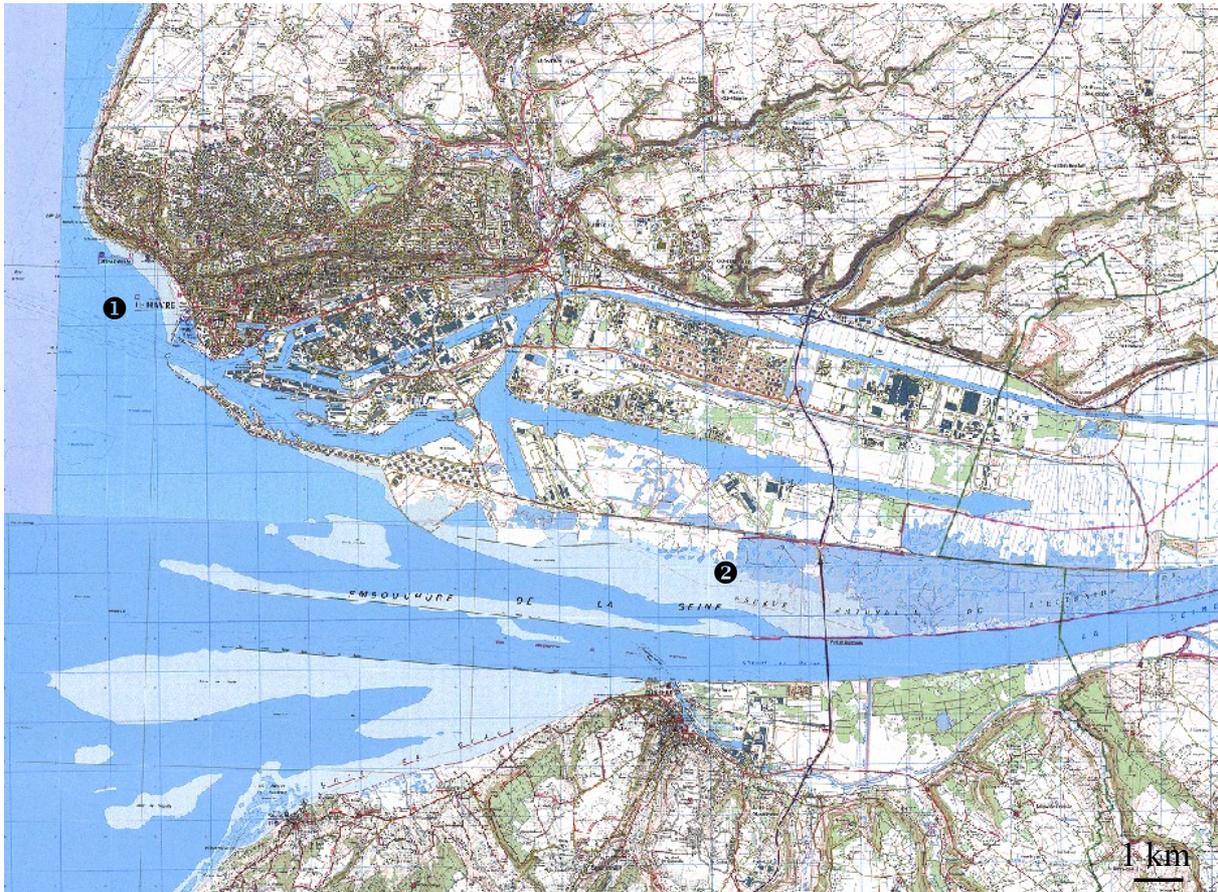


Figure 16: Station de prélèvement sur l'estuaire de Seine. ① : Le Havre ; ② : station de prélèvement ( $49^{\circ} 25' 12''$ ,  $0^{\circ} 14' 05''$ ).

### III.2 Prélèvements

#### III.2.1 Plan d'échantillonnage

La stratégie d'échantillonnage adoptée dans le cadre du programme PNETOX a été la suivante :

- un suivi des sites sur trois ans : 2002, 2003 et 2004,
- des prélèvements saisonniers : hiver, printemps, été et automne.

Le choix d'un pas de prélèvement trimestriel (Tableau 14) a été réalisé au vu des connaissances de la littérature au sujet du cycle reproducteur de l'espèce (Chambers et Milne, 1975 ; Arias et Drake, 1995 ; Gillet et Torresani, 2003). En effet, il est souvent fait mention d'une à deux périodes de reproduction par année. Les échantillonnages sont donc réalisés avant, pendant et après la période la plus probable de reproduction.

Tableau 14: Dates des campagnes de prélèvements sur les stations d'Authie et de Seine.

Campagne de prélèvements	Authie (vasière nord)	Seine (vasière nord)
Février 2002	1/02/02	4/02/02
Avril 2002	29/04/02	26/04/02
Juillet 2002	16/07/02	17/07/02
Septembre 2002*	24/09/02	23/09/02
Février 2003	19/02/03	19/02/03
Mai 2003	19/05/03	19/05/03
Août 2003	26/08/03	27/08/03
Novembre 2003	27/11/03	28/11/03
Février 2004	10/02/04	11/02/04
Mai 2004	17/05/04	17/05/04
Août 2004	31/08/04	1/09/04
Novembre 2004	24/11/04	23/11/04

### III.2.2 Température et salinité des sites d'étude

Les température et salinité sont mesurées à l'aide d'un thermo-salinomètre de terrain dans un échantillon d'eau résiduelle de surface (WTW, modèle Cond 315i) (Tableau 15).

Tableau 15: Température et salinité des eaux d'Authie et de Seine mesurées à marée basse au cours des campagnes de prélèvements.

Campagne de prélèvements	Température (°C)		Salinité	
	Authie	Seine	Authie	Seine
Février 2002	-	-	27,3	15,0
Avril 2002	-	-	26,3	17,3
Juillet 2002	20,4	17,4	27,4	19,0
Septembre 2002	8,6	13,6	29,5	18,1
Février 2003	-1,1	4,0	26,9	18,1
Mai 2003	14,0	13,8	25,8	26,0
Août 2003	<i>Milieu asséché</i>			
Novembre 2003	4,5	-	26,6	22,3
Février 2004	4,8	7,2	23,5	13,1
Mai 2004	12,2	25,8	28,7	23,7
Août 2004	29,0	19,4	15,6	12,8
Novembre 2004	15,6	10,3	19,7	22,6

Remarque : Pour le mois d'août 2003, le milieu étant complètement asséché, il a été impossible de réaliser les relevés de température et salinité.

### **III.2.3 Prélèvement des animaux**

Les animaux sont prélevés, à marée basse, à la main en retournant le sédiment à l'aide d'une bêche entre 0 et 30 cm de profondeur. Sur le terrain, ils sont maintenus dans un peu de sédiment au fond d'un seau.

En ce qui concerne les spécimens qui sont utilisés pour les mesures biométriques, ils sont maintenus dans un aquarium d'eau de mer naturelle filtrée (10 µm), aérée, ajustée à la salinité du site de prélèvement avec de l'eau d'Evian. Les animaux sont transportés ainsi jusqu'au laboratoire. Le temps de maintien des animaux dans les aquariums est de 36 heures. Au terme de cette étape, les animaux ont éliminé leur contenu digestif ainsi que tous les débris (sédiment et/ou mucus) adhérant à leur corps. Les animaux blessés et/ou incomplets sont éliminés. À l'issue de la dépuración, les animaux sont déposés sur un papier absorbant (une minute), pesés vivants (masse fraîche), puis fixés dans de l'eau de mer formolée à 10 %. Le fixateur est renouvelé une fois dans le mois qui suit la fixation. Les échantillons sont conservés ainsi dans le fixateur, dans un volume de 20 mL jusqu'à l'analyse.

Les animaux destinés aux analyses biochimiques sont, dans un premier temps, rincés dans de l'eau de mer naturelle filtrée (10 µm) dont la salinité est ajustée à celle mesurée sur la station de prélèvement, puis déposés sur un papier absorbant (environ une minute). Les animaux sont ensuite immédiatement placés dans des cryotubes et plongés dans un container d'azote liquide (-196 °C). Sur le terrain, les étapes sont coordonnées afin de travailler le plus rapidement possible. Les échantillons sont transportés jusqu'au laboratoire dans le container à azote liquide puis stockés dans un congélateur à -80 °C jusqu'au jour de l'analyse.

### ***III.3 Étude expérimentale des effets de variations de température sur les niveaux en réserves énergétiques***

Pour étudier les effets de variations de température sur les niveaux en réserves énergétiques, des animaux sont maintenus en chambre climatisée à deux régimes de température distincts (Tableau 16). Les spécimens sont collectés sur l'estuaire de la Loire. Les unités expérimentales sont des aquariums remplis de vase (hauteur : 15 cm), et d'eau de mer (hauteur : 3 cm) ajustée à la salinité du site. Ces aquariums sont maintenus sous oxygénation et la salinité est maintenue constante pendant une durée de 21 jours. Les niveaux en réserves énergétiques sont mesurés à 1, 2, 3 et 4 semaines de maintien en aquarium.

**Tableau 16: Températures des eaux du milieu naturel et des aquariums de laboratoire lors de l'étude des effets de variations de température sur les niveaux en réserves énergétiques.**

Périodes de prélèvement	Températures du milieu	Températures de maintien	
Septembre 2004	17°C	22°C	5°C
Janvier 2005	8°C	7°C	20°C

### ***III.4 Étude in situ et expérimentale des effets de variations de salinité sur les niveaux en réserves énergétiques***

Pour étudier *in situ* les effets de variations de salinité sur les niveaux en réserves énergétiques des spécimens sont prélevés sur trois stations de l'Authie de salinité différente (port de l'Authie : 18,9 - vasière nord : 29,5 - vasière sud : 33,0) en septembre 2002.

Pour étudier expérimentalement les effets des variations de salinité sur les niveaux en réserves énergétiques, des animaux sont maintenus, en laboratoire, dans des aquariums (N = 4) d'eau mer naturelle filtrée à 10 µm pendant 21 jours. Durant l'expérimentation, le milieu est oxygéné et les animaux ne sont pas alimentés. Les niveaux en réserves énergétiques sont mesurés à 1, 7, 14 et 21 jours de maintien.

### ***III.5 Les mesures biométriques***

Dans le présent travail, plusieurs variables biométriques sont utilisées:

- la masse (en mg) est mesurée à l'aide d'une balance de précision au dix millièmes de gramme. Pour étudier la teneur en eau des organismes, les masses fraîches et sèches (séchage à 60 °C jusqu'à masse constante) sont mesurées sur des organismes originaires des deux sites,
- la longueur totale du corps (en cm) est mesurée à l'aide d'une feuille de papier millimétré,
- le nombre de segments est compté sous loupe binoculaire (grossissement : x20) après avoir placé l'échantillon dans une boîte de Pétri contenant de l'eau de mer,
- la longueur L3 (en mm) est définie par la longueur des trois premiers segments (prostomium, péristomium, 1<sup>er</sup> segment) (Gillet, 1990); elle est mesurée sous loupe binoculaire (grossissement : x20) au moyen d'un oculaire équipé d'une lentille micrométrique,

- la longueur de la mâchoire (en mm) est mesurée à la loupe binoculaire (grossissement : x180) au moyen d'un oculaire équipé d'une lentille micrométrique, selon le protocole décrit par Olive et Garwood (1981). L'intérêt des mâchoires est qu'elles sont la seule partie dure de l'organisme. Un second intérêt est que chez bon nombre d'espèces de polychètes, les mâchoires sont utilisées pour estimer l'âge (Desrosiers et al., 1988 ; Olive, 1980).

### ***III.6 Détermination de critères caractérisant le statut reproducteur***

Le sexe de tous les animaux destinés aux mesures biométriques est déterminé. Le sex-ratio chez cette espèce est largement en faveur des femelles (environ 80 %). Elles constituent donc un matériel biologique abondant. La détermination des critères caractérisant le statut reproducteur porte exclusivement sur les femelles.

Au vu de la disposition des produits génitaux (libres dans la cavité cœlomique), il est facile d'échantillonner par simple biopsie des ovocytes pour les observer au microscope. Classiquement, les auteurs utilisent le diamètre ovocytaire pour estimer la maturité sexuelle des femelles. Cependant, il a été avancé que la morphologie des ovocytes serait un meilleur indicateur des processus hormonaux contrôlant la vitellogénèse que le diamètre ovocytaire. Le travail de détermination des stades de maturité sexuelle ainsi que la mesure du nombre d'ovocytes portés par chaque femelle est réalisé sur les spécimens collectés pour les mesures biométriques.

#### **III.6.1 Détermination du stade de maturité sexuelle des femelles**

Une incision est réalisée dans le second tiers de l'animal. Un aliquote du contenu cœlomique est placé sur une lame en verre. Une goutte d'eau de mer (ou bien d'une solution de NaCl à 8 ‰) est ajoutée à l'aliquote prélevé. La lame n'est pas recouverte et est observée au microscope (Olympus BH-2, oculaire x 10 équipé d'une lentille micrométrique, objectif x10). Les mesures de diamètre ovocytaire sont effectuées à l'aide d'un oculaire équipé d'une lentille micrométrique (grossissement : x200).

### III.6.2 Détermination du nombre d'ovocytes

Les femelles sont disséquées par une ouverture longitudinale depuis l'extrémité antérieure jusqu'à l'extrémité postérieure dans une boîte de Pétri. Le contenu coelomique ainsi libéré est passé sur deux tamis superposés de maille respective 300 et 25  $\mu\text{m}$  (tamis inox, norme AFNOR-ASTM). Cette étape permet d'éliminer les débris macroscopiques issus de la dissection et de récolter les ovocytes sur le tamis de 25  $\mu\text{m}$ . Ensuite les ovocytes sont re-suspendus dans une solution d'eau de mer filtrée à 10  $\mu\text{m}$  et ajustée à une salinité de 8 (25 mL). Cette suspension est, par la suite, centrifugée pendant 10 minutes à 12 000 g (Heraeus, modèle Biofuge 28RS), stockée ensuite au réfrigérateur (+ 4 °C) jusqu'à la sédimentation complète des ovocytes (36 heures). Au terme de cette étape, 80 % (20 mL) du volume de la suspension sont éliminés de façon à concentrer suffisamment la suspension pour le comptage à l'aide d'un hématimètre. Trois aliquotes sont échantillonnées après homogénéisation de la suspension ovocytaire (5 mL). Le comptage des ovocytes est réalisé à l'aide d'une cellule Nageotte examinée au microscope optique.

## III.7 Quantification des réserves énergétiques

### III.7.1 Préparation des échantillons

Les échantillons sont conservés dans un congélateur à -80 °C jusqu'à analyse. Avant leur préparation tous les échantillons sont pesés congelés (Balance Sartorius modèle BL 60-S). Le broyage des annélides est réalisé à la main, au moyen d'un pilon et d'un mortier en présence d'azote liquide afin d'éviter l'activation des enzymes impliquées dans la glycogénolyse. Après obtention d'une poudre fine, celle-ci est placée dans un tube à homogénéisation. L'homogénéisation est réalisée dans du tampon citrate (0,1 M, pH=5,0) à l'aide d'un homogénéiseur mécanique (Heidolph, modèle RZR 2102) en présence de glace.

- Une fraction de l'homogénat ( $V = 200 \mu\text{L}$ ) est prélevée, placée dans un tube eppendorf identifié puis stockée au congélateur à -80 °C pour être ultérieurement utilisée pour le dosage des lipides totaux de l'échantillon,
- Le reste de l'homogénat est prélevé à la micropipette, placé dans un tube nalgène 10 mL identifié. Afin de désactiver les enzymes impliquées dans la glycogénolyse, le tube est placé pendant 4 minutes dans un bain-marie en ébullition. Cette fraction est ensuite

stockée au congélateur à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  et sera utilisée pour le dosage du glycogène de l'échantillon.

### III.7.2 Quantification du glycogène

#### I.1.1.14 Principe du dosage

Le glycogène  $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$  est un polymère ( $\text{MM} = 10^6\text{ g.mol}^{-1}$ ) de glucose  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$  ( $\text{MM} = 180,156\text{ g.mol}^{-1}$ ), un sucre simple présent à l'état libre dans l'organisme. La méthode de dosage du glycogène est celle décrite par Carr et Neff (1984b). Elle consiste à doser comparativement le glucose présent dans :

- Un sous - échantillon de l'homogénat contenant du glucose libre et du glycogène,
- Un sous - échantillon de l'homogénat soumis à l'action d'une amyloglucosidase (0,42 unités - Sigma A-3042) contenant du glucose libre et du glucose issu de la digestion du glycogène.

Des aliquotes de chaque sous - échantillon et de chacune des solutions de gamme sont soumis à l'action d'une préparation enzymatique : un mélange de glucose oxydase (Sigma G-6125/G-7773), d'O-Dianisine (Sigma D-3252) et de peroxydase (Sigma D-3252). Cette préparation enzymatique catalyse l'oxydation du glucose en acide gluconique, un produit coloré absorbant à 420 nm.

#### I.1.1.15 Réalisation du dosage

Concernant la réalisation du dosage, plusieurs solutions sont préparées :

- une gamme de solutions de concentrations croissantes en glycogène (solution Sigma G-8751, provenant d'huîtres) soumises à l'action d'une amyloglucosidase (0,42 unités - Sigma A-3042) pendant 2 heures 15 minutes d'incubation à  $55^{\circ}\text{C}$ .
- un sous - échantillon de l'homogénat de spécimen *N. diversicolor* soumis à l'action d'une amyloglucosidase dans les mêmes conditions que la gamme étalon,
- un sous - échantillon de l'homogénat spécimen *N. diversicolor* non soumis à l'action d'une amyloglucosidase,
- une solution de glucose standard (Sigma 635-100).

200  $\mu\text{L}$  de tampon citrate (0,1 M,  $\text{pH}=5,0$ ) et 1,6 mL de préparation enzymatique sont ajoutés à 20  $\mu\text{L}$  de chacune des solutions précédemment décrites. Quarante minutes sont nécessaires à la réaction pour se développer (température ambiante), celle-ci étant stoppée par

ajout de 60  $\mu\text{L}$  d' $\text{HCl}$  5N. Un spectrophotomètre (UV visible) est utilisé pour mesurer l'absorbance à 420 nm. Un ajustement linéaire ( $D.O_{420 \text{ nm}} = a.[\text{glycogène}] + b$ ) des densités optiques mesurées à 420 nm aux concentrations en glycogène des solutions de la gamme permet de calculer la concentration en glycogène dans l'homogénat (après soustraction du glucose libre). Le résultat est exprimé en milligramme de glycogène par gramme de masse fraîche d'échantillon ( $\text{mg.g}^{-1}$ ).

### III.7.3 Quantification des lipides

#### *I.1.1.16 Principe du dosage*

Il consiste en un dosage colorimétrique des lipides de l'organisme (Frings et al., 1972). Cette méthode utilise la présence générale de double liaisons -  $\text{C}=\text{C}$  - dans la majorité des lipides (lipides insaturés) et leur rareté dans les autres molécules biologiques. La majeure partie des lipides dans les membranes et les fluides biologiques sont partiellement insaturés, cette méthode permet donc d'estimer la quantité de lipides dans un échantillon biologique. Pour cela, les lipides des échantillons sont soumis à une hydrolyse acide par l'acide sulfurique puis sont mélangés à un réactif (la phosphovanilline) entraînant la formation d'un produit de réaction de couleur rose, absorbant à 540 nm. Le produit de la réaction est stable pendant un temps relativement court (maximum après 10 minutes).

#### *I.1.1.17 Réalisation du dosage*

Deux types de solutions sont préparés :

- une gamme de concentrations en huile d'olive (Solution Sigma n° 0.1500). La composition chimique de l'huile d'olive est détaillée dans l'annexe 1,
- un aliquote de l'homogénat.

200  $\mu\text{L}$  d'acide sulfurique concentré à 96 % sont ajoutés à 20  $\mu\text{L}$  de chaque solution précédemment décrite dans des tubes à essai puis les tubes sont placés dans un bain-marie en ébullition. Au terme de 10 minutes d'incubation, les tubes sont refroidis pendant 5 minutes dans de l'eau froide. Le réactif, la phosphovanilline, est ajouté ( $V = 10 \text{ mL}$ ) par tube : une coloration rose apparaît. Les tubes sont placés dans un bain-marie à 37 °C pendant 15 minutes puis refroidis à nouveau pendant 5 minutes. Un spectrophotomètre (UV visible) est utilisé pour mesurer les absorbances à 540 nm.

Un ajustement linéaire ( $D.O_{540 \text{ nm}} = a.[\text{huile d'olive}] + b$ ) des densités optiques (mesurées à 540 nm) aux concentrations de la gamme de solutions en huile d'olive permet de

calculer la concentration en lipides dans l'homogénat. Le résultat est exprimé en milligramme de lipides par gramme de masse fraîche d'échantillon ( $\text{mg.g}^{-1}$ ).

### III.8 Quantification de la progestérone, du $17\beta$ -œstradiol et de la testostérone

#### III.8.1 Détection préliminaire des hormones stéroïdiennes chez *N. diversicolor*

La présence de la progestérone et de la testostérone dans les tissus de *N. diversicolor* a été préalablement détectée par le laboratoire de chimie marine et spectrométrie de masse (Émilien Pelletier et coll., LCM-S, Institut des Sciences de la Mer de Rimouski, Québec). Les stéroïdes présents dans les extraits méthanoliques des tissus biologiques sont d'abord séparés par chromatographie liquide puis analysés par spectrométrie de masse en mode tandem (MSMS). Par ce mode de détection l'ion spécifique de chaque stéroïde est isolé puis fragmenté, l'abondance du fragment caractéristique ayant le rapport masse sur charge de 97 ( $m/z = 97$ ) est utilisé pour la quantification. La Figure 1 illustre le résultat obtenu pour 40 pg de testostérone et progestérone.

Conditions chromatographiques : Colonne Kromasil C18 15 cm x 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$   
Elution MeOH 80 % vers MeOH 100% (solvent B: eau nanopure) en 2 minutes, 0.8  $\text{ML.min}^{-1}$ .  
Solution standard 0.002  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , injection 20  $\mu\text{l}$

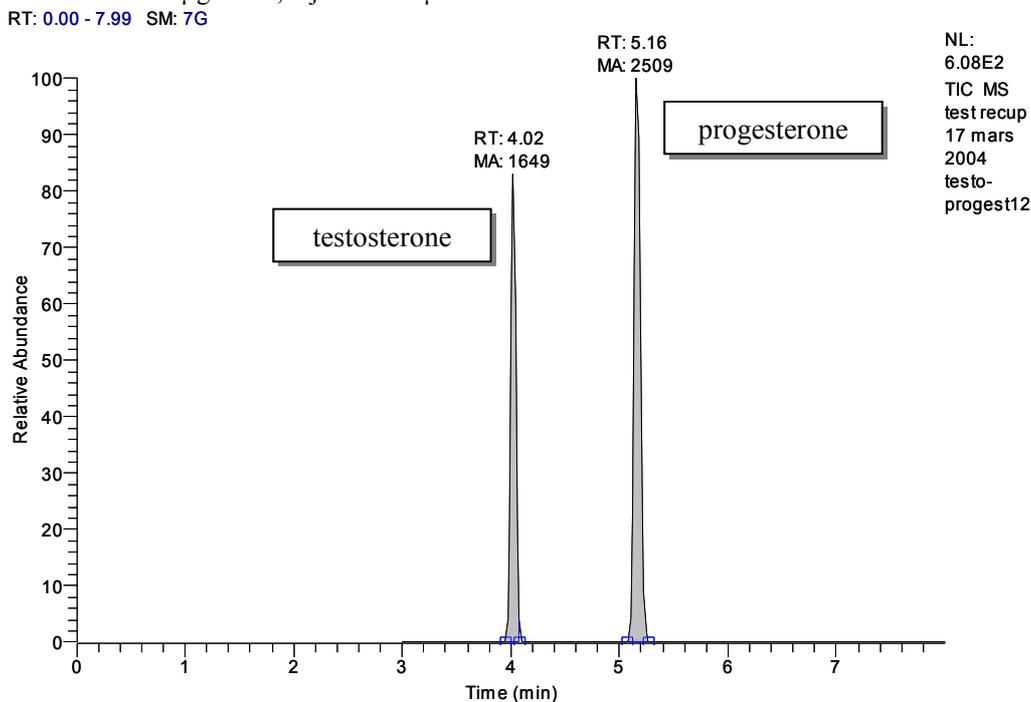


Figure 17: Détection de la progestérone et de la testostérone dans les tissus de *N. diversicolor* par le laboratoire de chimie marine et spectrométrie de masse (Émilien Pelletier et coll., LCM-S, Institut des Sciences de la Mer de Rimouski, Québec).

Dans le cadre du suivi des populations de *N. diversicolor* (PNETOX), les hormones stéroïdiennes des animaux sont quantifiées par un test immunologique (ELISA - *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) préparé par le fabricant Cayman Chemical (Ann Harbor, MI, USA). Les étapes de l'extraction et de la quantification des hormones stéroïdiennes (progestérone, 17 $\beta$ -œstradiol, testostérone) sont respectivement effectuées selon les méthodes décrites par Gauthier-Clerc (2004), Siah (2002, 2003) et le fabricant Cayman Chemical.

### **III.8.2 Préparation des échantillons et extraction des hormones stéroïdiennes**

#### *I.1.1.18 Préparation des échantillons*

Les échantillons sont conservés dans un congélateur à  $-80$  °C avant analyse. Tous les échantillons sont pesés congelés (Balance Sartorius modèle BL 60-S). Après pesée, l'échantillon est placé dans une cuve à dissection contenant de la glace. Lorsque celui-ci est décongelé, **une biopsie est réalisée afin de déterminer le sexe et le stade de maturité sexuelle** (cf. section *III.6.1*). **Étant donné le sex-ratio en faveur des femelles, les analyses sont effectuées exclusivement sur ces dernières.**

**L'étape concernant l'extraction des hormones stéroïdiennes nécessite une prise de masse fraîche minimale de 100 mg.** Pour satisfaire à cette condition, des spécimens de même stade de maturité sexuelle et de masse relativement identique sont rassemblés par deux et sont ainsi homogénéisés. L'homogénéisation est réalisée dans de l'eau ultra-pure (charge organique totale inférieure à 10 ppb) à raison de 500  $\mu$ L d'eau ultra-pure pour 100 mg de masse fraîche. Le pool d'échantillons est homogénéisé (homogénéiseur mécanique Heidolph, modèle RZR 2102) en présence de glace et jusqu'à obtention d'un homogénat. Les échantillons et homogénats sont conservés à 4 °C durant les manipulations. Des aliquotes ( $V = 500$   $\mu$ L) des homogénats obtenus sont prélevés puis stockés à  $-80$  °C et sont destinés à l'extraction puis la quantification des hormones stéroïdiennes.

#### *I.1.1.19 Déconjugaison des hormones stéroïdiennes*

Une fois décongelé, l'aliquote est placée dans un bain à sonication pendant 30 secondes. Afin de rompre les liaisons des hormones stéroïdiennes aux protéines liantes, 400  $\mu$ L d'acide chlorhydrique à 0,025 M (solution préparée le jour même) pré-chauffé sont ajoutés à l'aliquote de l'homogénat destiné à être extrait. Les tubes réactionnels sont ensuite placés

dans un bain thermostaté (40 °C) pendant 15 minutes. Au terme de cette étape, les hormones stéroïdiennes sont dépourvues des protéines liantes.

#### *1.1.1.20 Partage phase aqueuse - phase organique*

Au terme de l'étape précédente, 1,25 mL de tampon phosphate de sodium (0,07 M, pH=7,4) (phase aqueuse) puis 7 mL de dichlorométhane de qualité HPLC sont ajoutés (phase organique). Les tubes sont ensuite mis en agitation au moyen d'un agitateur orbital (Heidolph, modèle Titramax 100) pendant 3 minutes puis centrifugés à 2500 rpm pendant 10 minutes à 4 °C. La phase organique contenant les hormones stéroïdiennes est récupérée à l'aide d'une pipette pasteur puis stockée dans un tube en verre au réfrigérateur. L'extraction est répétée deux fois sur la phase aqueuse.

#### *1.1.1.21 Élimination du solvant*

Au terme des trois répétitions d'extraction sur la phase aqueuse, cette dernière est éliminée. La phase organique contenant les hormones stéroïdiennes, est maintenue sous un jet d'azote (sur-pression) afin d'évaporer rapidement (1h30 à 2h00) le solvant (dichlorométhane). Après évaporation complète du solvant, l'extrait est repris dans 300 µL de tampon EIA (« *Enzyme Immuno Assay* ») fourni dans le kit de dosage des hormones par Cayman Chemical). Les tubes sont stockés à -20 °C jusqu'au dosage.

### **III.8.3 Dosage de la progestérone, du 17β-œstradiol et de la testostérone**

Le dosage des hormones stéroïdiennes est effectué au moyen des kits de dosage préparés par Cayman Chemical (Ann Harbor, MI, USA).

#### *1.1.1.22 Principe du dosage*

Le principe du dosage est commun aux trois hormones stéroïdiennes. Il s'agit d'un test ELISA basé sur la compétition entre l'**hormone libre** présente dans l'extrait et le **traceur** (*hormone liée de manière covalente à l'acétylcholine estérase*) pour la reconnaissance par l'**anticorps spécifique de l'hormone** (*anticorps anti-hormone*). Cet anticorps est reconnu par l'anticorps monoclonal de souris fixé de manière covalente au puits de la microplaque. Le **traceur** et l'**anticorps anti-hormone** sont spécifiques au kit de dosage de l'hormone considérée.

### 1.1.1.23 Réalisation du dosage

Le dosage est réalisé en microplaques (96 puits,  $V_{\text{puit}} = 300 \mu\text{L}$ ). Le fond de chaque puits est tapissé d'une protéine de fixation liant l'anticorps monoclonal de souris. **Cet anticorps monoclonal se lie spécifiquement et uniquement à l'anticorps anti-hormone.** Plusieurs types de puits sont préparés selon les instructions du fabricant:

- blanc (Blc) : aucun réactif n'est ajouté,
- liaison non spécifique (LNS) : 100  $\mu\text{L}$  de tampon EIA, 50  $\mu\text{L}$  de traceur,
- liaison maximale (B0) : 50  $\mu\text{L}$  de tampon EIA, 50  $\mu\text{L}$  de traceur, 50  $\mu\text{L}$  d'anticorps,
- standard et échantillon : 50  $\mu\text{L}$  de solutions standard ou d'échantillons, 50  $\mu\text{L}$  de traceur, 50  $\mu\text{L}$  d'anticorps.

Lorsque les puits sont prêts, la microplaque est incubée pendant 1 heure (pour la progestérone et le  $17\beta$ -œstradiol) ou 2 heures (pour la testostérone) à l'obscurité et maintenue en agitation à l'aide d'un agitateur orbital (Heidolph, modèle Titramax 100). Au terme de l'incubation, la plaque est lavée à l'aide d'un laveur automatique de plaques (Tecan Washer Columbus) afin d'éliminer l'ensemble des réactifs non liés. Le lavage est répété cinq fois selon les recommandations du fabricant. Le réactif d'Ellman (constitué d'acétylthiocholine et d'acide 5-5'-bis-2-nitrobenzoïque) est ensuite ajouté dans les puits. Pour le développement de la coloration, les microplaques sont incubées pendant une durée de 1 à 1h30. L'incubation est arrêtée lorsque la densité optique des puits de liaison maximale (B0) est comprise entre 0,300 et 0,800. Les densités optiques sont mesurées à l'aide d'un lecteur de plaques (Tecan modèle Sunrise) à la longueur d'onde 420 nm. Les données sont exportées vers un classeur Excel pour être traitées.

### 1.1.1.24 Traitement et expression des résultats

À partir des densités optiques  $DO_{420\text{nm}}$  mesurées, le taux de fixation (noté  $\%B / B_0$ ) est calculé pour les différents essais (standard et échantillons) :

**Équation 5: Calcul du taux de fixation (noté  $\%B / B_0$ ) de l'hormone.**

$$\%B / B_0 = \left[ \frac{(DO_{St/Ech} - DO_{Blc} - DO_{LNS})}{(DO_{B_0} - DO_{Blc} - DO_{LNS})} \right] \times 100$$

Un ajustement logarithmique du taux de fixation aux concentrations des standards d'hormones (progestérone, 17 $\beta$ -œstradiol : 7,8 – 62,5 – 250 – 1000 pg.mL<sup>-1</sup> ; testostérone : 3,9 – 31,3 – 125 – 500 pg.mL<sup>-1</sup>) est effectué ( $\%B/B_0 = a.[Standard] + b$ ) pour déterminer la concentration en hormones stéroïdiennes dans l'échantillon analysé.

Les taux de réactions croisées avec d'autres hormones sont fournis par le fabricant et présentés dans l'annexe 2. **Conformément aux données du fabricant, les limites de détection des hormones stéroïdiennes sont respectivement de l'ordre de 10 pg.mL<sup>-1</sup> pour la progestérone, 8 pg.mL<sup>-1</sup> pour le 17 $\beta$ -œstradiol, 6 pg.mL<sup>-1</sup> pour la testostérone.**

La concentration en hormone dans les tissus de *N. diversicolor* est exprimée en ng.g<sup>-1</sup> de masse fraîche.

Les taux de récupération sont estimés pour chacune des hormones en effectuant des ajouts dosés à des homogénats de pool de *N. diversicolor*. Ces taux de récupération sont respectivement estimés à  $94,5 \pm 13,7$  % (N = 6) pour la progestérone,  $93,3 \pm 18,5$  % (N = 6) pour le 17 $\beta$ -œstradiol et  $88,2 \pm 17,9$  % (N = 6) pour la testostérone.

### ***III.9 Analyses statistiques***

Les analyses statistiques sont effectuées à partir du logiciel XLStat 2006. Pour toutes les hypothèses statistiques, le seuil de risque est fixé à 5 %. La normalité de la distribution des variables analysées (biométriques, biochimiques) est testée à l'aide du test de Shapiro et Wilks.

Les coefficients de corrélations entre les variables biométriques (nombre de segments, longueurs et masse) sont calculés à l'aide de la méthode de Spearman (coefficients de corrélations non linéaires). Pour comparer les régressions linéaires de deux variables, les analyses de covariance (ANCOVA) sont utilisées.

Pour comparer les concentrations en réserves énergétiques, en hormones stéroïdiennes et le nombre d'ovocytes, les tests statistiques paramétriques sont effectués. Pour comparer deux moyennes, le test t de Student est utilisé ; pour les comparaisons multiples de moyenne, l'analyse de variance (ANOVA) et le test de Tukey sont utilisés.

Pour la description synthétique des résultats, des analyses en composantes principales sont été effectuées. Ces analyses extraient plusieurs axes principaux ; seuls les axes principaux ayant une valeur propre supérieure à un sont retenus pour l'interprétation. Les

coefficients de corrélation de Spearman des variables initiales aux nouveaux sont calculés. Pour tester la significativité de ces corrélations dans le nouvel espace, le test de Legendre et Legendre est utilisé: lorsque la valeur du coefficient de corrélation est supérieur à la racine carré de  $d/n$  ( $d$ , étant le nombre de composantes principales,  $n$ , le nombre de variables initiales) le coefficient est significatif.



## IV Chapitre IV : Croissance et condition chez *N. diversicolor*

En écotoxicologie beaucoup d'efforts et de travaux sont mis en œuvre pour identifier des **indicateurs biologiques** de l'**état de santé** des organismes. Divers **indices de condition**, basés sur des caractéristiques morphologiques ou biométriques des spécimens analysés ont été développés chez certains modèles biologiques (Cf section 1.7.2.7). Chez les néréidés, aucun indice équivalent n'existe actuellement. Pour estimer la **condition** des organismes il est indispensable de posséder une bonne compréhension de la biologie de la croissance de l'espèce envisagée et d'identifier différentes variables biométriques.

De nombreux travaux sur l'écologie des polychètes sont disponibles dans la littérature. Les études de terrain ont surtout trait à l'étude de la structure en taille ou en âge des populations. Une première difficulté dans ces études est que les animaux ont un corps mou et que les parties dures sont rares. La **mâchoire** constitue une des rares parties dures de l'organisme (Desrosiers et al., 1988). Chez certaines espèces de polychètes comme *Nephtys hombergii*, des arrêts de croissance en relation avec le changement de saison s'impriment sous forme de stries sur les mâchoires et permettent ainsi une estimation de l'âge des spécimens après examen au microscope photonique ou à balayage (Kirkegaard, 1970 ; Olive, 1980). Chez *N. diversicolor*, les mâchoires ne portent pas ce type de stries (Olive, 1980), par contre la **longueur de la mâchoire** est utilisée comme un critère fiable pour étudier la structure des populations (Chambers et Milne, 1975 ; Olive et Garwood, 1981 ; Mettam, 1982 ; Möller, 1985). Pour étudier la structure en taille/âge des populations d'annélides polychètes, d'autres variables biométriques sont disponibles comme la **longueur totale du corps**, la **masse totale**, le **nombre de segments** des individus complets. Dans le cadre de ces travaux, la seconde difficulté est que les animaux sont capables de se couper spontanément (autotomie) suite à un stress, comme celui induit par leur manipulation. Les animaux peuvent également être abîmés lors de leur collecte (blessure, cassure). Aussi, dans ce type d'études, chez *N. diversicolor*, la L3 (longueur cumulée du prostomium, du peristomium et du 1<sup>er</sup> segment) est proposée puisqu'elle ne nécessite pas d'individus entiers (Gillet, 1990 ; Gillet et Torresani, 2003).

Dans le présent travail, la teneur en eau des organismes est étudiée pour déterminer si la masse fraîche pourrait être utilisée dans la détermination d'un indice de condition. Les relations entre les différentes variables biométriques sont définies pour caractériser la biologie de la croissance et l'identification d'un indice de condition.

## IV.1 Teneur en eau et variables biométriques

### IV.1.1 Teneur en eau des organismes

La teneur en eau des organismes est relativement constante, comprise entre 83 et 85 % et entre 82 et 86 % pour les spécimens d'Authie et de Seine respectivement (Figure 18). La teneur en eau des organismes n'est pas influencée par la période de prélèvement.

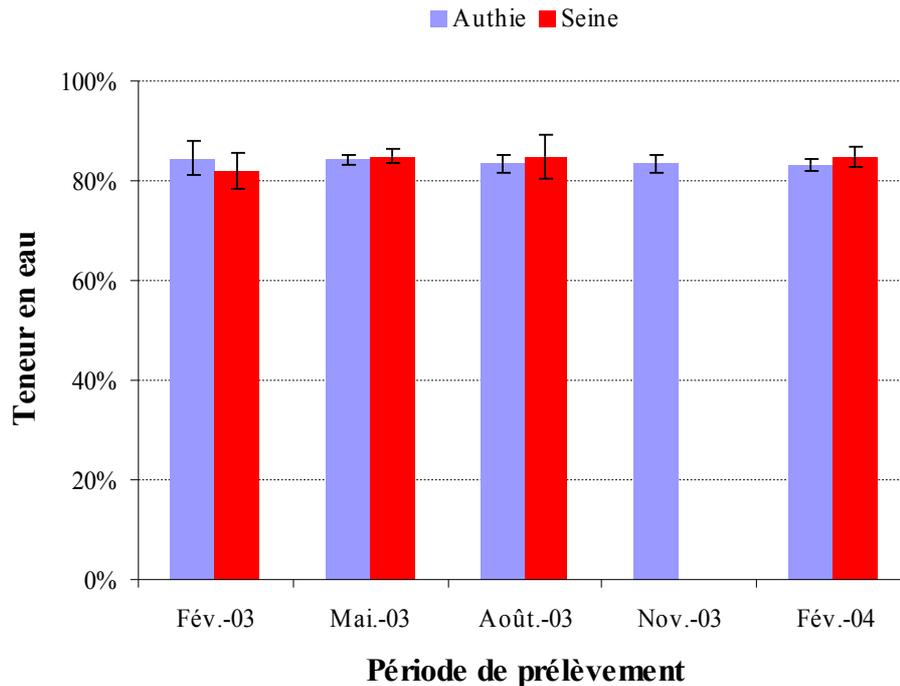


Figure 18: Teneur en eau des spécimens d'Authie et de Seine.

### IV.1.2 Étude des variables biométriques

Les mesures biométriques (masse fraîche, nombre de segments longueurs de la mâchoire, du corps et des trois premiers segments L3) réalisées sur les spécimens originaires d'Authie et de Seine au cours des six campagnes de prélèvement (août et novembre 2003, février, mai, août et novembre 2004) sont illustrées dans la Figure 19.

La masse fraîche des organismes (Figure 19A) varie entre 11 et 987 mg sur l'Authie et entre 17 et 405 mg sur la Seine, la moyenne sur l'ensemble des prélèvements étant de 210 mg pour l'Authie et de 114 mg pour la Seine. Le nombre de segments (Figure 19B) des animaux est compris entre 56 et 103 pour les spécimens de l'Authie et entre 41 et 92 pour la Seine. Les valeurs des longueurs totale, de la mâchoire et L3 sont respectivement comprises entre :

- 1,2 - 8,5 cm et 1,8 - 6,5 cm (Figure 19C),

- 0,64 - 2,72 mm et 0,91 - 2,13 (Figure 19D),
- 0,56 - 3,10 mm et 0,85 - 2,40 (Figure 19E), pour les spécimens d'Authie et de Seine respectivement.

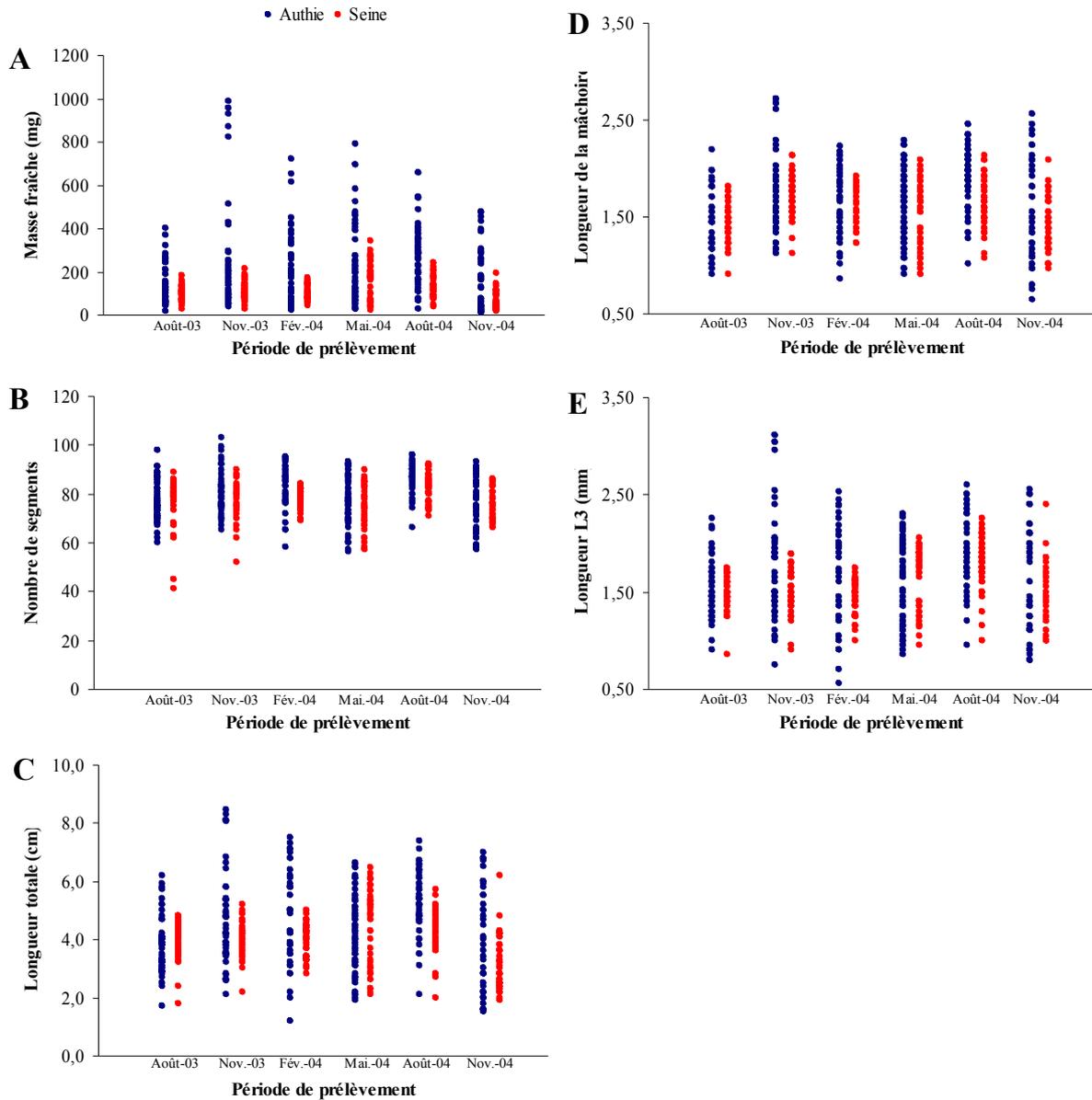


Figure 19: Mesures biométriques sur *N. diversicolor* (A- masse fraîche, B- nombre de segments, C - longueur totale, D - longueur de la mâchoire, E - longueur L3) originaires des estuaires d'Authie et de Seine au cours de six campagnes de prélèvement.

Les corrélations de Spearman des variables biométriques mesurées chez *N. diversicolor* sont établies en tenant compte de l'ensemble des individus collectés à cet effet sur chacun des deux sites (Authie : N = 292 ; Seine : N = 272). Les variables biométriques sont positivement et significativement corrélées entre elles pour les deux sites (Tableau 17).

Tableau 17: Coefficients de corrélation de Spearman entre les variables biométriques mesurées sur les spécimens de l'Authie et de Seine. Les corrélations sont significatives au seuil de risque 5 %.

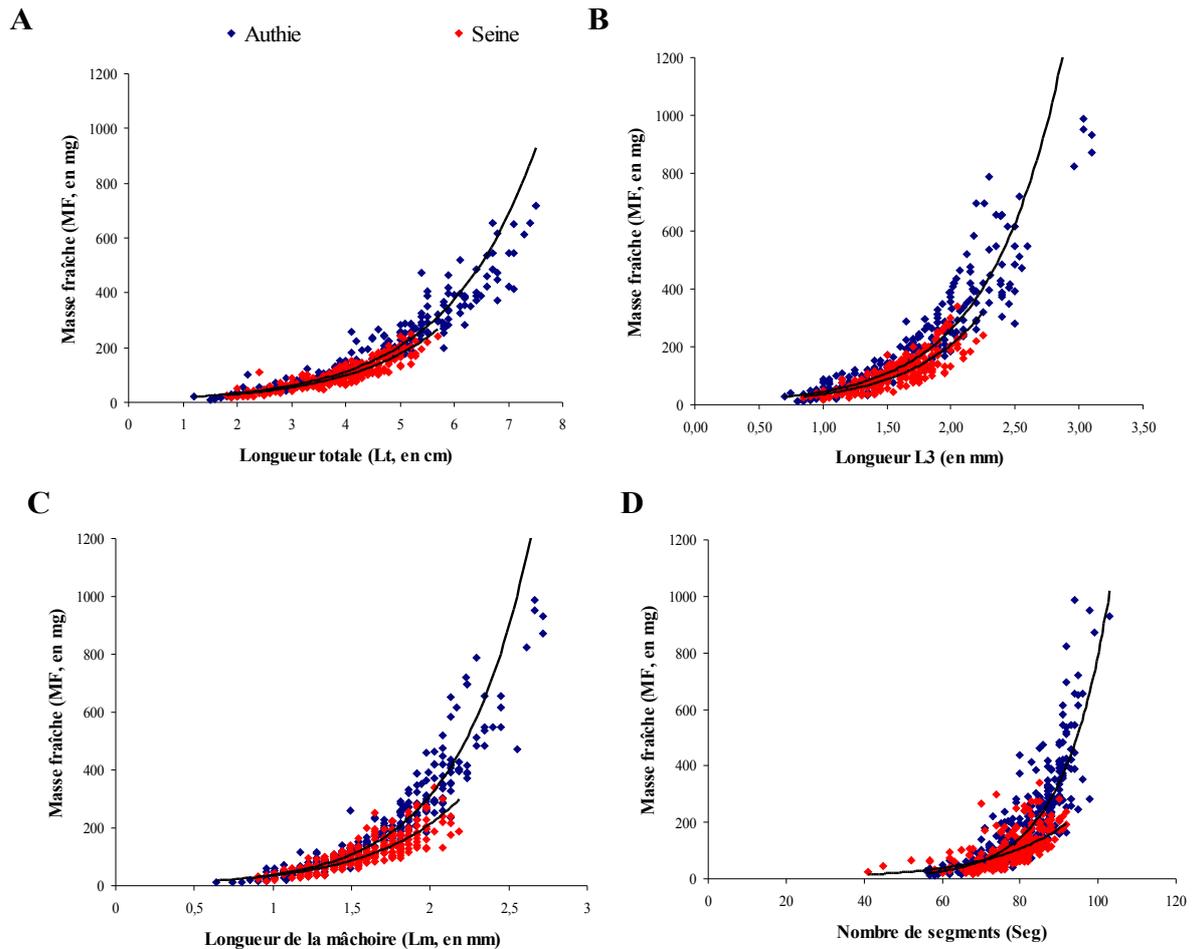
R <sup>2</sup>	Masse fraîche		Longueur de la mâchoire		Nombre de segments		Longueur L3	
	Authie	Seine	Authie	Seine	Authie	Seine	Authie	Seine
Site								
Masse fraîche	-	-	-	-	-	-	-	-
Longueur de la mâchoire	0,969	0,875	-	-	-	-	-	-
Nombre de segments	0,895	0,710	0,893	0,663	-	-	-	-
Longueur L3	0,950	0,855	0,946	0,755	0,874	0,681	-	-
Longueur totale	0,976	0,916	0,960	0,796	0,910	0,708	0,949	0,793

#### IV.2 Relations entre les variables d'allongement et la masse

Les relations entre la longueur totale, la longueur L3, la longueur de la mâchoire, le nombre de segments et la masse fraîche des animaux collectés au cours de l'ensemble des périodes de prélèvement sur les estuaires d'Authie ou de Seine sont illustrées dans la Figure 20. Les relations entre les variables d'allongement et la masse fraîche sont de type exponentiel (Tableau 18).

Tableau 18: Relations entre les variables d'allongement et la masse fraîche chez des animaux originaires des sites d'Authie et de Seine. A - longueur totale, B - longueur L3, C - longueur de la mâchoire, D - nombre de segments.

Relations	Authie		Seine	
	Équation	R <sup>2</sup>	Equation	R <sup>2</sup>
A	MF = 10,02*Exp(0,60*Lt)	R <sup>2</sup> = 0,93	MF = 9,4*Exp(0,59*Lt)	R <sup>2</sup> = 0,84
B	MF = 7,73*Exp(1,76*L3)	R <sup>2</sup> = 0,86	MF = 6,45*Exp(1,74*L3)	R <sup>2</sup> = 0,72
C	MF = 4,54*Exp(2,11*Lm)	R <sup>2</sup> = 0,92	MF = 5,94*Exp(1,79*Lm)	R <sup>2</sup> = 0,77
D	MF = 0,17*Exp(0,08*Seg)	R <sup>2</sup> = 0,81	MF = 1,79*Exp(0,05*Seg)	R <sup>2</sup> = 0,46



**Figure 20:** Relations entre les variables d'allongement (A - longueur totale, B - longueur L3, C - longueur de la mâchoire, D - nombre de segments) et la masse fraîche des animaux collectés sur les sites d'Authie et de Seine au cours de l'ensemble des périodes de prélèvement.

La biologie de la croissance des *N. diversicolor* est caractérisée. Les relations allométriques entre les variables d'allongement et la masse font apparaître deux phases de croissance. Une première due à l'adjonction de nouveaux segments en position postérieure (phase de croissance segmentaire). Une seconde phase de croissance par gain de masse traduisant un allongement des segments. Des différences intersites de la croissance sont notées. Tout d'abord, des spécimens de plus grande taille et de masse plus élevée sont présents en Authie et absents en Seine.

### IV.3 Variations intersites des relations taille - masse

Afin d'étudier statistiquement ces différences intersites pour chacune des périodes de prélèvements étudiées, des relations linéaires simples entre la masse et les diverses variables d'allongement (nombre de segments, longueur totale, longueur de la mâchoire, longueur L3), sont établies (Équation 6).

L'étude statistique consiste à comparer les régressions linéaires simples obtenues à partir des mesures individuelles effectuées sur les organismes d'Authie et de Seine à chaque période de prélèvement. La variable *site d'origine des animaux* est introduite comme covariant dans l'analyse. L'hypothèse nulle est que les droites ont des coefficients égaux, l'hypothèse alternative est que - à taille égale - les animaux d'Authie ont une masse supérieure à ceux de Seine. Pour comparer statistiquement les relations considérées, des analyses de covariance ont été réalisées. Les résultats des tests statistiques sur les coefficients des régressions sont présentés dans le Tableau 19.

**Équation 6: Modèle de régression linéaire utilisé pour l'étude des différence intersites des relations taille - masse.**

$$\text{Log}_{10}(\text{Masse\_fraîche}) = f_x[(\text{Log}_{10}(\text{Variable\_d'allongement}))]$$

En ce qui concerne les longueurs totales et L3, des différences intersites significatives sont observées (ANCOVA,  $p \leq 0.000$ ) pour les six campagnes de prélèvements. Au regard de la longueur de la mâchoire et du nombre de segments, les régressions linéaires sont significativement différentes dans la majorité des cas (5/6) excepté en novembre 2004 et mai 2004 respectivement où les pentes des courbes ne diffèrent pas.

**À taille identique (longueur totale, longueur L3, longueur de la mâchoire, nombre de segments) les masses des spécimens d'Authie sont généralement significativement plus élevées que celles des spécimens de Seine au regard des différentes variables d'allongement étudiées.**

Tableau 19: Comparaison intersite des relations taille - masse.

Date	Axe X	Site	N	a	b	R <sup>2</sup>	p-value
08/03	Log <sub>10</sub> (Long. Mâchoire)	AUTHIE	48	2,688	3,791	0,906	< 0,0001
		SEINE	47	2,028	3,826	0,683	
	Log <sub>10</sub> (Long. Totale)	AUTHIE	49	2,501	1,386	0,903	< 0,0001
		SEINE	46	1,969	1,814	0,541	
	Log <sub>10</sub> (N Segments)	AUTHIE	49	5,289	-18,279	0,739	0,041
		SEINE	46	1,264	-0,940	0,208	
Log <sub>10</sub> (Long. L3)	AUTHIE	48	3,186	3,394	0,899	0,002	
	SEINE	47	2,770	3,437	0,667		
11/03	Log <sub>10</sub> (Long. Mâchoire)	AUTHIE	38	3,168	3,423	0,946	< 0,0001
		SEINE	43	2,700	3,167	0,875	
	Log <sub>10</sub> (Long. Totale)	AUTHIE	38	2,217	1,733	0,950	< 0,0001
		SEINE	41	1,339	2,754	0,415	
	Log <sub>10</sub> (N Segments)	AUTHIE	38	5,577	-19,456	0,717	0,005
		SEINE	41	1,370	-1,347	0,268	
Log <sub>10</sub> (Long. L3)	AUTHIE	38	2,289	3,822	0,944	< 0,0001	
	SEINE	43	2,091	3,759	0,818		
02/04	Log <sub>10</sub> (Long. Mâchoire)	AUTHIE	38	3,902	3,251	0,986	< 0,0001
		SEINE	35	2,583	3,417	0,908	
	Log <sub>10</sub> (Long. Totale)	AUTHIE	38	2,339	1,556	0,961	< 0,0001
		SEINE	34	2,263	1,483	0,811	
	Log <sub>10</sub> (N Segments)	AUTHIE	38	7,839	-29,521	0,903	0,041
		SEINE	34	5,657	-20,100	0,658	
Log <sub>10</sub> (Long. L3)	AUTHIE	38	2,485	3,934	0,935	< 0,0001	
	SEINE	35	2,420	3,748	0,810		
05/04	Log <sub>10</sub> (Long. Mâchoire)	AUTHIE	63	3,659	3,425	0,973	0,014
		SEINE	47	2,934	3,614	0,965	
	Log <sub>10</sub> (Long. Totale)	AUTHIE	63	2,519	1,622	0,954	< 0,0001
		SEINE	47	2,020	2,222	0,901	
	Log <sub>10</sub> (N Segments)	AUTHIE	60	6,041	-21,150	0,850	0,399
		SEINE	46	4,826	-16,001	0,676	
Log <sub>10</sub> (Long. L3)	AUTHIE	63	2,842	3,913	0,909	< 0,0001	
	SEINE	47	3,264	3,297	0,920		
08/04	Log <sub>10</sub> (Long. Mâchoire)	AUTHIE	49	3,391	3,347	0,960	< 0,0001
		SEINE	48	2,495	3,579	0,896	
	Log <sub>10</sub> (Long. Totale)	AUTHIE	46	2,864	0,770	0,939	0,000
		SEINE	47	2,565	1,093	0,835	
	Log <sub>10</sub> (N° Segments)	AUTHIE	47	7,390	-27,476	0,592	< 0,0001
		SEINE	47	4,596	-15,460	0,623	
Log <sub>10</sub> (Long. L3)	AUTHIE	49	3,391	3,347	0,960	< 0,0001	
	SEINE	48	2,495	3,579	0,896		
11/04	Log <sub>10</sub> (Long. Mâchoire)	AUTHIE	41	3,578	3,015	0,975	0,059
		SEINE	41	3,287	3,026	0,903	
	Log <sub>10</sub> (Long. Totale)	AUTHIE	40	2,463	1,399	0,983	0,001
		SEINE	41	2,366	1,406	0,941	
	Log <sub>10</sub> (N Segments)	AUTHIE	40	7,138	-26,432	0,844	< 0,0001
		SEINE	41	6,752	-25,199	0,805	
Log <sub>10</sub> (Long. L3)	AUTHIE	41	3,358	3,025	0,972	0,001	
	SEINE	41	2,726	3,067	0,807		

#### ***IV.4 Discussion partielle***

Les **variables biométriques** (masse sèche, masse fraîche, nombre de segments, longueurs de la mâchoire, du corps et L3) étudiées chez *N. diversicolor* permettent de **caractériser la biologie de la croissance** de cette espèce et de dégager un **indice de condition générale** des organismes originaires des sites contaminés de la Seine et relativement indemne de pollution de l'Authie.

Plusieurs travaux de recherche sur l'**élevage** et la **biologie de la croissance** de *N. diversicolor* sont disponibles dans la littérature (Dales, 1950 ; Scaps et al., 1993 ; Olivier et al., 1996 ; Marty et al., 1997 ; Fidalgo e Costa, 1999 ; Meziane et Retière, 2002). Les stades embryonnaires puis larvaires se développent en **puisant les ressources du vitellus accumulé initialement dans les ovocytes**. Les stades post-larvaires (2 à 6 jours) se nourrissent d'ovocytes non fécondés ou réémis (adelphophagie) par la femelle qui entretient la galerie. Les stades post-larves sont formés de 3 à 6 segments et ont une taille inférieure ou égale à 1 mm. Les individus entrent dans la phase juvénile, des nouveaux segments sont élaborés et ajoutés à ceux préexistants. Les individus sont généralement considérés comme adultes lorsque mâchoire et tube digestif sont mis en place et que le régime alimentaire est celui de l'adulte. Suivant les sources bibliographiques, les mâchoires sont élaborées de quelques jours à trois semaines après la fécondation. Incolores initialement, l'apparition de la pigmentation de ces dernières révèle que les animaux se nourrissent. Les taux de croissance des animaux sont dépendants notamment de leur alimentation (jeûne ou nourris, qualité de l'alimentation) et de la densité des individus. **Le stress trophique et/ou des densités élevées (supérieures à 3000 individus par mètre carré) diminue le taux de croissance des individus, la biomasse et le taux de survie (Scaps et al., 1993). Par ailleurs, les auteurs précisent que la manipulation trop fréquente des spécimens ou des chocs de température entraînent les mêmes effets. Ces considérations sont d'une importance capitale dans le cas d'études en laboratoire ou de prélèvement de spécimens *in situ*.**

Dans la présente étude, les relations exponentielles entre la masse et les variables d'allongement mettent clairement en évidence deux phases de croissance. Pendant une première phase de croissance les animaux s'allongent par adjonction de nouveaux segments. C'est la **phase de croissance segmentaire** qui fait suite aux stades larvaires. Au cours de cette phase, les individus augmentent en longueur (longueur L3 et longueur totale du corps),

les mâchoires s'allongent également. Au terme de cette phase, les animaux atteignent un nombre définitif de segments. À ce moment-là, la croissance se fait surtout par gain de masse, la croissance en longueur est ralentie. C'est la **phase de croissance pondérale**. Ces résultats sont en accord avec la bibliographie selon laquelle le taux de prolifération segmentaire est élevé chez les animaux jeunes. Par contre, celui-ci diminue chez les spécimens plus âgés et la croissance est due essentiellement à l'allongement de ces segments (Barnes et al., 1988). En Seine, les individus appartenant à des classes de masse supérieures à 400 mg (masse fraîche) sont quasiment complètement absents. Ceux appartenant à la plus grande classe de masse identifiée (300 - 400 mg) sont occasionnellement présents en mai et absents le reste des autres périodes de prélèvements.

**L'utilisation de la masse des animaux pour évaluer des toxicités sublétales est préconisée chez les néréidés** (Dillon et al., 1993 ; Moore et Dillon, 1993). Par ailleurs, chez une espèce proche, *Nereis virens*, Carr et Neff (1982, 1984a) observent des **réductions de masse dans le cas de spécimens soumis à une pollution portuaire**. Par contre, chez des juvéniles de *N. diversicolor*, Saiz-Salinas et Francés-Zubillaga (1997) notent une augmentation de la masse des spécimens suite à l'exposition à des sédiments hautement contaminés mais enrichis en matière organique. Selon les auteurs, l'activité bioturbatrice des vers entraînerait une oxygénation du sédiment, et l'implantation de microorganismes. Il en résulterait une dégradation accrue des composés et de la matière organique, augmentant ainsi la disponibilité alimentaire et expliquant l'augmentation de la masse des spécimens.

Les **indices de condition** permettent d'établir l'état de santé général des organismes. Dans la littérature, ces derniers intègrent très souvent la masse sèche des individus. Celle-ci, par comparaison à la masse fraîche, est indépendante de la teneur en eau des organismes. Plusieurs facteurs influencent la **teneur en eau** d'un corps comme par exemple l'état physiologique (**reproduction, osmorégulation**), la **salinité** du milieu, les **agents chimiques**. Ainsi, Cardellicho et al. (1998, cité dans Ivankovic et al., 2005) démontrent chez la moule (*Mytilus edulis*) que la teneur en eau des tissus varie en fonction de la saison et ce en relation avec l'état reproducteur des animaux. Par contre, chez *N. diversicolor* issue de nos sites d'études, aucune variation saisonnière de la teneur en eau n'a été montrée. Les mécanismes osmorégulateurs chez *N. diversicolor* sont depuis longtemps largement étudiés (Smith, 1970, 1976 ; Oglesby, 1969, 1970 ; Fletcher, 1974) et l'espèce est reconnue comme euryhaline. Il n'est donc pas étonnant qu'en dépit d'une certaine différence de salinité entre les points de

prélèvements en Seine et en Authie, la teneur en eau des tissus des animaux ne varie pas en regard du site d'origine. Chez l'anguille, Sancho et al. (2003) démontrent, au cours d'une expérimentation en laboratoire, que l'exposition à un carbamate induit une augmentation de la teneur en eau dans les muscles sur le court terme (24 heures d'exposition). Par ailleurs, l'exposition à l'Ag induit des modifications de la teneur en eau des tissus de trois espèces d'invertébrés (Bianchini et al., 2005). En dépit de la contamination de la Seine par rapport à l'Authie, en particulier par l'Ag (Poirier et al. 2006), aucune différence intersite des teneurs en eau n'est révélée. **Ainsi, ces résultats permettent d'utiliser la masse fraîche au lieu de la masse sèche ce qui d'un point de vue opérationnel, dans l'optique de l'utilisation d'un tel indice dans des programmes de surveillance, représente une simplification très appréciable. De plus, ceci permet de mesurer sur un même individu, à la fois les variables biométriques ainsi que des paramètres de la reproduction tel que le nombre d'ovocytes, par exemple.**

Les **relations taille-masse** sont établies uniquement sur des **spécimens complets** qui sont collectés à la main et manipulés avec une méticulosité particulière. Les relations taille - masse obtenues pour les différentes variables biométriques (nombre de segments, longueurs de la mâchoire, du corps et des trois premiers segments) sont relativement similaires. La mâchoire est la seule partie dure de *N. diversicolor*. La longueur de celle-ci apparaît donc comme la plus fiable. Cependant, il est nécessaire de disséquer cette dernière en vue d'un examen microscopique. En cela la procédure est assez longue et méticuleuse. Aussi, la mâchoire ne peut être retenue comme la variable biométrique de prédilection d'un point de vue opérationnel. Par opposition, la longueur totale et la longueur L3 sont faciles à mettre en œuvre. Par contre, compte tenu de l'élasticité du corps des animaux, il est probable que la mesure de la longueur totale soit influencée par l'expérimentateur. Ainsi, **la L3 apparaît comme la variable d'allongement la plus adéquate.**

De nombreuses **différences intersites** dans ces variables biométriques étudiées chez *N. diversicolor* sont observées. Pour les relations taille - masse, aucune différence intersite n'est observée chez les spécimens en phase de croissance segmentaire. Par contre les différences intersites de l'indicateur taille - masse s'affirment pour les spécimens en phase de croissance pondérale. **Autrement dit, l'indicateur taille versus masse révèle une condition pondérale dégradée des spécimens si ces derniers ont vécu suffisamment longtemps dans le milieu dont les conditions sont défavorables.**

Pour expliquer les différences intersites de la croissance et de la condition des animaux, deux hypothèses peuvent être avancées. La première est qu'à âge identique, les animaux observés en Seine présentent **une phase de croissance pondérale très limitée**. La seconde est que les animaux disparaissent précocement du milieu du fait d'une **reproduction à une masse plus faible**.

Le maintien de la tolérance chez les organismes de Seine pourrait induire **une réallocation des ressources au détriment de la croissance**. La tolérance est soutenue par un ensemble de mécanismes en lien avec la prise en charge, la détoxification, le stockage et l'élimination des contaminants. Ainsi, l'induction chronique et/ou le maintien de mécanismes de compensation (métabolisation, stockage et élimination des contaminants) modifie l'état de santé général des animaux de Seine. Cette modification pouvant concourir à une réallocation des ressources privilégiant la tolérance aux contaminants au dépens de la croissance pourrait expliquer la diminution de masse des spécimens de Seine.

Les individus ne se reproduisent qu'une fois par cycle de vie, la longévité est donc grandement dépendante de la reproduction. De nombreux contaminants sont susceptibles d'interférer avec le système endocrinien impliqué dans la physiologie de la reproduction. Or des effets des PE ont été observés en Seine (Minier, 2000b). Les effets des PE sur les mollusques bivalves sont bien connus et généralement un délai dans la maturité sexuelle est observé (Gauthier-Clerc et al., 2002 ; Siah et al., 2003). Cependant, les effets des PE sur les annélides polychètes sont peu connus (Mouneyrac et al., 2006). Ainsi, le **déclenchement de la reproduction des individus de Seine au cours d'une phase précoce de la croissance pondérale** en comparaison à ceux de l'Authie pourrait expliquer cette absence de spécimens de masse élevée.



## V Chapitre V : Réserves énergétiques chez *N. diversicolor*

Les organismes biologiques ont à disposition un budget énergétique alloué entre productions (croissance et reproduction), métabolisme de base et activités (**concept de l'allocation des ressources** : Barnes et al., 1988 ; Congdon et al., 2001 ; Newman, 2001). L'**énergie est mise en réserve** lorsque les conditions environnementales sont favorables (disponibilité alimentaire, absence de stress notamment) et peut être mobilisée pour les activités, la croissance et/ou la physiologie de la reproduction, pour faire face à des stress naturels et/ou chimiques générant un **coût de tolérance** (Holloway et al., 1990 ; Postma et al., 1995).

Ainsi, les molécules sources d'énergie et les modulateurs du métabolisme énergétique sont proposés comme biomarqueurs de l'état de santé général des organismes (cf. section I.7.2.). Les techniques de la mesure de paramètres en relation avec le métabolisme énergétique sont largement maîtrisées. Ce type de méthodologie est particulièrement utilisé chez des animaux aquatiques. La difficulté réside plutôt dans l'interprétation des résultats. **Une bonne connaissance du modèle biologique est nécessaire pour pouvoir correctement analyser les résultats.**

En ce qui concerne les invertébrés estuariens et plus particulièrement les annélides polychètes, ces animaux sont soumis à un grand nombre de fluctuations de facteurs écologiques tels que la **salinité**, la **température** ou bien encore le niveau en oxygénation du milieu (Pellerin-Massicotte et al., 1994 ; Scaps, 2002). Ces changements sont donc des sources naturelles de **stress** auxquels les organismes doivent faire face. De plus, plusieurs **facteurs endogènes aux organismes** peuvent influencer le métabolisme comme la **masse** et/ou l'âge, le niveau d'activités, la reproduction (Olive et al., 1985 ; Cammen, 1987). Ainsi, la composition biochimique des invertébrés varie grandement en raison de **cycles d'accumulation et de mobilisation des réserves énergétiques**. Afin d'être le plus à même d'interpréter des résultats, il est, par conséquent, nécessaire de connaître dans quelle mesure ces molécules (glycogène, lipides) peuvent répondre à des fluctuations naturelles du milieu ou bien encore en fonction de facteurs intrinsèques aux individus. Pour cela, les variations **intrapopulationnelles** et **temporelles** des concentrations en réserves énergétiques sont étudiées. Les effets de variations de **facteurs écologiques** comme la **température** et la **salinité** sur les niveaux en réserves énergétiques sont étudiés *in situ* et en laboratoire. Enfin

les **différences intersites** sont envisagées pour évaluer l'utilisation des réserves énergétiques en tant que **biomarqueurs de pollution**.

## V.1 Variations intrapopulationnelles et intersites

### V.1.1 Année 2002

Le Tableau 20 présente les masses, les concentrations en glycogène et lipides totaux des animaux d'Authie et de Seine collectés en 2002. Les concentrations en glycogène et lipides totaux des spécimens originaires du site de l'Authie sont significativement plus élevées que celles des organismes prélevés en Seine (ANOVA,  $p < 0,05$ ). Cependant, la masse des annélides collectés sur le site de l'Authie est significativement plus élevée que celle des spécimens de Seine et ce, quelle que soit la période de prélèvement (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

**Tableau 20 : Masse, concentrations en glycogène et lipides (moyenne  $\pm$  écart-type, N = 20) des spécimens collectés sur les sites d'Authie et de Seine au cours de l'année 2002.**

Périodes de prélèvement	Authie			Seine		
	Masse (mg)	Glycogène (mg.g <sup>-1</sup> )	Lipides (mg.g <sup>-1</sup> )	Masse (mg)	Glycogène (mg.g <sup>-1</sup> )	Lipides (mg.g <sup>-1</sup> )
Février	514 $\pm$ 138	8,7 $\pm$ 4,1	9,4 $\pm$ 2,5	98 $\pm$ 31	5,0 $\pm$ 1,9	5,5 $\pm$ 2,3
Avril	600 $\pm$ 168	16,5 $\pm$ 3,7	12,9 $\pm$ 3,6	113 $\pm$ 21	5,0 $\pm$ 1,4	4,0 $\pm$ 2,2
Juillet	539 $\pm$ 144	16,3 $\pm$ 5,1	10,7 $\pm$ 3,2	137 $\pm$ 31	9,5 $\pm$ 2,0	6,5 $\pm$ 2,7
Septembre	412 $\pm$ 75	12,6 $\pm$ 3,1	7,3 $\pm$ 1,3	130 $\pm$ 25	4,5 $\pm$ 1,2	4,1 $\pm$ 1,2

**Au cours de cette première année de suivi, les organismes sont collectés sans sélection en fonction de la masse afin que chaque échantillon soit représentatif de la population globale de l'estuaire d'origine.** Les différences observées résultent-elles d'un effet direct du site sur le métabolisme énergétique des individus ou d'un effet indirect, le taux des réserves dépendant de la masse des individus ? Pour répondre à cette question, l'échantillonnage est modifié pour les prélèvements postérieurs (suivi 2003 - 2004).

### V.1.2 Années 2003 et 2004

Au cours du suivi 2003 - 2004, des spécimens de « masse faible » ( $121 \pm 47$  mg) et comparativement de « masse élevée » ( $420 \pm 126$  mg) sont collectés sur l'Authie alors que sur la Seine seulement des spécimens de « masse faible » étaient présents ( $160 \pm 76$  mg). Les concentrations en glycogène et lipides totaux des animaux de « masse faible » ou de « masse élevée » de l'Authie et de Seine sont illustrées dans la Figure 21. Les résultats des tests de comparaison de moyennes sont présentés dans le Tableau 21. Les **concentrations en glycogène** (Figure 21A) des animaux de « masse élevée » MEA sont significativement supérieures à celles des spécimens de « masse faible » MFA excepté en deux occasions pour lesquelles elles sont égales (Tableau 21 : février et mai 2003). En ce qui concerne les **concentrations en lipides** (Figure 21B), elles sont significativement plus élevées chez les spécimens de « masse élevée MEA » de l'Authie par comparaison avec ceux de « masse faible MFA » à cinq périodes de prélèvement (Tableau 21 : mai 2003, février, mai, août et novembre 2004) et sont semblables en février, août et novembre 2003.

En ce qui concerne les différences **intersites** (Tableau 21 : spécimens de « masse faible » de l'Authie MFA versus spécimens de Seine S), les concentrations en **glycogène** sont équivalentes en février, novembre 2003, août, novembre 2004. Elles sont significativement supérieures chez les animaux de Seine en mai 2003 et 2004 et chez les spécimens de « masse faible » de l'Authie en août 2003 et février 2004. Des concentrations en **lipides** équivalentes chez les vers de masses comparables d'Authie et de Seine sont observées en cinq occasions (février, novembre 2003, février, août et novembre 2004). En mai 2003 et mai 2004 les vers de Seine ont des concentrations significativement supérieures en comparaison à ceux de l'Authie alors que la situation inverse est observée en août 2003.

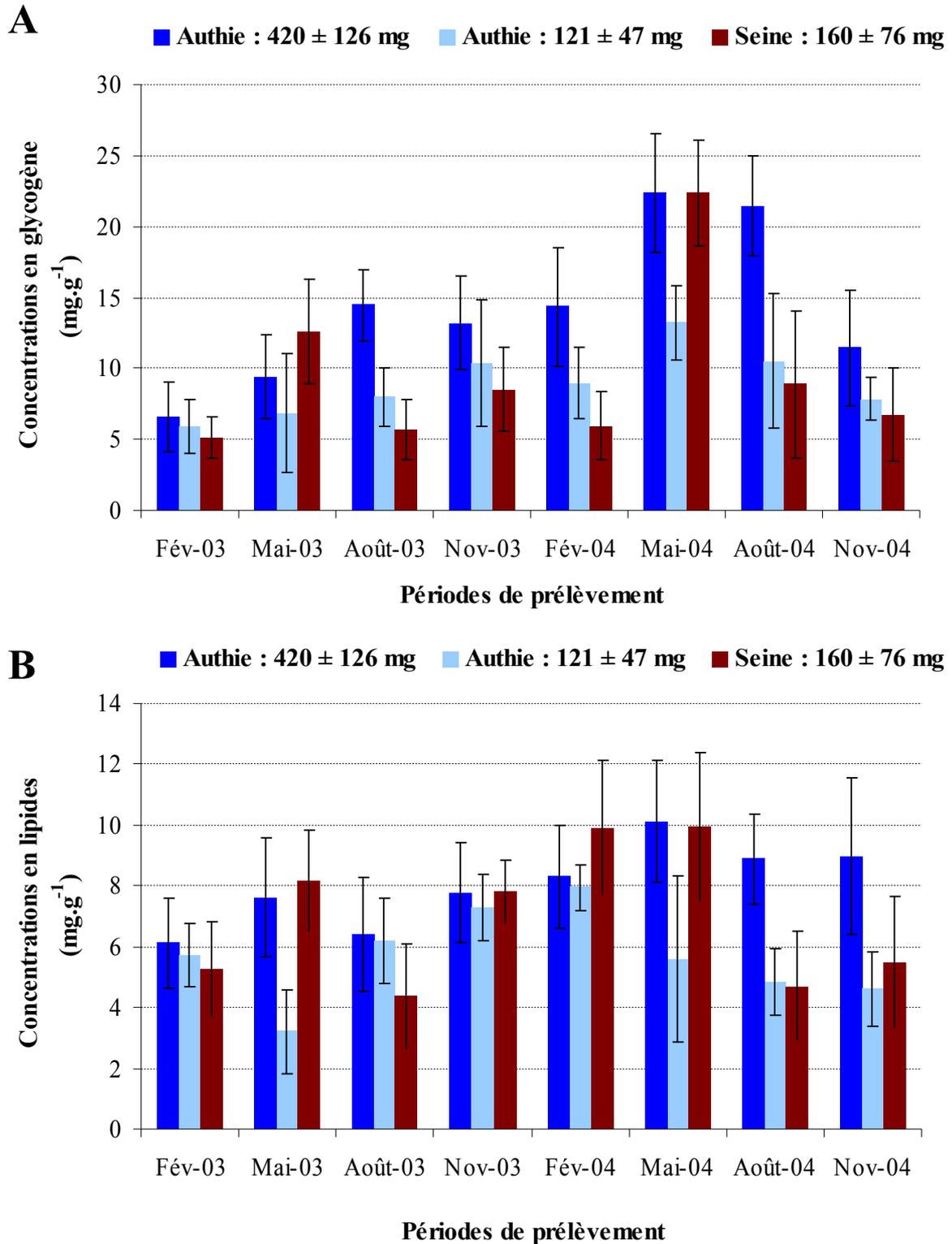


Figure 21: Concentrations (moyenne ± écart-type, N = 12) en glycogène (A) et lipides (B) (mg.g<sup>-1</sup>) des spécimens MEA d'Authie (121 ± 47 mg) et Se de Seine (160 ± 76 mg) ou de MFA d'Authie (420 ± 126 mg).

**Tableau 21 : Comparaison des concentrations moyennes en glycogène et lipides (illustrées dans la Figure 20) des animaux en fonction du site d'origine (MFA : Authie -  $121 \pm 47$  mg ; Se : Seine -  $160 \pm 76$  mg) et de la masse des spécimens (MEA : Authie -  $420 \pm 126$  mg) (ANOVA, test de Tukey, seuil de risque 5%).**

<b>Périodes de prélèvement</b>	<b>Analyse</b>	<b>Glycogène</b>	<b>Lipides</b>
Février 2003	<b>ANOVA</b>	0,215	0,312
	<b>Site</b>	MFA = S	MFA = S
	<b>Masse</b>	MFA = MEA	MFA = MEA
Mai 2003	<b>ANOVA</b>	0,0021	0,0001
	<b>Site</b>	MFA < S	MFA < S
	<b>Masse</b>	MFA = MEA	MFA < MEA
Août 2003	<b>ANOVA</b>	0,0001	0,010
	<b>Site</b>	MFA > S	MFA > S
	<b>Masse</b>	MFA < MEA	MFA = MEA
Novembre 2003	<b>ANOVA</b>	0,012	0,532
	<b>Site</b>	MFA = S	MFA = S
	<b>Masse</b>	MFA < MEA	MFA = MEA
Février 2004	<b>ANOVA</b>	0,0001	0,020
	<b>Site</b>	MFA > S	MFA = S
	<b>Masse</b>	MFA < MEA	MFA < MEA
Mai 2004	<b>ANOVA</b>	0,0001	0,0001
	<b>Site</b>	MFA < S	MFA < S
	<b>Masse</b>	MFA < MEA	MFA < MEA
Août 2004	<b>ANOVA</b>	0,0001	0,0001
	<b>Site</b>	MFA = S	MFA = S
	<b>Masse</b>	MFA < MEA	MFA < MEA
Novembre 2004	<b>ANOVA</b>	0,0022	0,0001
	<b>Site</b>	MFA = S	MFA = S
	<b>Masse</b>	MFA < MEA	MFA < MEA

Par rapport à la question posée à l'issue des analyses des prélèvements de 2002, la Figure 22 illustre les concentrations en glycogène et lipides en fonction des classes de masse

des animaux collectés sur les sites d'Authie et de Seine respectivement et ce sur l'ensemble des périodes de prélèvement au cours des années 2003 et 2004. Les résultats des tests de comparaison des concentrations moyennes en réserves énergétiques des différentes classes de masse sont présentés dans les Tableaux 22 et 23 respectivement pour l'Authie et la Seine.

Dans le cas de l'**Authie** (Figure 22A), la classe de masse à laquelle appartiennent les échantillons influence significativement les niveaux en glycogène et lipides (ANOVA,  $p < 0,0001$ ). Les **concentrations en glycogène** sont significativement plus élevées pour les animaux de masse comprise entre 400 et 700 mg ( $16,0 - 17,0 \text{ mg.g}^{-1}$ ) en comparaison aux animaux de masse inférieure à 400 mg ( $8,9 - 11,5 \text{ mg.g}^{-1}$ ) (Test de Tukey, seuil de risque 5 %). En ce qui concerne les **concentrations en lipides**, elles sont significativement supérieures chez les vers de masse comprise entre 400 et 700 mg par comparaison aux vers de masse inférieure à 300 mg.

Dans le cas de la **Seine** (Figure 22B), des observations similaires sont notées (ANOVA, respectivement  $p < 0,0001$  et  $p = 0,011$ ). Les **concentrations en glycogène** des animaux de masse supérieure à 200 mg sont significativement plus élevées que celles des animaux de masse inférieure à 200 mg ; les concentrations étant significativement maximales pour la classe de masse 300 - 400 mg.

Les **concentrations en lipides** sont significativement supérieures ( $9,8 \pm 2,7 \text{ mg.g}^{-1}$ ) chez les vers de classe de masse comprise entre 300 et 400 mg par comparaison aux organismes dont la masse est inférieure à 300 mg ( $4,8$  à  $7,8 \text{ mg.g}^{-1}$  en moyenne).

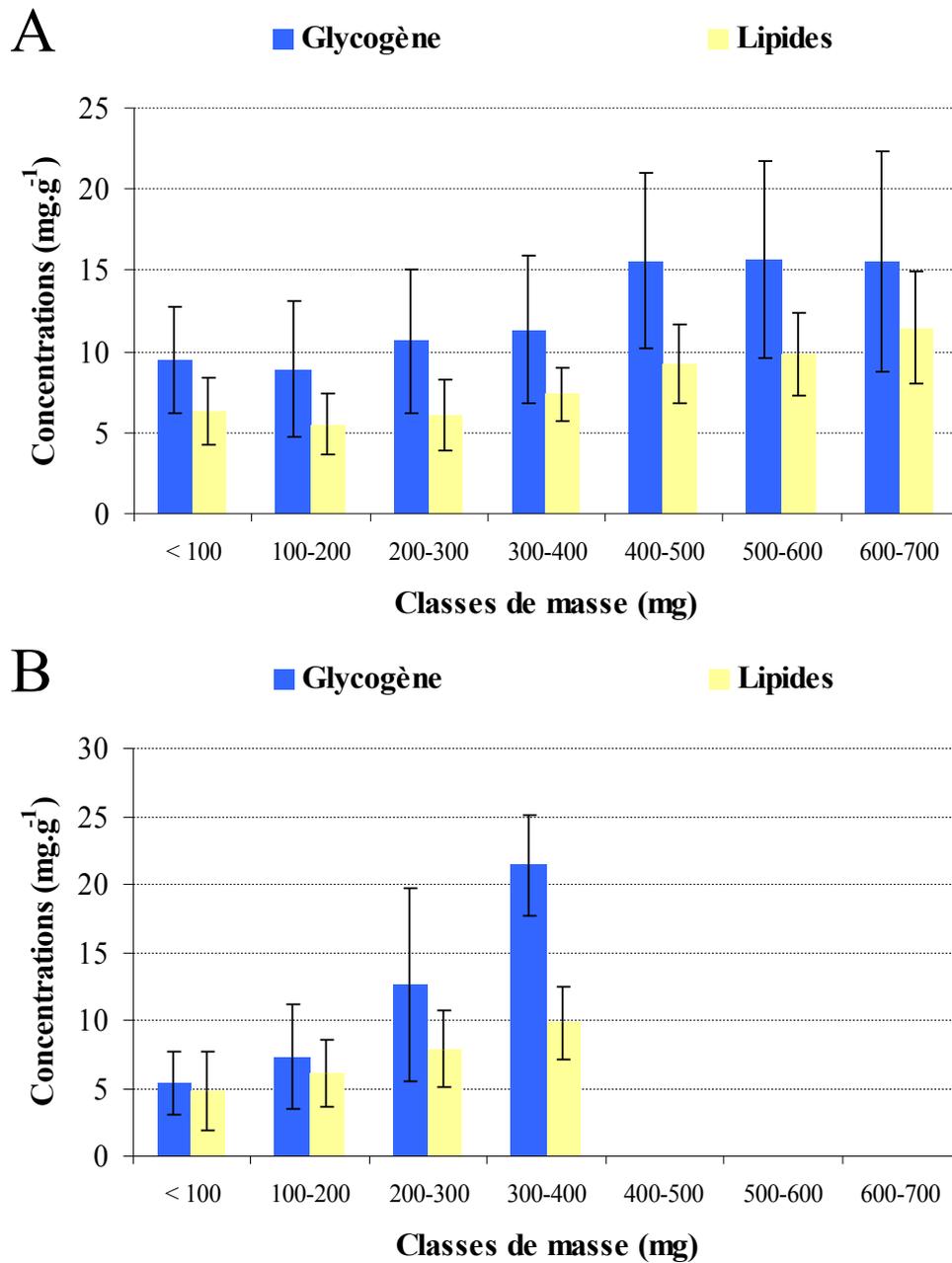


Figure 22: Variations des concentrations (moyenne  $\pm$  écart-type) en glycogène et lipides ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) en fonction de la classe de masse des spécimens d'Authie (A) ou de Seine (B).

Tableau 22: Comparaison (Test de Tukey, seuil de risque 5 %) des concentrations moyennes en glycogène et lipides (illustrées dans la Figure 22A) des animaux d'Authie en fonction de la classe de masse. Les moyennes significativement différentes sont désignées par des lettres différentes.

	Classes de masse (mg)						
	< 100	100 - 200	200 - 300	300 - 400	400 - 500	500 - 600	600 - 700
Glycogène	A	A	A	A	B	B	B
Lipides	A, B, C	A	A, B	B, C, D	D	D	D

**Tableau 23: Comparaison des concentrations moyennes en glycogène et lipides (illustrées dans la Figure 22B) des animaux de Seine en fonction de la classe de masse. Les moyennes significativement différentes sont désignées par des lettres différentes.**

	Classes de masse (mg)			
	< 100	100 - 200	200 - 300	300 - 400
Glycogène	A	A	B	C
Lipides	A	A	A, B	B

## V.2 Variations temporelles

Les profils temporels des concentrations en glycogène, lipides et des proportions relatives de chacun des constituants de réserves sont illustrés dans les Figures 23 à 31 pour chacun des lots MEA, MFA de l'Authie et Se de la Seine.

### 1.1.1.25 Spécimens MEA de l'Authie

Les variations temporelles des concentrations en glycogène et lipides totaux des spécimens MEA d'Authie au cours du suivi de février 2002 à novembre 2004 sont illustrées dans les Figures 23 et 24 respectivement. Des **variations significatives** (ANOVA,  $p < 0,000$ ) des **concentrations en glycogène et en lipides totaux** en fonction de la période de prélèvement (année, saison) sont mises en évidence.

Les concentrations moyennes **annuelles** en **glycogène** sont significativement différentes (Test de Tukey, seuil de risque 5 %). Elles sont minimales en 2003 ( $10,9 \pm 4,2$  mg.g<sup>-1</sup>, N = 48), maximales en 2004 ( $17,4 \pm 6,1$  mg.g<sup>-1</sup>, N = 48) et intermédiaires en 2003 ( $13,5 \pm 5,1$  mg.g<sup>-1</sup>, N = 80). En regard de la **saison**, les concentrations en **glycogène** sont maximales au printemps et en été (respectivement :  $16,2 \pm 6,0$  mg.g<sup>-1</sup>, N = 44 ;  $17,2 \pm 4,9$  mg.g<sup>-1</sup>, N = 44), minimales en hiver ( $9,7 \pm 4,8$  mg.g<sup>-1</sup>, N = 44) et intermédiaires en automne ( $12,4 \pm 3,4$  mg.g<sup>-1</sup>, N = 44).

Les concentrations moyennes **annuelles** en **lipides totaux** sont significativement plus élevées en 2002 et 2004 (respectivement  $10,2 \pm 3,4$  mg.g<sup>-1</sup>, N = 80 et  $9,1 \pm 2,0$  mg.g<sup>-1</sup>, N = 48) qu'en 2003 ( $7,0 \pm 1,8$  mg.g<sup>-1</sup>, N = 48) (Test de Tukey, seuil de risque 5 %). Pour les **variations saisonnières**, les concentrations en **lipides totaux** sont plus élevées au printemps ( $10,7 \pm 3,4$  mg.g<sup>-1</sup>, N = 44) qu'en hiver, été et automne (respectivement :  $8,2 \pm 2,4$  mg.g<sup>-1</sup>, N = 44 ;  $9,1 \pm 3,1$  mg.g<sup>-1</sup>, N = 44 ;  $7,9 \pm 1,9$  mg.g<sup>-1</sup>, N = 44).

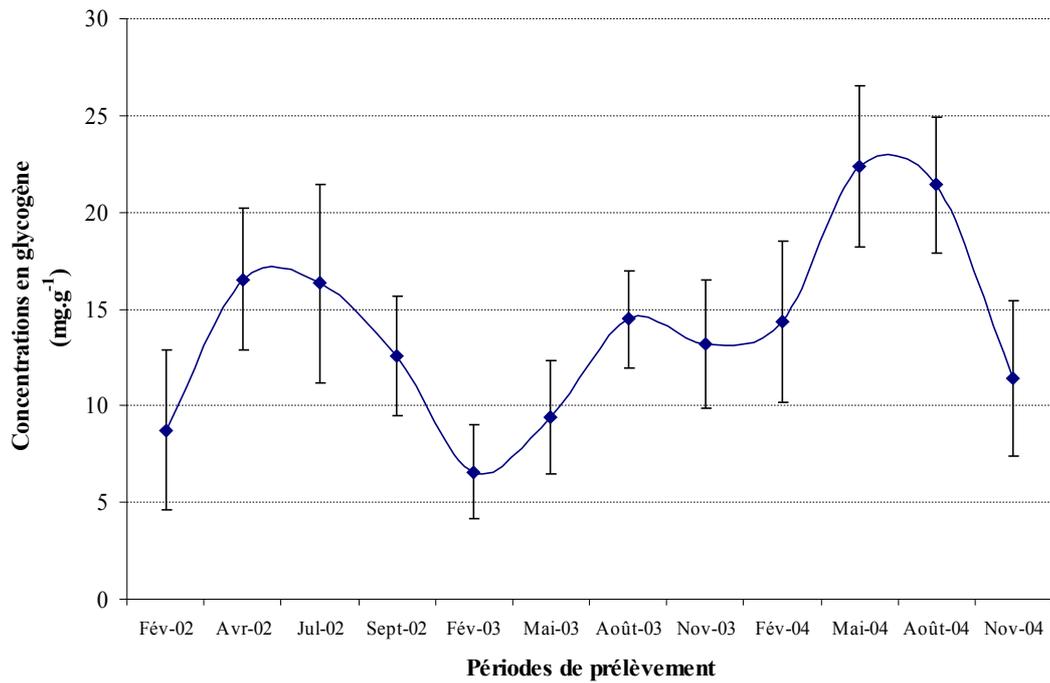


Figure 23: Variations temporelles des concentrations (moyenne  $\pm$  écart-type) en glycogène (mg.g<sup>-1</sup>) des spécimens MEA d'Authie.

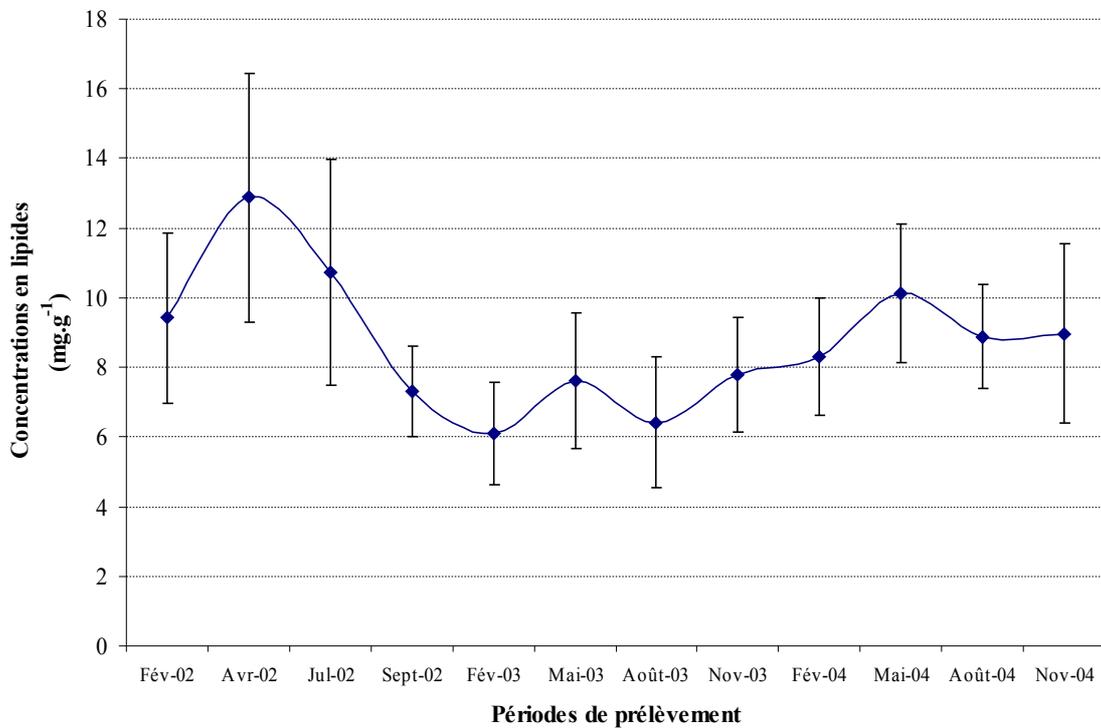


Figure 24: Variations temporelles des concentrations (moyenne  $\pm$  écart-type) en lipides totaux (mg.g<sup>-1</sup>) des spécimens MEA d'Authie.

Les proportions relatives de chacun des constituants de réserves sont illustrées dans la Figure 25. Sur l'ensemble des périodes de prélèvement, la proportion relative moyenne en glycogène est de  $60,1 \pm 7,5 \%$ , celle en lipides de  $39,9 \pm 7,5 \%$ . La proportion relative de chacun des constituants de réserves varie significativement en fonction des périodes de prélèvement (ANOVA,  $p = 0,000$ ).

La proportion **relative annuelle en glycogène** est plus élevée en 2004 ( $64,4 \pm 6,8 \%$ ,  $N = 48$ ) qu'en 2002 et 2003 (respectivement :  $56,5 \pm 6,7 \%$ ,  $N = 80$  ;  $59,4 \pm 8,4 \%$ ,  $N = 48$ ). Inversement, la proportion relative annuelle en lipides est plus élevée en 2002 et 2003 (respectivement :  $43,5 \pm 6,7 \%$ ,  $N = 80$  ;  $40,6 \pm 8,4 \%$ ,  $N = 48$ ) qu'en 2004 ( $35,6 \pm 6,8 \%$ ,  $N = 48$ ). En hiver, la proportion relative en glycogène est significativement diminuée ( $53,5 \pm 8,1 \%$ ,  $N = 44$ ) par rapport aux autres saisons de prélèvement (printemps :  $60,0 \pm 7,7 \%$ ,  $N = 44$  ; été :  $66,6 \pm 6,1 \%$ ,  $N = 44$ ; automne :  $60,3 \pm 4,0 \%$ ,  $N = 44$ ). La proportion relative en lipides totaux est par contre maximale en hiver (Figure 25).

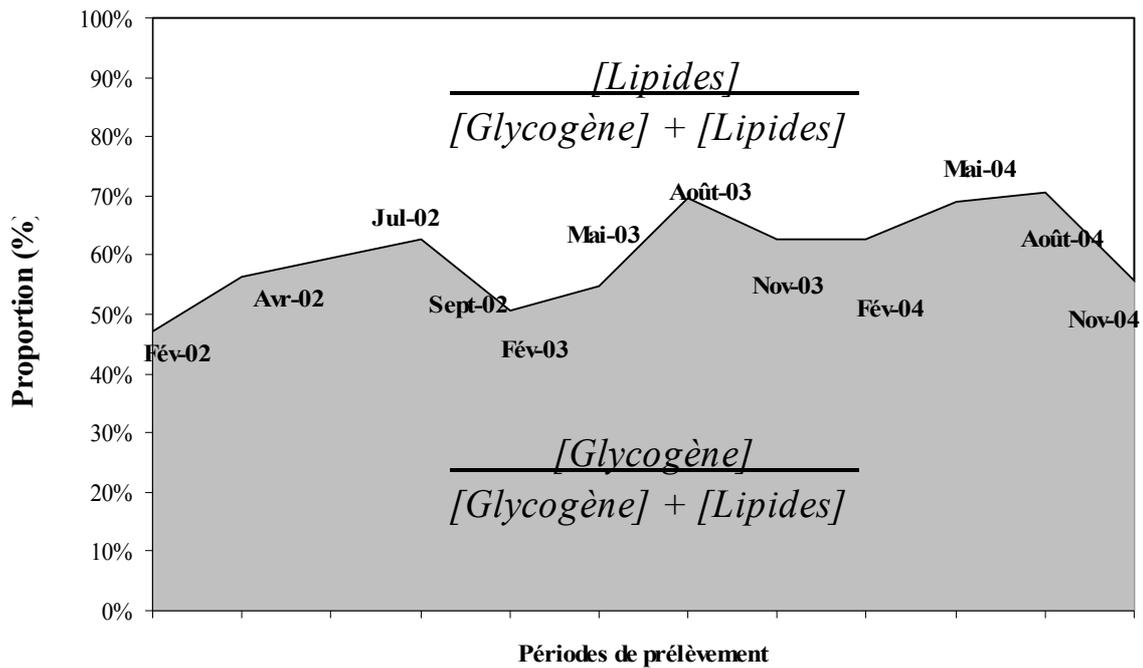


Figure 25: Variations temporelles des proportions relatives des constituants de réserves énergétiques des spécimens MEA d'Authie.

1.1.1.26 Spécimens MFA de l'Authie

Les variations temporelles des concentrations en glycogène et lipides totaux des spécimens MFA d'Authie au cours du suivi de février 2003 à novembre 2004 sont illustrées dans les Figures 26 et 27 respectivement.

Les concentrations moyennes annuelles en glycogène sont plus élevées en 2004 ( $10,1 \pm 3,6 \text{ mg.g}^{-1}$ ,  $N = 48$ ) qu'en 2003 ( $7,8 \pm 3,7 \text{ mg.g}^{-1}$ ,  $N = 48$ ). La saison de prélèvement n'influence pas de manière significative (ANOVA,  $p = 0,111$ ) les concentrations en glycogène des animaux de masse faible de l'Authie.

Les concentrations moyennes annuelles en lipides totaux ne diffèrent pas entre 2003 ( $5,6 \pm 1,9 \text{ mg.g}^{-1}$ ,  $N = 48$ ) et 2004 ( $5,7 \pm 2,1 \text{ mg.g}^{-1}$ ,  $N = 48$ ) et sont relativement faibles. En regard des variations saisonnières, les concentrations en lipides totaux sont plus faibles en période printanière ( $4,4 \pm 2,4 \text{ mg.g}^{-1}$ ,  $N = 24$ ) qu'en période automnale et hivernale (respectivement :  $6,0 \pm 1,8 \text{ mg.g}^{-1}$ ,  $N = 24$  ;  $6,8 \pm 1,8 \text{ mg.g}^{-1}$ ,  $N = 24$ ).

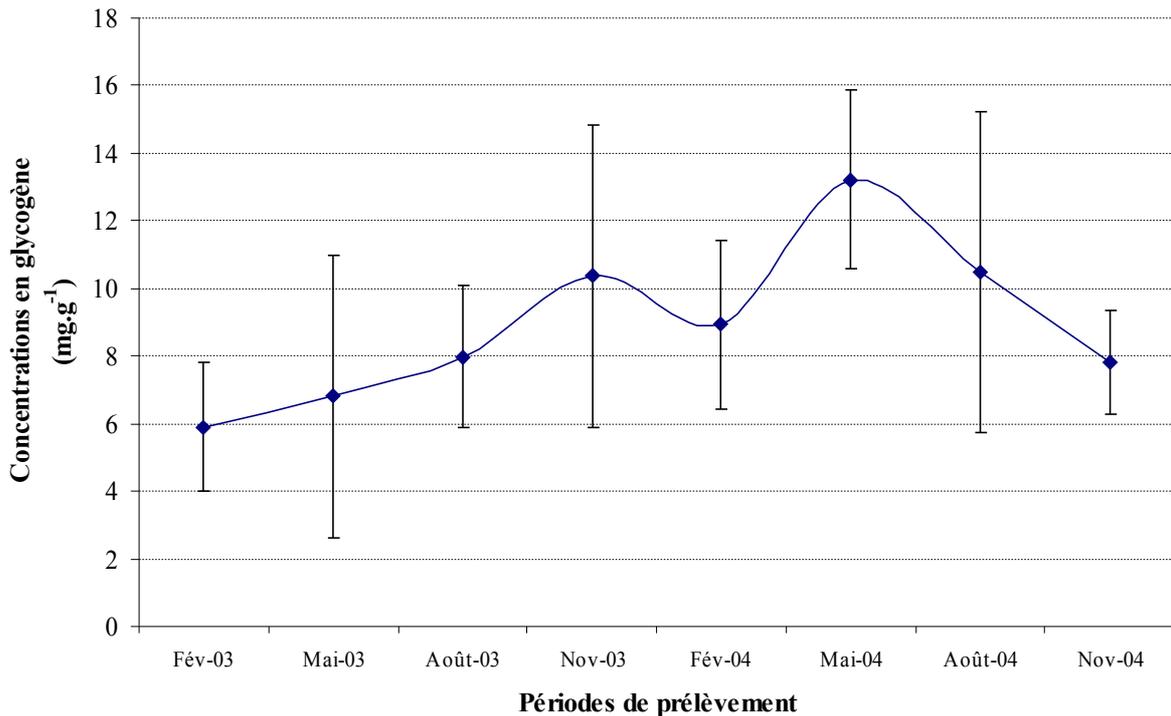
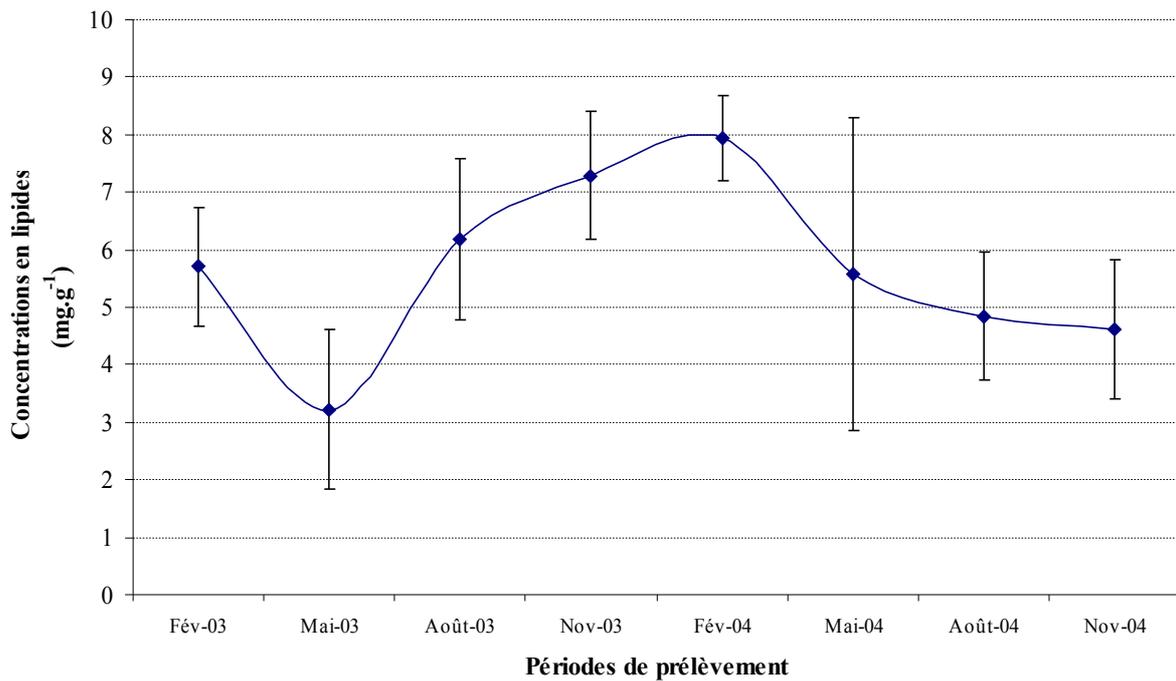


Figure 26 : Variations temporelles des concentrations (moyenne  $\pm$  écart-type) en glycogène ( $\text{mg.g}^{-1}$ ) des spécimens MFA d'Authie.



**Figure 27: Variations temporelles des concentrations (moyenne ± écart-type) en lipides totaux (mg.g<sup>-1</sup>) des spécimens MFA d'Authie.**

Les proportions relatives de chacun des constituants de réserves sont illustrées dans la Figure 28. La proportion relative moyenne en glycogène est de  $60,4 \pm 7,7$  % et celle des lipides de  $39,6 \pm 7,7$  %. La proportion relative de chacun des constituants de réserves varie significativement en fonction périodes de prélèvement (ANOVA,  $p = 0,000$ ).

La proportion relative en glycogène est significativement plus élevée en 2004 ( $63,3 \pm 8,3$  %,  $N = 48$ ) qu'en 2003 ( $57,5 \pm 6,8$  %,  $N = 48$ ). Inversement la proportion relative en lipides est plus élevée en 2003 ( $42,5 \pm 6,8$  %,  $N = 48$ ) qu'en 2004 ( $36,7 \pm 8,3$  %,  $N = 48$ ). La proportion relative en glycogène est plus élevée au printemps ( $69,0 \pm 3,4$  %,  $N = 24$ ) qu'aux autres saisons de prélèvement (hiver :  $51,1 \pm 1,3$  %,  $N = 24$  ; été :  $61,4 \pm 7,6$  %,  $N = 24$  ; automne :  $59,9 \pm 4,2$  %,  $N = 24$ ).

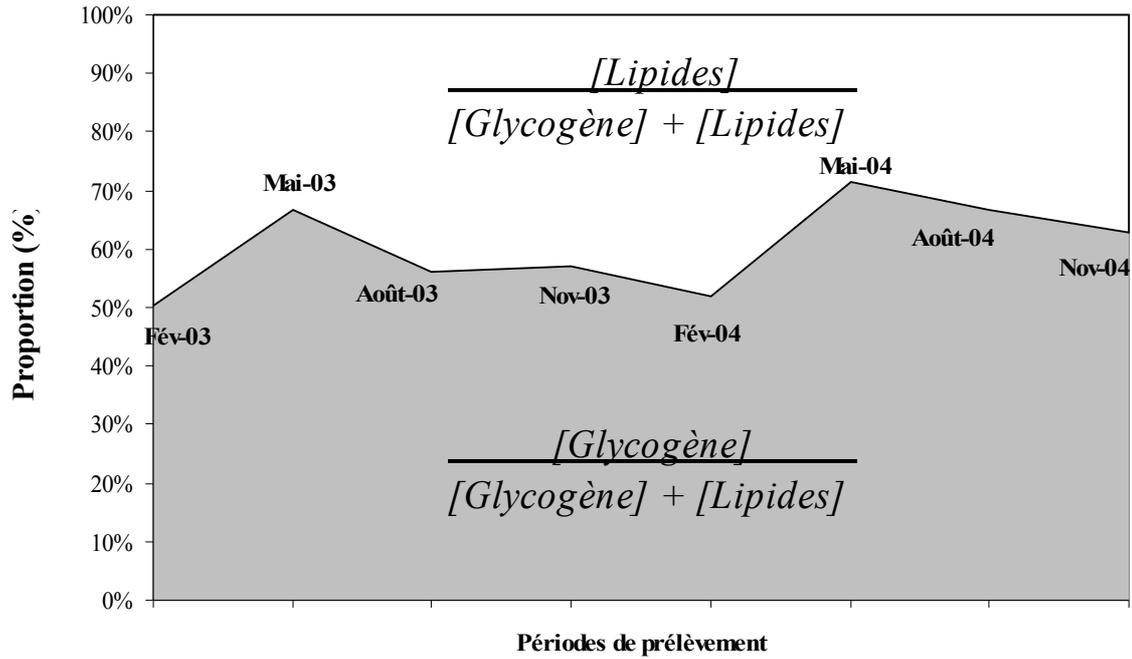


Figure 28: Variations temporelles des proportions relatives des constituants de réserves énergétiques des spécimens MFA d'Authie.

#### 1.1.1.27 Spécimens Se de la Seine

Les variations temporelles des concentrations en glycogène et lipides totaux des spécimens Se de la Seine au cours du suivi de février 2002 à novembre 2004 sont illustrées dans les Figures 29 et 30 respectivement. Des **variations significatives** (ANOVA,  $p < 0,000$ ) des **concentrations en glycogène et en lipides totaux** en fonction de la période de prélèvement (année, saison) sont mises en évidence.

Les concentrations moyennes **annuelles** en **glycogène** sont significativement (Test de Tukey, seuil de risque 5 %) plus élevées 2004 ( $11,0 \pm 7,7 \text{ mg.g}^{-1}$ ,  $N = 48$ ) qu'en 2002 ( $6,0 \pm 2,6 \text{ mg.g}^{-1}$ ,  $N = 78$ ) ou qu'en 2003 ( $8,0 \pm 3,9 \text{ mg.g}^{-1}$ ,  $N = 48$ ). En regard des variations **saisonniers**, les concentrations en **glycogène** sont maximales au printemps ( $11,8 \pm 7,8 \text{ mg.g}^{-1}$ ,  $N = 44$ ) et minimales en hiver ( $5,3 \pm 1,9 \text{ mg.g}^{-1}$ ,  $N = 44$ ) (Test de Tukey, seuil de risque 5 %).

Les concentrations en lipides totaux des animaux sont plus élevées en 2003 ( $6,4 \pm 2,2 \text{ mg.g}^{-1}$ ,  $N = 48$ ) et 2004 ( $7,5 \pm 3,2 \text{ mg.g}^{-1}$ ,  $N = 48$ ) qu'en 2002 ( $5,0 \pm 2,4 \text{ mg.g}^{-1}$ ,  $N = 78$ ). Par contre, les concentrations moyennes en lipides ne diffèrent pas en regard de la saison (Test de Tukey,  $p = 0,113$ ).

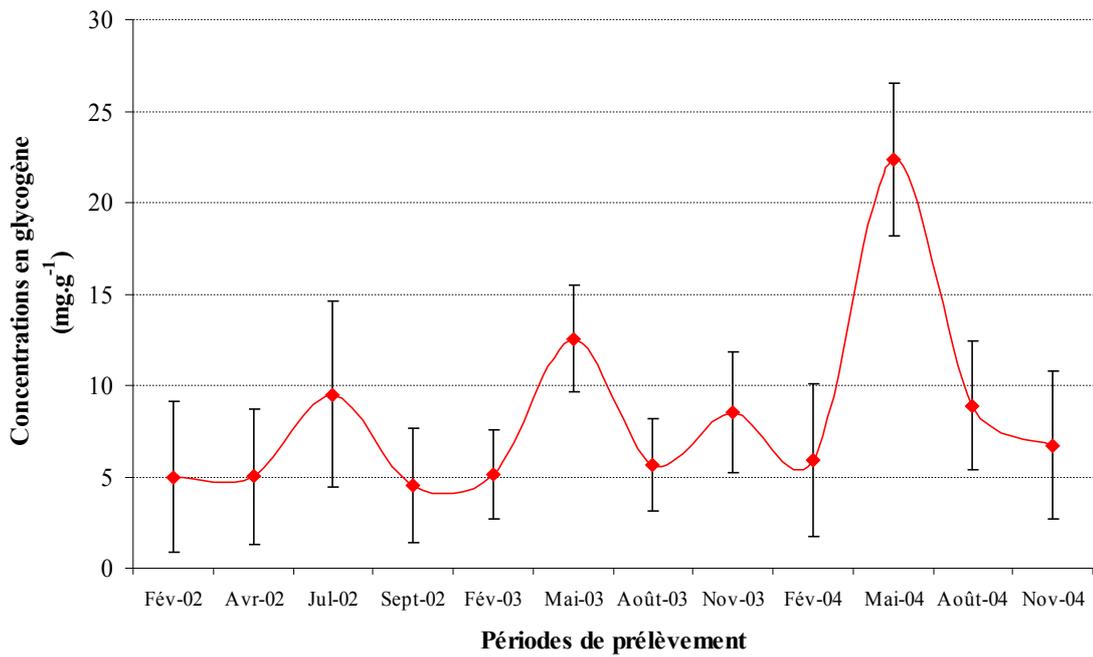


Figure 29: Variations temporelles des concentrations (moyenne  $\pm$  écart-type) en glycogène (mg.g<sup>-1</sup>) des spécimens Se de Seine.

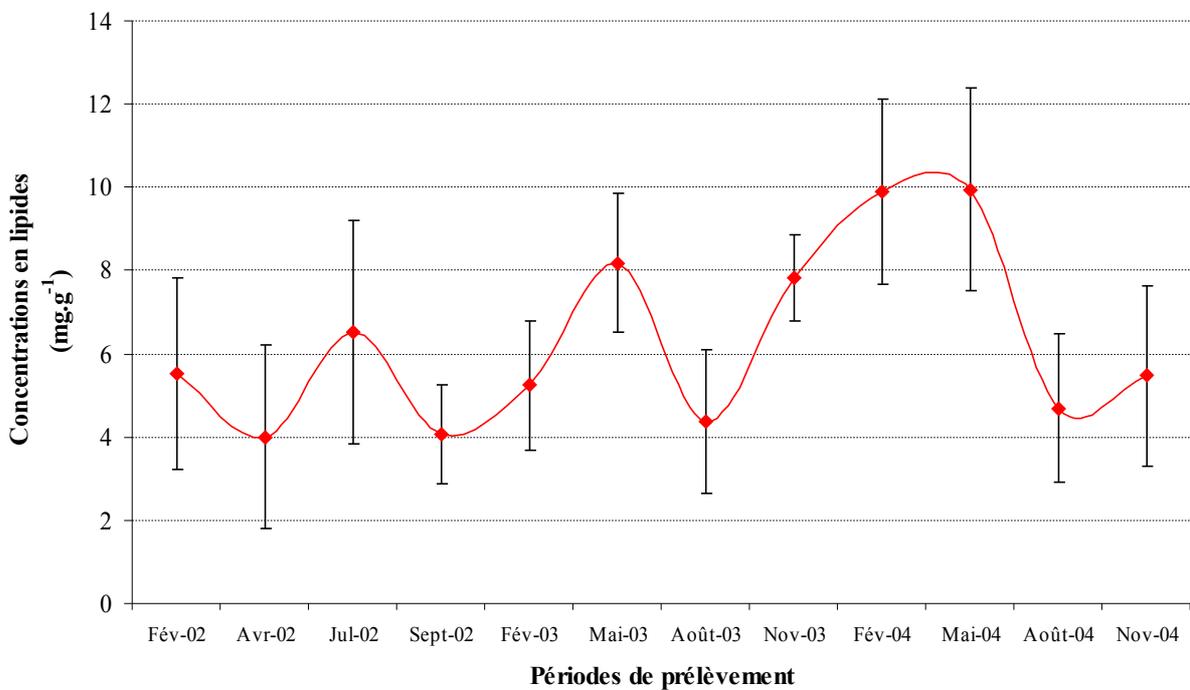


Figure 30: Variations temporelles des concentrations (moyenne  $\pm$  écart-type) en lipides totaux (mg.g<sup>-1</sup>) des spécimens Se de Seine.

La proportion relative de chacun des constituants de réserves est présentée dans la Figure 31. La proportion moyenne du glycogène dans les réserves énergétiques est de  $54,9 \pm 8,4$  % et celle des lipides de  $45,1 \pm 8,4$  %. L'année de prélèvement n'a pas d'influence significative (ANOVA,  $p = 0,780$ ) sur les proportions relatives en glycogène ou en lipides totaux. La **saison** de prélèvement influence significativement ces proportions (ANOVA,  $p < 0,0001$ ). La **proportion relative en glycogène est significativement plus élevée au printemps et en été** ( $62,2 \pm 6,3$  %,  $N = 44$  et  $60,1 \pm 3,9$  %,  $N = 44$ ) qu'aux périodes hivernales ( $44,9 \pm 6,9$  %,  $N = 44$ ) et automnales ( $52,5 \pm 1,5$  %,  $N = 44$ ). La proportion des **lipides** est maximale en **hiver** ( $55,1 \pm 6,9$  %,  $N = 44$ ).

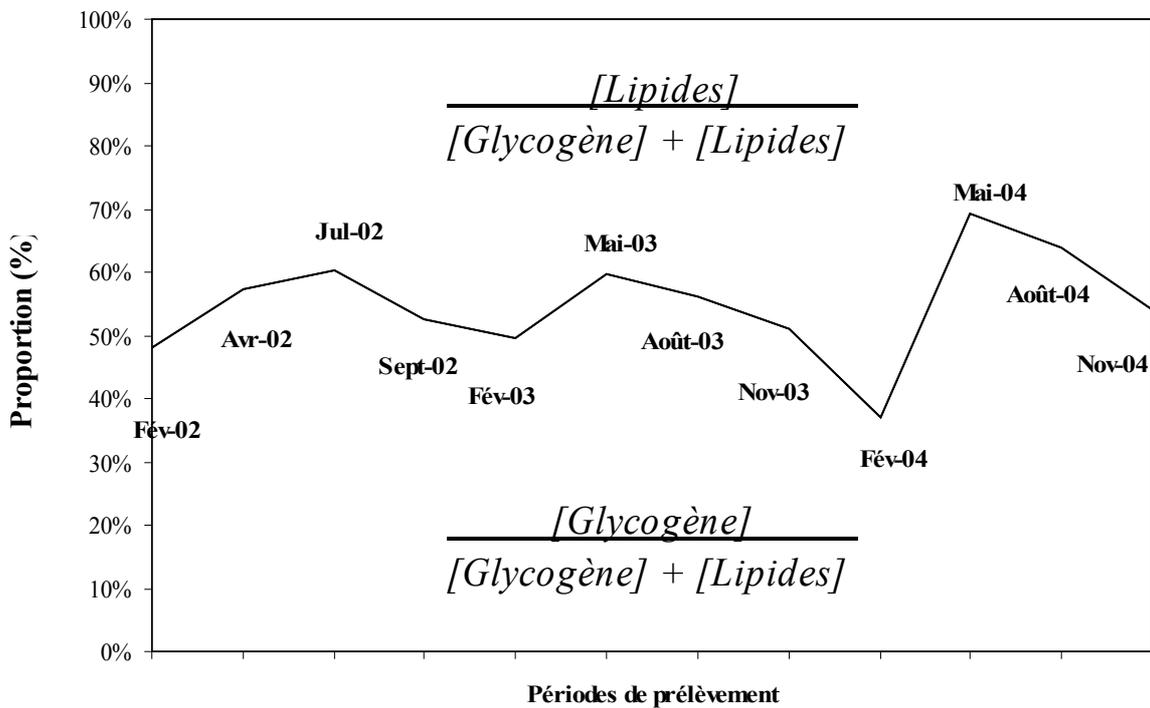


Figure 31: Variations temporelles des proportions relatives des constituants de réserves énergétiques des spécimens Se de Seine.

### V.3 Effets de variations de salinité et de température

#### V.3.1 Effets de variations de salinité

Les résultats de l'étude *in situ* des variations chroniques de salinité sur les niveaux en réserves énergétiques des animaux sont présentés dans le Tableau 24. Aucune différence significative des concentrations en réserves énergétiques (glycogène ou lipides totaux) n'est mise en évidence entre les trois stations de salinité différente prospectées (ANOVA, respectivement  $p = 0,141$  et  $p = 0,419$ ).

**Tableau 24 : Étude *in situ* des effets de variations de la salinité sur les concentrations (moyenne  $\pm$  écart-type) en réserves énergétiques (glycogène et lipides) des animaux (N = 12) collectés en septembre 2002 sur trois stations de l'estuaire de l'Authie (Authie Port, Authie Nord, Authie Sud).**

Stations	Authie Port	Authie Nord	Authie Sud
Salinité	18,9	29,5	33,0
Concentration en glycogène (mg.g <sup>-1</sup> )	12,4 $\pm$ 3,3	12,6 $\pm$ 2,5	13,9 $\pm$ 3,9
Concentration en lipides (mg.g <sup>-1</sup> )	7,9 $\pm$ 2,0	7,3 $\pm$ 1,9	8,0 $\pm$ 1,6

En laboratoire, les concentrations en glycogène et lipides totaux des animaux de l'Authie (salinité moyenne annuelle :  $25,3 \pm 3,0$ ) **maintenus en laboratoire à deux salinités différentes (15 ou 25)** pendant **21 jours** sont respectivement illustrées dans les Figures 32 et 33. L'exposition à une salinité plus faible que celle habituellement rencontrée dans le milieu n'a pas d'influence sur les concentrations en réserves énergétiques (ANOVA : glycogène :  $p = 0,565$  ; lipides totaux :  $p = 0,822$ ) et ce quelle que soit la durée de maintien des animaux en laboratoire (ANOVA : glycogène :  $p = 0,729$  ; lipides totaux :  $p = 0,413$ ).

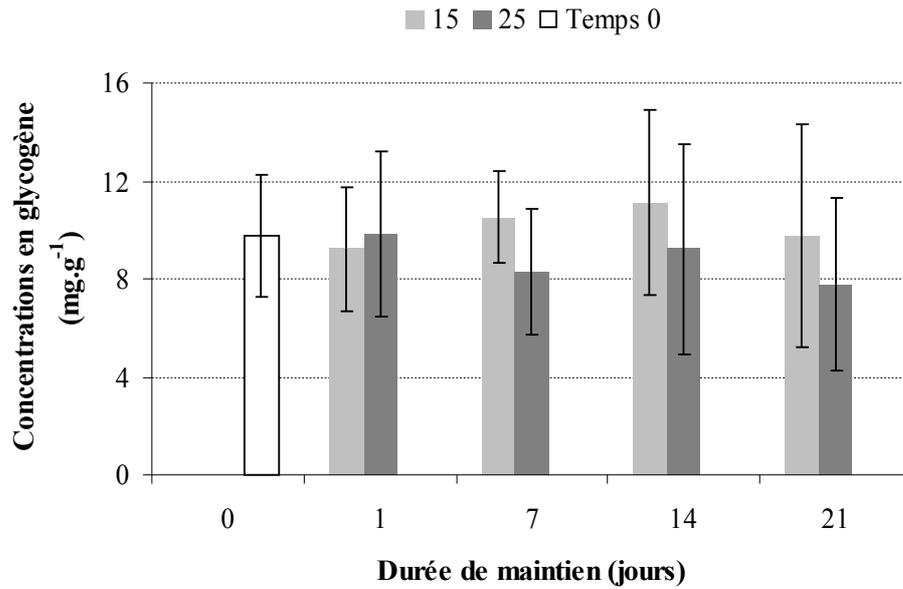


Figure 32: Étude en laboratoire des effets de variations de la salinité et de la durée de maintien sur les concentrations (mg.g<sup>-1</sup>) en glycogène (moyenne ± écart-type, N = 12).

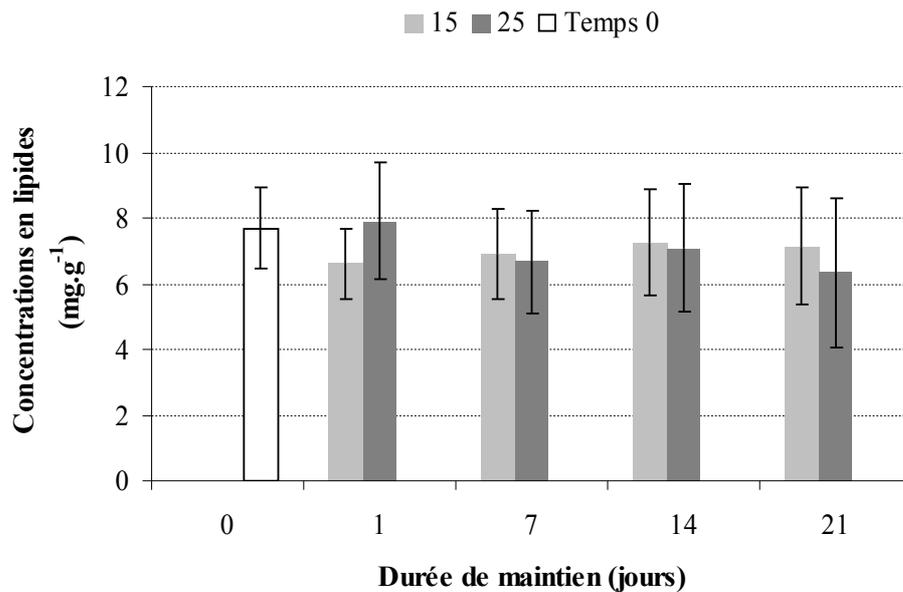


Figure 33: Étude en laboratoire des effets de variations de la salinité et de la durée de maintien sur les concentrations (mg.g<sup>-1</sup>) en lipides (moyenne ± écart-type, N = 12).

En conclusion, que les animaux soient soumis chroniquement à des dessalures comme les spécimens de la station « Authie port » ou exposés en laboratoire à des salinités plus faibles que celles expérimentées dans leur milieu naturel, aucun effet significatif des variations de salinité sur les niveaux en réserves énergétiques n'est observé.

### V.3.2 Effets de variations de température

Les effets respectifs du transfert des animaux vers une température faible ou vers une température élevée sont présentés dans les Tableaux 25, 26 et 27 et la Figure 34.

*Transfert d'une température élevée à une température plus faible (Tableaux 25 et 26)*

La **température de maintien** n'a aucun effet significatif sur les concentrations en **glycogène** et en **lipides totaux des animaux** (ANOVA, respectivement  $p = 0,136$  et  $p = 0,429$ ). La **durée de maintien** a une influence significative ( $p < 0,0001$ ) sur les **concentrations en lipides** totaux des animaux maintenus en laboratoire mais pas sur les concentrations en glycogène. Au terme de 4 semaines de maintien, les animaux ont des concentrations en lipides significativement plus élevées (test de Tukey, seuil de risque 5 %) (Tableau 24).

**Tableau 25: Étude en laboratoire des effets de variations de la température et de la durée de maintien sur les concentrations en glycogène ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) des animaux prélevés à une température élevée (09/09/04 :  $T^\circ = 17^\circ\text{C}$ ).**

Durée de maintien (en jours)	Température de maintien	
	20 °C	5 °C
0	19,8 ± 11,6	
7	14,1 ± 5,2	20,6 ± 10,8
14	11,3 ± 8,4	12,4 ± 8,5
21	7,4 ± 3,7	16,1 ± 8,3
28	15,8 ± 6,0	14,6 ± 7,5

**Tableau 26: Étude en laboratoire des effets de variations de la température et de la durée de maintien sur les concentrations en lipides totaux ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) des animaux prélevés à une température élevée (09/09/04 :  $T^\circ = 17^\circ\text{C}$ ).**

Durée de maintien (en jours)	Température de maintien	
	20 °C	5 °C
0	7,0 ± 3,2	
7	6,8 ± 2,0	8,0 ± 1,2
14	6,6 ± 2,3	6,6 ± 3,1
21	6,7 ± 1,9	9,1 ± 3,8
28	13,3 ± 4,6	11,4 ± 2,8

Transfert d'une faible température à une température plus élevée (Figure 34 et Tableau 27)

La **température** (ANOVA,  $p < 0,0001$ ) et la **durée** (ANOVA,  $p = 0,029$ ) de **maintien** influencent significativement les concentrations en glycogène des animaux. À 14, 21 et 28 jours, les animaux maintenus à 5 °C ont des concentrations en glycogène systématiquement supérieures à celles des animaux maintenus 20 °C (Figure 33). En revanche, en ce qui concerne la concentration en lipides totaux, la température n'a aucune influence (Tableau 27).

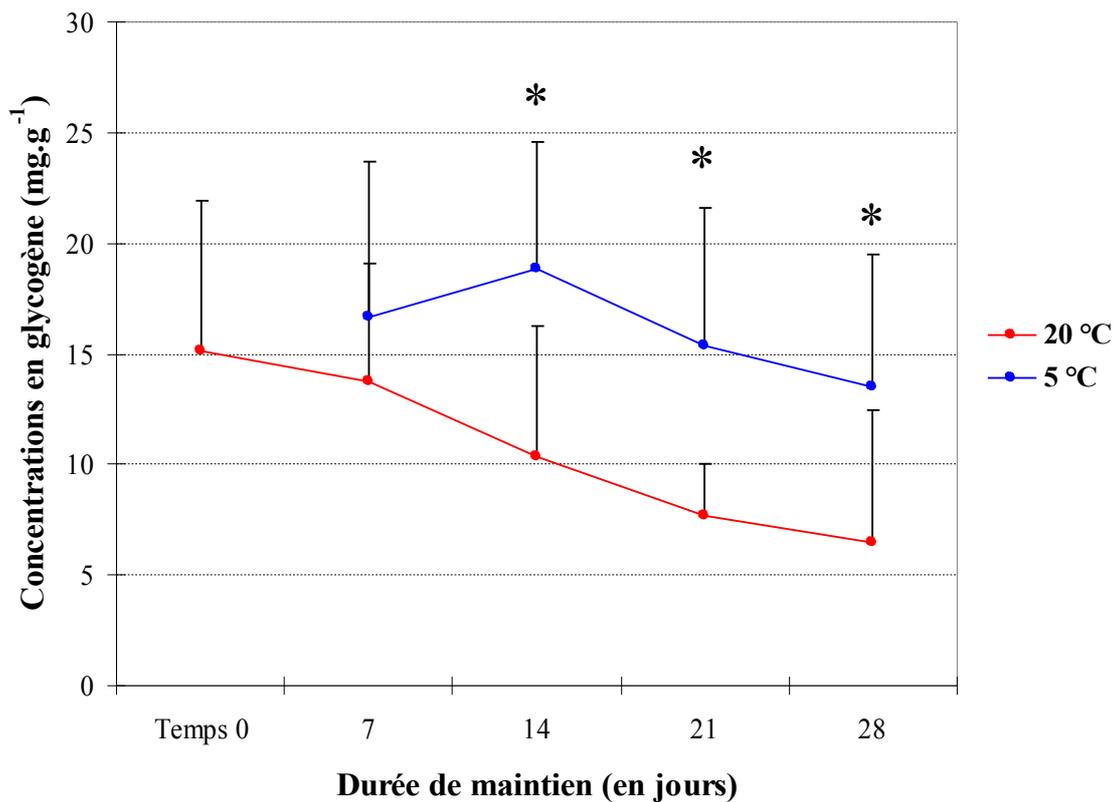


Figure 34: Étude en laboratoire des effets de variations de la température et de la durée de maintien sur les concentrations en glycogène des animaux prélevés à une température faible (28/01/05 : T° = 8 °C). Les astérisques indiquent un effet significatif de la température sur les concentrations en glycogène (Test de Tukey, seuil de risque fixé à 5%).

Tableau 27: Étude en laboratoire des effets de variations de la température et de la durée de maintien sur les concentrations en lipides totaux ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) des animaux prélevés à une température faible (28/01/05 :  $T^\circ = 8^\circ\text{C}$ ).

Durée de maintien (en jours)	Température de maintien	
	20 °C	5 °C
0	9,2 ± 2,7	
7	7,2 ± 2,5	5,9 ± 1,5
14	6,2 ± 2,5	7,3 ± 1,5
21	6,4 ± 2,0	6,2 ± 2,4
28	4,9 ± 2,7	5,7 ± 2,3

#### V.4 Discussion des résultats

Les **biomarqueurs** en relation avec le **métabolisme énergétique** fournissent une indication générale de l'état de santé des organismes. Des agents de stress naturels et chimiques peuvent être à l'origine de modifications des niveaux des réserves énergétiques. **Des diminutions de croissance et une mobilisation des réserves énergétiques sont souvent répertoriées comme effets néfastes de la pollution (Walker et al., 1996) et sont généralement indicatrices d'une exposition de longue durée à des doses sublétales de contaminants (Mayer et al., 2002).**

Dans l'optique d'utiliser les **réserves énergétiques** comme **biomarqueurs de pollution**, il est nécessaire que la variation provoquée par la contamination (signal) soit plus importante que la variation naturelle (bruit de fond) (Cairns, 1992). C'est pourquoi une approche intégrant différents aspects de la **biologie de l'espèce** et des **facteurs d'influence** est nécessaire pour une interprétation correcte des résultats. Dans la littérature, peu d'études rendent compte d'un suivi long prenant en considération les variations annuelles et saisonnières des réserves énergétiques. Aussi, dans le cas présent, l'originalité du travail repose sur un **suivi de longue durée** (trois années) à différentes périodes de l'année (hiver, printemps, été, automne), chez des annélides polychètes *N. diversicolor*, originaires des sites sain d'Authie et contaminé de Seine, mettant ainsi à l'épreuve la **fiabilité de tels biomarqueurs**.

Généralement **les concentrations en réserves énergétiques sont plus élevées chez les animaux de masse élevée** par comparaison avec des animaux de masse plus faible (Figure 22). Des **observations similaires ont été rapportées dans le cas du glycogène chez une espèce voisine *Nereis virens*** (Carr et Neff, 1981, 1982, 1984a). Plusieurs facteurs physiologiques (croissance, condition, reproduction) en lien avec des facteurs environnementaux (saison, niveau de contamination) peuvent expliquer ces observations. En effet, des organismes de masse faible et/ou jeune allouent l'énergie disponible principalement à leur croissance. Ce patron correspond aux observations sur *N. diversicolor* rapportées ci-dessus dans le chapitre IV. **Une relation significative de la masse des animaux et des niveaux en glycogène et lipides a été observée sur les deux sites.**

Les variations dans la composition biochimique des tissus d'invertébrés aquatiques sont le résultat de cycles d'**accumulation** et de **mobilisation** de réserves (Pellerin-Massicotte et al., 1994). L'accumulation des constituants de réserves est possible lorsque les conditions du milieu sont favorables, à savoir une disponibilité alimentaire convenable et l'absence de stress. Plusieurs facteurs sont responsables de la mobilisation des réserves, des facteurs intrinsèques tels que l'état reproducteur, le stade de développement, l'âge et/ou la masse, mais aussi des facteurs extrinsèques comme la température, le niveau d'oxygénation du milieu, la salinité, les stress chimiques.

**Des variations temporelles, intra- et inter- annuelles, des réserves énergétiques ont été généralement observées chez les annélides originaires des deux sites (Figures 23 à 31).** La **température** est un facteur écologique de première importance puisqu'elle influence grandement la biologie des organismes. Deschênes et al. (2005) démontrent chez *N. virens* que les comportements (prospection alimentaire, locomotion, ventilation de la galerie, etc..) sont réduits au strict minimum lorsque les animaux sont maintenus à faible température (1°C). Dans ces conditions, les animaux entrent dans une phase de « dormance » afin de limiter la consommation et de sauvegarder l'énergie dont ils disposent. Sur un site de Bretagne, *N. diversicolor* cesse de s'alimenter lorsque la température est inférieure à 8 °C et reprend des activités pour des températures voisines de 13 °C (Lambert et al., 1992). Nos observations lors de l'hiver 2003 qui a été particulièrement rigoureux sont cohérentes avec ces travaux. Les animaux collectés dans le sédiment ne bougeaient pratiquement pas et se trouvaient plus en profondeur dans le sédiment qu'habituellement.

Dans le présent travail, des animaux prélevés en période hivernale et estivale sont maintenus en laboratoire pendant quatre semaines à une température élevée ( $T^{\circ} = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) ou

faible ( $T = 5\text{ °C}$ ). Une baisse de la température n'affecte généralement pas les réserves énergétiques des annélides prélevées en période estivale ( $T^{\circ} = 17\text{ °C}$ ). En revanche, lorsque les animaux sont prélevés en période hivernale ( $T^{\circ} = 8\text{ °C}$ ) et maintenus à  $20\text{ °C}$ , les concentrations en glycogène sont significativement diminuées (Figure 34). L'élévation de la température induit donc probablement une mobilisation énergétique du glucose libre tout d'abord puis du glucose issu de la glycogénolyse. Ces résultats sont cohérents avec les observations de Kristensen (1983b) qui démontre que *N. diversicolor* est capable de mettre en place des adaptations physiologiques pour supporter les stress thermiques notamment en réduisant la ventilation des galeries et la consommation d'oxygène à des températures faibles. Des résultats similaires sont obtenus dans le cadre du PNETOX, la consommation d'oxygène est mesurée en température contrôlée (4, 10, 16 et  $22\text{ °C}$ ) sur chaque site et à chaque campagne de prélèvements de février 2003 à février 2004 (H. Hummel et coll.). La relation entre la respiration et la température de maintien des animaux est assez comparable pour toutes les expérimentations (mai, juillet, août, novembre 2003 et février 2004) à l'exception de l'expérimentation de février 2003 (température environnementale de  $-1$  à  $3\text{ °C}$ ) pour laquelle la consommation d'oxygène est environ deux fois plus élevée. Ceci indique que les animaux sont capables d'une acclimatation en réglant leur consommation d'oxygène à une valeur de l'ordre de  $1\text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  de masse sèche sauf aux conditions les plus extrêmes. La saison (température, photopériode) influence également de manière significative l'état reproducteur des organismes or les réserves énergétiques sont d'une importance capitale dans les processus reproducteurs. Cet aspect sera discuté dans le chapitre suivant.

L'influence du **site d'origine** des annélides sur les niveaux en réserves énergétiques est étudiée. Dans le cas présent, des différences intersites sont révélées dans le suivi de 2002 à 2004. En 2002, les spécimens collectés en Seine, trois à cinq fois plus « petits » que ceux de l'Authie, avaient des teneurs en réserves énergétiques considérablement réduites en comparaison aux spécimens collectés en Authie.

Pour étudier si les différences intersites observées en 2002 sont le résultat de l'influence de la masse sur les concentrations en réserves énergétiques, des spécimens de masse comparable entre les deux sites sont collectés pour la période 2003-2004. Aucune différence intersite systématique n'est dégagée. Cependant, au cours de l'année 2003, et précisément en **hiver** (février) et au **printemps** (mai) les concentrations en réserves énergétiques (glycogène et lipides totaux) des spécimens de l'Authie sont réduites par rapport à l'ensemble des données du suivi ( $-49$  et  $-33\%$  pour le glycogène,  $-24$  et  $-31\%$  pour les

lipides). Cette diminution significative observée en 2003 (hiver particulièrement rigoureux) sur le site de l'Authie pourrait masquer une différence intersite.

**Indépendamment de tout effet de pollution, le métabolisme énergétique des organismes est influencé par un grand nombre de facteurs naturels en particulier les ressources alimentaires, les facteurs de stress.**

**Parmi les facteurs naturels, la salinité est un paramètre physico-chimique déterminant en milieu estuarien (Chapman et Wang, 2001).** La salinité mesurée sur le site de Seine ( $18,9 \pm 4,2$ ) est généralement plus faible que celle mesurée en Authie ( $25,3 \pm 3,0$ ). Est-ce que la salinité constitue un stress environnemental supplémentaire pour les individus de Seine ? Carr (1981, cité dans Carr 1984) observe chez *N. virens*, que les concentrations en glycogène sont diminuées suite à un choc hypoosmotique (maintien à une salinité de 15). Les concentrations diminuent en raison du fait que *N. virens* s'avère incapable d'osmoréguler et de maintenir son volume corporel constant à cette salinité. Par conséquent une entrée d'eau modifie le volume corporel (et la masse fraîche des animaux), influençant ainsi la concentration en glycogène. Selon Oglesby (1978) la régulation et la stabilité du volume corporel chez *N. diversicolor* débute pour des valeurs de salinité comprise entre 8,75 et 12,25, la salinité critique est de 1 à 2 % de celle de l'eau de mer. **En accord avec ces données, les individus en Seine ne se trouvent pas en dehors de leur capacité de tolérance**, comme en témoigne la constance des teneurs en eau des tissus en dépit des variations saisonnières et intersites de la salinité (Cf. Chapitre IV, Figure 18). Par ailleurs, sur le site de l'Authie en septembre 2002, les individus collectés à trois stations différant par la salinité présentaient des concentrations en glycogène et lipides identiques. De plus, expérimentalement, des individus de l'Authie maintenus à une salinité différente (15) de celle expérimentée dans leur milieu (25) ne mobilisaient ni le glycogène ni les lipides pour tolérer de tels changements. Ces résultats sont cohérents avec l'aptitude des espèces estuariennes à supporter des stress environnementaux, particulièrement *N. diversicolor* (Scaps, 2002). **Par conséquent, dans le cadre strict de cette étude (salinité comprise entre 15 et 30), la salinité n'influence pas de manière significative les niveaux en réserves énergétiques.**

**La source de l'énergie pour les organismes est la nourriture disponible du milieu.** *N. diversicolor* est considérée comme une espèce omnivore (Scaps, 2002) et opportuniste, capable d'exploiter diverses sources d'alimentation, incluant la matière organique du sédiment, les débris végétaux, des organismes phytoplanctoniques mais elle est également un prédateur potentiel (Olivier et al., 1995 ; Meziane et Retière, 2002 ; Scaps, 2002). Les

animaux sont capables de piéger des particules nutritives sur des filets mucilagineux recouvrant leur galerie, de prospecter la surface du sédiment aux alentours de l'orifice de leur galerie. Dans le cadre du PNETOX une relation entre les variations temporelles des réserves énergétiques et des ressources alimentaires a été recherchée. Si l'on considère la **matière organique** déterminée par la perte au feu à 450 °C dans les sédiments superficiels, aucune différence intersite (Authie : 12,5 - 19 % ; Seine : 13 - 15,5 %) n'est mise en évidence. Considérant, la fraction granulométrique de taille supérieure à 250 µm (comprenant les **débris végétaux**), ces fractions ne diffèrent pas significativement entre les deux estuaires (Authie :  $0,75 \pm 0,77$  % ; Seine :  $0,41 \pm 0,36$  %). Par contre, les **organismes vivants (diatomées, foraminifères, nématodes)** sont généralement plus abondants en Authie qu'en Seine au moins à certaines périodes de l'année (source : Debenay, Sylvestre, EA 2644, Angers ; Ferrero, National History Museum, London). Pour l'année 2003 les données sont les plus complètes. En Seine, les concentrations de glycogène sont maximales en mai et les plus fortes concentrations de lipides sont enregistrées en mai mais aussi en novembre. Au cours de cette période, les abondances de nématodes et de foraminifères restent stables tandis que l'abondance des diatomées est importante en mai et plus encore en août. Toutefois, le rôle particulier des diatomées dans l'accumulation des réserves des annélides de la Seine ne s'est pas vérifié en 2004 puisqu'en dépit d'une abondance toujours médiocre, un pic de glycogène est observé en mai et des valeurs importantes de lipides en février et mai. Chez les spécimens de masse élevée de l'Authie, les valeurs maximales de glycogène sont observées en août et novembre 2003 tandis que les différences temporelles sont moins nettes pour les lipides. Dans cet estuaire, les abondances des diatomées et des nématodes sont élevées en mai et plus encore en août alors que les concentrations maximales des foraminifères sont enregistrées en novembre. En 2004, les concentrations de glycogène sont beaucoup plus élevées de février à août dans les organismes de l'Authie que l'année précédente et ceci malgré des abondances équivalentes ou même inférieures de nématodes (en février) et de diatomées et de foraminifères.

Concernant la **disponibilité alimentaire**, des différences intersites sont mises en évidence. Cependant l'absence de relation directe entre ces dernières et les niveaux en réserves énergétiques démontre que **les différences intersites en réserves n'apparaissent pas uniquement en lien avec la nourriture disponible**. De plus, les concentrations en lipides et glycogène ne sont pas significativement affectées par les variations de **salinité** en raison de l'**euryhalinité de l'espèce**. Par contre les résultats démontrent que la **température** a

une **influence directe sur le métabolisme énergétique** et peut conduire à la mobilisation des réserves énergétiques sur le court ou le long terme. Par ailleurs, des **variations temporelles significatives** sont clairement établies. Ces résultats ont, par conséquent, des implications directes sur l'interprétation des données acquises *in situ* ou dans le cas d'expérimentations en laboratoire. La **masse des organismes** est une **variable intégrative de l'état de croissance, de condition générale mais également de l'état reproducteur**. Or, chez d'autres espèces, l'état reproducteur et les niveaux en réserves énergétiques des organismes sont en étroites relations. **Ainsi, l'utilisation des réserves énergétiques chez cette espèce comme biomarqueur de pollution, l'état reproducteur des annélides selon leur site d'origine doit être pris en considération.**



## VI Chapitre VI : Physiologie de la reproduction de *N. diversicolor*

Chez les néréidés, l'investissement des ressources dans la reproduction constitue un coût considérable. Les individus se reproduisent une fois par cycle de vie, les reproducteurs disparaissant peu de temps après. La longévité des organismes est donc fonction de la reproduction. La balance entre la survie de l'individu et son succès reproducteur est un équilibre complexe. À quel âge et/ou taille/masse un individu se reproduit-il ? Comment est modulée la physiologie de la reproduction ? Quelle est l'influence des facteurs environnementaux notamment la qualité du milieu sur la reproduction ? **La compréhension de la physiologie de la reproduction au moyen d'études *in situ* est donc tout à fait pertinente.**

Les études *in situ* relatent le **cycle ovogénique** dans de nombreuses populations. Ce type d'étude permet d'évaluer la durée de la gamétogenèse et d'identifier la période de reproduction dans l'année. Cependant, selon la littérature la morphologie et l'aspect des ovocytes seraient plus à même de rendre compte des processus endocriniens régulateurs de la reproduction. Dans ce travail, **des stades de maturité sexuelle sont définis en tenant compte à la fois de l'aspect des produits génitaux et du diamètre des ovocytes présents dans la cavité coelomique.**

Les néréidés sont extrêmement féconds. La quantité de produits génitaux chez ces espèces est en relation avec le volume corporel. Peu d'études ne rendent compte *in situ* du nombre d'ovocytes portés par les femelles. Or, une telle donnée permet d'évaluer l'investissement des ressources dans la reproduction et d'estimer les effets de l'environnement sur l'état reproducteur des individus. **L'évolution du nombre d'ovocytes des femelles en fonction du stade de maturité sexuelle, l'influence des variables biométriques (taille, masse) ainsi que les différences intersites sont étudiées.**

La reproduction est un phénomène saisonnier qui entraîne des modifications biochimiques et physiologiques des individus (accumulation/mobilisation de réserves énergétiques, acquisition de caractères sexuels, production et maturation de produits génitaux). Ces variations sont influencées par des facteurs environnementaux et contrôlées par des hormones. Peu d'informations existent sur le rôle des **stéroïdes sexuels** dans la modulation de la reproduction chez *N. diversicolor*. **Dans le présent travail, les relations entre le stade de maturité sexuelle, les niveaux en hormones stéroïdiennes et en réserves énergétiques sont examinées.**

**Au terme de ce chapitre, l'ensemble des données acquises sur la physiologie de *N. diversicolor* auront été présentées. L'examen de l'ensemble des données obtenues dans le présent travail permettra de révéler les indicateurs physiologiques chez cette espèce.**

### ***VI.1 Définition des stades de maturité sexuelle chez les femelles***

Les proportions relatives de femelles dans les populations d'Authie et de Seine sont respectivement présentées dans le Tableau 28. Chez les femelles, cinq stades de maturité sexuelle sont définis. Les critères de détermination de ces stades sont résumés dans les Tableaux 29 et 30:

- **stade indifférencié** : des amas de cellules reliées entre elles par des ponts cytoplasmiques sont présents dans le fluide cœlomique,
- **stade de développement** : les premiers ovocytes qui apparaissent sont encore inclus dans le tissu germinal ou bien sont libres dans le cœlome, le diamètre minimal est compris entre 15 et 20  $\mu\text{m}$ . Le contenu des ovocytes est très peu dense, le diamètre ovocyttaire moyen est faible ( $31 \pm 8 \mu\text{m}$ ),
- **stade de vitellogénèse** : au cours de cette phase, les ovocytes sont très hétérogènes en taille (coefficient de variation de l'ordre de 28 %, étendue de 70  $\mu\text{m}$ ), le contenu des ovocytes se densifie,
- **stade mature** : les ovocytes atteignent un diamètre maximal de l'ordre de 200  $\mu\text{m}$ , ils sont parfaitement sphériques et très homogènes en taille (coefficient de variation de l'ordre de 6 %). Les ovocytes matures sont accumulés dans les parapodes, ces derniers sont gonflés,
- **stade passé** : les individus présentent des parapodes « flétris », des ovocytes de grande taille mais non sphériques ou en cours de dégénérescence et très peu nombreux.

Un indice de maturité sexuelle (IMS) est calculé (Équation 7) selon la formule de Siah et al. (2003) :

**Équation 7: Calcul de l'indice de maturité sexuelle (IMS) où  $n_i$  représente le nombre de femelles présentant le stade  $i$ ,  $v_i$  la valeur du stade  $i$ , et  $N$  le nombre total de femelles.**

$$IMS = \frac{\sum_{i=0}^4 n_i \times v_i}{N}$$

Tableau 28: Proportions relatives des femelles dans les populations d'Authie et de Seine au cours de six périodes de prélèvement.

Périodes de prélèvement	Authie	Seine
Août-03	94,9%	97,8%
Nov-03	90,5%	91,7%
Fév-04	97,3%	87,9%
Mai-04	97,9%	86,7%
Août-04	83,7%	87,0%
Nov-04	89,7%	80,6%
Moyenne	92,3 ± 5,4 %	88,6 ± 5,8 %

Tableau 29: Critères de détermination des stades de maturité sexuelle chez les femelles de *N. diversicolor*.

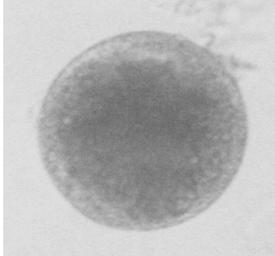
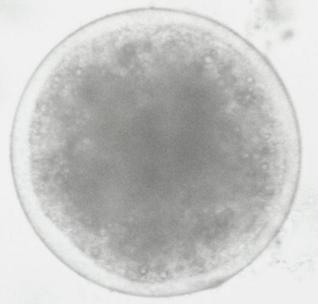
Valeur du stade	Dénomination du stade	Critères de détermination
1	Indifférencié	Présence de tissu germinal, Masse cellulaire en division
2	Développement	Ovocytes primaires, libres ou inclus dans le tissu germinal (Ø = 15 – 65 µm) 
3	Vitellogenèse	Ovocytes primaires libres, de taille très hétérogène (Ø = 65 – 190 µm) 
4	Mature	Ovocytes primaires libres et parfaitement sphériques, de taille très homogène (Ø = 190 – 225 µm) 
0	Passé	Ovocytes sphériques rares, éventuellement en dégénérescence, parapodes flétris.

Tableau 30: Caractéristiques du diamètre ovocytaire en fonction du stade de maturité sexuelle des femelles.

Stade	Moyenne ( $\mu\text{m}$ )	Écart-type ( $\mu\text{m}$ )	Coefficient de variation (%)	Étendue ( $\mu\text{m}$ ) (Maximum - Minimum)
Développement	31	8	26%	29
Vitellogenèse	76	33	28%	70
Mature	200	10	6%	46

## VI.2 Variabilité de la maturité sexuelle

Les proportions relatives des femelles au sein des cinq stades de maturité sexuelle sont étudiées en tenant compte de la **masse des femelles**, de la **période de prélèvement** et du **site d'origine** de ces dernières.

### VI.2.1 Variations intrapopulationnelles et temporelles

Les proportions relatives au sein des cinq stades de maturité sexuelle et l'IMS des femelles collectées au cours de l'ensemble des périodes de prélèvement sur les deux sites sont illustrées **en fonction des classes de masse** sur les Figures 35 et 37. Les effectifs des femelles analysées à cet égard sont présentés dans les Tableaux 31 et 33. Les Figures 36 et 38 présentent respectivement pour les sites d'Authie et de Seine les variations de la maturité sexuelle en fonction de la **période de prélèvement** sur la proportion des individus au sein des cinq stades de maturité sexuelle identifiés et sur l'IMS. Les effectifs des femelles analysées sont présentés dans les Tableaux 32 et 34.

Des variations significatives des proportions des stades de maturité sexuelle et de l'IMS en fonction des classes de masse et des périodes de prélèvement des individus, quel que soit leur site d'origine, sont observées.

#### 1.1.1.28 Site d'Authie

Les **femelles appartenant à la classe de masse [ $< 100$  mg] sont majoritairement en stade indifférencié (75 %)**. Cette proportion diminue dans la classe [100 - 200 mg] (38 %) et devient minimale (4 %) dans la classe [200 - 300 mg]. La proportion des femelles en stade de développement est maximale (55 %) dans la classe [100 - 200 mg], minimale (13 - 17 %)

dans les classes [400 - 600 mg] et nulle pour les classes de masse supérieures à 600 mg. Les femelles **sexuellement matures sont observées seulement dans les classes de masse [400 - 500 mg] et [600 - 700 mg]** (13 et 40 % respectivement). Au-delà d'une masse de 400 mg les femelles sont majoritairement dans le stade de vitellogenèse (proportion supérieure ou égale à 60 %) (Figure 35). Quelle que soit la classe de masse considérée, le stade passé n'a pas été observé sur le site de l'Authie.

L'indice de maturité sexuelle est minimal (IMS = 1,25) chez les spécimens de la plus petite classe de masse (< 100 mg). Une augmentation régulière de l'IMS est observée pour les individus de masse comprise entre 100 et 700 mg. Des femelles de masses supérieures à 700 mg (700 - 1000 mg) sont occasionnellement observées et sont très homogènes au regard du stade de maturité sexuelle (IMS = 3) (Figure 35).

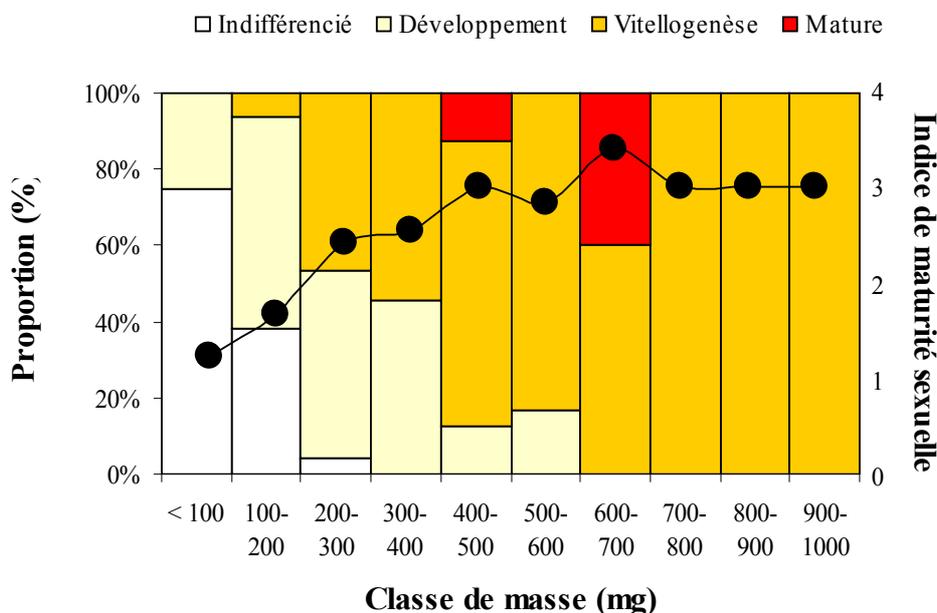


Figure 35: Variations intrapopulationnelles sur l'Authie des proportions relatives (%) des femelles au sein de quatre stades de maturité sexuelle (□ : indifférencié, ◻ : développement, ◻ : vitellogenèse, ◻ : mature) et de l'indice de maturité sexuelle durant l'étude.

Tableau 31: Effectifs des femelles d'Authie analysées pour l'étude des proportions relatives au sein des quatre stades de maturité sexuelle et le calcul de l'IMS pour chacune des classes de masse.

	Classes de masse (mg)									
	< 100	100-200	200-300	300-400	400-500	500-600	600-700	700-800	800-900	900-1000
Effectifs analysés	N = 52	N = 65	N = 47	N = 22	N = 16	N = 6	N = 5	N = 2	N = 2	N = 3

En ce qui concerne l'influence de la **période de prélèvement** (Figure 36) sur la maturité sexuelle, les stades indifférencié, développement ou vitellogenèse sont observés pour les six périodes de prélèvement. En **août et en novembre 2003 et 2004** seulement des femelles de stade indifférencié, développement ou vitellogenèse (diamètre ovocytaire inférieur à 70  $\mu\text{m}$ ) sont présentes. En **février et mai 2004**, des femelles dans en stade vitellogenèse avancé (diamètre ovocytaire supérieur à 120  $\mu\text{m}$ ) et sexuellement matures sont présentes.

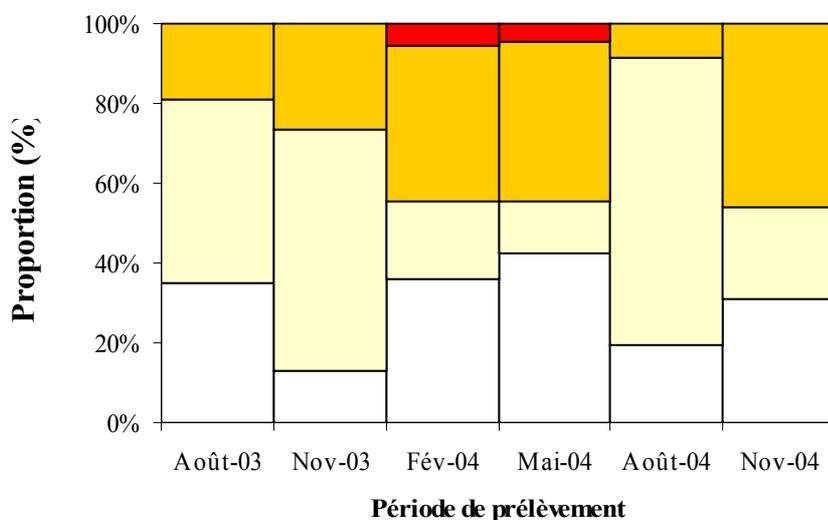


Figure 36: Variations temporelles sur l'Authie des proportions relatives (%) des femelles au sein de quatre stades de maturité sexuelle (□ : indifférencié, ■ : développement, ■ : vitellogenèse, ■ : mature).

Tableau 32: Effectifs des femelles d'Authie analysées pour l'études des proportions relatives au sein des quatre stades de maturité sexuelle pour chacune des périodes de prélèvement.

	Périodes de prélèvement					
	Août-03	Nov-03	Fév-04	Mai-04	Août-04	Nov-04
Effectifs analysés	N = 37	N = 38	N = 36	N = 47	N = 36	N = 26



Concernant l'influence de la **période de prélèvement** sur la maturité sexuelle (Figure 38), les stades indifférencié, développement et vitellogenèse sont présents pour chacune des périodes de prélèvement. En **août 2003 et 2004**, des femelles de stade passé sont observées (respectivement 4 et 10 %). En **mai 2004**, des femelles à proximité de la maturité sexuelle (femelles en stade vitellogenèse, diamètre ovocytaire supérieur à 120  $\mu\text{m}$ ) ou matures sexuellement (21 %) sont observées.

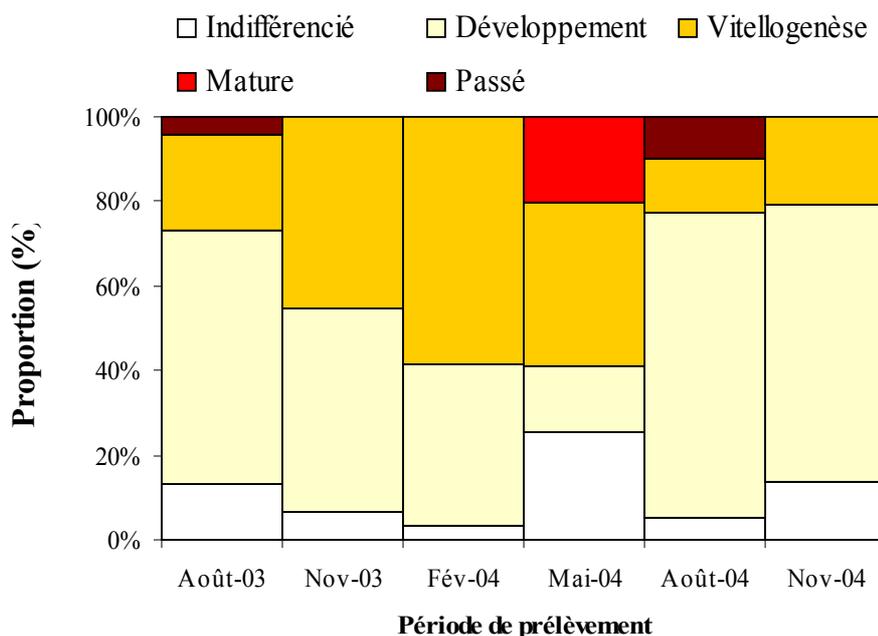


Figure 38: Variations temporelles sur la Seine des proportions relatives (%) des femelles au sein des cinq stades de maturité sexuelle (□ : indifférencié, ◻ : développement, ◻ : vitellogenèse, ◻ : mature, ◻ : passé) et de l'indice de maturité sexuelle.

Tableau 34: Effectifs des femelles de Seine analysées pour l'études des proportions relatives au sein des cinq stades de maturité sexuelle pour chacune des périodes de prélèvement.

	Périodes de prélèvement					
	Août-03	Nov-03	Fév-04	Mai-04	Août-04	Nov-04
Effectifs analysés	N = 45	N = 44	N = 29	N = 39	N = 40	N = 29

### VI.2.2 Variations intersites

Les individus de masse supérieure à 300 mg sont occasionnellement observés sur le site de la Seine. Le Tableau 35 présente les effectifs des individus analysés pour la comparaison intersite de l'IMS des femelles. Trois classes de masse sont disponibles pour la

comparaison intersite de l'IMS: [ $< 100$  mg], [ $100 - 200$  mg] et [ $200 - 300$  mg]. Les résultats sont illustrés sur la Figure 39.

**L'IMS des femelles de Seine est systématiquement supérieur à celui des femelles d'Authie pour les six campagnes de prélèvement étudiées et ce pour les trois classes de masse envisagées.**

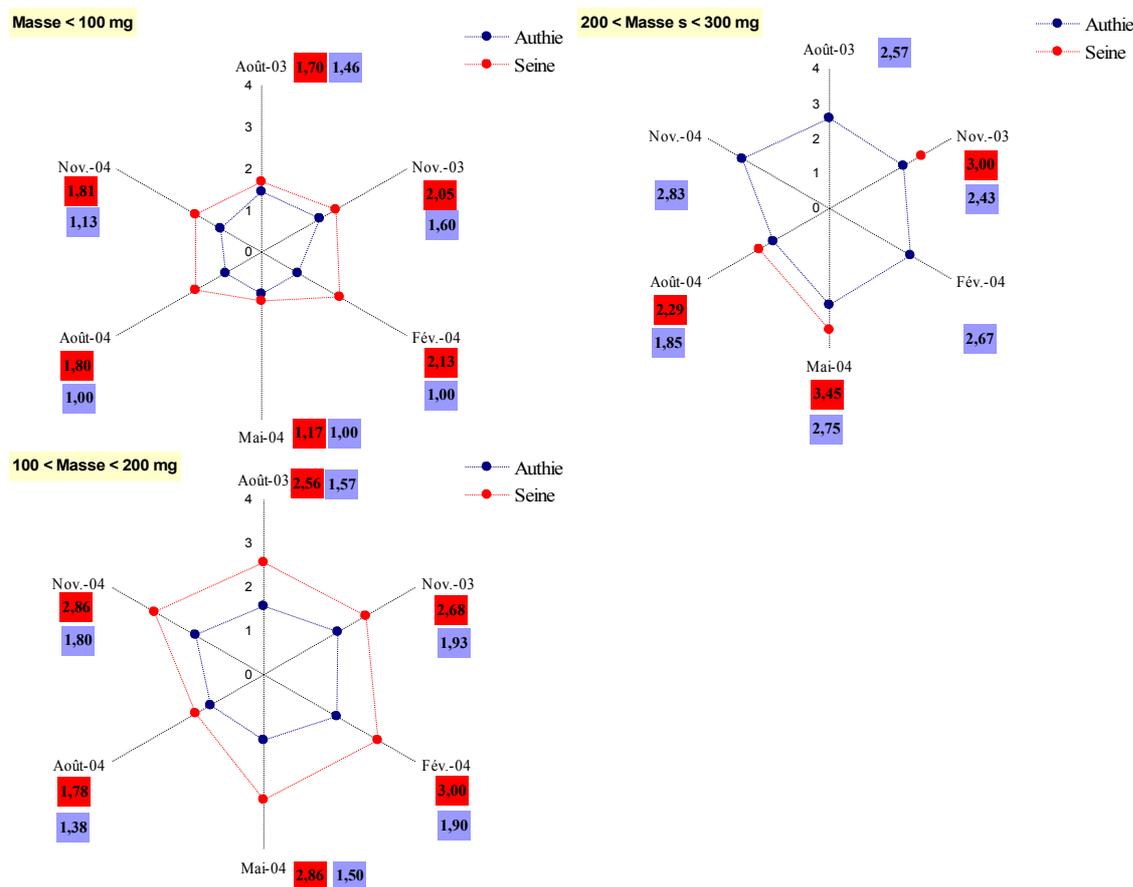


Figure 39: Variations intersites de l'indice de maturité sexuelle pour trois classes de masse ( $< 100$  mg], [ $100 - 200$  mg], [ $200 - 300$  mg]) au cours de six campagnes de prélèvement. Remarque : [ $200 < Masse < 300$  mg] : pas d'échantillons disponibles dans cette classe de masse en Seine en août 2003, février 2004 et novembre 2004.

Tableau 35: Effectifs des femelles analysées pour la comparaison intersite de l'IMS.

Effectifs (N)	Classe de masse					
	0 – 100 mg		100 – 200 mg		200 – 300 mg	
	Authie	Seine	Authie	Seine	Authie	Seine
<b>Août 2003</b>	N = 13	N = 20	N = 14	N = 25	N = 7	N = 0
<b>Novembre 2003</b>	N = 10	N = 21	N = 14	N = 22	N = 7	N = 1
<b>Février 2004</b>	N = 10	N = 15	N = 10	N = 14	N = 6	N = 0
<b>Mai 2004</b>	N = 11	N = 12	N = 14	N = 14	N = 8	N = 11

<b>Août 2004</b>	N = 4	N = 10	N = 8	N = 23	N = 13	N = 7
<b>Novembre 2004</b>	N = 8	N = 21	N = 5	N = 7	N = 6	N = 0

### VI.3 Variabilité du nombre d'ovocytes

Le nombre d'ovocytes libres dans la cavité coelomique est étudié en tenant compte du stade de maturité sexuelle (développement, vitellogenèse et mature), de la masse, des longueurs totales et L3 des femelles, du site et de la période de prélèvement.

#### VI.3.1 Évolution au cours du processus de maturation sexuelle

L'évolution du nombre d'ovocytes présents dans la cavité coelomique en fonction du **stade de maturité sexuelle** des femelles originaires des deux sites est illustrée dans le Tableau 36. Une influence significative du stade de maturité sexuelle sur le nombre d'ovocytes est observée (ANOVA,  $p < 0,000$ ). Le nombre d'ovocytes est minimal pour les femelles en stade développement (Authie :  $3,9 \times 10^3$  - Seine :  $3,6 \times 10^3$ ) et maximal chez celles en stade mature (Authie :  $13,9 \times 10^3$  - Seine :  $8,0 \times 10^3$ ).

**Tableau 36: Variations du nombre d'ovocytes en fonction du stade de maturité sexuelle des femelles (développement, vitellogenèse et mature) sur les sites d'Authie et de Seine.**

	<b>Stade</b>	<b>Minimum</b>	<b>Moyenne</b>	<b>Maximum</b>
<b>Authie</b>	Développement	53	3903	14160
	Vitellogenèse	1733	12618	22440
	Mature	9158	13876	20988
<b>Seine</b>	Développement	200	3645	12200
	Vitellogenèse	933	6802	14080
	Mature	7920	8069	8217

#### VI.3.2 Relations entre les variables biométriques et le nombre d'ovocytes

Les relations entre les variables biométriques (masse fraîche, nombre de segments, longueur totale, longueur L3) et le nombre d'ovocytes des femelles d'Authie et de Seine sont illustrées dans le Tableau 37.

**Pour les deux populations, le nombre d'ovocytes est positivement et significativement influencé par les variables biométriques.**

**Tableau 37: Relations entre le nombre d'ovocytes des femelles (Y) et les variables biométriques (X : masse fraîche, nombre de segments, longueur L3, longueur totale) chez les femelles d'Authie (N = 79) et de Seine (N= 74).**

Axe X	Site	Y = aX + b	R <sup>2</sup>	Significativité
Masse	Authie	Y = 26X + 289	0,69	P < 0,000
	Seine	Y = 28X + 1716	0,21	P < 0,000
Nombre de segments	Authie	Y = 645X - 47228	0,44	P < 0,000
	Seine	Y = 282X - 17422	0,18	P < 0,000
Longueur L3	Authie	Y = 11311X - 14885	0,55	P < 0,000
	Seine	Y = 5600X - 3851	0,15	P < 0,000
Longueur totale	Authie	Y = 4018X - 13648	0,63	P < 0,000
	Seine	Y = 1646X - 1753	0,16	P < 0,000

### VI.3.3 Variations temporelles et intersite de la fécondité globale et relative

Le nombre d'ovocytes des femelles d'Authie et de Seine selon la période de prélèvement est illustré dans la Figure 40. Le nombre varie significativement au cours des périodes de prélèvement (ANOVA, Authie p < 0,000, Seine p = 0,013). Pour les deux sites le nombre d'ovocytes est minimal en août 2003 (Authie :  $3,9 \times 10^3$ ; Seine :  $2,2 \times 10^3$ ) et maximal en mai 2004 (Authie :  $17,7 \times 10^3$  ; Seine :  $8,0 \times 10^3$ ).

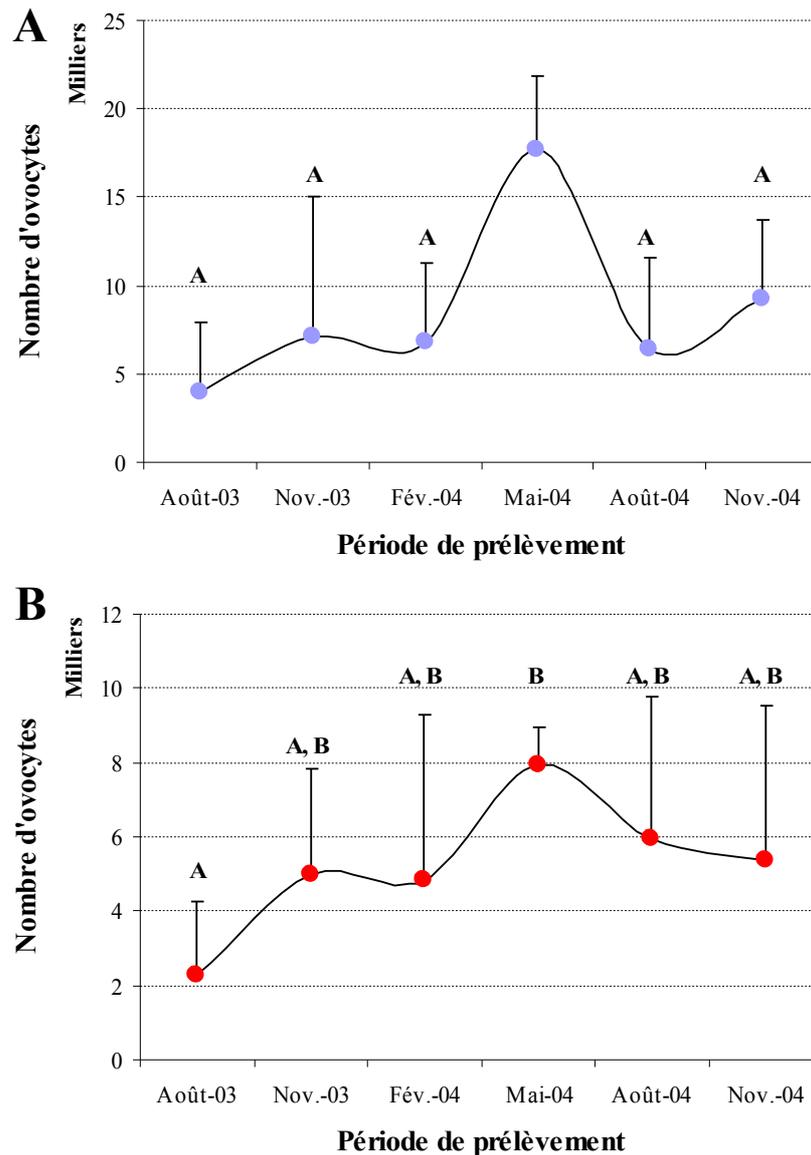


Figure 40: Variations temporelles du nombre d'ovocytes des femelles d'Authie (A) et de Seine (B). Les moyennes désignées par la même lettre ne diffèrent pas significativement (Test de Tukey, seuil de risque 5%).

À toutes les périodes de prélèvement, le nombre moyen d'ovocytes des femelles de l'Authie (nombre moyen sur l'ensemble du suivi :  $7,6 \times 10^3$ ) est généralement plus élevé que celui des femelles de Seine (nombre moyen sur l'ensemble du suivi :  $5,1 \times 10^3$ ). Les différences sont significatives à deux périodes de prélèvement, mai et novembre 2004.

Pour passer de la fécondité globale à la fécondité relative, le nombre d'ovocytes est pondéré par la masse des femelles (Figure 41). Sur l'ensemble des périodes de prélèvement la fécondité relative est plus élevée en Seine (45) qu'en Authie (24). Les différences intersites sont significatives à trois périodes de prélèvement (novembre 2003, août et novembre 2004).

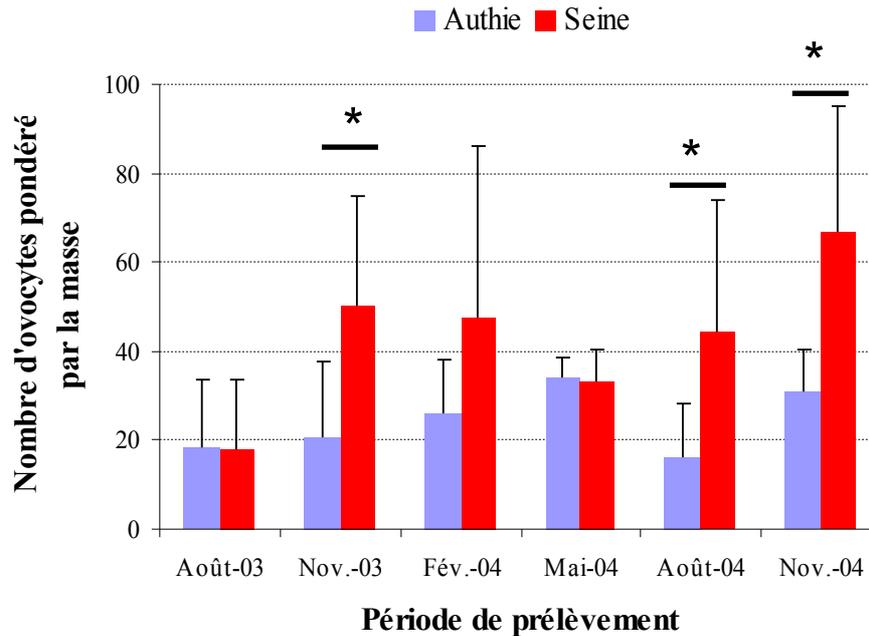


Figure 41: Variations intersites de la fécondité relative des femelles au cours de six périodes de prélèvement. Un astérisque indique une différence significative (Test t de Student, seuil de risque 5 %).

#### VI.4 Variations des concentrations en hormones stéroïdiennes

##### VI.4.1 Variations en fonction du stade de maturité sexuelle

Les variations des niveaux en hormones stéroïdiennes (progestérone,  $17\beta$ -œstradiol et testostérone) en fonction du stade de maturité sexuelle chez les femelles d'Authie et de Seine sont illustrées dans la Figure 42. Dans le cas de la population de l'Authie, les niveaux en hormones stéroïdiennes sont réduits chez les femelles sexuellement matures en comparaison aux femelles en stade indifférencié, développement et vitellogénèse. Cette diminution est significative pour la progestérone et la testostérone. Pour les femelles de Seine, les organismes en stade indifférencié sont de masse et en nombre trop faible pour permettre la quantification d'hormones stéroïdiennes. Les niveaux en hormones stéroïdiennes (progestérone,  $17\beta$ -œstradiol et testostérone) sont significativement réduits chez les femelles matures sexuellement en comparaison aux stades de développement et de vitellogénèse.

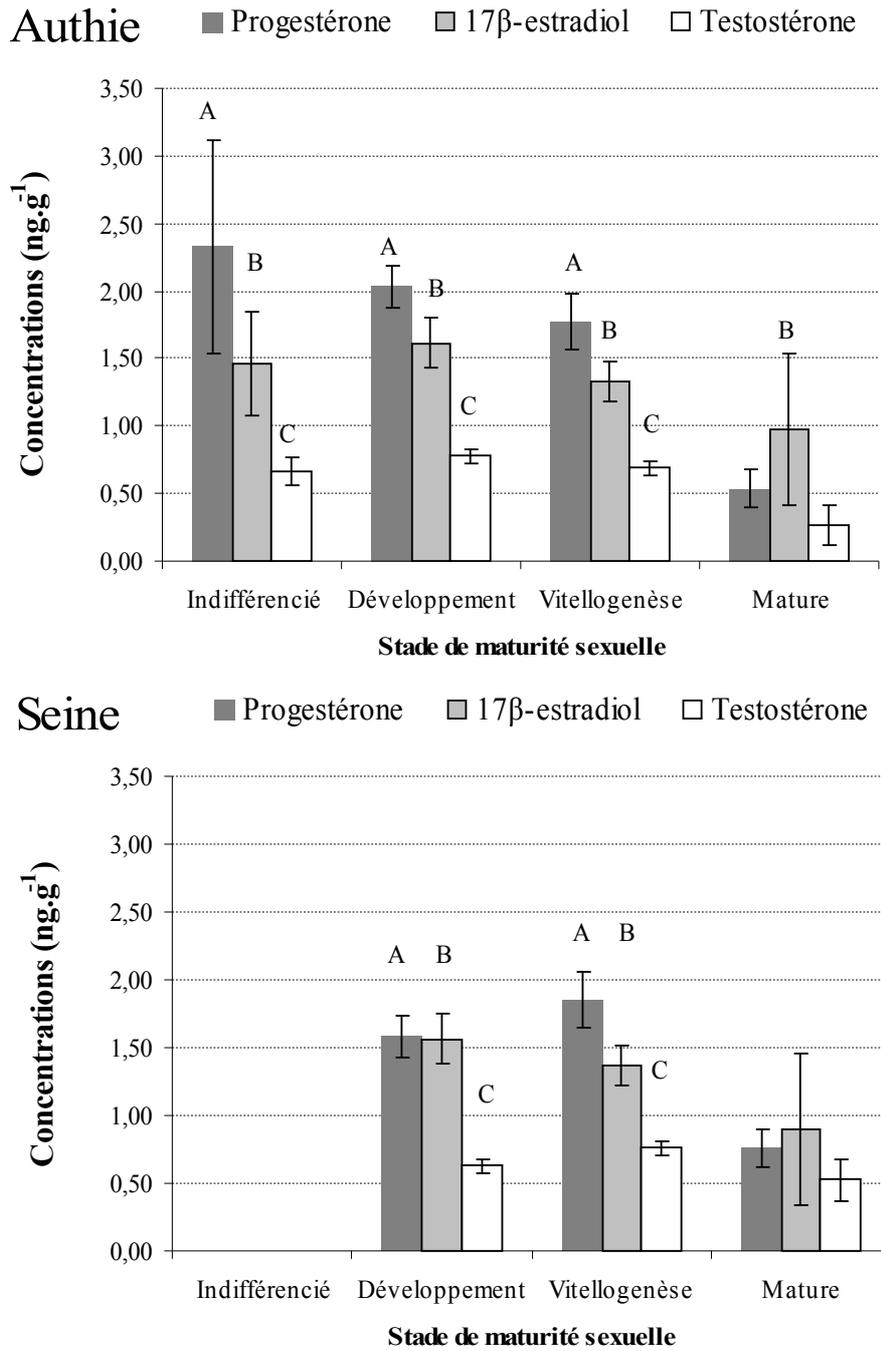


Figure 42: Variations des niveaux en hormones stéroïdiennes (moyenne  $\pm$  écart-type à la moyenne) en fonction du stade de maturité sexuelle (indifférencié, développement, vitellogénèse, mature). Pour chaque hormone, les moyennes désignées par la même lettre ne diffèrent pas significativement (Test de Tukey, seuil de risque 5 %).

#### VI.4.2 Variations intersites

Les résultats des tests de comparaison des concentrations en hormones stéroïdiennes sont présentés dans le Tableau 38. Aucune différence intersite n'est révélée pour les concentrations en  $17\beta$ -œstradiol. En août 2004, les concentrations en progestérone des femelles d'Authie sont plus élevées que celles de Seine. Au regard des concentrations en testostérone, les concentrations sont plus élevées en Seine qu'en Authie en deux occasions en août 2003 et février 2004, l'inverse étant observé pour août 2004. Le rapport E/T est plus élevé chez les spécimens de l'Authie en février 2004 alors que l'inverse est détecté en août et novembre 2004.

Tableau 38: Comparaison (probabilités des test t de Student) intersite (A : Authie ; S : Seine) des concentrations en hormones stéroïdiennes.

Périodes de prélèvement	Progestérone	$17\beta$ -œstradiol	Testostérone	Rapport E/T
Mai 2003	A = S P = 0,09	A = S P = 0,32	A = S P = 0,25	A = S P = 0,33
Août 2003	A = S P = 0,46	A = S P = 0,27	A < S <b>P = 0,04</b>	A = S P = 0,09
Novembre 2003	A = S P = 0,50	A = S P = 0,43	A = S P = 0,33	A = S P = 0,14
Février 2004	A = S P = 0,14	A = S P = 0,39	A < S <b>P = 0,04</b>	A > S <b>P = 0,04</b>
Mai 2004	A = S P = 0,27	A = S P = 0,45	A = S P = 0,21	A = S P = 0,25
Août 2004	A > S <b>P = 0,01</b>	A = S P = 0,29	A > S <b>P = 0,03</b>	A < S <b>P = 0,00</b>
Novembre 2004	A = S P = 0,13	A = S P = 0,41	A = S P = 0,05	A < S P = 0,01

#### VI.5 Relations hormones stéroïdiennes, réserves énergétiques et indice de maturité sexuelle

Afin de décrire au mieux les relations existant entre les niveaux en réserves énergétiques, l'indice de maturité sexuelle (IMS) et les niveaux en hormones stéroïdiennes des femelles, une analyse en composantes principales est réalisée sur l'ensemble des données. Les données (IMS, concentrations en progestérone,  $17\beta$ -œstradiol, testostérone, glycogène et lipides) sont moyennées par classe de masse (annexe 3) et intégrées dans l'analyse. L'analyse permet d'extraire six nouveaux axes dont les axes 1 et 2 définis par des valeurs propres

supérieures à 1. Les axes 1 et 2 sont donc les seuls retenus pour représenter les variables et les observations dans un espace à deux dimensions.

Les **niveaux en hormones 17 $\beta$ -œstradiol, testostérone, les concentrations en glycogène et en lipides** contribuent majoritairement (contribution collective : 82,5 %) à la formation de l'**axe 1**. Le **stade de maturité sexuelle**, les **niveaux en progestérone** et la **concentration en lipides** contribuent majoritairement (contribution collective : 71,7 %) à la formation de l'**axe 2**. **Dans le plan principal 1 - 2** (Figure 43), les concentrations en 17 $\beta$ -œstradiol, testostérone sont significativement et positivement corrélées à l'axe 1 en opposition aux concentrations en glycogène et lipides. L'indice de maturité sexuelle (IMS), les concentrations en lipides et progestérone sont significativement et positivement corrélées à l'axe 2.

La première composante principale oppose particulièrement les individus collectés en **période printanière** (mai 2003 et 2004 : observations *A54, S53, S54*) à ceux collectés en période estivale ou hivernale (août 2003, février 2004 : observations *A83, S83, S24, A24*). Ces derniers ont des **concentrations en glycogène** (5,1 - 11,2 mg.g<sup>-1</sup>) et des niveaux en **17 $\beta$ -œstradiol** (1,93 - 2,3 ng.g<sup>-1</sup>), **testostérone** (0,70 - 1,65 ng.g<sup>-1</sup>) plus faibles que ceux issus des périodes printanières (glycogène : 9,7 - 22,1 mg.g<sup>-1</sup> ; 17 $\beta$ -œstradiol : 0,72 - 0,97 ng.g<sup>-1</sup> ; **testostérone** : 0,44 - 0,52 ng.g<sup>-1</sup>).

La seconde composante principale oppose des individus caractérisés par un **stade de maturité sexuelle** et des concentrations en **lipides totaux** élevés (*S54* : IMS = 3,7 ; [Lipides] = 10,8  $\pm$  1,0 mg.g<sup>-1</sup>) à des individus caractérisés par un stade de maturité sexuelle et des concentrations en lipides totaux faibles (*A84, S84, S114* : IMS = 2,2 - 2,4 ; [Lipides] = 4,7 - 7,9 mg.g<sup>-1</sup>).

**Cette analyse met en relief la période printanière pour laquelle les animaux présentent d'une manière générale des niveaux en hormones stéroïdiennes réduits en concomittance avec un IMS et des concentrations en réserves énergétiques élevées. Pour les autres périodes de prélèvement, l'IMS est réduit et les niveaux en hormones stéroïdiennes plus élevés.**

### Plan principal 1 - 2 : 70,4 %

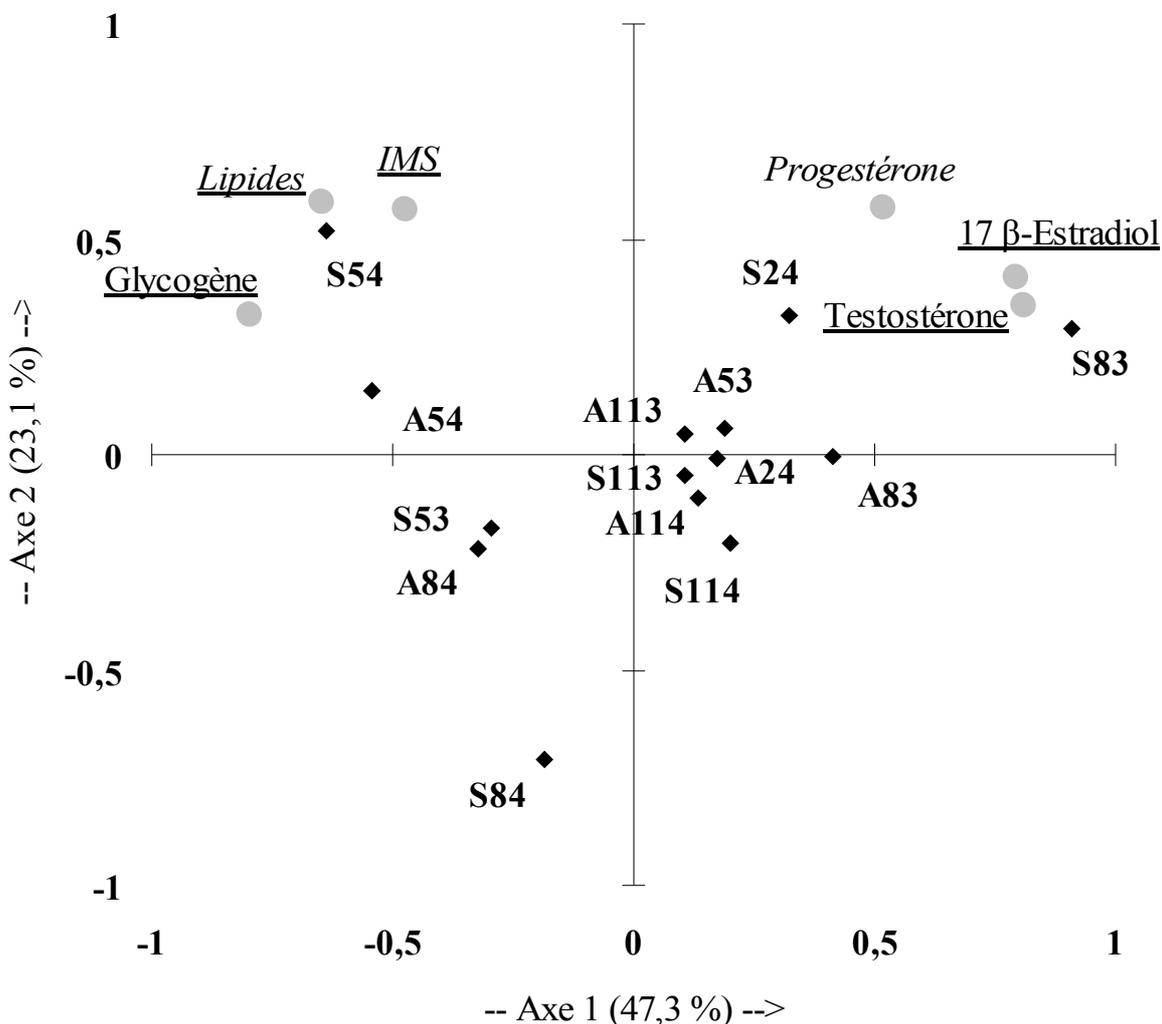


Figure 43 :Représentation des variables (●) et des observations (◆) dans le premier plan principal. Les concentrations en 17β-œstradiol, testostérone, glycogène et lipides sont significativement corrélées à l'axe 1, les concentrations en lipides, progestérone et IMS à l'axe 2. Les observations sont codées de la manière suivante : initiale du site -S (Seine) ; A (Authie) -, période de prélèvement - 53 (mai 2003) ; 83 (août 2003) ; 113 (novembre 2003) ..etc -.

#### VI.6 Discussion des résultats

Conformément aux données de la littérature (Dales, 1950 ; Olive et Garwood, 1981 ; Mettam et al., 1982 ; Abrantes et al., 1999) les femelles sont majoritaires dans les populations de *N. diversicolor* d'Authie et de Seine. Dans la littérature, l'étude du cycle

reproducteur des femelles fait exclusivement appel au diamètre ovocytaire. Dans le présent travail, les **stades de maturité sexuelle** des femelles sont aisément identifiés. Ils permettent d'établir rapidement l'état de maturité sexuelle d'une femelle. Le calcul de l'indice de maturité sexuelle fournit une information numérique et synthétique.

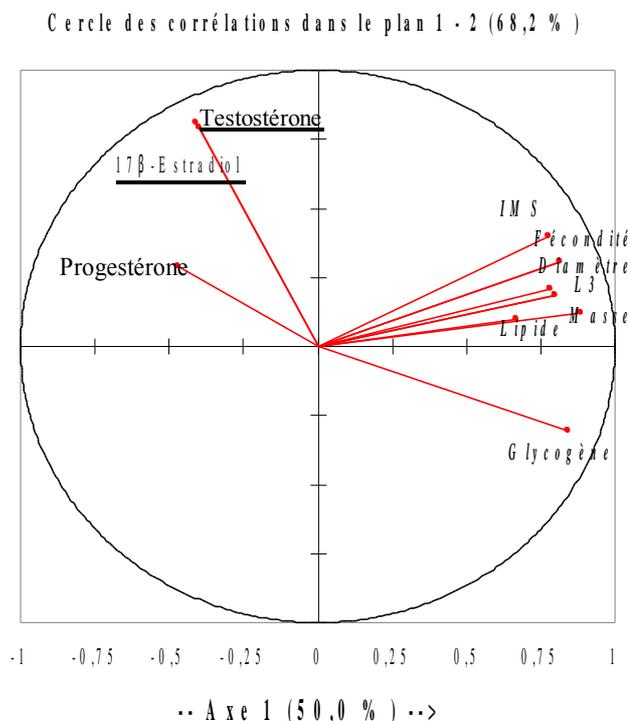
Olive (1984) (cité dans Marty, 1997) a établi le modèle de l'ovogenèse. Selon cet auteur, la phase rapide de maturation sexuelle et somatique, préalable à la reproduction des individus, ne pourrait se faire que dans une période spécifique déterminée par un rythme endogène et un signal externe. Le signal externe de déclenchement varie selon les espèces : la salinité, la température, la photopériode, le cycle lunaire (Marty, 1997). Chez *N. diversicolor*, les facteurs environnementaux modulant la reproduction sont la température (Dales, 1950), la nourriture (Olive et Garwood, 1981), le cycle lunaire (Dales, 1950 ; Bartels-Hardege et Zeeck, 1990). Un changement de régime de température est généralement mis en avant pour expliquer les différences dans les périodes de reproduction (Kristensen, 1984) de populations géographiquement distantes.

Les résultats acquis sur les stades de maturité sexuelle suggèrent que la période de reproduction se situerait entre février et mai sur l'estuaire de l'Authie, et autour de mai sur l'estuaire de Seine. **Considérant la comparaison intersite, la période de reproduction semble étendue en Authie par rapport à la Seine.** En l'occurrence, même si l'estuaire de l'Authie se trouve légèrement au nord de celui de Seine, les différences de température sont minimales (Chapitre III, Figure 14) et ne peuvent expliquer le délai de l'apparition d'individus sexuellement matures en Seine.

Quels indicateurs physiologiques chez *N. diversicolor* permettent d'avérer l'état de santé des populations étudiées ? Du fait des **influences mutuelles et relatives** d'un certain nombre de facteurs endogènes (taille, masse, état reproducteur) sur les indicateurs biologiques chez cette espèce, **les paramètres biologiques étudiés (biométriques, biochimiques, physiologiques) doivent être analysés statistiquement de manière conjointe.** Par conséquent, les **méthodes statistiques multidimensionnelles** du type analyse en composantes principales, intégrant, d'une part l'ensemble des variables étudiées, et d'autre part l'ensemble des individus des populations de Seine et d'Authie permettent clairement de caractériser le statut de ces deux populations. Les observations sont moyennées par classe de masse (annexe 4). L'analyse extrait dix nouveaux axes dont les axes 1 et 2 pour lesquels les valeurs propres sont supérieures à 1 (respectivement : 5,0 et 1,8). La masse fraîche, la

concentration en glycogène, le stade de maturité sexuelle, le diamètre ovocytaire, la longueur L3, la fécondité contribuent majoritairement (80,1 %) à la formation du premier axe. Les concentrations en  $17\beta$ -œstradiol et en testostérone contribuent à 79 % à la formation du second axe.

**Le plan principal 1-2 conserve 68,2 % de l'information de départ.** Dans le cercle des corrélations des variables dans le plan principal 1 - 2 (Figure 44), l'IMS, la fécondité, le diamètre (ovocytaire), la longueur L3, la masse (fraîche), les concentrations en lipides et en glycogène sont significativement corrélées à l'axe 1 ; les concentrations en  $17\beta$ -œstradiol et testostérone à l'axe 2. **Les variables biométriques, l'état reproducteur et les réserves énergétiques sont fortement et significativement corrélés.**



**Figure 44: Cercle des corrélations des variables aux axes 1 et 2. Les variables *IMS, fécondité, diamètre (ovocytaire), L3, masse (fraîche), lipides et glycogène* sont significativement corrélées à l'axe 1 ; les concentrations en  $17\beta$ -œstradiol et testostérone à l'axe 2.**

Les observations sont représentées dans le plan principal 1-2 en fonction du site de prélèvement dans la Figure 45. Dans la partie positive de l'axe 1, les observations présentent **une bonne condition générale (concentrations en réserves énergétiques, taille, masse élevées) et/ou sont des individus à proximité de la maturité sexuelle ou sexuellement matures (IMS, fécondité, diamètre élevés)**. Par opposition, les observations dans la partie négative de l'axe 1 présentent une **condition générale et/ou un état reproducteur diminué ou sont sexuellement immatures (juvéniles)**. Ainsi, dans la partie positive du premier axe, sont représentés les spécimens de masse élevée de l'Authie (masse > 300 mg) mais également les spécimens de Seine collectés en mai (observations N° 20 et 21), période la plus probable

de reproduction sur ce site et pour laquelle des spécimens de masse élevée peuvent être observés. Par contre, les spécimens de masse faible de l'Authie et la majorité des spécimens de Seine sont représentés dans la partie négative du premier axe en accord avec des masses, tailles, fécondités, concentrations en glycogène généralement réduites.

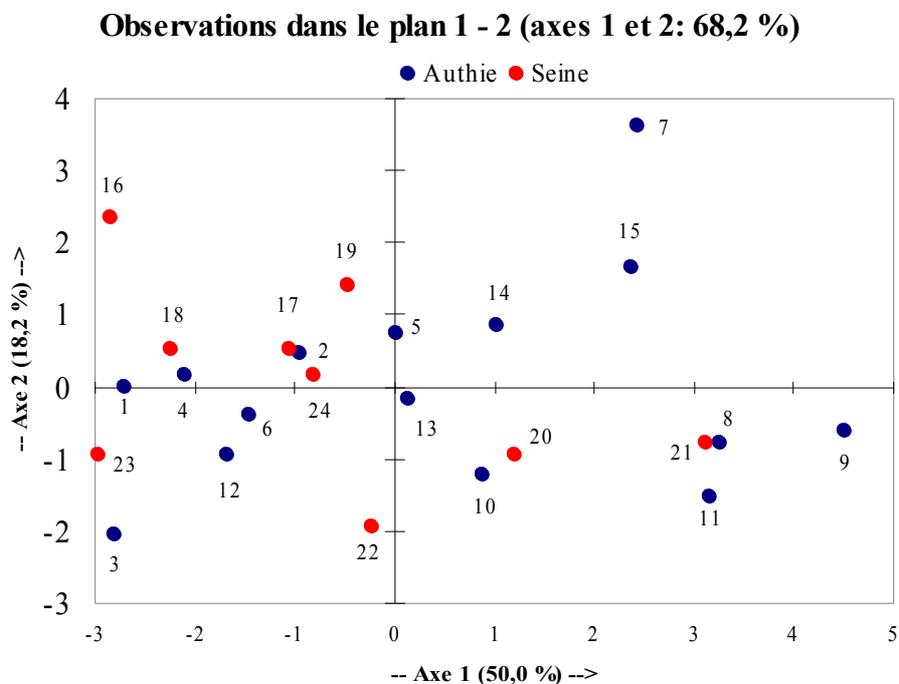


Figure 45: Représentation des observations de l'Authie (●) et de la Seine (●) dans le plan principal 1 - 2.

L'état reproducteur des femelles, notamment, diffère significativement entre les sites. Les femelles sexuellement matures sont observées uniquement dans certaines classes de masse (Figures 35 et 37). En Seine, la masse de ces individus est comprise entre 100 et 400 mg, en Authie entre 400 et 700 mg. **La masse des femelles à maturité sexuelle est donc différente sur les deux sites.**

Chez les néréidés présentant le mode de reproduction monotélique, un maximum de ressources est investi dans la production des gamètes. Chez *N. diversicolor* précisément, 40 % de la production populationnelle est sous forme de gamètes (Chambers et Milne, 1975). Au niveau individuel, il est estimé que 70 % de l'énergie totale de l'organisme est investie dans la production et la maturation des gamètes (Olive, 1983 ; Grémare et Olive, 1986). En effet, au cours de l'ovogenèse, les ressources de l'individu sont mobilisées ; les cellules doivent se diviser puis accumuler des réserves.

Dales (1957) démontre, par ailleurs, que les femelles stockent au sein des ovocytes des quantités importantes de réserves (glycogène, lipides). De Vooys (1975) observe chez *Arenicola marina* que les individus juvéniles et sexuellement immatures ont des réserves en glycogène très élevées. Lorsque les animaux initient la gamétogenèse et que des gamètes commencent à apparaître, les réserves en glycogène sont mobilisées. Par contre l'auteur ne met pas une telle relation en évidence concernant les lipides. Dales (1957) étudie les concentrations en glycogène et lipides en relation avec l'état de maturité sexuelle des femelles de *N. diversicolor*. Très clairement l'auteur met en évidence des niveaux réduits en lipides après la période de ponte. D'autre part, la proportion plus importante des lipides dans les constituants des réserves énergétiques observée en période hivernale chez les annélides des deux sites pourrait être expliquée par une conversion du glycogène en lipides nécessaire à la phase finale de maturation sexuelle. Chez *N. virens* il est suggéré que le glycogène soit un substrat métabolique essentiel pour la conversion en lipides chez les animaux initiant la gamétogenèse (Pellerin-Massicotte, 1994). **Ainsi, l'état reproducteur influence significativement les niveaux en réserves énergétiques.**

Dans ce travail, le nombre d'ovocytes est mis en relation avec le stade de maturité sexuelle et les mesures biométriques des animaux. Le nombre d'ovocytes croît avec le stade de maturité sexuelle (Tableau 36). Les individus de Seine à classe de masse équivalente à celle de l'Authie ont un IMS supérieur, c'est-à-dire que la fécondité relative est plus élevée en Seine qu'en Authie. Cependant, le nombre d'ovocytes produits est extrêmement dépendant du volume dans lequel ils se développent (Olive, 1983). Or, les individus de l'Authie se reproduisent dans une classe de masse (et de longueur et nombre de segments) bien supérieure à ceux de la Seine. **Aussi, si l'on considère la fécondité globale, la production d'ovocytes par les femelles de l'Authie est supérieure à celle de la Seine.**

Les mécanismes physiologiques reproducteurs sont modulés et régulés par des contrôles endocriniens. L'activité neuroendocrinologique chez *N. diversicolor* a fait l'objet de nombreuses études (Golding, 1983 ; Golding, 1987 ; Golding et Yuwono, 1994). Dans le cas présent, les hormones stéroïdiennes sont suspectées de jouer le rôle de modulateur dans la physiologie de la reproduction de *N. diversicolor*. Chez les annélides polychètes, le rôle des hormones stéroïdiennes dans le processus de gamétogenèse est peu connu (Mouneyrac et al., 2006 ; Durou et Mouneyrac, accepté). **Dans la présente étude, les individus caractérisés par un stade de maturité sexuelle avancé (mature ou en fin de vitellogenèse) et des**

**teneurs en réserves énergétiques élevées, présentent des niveaux en hormones stéroïdiennes réduits.** Ces résultats sont en accord avec ceux de Garcia-Alonso et Rebsher (2005) qui quantifient chez des *N. virens* mâles et femelles le  $17\beta$ -œstradiol. Les concentrations de cette hormone varient en fonction du sexe et de l'âge des spécimens. Chez les femelles dans une phase vitellogénique avancée et chez des mâles contenant des spermatocytes, les concentrations en  $17\beta$ -œstradiol étaient diminuées en comparaison à celles mesurées chez des spécimens plus jeunes et moins avancés dans les processus de gamétogenèse. De plus, **ces auteurs ont identifié un récepteur aux oestrogènes présents sur les éléocytes, les cellules cœlomiques dans lesquelles la vitellogénine est synthétisée.** Ces travaux ainsi que les présents résultats supportent donc l'hypothèse que les hormones stéroïdiennes synthétisées au début du développement de l'ovocyte jouent un rôle dans l'initiation de la gamétogenèse chez les néréidés.

Des indicateurs de l'état de santé général des organismes sont identifiés et validés chez *N. diversicolor* et permettent de discriminer le site d'origine des animaux : les relations taille - masse, l'indice de maturité sexuelle et le nombre d'œufs, les réserves énergétiques. Dans l'analyse en composantes principales, la première composante extraite est significativement corrélée aux variables biométriques (tailles, masse), aux réserves énergétiques (glycogène, lipides), aux paramètres de la reproduction (stade, nombre d'ovocytes). Ainsi, elle discrimine dans la partie positive des individus ayant des scores élevés pour ces variables à des individus aux scores faibles dans la partie négative. La majorité des individus représentés dans la partie positive de la première composante sont originaires de l'Authie, les seuls individus de Seine présents dans cette partie correspondent aux prélèvements printaniers.

## VIIDiscussion générale

Cette étude est avant tout stimulée par le manque d'indicateurs biologiques dans les milieux estuariens. Pour évaluer l'état de qualité des écosystèmes, plusieurs méthodologies sont disponibles : l'approche chimique, les indices d'évaluation de l'état des peuplements, les biomarqueurs. Si des indicateurs biologiques représentatifs de la colonne d'eau existent et sont couramment utilisés, des indicateurs biologiques du compartiment sédimentaire nécessitent d'être développés.

Dans le cadre du PNETOX II (2002-2004) **une approche multiparamétrique est développée chez une espèce clé du compartiment sédimentaire du milieu estuarien** au cours d'un **suivi de longue durée** (3 années, 12 périodes de prélèvements). Dans ce contexte, des **biomarqueurs** (MT, AChE, GST, CAT, TBARs) classiquement utilisés et/ou recommandés dans les programmes de biosurveillance de l'environnement sont mesurés chez l'annélide polychète *N. diversicolor* originaires de site comparativement sain et pollué (estuaires d'Authie et de Seine respectivement). Ces biomarqueurs rendent compte d'une adaptation - les **biomarqueurs de défense** - ou d'effets délétères - les **biomarqueurs de dommage** - suite à l'exposition à des contaminants. En complémentarité avec l'étude de terrain, la **tolérance de *N. diversicolor*** à des contaminants communs en estuaires comme les métaux est étudiée. En effet, la mise en œuvre des mécanismes de la tolérance est considérée comme responsable d'une réallocation des ressources énergétiques de l'organisme pouvant avoir pour conséquence de diminuer l'investissement des ressources pour certaines fonctions physiologiques comme la croissance ou la reproduction. Ainsi, un des objectifs était de tester *in situ* les **réserves énergétiques** comme biomarqueurs de contamination. Des indices de condition générale permettent d'établir l'état de santé des organismes ; par conséquent et dès lors qu'aucun indice de ce genre n'existait chez *N. diversicolor*, il s'avérait nécessaire d'explorer plusieurs **variables biométriques** afin de déterminer un indicateur de condition générale chez cette espèce. Enfin, la **reproduction** constitue un investissement énergétique considérable et son altération aura des conséquences populationnelles. Aussi, la physiologie de la reproduction de *N. diversicolor* a fait l'objet d'un effort significatif de recherche.

Enfin, une priorité actuelle de l'écotoxicologie est de relier les changements au niveau individuel à des conséquences à l'échelle de la population. Dans le contexte des études écotoxicologiques en milieu estuarien, cette priorité prend pleinement sa signification dès lors

que dans ces milieux naturellement stressés les peuplements se résument souvent à des populations isolées (Grall et Glémarec, 2003).

### **Mécanismes de défense et d'altérations**

Bien que l'utilisation de la **métallothionéine** (MT) soit préconisée dans les programmes de biosurveillance de la qualité de l'environnement (BEQUALM) et que la présence de composés type MT est démontrée chez *N. diversicolor* (Berthet et al., 2003), **l'absence de corrélations positives entre taux de ces composés et niveaux de contamination métallique en Authie et en Seine** (une situation déjà rencontrée sur des sites anglais présentant des degrés de contaminations encore plus contrastés, Berthet et al., 2003) **prohibent l'utilisation de *N. diversicolor* comme matrice pour la détermination du biomarqueur MT (Poirier et al., 2006)**. La concentration en composés type MT intègre les processus de biosynthèse et de dégradation de ces derniers mais ne permet pas d'appréhender les taux de renouvellement de ces composés. Ainsi un taux de renouvellement plus élevé pourrait être responsable d'une séquestration des métaux plus efficace chez les organismes exposés que chez les organismes issus d'un site moins contaminé par les métaux. **Expérimentalement, Ng et al. (comm. pers.) démontrent que le turnover de la MT est plus court chez des annélides (*Perinereis aibuhitensis*) préalablement exposées au Cd que chez les témoins.**

L'influence de la **masse des organismes** sur les réponses des biomarqueurs AChE, GST, CAT, TBARs est systématiquement évaluée dans le cadre du suivi du PNETOX. Aucune influence de la masse n'est mise en évidence sur les activités GST et CAT ainsi que sur les concentrations en TBARs. Dans le cas de l'AChE, une influence occasionnelle est détectée, l'activité étant plus élevée chez les organismes de masse plus faible. Concernant le suivi des activités AChE chez *N. diversicolor*, aucune différence intersite claire n'est révélée au cours de la première année de prélèvement. Même si la comparaison des activités AChE des organismes de masse comparable ne met pas en évidence de différence intersite systématique, **dans une majorité de cas l'activité AChE est inférieure en Seine**. En 2002, l'activité de la GST est plus élevée dans les petites polychètes de la Seine que dans les grandes de l'Authie uniquement en février. À masse comparable, **une différence intersite est généralement observée en 2003 et 2004**, même si elle n'est pas toujours significative. En ce

qui concerne l'activité de la **CAT et les concentrations en TBARS, aucune différence intersite** consistante n'est mise en évidence au cours de l'étude (Durou et al., soumis).

**Nous obtenons des résultats similaires chez *N. diversicolor* issue d'environnements comparativement sain et contaminé de la côte Atlantique du Maroc.** La seule différence avec les sites français concerne l'activité de la CAT, plus élevée chez les organismes du site contaminé probablement en relation avec un stress oxydant plus marqué en raison des conditions naturelles d'exondation, de température et d'oxygénation (Ait Alla et al., 2006). Par ailleurs, Pérez et al. (2004) observent *in situ* chez *N. diversicolor* des activités plus élevées pour la GST et la CAT et diminuées pour l'AChE chez des organismes prélevés à proximité d'un chantier naval ou sur des stations soumises à des rejets d'effluents domestiques.

En laboratoire, Moreira et al. (2006) démontrent que les organismes exposés à des sédiments contaminés issus du milieu naturel présentent un taux de peroxydation lipidique plus élevé et l'induction de systèmes antioxydants de défense (CAT, GST, SOD). Concernant l'activité de l'AChE, l'exposition à des pesticides (organophosphorés, carbamate) entraîne une inhibition de l'enzyme au terme de 2 et 7 jours de maintien respectivement (Scaps et al., 1997). Les auteurs recommandent notamment l'utilisation de l'activité AChE chez ce modèle biologique dans les programmes de biosurveillance en milieu estuarien.

Des travaux concernant une autre espèce de néréidé intrasédimentaire estuarienne, *Laeonereis acuta*, sont disponibles dans la littérature (Geracitano et al., 2002, 2004a, 2004b). *In situ*, les systèmes antioxydants de défense (CAT, SOD, GST) sont plus actifs chez les organismes prélevés sur une station impactée par des effluents (urbains, agricoles et industriels) en comparaison à ceux originaires d'une station indemne d'atteinte (Geracitano et al., 2004a). En laboratoire ces systèmes de défense antioxydants sont induits en réponse à l'exposition chronique au Cu (Geracitano et al., 2002, 2004b).

**Ainsi, des mécanismes de défense et d'altération au niveau biochimique sont mis en évidence chez *N. diversicolor*, une espèce clé du milieu estuarien au cours d'un suivi de longue durée.**

### **La tolérance aux métaux**

Les recherches concernant les marqueurs biochimiques chez *N. diversicolor* révèlent l'existence de mécanismes de défense chez cette espèce et chez d'autres annélides

(*Laeonereis acuta*). D'autres processus sont décrits en ce qui concerne les contaminants métalliques comme la **sécrétion de mucus**, capable de chélater les métaux à l'extérieur de l'organisme, et la **biominéralisation des métaux** incorporés conduisant à leur détoxification (Mouneyrac et al. 2003a ; Poirier et al. 2006 et littérature citée par ces auteurs). Il n'est donc pas surprenant que des **populations tolérantes** de *N. diversicolor* soient mises en évidence dans différents milieux contaminés par des métaux (Bryan et Hummerstone, 1971, 1973 ; Hateley et al., 1989 ; Mouneyrac et al., 2003a). Aussi, l'utilisation de l'annélide intrasédimentaire *N. diversicolor* est pertinente pour étudier les concepts de tolérance et de coût de tolérance à l'égard des métaux (Cd, Cu, Zn). Dans cette optique, deux approches ont été mises en œuvre : i) la réalisation de tests toxicologiques ii) l'estimation des concentrations en réserves énergétiques (glycogène and lipides) chez des organismes originaires de sites contaminé (Seine) et de référence (Authie) (Durou et al., 2005a).

La tolérance **aux métaux des *N. diversicolor* de Seine** en comparaison à celles de l'Authie est examinée pour le Cd, le Cu et le Zn (Durou et al., 2005a). **Exposés au Zn, les organismes de Seine survivent plus longtemps que ceux de l'Authie.** La tolérance de *N. diversicolor* aux métaux est un phénomène bien documenté. Ainsi les polychètes issues d'un site extrêmement contaminé en Cornouaille anglaise (Restrouget Creek) sont tolérantes aux Zn, Cd et Cu (Bryan et Hummerstone, 1971, 1973 ; Hateley et al., 1989 ; Mouneyrac et al., 2003a). Nous démontrons également que la population d'un site contaminé de la côte Atlantique marocaine est tolérante au Zn et au Cu (**Ait Alla et al., 2006**). **Il semble que le degré de contamination du sédiment conditionne l'apparition de la tolérance chez *N. diversicolor*.** Ainsi les organismes de Seine ne sont pas tolérants au Cd ni au Cu contrairement aux animaux du site anglais. Dans le cas du site anglais, les niveaux de contamination métallique du sédiment auxquels sont exposés les animaux sont considérablement plus élevés. Le rapport des concentrations dans les sédiments de la Restrouget Creek et de la Seine est de deux pour le Cd, de dix pour le Zn et de cent pour le Cu.

Est-ce que la tolérance des organismes de Seine est liée à la différence de salinité observée en moyenne par rapport à l'estuaire de l'Authie (Chapitre III, Tableau 15) ? La tolérance des organismes aux métaux est donc revisitée en tenant compte de la **salinité** du milieu d'exposition : 15, c'est-à-dire la salinité généralement expérimentée par les annélides de Seine contre 25, salinité moyenne généralement par les annélides de l'Authie. Quel que soit le site d'origine des animaux, leur survie à l'exposition est prolongée à la **salinité** la plus faible. Ces résultats sont en accord avec la littérature qui démontre que la tolérance de *N.*

*diversicolor* aux métaux est favorisée à salinité plus faible que celle de l'eau de mer naturelle (Bryan, 1976 ; Fernandez et Jones, 1990 ; Ozoh, 1992). Par contre, les animaux de Seine maintenus à une salinité de 25 survivent plus longtemps que ceux de l'Authie ; **ainsi la salinité du site de la Seine ne peut être le seul facteur responsable de la tolérance de ces animaux.**

Dans cette première série d'expérimentations des spécimens représentatifs des populations de *N. diversicolor* de Seine (spécimens de masse faible : 70 mg) et d'Authie (spécimens de masse élevée : 430 mg) sont exposés au Cd, au Cu ou au Zn. L'influence de la masse des organismes sur la sensibilité à l'exposition métallique est par la suite prise en considération lors d'une seconde série de tests toxicologiques. Chez les animaux du site sain, les spécimens de masse faible (environ 100 mg) survivent moins longtemps que les spécimens de masse élevée (environ 320 mg) à l'exposition au Zn. **Ce résultat renforce donc l'idée que les spécimens de Seine, de masse plus faible que ceux de l'Authie, ont réellement acquis une tolérance au Zn.**

Si on considère l'ensemble des annélides constituant les populations de Seine et d'Authie et non un sous-échantillon particulier (en fonction de la masse ou du stade de maturité sexuelle), les niveaux en réserves énergétiques et plus particulièrement en glycogène sont généralement diminués chez les organismes de Seine (Figure 45).

Dans les milieux estuariens, la **salinité** est un paramètre déterminant intervenant dans la biologie des espèces. Ce paramètre est donc à prendre en considération pour l'étude du métabolisme énergétique. **La présente étude démontre *in situ* et dans le cadre d'expérimentations en laboratoire que la salinité n'influence pas les concentrations en lipides et glycogène en raison de l'euryhalinité de l'espèce *N. diversicolor*.**

La population de *N. diversicolor* de Seine en contact étroit avec des sédiments hautement contaminés est susceptible d'avoir été soumise à une sélection des individus tolérants et une élimination progressive des individus sensibles. La tolérance de la population est démontrée pour au moins un contaminant commun, le Zn. Comme nous le présentons dans le chapitre II, **un profil de sélection de la population de Seine** est démontré au niveau du génome fonctionnel et non fonctionnel (Denis, comm. pers., PNETOX). **Nos résultats sur les taux des réserves énergétiques en Seine et Authie semblent donc parfaitement cohérents avec le concept de coût de tolérance.**

Toutefois, le coût de la tolérance pourrait ne pas être seul en cause. Le métabolisme énergétique dépend en effet de la nourriture disponible, laquelle peut être réduite lorsque les

espèces qui la constituent sont elles-mêmes soumises à des stress environnementaux (cf. Chapitre V). Si les disponibilités alimentaires sont moins riches en Seine qu'en Authie au moins à certaines périodes, sur un cycle annuel rappelons qu'il n'est pas mis en évidence de relation directe entre ressources et réserves énergétiques. De plus, *N. diversicolor*, espèce très opportuniste, est considérée comme capable d'assurer ses besoins énergétiques en jouant sur différents modes et sources d'alimentation (Olivier et al., 1995; Meziane et Retière, 2002). Quelles peuvent être les conséquences de ce coût de tolérance sur la reproduction ?

### **Physiologie de la reproduction**

**Les femelles de Seine en comparaison à celles de l'Authie sont matures sexuellement et aptes à se reproduire à des masses plus faibles et présentent une période de reproduction à la fois plus tardive et moins étendue.**

*In situ*, le maintien des populations de *N. diversicolor* et d'invertébrés plus généralement, dont le rôle-clé dans la structure et le fonctionnement des écosystèmes est avéré, est largement dépendant du recrutement de nouvelles générations. Ce recrutement est conditionné par le succès reproducteur des organismes. **Les paramètres en lien avec la reproduction sont généralement considérés comme des prédicteurs fiables des modifications à l'échelle populationnelle. Ces paramètres, incluant le stade de maturité sexuelle et le nombre d'ovocytes des femelles, sont caractérisés chez *N. diversicolor* dans le présent travail. L'évaluation du nombre d'ovocytes produits par les femelles peut donc être réalisée facilement.**

Conformément aux données de la littérature, le nombre d'ovocytes est directement dépendant du volume cœlomique ; dès lors que celui-ci est plus élevé, le nombre d'ovocytes est également plus élevé. Ainsi, la masse des femelles, directement proportionnelle au volume de l'organisme, influence significativement le nombre d'ovocytes. **Il en résulte que le nombre d'ovocytes (fécondité globale) des femelles d'Authie a tendance à être plus élevé que celui de Seine. Cependant, les femelles de Seine ont tendance à produire relativement à leur masse (fécondité relative) un nombre d'ovocytes plus élevé que les femelles d'Authie.**

**La présente étude établit pour la première fois les relations entre les profils en réserves énergétiques, le stade de maturité sexuelle et les niveaux en hormones stéroïdiennes (progesterone, 17 $\beta$ -œstradiol et testostérone).**

Aucune différence intersite des niveaux en hormones stéroïdiennes n'est mise en évidence (Tableau 38). Cependant **les états reproducteurs des femelles d'Authie et de Seine diffèrent significativement** suggérant une modulation différente des mécanismes impliqués dans la reproduction. Or, si la quantification des hormones stéroïdiennes rend compte de la synthèse de ces dernières par les organismes, elle ne permet en aucun cas d'appréhender les niveaux en xénobiotiques, à potentiel œstrogénique par exemple, présents dans l'individu. Il est nécessaire d'évoquer la présence de PE en Seine. Celle-ci est actuellement bien documentée. En ce qui concerne les **PCB**, leur présence en Seine est suivie depuis de nombreuses années dans le cadre du Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin (RNO, 1995). Leurs niveaux dans les sédiments et les tissus de *N. diversicolor* sont significativement renseignés dans le cadre PNETOX (cf. Chapitre III). Si les PCB sont reconnus comme PE, un grand nombre de substances de structure chimique différente sont avérées ou soupçonnées d'avoir les mêmes effets. L'activité œstrogénique des **alkylphénols** est bien documentée chez les mammifères, suggérant qu'ils puissent jouer le rôle de perturbateurs endocriniens dans les milieux aquatiques. Ces molécules, récemment accessibles à l'analyse aux concentrations environnementales (Laboratoire de Physico-Toxico-Chimie, Université Bordeaux I, Budzinski et collaborateurs), sont détectées respectivement dans la phase particulaire et la fraction dissoute des eaux de Seine.

### **Outils pour la surveillance de la santé de l'environnement**

Les réponses biologiques analysées chez *N. diversicolor* peuvent être examinées dans une optique d'utilisation comme biomarqueurs. Les marqueurs physiologiques présentent un intérêt particulier puisqu'ils vont vraisemblablement avoir des conséquences à l'échelle populationnelle (Adams et al., 1989 ; Lam et Gray, 2003). La pertinence écologique des réserves énergétiques est reconnue et ces dernières étant proposées comme un lien idéal entre les niveaux d'organisation infra- et supra- individuels (Kooijman, 2000 ; Maltby et al., 2001 ; DeCoen et Janssen, 1997, 2003).

**Les relations entre les biomarqueurs biochimiques (activités AChE, CAT, GST et concentrations en TBARS) et physiologiques (glycogène, lipides et protéines) et contaminants (PCB, HAP, métaux) sont examinées en utilisant une analyse en composantes principales (Durou et al., soumis).** La distribution des données dans le premier plan principal (Figure 46) oppose clairement les résultats de la Seine localisés dans la partie positive de l'axe 1 (corrélé positivement à l'activité de la GST et les concentrations des

contaminants chimiques) et les résultats de l'Authie dans la partie négative de l'axe 1 (corrélé avec des réserves énergétiques élevées). Comme mentionné ci-dessus, la GST est une enzyme de phase II impliquée dans la métabolisation des composés organiques lipophiles tels que les HAP, les PCB détectés à des niveaux élevés dans l'estuaire de la Seine comparativement à l'Authie. De plus cette enzyme joue un rôle dans la protection cellulaire contre le stress oxydatif qui peut être généré par des polluants tels que les métaux, les PCB, les HAP (Michel et al., 1998). Comme cela est discuté précédemment, la déplétion des niveaux en réserves énergétiques pourrait correspondre à un coût de tolérance à un ou des contaminant(s) présents. Similairement, chez d'autres espèces de polychètes exposées à des sédiments enrichis en hydrocarbures, une déplétion du glycogène est observée (Augenfeld et al., 1983 ; Carr et Neff, 1984a). Considérant le plan principal 1 - 3 (Figure 46B), les résultats de Seine et d'Authie sont de nouveau opposés, les premiers étant localisés dans la partie positive de l'axe 3 (corrélé avec des niveaux élevés de PCB) et les seconds dans la partie négative de l'axe 3 (corrélé avec des activités élevées de l'AChE). Les PCB induisent les enzymes de phase I dépendantes du cytochrome P-450 et les produits de biotransformation pourraient jouer un rôle dans l'inhibition de l'AChE (Payne et al., 1996). Selon Leiniö et Lehtonen (2005) il paraît de plus en plus évident que l'activité de l'AChE pourrait être utilisée pour le criblage de stress variés.

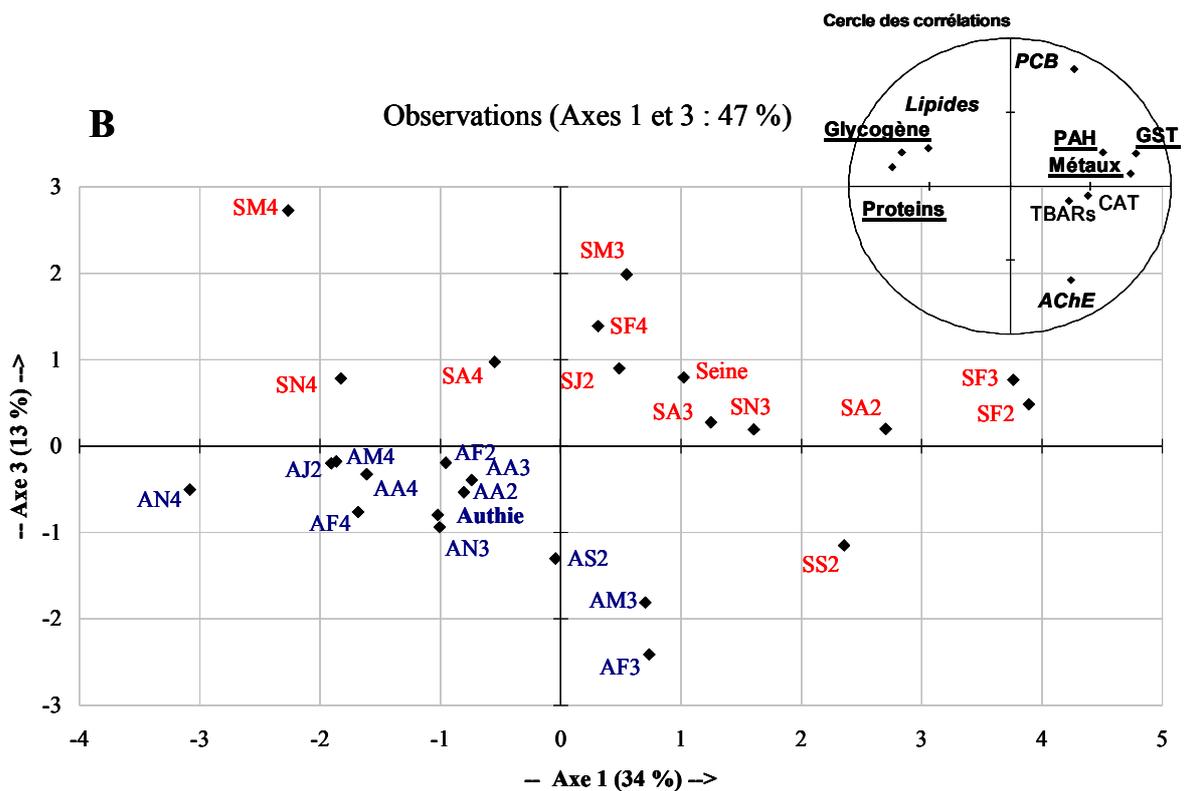
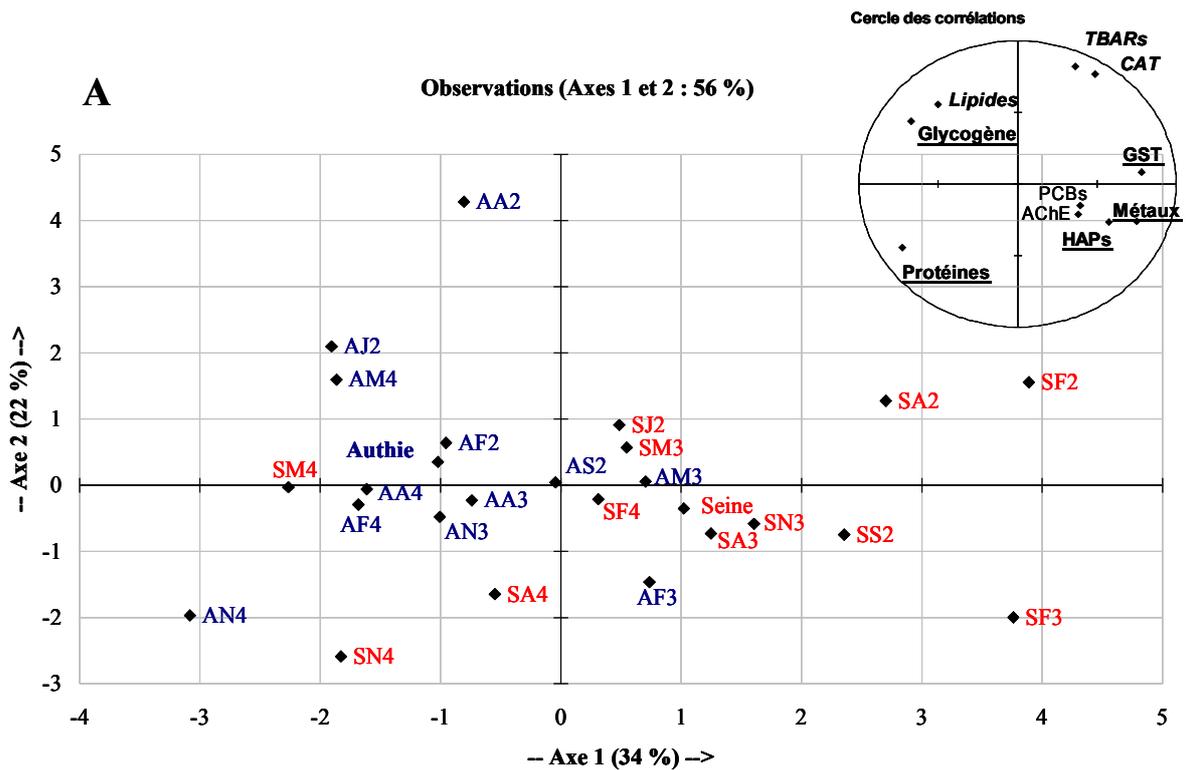


Figure 46: Analyse en composantes principales (A : plan 1-2 ; B : plan 1-3). Les observations sont codées avec l'initiale du site (A = Authie, S = Seine), le numéro du mois (F = février, M = mai, A = août, N = Novembre) et de l'année (2 pour 2002, etc) de prélèvement. Le cercle des corrélations est présenté en « vignette ».

**Pour interpréter correctement un biomarqueur, il est nécessaire de connaître les variations naturelles (« bruit de fond ») de ce dernier.** Le présent travail démontre d'une part qu'une bonne connaissance du modèle biologique est nécessaire pour interpréter les résultats et d'autre part que des facteurs environnementaux et endogènes influencent significativement les niveaux en réserves énergétiques.

L'analyse multivariée de l'ensemble des données biologiques permet de préciser l'influence indirecte de la masse sur les niveaux en réserves énergétiques (cf. Chapitre VI). **La masse est un indicateur global qui rend compte de l'état somatique et reproducteur des *N. diversicolor*.** Les organismes qui présentent une bonne condition générale et/ou qui sont sexuellement matures ont des concentrations en glycogène et lipides élevés. Par contre, les animaux plus jeunes, en phase de croissance segmentaire ou présentant une condition générale dégradée ont des niveaux en réserves énergétiques faibles. Les seuls individus de la Seine présentant des niveaux élevés en réserves énergétiques sont les spécimens collectés en période printanière et qui sont sexuellement matures.

Outre la présence de contaminants dans le milieu, les indicateurs physiologiques sont influencés par un certain nombre de facteurs environnementaux comme la période de prélèvement. **Ainsi l'analyse ponctuelle de paramètres énergétiques ne peut être révélatrice de l'état de santé des populations. De plus il est primordial de tenir compte de l'état reproducteur.**

Nos travaux sur l'influence de la **température** sur les niveaux en réserves énergétiques ont montré que ce facteur influence significativement les niveaux en glycogène. Cependant une mobilisation significative du glycogène n'est observée qu'après au moins sept jours de maintien au laboratoire (Chapitre V, Figure 34). **Aussi, sur le plan technique, le glycogène ne sera pas influencé par d'éventuels écarts de température lors de la manipulation des échantillons entre la collecte et le stockage dans l'azote liquide.** Pour les lipides, le problème ne se pose pas car nous n'avons observé aucun effet de la température sur une période d'un mois.

**Les réserves énergétiques, l'état reproducteur et les variables biométriques sont significativement corrélés (Figure 44).** Dans ce travail, il convenait donc de revisiter les variables biométriques couramment employées chez *N. diversicolor* pour : i) étudier les relations entre les variables d'allongement et la masse, ii.) caractériser la biologie de la croissance des individus, et iii) établir un indicateur général de la condition chez *N. diversicolor*. Les études écologiques concernant la structure des populations de *N.*

*diversicolor* utilisent un grand nombre de paramètres en lien avec la croissance. **Si les relations entre ces paramètres et la masse sont utilisées pour caractériser la structure des populations de néréidés, les relations taille versus masse n'ont jamais été, à notre connaissance, utilisées pour étudier la condition générale des individus originaires de populations expérimentant des conditions environnementales très différentes.**

Les résultats présentés dans le chapitre IV nous ont amené à conclure que l'utilisation de la masse fraîche des spécimens peut être envisagée pour établir un indice de condition générale. Ceci permet de réaliser sur le même individu les mesures de plusieurs variables (biométriques, nombre d'ovocytes par exemple). Les résultats démontrent clairement des différences intersites de la biologie de la croissance des spécimens originaires d'estuaires contaminé de Seine et relativement indemne d'Authie. La croissance pondérale des spécimens de Seine est limitée en comparaison à ceux de l'Authie aboutissant à l'absence de spécimens de grande taille et de masse élevée en Seine. Par ailleurs, l'utilisation des relations taille (L3) versus masse des organismes pour établir leur état général est proposé. Cet indicateur témoigne d'une condition générale diminuée des spécimens de Seine en comparaison à ceux de l'Authie.

Comme nous le mentionnons plus haut la fécondité absolue des femelles d'Authie a tendance à être plus élevée que celle des femelles de Seine en raison des tailles et masses atteintes. **Or le recrutement de juvéniles est largement dépendant de la production d'ovocytes par les femelles et de leur succès reproducteur. Le maintien de la population est directement lié au nombre de juvéniles recruté suite à la reproduction. Ainsi ces paramètres de la reproduction, liés à des variables biométriques aisément mesurables, pourraient constituer des prédicteurs fiables de l'état de la population.**



## VIII Conclusions et Perspectives

Le bon état écologique d'une eau de surface est défini dans la directive cadre sur l'eau comme l'état d'une masse d'eau de surface classée en fonction de l'abondance et de la diversité de certains groupes végétaux et animaux. En ce qui concerne les eaux de transition, il s'agit du phytoplancton, des algues macroscopiques, les angiospermes, la faune benthique invertébrée et l'ichtyofaune. Toutefois, Grall et Glémarec (2003) considèrent que les **peuplements des milieux estuariens, naturellement stressés, se résument souvent à une juxtaposition de populations**. Il apparaît donc pertinent d'envisager l'évaluation du risque au niveau populationnel en s'adressant à des espèces qui ont un rôle important dans le fonctionnement de l'écosystème ce qui est manifestement le cas de notre modèle biologique, *N. diversicolor*.

**Au plan fondamental, la présente étude établit pour la première fois les relations entre le stade de maturité sexuelle, les niveaux en réserves énergétiques et en hormones stéroïdiennes.** Les résultats nous conduisent à faire l'hypothèse que les hormones stéroïdiennes sont synthétisées au début de l'apparition des ovocytes ; les niveaux en hormones stéroïdiennes diminuant au cours du processus de maturation sexuelle en raison d'une modification de la stéroïdogénèse comme cela est observé chez les vertébrés inférieurs (Nagahama, 1987). **Ceci constitue un acquis essentiel et préalable pour étudier les mécanismes de la vitellogénèse chez cette espèce.**

En étroite complémentarité avec d'autres chercheurs partenaires du programme PNETOX, nous validons **l'utilisation *in situ* des activités GST, AChE et des concentrations en réserves énergétiques comme biomarqueurs** au cours d'un suivi de trois années comprenant quatre prélèvements saisonniers permettant de prendre en compte l'influence potentielle des facteurs endogènes (masse, stade de maturité sexuelle) et exogènes (température, salinité).

Nous mettons au point **un indicateur taille - masse** qui, testé en nature sur plus d'un cycle annuel, révèle clairement une différence intersite de la condition des organismes des estuaires d'Authie et de Seine. Cet indicateur pourrait être utilisé à une plus grande échelle,

notamment sur des sites de disponibilité alimentaire et de degré de contamination plus variés. Une démarche en ce sens est d'ores et déjà engagée sur l'estuaire de la Loire qui présente un niveau de contamination plus modéré que celui de la Seine.

**Dans le présent travail, les indicateurs au niveau individuel démontrent un état physiologique détérioré chez les organismes de Seine.** Très clairement, les organismes de Seine se reproduisent à une masse plus faible que les organismes d'Authie. La conséquence directe de ce phénomène est l'absence de spécimens de taille et masse élevées dans la population. La fécondité absolue étant directement dépendante du volume corporel des organismes, le recrutement de juvéniles pourrait être limité dans le cas de la population de Seine.

Dans le cadre du programme PNETOX, la structure (*étude démographique*) et l'évolution temporelle (*dynamique des populations*) des populations de *N. diversicolor* de Seine et d'Authie sont étudiées par des écologues (Gillet et coll.). Considérant la **structure des populations**, neuf cohortes de taille sont présentes en Authie et cinq seulement en Seine au cours du suivi des trois années. Quant à l'étude de **l'évolution temporelle de ces cohortes**, elle fait apparaître deux recrutements annuels de nouvelle génération en Authie contre un seul recrutement annuel pour la Seine. De plus, les **densités** de la population en Seine sont significativement réduites par rapport à celles de l'Authie (Durou et al., 2005b). Au début de l'étude du PNETOX, les densités dans les deux sites sont sensiblement identiques. En Seine, une tendance générale se dégage sur l'ensemble de l'étude avec une décroissance importante de la densité, atteignant un ordre de grandeur entre le premier et le dernier prélèvement. **Il ne s'agit pas d'un phénomène limité à notre station de prélèvement puisque des prélèvements annuels sur l'ensemble de l'estuaire indiquent une tendance similaire (Cellule de Suivi de la Qualité du Littoral Haut-Normand, Pers. Comm.)**. Des théories sont élaborées qui lient la taille de la population d'une espèce donnée à la capacité de l'espèce à se maintenir dans son milieu (« *minimum viable population* »). Les populations de petite taille seraient plus susceptibles de disparaître et on s'attend à ce que les stress exacerbent les effets des fluctuations environnementales et impactent la capacité des populations à recouvrer leur état initial après des oscillations négatives (Maltby et al., 2001). La contradiction entre l'existence de populations résistantes et le statut détérioré des populations ou des communautés en Seine s'explique probablement par le coût énergétique dû au maintien des mécanismes de défense (enzymes, métallothionéine, biominéralisation...), ce qui conduit à

une modification de l'allocation de l'énergie normalement dévolue au métabolisme de base, à la croissance et à la reproduction.

Si le nombre **d'études des PE chez les invertébrés** est actuellement limité en raison du fait que leur système hormonal est très peu connu par rapport à celui des vertébrés, le présent travail permet de renseigner sur la présence et le rôle des hormones stéroïdiennes chez *N. diversicolor*. Cependant, afin d'avérer d'éventuels effets PE chez *N. diversicolor*, il est nécessaire de caractériser les expositions potentielles des organismes aux PE. Ainsi, les récentes avancées biotechnologiques comme les tests *in vitro* utilisant des gènes rapporteurs luminescents ou des sondes biochimiques fluorescentes et la bonne spécificité de ces techniques permettrait de caractériser le potentiel œstrogénique des sédiments de Seine. Par ailleurs, dans le cas où l'exposition aux PE des spécimens de Seine via le compartiment sédimentaire serait avérée, l'étude de l'influence des PE sur l'état d'avancement de la maturité sexuelle des animaux serait nécessaire. Ainsi, il conviendrait d'expérimenter en laboratoire l'exposition des spécimens durant plusieurs périodes de leur cycle de vie à des contaminants pour lesquels les effets PE sont reconnus.

**La tolérance de *N. diversicolor* au Zn est révélée en estuaire de Seine.** Par ailleurs, du fait de la multitude de contaminants présents, la population pourrait présenter des tolérances à d'autres contaminants. Les mécanismes qui soutiennent la tolérance aux stress chimiques incluent notamment des enzymes impliquées dans les biotransformations de contaminants lipophiles telles que les monooxygénases à cytochrome P-450. **L'induction de ce biomarqueur suite à l'exposition à des xénobiotiques, ainsi que le support génétique de celui-ci, sont identifiés chez une espèce proche, *Nereis virens*.** Ainsi, l'activité EROD supportée par le cytochrome P-450, seul biomarqueur faisant actuellement l'objet d'une normalisation chez le poisson, pourrait permettre de caractériser les mécanismes de défense mis en place par *N. diversicolor* contre les contaminants lipophiles bien représentés en Seine. **De plus l'éventuelle induction de ce biomarqueur de défense en association aux mesures des réserves énergétiques permettrait d'argumenter le coût énergétique de la tolérance.**

En dépit du caractère opportuniste de *N. diversicolor*, qui suggère que les perturbations du métabolisme énergétique pourraient être dues principalement au coût de tolérance, il serait intéressant de vérifier expérimentalement l'importance relative de la contamination chimique et de la disponibilité alimentaire. Pour ce faire nous suggérons de

mener des transplantations croisées en mésocosme avec des annélides *N. diversicolor* de Seine et d'Authie maintenues dans du sédiment de leur milieu d'origine ou dans du sédiment de l'autre site. Cette première étape permettrait d'établir si la qualité du sédiment (contamination chimique et nourriture disponible) est responsable de perturbations du métabolisme énergétique en terme de réserves et de consommation d'oxygène. Dans une seconde étape, pour préciser l'importance relative du stress chimique ou du niveau de trophie du système, des apports nutritionnels croissants pourraient être effectués, en se basant sur les connaissances qui ont permis de maîtriser l'élevage de l'espèce (Marty, 1997).

Nous avons établi que la fécondité absolue des *N. diversicolor* de Seine était plus faible que celles des *N. diversicolor* de grande taille de l'Authie. Une question supplémentaire doit être posée : Est-ce que les larves sont également viables qu'elles aient été produites dans un écosystème sous stress ou non ? La maîtrise des méthodes d'élevage de cette espèce en laboratoire peut permettre de trancher. L'approche consisterait à déterminer de façon comparative en fonction de l'estuaire d'origine, les taux de mortalité d'un stade larvaire à l'autre puis la vitesse de croissance des juvéniles.

Nous avons mentionné que nous nous intéressions à *N. diversicolor* en tant qu'espèce clé du fonctionnement des écosystèmes estuariens. L'une de ses fonctionnalités dépend de son **activité bioturbatrice**. La régression des populations de *N. diversicolor* en Seine montrée dans le cadre du PNETOX peut-elle être compensée au moins partiellement par l'activité bioturbatrice de la méiofaune? Plusieurs stratégies peuvent être mises en œuvre pour répondre à cette question. Il est ainsi possible d'établir la distribution des espèces produisant des galeries de petite taille telles que les nématodes et les oligochètes à l'aide de la méthode de tomodensitométrie axiale assistée par ordinateur qui permet de donner une image détaillée de l'activité de fouissage de la faune benthique du sédiment, capable d'affecter en nature les cycles biogéochimiques à l'interface sédiment/colonne d'eau. Ces études en nature pourraient être complétées par des expérimentations en microcosmes permettant de suivre la redistribution verticale au sein du sédiment d'un radiotraceur initialement lié au sédiment superficiel selon le type de biota responsable de la bioturbation.

## IX Références bibliographiques

### A

Abarnou, A., Burgeot, T., Chevreuil, M., Leboulenger, F., Loizeau, V., Madoulet-Jaouen, A., Minier, C., Blanchard, M., Dauvin, J.C., Hocde, R., Le Guellec, A.M., Romana L.A. et Teil M.J. (2000). Les contaminants organiques : quels risques pour le monde vivant ? Fascicule N°13 du programme scientifique Seine-Aval. Editions Ifremer. Plouzané (France). 33 p.

Abrantes, A., Pinto, F. et Moreira, M. H. (1999). Ecology of the polychaete *Nereis diversicolor* in the Canal de Mira (Ria de Aveiro, Portugal): Population dynamics, production and oogenic cycle. *Acta Oecologica* **20**(4): 267-283.

Adams, S. M., Shepard, K. L., Greeley, M. S., Jimenez, B. D., Ryon, M. G., Shugart, L. R. et McCarthy, J. F. (1989). The use of bioindicators for assessing the effects of pollutant stress on fish. *Marine Environmental Research* **28**: 459-464.

Ait Alla, A., Mouneyrac, C., Durou, C., Moukrim, A. et Pellerin, J. (2006). Tolerance and biomarkers as useful tools for assessing environmental quality in the Oued Souss estuary (Bay of Agadir, Morocco). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **143**: 23-29.

Amiard, J.-C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J. et Rainbow, P. S. (2006). Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology* **76**(2): 160-202.

Amiard-Triquet, C. (1989). Relative harmfulness of some metallic pollutants with regard to the marine environment. *Bulletin d'Écologie* **20**: 129-151.

Amiard-Triquet, C., Altmann, S., Amiard, J. C., Ballan-Dufrançais, C., Baumard, P., Budzinski, H., Crouzet, C., Garrigues, P., His, E., Jeantet, A.-Y., Menasria, R., Mora, P., Mouneyrac, C., Narbonne, J. F. et Pavillon, J. F. (1998). Fate and effects of micropollutants in the Gironde estuary, France: a multidisciplinary approach. *Hydrobiologia* **373/374**: 259-279.

Andries, J.-C. (2001). Endocrine and environmental control of reproduction in Polychaeta. *Canadian Journal of Zoology* **79**(2): 254-270.

Arias, A. M. et Drake, P. (1995). Distribution and production of the polychaete *Nereis diversicolor* in a shallow coastal lagoon in the Bay of Cadiz (SW Spain). *Cahier de Biologie Marine* **36**: 201-210.

Augenfeld, J. M., Anderson, J. W., Kiesser, S. L., Fellingham, G. W., Riley, R. G. et Thomas, B. L. (1983). Exposure of *Abarenicola pacifica* to oiled sediment: Effects on glycogen content and alterations in sediment-bound hydrocarbons. Dans: *Oil Spill Conference*. American Petroleum Institute, Washington D.C.: 443-449.

## B

Baert, J.-L. (1985). Multiple forms of vitellin in young oocytes of *Perinereis cultrifera* (Polychaete annelid): Occurrence and relation to vitellin maturation in the oocyte. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **81**(4): 851-856.

Baert, J.-L. et Slomianny, M. C. (1987). Heterosynthetic origin of the major yolk protein, vitellin, in a nereid, *Perinereis cultrifera* (polychaete annelid). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **88**(4): 1191-1199.

Baldwin, W. S., Graham, S. E., Shea, D. et LeBlanc, G. A. (1997). Metabolic androgenization of female *Daphnia magna* by the xenoestrogen 4-nonylphenol. *Environmental Toxicology and Chemistry* **16**: 1905-1911.

Banta, G. T. et Andersen, O. (2003). Bioturbation and the fate of sediment pollutants. Experimental case studies of selected infauna species. *Vie et Milieu* **53**: 233-248.

Barbeau, M. A. et Grecian, L. A. (2003). Occurrence intersuality in the amphipod *Corophium volutator* (Pallas) in the upper bay of Fundy, Canada. *Crustaceana* **76**(6): 665-679.

Barnes, R. S. K., Calow, P., Olive, P. J. W. et Golding, D. W. (1988). *The Invertebrates. A new synthesis*. Deuxième édition. Blackwell Science, Oxford: 488 p.

Bartels-Hardege, H. D. et Zeeck, E. (1990). Reproductive behaviour of *Nereis diversicolor* (Annelida: Polychaeta). *Marine Biology* **106**: 409-412.

Bayne, B. L. (1989). Measuring the biological effects of pollution: the mussel watch approach. *Water Science and Technology* **81**: 1089-1100.

Bebianno, M. J., G eret, F., Hoarau, P., Serafim, M. A., Coelho, M. R., Gnassia Barelli, M. et Roméo, M. (2004). Biomarkers in *Ruditapes decussatus*: a potential bioindicator species. *Biomarkers* **9**(4-5): 305-330.

Begon M., Harper J.L. et Townsend, C.R. (1996). The flux of energy through communities. Dans : *Ecology*. Troisième  dition. Blackwell Science, Oxford: 711-743.

Beliaeff, B. et Burgeot, T. (2002). Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* **21**(6): 1316-1322.

Berthet, B., Mouneyrac, C., Amiard, J.-C., Amiard-Triquet, C., Berthelot, Y., Le Hen, A., Mastain, O., Rainbow, P. S. et Smith, B. D. (2003). Accumulation and soluble binding of cadmium, copper, and zinc in the polychaete *Hediste diversicolor* from coastal sites with different trace metal bioavailabilities. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **45**(4): 468-478.

BEQUALM (2002). Biological Effects Quality Assurance in Monitoring Programmes. European Union Program. Source: <http://www.bequalm.org>.

Bianchini, A., Playle, R. C., Wood, C. M. et Walsh, P. J. (2005). Mechanism of acute silver toxicity in marine invertebrates. *Aquatic Toxicology* **72**: 67-82.

Blaise, C., Gagné, F., Pellerin, J., Hansen, P.-D. et Trottier, S. (2002). Molluscan shellfish biomarker study of the Quebec, Canada, Saguenay Fjord with the soft-shell clam, *Mya arenaria*. *Environmental Toxicology* **17**: 170-186.

Blandin, P. (1986). Bio-indicateurs et diagnostic des systèmes écologiques. *Bulletin d'Écologie* **17**(4): 215-307.

Bonnier, P. et Baert, J.-L. (1992). Vitellogenesis in the sand worm, *Nereis diversicolor*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **102**(4): 785-790.

Borja, A., Franco, J. et Pérez, V. (2000). A marine biotic index to establish the ecological quality of soft-bottom benthos within european estuarine and coastal environments. *Marine Pollution Bulletin* **40**(12): 1100-1114.

Borja, A., Muxika, I. et Franco, J. (2003). The application of a marine biotic index to different impact sources affecting soft-bottom benthic communities along European coasts. *Marine Pollution Bulletin* **46**: 835-845.

Bossuyt, B. T. A. et Janssen, C. R. (2003). Acclimation of *Daphnia magna* to environmentally realistic copper concentrations. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **136**: 253-264.

Bragigand, V. (2005). Recherches écotoxicologiques sur les retardateurs de flamme bromés dans les écosystèmes estuariens (estuaires de Loire et de Seine). Thèse de doctorat. Nantes. Faculté de Pharmacie, Université de Nantes: 279p.

Bragigand, V., Amiard-Triquet, C., Parlier, E., Boury, P., Marchand, P. et El Hourch, M. (2006). Influence of biological and ecological factors on bioaccumulation of polybrominated diphenyl ethers in aquatic food webs. *Science of the Total Environment* **368**(2-3): 615-626.

Brown, B. E. (1982). The form and function of metal-containing “granules” in invertebrate tissues. *Biological Review* **57**: 621–667.

Bryan, G. W. et Hummerstone, L. G. (1971). Adaptation of the polychaete *Nereis diversicolor* to estuarine sediments containing high concentrations of heavy metals I. General observations and adaptation to copper. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **51**: 845-863.

Bryan, G. W. et Hummerstone, L. G. (1973). Adaptation of the polychaete *Nereis diversicolor* to estuarine sediments containing high concentrations of zinc and cadmium. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **53**: 839-857.

Bryan, G. W. (1976). Some aspects of heavy metal tolerance in aquatic organisms. Dans: *Effects of pollutants on aquatic organisms*. Éditeur: Lockwood, A. P. M. Cambridge, Cambridge University Press: 7-34.

Bryan, G. W. et Gibbs, P. E. (1983). Heavy metals in the Fal estuary, Cornwall: a study of long-term contamination by mining waste and its effects on estuarine organisms. *Occasional Publication of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **2**: 1-112.

Bryan, G. W., Gibbs, P. E., Hummerstone, L. G. et Burt, G. R. (1987). Copper, zinc, and organotin as long-term factors governing the distribution of organisms in the Fal Estuary in southwest England. *Estuaries* **10**(3): 208-219.

## C

Cairns, J. (1992). The threshold problem in ecotoxicology. *Ecotoxicology* **1**: 3-16.

Calow, P. (1991). Physiological costs of combating chemical toxicants: ecological implications. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* **100**(1-2): 3-6.

Cammen, L. M. (1987). Polychaeta. Dans: *Animal energetics*. Éditeurs: Pandian, T. J. et Vernberg, F. J. Academic press, New York, **1**: 217-260.

Canli, M. (2005). Dietary and water-borne Zn exposures affect energy reserves and subsequent Zn tolerance of *Daphnia magna*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **141**: 110-116.

Cardellicchio, N., Brandini, E., Di Leo, A., Giandomenico, S. et Annicchiarico, C. (1998). The influence of environmental and physiological factors on the accumulation of heavy metals in mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Annali di Chimica* **88**: 253-260.

Carr, R. S. (1981). Biochemical indices of stress in the sandworm *Neanthes virens* (Sars). PhD Thesis. Texas. College station, Texas A & M University: 93p.

Carr, R. S. et Neff, J. M. (1982). Biochemical indices of stress in the sandworm *Neanthes virens* (Sars). II. Sublethal responses to cadmium. *Aquatic Toxicology* **2**: 319-333.

Carr, R. S. et Neff, J. M. (1984a). Field assessment of biochemical stress indices for the sandworm *Neanthes virens* (Sars). *Marine Environmental Research* **14**: 267-279.

Carr, R. S. et Neff, J. M. (1984b). Quantitative semi-automated enzymatic assay for tissue glycogen. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **77**: 447-449.

Chambers, M. R. et Milne, H. (1975). Life cycle and production of *Nereis diversicolor* O. F. Müller in the Ythan estuary, Scotland. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **3**: 133-144.

Cassai, C. et Prevedelli, P. 1998. Reproduction effort, fecundity and energy metabolism in two species of the genus *Perinereis* (Polychaeta : Nereididae). *Invertebrate Reproduction and Development* **34**: 125-131.

Chapman, P. M. et Wang, F. (2001). Assessing sediment contamination in estuaries. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**(1): 3-22.

Chapman, P. M. (2006). Emerging substances - emerging problems? *Environmental Toxicology and Chemistry* **25**(6): 1445-1447.

Christensen, M., Andersen, O. et Banta, G. T. (2002). Metabolism of pyrene by the polychaetes *Nereis diversicolor* and *Arenicola marina*. *Aquatic Toxicology* **58**: 15-25.

Clark, R. B. (1965). Endocrinology and the reproductive biology of polychaetes. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review* **3**: 211-255.

Cold, A. et Forbes, V. E. (2004). Consequences of a short pulse of pesticide exposure for survival and reproduction of *Gammarus pulex*. *Aquatic Toxicology* **67**: 287-299.

Congdon, J. D., Dunham, A. E., Hopkins, W. A., Rowe, C. L. et Hinton, T. G. (2001). Resource allocation-based life histories: a conceptual basis for studies of ecological toxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**(8): 1698-1703.

Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M. C. et Vasseur, P. (1997). Mécanisme de formation des espèces réactives de l'oxygène. Dans : *Biomarqueurs en écotoxicologie - aspects fondamentaux*. Éditeurs : Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.-C. et Ramade, F. Masson, Paris: 125-147.

Créange, J. E. et Szeco, C. M. (1967). Sulphation as a metabolic pathway for oestradiol in the sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus*. *The Biochemical Journal* **102**(3): 898-904.

## D

Dales, R. P. (1950). The reproduction and larval development of *Nereis diversicolor* O. F. Müller. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **29**: 321-360.

Dales, R. P. (1957). Preliminary observations on the role of the coelomic cells in food storage and transport in certain polychaetes. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **36**: 91-110.

Damiens, G., Gnassia-Barelli, M., Loqués, F., Roméo, M. et Salbert, V. (2006). Integrated biomarker response index as a useful tool for environmental assessment evaluated using transplanted mussels. *Chemosphere*, **sous presse**.

Davey, J. T. et Watson, P. G. (1995). The activity of *Nereis diversicolor* (Polychaeta) and its impact on nutrient fluxes in estuarine waters. *Ophelia* **41**: 55-70.

De Coen, W. M. et Janssen, C. R. (1997). The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. IV. Cellular energy allocation: a new methodology to assess the energy budget of toxicant-stressed *Daphnia* populations. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* **6**: 43-55.

De Coen, W. M. et Janssen, C. R. (2003). The missing biomarker link: relationship between effects on the cellular energy allocation biomarker of toxicant-stressed *Daphnia magna* and corresponding population characteristics. *Environmental Toxicology and Chemistry* **22**(7): 1632-1641.

De Fur, P. L., Crane, M., Ingersoll, C. et Tattersfield, L. 1999. Endocrine disruption in invertebrates: Endocrinology, testing and assessment. *Proceedings of the Workshops on Endocrine Disruption in Invertebrates*. 12-15 December 1998, Noordwijkerhout, The Netherlands, SETAC press, Pensacola.

De Lafontaine, Y., Gagné, F., Blaise, C., Costan, G., Gagnon, P. et Chan, H. M. (2000). Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aquatic Toxicology* **50**: 51-71.

De Longchamp, D., Lubet, P. et Drosdowsky, M. (1974). The in vitro biosynthesis of steroids by the gonad of the mussel (*Mytilus edulis*). *General and Comparative Endocrinology* **22**(1): 116-127.

De Vooy, C. G. N. (1975). Glycogen and total lipids in the lugworm (*Arenicola marina*) in relation to reproduction. *Netherlands Journal of Sea Research* **9**(3-4): 311-319.

Depledge, M. H. (1994). The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. Dans: *Biomarkers in Vertebrates*. Éditeurs: Fossi, C. et Leonzio, C. Lewis Publishers, Boca Raton: 271-295.

Depledge, M. H. et Billingham, Z. (1999). Ecological significance of endocrine disruption in marine invertebrates. *Marine Pollution Bulletin* **39**(1-12): 32-38.

Deschênes, J., Desrosiers, G., Ferron, J., Cloutier, R. et Stora, G. (2005). Environmental influence on activity levels and behavioural allocation in the polychaete *Nereis virens* (Sars). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **217**(2): 203-212.

Desrosiers, G., Vincent, B., Retière, C. et Boucher, L. (1988). Comparaisons de critères utilisables pour l'étude de la structure des populations du polychète *Nereis virens* (Sars). *Journal Canadien de Zoologie* **66**: 1454-1459.

Diez, G., Soto, M., Canton, L., Vaquero, C. et Marigomez, I. (2000). *Hediste (Nereis) diversicolor* as bioindicator of metal and organic chemical bioavailability: A field study. *Ecotoxicology and Environmental Restoration* **3**(1): 7-15.

Dillon, T. M., Moore, D. W. et Gibson, A. B. (1993). Development of a chronic sublethal bioassay for evaluating contaminated sediment with the marine polychaete worm *Nereis (Neanthes) arenaceodentata*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **12**: 589-605.

Directive 2000/60/CE du Parlement Européen et du Conseil du 23 octobre 2000 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau. Journal Officiel des Communautés Européennes. L 327.

Donker, M. H. (1992). Energy reserves and distribution of metals in populations of the isopod *Porcellio scaber* from metal-contaminated sites. *Functional Ecology* **6**: 445-454.

Driscoll, S. K. et Mc Elroy, A. E. (1996). Bioaccumulation and metabolism of benzo[a]pyrene in three species of polychaete worms. *Environmental Toxicology and Chemistry* **15**(8): 1401-1410.

Duquesne, S., Liess, M. et Bird, D. J. (2004). Sub-lethal effects of metal exposure: physiological and behavioural responses of the estuarine bivalve *Macoma balthica*. *Marine Environmental Research* **58**(2-5): 245-250.

Durchon, M. et Joly, P. (1978). *L'Endocrinologie des Invertébrés*, Presses universitaires de France: 235p.

Durou, C., Mouneyrac, C. et Amiard-Triquet, C. (2005a). Tolerance to metals and assessment of energy reserves in the polychaete *Nereis diversicolor* in clean and contaminated estuaries. *Environmental Toxicology* **20**(1): 23-31.

Durou, C., Mouneyrac, C., Rainbow, P., Smith, B.D., Gillet, P., M., Mouloud, M., Amiard-Triquet, C. (2005b). Linking the physiological and population status of worms *Nereis diversicolor* from a clean and a multi-polluted estuary. Dans: *The Reason d'être of Environmental Toxicology and Chemistry*. SETAC Europe 15<sup>th</sup> Annual Meeting. Lille, France, 22-26 mai 2005.

Durou, C. et Mouneyrac, C. (2006). Linking steroid hormone levels to sexual maturity index and energy reserves in *Nereis diversicolor* from clean and polluted estuaries. *General and Comparative Endocrinology* **accepté**.

Durou, C., Poirier, L., Mouneyrac, C., Gnassia-Barelli, M., Roméo, M., Budzinski, H., Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C. 2006. Biomonitoring in a clean and multi-contaminated estuaries based on biomarkers and chemical analyses in the endobenthic worm *Nereis diversicolor*. *Environmental Pollution*, **soumis**.

## E

Encomio, V. et Chu, F.-L. (2000). The effect of PCBs on glycogen reserves in the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Marine Environmental Research* **50**: 45-49.

## F

Fernandez, T. V. et Jones, N. V. (1990). The influence of salinity and temperature on the toxicity of zinc to *Nereis diversicolor*. *Tropical Ecology* **31**(1): 40-46.

Fidalgo e Costa, P., Sarda, R. et Cancela da Fonsesca, L. (1998). Life cycle, growth and production of the polychaete *Nereis diversicolor* O.F. Müller in three lagoonal estuarine systems of the southwestern portuguese coast (Odeceixe, Aljezur and Carrapateira). *Ecologie* **29**(4): 523-533.

Fidalgo e Costa, P. (1999). Reproduction and growth in captivity of the polychaete *Nereis diversicolor* O.F. Müller, 1776, using two different kinds of sediment: Preliminary assays. *Boletin-Instituto Espanol de Oceanografia* **15**(1-4): 351-355.

Fidalgo e Costa, P. (2003). The oogenic cycle of *Nereis diversicolor* (O. F. Müller, 1776) (Annelida: Polychaeta) in shallow water environments in southwestern Portugal. *Boletim-Instituto Espanol de Oceanografia* **19**: 17-29.

Fischer, A. et Hoeger, U. (1993). Metabolic links between somatic sexual maturation and oogenesis in nereid annelids - a brief review. *Invertebrate Reproduction and Development* **23**(2-3): 131-138.

Flammarion, P. (2000). Mesures d'un biomarqueur de pollution chez des poissons d'eau douce. Validation et optimisation. Dans : *Gestion des milieux aquatiques*. Édition : Cemagref. TEC et DOC, Lyon. **15**: 126.

Fletcher, C. R. (1974). Volume regulation in *Nereis diversicolor*-III. Adaptation to a reduced salinity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* **47**(4): 1221-1234.

Forbes, V. E., Palmqvist, A. et Bach, L. (2006). The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry* **25**(1): 272-280.

Ford, A. T. et Fernandes, T. F. (2005). Better the devil you know? A precautionary approach to using amphipods and daphnids in endocrine disruptor studies. *Environmental Toxicology and Chemistry* **24**(5): 1019-1021.

Forget-Leray, J., Landriau, I., Minier, C. et Leboulenger, F. (2005). Impact of endocrine toxicants on survival, development, and reproduction of the estuarine copepod *Eurytemora affinis* (Poppe). *Ecotoxicology and Environmental Safety* **60**(3): 288-294.

Förstner, U. (1979). Metal pollution assessment from sediment analysis. Dans: *Metal pollution in the aquatic environment*. Éditeurs: Förstner, U. et Wittman, G. T. W. Springer-Verlag, New-York: 110-196.

Frings, C. S., Fendley, T. W., Dunn, R. T. et Queen, C. A. (1972). Improved determination of total serum lipids by the sulpho-phospho-vanillin reaction. *Clinical Chemistry* **18**: 673-674.

## G

- Gagné, F., Blaise, C., Pellerin, J. et Gauthier-Clerc, S. (2002). Alteration of the biochemical properties of female gonads and vitellins in the clam *Mya arenaria* at contaminated sites in the Saguenay fjord. *Marine Environmental Research* **53**(3): 295-310.
- Gagné, F., Blaise, C., Pellerin, J., Pelletier, E., Douville, M., Gauthier-Clerc, S. et Viglino, L. (2003). Sex alteration in soft-shell clams (*Mya arenaria*) in an intertidal zone of the Saint Lawrence river (Quebec, Canada). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **134**(2): 189-198.
- Gagnon, C. et Fisher, N.S., (1997). The bioavailability of sediment-bound Cd, Co, and Ag to the mussel *Mytilus edulis*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **54**, 147:156.
- Galgani, F. et Bocquené, G. (1989). A method for routine detection of organophosphates and carbamates in sea water. *Environmental Technology Letters* **10**: 311–322.
- Galloway, T. S., Brown, R. J., Browne, M. A., Dissanayake, A., Lowe, D., Jones, M. B. et Depledge, M. H. (2004). Ecosystem management bioindicators: the ECOMAN project – a multi-biomarker approach to ecosystem management. *Marine Environmental Research* **58**: 233-237.
- Garcia-Alonso, J. et Rebscher, N. (2005). Estradiol signalling in *Nereis virens* reproduction. *Invertebrate Reproduction and Development* **48**(1-3): 95-100.
- Garcia-Alonso, J., Hoeger, U. et Rebscher, N. (2006). Regulation of vitellogenesis in *Nereis virens* (Annelida: Polychaeta): Effect of estradiol-17 $\beta$  on leucocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* **143**(1): 55-61.
- Garwood, P. R. et Olive, P. J. W. (1981). The influence of environmental factors on the growth of oocytes in *Nereis diversicolor* (ANNELIDA : POLYCHAETA). *Bulletin de la Société Zoologique de France* **106**: 399-402.

Gauthier-Clerc, S., Pellerin, J., Blaise, C. et Gagné, J. P. (2002). Delayed gametogenesis of *Mya arenaria* in the Saguenay fjord (Canada): a consequence of endocrine disruptors? *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **131**(4): 457-467.

Gauthier-Clerc, S. (2004). Activité vitellogénique et stéroïdienne chez *Mya arenaria* (mollusque bivalve) durant la gamétogenèse et en réponse à une exposition au 17 $\beta$ -oestradiol. Thèse de doctorat. Nantes. Faculté de Pharmacie, Université de Nantes : 232p.

Gauthier-Clerc, S., Pellerin, J. et Amiard, J. C. (2006). Estradiol-17 $\beta$  and testosterone concentrations in male and female *Mya arenaria* (Mollusca bivalvia) during the reproductive cycle. *General and Comparative Endocrinology* **145**(2): 133-139.

Geffard, A. (2001). Réponses du biota à la contamination polymétallique d'un milieu estuarien, la Gironde, Fr : exposition, imprégnation, induction d'une protéine de détoxification, la métallothionéine, impact au niveau individuel et populationnel. Thèse de doctorat. Nantes Faculté de Pharmacie, Université de Nantes : 252p.

Geracitano, L. A., Monserrat, J. M. et Bianchini, A. (2002). Physiological and antioxidant enzyme responses to acute and chronic exposure of *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae) to copper. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **277**(2): 145-156.

Geracitano, L. A., Monserrat, J. M. et Bianchini, A. (2004a). Oxidative stress in *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae): environmental and seasonal effects. *Marine Environmental Research* **58**: 625-630.

Geracitano, L. A., Bocchetti, R., Monserrat, J. M., Regoli, F. et Bianchini, A. (2004b). Oxidative stress responses in two populations of *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae) after acute and chronic exposure to copper. *Marine Environmental Research* **58**: 1-17.

Gérino, M. et Stora, G. (1991). Analyse quantitative in vitro de la bioturbation induite par la Polychète *Nereis diversicolor*. *Compte rendu de l'Académie des Sciences Paris* **313**(III): 489-494.

Gerino, M., Stora, G., François-Carcaillet, F., Gilbert, F., Poggiale, J. C., Mermillod-Blondin, F., Desrosiers, G. et Vervier, P. (2003). Macro-invertebrate functional groups in freshwater and marine sediments: a common mechanistic classification. *Vie et Milieu* **53**: 221-231.

Giessing, A. M. B., Mayer, L. M. et Forbes, T. L. (2003). Synchronous fluorescence spectrometry of 1-hydroxypyrene: a rapid screening method for identification of PAH exposure in tissue from marine polychaetes. *Marine Environmental Research* **56**: 599-615.

Gillet, P. (1986). Variations de la distribution des paragnathes chez *Nereis diversicolor* dans l'estuaire du Bou Regreg (Maroc). *Cahier de Biologie Marine* **28**: 481-490.

Gillet, P. (1990). Variation intraspécifique des paragnathes chez *Nereis diversicolor* (annélides polychètes) de l'Atlantique Nord-Est. *Vie et Milieu* **40**(4): 297-303.

Gillet, P. et Torresani, S. (2003). Structure of the population and secondary production of *Hediste diversicolor* (O.F. Müller, 1776), (Polychaeta, Nereidae) in the Loire estuary, Atlantic coast, France. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **56**: 621-628.

Gimeno, L., Ferrando, M. D., Sanchez, S., Gimeno, L. O. et Andreu, E. (1995). Pesticide effects on eel metabolism pesticide. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **31**: 153-157.

Goerke, H. et Weber, K. (1990). Population-dependant elimination of various polychlorinated biphenyls in *Nereis diversicolor*. *Marine Environmental Research* **29**: 205-226.

Golding, D. W. (1983). Endocrine programmed development and reproduction in *Nereis*. *General and Comparative Endocrinology* **52**: 456-466.

Golding, D. W. (1987). Brain-body interactions in *Nereis*. deactivation of the cerebral neuroendocrine system by ganglion transplantation. *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development* **12**: 281-294.

Golding, D. W. et Yuwono, E. (1994). Latent capacities for gametogenic cycling in the semelparous invertebrate *Nereis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **91**: 11777-11781.

Grall, J. et Glémarec, M. (2003). L'indice de l'évaluation de l'endofaune côtière I2EC. *Dans* : Bioévaluation de la qualité environnementale des sédiments portuaires et des zones d'immersion. Éditeur : Alzieu, C. Ifremer, Plouzanné : 53-85.

Grant, A., Hateley, J. G. et Jones, N. V. (1989). Mapping the ecological impact of metal contamination on the estuarine polychaete *Nereis diversicolor* using inherited metal tolerance. *Marine Pollution Bulletin* **20**: 235-236.

Grémare, A. et Olive, P. J. W. (1986). A preliminary study of fecundity and reproductive effort in two polychaetous annelids with contrasting reproductive strategies. *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development* **9**: 1-16.

Gross, M. Y., Maycock, D. S., Thorndyke, M. C., Morritt, D. et Crane, M. (2001). Abnormalities in sexual development of the amphipod *Gammarus pulex* (L.) found below sewage treatment works. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**(8): 1792-1797.

Gunnarsson, J. S., Hollertz, K. et Rosenberg, R. (1999). Effects of organic enrichment and burrowing activity of the polychaete *Nereis diversicolor* on the fate of tetrachlorobiphenyl in marine sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry* **18**(6): 1149-1156.

## H

Hateley, J. G., Grant, A. et Jones, N. V. (1989). Heavy metal tolerance in estuarine populations of *Nereis diversicolor*. *Dans*: *Reproduction, genetics and distribution of marine organisms*. Éditeurs: Ryland, J. S. et Tyler, P. A. Olsen and Olsen, Fredensborg: 425-434.

Haya, K. et Waiwood, B. A. (1983). Adenylate energy charge and ATPase activity: Potential biochemical indicators of sublethal effects caused by pollutants in aquatic animals. *Dans*: *Aquatic Toxicology*. Éditeur: Nriagu, J. O. John Wiley, New-York: 307-333.

Hily, C. (1984). Variabilité de la macrofaune benthique dans les milieux hypertrophiques de la rade de Brest. Thèse de doctorat. Brest, Université de Bretagne Occidentale (UBO): 696p.

Hines, G. A., Watts, S. A., Sower, S. A. et Walker, C. W. (1992). Sex steroid levels in the testes, ovaries, and pyloric caeca during gametogenesis in the sea star *Asterias vulgaris*. *General and Comparative Endocrinology* **87**(3): 451-460.

Hoarau, P., Gnassia Barelli, M., Roméo, M. et Girard, J. P. (2001). Differential induction of glutathione S-transferases in the clam *Ruditapes decussatus* exposed to organic compounds. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**(3): 523-529.

Holloway, G. J., Sibly, R. M. et Povey, S. R. (1990). Evolution in toxin-stressed environments. *Functional Ecology* **4**: 289-294.

Hutchinson, T. H. et Pickford, D. B. (2002). Ecological risk assessment and testing for endocrine disruption in the aquatic environment. *Toxicology* **181-182**: 383-387.

## I

Ivankovic, D., Pavicic, J., Erk, M., Filipovic'-Marijic, V. et Raspor, B. (2005). Evaluation of the *Mytilus galloprovincialis* Lam. digestive gland metallothionein as a biomarker in a long-term field study: Seasonal and spatial variability. *Marine Pollution Bulletin* **50**: 1303-1313.

## J

Janer, G., Sternberg, R. M., LeBlanc, G. A. et Porte, C. (2005). Testosterone conjugating activities in invertebrates: are they targets for endocrine disruptors? *Aquatic Toxicology* **71**: 273-282.

Jobling, S., Coey, S., Whitmore, J. G., Kime, D. E., Van Look, K. J. W., McAllister, B. G., Beresford, N., Henshaw, A. C., Brighty, G., Tyler, C. R. et Sumpter, J. P. (2002). Wild intersex roach (*Rutilus rutilus*) have reduced fertility. *Biology of Reproduction* **67**(2): 515-524.

Jørgensen, A., Rasmussen, L. J. et Andersen, O. (2005). Characterisation of two novel CYP4 genes from the marine polychaete *Nereis virens* and their involvement in pyrene hydroxylase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **336**: 890-897.

## K

Kavlock, R. J., Daston, G. P., DeRosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, L. E., Kaattari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M. J., Maczka, C., Miller, R., Moore, J., Rolland, R., Scott, G., Sheehan, D. M., Sinks, T. et Tilson, H. A. (1996). Research needs for risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environmental Health Perspectives* **104**: 715-740.

Kennish, M. J. (2002). Environmental threats and environmental future of estuaries. *Environmental Conservation* **29**(1): 78-107.

Kirkegaard, J. B. (1970). Age determination of *Nephtys* (Polychaeta: Nephtyidae). *Ophelia* **7**(2): 277-282.

Klerks, P. L. et Weis, J. S. (1987). Genetic adaptation to heavy metals in aquatic organisms: a review. *Environmental Pollution* **45**: 173-205.

Knigge, T. et Köhler, H.-R. (2000). Lead impact on nutrition, energy reserves, respiration and stress protein (hsp 70) level in *Porcellio scaber* (Isopoda) populations differently preconditioned in their habitats. *Environmental Pollution* **108**: 209-217.

Knight, J. A., Pieper, R. K. et McClellan, L. (1988). Specificity of the thiobarbituric acid reaction: its use in studies of lipid peroxidation. *Clinical Chemistry* **34**: 2433-2438.

Kooijman, S. A. L. M. (2000). *Dynamic energy and mass budgets in biological systems*. Cambridge University Press, Cambridge: 423p.

Kramer, V. J. et Newman, M. C. (1994). Inhibition of glucose-phosphate isomerase allozymes of the mosquitofish, *Gambusia holbrooki*, by mercury. *Environmental Toxicology and Chemistry* **13**: 9-14.

Kristensen, E. (1983a). Ventilation and oxygen uptake by three species of *Nereis* (Annelida: Polychaeta). I. Effects of hypoxia. *Marine Ecology Progress Series* **12**: 289-297.

Kristensen, E. (1983b). Ventilation and oxygen uptake by three species of *Nereis* (Annelida: Polychaeta) II. Effects of temperature and salinity changes. *Marine Ecology Progress Series* **12**: 299-306.

Kristensen, E. (1984). Life cycle and production in estuarine populations of the polychaetes *Nereis virens* and *Nereis diversicolor*. *Holarctic Ecology* **7**: 249-256.

## L

Lagadic L, Caquet T, Amiard JC. (1997). Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions. Dans : *Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux*. Éditeurs : Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.-C. et Ramade, F. Masson, Paris : 1-9.

Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J. C. et Ramade, F. (1998). *Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement*. Masson, Paris: 316p.

Lafont, R. (2000). The endocrinology of invertebrates. *Ecotoxicology* **9**(1-2): 41-57.

Lam, P. K. S. et Gray, J. S. (2003). The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. *Marine Pollution Bulletin* **46**: 182-186.

Lambert, R., Desrosiers, G., Retière, C. et Miron, G. (1992). Activité de prospection de son aire d'alimentation par la polychète *Nereis diversicolor* (O.F. Müller) : données préliminaires. *Cahier de Biologie Marine* **33**: 43-54.

Langston, W. J., Burt, G. R., Chesman, B. S. et Van, C. H. (2005). Partitioning, bioavailability and effects of oestrogens and xeno-oestrogens in the aquatic environment. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **85**: 1-31.

Lavie, B. et Nevo, E. (1986). Genetic selection of homozygote allozyme genotypes in marine gastropods exposed to cadmium pollution. *Science of the Total Environment* **57**: 91-98.

Le Gal, Y., Lagadic, L., Le Bras, S. et Ramade, F. (1997). Charge énergétique en adénylates (CEA) et autres biomarqueurs associés au métabolisme énergétique. Dans : *Biomarqueurs en écotoxicologie : Aspects fondamentaux*. Éditeurs : Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.-C. et Ramade, F. Masson, Paris: 241-285.

Lee, R. F. (1998). Annelid cytochrome P-450. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* **121**(1-3): 173-179.

Lee, R. F., Walker, A. et Reish, D. J. (2005). Characterization of lipovitellin in eggs of the polychaete *Neanthes arenaceodentata*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **140**(3): 381-386.

Leiniö, S. et Lehtonen, K. K. (2005). Seasonal variability in biomarkers in the bivalves *Mytilus edulis* and *Macoma balthica* from the northern Baltic sea. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **140**(3-4): 408-421.

Leung, K. M. et Furness, R. W. (2001). Survival, growth, metallothionein and glycogen levels of *Nucella lapillus* (L.) exposed to sub-chronic cadmium stress: the influence of nutritional state and prey type. *Marine Environmental Research* **52**: 173-194.

## M

Maltby, L., Kedwards, T. J., Forbes, V. E., Grasman, K., Kammenga, J. E., Munns, W. R. J., Ringwood, A. H., Weis, J. S. et Wood, S. N. (2001). Linking individual-level responses and population-level consequences. Dans: *Ecological variability: separating natural from anthropogenic causes of ecosystem impairment*. Éditeurs: Baird, D. J. et Burton, G. A. J. Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Pensacola, Floride., USA: 27-82.

Mansuy, D. (1998). The great diversity of reactions catalyzed by cytochromes P450. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* **121**: 5-14.

Marchand, J., Quiniou, L., Riso, R., Thebaut, M.-T. et Laroche, J. (2004). Physiological cost of tolerance to toxicants in the european flounder *Platichthys flesus*, along the French Atlantic Coast. *Aquatic Toxicology* **70**(4): 327-343.

Marty, R. (1997). Biologie de la reproduction et du développement de deux espèces d'annélides polychètes *Nereis diversicolor* (O.F. Müller) et *Perinereis cultrifera* Grube. Thèse de doctorat. Rennes. Université de Rennes : 173p.

Marty, R., Brenot, S., Retière, C. et Desrosiers, G. (1997). Premier cas d'adelphophagie étudié chez les néréides (Annélides polychètes): signification écologique de ce comportement développé par le *Nereis diversicolor* (O. F. Müller). *Journal Canadien de Zoologie* **75**(10): 1575-1584.

Maryanski, M., Kramarz, P., Laskowski, R. et Niklinska, M. (2002). Decreased energetic reserves, morphological changes and accumulation of metals in carabid beetles (*Poecilus cupreus* L.). *Ecotoxicology* **11**: 127-139.

Masero, J. A., Pérez-Gonzalez, M., Basadre, M. et Otero-Saavedra, M. (1999). Food supply for waders (Aves: Charadrii) in an estuarine area in the Bay of Cadiz (SW Iberian Peninsula). *Acta Oecologica* **20**: 429-434.

Mason, A. Z. et Jenkins, K. D. (1995). Metal detoxification in aquatic organisms. Dans: *Metal speciation and bioavailability in aquatic systems*. Éditeurs: Tessier, A. et Turner, D. R. John Wiley & Sons, Chichester: 479-608.

Matsumoto, T., Osada, M., Osawa, Y. et Mori, K. (1997). Gonadal estrogen profile and immunohistochemical localization of steroidogenic enzymes in the oyster and scallop during sexual maturation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **118**(4): 811-817.

Matthiessen, P. et Gibbs, P. E. (1998). Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. *Environmental Toxicology and Chemistry* **17**(1): 37-43.

Mayer, F. L., Versteeg, D. J., McKee, M. J., Folmar, L. C., Graney, R. L., McCume, D. C. et Rattner, B. A. (2002). Physiological and non specific biomarkers. Dans: *Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Éditeurs:

Huggett, R. J., Kimerle, R. A., Mehrle, P. M. J. et Bergman, H. L. Chelsea, USA, SETAC Special Publication Series, Lewis Publishers, Boca Raton: 5-85.

Mc Lusky, D. (1989). The secondary consumers. Dans : *The estuarine ecosystem*. Éditeurs: Chapman et Hall. Blackie Academic & Professional, Londres: 113-129.

Mermillod-Blondin, F., François-Carcaillet, F. et Rosenberg, R. (2005). Biodiversity of benthic invertebrates and organic matter processing in shallow marine sediments: an experimental study. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **315**: 187-209.

Mettam, C., Santhanam, V. et Havard, M. S. (1982). The oogenic cycle of *Nereis diversicolor* under natural conditions. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **62**: 637-645.

Meziane, T. et Retière, C. (2002). Croissance de juvéniles de *Nereis diversicolor* nourris avec des détritux d'halophytes. *Oceanologica Acta* **25**: 119-124.

Michel, X., Narbonne, J. F., Mora, P., Daubèze, M., Ribera, D., Lafaurie, M., Budzinski, H. et Garrigues, P. (1998). Indicateurs biogéochimiques de pollution des écosystèmes côtiers: expérience du groupe interface chimie-biologie des écosystèmes marins (GICBEM). Dans : *Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement*. Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J. C. et Ramade, F. Lavoisier Tec et Doc, Paris, New York, Londres: 9-30.

Minier, C., Caltot, G., Leboulenger, F. et Hill, E. M. (2000a). An investigation of the incidence of intersex fish in Seine-Maritime and Sussex regions. *Analysis* **28**: 801-806.

Minier, C., Levy, F., Rabel, D., Bocquené, G., Godefroy, D., Burgeot, T. et Leboulenger, F. (2000b). Flounder health status in the Seine Bay. A multibiomarker study. *Marine Environmental Research* **50**(1-5): 373-377.

Minier, C., Abarnou, A., Jaouen-Madoulet, A. et Le Guellec, A.-M. (2006). A pollution-monitoring pilot study involving contaminant and biomarker in the Seine estuary, France, using zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Environmental Toxicology and Chemistry* **25**(1): 112-119.

Möller, P. (1985). Production and abundance of juvenile *Nereis diversicolor*, and oogenic cycle of adults in shallow waters of western Sweden. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **65**: 603-616.

Moore, D. W. et Dillon, T. M. (1993). The relationship between growth and reproduction in the marine polychaete worm *Nereis (Neanthes) arenaceodentata* (Moore): implications for chronic sublethal sediment bioassays. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **173**: 241-246.

Mora, S. J. (1999). The oceanic environment. Dans: *Understanding our environment*. Éditeur: Harrison, R. M. Royal Society of Chemistry, Cambridge: 139-198.

Moraga, D., Mdelgi-Lasram, E., Romdhane, M. S., El Abed, A., Boutet, I., Tanguy, A. et Auffret, M. (2002). Genetic responses to metal contamination in two clams: *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum*. *Marine Environmental Research* **54**: 521-525.

Moreira, F. (1999). On the use by birds of intertidal areas of the Tagus: implications for management. *Aquatic Ecology* **33**: 301-309.

Moreira, S. M., Lima, I., Ribeiro, R. et Guilhermino, L. (2006). Effects of estuarine sediment contamination on feeding and on key physiological functions of the polychaete *Hediste diversicolor*: laboratory and in situ assays. *Aquatic Toxicology* **78**: 186-201.

Mosleh, Y. Y., Paris-Palacios, S., Couderchet, M., Biagianti-Risbourg, S. et Vernet, G. (2005). Metallothionein induction, antioxidative responses, glycogen and growth changes in *Tubifex tubifex* (Oligochaete) exposed to the fungicide, fenhexamid. *Environmental Pollution* **135**: 73-82.

Mouneyrac, C., Mastain, O., Amiard, J. C., Amiard-Triquet, C., Beaunier, P., Jeantet, A.-Y., Smith, B. D. et Rainbow, P. S. (2003a). Trace-metal detoxification and tolerance of the estuarine worm *Hediste diversicolor* chronically exposed in their environment. *Marine Biology* **143**: 731-744.

Mouneyrac, C., Pellerin, J., Durou, C., Amiard-Triquet, C. et Rainbow, P. S. (2003b). Progesterone levels in a key species in coastal sediments, the annelid polychaete, *Hediste diversicolor*. *Proceedings of the 30<sup>th</sup> Annual Toxicity Workshop*. Éditeurs: Hedley, K., Roe, S. et Niimi, A. J. Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences, Ottawa, Ontario, **2510**: 38-44.

Mouneyrac, C., Pellerin, J., Moukrim, A., Ait Alla, A., Durou, C. et Viault, N. (2006). In situ relationship between energy reserves and steroid hormone levels in *Nereis diversicolor* (O. F. Müller) from clean and contaminated sites. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **65**(2): 181-187.

## N

Nagahama, Y. (1987). Gonadotropic action on gametogenesis and steroidogenesis in teleost gonads. *Zoological Science* **4**: 209-222.

Newman, M. C. (2001). The phenotype in exposed populations. Dans: *Population Ecotoxicology*. Wiley & Sons, Chichester: 113-143.

Newman, M. C. et Unger, M. A. (Eds). (2003). *Fundamentals of ecotoxicology*. Lewis Publishers, London, New York, Washington DC: 458p.

NRC (1987). Biological markers in environmental health research. *Environmental Health Perspectives* **74**: 3-9.

NRC (1989). *Biologic markers in reproductive toxicology*. National Academy Press, Washington D.C.: 15-35.

## O

OCDE (1997). Draft detailed review paper : appraisal of test methods for sex-hormone disrupting chemicals. OECD, Paris: 290p.

Oetken, M., Bachmann, J., Schulte-Oehlmann, U. et Oehlmann, J. (2004). Evidence for endocrine disruption in invertebrates. *International Review of Cytology* **236**: 1-44.

Oglesby, L. C. (1969). Salinity-stress and desiccation in intertidal worms. *American Zoologist* **9**: 319-331.

Oglesby, L. C. (1970). Studies on the salt and water balance of *Nereis diversicolor*-I. Steady-state parameters. *Comparative Biochemistry and Physiology* **36**(3): 449-466.

Oglesby, L. C. (1978). Salt and water balance. Dans: *Physiology of Annelids*. Éditeur: Mill, P. J. Academic Press, London, New-York, San Francisco: 555-658.

Olive, P. J. W. et Clark, R. B. (1978). Physiology of reproduction. Dans: *Physiology of Annelids*. Éditeur: Mill, P. J. Academic Press, London, New-York, San Francisco: 271-368.

Olive, P. J. W. (1980). Growth lines in polychaete jaws (Teeth). Dans: *Skeletal growth of aquatic organisms: Biological records of environmental change*. Éditeurs: Rhoads, D. C. et Lutz, R. A. Plenum Press, New-York, London: 561-592.

Olive, P. J. W. et Garwood, P. R. (1981). Gametogenic cycle and population structure of *Nereis (Hediste) diversicolor* and *Nereis (Nereis) pelagica* from Northern-East England. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **61**: 193-213.

Olive, P. J. W. (1983). Annelida-Polychaeta. Oogenesis, oviposition and oosorption. Dans: *Reproductive Biology of Invertebrates*. Éditeurs: K.G. & R.G. Adiyodi. John Wiley & Sons Ltd, New-York 1: 357-422.

Olive, P. J. W. (1984). Environmental control of reproduction in polychaeta. Dans: *Polychaete reproduction. Progress in comparative reproductive biology*. Éditeurs: Fisher, A. et Plannenstiel, H. D. Fortschritte der Zoologie, Stuttgart, New-York **29**: 17-38.

Olive, P. J. W., Bentley, G. M., Wright, N. H. et Morgan, P. J. (1985). Reproductive energetics, endocrinology and population dynamics of *Nephtys caeca* and *N. hombergi*. *Marine Biology* **88**: 235-246.

Olivier, M., Desrosiers, G., Caron, A., Retière, C. et Caillou, A. (1995). Behavioural responses of *Nereis diversicolor* (O.F. Müller) and *Nereis virens* (Sars) (polychaeta) to food stimuli - use of specific organic matter (algae and halophytes). *Canadian Journal of Zoology* **73**: 2307-2317.

Olivier, M., Desrosiers, G., Caron, A., Retière, C. et Caillou, A. (1996). Juvenile growth of *Nereis diversicolor* (O.F. Müller) feeding on a range of marine vascular and macroalgal plant sources under experimental conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **208**(1-2): 1-12.

Ozoh, P. T. E. (1992). The importance of adult *Hediste (Nereis) diversicolor* in managing heavy metal pollution in shores and estuaries. *Environmental Monitoring and Assessment* **21**: 165-171.

## P

Payne, J. F., Mathieu, A., Melvin, W. et Fancey, L. L. (1996). Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Marine Pollution Bulletin* **32**: 225-231.

Pellerin-Massicotte, J., Martineu, P., Desrosiers, G., Caron, A. et Scaps, P. (1994). Seasonal variability in biochemical composition of the polychaete *Nereis virens* (Sars) in two tidal flats with different geographic orientations. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* **107**(3): 509-516.

Pellerin-Massicotte, J. (1997). Influence of elevated temperature and air-exposure on MDA levels and catalase activities in digestive glands of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.). *Journal de Recherche Océanographique* **22**: 91-98.

Pérez, E., Blasco, J. et Solé, M. (2004). Biomarker responses to pollution in two invertebrate species: *Scrobicularia plana* and *Nereis diversicolor* from the Cadiz bay (SW Spain). *Marine Environmental Research* **58**: 275-279.

Pillon, A., Boussioux, A. M. et Escande, A. (2005). Binding of estrogenic compounds to recombinant estrogen receptor-alpha: Application to environmental analysis. *Environmental Health Perspectives* **113**(3): 278-284.

Poirier, L., Berthet, B., Amiard, J. C., Jeantet, A.-Y. et Amiard-Triquet, C. (2006). A suitable model for the biomonitoring of trace metal bioavailabilities in estuarine sediments: the annelid polychaete *Nereis diversicolor*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **86**: 71-82.

Porchet, M. et Cardon, C. (1976). The inhibitory feedback mechanism coming from oocytes and acting on brain endocrine activity in *Nereis* (Polychaetes, Annelids). *General and Comparative Endocrinology* **30**(3): 78-90.

Porchet, M., Baert, J. L. et Dhainaut, A. (1989). Evolution of the concepts of vitellogenesis in Polychaete Annelids. *Invertebrate Reproduction and Development* **16**: 53-61.

Postma, J. F., Mol, S., Larsen, H. et Admiraal, W. (1995). Life-cycle changes and zinc shortage in cadmium-tolerant midges, *Chironomus riparius* (Diptera), reared in the absence of cadmium. *Environmental Toxicology and Chemistry* **14**(1): 117-122.

Programme de recherche Seine-Aval, Source: <http://seine-aval.crihan.fr/>.

## R

Rainbow, P. S., Geffard, A., Jeantet, A.-Y., Smith, B. D., Amiard, J.-C. et Amiard-Triquet, C. (2004). Enhanced food-chain transfer of copper from a diet of copper-tolerant estuarine worms. *Marine Ecology Progress Series* **271**: 183-191.

Ramade, F. (1993). *Dictionnaire encyclopédique de l'écologie et des sciences de l'environnement*. Ediscience International: 822p.

Rees, S. W. et Olive, P. J. W. (1999). Photoperiodic changes influence the incorporation of vitellin yolk protein by oocytes of the semelparous polychaete *Nereis (Neanthes) virens*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* **123**(2): 213-220.

Rewitz, K. F., Kjellerup, C., Jørgensen, A., Petersen, C. et Andersen, O. (2004). Identification of two *Nereis virens* (Annelida: Polychaeta) cytochromes P450 and induction by xenobiotics. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **138**(1): 89-96.

Ribeiro, S., Sousa, J. P., Nogueira, A. J. A. et Soares, A. M. V. M. (2001). Effect of endosulfan and parathion on energy reserves and physiological parameters of the terrestrial isopod *Porcellio dilatatus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **49**: 131-138.

RNO (1995). Surveillance du milieu marin. Ministère de l'environnement, Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER), Paris, Nantes. Source : <http://www.ifremer.fr/envlit/documentation/documents.htm#2>.

RNO (2001). Surveillance du milieu marin. Ministère de l'environnement, Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER), Paris, Nantes. Source : <http://www.ifremer.fr/envlit/actualite/20011026.htm>.

Roméo, M., Mourgaud, Y., Geffard, A., Gnassia-Barelli, M., Amiard, J.-C. et Budzinski, H. (2003). Multimarker approach in transplanted mussels for evaluating water quality in Charentes, France, coast areas exposed to different anthropogenic conditions. *Environmental Toxicology* **18**(5): 295-305.

Rotchell, J. M. et Ostrander, G. K. (2003). Molecular markers of endocrine disruption in aquatic organisms. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* **6**: 453-495.

Ruus, A., Schaanning, M., Øxnevad, S. et Hylland, K. (2005). Experimental results on bioaccumulation of metals and organic contaminants from marine sediments. *Aquatic Toxicology* **72**: 273-292.

## S

- Saiz-Salinas, J. I. et Francés-Zubillaga, G. (1997). Enhanced growth in juvenile *Nereis diversicolor* after its exposure to anaerobic polluted sediments. *Marine Pollution Bulletin* **34**(6): 437-442.
- Sancho, E., Fernandez-Vega, C., Ferrando, M. D. et Andreu-Moliner, E. (2003). Eel ATPase activity as biomarker of thiobencarb exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **56**: 434-441.
- Scaps, P., Retière, C., Desrosiers, G. et Miron, G. (1992). Dynamique d'une population de *Perinereis cultrifera* (Grübe) de la côte nord Bretagne. *Cahier de Biologie Marine* **33**: 477-494.
- Scaps, P., Retière, C., Desrosiers, G. et Miron, G. (1993). Effets de la ration alimentaire, de la densité intraspécifique et des relations entre individus sur la croissance des juvéniles de l'espèce *Nereis diversicolor* (Annelida : Polychaeta). *Journal Canadien de Zoologie* **71**: 424-430.
- Scaps, P., Demuyne, S., Descamps, M. et Dhainaut, A. (1997). Effects of organophosphate and carbamate pesticides on acetylcholinesterase and choline acetyltransferase activities of the Polychaete *Nereis diversicolor*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **33**: 203-208.
- Scaps, P. (2002). A review of the biology, ecology and potential use of the ragworm *Hediste diversicolor* (O.F. Müller) (Annelida: Polychaeta). *Hydrobiologia* **470**: 203-218.
- Schill, R. O. et Köhler, H.-R. (2004). Energy reserves and metal-storage granules in the hepatopancreas of *Oniscus asellus* and *Porcellio scaber* (Isopoda) from a metal gradient at Avonmouth, UK. *Ecotoxicology* **13**: 787-796.

Schroeder, P. C., Hofmann, E. et Wallace, K. (1977). Posterior regeneration and the endocrine control of postlarval development in *Nereis grubei* (Kinberg). Dans: *Essays on Polychaetous Annelids in Memory of Dr. Olga Hartman*. Éditeurs: Reish, D. J. et Fauchald, K. Alan Hancock Foundation, Los Angeles : 391-405.

Siah, A., Pellerin, J., Benosman, A., Gagné, J. P. et Amiard, J. C. (2002). Seasonal gonad progesterone pattern in the soft-shell clam *Mya arenaria*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* **132**(2): 499-511.

Siah, A., Pellerin, J., Amiard, J. C., Pelletier, E. et Viglino, L. (2003). Delayed gametogenesis and progesterone levels in soft-shell clams (*Mya arenaria*) in relation to in situ contamination to organotins and heavy metals in the St. Lawrence River (Canada). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **135**(2): 145-156.

Smaal, A. C. et Widdows, J. (1994). The scope for growth of bivalves as an integrated response parameter in biological monitoring. Dans: *Biomonitoring of Coastal Waters and Estuaries*. Éditeur: Kramer, K. J. M. CRC Press, Inc., Boca Raton: 247-261.

Smith, R. I. (1955). On the distribution of *Nereis diversicolor* in relation to salinity in the vicinity of Tvärmine, Finland and the Isefjord Denmark. *Biological Bulletin* **108**: 326-345.

Smith, R. I. (1970). Chloride regulation at low salinities by *Nereis diversicolor* (Annelida, Polychaeta) I. Uptake and exchanges of chloride. *Journal of Experimental Biology* **53**: 75-92.

Smith, R. I. (1976). Further observations on the reproduction of *Nereis diversicolor* (Polychaeta) near Tvärmine, Finland, and Kristineberg, Sweden. *Annales Zoologici Fennici* **13**: 179-184.

Smolders, R., Bervoets, L., De Coen, W. M. et Blust, R. (2004). Cellular energy allocation in zebra mussels exposed along a pollution gradient: linking cellular effects to higher levels of biological organization. *Environmental Pollution* **129**: 99-112.

Spooner, N., Gibbs, P. E., Bryan, G. W. et Goad, L. J. (1991). The effects of tributyltin upon steroid titres in the female dogwhelk, *Nucella lapillus*, and the development of imposex. *Marine Environmental Research* **32**: 37-49.

Sumpter, J. P. et Johnson, A. C. (2005). Lessons from endocrine disruption and their application to other issues concerning trace organics in the aquatic environment . *Environmental Science and Technology* **39**(12): 4321-4332.

## T

Tronczynski, J., Munsch, C. et Moisan, K. (1999). Les contaminants organiques qui laissent des traces. Source, transport et devenir. Programme scientifique Seine-Aval. Fascicule N° 12. 39p.

Truhaut R. 1974. Ecotoxicology : objectives, principles, and perspectives. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **1**:151-173.

Tyler, C. R., Jobling, S. et Sumpter, J. P. (1998). Endocrine disruption in wildlife: A critical review of the evidence. *Critical Reviews in Toxicology* **28**(4): 319-361.

## V

Verschraegen, K., Herman, P. M. J., Gansbeke, D. V. et Brackman, A. (1985). Measurement of adenylate energy charge in *Nereis diversicolor* and *Nephtys sp.* Evaluation of the usefulness of AEC in pollution monitoring. *Marine Biology* **86**: 233-240.

Verslycke, T., Roast, S. D., Widdows, J., Jones, M. B. et Janssen, C. R. (2004a). Cellular energy allocation and scope for growth in the estuarine mysid *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea) following chlorpyrifos exposure: a method comparison. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **306**: 1-16.

Verslycke, T., Poelmans, S., De Wasch, K., De Brabander, H. F. et Janssen, C. R. (2004b). Testosterone and energy metabolism in the estuarine mysid *Neomysis integer* (Crustacea :Mysidacea) following exposure to endocrine disruptors. *Environmental Toxicology and Chemistry* **23**(5): 1289-1296.

Virgilio, M., Baroncini, N., Trombini, C. et Abbiati, M. (2003). Relationships between sediments and tissue contamination and allozymic patterns in *Hediste diversicolor* (Polychaeta Nereididae) in the Pialassa lagoons (north Adriatic Sea). *Oceanologica Acta* **26**(1): 85-92.

Virgilio, M. et Abbiati, M. (2004). Allozyme genotypes and tolerance to copper stress in *Hediste diversicolor* (Polychaeta: Nereididae). *Marine Pollution Bulletin* **49**: 979-985.

Voogt, P. A. (1974). Biosynthesis and composition of sterols in Annelida. II. Investigations on some Oligochaetes. *Netherlands Journal of Zoology* **24**(4): 469-478.

Vos, J. G., Dybing, E., Greim, H. A., Ladefoged, O., Lambré, C., Tarazona, J. V., Brandt, I. et Vethaak, A. D. (2000). Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the european situation. *Critical Reviews in Toxicology* **30**(1): 71-133.

## W

Walker, C. H., Hopkin, S. P., Sibly, R. M. et Peakall, D. B. (1996). *Principles of ecotoxicology*. Taylor and Francis, Londres: 309p.

Watts, M. M., Pascoe, D. et Carroll, K. (2001). Survival and precopulatory behaviour of *Gammarus pulex* (L.) exposed to xenoestrogens. *Water Research* **35**(10): 2347-2352.

Watts, M. M., Pascoe, D. et Carroll, K. (2002). Population responses of the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.) to an environmental estrogen, 17-ethinylestradiol. *Environmental Toxicology and Chemistry* **21**(2): 445-450.

Whitehead, S. A. et Rice, S. (2006). Endocrine-disrupting chemicals as modulators of sex steroid synthesis. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* **20**(1): 45-61.

Widdows, J., Nasci, C. et Fossato, V. (1997). Effects of pollution on the scope for growth of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Venice lagoon, Italy. *Marine Environmental Research* **43**(1/2): 69-79.

Widdows, J., Donkin, P., Staff, F. J., Matthiessen, P., Law, R. J., Allen, Y. T., Thain, J. E., Allchin, C. R. et Jones, B. R. (2002). Measurement of stress effects (scope for growth) and contaminant levels in mussels (*Mytilus edulis*) collected from the Irish Sea. *Marine Environmental Research* **53**: 327-356.

Wotiz, H. H., Botticelli, C. R., Hisaw, F. L. et Olsen, A. G. (1960). Estradiol-17beta, estrone, and progesterone in the ovaries of dogfish (*Squalus suckleyi*). *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **46**(4): 580-583.

## X

Xie, L. et Klerks, P. L. (2003). Responses to selection for cadmium resistance in the least killifish, *Heterandria formosa*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **22**(2): 313-320.

Xie, L. et Klerks, P. L. (2004). Fitness cost of resistance to cadmium in the least killifish (*Heterandria formosa*). *Environmental Toxicology and Chemistry* **23**(6): 1499-1503.

## Z

Zeeck, E., Hardege, J. D., Williig, A., Ikekawa, N. et Fujimoto, Y. (1994). Sex pheromones in marine polychaetes: Steroids from ripe *Nereis succinea*. *Steroids* **59**: 341-344.

## Annexes

### Annexe 1

#### **Composition de l'huile d'Olive (Solution Sigma n° 0.1500):**

- ✓ Acide oléique (C 18:1  $\omega$ -9) : 83,5%,
- ✓ Acide palmitique (C 16) : 9,4%,
- ✓ Acide linoléique (C 18:2  $\omega$ -6) : 4,0%,
- ✓ Acide stéarique (C 18) : 2,0%,
- ✓ Acide arachidique (C 20) : 0,9%.

## Annexe 2

### Spécificités des tests (informations fournies par le fabricant) :

#### **Kit de dosage du 17 $\beta$ -œstradiol (référence du kit : 582251):**

- 17 $\beta$ -œstradiol : 100 %
- 17 $\beta$ -œstradiol-3-glucuronide : 17 %
- œstrone : 4 %
- œstriol : 0,57 %
- testostérone : 0,1 %
- 5 $\alpha$ -dihydro-testostérone: 0,1 %
- 17 $\alpha$ -œstradiol: 0,07 %
- progestérone: 0,03 %
- Aldostérone, 5-androstan-17 $\beta$ -ol-3-one, aldrosténédiol, androsténédione, cortisol, œstradiol-17-glucuronide, hydrocortisone, 17 $\alpha$ -hydroxy-progestérone: < 0,01 %.

#### **Kit de dosage de la testostérone (référence du kit : 582701):**

- testostérone : 100 %
- 5 $\alpha$ -dihydro-testostérone : 27,4 %
- 5 $\beta$ -dihydro-testostérone : 18,9 %
- androsténédione : 3,7 %
- 11-kéto-testostérone : 2,2 %
- 5-androsténédiol : 0,51 %
- *épi*-testostérone : 0,2 %
- androstérone : 0,05 %
- androstérone sulfate : 0,04 %
- testostérone sulfate : 0,03 %
- DHEA sulfate : 0,02 %

#### **Kit de dosage de la progestérone (référence du kit : 582601):**

- Progestérone : 100 %
- Prénénolone : 61 %
- 17 $\beta$ -œstradiol : 7,2 %
- 5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -ol-20-one : 6,7 %
- 17-hydroxy-progesterone: 0,5 %
- 5 $\alpha$ -pregnan-3 $\alpha$ -20 $\alpha$ -diol, 5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -20 $\alpha$ -diol, 5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -20 $\alpha$ -diol-glucuronide, 17 $\beta$ -œstradiol, œstriol, œstrone, promegestone: < 0,01 %

### Annexe 3

Données moyennées par classe de masse pour établir les relations entre l'indice de maturité sexuelle, les niveaux en hormones stéroïdiennes et en réserves énergétiques.

Observations	Site	Période	Classe de masse	IMS	Progestéron e	17β-Estradiol	Testostérone	Glycogène	Lipides
A53	Authie	Mai.-03	200-300	2,00	2,04	1,23	0,77	6,0	3,7
A53	Authie	Mai.-03	300-400	3,00	0,80	1,08	0,53	8,5	4,9
A53	Authie	Mai.-03	400-500	3,00	5,32	2,82	1,22	9,9	6,8
A53	Authie	Mai.-03	500-600	3,00	1,13	1,01	0,51	10,4	9,0
A83	Authie	Août.-03	100-200	1,33	1,99	2,07	0,96	7,6	5,6
A83	Authie	Août.-03	200-300	2,00	2,83	2,00	0,81	14,7	6,1
A113	Authie	Nov.-03	< 100	1,50	3,27	0,91	0,45	11,5	7,7
A113	Authie	Nov.-03	100-200	2,00	2,03	2,35	0,80	8,1	6,5
A113	Authie	Nov.-03	200-300	2,33	2,34	1,92	0,85	13,4	8,5
A113	Authie	Nov.-03	300-400	3,00	0,64	1,55	0,69	13,4	7,9
A24	Authie	Fév.-04	100-200	2,00	1,77	1,93	0,70	9,5	8,1
A54	Authie	Mai.-04	100-200	2,00	1,74	0,63	0,46	18,4	14,5
A54	Authie	Mai.-04	300-400	1,67	2,56	0,69	0,57	19,6	9,9
A54	Authie	Mai.-04	400-500	3,00	1,39	0,88	0,43	22,0	10,1
A54	Authie	Mai.-04	500-600	3,00	1,34	0,82	0,36	24,5	10,1
A84	Authie	Août.-04	100-200	0,60	1,79	0,98	0,74	11,2	4,9
A84	Authie	Août.-04	300-400	2,00	1,70	0,82	0,61	20,0	8,5
A84	Authie	Août.-04	400-500	3,00	1,24	0,71	0,47	19,7	9,8
A84	Authie	Août.-04	500-600	3,00	0,69	0,64	0,41	21,5	8,5
A114	Authie	Nov.-04	< 100	1,00	1,86	1,01	0,83	8,3	3,6
A114	Authie	Nov.-04	100-200	1,50	1,75	0,98	0,83	7,5	5,3
A114	Authie	Nov.-04	200-300	2,00	1,83	0,96	0,76	8,0	6,5
A114	Authie	Nov.-04	300-400	3,00	2,35	1,13	0,97	10,9	9,0
A114	Authie	Nov.-04	400-500	3,00	1,87	1,62	1,09	15,4	11,3
S53	Seine	Mai.-03	200-300	3,29	0,79	0,97	0,53	9,7	8,0
S83	Seine	Août.-03	100-200	2,33	2,47	2,29	1,65	5,1	4,2
S113	Seine	Nov.-03	< 100	2,00	1,22	1,47	0,44	5,1	7,5
S113	Seine	Nov.-03	100-200	3,00	2,32	2,07	0,71	8,9	7,9
S24	Seine	Fév.-04	< 100	2,00	2,60	2,05	0,90	5,9	10,2
S24	Seine	Fév.-04	100-200	2,50	1,87	1,95	1,06	6,0	9,7
S54	Seine	Mai.-04	100-200	4,00	2,79	0,77	0,45	21,0	10,1
S54	Seine	Mai.-04	200-300	3,40	1,66	0,67	0,45	23,1	11,5
S84	Seine	Août.-04	100-200	2,33	1,11	0,66	0,32	8,9	4,7
S114	Seine	Nov.-04	< 100	2,00	1,48	1,77	0,78	7,4	3,3
S114	Seine	Nov.-04	100-200	2,67	3,04	1,12	0,65	6,7	6,2
S114	Seine	Nov.-04	200-300	2,67	2,17	1,10	0,52	4,9	6,4

**Annexe 4**

Données moyennées par classe de masse pour étudier de manière conjointe l'ensemble des données acquises sur les populations d'Authie et de Seine.

ID	Site	Période	Classe masse	Masse	Glycogène	Lipide	IMS	Diamètre	L3	Fécondité	Progestérone	17 $\beta$ -Estradiol	Testostérone
1	Authie	août-03	2	131	7,6	5,6	1,53	24,04	1,57	2297	1,99	2,07	0,96
2	Authie	août-03	3	251	14,7	6,1	2,40	39,64	1,86	5067	2,83	2,00	0,81
3	Authie	nov-03	1	75	11,5	7,7	1,12	22,66	1,24	744	3,27	0,91	0,45
4	Authie	nov-03	2	144	8,1	6,5	1,95	26,94	1,65	2770	2,09	2,29	0,79
5	Authie	nov-03	3	250	13,4	8,5	2,40	51,54	1,99	10578	2,34	1,92	0,85
6	Authie	févr-04	2	151	9,5	8,1	1,92	40,65	1,58	3309	1,77	1,93	0,70
7	Authie	févr-04	5	450	13,0	8,3	3,20	124,13	2,32	24600	2,13	3,17	1,06
8	Authie	mai-04	5	442	22,0	10,1	3,00	106,28	2,07	14010	1,39	0,88	0,43
9	Authie	mai-04	6	561	24,5	10,1	3,00	124,65	2,15	21648	1,34	0,82	0,36
10	Authie	août-04	4	360	17,9	7,7	2,00	36,85	2,14	10293	1,70	0,82	0,61
11	Authie	août-04	6	539	21,5	8,5	2,75	57,67	2,42	11487	0,69	0,64	0,41
12	Authie	nov-04	2	143	7,5	5,3	1,71	29,91	1,86	4592	1,75	0,98	0,83
13	Authie	nov-04	3	260	8,0	6,5	2,63	58,88	2,11	8485	1,83	0,96	0,76
14	Authie	nov-04	4	351	10,9	9,0	3,00	64,92	2,43	7067	2,35	1,13	0,97
15	Authie	nov-04	5	453	15,4	11,3	3,00	61,68	2,49	15650	1,87	1,62	1,09
16	Seine	août-03	2	135	5,1	4,2	2,52	48,11	1,58	2270	2,47	2,29	1,65
17	Seine	nov-03	2	133	8,5	7,8	2,74	51,76	1,63	6013	2,32	2,07	0,71
18	Seine	févr-04	1	76	5,9	10,2	2,12	42,06	1,29	2707	2,60	2,05	0,90
19	Seine	févr-04	2	133	6,0	9,7	2,89	87,47	1,56	8552	1,87	1,95	1,06
20	Seine	mai-04	2	172	21,1	10,9	2,93	79,98	1,77	7796	2,79	0,77	0,45
21	Seine	mai-04	3	247	22,5	10,9	3,44	167,01	1,90	7632	1,66	0,67	0,45
22	Seine	août-04	2	141	8,9	4,7	2,42	44,66	1,88	9074	1,11	0,66	0,32
23	Seine	nov-04	1	51	7,4	3,3	1,45	31,90	1,33	3604	1,48	1,77	0,78
24	Seine	nov-04	2	130	6,7	6,2	2,80	52,65	1,76	12185	3,04	1,12	0,65

**Résumé :**

L'évaluation du risque écologique dans des milieux estuariens est limitée notamment par le manque d'indicateurs biologiques du compartiment sédimentaire mais aussi par une méconnaissance de la physiologie (de reproduction en particulier) des invertébrés. *In situ*, le maintien des populations d'invertébrés est largement dépendant de l'état de santé des individus. Une approche multiparamétrique a été mise en œuvre chez *Nereis diversicolor*, espèce clé du compartiment intrasédimentaire, recommandée dans les programmes de biosurveillance de la qualité du milieu. Des indicateurs physiologiques (relations taille - masse, état reproducteur, réserves énergétiques) sont proposés pour établir l'état de qualité biologique du milieu estuarien. De plus, le présent travail établit pour la première fois les relations entre les niveaux en réserves énergétiques (glycogène, lipides), le stade de maturité sexuelle et les niveaux en hormones stéroïdiennes (progestérone, 17 $\beta$ -œstradiol et testostérone).

*Mots-clés* : évaluation du risque, estuaire, sédiment, annélide *Nereis diversicolor*, état reproducteur, indice de condition, glycogène, lipides, progestérone, 17 $\beta$ -œstradiol, testostérone, biomarqueurs.

**Abstract :**

Risk assessment in estuarine ecosystems is mainly limited due to the lack of both biological indicators for the sediment and knowledge about invertebrate physiology (particularly of reproduction). *In situ*, conservation of invertebrate population strongly depends upon individual health status. A multi-parameter methodology was applied to *Nereis diversicolor*, a key species of the sediment, recommended in biomonitoring programs. Physiological indicators (size - weight relationships, reproduction status, energy reserves) are proposed to assess the biological quality status in estuarine ecosystems. Moreover, this work links for the first time levels of energy reserves (glycogen, lipids), sexual maturity stage and level of steroid hormones (progesterone, 17 $\beta$ -œstradiol and testosterone).

*Keywords*: risk assessment, estuary, sediment, annelida *Nereis diversicolor*, reproductive status, condition index, glycogen, lipids, progesterone, 17 $\beta$ -œstradiol, testosterone, biomarkers.