

N° d'ordre : 2262

# THÈSE

présentée à

## L'UNIVERSITÉ BORDEAUX I

ÉCOLE DOCTORALE DE CHIMIE

par **Marie-Hélène DEVIER**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

### DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : CHIMIE ANALYTIQUE ET ENVIRONNEMENT

\*\*\*\*\*

## ETUDE INTEGREE SUR L'IMPACT DES DIFFERENTES CLASSES DE CONTAMINANTS (COMPOSES ORGANOSTANNIQUES, METAUX, HAP, PCB) SUR LES MOULES. BIOACCUMULATION ET REPONSES BIOCHIMIQUES

\*\*\*\*\*

Soutenue le 19 mars 2003

Après avis de :

M O.F.X. DONARD, Directeur de Recherche CNRS, Pau  
Mme C. PORTE VISA, Directeur de Recherche, Barcelone

*Rapporteurs*

Devant la Commission d'examen formée de :

M E. FOUQUET, Professeur, Université de Bordeaux 1  
Mme S. AUGAGNEUR, Ingénieur d'Etudes CNRS, Université de Bordeaux 1  
MM C. ALZIEU, Chercheur, IFREMER Station Sète  
O.F.X. DONARD, Directeur de Recherche CNRS, Université de Pau et des Pays de l'Adour  
P. GARRIGUES, Directeur de Recherche CNRS, Université de Bordeaux 1  
Mme C. PORTE VISA, Directeur de Recherche, Université de Barcelone, Espagne

*Président*  
*Rapporteur*  
*Examineurs*



## AVANT-PROPOS

Ces travaux ont été réalisés au Laboratoire de Physico- et Toxicochimie des Systèmes Naturels.

Madame Cinta PORTE VISA, spécialiste en écotoxicologie, m'a fait l'honneur d'étudier avec attention cette thèse en tant que rapporteur et je l'en remercie.

Monsieur Olivier DONARD, spécialiste en biogéochimie des métaux et des organométaux, m'a fait l'honneur d'être rapporteur de ce travail de thèse. Je lui exprime ma profonde reconnaissance.

Monsieur Claude ALZIEU a été un des instigateurs de la mise en évidence des effets délétères des peintures antisalissures à base de TBT sur les huîtres du Bassin d'Arcachon au début des années 80, et je le remercie d'avoir accepté de se replonger dans le « milieu » pour juger ce travail.

Je remercie Monsieur Eric FOUQUET qui a bien voulu prendre part à ce jury de thèse afin de juger ce travail.

J'exprime ma reconnaissance à Monsieur Philippe GARRIGUES qui m'a accueillie dans son laboratoire depuis la maîtrise et qui a assumé la direction de cette thèse.

Madame Sylvie AUGAGNEUR m'a initié à la recherche depuis la maîtrise et a su me montrer la voie de la rigueur. Sylvie, c'est avec toi que j'ai « grandi », et ces cinq années passées à tes côtés resteront gravées dans mon esprit.

Madame Hélène BUDZINSKI m'a également initié à la recherche et a grandement concourue à la réalisation de ces travaux. Hélène, tu m'as appris à respecter et à m'intéresser au travail des autres, une notion essentielle à toute collaboration. Tu m'as permis de participer à plusieurs congrès nationaux et internationaux, ainsi qu'à une mission océanographique en Méditerranée qui restera un merveilleux souvenir.

Sylvie, Hélène, votre passion a su éveiller en moi l'amour du métier et vos qualités, tant humaines que professionnelles, seront toujours un exemple pour moi. J'espère avoir hérité d'un peu de chacune vous. Merci « mes dames » !

Je remercie également Georges SMALBEEN, ostréiculteur du Bassin d'Arcachon, dont la généreuse collaboration a grandement facilité la réalisation de l'étude de biosurveillance du Bassin.

Enfin, je remercie tous les étudiants du LPTC, passés et présents, qui m'ont donné toute leur amitié et leur soutien.

Je tiens également à remercier mes parents et mes frères pour leur soutien – moral et financier! - durant toutes ces années d'études.



# SOMMAIRE

<b>ABBREVIATIONS</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>5</b>
<b>CHAPITRE I. LES COMPOSES ORGANOSTANNIQUES DANS L'ENVIRONNEMENT MARIN</b>	<b>11</b>
<b>1. <u>Niveaux de présence et toxicité</u></b>	<b>11</b>
<b>1.1. Les composés organostanniques</b>	<b>11</b>
1.1.1. Utilisation	11
1.1.2. Biogéochimie	12
1.1.2.1. Propriétés physico-chimiques	12
1.1.2.2. Mode d'introduction dans l'environnement aquatique	12
1.1.2.3. Biogéochimie	12
<b>1.2. Niveaux de présence dans l'environnement</b>	<b>14</b>
1.2.1. Eaux marines	14
1.2.2. Sédiments	16
1.2.3. Bioaccumulation des composés organostanniques	20
1.2.3.1. Bioaccumulation et biotransformation par les mollusques	20
1.2.3.2. Les composés organostanniques dans les mammifères marins	24
1.2.4. Législation et peintures antisalissures alternatives	25
1.2.4.1. Législation	25
1.2.4.2. Peintures antisalissures alternatives	26
<b>1.3. Toxicité et effets biologiques du TBT</b>	<b>28</b>
1.3.1. Toxicité des composés organostanniques	28
1.3.2. Effets du TBT sur les mollusques bivalves	29
1.3.2.1. Effet sur le développement larvaire des bivalves	29
1.3.2.2. Effet sur la différenciation sexuelle des gastéropodes	30
1.3.2.3. Autres effets du TBT sur les mollusques	31
1.3.2.3.1. Anomalies de calcification de la coquille des huîtres	32
1.3.2.3.2. Perturbations au niveau physiologique	33
1.3.2.3.3. Perturbations au niveau cellulaire	34
1.3.3. Risques pour l'homme	34
<b>2. <u>Le tributylétain en tant que perturbateur endocrinien</u></b>	<b>37</b>
<b>2.1. Etat des connaissances sur le système endocrinien des mollusques bivalves</b>	<b>37</b>
2.1.1. La reproduction	38
2.1.2. Les neurosécrétions	38

2.1.3.	Les stéroïdes endogènes chez les mollusques bivalves	39
2.1.3.1.	Identification des stéroïdes chez les mollusques bivalves	39
2.1.3.2.	Biosynthèse et rôle physiologique des stéroïdes	39
<b>2.2.</b>	<b>Interaction du TBT avec le système endocrinien des mollusques</b>	<b>40</b>
2.2.1.	Le TBT: perturbateur endocrinien	40
2.2.2.	Les cibles biochimiques du TBT	41
<b>3.</b>	<b><u>Les biomarqueurs d'exposition</u></b>	<b>44</b>
3.1.	Introduction	44
3.2.	Les indicateurs de stress oxydatif	47
3.2.1.	Les teneurs en espèces réactives avec l'acide thiobarbiturique (TBARS)	47
3.2.2.	L'activité catalase (CAT)	48
3.3.	L'activité glutathion S-transférase (GST)	49
3.4.	L'activité Acétylcholinestérase (AChE)	50
<b>4.</b>	<b><u>Les techniques de couplage en spéciation des composés organostanniques</u></b>	<b>51</b>
4.1.	Séparations chromatographiques pour l'analyse de spéciation	52
4.1.1.	La chromatographie en phase gazeuse (GC)	52
4.1.2.	La chromatographie en phase liquide (LC)	54
4.2.	Limites de détection des différentes techniques de couplage	55
4.3.	Les réactions de dérivation pour la chromatographie en phase gazeuse	55
<b>CHAPITRE II.</b>	<b>DEVELOPPEMENTS ANALYTIQUES</b>	<b>61</b>
<b>1.</b>	<b><u>Analyse des composés organostanniques par GC-MIP-AED</u></b>	<b>63</b>
<b>1.1.</b>	<b>La chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à émission atomique : le couplage GC-MIP-AED Hewlett-Packard</b>	<b>63</b>
1.1.1.	Présentation générale	63
1.1.2.	Caractéristiques du détecteur	64
1.1.2.1.	La source d'émission	64
1.1.2.2.	Le spectromètre optique	66
1.1.3.	Comparaison des performances du détecteur HP G2350A avec la première génération d'instrument AED HP 5921A	67
<b>1.2.</b>	<b>Optimisation des conditions d'analyse</b>	<b>68</b>
1.2.1.	Les raies d'émission de l'étain	70
1.2.2.	Optimisation des débits de gaz	71
1.2.3.	Optimisation des conditions d'injection	73
1.2.3.1.	Choix du mode d'injection	73
1.2.3.2.	Optimisation des conditions d'injection à pression de gaz vecteur pulsée	74
1.2.3.2.1.	Optimisation du débit et du temps de purge	74
1.2.3.2.2.	Optimisation de la température du port d'injection	74

1.2.3.2.3.	Optimisation de la pression et du temps de la pression de gaz vecteur pulsée	75
1.2.4.	Performances analytiques	76
<b>1.3.</b>	<b>Les protocoles d'extraction</b>	<b>79</b>
1.3.1.	Les tissus biologiques	79
1.3.2.	Les sédiments	84
1.3.3.	Les eaux	86
<b>2.</b>	<b><u>Analyse des métaux par ICP-MS</u></b>	<b>87</b>
<b>2.1.</b>	<b>Présentation générale</b>	<b>87</b>
<b>2.2.</b>	<b>Principe de l'ICP-MS</b>	<b>88</b>
2.2.1.	La source d'émission	89
2.2.2.	Le détecteur	91
2.2.3.	Problèmes liés aux interférences	92
<b>2.3.</b>	<b>Les conditions d'analyse utilisées</b>	<b>92</b>
<b>2.4.</b>	<b>Protocole d'extraction des tissus biologiques</b>	<b>94</b>
<b>3.</b>	<b><u>Autres analyses réalisées dans cette étude</u></b>	<b>95</b>
<b>3.1.</b>	<b>Analyse des stéroïdes par GC-MS</b>	<b>95</b>
3.1.1.	Protocole d'extraction des stéroïdes	95
3.1.2.	Identification des stéroïdes endogènes chez la moule <i>Mytilus edulis</i>	96
<b>3.2.</b>	<b>Analyse des HAP par GC-MS et des PCB par GC-ECD</b>	<b>97</b>
3.2.1.	Détermination des HAP	98
3.2.2.	Détermination des PCB	98
<b>3.3.</b>	<b>Analyse des biomarqueurs</b>	<b>99</b>
3.3.1.	Préparation des échantillons	99
3.3.2.	Dosage des protéines	100
3.3.3.	Détermination des biomarqueurs	100
3.3.3.1.	Les teneurs en TBARS	100
3.3.3.2.	L'activité catalase	100
3.3.3.3.	L'activité glutathion S-transférase	100
3.3.3.4.	L'activité acétylcholinestérase	101
<b>4.</b>	<b><u>Données sur l'étude de surveillance biologique du Bassin d'Arcachon</u></b>	<b>102</b>
<b>4.1.</b>	<b>La moule <i>Mytilus</i> en tant qu'espèce sentinelle</b>	<b>102</b>
<b>4.2.</b>	<b>Etude réalisée dans le Bassin d'Arcachon</b>	<b>103</b>
4.2.1.	Préparation des échantillons	103
4.2.2.	Détermination des paramètres physiologiques	103
4.2.2.1.	Indices de condition	103
4.2.2.2.	Teneurs en lipides et poids sec	105
4.2.3.	Facteurs d'accumulation	105
4.2.4.	Traitement statistique des données	105

**CHAPITRE III. EXPOSITION DE MOULES MARINES *MYTILUS SPAU* TBT : EXPERIENCES EN MICROCOSME ET APPLICATION ENVIRONNEMENTALE AU BASSIN D'ARCACHON** 109

<b>1. <u>Expositions de moules <i>Mytilus sp.</i> au TBT en microcosme</u></b>	<b>111</b>
<b>1.1. Description du système d'exposition</b>	<b>111</b>
1.1.1. Collecte des moules	111
1.1.2. Système d'étude	111
1.1.3. Préparation des échantillons	112
<b>1.2. Validation du système d'étude</b>	<b>112</b>
1.2.1. La période de stabulation de moules en aquarium	113
1.2.2. Test de filtration de l'eau contaminée par le TBT	113
<b>1.3. Dégradation du TBT en microcosme</b>	<b>115</b>
<b>1.4. Expositions en microcosme</b>	<b>118</b>
1.4.1. Détection des butylétains dans l'eau de mer	118
1.4.2. Accumulation du TBT chez <i>Mytilus sp.</i>	119
1.4.3. Distribution tissulaire du TBT	122
1.4.4. Effet du TBT sur les marqueurs biochimiques mesurés	125
1.4.4.1. Les stéroïdes endogènes	125
1.4.4.2. Les biomarqueurs	127
<b>1.5. Conclusion</b>	<b>129</b>
<b>2. <u>Surveillance biologique du bassin d'Arcachon par transplantation de moules <i>Mytilus sp.</i></u></b>	
<b>2.1. Introduction</b>	<b>130</b>
<b>2.2. Présentation de l'étude réalisée sur le Bassin d'Arcachon</b>	<b>133</b>
2.2.1. Présentation du Bassin	133
2.2.2. Description des sites de transplantation	134
2.2.3. Protocole général de l'expérience	136
2.2.3.1. Collecte des moules	137
2.2.3.2. Mise en place des cages	137
2.2.3.3. Préparation des échantillons et analyses	137
<b>2.3. Résultats et discussion</b>	<b>138</b>
2.3.1. Etat physiologique des individus transplantés	141
2.3.1.1. Viabilité des transplantations (mortalité)	141
2.3.1.2. Indices de condition	142
2.3.1.3. Taux de lipides	143
2.3.2. Les composés organostanniques	144
2.3.2.1. Eaux	144
2.3.2.2. Sédiments	146
2.3.2.3. Moules	148
2.3.2.3.1. Les teneurs dans le Bassin d'Arcachon	150
2.3.2.3.2. Evaluation des niveaux de concentration	155

2.3.2.3.3.	Niveaux de concentration et effets biologiques possibles	158
2.3.2.3.4.	Variations saisonnières des teneurs en TBT	158
2.3.2.3.5.	Bioaccumulation du TBT par <i>Mytilus sp.</i>	159
2.3.2.3.6.	La dégradation du TBT	161
2.3.2.4.	Conclusion	167
2.3.3.	Les métaux	168
2.3.3.1.	Niveaux de concentration	168
2.3.3.2.	Variations saisonnières	173
2.3.3.3.	Conclusion	174
2.3.4.	Les contaminants organiques: les HAP et les PCB	175
2.3.4.1.	Les teneurs en PCB	175
2.3.4.2.	Les teneurs en HAP	177
2.3.4.2.1.	Niveaux de concentrations	177
2.3.4.2.2.	Teneurs en HAP dans les sédiments portuaires	182
2.3.4.2.3.	Origine des HAP présents dans les bivalves	183
2.3.4.3.	Conclusion	185
2.3.5.	Les marqueurs biochimiques	187
2.3.5.1.	Variabilité spatiotemporelle des réponses biologiques	189
2.3.5.2.	Variations saisonnières des niveaux des biomarqueurs	192
2.3.5.2.1.	Variations saisonnières des biomarqueurs sur le site de référence	192
2.3.5.2.2.	Relation avec les paramètres physiologiques et les paramètres physico-chimiques	194
2.3.5.2.3.	Différences intersites dans les réponses des biomarqueurs	197
2.3.5.3.	Confrontation des données chimiques et biochimiques	198
2.3.5.3.1.	Corrélations observées entre contaminants et biomarqueurs	199
2.3.5.3.2.	Analyses statistiques multivariées (ACP)	201
2.3.5.3.3.	Comparaison avec d'autres études de biosurveillance	205
2.3.5.4.	Conclusion	208
2.3.6.	Les teneurs en stéroïdes	208
2.3.6.1.	Variations saisonnières des teneurs en stéroïdes endogènes sur le site de référence	209
2.3.6.2.	Corrélation des teneurs en stéroïdes avec les paramètres physiologiques	210
2.3.6.3.	Effet du TBT sur les teneurs en stéroïdes	212
2.3.6.4.	Conclusion	213
<b>2.4.</b>	<b>Conclusion</b>	<b>214</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b>		<b>221</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>		<b>227</b>

- ANNEXE 1:** Données brutes de l'étude de surveillance biologique du Bassin d'Arcachon: concentrations des contaminants et niveaux des paramètres physiologiques et biochimiques. **253**
- ANNEXE 2:** Données brutes de l'étude de surveillance biologique du Bassin d'Arcachon: facteurs d'accumulation des contaminants. **271**
- ANNEXE 3:** Représentations graphiques des variations saisonnières des paramètres physico-chimiques de l'eau du Bassin d'Arcachon pour l'année 2001 (données IFREMER Arcachon, comm. pers.). **279**
- ANNEXE 4:** Corrélations observées entre contaminants et biomarqueurs sur l'ensemble des sites suivis. **283**
- ANNEXE 5:** Publication 1: "*Microcosm tributyltin bioaccumulation and multi-biomarkers assessment in the blue mussel *Mytilus edulis*.*", acceptée après révision à la revue "*Environmental Toxicology and Chemistry*". **287**
- ANNEXE 6:** Publication 2: "*One-year monitoring survey of organic compounds (TBT, PAHs, PCBs), heavy metals and biomarkers in blue mussels from the Arcachon Bay (France)*", forme non définitive. **309**

## ABBREVIATIONS

A	Anthracène
AChE	Acétylcholinestérase
Ae	Acénaphène
Al	Aluminium
As	Arsenic
Ay	Acénaphthylène
B	Bore
BaA	Benzo(a)anthracène
BaP	Benzo(a)pyrène
BbkjF	Benzo(b,k,j)fluoranthène
BCR	Bureau Communautaire de Référence [désormais programme Normes, Mesures et Essais (“ <i>Standard, Measurement and Testing</i> ”)]
BeP	Benzo(e)pyrène
Bper	Benzo(g,h,i)pérylène
CAT	Catalase
Cd	Cadmium
Chrys	Chrysène
Co	Cobalt
Cr	Chrome
CRM	Matériel de référence certifié (“ <i>certified reference material</i> ”)
Cu	Cuivre
DahA	Dibenzo(a,h)anthracène
DBT	Dibutylétain
DiBT	Dibenzothiophène
DPT	Diphénylétain
EM	Multiplicateur d'électron à dynode discrète (“ <i>electron multiplier</i> ”)
F	Fluoranthène
FA	Facteur d'accumulation
FC	Facteur de condition
Fe	Fluorène
GC-ECD	Chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à capture d'électrons (“ <i>gas chromatography-electron capture detector</i> ”)
GC-MIP-AED	Chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à émission atomique (“ <i>gas chromatography with microwave-induced plasma atomic emission spectroscopy</i> ”)
GC-MS	Chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (“ <i>gas chromatography-mass spectrometry</i> ”)
GST	Glutathion S-transférase
IC	Indice de condition
ICP-MS	Spectrométrie de masse avec ionisation dans un plasma à couplage inductif (“ <i>inductively coupled plasma-mass spectrometry</i> ”)
Ipyr	Indénopyrène
MBT	Monobutylétain
MIP-OES	Spectrométrie d'émission atomique par plasma micro-ondes (“ <i>microwave induced plasma-optical emission spectrometry</i> ”)
Mn	Manganèse
1-MP	1-Méthylphénanthrène
2-MP	2-Méthylphénanthrène
3-MP	3-Méthylphénanthrène

9-MP	9-Méthylphénanthrène
MPT	Monophénylétain
N	Naphthalène
NaBET <sub>4</sub>	Tétraéthylborate de sodium
Ni	Nickel
Pb	Plomb
PCB 118	2,3',4,4',5-pentachlorobiphényle
PCB 138	2,2',3,4,4',5'-hexachlorobiphényle
PCB 153	2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphényle
PCB 180	2,2',3,4,4',5,5'-heptachlorobiphényle
PCB 28	2,4,4'-trichlorobiphényle
PCB 52	2,2',5,5'-tetrachlorobiphényle
PDA	Détecteur à barrettes de diodes (" <i>photodiode array</i> ")
Pg	Progestérone
Phe	Phénanthrène
Pn	Prégnénolone
Pyr	Pyrène
Rb	Rubidium
Se	Sélénium
Sr	Strontium
SRM	Matériel de référence standard (" <i>standard reference material</i> ")
TAE	Table d'agitation elliptique
TBARS	Espèces réactives avec l'acide thiobarbiturique (" <i>thiobarbituric acid reactive species</i> ")
TBT	Tributylétain
TPT	Triphénylétain
Zn	Zinc

# **INTRODUCTION**



## INTRODUCTION

Les effets toxiques des organoétains sont une préoccupation encore d'actualité liée aux emplois dispersifs des biocides et de leur rémanence dans le milieu aquatique. Les composés butylés et phénylés de l'étain sont les plus rencontrés pour leurs applications en tant que stabilisateurs du chlorure de polyvinyle (PVC) (mono- et dibutylétains), biocides dans les peintures antisalissures (tributylétain et triphénylétain) et agents fongicides dans l'agrochimie (triphénylétain). Les composés trisubstitués présentent la plus forte toxicité et leurs apports directs dans l'environnement sont à l'origine de catastrophes écologiques et économiques. La destruction des huîtres de nombreuses exploitations ostréicoles dans les années 80, comme ce fut le cas dans le Bassin d'Arcachon, fut causée notamment par le relargage du tributylétain (TBT) contenu dans les peintures antisalissures. Si l'utilisation du TBT dans les peintures antisalissures est interdite en France depuis 1982 sur les bateaux de moins de 25 m, son piégeage dans les sédiments, et donc les stocks importants que renferment ces derniers, joue un rôle prépondérant dans le cycle biogéochimique des composés organostanniques car une remise en suspension des sédiments par un brassage naturel (marées, tempêtes...) ou artificiel (dragages) peut créer un risque écologique important.

Le TBT présent dans l'environnement marin induit chez les invertébrés marins (bivalves, gastéropodes) des modifications hormonales et des perturbations biochimiques de certaines enzymes. Les effets du TBT sur le développement larvaire des bivalves, ainsi que les perturbations de la différenciation sexuelle de certaines espèces de gastéropodes ont été observés à des concentrations aussi faibles que  $1 \text{ ng.L}^{-1}$ . Le TBT interfère avec le métabolisme des hormones naturelles, entraînant une augmentation des taux d'androgènes (Spooner, 1991) et causant l'apparition d'organes génitaux mâles (imposex) chez les femelles du gastéropode *Nucella lapillus*. Ce phénomène d'imposex représente la plus forte preuve de la présence d'un perturbateur endocrinien dans l'environnement. Chez les bivalves, seulement quelques travaux ont mis en évidence des perturbations du métabolisme des hormones stéroïdiennes et des taux de stéroïdes chez *Mitylus edulis* et *Ruditapes decussata* (Morcillo et al., 1999, 2000).

Le travail présenté dans ce mémoire porte, d'une part, sur la caractérisation de la bioaccumulation du tributylétain (TBT) chez *Mytilus sp.* en microcosme et sur le terrain, et d'autre part, sur l'utilisation des niveaux de stéroïdes endogènes comme indicateurs d'une perturbation hormonale induite par le TBT. De façon plus générale, il traite de l'utilisation de différents marqueurs biochimiques (activités enzymatiques) sensibles à l'exposition de contaminants chimiques. Le but ultime de ce travail était d'appliquer les développements réalisés à la surveillance biologique de la qualité du Bassin d'Arcachon (Sud-ouest de la côte Atlantique française).

La première partie de ce mémoire replace les butyl- et phénylétains dans un contexte environnemental, par une synthèse de leurs niveaux de présence dans l'environnement marin, et décrit la toxicité du TBT vis-à-vis des mollusques. Les mécanismes d'action proposés du TBT sur le système endocrinien des mollusques sont également discutés. De même, en vue de l'application environnementale, les différents biomarqueurs suivis sont présentés dans ce chapitre. Cette première partie est complétée par une brève synthèse des différentes techniques de couplage utilisées pour la spéciation des composés organostanniques.

Le chapitre II porte sur le développement des méthodologies analytiques pour, d'une part, déterminer les composés organostanniques, et mesurer, d'autre part, différents marqueurs biochimiques sensibles aux contaminants. Elle rassemble donc i) la mise au point des protocoles d'extraction des organoétains dans les différentes matrices environnementales, ainsi que l'optimisation d'une méthode d'analyse des composés organostanniques par chromatographie gazeuse couplée à un détecteur d'émission atomique (GC-MIP-AED), ii) la mise au point d'une méthode de dosage des stéroïdes endogènes chez la moule par chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS). De plus, l'ensemble des techniques analytiques utilisées dans cette étude et réalisées par différents groupes du laboratoire, sont également présentées: détermination des métaux traces à l'aide d'un plasma à couplage inductif couplée à un spectromètre de masse (ICP-MS), détermination des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) par GC-MS et des polychlorobiphényles (PCB) par chromatographie gazeuse couplée à un détecteur à capture d'électrons (GC-ECD), et la mesure des marqueurs biochimiques par lecteur UV de microplaque ou spectrophotométrie différentielle. Enfin, de façon à ne pas alourdir la présentation des résultats (chapitre III), un certain nombre de données relatives à l'étude de surveillance biologique du Bassin d'Arcachon sont présentées dans ce chapitre. Elles concernent le choix de l'espèce sentinelle, la préparation des échantillons, la détermination des paramètres physiologiques des moules, ainsi que la détermination des

facteurs d'accumulation des contaminants et la description du traitement statistique des données.

La troisième partie de ce mémoire est consacrée à l'application environnementale des différents développements réalisés. Des expositions de moules à différentes concentrations de TBT en microcosme ont été réalisées afin de mettre en évidence l'effet du tributylétain sur la composition en stéroïdes endogènes de la moule *Mytilus edulis* et sur différents biomarqueurs. En parallèle, une étude de surveillance biologique utilisant la transplantation de moules en cages a été réalisée dans le Bassin d'Arcachon pendant une année dans le but d'évaluer la qualité du milieu à travers la détermination de nombreuses classes de contaminants et de la réponse biologique.

Six annexes ont été ajoutées à la fin de ce manuscrit. Les deux premières rassemblent l'ensemble des données obtenues dans l'étude de surveillance biologique du Bassin d'Arcachon, les concentrations individuelles de chaque contaminant, paramètre biochimique et physiologique suivis (annexe 1), ainsi que leur facteur d'accumulation dans les tissus de moules durant la durée de transplantation (annexe 2). A titre indicatif, les variations annuelles des paramètres physico-chimiques de l'eau du bassin (fournies par la station IFREMER d'Arcachon) sont également présentés sous forme de graphiques en annexe 3. L'annexe 4 représente les résultats de l'analyse des corrélations entre chaque contaminant et chaque biomarqueur. Enfin, les résultats obtenus sur les expositions en microcosme ont fait l'objet d'une publication acceptée après révision à la revue "*Environmental Toxicology and Chemistry*" et présentée en annexe 5: "*Microcosm tributyltin bioaccumulation and multi-biomarkers assessment in the blue mussel Mytilus edulis*". De la même façon, les résultats de l'étude de surveillance biologique du Bassin d'Arcachon ont fait l'objet d'une publication présentée en annexe 6 et intitulée: "*One-year monitoring survey of organic compounds (TBT, PAHs, PCBs), heavy metals and biomarkers in blue mussels from the Arcachon Bay (France)*". Bien que cette publication ne soit pas sous sa forme définitive (n'ayant subie aucune correction), elle est tout de même présentée dans ce mémoire afin de faciliter la lecture et la compréhension de ces travaux par Mme Cinta Porte, rapporteur de cette thèse. Elle sera, après correction, soumise à la revue "*Marine Environmental Research*".



## **CHAPITRE I.**

# **LES COMPOSES ORGANOSTANNIQUES DANS L'ENVIRONNEMENT MARIN**



# LES COMPOSES ORGANOSTANNIQUES DANS L'ENVIRONNEMENT MARIN

## 1. Niveaux de présence et toxicité

### 1.1. Les composés organostanniques

Les composés organostanniques ont pour formule générale  $R_nSnX_{4-n}$ , où R est un groupement alkyle ou aryle et X une espèce anionique, par exemple un halogène ou un groupement hydroxyle. Une représentation 3D du TBT est donnée à la figure I-1.

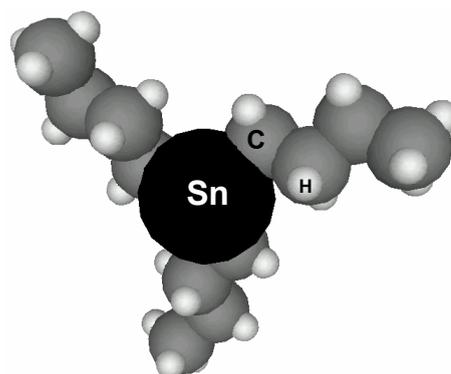


Figure I-1: Représentation 3D du tributylétain (d'après Donard et al., 2001).

#### 1.1.1. Utilisation

Leurs applications se trouvent dans la chimie industrielle comme catalyseurs en synthèse organique ou comme agents stabilisants pour les polymères, mais leur utilisation comme agent biocide dans l'agriculture et dans l'industrie du bois reste prépondérante. La propriété biocide des formes trisubstituées, découverte dans les années 1950, a rendu très populaire l'utilisation du tributylétain (TBT) dans la composition des peintures antisalissures ("*antifouling paints*") et dans les produits permettant une meilleure préservation du bois. Le triphénylétain (TPT), composé ayant aussi des propriétés biocides, fut introduit un peu plus tard comme fongicide dans l'agriculture et comme co-agent biocide dans les peintures antisalissures (Fent, 1996).

Les nombreuses applications commerciales des composés organostanniques ont conduit à une très forte augmentation de leur production mondiale, de moins de 5 000 tonnes en 1955 à plus de 50 000 tonnes en 1992. Actuellement, il n'y a aucune estimation disponible sur la production annuelle exacte. Par contre, ces composés sont de plus en plus consommés par les pays du Sud-est asiatique et par les pays en voie de développement (Fent, 1996).

## **1.1.2. Biogéochimie**

### **1.1.2.1. Propriétés physico-chimiques**

Les composés organostanniques ne sont pas décomposés thermiquement dans les conditions environnementales de température, mais le clivage de la liaison Sn-C peut se produire sous irradiation UV ou en présence d'acides forts ou d'agents électrophiles (Alzieu et Michel, 1998). La solubilité des composés organostanniques est généralement comprise entre 20 g.L<sup>-1</sup> pour le dichlorure de diméthylétain et moins de 1 mg.L<sup>-1</sup> pour les composés phénylés et octylés. A pH 8, le pH moyen des eaux marines, les espèces prédominantes sont les carbonates et les hydroxydes de TBT (Champ et Seligman, 1996).

### **1.1.2.2. Mode d'introduction dans l'environnement aquatique**

La voie d'introduction privilégiée du TBT et du TPT dans l'environnement aquatique est principalement attribuée aux lessivages des peintures antisalissures, et ce sont donc dans les zones portuaires que leurs concentrations dans les eaux sont les plus élevées (Fent, 1996). L'utilisation du TPT dans les produits de traitements agricoles et aquacoles est aussi incriminée. Ce dernier peut être transporté par les eaux de ruissellement, mais aussi par des phénomènes d'évaporation, sur de grandes distances, contribuant ainsi à la contamination du réseau hydrologique, puis du milieu aquatique dulcicole et marin (Stäb et al., 1994). Les matériaux plastiques contenant du DBT et du DOcT (dioctylétain) (tuyaux d'arrosage de jardin, revêtements de sol, éléments imprimés sur les maillots des joueurs de football, etc...) sont sujets au relargage de ces composés par lessivage (Becker van Slooten et al., 1994b). Ils représentent donc une source potentielle de contamination des eaux de rejets et des boues des stations d'épuration.

### **1.1.2.3. Biogéochimie**

Le comportement fortement hydrophobe du TBT favorise son élimination de la phase dissoute et permet un dépôt et un piégeage rapide dans les sédiments conduisant à un stockage à long terme de ce contaminant. Ce phénomène de sorption semble être un processus réversible en fonction des conditions (Unger et al., 1988; Ma et al., 2000). Différents mécanismes influent sur la persistance des composés organostanniques dans l'environnement. Des processus de rupture de la liaison Sn-C, soit photochimiques, soit biochimiques, conduisent à une rapide dégradation des composés organostanniques par désalkylations ou désarylations successives, résultant dans la formation d'espèces moins

toxiques. L'hydrophobicité des organoétains trisubstitués devrait favoriser leur accumulation dans la micro-couche de surface et réduire leur temps de vie via une dégradation photolytique, mais ce processus semble être très limité dans l'environnement et leur adsorption sur les particules en suspension et leur piégeage dans les sédiments apparaît être la voie principale (Hoch, 2001). Un schéma du cycle biogéochimique des composés organostanniques est représenté à la figure I-2. Les composés organostanniques disparaissent rapidement de l'eau, suite à leur piégeage dans les sédiments, mais aussi à leur dégradation biologique et photochimique à l'interface air-eau.

Alors que le temps de demi-vie du TBT ne dépassent pas quelques semaines dans l'eau, il peut atteindre plusieurs années dans les sédiments (De Mora et al., 1995). Par conséquent, les sédiments jouent un rôle prépondérant dans le cycle biogéochimique des composés organostanniques. Une remise en suspension des sédiments par un brassage naturel (marées, tempêtes...) ou artificiel (dragages) peut créer un risque écologique important même bien après la période de pollution (Fent, 1996). Par ailleurs, des processus de biométhylation de l'étain inorganique par des algues et des microorganismes dans l'environnement aquatique sont à l'origine de pollution non directement anthropogénique (Donard et Weber, 1988).

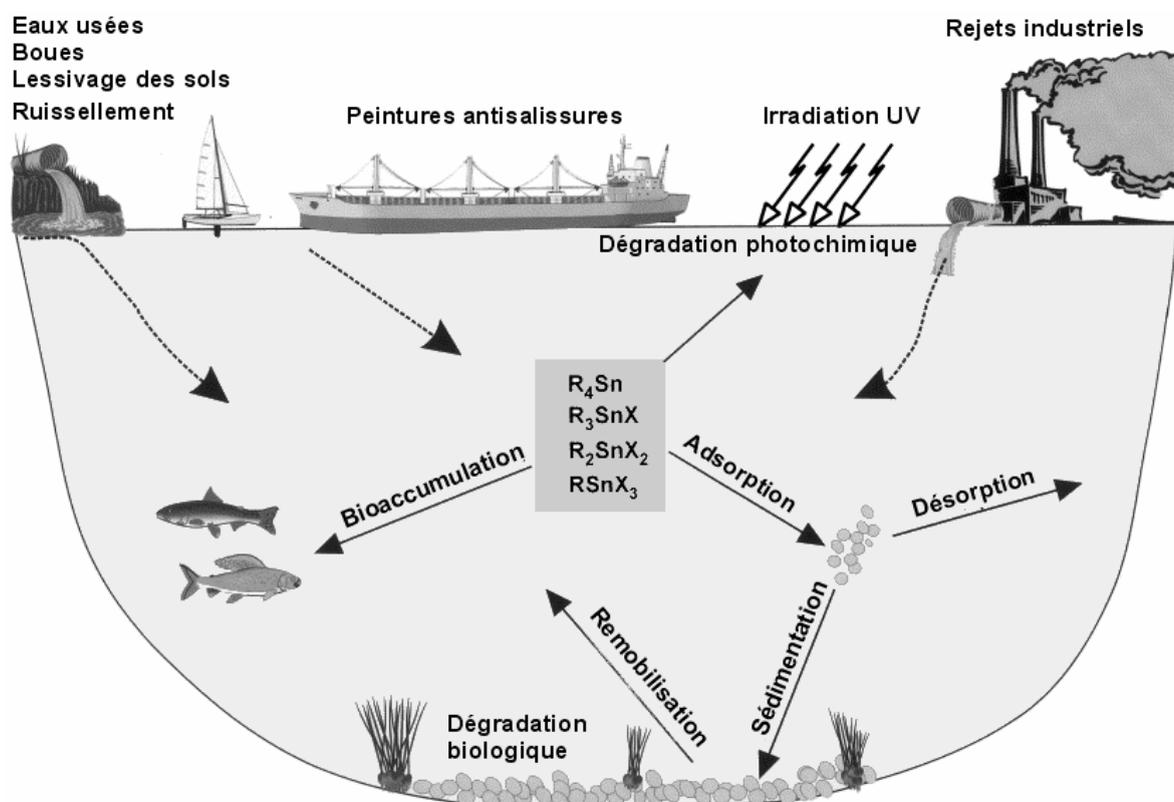


Figure I-2: Biogéochimie des composés organostanniques dans l'environnement aquatique (d'après Hoch, 2001).

## 1.2. Niveaux de présence dans l'environnement marin

### 1.2.1. Eaux marines

Un certain nombre de données bibliographiques concernant les teneurs en TBT dans les eaux marines est représenté dans le tableau I-1.

Localisation	TBT en ng.L <sup>-1</sup> (Sn)	Référence
<b>Pays avec réglementation du TBT</b>		
Baie de San Diego (USA)		Valkirs et al., 1991
Ports	2,4 - 50	
Baie	0,4 - 5,7	
Baie d'Otsuchi (Japon)	8 - 74	Harino et al., 1998
Port d'Osaka	4 - 36	
Côtes anglaises et écossaises (UK):		Law et al., 1994
Estuaires	< 17	
Ports	< 100	
Port d'El Masnou (Espagne)	27	Morcillo et al., 2000
Port de Gênes (Italie)	500 - 3 000	Rivarolo et al., 1999
<b>FRANCE</b>		
<b>Côte Atlantique</b>		
La Vigne port: 1986 / 1992	1 - 37 / 7	Alzieu, 2000 et Michel,
Arcachon port: 1986 / 1992 / 2001	3-23 / 16,8 / 2,9-7,4	non publié,
Brest ports 1992	2 - 21	Michel et Averty, 1996
Brest baie 1992	0,2 - 2,6	"
La Rochelle 1992	4 - 13	"
<b>Côte Méditerranéenne</b>		
Ports de Toulon, 1992 et 1998	0,2 - 6 et 7,2 - 59	Michel et Averty, 1996, 1999a
Port de Saint-Tropez, 1998	2,7	"
Port de Marseille, 1992	0,4 - 35	"
Ports de Monaco, Nice, Cannes, 1995	50 - 60	Tolosa et al., 1996
Port d'Antibes	188	
Port du Golfe Juan	143	
<b>Corse</b>		
Ports	12 - 82	Michel et Averty, 2001
Réserves naturelles: Lavezzi et Scandola	0,8 et 3	
<b>Pays sans réglementation du TBT</b>		
Port d'Alexandrie (Egypte)	40 (390)	Abd-Allah et al., 1995
<i>moyenne des valeurs (valeur maximale)</i>		
Bahrein	14 700	Hassan et al., 1992
Hong Kong (Chine)	1000	May-ming Lau et al., 1991
Baie de Piran (Slovénie)	180 - 630	Nemanic et al., 2002
<b>Eaux profondes et abyssales</b>		
Nord-Ouest Méditerranée (axe Toulon - Corse) <i>de 25 à 2 500 m de profondeur</i>	< 0,016 (1 200 m)	Michel et Averty, 1999b
<b>Parcours des pétroliers: Tokyo - Baie du Bengale</b>		
Baie de Tokyo (Japon)	< 1 - 2,7	Hashimoto et al., 1998
Détroit de Malacca	< 0,1 - 2	
Baie du Bengale (Inde) (pleine eau)	< 0,05 - 0,1	

Tableau I-1: Niveaux de présence du TBT dans les eaux marines (en ng.L<sup>-1</sup>).

Les analyses des composés organostanniques présents dans les eaux réalisées avant la réglementation de l'utilisation du TBT dans les peintures antisalissures affichaient des niveaux allant de 5 à 800 ng.L<sup>-1</sup> de TBT dans les zones portuaires en Amérique du Nord et en Europe, atteignant parfois 1 µg.L<sup>-1</sup> dans les eaux de subsurface les plus contaminées (Seligman et al., 1986b ; Waldock et Miller, 1983) et allant jusqu'à 2600 µg.L<sup>-1</sup> dans la micro-couche de surface dans les zones les plus polluées du lac Ontario (Canada) (Maguire et al., 1982). Dans les pays où l'utilisation du TBT dans les peintures antisalissures n'est pas réglementée, des concentrations extrêmement élevées sont enregistrées dans les eaux portuaires : 14,7 µg.L<sup>-1</sup> à Bahreïn (Hassan et al., 1992) et 1 µg.L<sup>-1</sup> à Hong Kong (May-ming Lau et al., 1991).

En ce qui concerne le littoral français, les résultats d'un suivi réalisé en 1986-1987 sur la côte atlantique indique des teneurs en TBT comprises entre <1 et 21 ng.L<sup>-1</sup> dans les eaux côtières et entre 4 et 63 ng.L<sup>-1</sup> (exceptionnellement 625 ng.L<sup>-1</sup>) dans celles des ports de plaisance. Sur la côte méditerranéenne, un échantillonnage réalisé en 1988 indique des teneurs maximales n'excédant pas 250 ng.L<sup>-1</sup> dans les ports de plaisance, 83 ng.L<sup>-1</sup> dans un port de commerce et de l'ordre de 1 ng.L<sup>-1</sup> dans la zone mytilicole de l'étang de Thau. Depuis, la contamination a diminué de manière sensible, puisque l'inventaire réalisé en 1992 a fait apparaître, à l'écart des sources, des niveaux de contamination moyens de l'ordre de 1,5 ng.L<sup>-1</sup> en Atlantique et supérieurs à 5,5 en Méditerranée (Alzieu et Michel, 1998). Actuellement, les concentrations enregistrées dans les zones portuaires excèdent rarement 100 ng.L<sup>-1</sup> le long de la côte atlantique et de la Manche (moyennes de 22 et 42, respectivement), et 200 ng.L<sup>-1</sup> sur la côte méditerranéenne (moyenne de 42) (Michel P., données non publiées, dans Alzieu, 2000). Les analyses effectuées par Michel et al. (1999a) sur 237 points d'échantillonnage du littoral français en 1997, n'ont pas révélé d'amélioration en comparaison avec le même suivi réalisé en 1992. La contamination des ports de plaisance par le TBT reste encore importante aujourd'hui. La contamination de la Méditerranée par les composés organostanniques est la plus préoccupante (Michel et Averty, 1996), du fait du nombre important d'installations portuaires dans des lagunes semi-fermées et d'un hydrodynamisme beaucoup plus faible qu'en Atlantique ou en Manche. Le triphénylétain a aussi été détecté dans de nombreux endroits, au Japon (Suzuki et al., 1998), dans des systèmes lacustres suisses et hollandais (Becker van Slooten et al., 1995; Stäb et al., 1995) et parfois à des concentrations supérieures à celles du TBT, pouvant atteindre jusqu'à 100 ng.L<sup>-1</sup>. Même si la contamination du littoral français traduit une amélioration parfois sensible, en de nombreux endroits cette contamination reste supérieure à celle connue pour provoquer des effets nocifs sur les organismes vivants.

Seuls quelques travaux se sont intéressés à la contamination des eaux en plein océan: Ten Hallers-Tjabbes et al. (1994) ont mis en évidence une relation entre la fréquence d'imposex (surimposition d'organes sexuels mâles chez les femelles) chez *Buccinum undatum* et l'intensité du trafic maritime en mer du Nord. Hashimoto et al. (1998) ont effectué des prélèvements d'eau en 1996 le long du parcours des pétroliers de la Baie de Tokyo (Japon) à la Baie du Bengale (Inde), par le passage du Détroit de Malacca, et détecté la présence de TBT tout le long du parcours avec des concentrations significatives dans le détroit de Malacca. Michel et Averty (1999b) ont établi un profil vertical de la contamination des eaux (de 25 à 2500 m de profondeur) le long d'un axe Toulon – Corse en Méditerranée et constaté une contamination en TBT maximale à 1200 m ( $0,02 \text{ ng.L}^{-1}$ ) et toujours significative à 2500 m ( $0,005 - 0,01 \text{ ng.L}^{-1}$ ). Mais surtout, le temps de demi-vie du TBT dans ces eaux (environnement oligotrophique) a été estimé à plusieurs années, contrairement aux eaux côtières, constituant par là même une nouvelle source d'intérêts en raison de l'ubiquité et de la persistance du TBT dans ces eaux (Alzieu, 2000).

Dans le Bassin d'Arcachon, les concentrations en TBT déterminées dans l'eau excédaient régulièrement  $100 \text{ ng.L}^{-1}$  de 1977 à 1981 et repassaient au niveau de  $1 \text{ ng.L}^{-1}$  à la fin des années 80 et au début des années 90, faisant suite à la réglementation de l'utilisation du TBT dans les peintures antisalissures en janvier 1982 (Ruiz et al., 1996).

### 1.2.2. Sédiments

Un certain nombre de données bibliographiques concernant les teneurs en TBT dans les sédiments marins est représenté dans le tableau I-2.

La contamination des sédiments est très variable selon les sites de prélèvement. Dans les sédiments portuaires, les concentrations sont en général de l'ordre de  $500$  à  $1000 \text{ ng.g}^{-1}$  de poids sec. Dans les ports situés autour du Bassin d'Arcachon, Sarradin et al. (1994) rapportent pour les sédiments superficiels des concentrations en TBT comprises entre  $4$  et  $158 \text{ ng.g}^{-1}$  de sédiment sec, avec une moyenne de  $59 \text{ ng.g}^{-1}$ . Les teneurs des zones ostréicoles situées à l'intérieur du Bassin, sont en moyenne de  $4 \text{ ng.g}^{-1}$  et au maximum de  $10 \text{ ng.g}^{-1}$ . Dans la rade de Brest, la contamination est considérablement plus élevée du fait des activités nautiques. Michel et Averty (1995) font état d'une forte contamination, puisque les sédiments portuaires contenaient entre  $340$  et  $2600 \text{ ng.g}^{-1}$  avec un site particulièrement pollué ( $8730 \text{ ng.g}^{-1}$ ). La moyenne à l'extérieur des zones portuaires s'établissait à  $16 \text{ ng.g}^{-1}$ . Les sédiments profonds sont également contaminés, comme l'atteste la carotte prélevée dans le port de la Trinité-sur-Mer qui montre des niveaux en TBT sensiblement constants

jusqu'à une profondeur de 70 cm (Alzieu et Michel, 1998). De la même façon, l'étude de Sarradin (1993) sur un carottage du port de Boyardville (Ile d'Oléron), montre la persistance de la contamination dans les sédiments enfouis depuis de nombreuses années ([TBT]=226 ng/g et [BT]=715 ng.g<sup>-1</sup>). L'auteur a estimé à 2 ans la demi-vie du TBT dans ces sédiments. De la même façon, un carottage du port d'Arcachon a aussi été réalisé par Quevauvillier et al. (1994). La concentration est maximale à 15 cm de profondeur ([TBT]=160 ng.g<sup>-1</sup> et [BT]=460 ng.g<sup>-1</sup>) avec l'observation d'une très légère diminution dans les premiers centimètres.

Localisation	TBT en ng/g (Sn)	Référence
Zones côtières (USA): <i>valeur moyenne</i>	22	Wade et al., 1990
Baie de Coos, Oregon (USA): [BT] totaux	3 - 3300	Elgethun et al., 2000
Port de Vancouver (Canada)	102 - 410	Stewart et Thompson, 1994
Baie de Vancouver	29 - 66	" "
à 25 km au large de Vancouver (à 370 m de pfd)	2,2	" "
Ports canadiens (1993-1994)		Chau et al., 1997c
Montréal et Toronto	10 - 200	" "
Burrard Inlet, Saint John, Halifax	40 - 3212	" "
Baie d'Otsuchi (Japon)	10 - 640	Harino et al., 1998
Port d'Osaka	4 - 284	" "
Baie d'Osaka	nd - 66	" "
Port de Hong-Kong (Chine)	500 - 1000	Ko et al., 1995
2 sites contenant certainement des flaques de peinture	18300 et 53000	" "
Baie du Bengale (Inde)	ND - 1280	Rajendran et al., 2001
Ports (Thaïlande)	4 - 1844	Kan-Atireklap et al., 1997
Baies	2 - 38	" "
East Anglia (Angleterre), 1989	4 - 533	Dowson et al., 1994
1992	<2 - 26	" "
Ports côtes nord-est et sud (Espagne)	124 - 18700	Diez et al., 2002
Ports mer du Nord et mer Baltique (Allemagne)	73 - 15130	Biselli et al., 2000
Iles Féroé (Norvège)	2 - 984	Folsvik et al., 1998
Nuuk, Groënland (Danemark)	417	Jacobsen et al., 2000
Zones côtières (Grèce): valeur moyenne	400	Tselensis et al., 1999
<i>Sédiment collecté en pleine mer</i>	300	
Port d'Arcachon (France)		
1990 (<100 µm)	10 - 380	Sarradin et al., 1993, 1994
1990 - 1991 (<60 µm)	76 - 596	Quevauvillier et al., 1994
carotte sédimentaire (0-40 cm) (<63 µm)	49 - 161	" "
Baie d'Arcachon		
1990, de 0 à 40 cm (<100 µm)	< DL - 75	Sarradin et al., 1993, 1994
Larros, Andernos	100 - 650	" "
1993 (<100 µm)	7 - 30	Ruiz et al., 1997
Port d'Arcachon ( <i>fraction sablonneuse</i> )	3340	Amouroux et al., 2000
Ports de Brest (France)	340 - 8730	Michel et Averty, 1995
Baie de Brest	1 - 81	" "

Tableau I-2: Niveaux de présence du TBT dans les sédiments marins (en ng.g<sup>-1</sup> poids sec).

Les mesures de réduction de l'utilisation de peintures à base de TBT semblent produire des résultats. Par exemple, les concentrations en TBT dans les sédiments du port de plaisance de Sydney (Colombie-Britannique, Canada) sont passées d'un maximum de  $0,52 \mu\text{g.g}^{-1}$  à  $0,064 \mu\text{g.g}^{-1}$ , en surface (Stewart et Thompson, 1994). Toutefois, les concentrations demeurent élevées – environ  $0,4 \mu\text{g.g}^{-1}$  – dans les sédiments du port de Vancouver, où la plupart des bateaux font plus de 25 m de long. Une récente étude réalisée par Diez et al. (2002) comparant les teneurs en butylétains dans les sédiments de nombreuses baies, marinas et ports de pêche de la Méditerranée a montré que la réglementation de l'utilisation du TBT dans les peintures antisalissures était efficace dans les marinas mais pas dans les ports de pêche. De nombreuses autres études aboutissent sensiblement au même constat. Mais l'intercomparaison des résultats obtenus sur les sédiments est rendue extrêmement difficile par l'absence de données sédimentologiques ou de paramètres géochimiques, tels que la granulométrie ou la teneur en carbone du sédiment. Il n'existe aucune normalisation des valeurs par un paramètre biogéochimique conservateur, tel que la fraction granulométrique inférieure à  $2 \mu\text{m}$ , les teneurs en aluminium ou en scandium (Donard et al., 2001).

Récemment, de nouvelles études ont porté sur la remobilisation des sédiments et montré l'apparition ubiquitaire d'espèces volatiles dans l'environnement côtier. Ces composés, des méthylétains et des formes mixtes méthylbutylétains pourraient résulter de processus de méthylation et d'hydruration naturelles de l'étain inorganique et des dérivés butylés des peintures antisalissures piégés dans les sédiments (Amouroux et al., 2000). Ces résultats suggèrent une diffusion continue à partir du sédiment d'espèces de TBT gazeuses (totalement alkylées:  $\text{MeSnBu}_3$ ); les auteurs ont également estimé le flux de ces espèces à l'interface sédiment-eau et eau-air dans le port d'Arcachon à  $50\text{-}370 \text{ nmol/m}^2/\text{an}$  et  $90 \text{ nmol/m}^2/\text{an}$ , respectivement. De ce fait, la remobilisation des sédiments peut constituer une source de contamination pour les eaux surnageantes, mais également pour l'atmosphère (Donard et al., 2001). Si les espèces méthylées de l'étain sont moins toxiques pour la vie aquatique que les formes butylées, on ne sait encore rien sur la toxicité de ces composés organostanniques. Plus de 20 composés organostanniques différents, incluant des méthylétains, des octylétains, ainsi que de nombreuses formes de méthylbutylétains, méthyloctylétains et d'éthylbutylétains et des formes oxydées de butylétains ont aussi été décelées dans des sédiments portuaires et parfois à des niveaux de concentration importants (Suzuki et al., 1999; Vella et al., 2000). Ces auteurs ont aussi comparé les chromatogrammes obtenus sur des échantillons de sédiments, de moules et d'une solution commerciale de TBTCI de qualité technique (96%) et mis en évidence la présence de

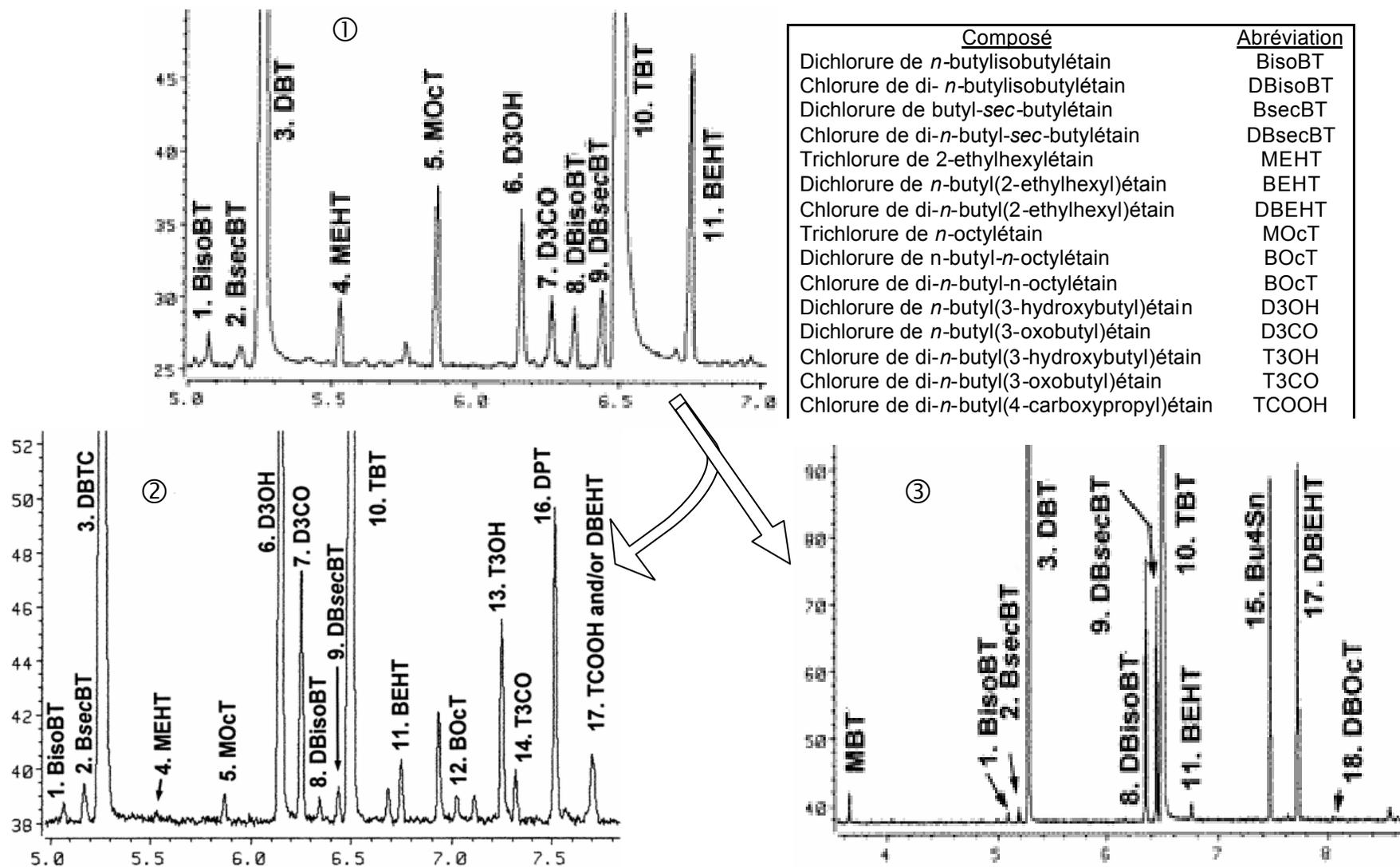


Figure I-3: Chromatogrammes GC-AED (extraits), ① : d'une solution commerciale de tributylétain de qualité technique (96%), ② : d'un sédiment portuaire, ③ : d'un tissu de bivalve prélevé sur le marché de Tokyo (Suzuki et al., 1999).

chacune des impuretés de la solution commerciale de TBT dans les échantillons environnementaux (figure I-3).

### 1.2.3. Bioaccumulation des composés organostanniques

#### 1.2.3.1. Bioaccumulation et biotransformation par les mollusques bivalves

Waldock et Miller (1983) ont déterminé des concentrations comprises entre 0,1 et 3,5  $\mu\text{g.g}^{-1}$  de poids sec dans les huîtres *Ostrea edulis* et *Crassostrea gigas* de la côte anglaise. Dans le Bassin d'Arcachon, les teneurs en étain organique total chez *Crassostrea gigas* ont varié de 0,4 à  $< 0,06 \mu\text{g.g}^{-1}$  de poids sec entre 1982 et 1985 à la suite des mesures restreignant l'emploi du TBT dans les peintures antisalissures (rapport IFREMER, 1997). Les analyses d'étain effectuées au début des années 80 ont rapporté des concentrations en étain total de 28  $\mu\text{g.g}^{-1}$  dans les tissus de scrobiculaires prélevés dans le port d'Arcachon (Ruiz et al., 1997). Une synthèse bibliographique de quelques données récentes sur l'accumulation du TBT par les mollusques est présentée dans le tableau I-3.

D'après Laughlin et al. (1986b), la bioaccumulation du TBT est contrôlée par deux mécanismes: le premier implique la partition du TBT entre la phase dissoute aqueuse et les tissus lipidiques de l'organisme, et le second, la complexation du TBT avec les ligands organiques. Les études réalisées sur l'absorption du TBT par les macroorganismes ont démontré que le temps d'équilibre entre les teneurs dans l'eau et dans les tissus sont généralement estimés en semaines ou en mois plutôt qu'en jour. Les cinétiques de bioaccumulation et d'élimination ont été expérimentalement étudiées sur différentes espèces de bivalves, comme les moules (*Mytilus edulis*, *Aequipecten irradians*), les huîtres (*Ostrea edulis* et *Crassostrea gigas*) ou la coquille St Jacques *Pecten maximus*, la cinétique d'accumulation étant plus rapide que la phase d'élimination. Les valeurs du facteur de bioconcentration (BCF, "bioconcentration factor") des composés organostanniques sont généralement élevées chez les mollusques et peuvent aller de 2000 à 160000, avec une valeur de 500000 obtenue chez la mye *Mya arenaria* (Waldock et Thain, 1983b; Laughlin et al., 1986b; Bryan et Gibbs, 1991), et sont généralement nettement supérieurs aux valeurs prédictives établies à partir des coefficients de partage octanol-eau (Kow) et des équations de corrélation de Veith, de Mackay ou de Geyer (Laughlin et al., 1986a). De plus, un certain nombre d'études ont montré que les BCF chez les moules *Mytilus edulis*, exposées au TBT soit par l'eau, soit par du phytoplancton contaminé, étaient inversement proportionnels aux concentrations de TBT dans l'eau (Laughlin et al., 1986b; Zoulian et al., 1989; Huang et al.,

1995, Salazar et Salazar, 1996). Chez des palourdes *Venerupis decussata* exposées à des concentrations de TBT de 0,004 à 2,5  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (TBTCl), l'état d'équilibre a été atteint en 40 jours et les BCF étaient compris entre 10000 et 40000 (Gomez-Ariza et al., 1999). Les temps de demi-vie du TBT étaient compris entre 11 et 36 jours, augmentant avec les concentrations d'exposition les plus faibles. De la même façon, des moules *Mytilus edulis* et *Aequipecten irradians* ont été exposées à des concentrations de TBT de 0,02 à 0,5  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (TBTCl) pendant 60 jours (Huang et Wang, 1995). Les BCF étaient compris entre 2000 et 10000 dans les tissus de moules et un état d'équilibre a été atteint en 25 jours, à l'exception de la plus forte dose d'exposition, chez *Mytilus edulis*. Chez *Aequipecten irradians*, l'état d'équilibre n'a été atteint que pour la plus faible dose d'exposition. Ces auteurs ont aussi montré que l'accumulation par la voie trophique (algues *Dunaliella salina* et *Dunaliella vivides*) représentait une part non négligeable dans la bioaccumulation du TBT par les moules, bien qu'aucune bioamplification n'ait été mise en évidence.

Localisation	Espèce	TBT ng(Sn)/g	Référence
Islande	<i>Mytilus edulis</i>	4 - 51 *	Skarphédinsdottir et al., 1996
	<i>Nucella lapillus</i>	4 - 25 *	
Norvège	<i>Mytilus edulis</i>	7 - 736 *	Folsvik et al., 1998
Iles Féroé (Norvège)		10 - 55 *	
Groenland (DK)	<i>Mytilus edulis</i>	0,5 - 1 *	Jacobsen et al., 2000
Baie de Chine (Corée)	<i>Mytilus sp.</i>	200 - 500	Hwang et al., 1999
	<i>Crassostrea gigas</i>	250 - 740	
Zones côtières (Corée)	<i>Mytilus edulis</i>	49 - 2500 *	Hong et al., 2002
Zone ostréicole, Taïwan (Chine)	<i>Thais clavigera</i>	84 - 1950	Hung et al., 2001
Port d'Alexandrie (Egypte)	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	420	Abd-Allah et al., 1995
	<i>Tapes decussatus</i>	320	
Côtes O et E (Canada)	<i>Mytilus edulis</i>	25 - 1200	Chau et al., 1997
Côtes O et E (USA): 1988-1990	<i>Mytilus edulis</i>	4 - 2050	Uhler et al., 1993
Baie d'Otsuchi (Japon)	<i>Mytilus edulis</i>	20 - 390 *	Harino et al., 1998
Côte Sud (Espagne):1991-1998	<i>Venerupis decussata</i>	50 - 400	Gomez-Ariza et al., 2000
Côte d'Essex (UK)	<i>Crassostrea gigas</i>	1450 - 3500	Waldock et al., 1983
	<i>Ostrea edulis</i>	<0,1 - 800	
Zone côtière (Pologne)	<i>Mytilus edulis</i>	2,2 - 40 *	Albalat et al., 2002
Gênes port (Italie)	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	287 - 2172	Rivaro et al., 1999
Baie de Piran (Slovénie)	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	500 - 3500	Nemanic et al., 2002
FRANCE			
Bassin d'Arcachon:1982 [OT]	<i>Crassostrea gigas</i>	370 **	Rapport IFREMER, 1997
Bassin d'Arcachon:1985 [OT]	"	< 62 **	
Bassin d'Arcachon:1993	<i>Scrobicularia plana</i>	28 - 165	Ruiz et al., 1997

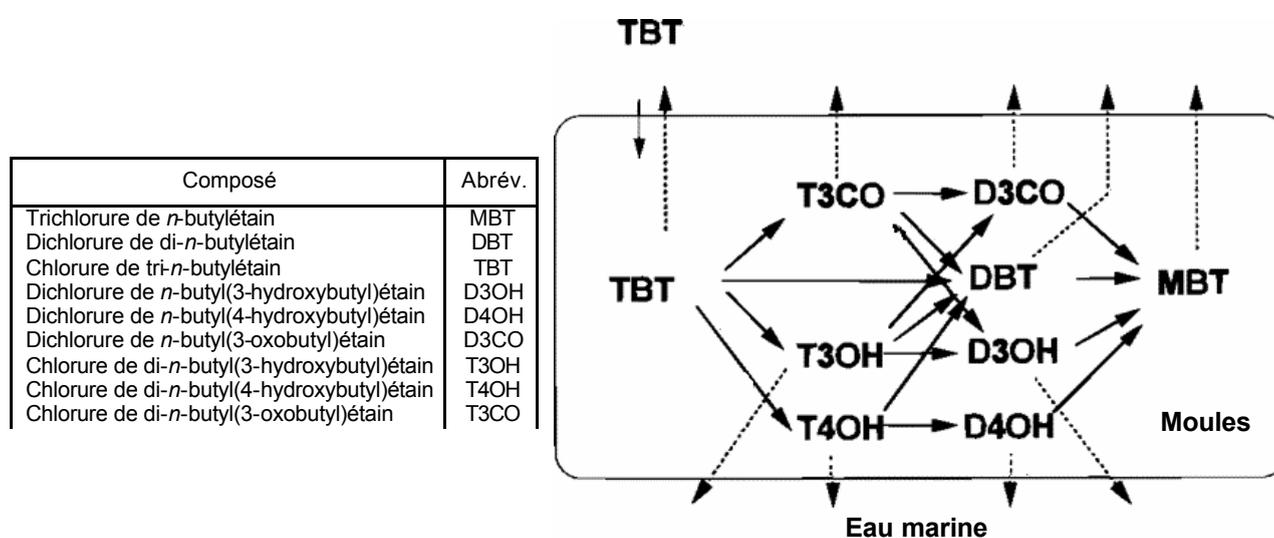
\* Poids frais, \*\* Concentrations en étain organique total.

**Tableau I-3: Niveaux de présence du TBT dans les mollusques marins (en  $\text{ng.g}^{-1}$  de poids sec).**

Laughlin et al. (1986b) ont étudié la bioconcentration à court terme (48h) et long terme (47 jours) du TBTO [oxyde de bis(tributylétain);  $0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ ] chez la moule *Mytilus edulis*. L'accumulation est très rapide au court des 90 premières minutes de contact et apparaît deux fois plus élevée dans les branchies que dans les viscères. A la fin de l'essai, l'état d'équilibre entre les teneurs dans l'eau et dans les tissus n'était pas atteint et les facteurs de bioconcentration (BCF) étaient de l'ordre de 5000 par rapport à l'eau et inférieur à 2 par rapport au phytoplancton ayant servi de nourriture. Des gastéropodes *Nucella lapillus* nourris avec des moules contaminées au  $^{14}\text{C}$ -TBT, présentaient une accumulation deux ou trois fois plus élevée que les animaux exposés au TBT directement par l'eau (Bryan et al., 1989). L'importance de la voie trophique dans l'accumulation du TBT a aussi été reportée chez la moule *Mytilus edulis* (Huang et al., 1995), bien que cette voie semble moins importante que chez les gastéropodes. Davies et al. (1997) ont estimé à environ 40% la part de TBT accumulé par la voie trophique chez des gastéropodes *Nucella lapillus* exposés au TBTO dans l'eau et nourris avec des moules *Mytilus edulis*. Coehlo et al. (2002b) n'ont pas observé de bioamplification du TBT chez des palourdes *Ruditapes decussatus* exposé au TBT via du phytoplancton (*Isochrysis galbana*) contaminé par le TBT. Bien que les mollusques soient capables d'accumuler le TBT à partir de l'alimentation, aucunes des études précédemment citées n'ont fait état d'une bioamplification du TBT chez ces espèces. Cependant, Mensink et al. (1997) ont observé une bioamplification des phénylétains entre *Mytilus edulis* et le gastéropode *Buccinum undatum*, mais pas des butylétains. De plus, il semblerait que les concentrations relativement élevées rencontrées chez les bivalves fouisseurs (palourdes, coques) pourraient refléter le rôle important des particules sédimentaires dans l'accumulation du TBT. Par exemple, il semblerait que pour le bivalve fouisseur *Scrobicularia plana*, l'absorption du TBT à partir des sédiments soit la principale voie d'accumulation (Langston et Burt, 1991).

Lee (1991) a démontré que la rétention du TBT dans les tissus des huîtres était liée à la très faible activité des fonctions mixtes oxygénases (MFO) chez ces mollusques, comparativement aux crustacés et aux poissons. Il semble établi que les crustacés et les poissons possèdent des systèmes enzymatiques capables de métaboliser les TBT en hydroxybutyldibutylétain, dibutylétain et monobutylétain, mais le devenir de ces métabolites est encore inconnu. Il ne faut pas non plus négliger la possibilité qu'une exposition à des concentrations très élevées de TBT pourrait inhiber les mécanismes de détoxification. L'absence d'un tel système de détoxification chez les bivalves pourrait expliquer leur faible capacité d'élimination du TBT, lorsque les individus exposés au TBT sont replacés en eau propre. De plus, les fortes concentrations de TBT rapportées chez certains bivalves

fouisseurs ( $36 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  chez *Scrobicularia plana*,  $50 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  chez la mye *Mya arenaria*) ainsi que la forte prédominance du TBT parmi les butylétains dans les tissus (> 90% chez la mye) semblent indiquer une capacité réduite de biotransformation du TBT chez ces bivalves (Bryan et Gibbs, 1991; Langston et al., 1987). Cependant, il semblerait que les mollusques bivalves soient capables, tout comme les crustacés, de métaboliser le TBT par débutylation et hydroxylation. Suzuki et al. (1999) ont montré que le TBT bioaccumulé par *Mytilus edulis* était rapidement transformé (quelques jours) en dibutyl(3-oxobutyl)étain, le principal métabolites observé. Ces auteurs ont proposé un modèle de biotransformation du TBT par les moules, représenté à la figure I4.



**Figure I4: Modèle d'accumulation, de biotransformation et de dépuraction du TBT chez les moules *Mytilus graynus* et *Mytilus edulis* (Suzuki et al., 1998).**

Actuellement, les études de l'impact des composés organostanniques sur les mammifères marins représente une part croissante des travaux publiés sur les composés organostanniques (Iwata et al., 1995; Kannan et al., 1996, 1997a, 1997b, 1998), et d'autre part, l'évidence croissante de l'impact du TBT sur les systèmes biologiques a également conduit à la multiplication des travaux s'attachant à mettre en évidence les perturbations endocriniennes induites par les composés organostanniques (Matthiessen, 1998, Alzieu, 2000; Oberdöster et al., 2000, 2002).

### 1.2.3.2. Les composés organostanniques dans les mammifères marins

Des concentrations significatives ont été retrouvées dans divers tissus de nombreux mammifères marins: dans des marsouins *Neophocaena phocaenoides* du Pacifique Nord et du Japon [la concentration maximale en butylétains enregistrée dans le foie atteignant 10  $\mu\text{g.g}^{-1}$  de poids frais] (Iwata et al., 1995), dans des dauphins *Tursiops truncatus* d'Italie et des zones côtières US [concentration moyenne en butylétains dans le foie : 580  $\text{ng.g}^{-1}$  (Sn) de poids frais] (Kannan et al., 1996, 1997a, 1997b), ainsi que dans des lions de mer *Eumetopias jubatus* du Japon (Kim et al., 1996) et des loutres de mer *Enhydra lutris nereis* de Californie (Kannan et al., 1998). Ce dernier a rapporté des concentrations hépatiques de TBT comprises entre 10 et 1300  $\text{ng.g}^{-1}$  (Sn) de poids frais de foie de loutres (concentration moyenne en butylétains dans le foie :  $550 \pm 850 \text{ ng.g}^{-1}$  de poids frais). Ces auteurs ont également rapporté des concentrations en butylétains deux fois plus élevées chez les femelles que chez les mâles. De plus, ils ont établi une relation entre les teneurs en butylétains dans le foie et les causes de décès des animaux échoués. Les loutres mortes à la suite de maladies infectieuses présentaient des teneurs moyennes en butylétains de 650  $\text{ng.g}^{-1}$  (Sn), supérieures à celles enregistrées chez les individus décédés à la suite de traumatismes (100  $\text{ng.g}^{-1}$  poids frais). Dans ces organismes, les composés organostanniques sont principalement concentrés dans le foie et la graisse et sont présents sous la forme prédominante du DBT, le pourcentage de DBT parmi les butylétains est supérieur à 65 % chez les cétacés (Iwata et al., 1995; Kim et al., 1996b; Kannan et al., 1997), indiquant une métabolisation du TBT dans le foie des mammifères marins.

Takahashi et al. (1997) ont trouvé des concentrations en butylétains comprises entre 20 et 980  $\text{ng.g}^{-1}$  de poids frais dans plusieurs tissus d'organismes vivant en eau profonde (poissons: *Zenopsis nebulosa*, *Deania calcea*,...; crustacés: *Aristeus virilis*, *Nephrops japonicus*,...; céphalopodes: *Octopus tenuicirrus*, *Sepiidae sp.*,...; gastéropodes: *Nibea sp.*, *Plechorhynchus sp.*,...) collectés dans la baie de Suruga au Japon. Le TBT prédomine dans les organismes abyssaux, certainement en raison de la faible capacité de ces organismes à décomposer le TBT, mais aussi des plus faibles températures, d'une pénétration réduite de la lumière et du manque de phytoplancton dans ces zones, résultant en une inhibition de la dégradation du TBT (Takahashi et al., 1997).

## **1.2.4. Législation et peintures antisalissures alternatives**

### **1.2.4.1. Législation**

En raison des préoccupations que suscite le TBT, l'utilisation de ce produit comme composant dans les peintures antisalissures a été interdite pour la plupart des bateaux de moins de 25 m de long.

La France a été le premier pays à limiter, dès janvier 1982, l'usage des peintures antisalissures à base d'organostanniques, en raison d'effets néfastes sur l'ostréiculture (Alzieu et al., 1982). La législation en vigueur (décret n° 92-1074 d'octobre 1992) interdit la mise sur le marché, la vente et l'utilisation de peintures antisalissures pour des navires d'une longueur hors tout de 25 m. Dès 1989, l'Union européenne a décidé d'interdire sur son territoire la commercialisation de ces composés. La huitième modification de la directive 76/769 interdit l'utilisation de peintures à base d'organostanniques pour les bateaux de moins de 25 m, les équipements aquacoles et toute structure immergée et réserve aux seuls professionnels leurs usages dans des emballages de capacité supérieure à 20 litres. L'Union Européenne s'est toutefois abstenue d'étendre cette obligation à tous les navires jusqu'à ce qu'un accord sur l'interdiction des composés organostanniques dans le monde entier ait été conclu. Actuellement, une nouvelle directive communautaire renforce la réglementation de la mise sur le marché et de l'emploi des composés organostanniques (Dir. n° 2002/62/CE de la Commission Européenne, 9 juillet 2002) [le texte de la directive est disponible à l'adresse internet : <http://europa.eu.int/comm/enterprise/chemicals/markrestr/ongowk/recentmodif.htm>]. Cette nouvelle modification a pour objet d'interdire strictement l'emploi des composés organostanniques en milieu aquatique. Entre temps, une nouvelle convention internationale sur le contrôle des produits antisalissures a été signée le 5 octobre 2001, dans le cadre de l'Organisation maritime internationale (OMI). Elle prévoit l'interdiction mondiale de l'application de composés organostanniques qui agissent comme biocides dans les produits antisalissures pour bateaux à partir du 1er janvier 2003 et l'interdiction totale de la présence de composants contenant ces produits dans les systèmes antisalissures utilisés sur les bateaux à partir du 1er janvier 2008.

La Commission Européenne propose aujourd'hui d'interdire les composés organostanniques utilisés comme biocides actifs sur les navires battant pavillon d'un État membre d'ici le 1er janvier 2003, et d'assurer une interdiction complète de la présence de composés organostanniques sur tous les navires, quel que soit leur pavillon, d'ici le 1er janvier 2008. Ajoutons cependant que la Commission Européenne n'a pas permis à la Suisse d'adopter, au niveau national, une mesure visant à interdire totalement l'utilisation de peintures à base d'organostanniques pour tous les bateaux à partir de 2003, en dépit du fait

que l'Organisation Maritime Internationale (IMO) travaille à l'application d'une mesure similaire au niveau international. La résolution de l'IMO interdit actuellement les peintures à base de TBT pour les bateaux de moins de 25 m et élimine celles dont le taux de lixiviation moyen est supérieur à 4 µg/cm<sup>2</sup>/jour.

Notons également qu'un certain nombre de pays (Canada, USA, UK, Allemagne, Pays-Bas) ont établi un critère de qualité des eaux côtières (EQT : "*Environmental Quality Target*") compris entre 20 et 1 ng.L<sup>-1</sup> (TBT) suivant les pays (réduit actuellement à 2 ng.L<sup>-1</sup> en Angleterre (Abel, 1996) et à 1 ng.L<sup>-1</sup> (TBT) au Pays-Bas. De plus, ces pays ont également réglementé les rejets des eaux de rinçage et les composés abrasifs explosifs utilisés dans l'élaboration des peintures antisalissures à base de TBT, ces derniers devant être collectés et traités en tant que déchets dangereux. Dans ces pays, une attention particulière est également portée à la collecte et au traitement des eaux usées des installations portuaires.

#### **1.2.4.2. Peintures antisalissures alternatives**

La restriction d'utilisation du TBT par la Commission Européenne a eu pour effet de susciter le développement et l'usage de nouvelles substances chimiques pour la protection des bateaux et des installations portuaires et industrielles. La contamination du milieu marin par ces produits à caractère de biocides, composés organiques élaborés et issus de synthèse, est très mal connue.

En ce sens, le projet européen réalisé dans le cadre du programme MAST III – DGXII (ACE, "*Assessment of Antifouling Agents in Coastal Environments*") dans le domaine «Méthode de Surveillance, de Prévision et de la Gestion des Zones Côtières» vise à étudier la contamination du milieu marin côtier par les substances chimiques antisalissures alternatives (autres que TBT et ses dérivés) et l'évaluation des risques écologiques liés à cette contamination.

L'ensemble des résultats de l'enquête auprès des fabricants de peintures montre qu'environ 190 000 litres de peintures antisalissures ont été vendus sur le territoire français en 1998, soit environ 230 tonnes. Les biocides employés sont principalement le diuron [3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-diméthylurea] (5%), le zinc pyrithione [complexe zinc et 1-oxyde-2-mercaptopyridine] (3%), le chlorothalonil [2,4,5,6-tétrachloro-isophthalonitrile] (3%), le dichlofluanid [N'-diméthyl-N-phénylsulfamide] (1%) et l'irgarol 1051 [2-méthylthio-4-tertbutylamino-6-cyclopropylamino-s-triazine] (1%). On retrouve également le Kathon 5287 (Sea-nine 211) [4,5-dichloro-2-n-octyl-4-isothazolin-3-one] et le zineb [éthylène de bis dithiocarbamate de zinc] dans des proportions tout à fait négligeables. Ces biocides sont

utilisés en association avec l'oxyde cuivreux ou le thiocyanate de cuivre (79 et 8% respectivement).

Dans le Bassin d'Arcachon, les quantités totales de peintures antisalissures utilisées en 1997, 1998 et 1999 étaient de 9400 litres (1997 et 1998) et de 11200 litres (1999) (Auby, pers. comm.). Les études réalisées par l'IFREMER ont rapporté des concentrations non négligeables de diuron et d'irgarol dans les eaux du Bassin (tableau I-4).

	Concentrations en ng.L <sup>-1</sup> : limite inférieure - limite supérieure (moyenne)			
	Diuron		Irgarol	
	1999	2000	1999	2000
Arcachon (port)	ND – 150 (28)	49 – 186 (116)	23 – 95 (49)	16 – 34 (23)
La Vigne (baie)	ND	ND	ND	ND
Les Jacquets (baie)	ND – 20 (8)	ND – 37 (18)	ND – 4 (1)	ND – 40 (8)
Tessilat (baie)	ND – 17 (5)	15 – 32 (17)	ND – 9 (3)	ND – 8 (2,5)

**Tableau I-4: Concentrations (ng.L<sup>-1</sup>) en diuron et en irgarol dans les eaux du Bassin d'Arcachon en été (Auby et al., 2002). Les concentrations sont exprimées sous la forme limite inférieure - limite supérieure (moyenne). ND: inférieur à la limite de quantification.**

Les niveaux d'irgarol sont cependant plus faibles que ceux rapportés dans les marinas (de 110 à 1700 ng.L<sup>-1</sup> avec une moyenne de 650 ng.L<sup>-1</sup>) et dans les ports (de 5 à 280 ng.L<sup>-1</sup> avec une moyenne de 88 ng.L<sup>-1</sup>) de la côte d'Azur (Readman et al., 1993). Basheer et al. (2002) ont rapporté des concentrations moyennes de TBT et d'irgarol 1051 dans les eaux de Singapour (26 sites échantillonnés en novembre 2000) de 1,4 µg.L<sup>-1</sup> et de 2 µg.L<sup>-1</sup>, respectivement. Dans une étude de surveillance biologique dans les marinas de la mer du Nord et de la mer Baltique, Biselli et al. (2000) ont rapporté des concentrations d'irgarol supérieures à 440 ng.L<sup>-1</sup> dans les eaux et de 220 ng.g<sup>-1</sup> (poids sec) dans les sédiments de la mer Baltique, et de 11 à 170 ng.L<sup>-1</sup> dans les eaux et de 3 à 25 ng/g dans les sédiments de la mer du Nord. De plus, Albanis et al. (2002) ont rapporté des concentrations d'irgarol de 690 ng.g<sup>-1</sup> (poids sec), de dichlofluanid de 195 ng.g<sup>-1</sup> et de chlorothalonil de 165 ng.g<sup>-1</sup> dans les sédiments portuaires de la côte grecque.

Bien que de nombreuses études récentes soient consacrées à la détermination de ces *antifouling* dans l'environnement marin, il n'existe actuellement que très peu de données écotoxicologiques disponibles sur ces composés. L'irgarol 1051 (à base de triazine) a été détecté à des concentrations avoisinant les seuils de toxicité aiguë le long des côtes méditerranéennes (Tolosa et al., 1996). De plus, il est présent dans les eaux de la côte ouest suédoise à des concentrations suffisamment élevées pour affecter les communautés algales

(Dahl et Blanck, 1996). Le mode d'action de l'irgarol sur les algues est basé sur l'inhibition du transport électronique photosynthétique dans les chloroplastes. La phytotoxicité de ce composé a également été mentionnée par Okamura et al. (2000) rapportant une concentration sans effet (NOEC, "non observed effect concentration") de 0,3  $\mu\text{g.L}^{-1}$  pour de nombreuses communautés algales (*Porphyra yezoensis*, *Eisenia bicyclis*, *Closterium ehrenbergii*).

### 1.3. Toxicité et effets biologiques du TBT

#### 1.3.1. Toxicité des composés organostanniques

La toxicité des composés organostanniques vient essentiellement de leur forte lipophilie et de leur capacité à traverser les membranes biologiques. La sensibilité de nombreuses espèces animales vis-à-vis des trialkylétains dépend de la nature du groupement alkyle. Ainsi, les tributyl-dérivés sont toxiques pour les mollusques, les champignons et les bactéries, les triméthyl-dérivés pour les insectes et les triéthyl-dérivés pour les mammifères (tableau I-5). Les radicaux butylés confèrent ses propriétés biocides à l'étain. En règle générale, la toxicité des groupements alkyles diminue avec le nombre de ces groupements. Une exception notable a été rapportée par Lascourrèges-Berdeü (1996) où le taux de croissance de la bactérie *Desulfovibrio* est réduit, en condition anoxique, plus fortement par le MBT que par le TBT (de 25% pour des concentrations de MBTCl de 1,4 à 4  $\mu\text{M}$  et de 55% seulement pour une concentration élevée de TBTCl de 170  $\mu\text{M}$ ).

Composé trisubstitué	Espèce
Méthyle / $\text{CH}_3$	Insectes
Ethyle / $\text{C}_2\text{H}_5$	Mammifères
Butyle / $\text{C}_4\text{H}_9$	Champignons, algues, mollusques, poissons
Phényle / $\text{C}_6\text{H}_5$	Champignons, mollusques, poissons
Hexyle / cyclo- $\text{C}_6\text{H}_{11}$	Mites, poissons

**Tableau I-5: Les composés organostanniques trisubstitués et leurs effets spécifiques sur les espèces.**

Ce sont les mollusques qui présentent la plus grande sensibilité à une contamination des eaux par le TBT. Les effets sur le développement larvaire, ainsi que des perturbations de la différenciation sexuelle des gastéropodes ont été observés à des concentrations aussi faibles que  $1 \text{ ng.L}^{-1}$ . Le TBT a été rendu responsable de la diminution de nombreuses populations de mollusques, comme par exemple la palourde *Scrobicularia plana* dans le Bassin d'Arcachon (Ruiz et al., 1996), de nombreuses espèces de gastéropodes, et notamment *Nucella lapillus* et *Buccinum undatum*, le long des côtes anglaises et nordiques (Evans, 2000; Ten Hallers-Tjabbes et al., 1996) ou l'ormeau *Haliotis gigantea* au Japon (Horiguchi et al., 2000).

### **1.3.2. Effets du TBT sur les mollusques**

#### **1.3.2.1. Effets sur le développement larvaire des bivalves**

Les premiers effets du TBT sur l'environnement côtier ont été observés dans le Bassin d'Arcachon (côte atlantique, France) au début des années 80 (Alzieu et al., 1982). A partir de 1975, la production ostréicole a été très fortement perturbée par deux phénomènes concomitants : la décroissance progressive de la reproduction et du recrutement des juvéniles, et l'apparition généralisée d'anomalies de la calcification de la coquille chez les adultes. De 1975 à 1982, le captage du naissain observé dans le Bassin d'Arcachon a été faible, voire inexistant dans certains secteurs, alors qu'il demeurerait normal à l'extérieur du Bassin. His et Robert (1983) ont montré que les larves de *Crassostrea gigas* étaient très sensibles au TBT à partir de concentrations aussi faibles que  $0,7 \text{ ng.L}^{-1}$ , et établit une échelle de relation entre la concentration en TBT et les effets sur l'embryogenèse et le développement des larves de *Crassostrea gigas*, depuis le seuil sans effet ( $0,7 \text{ ng.L}^{-1}$  en étain) jusqu'à l'inhibition de la fécondation ( $35 \mu\text{g.L}^{-1}$  en étain).

Le TBT affecte la croissance des moules *Mytilus edulis* pour des concentrations environnementales supérieures ou égales à  $200 \text{ ng.L}^{-1}$  (Salazar et Salazar, 1991) ou pour des concentrations tissulaires de  $1 \mu\text{g.g}^{-1}$  en poids sec (Widdows et al., 1993). Beaumont et Budd (1984) ont relevé une inhibition de la croissance des larves véligères de *Mytilus edulis* à  $100 \text{ ng.L}^{-1}$ , concentration correspondant à la  $\text{LC}_{50}$  (15 jours). Les moules plus âgées apparaissent moins sensibles, la croissance des juvéniles n'étant inhibée qu'à partir d'une concentration de TBT de  $400 \text{ ng.L}^{-1}$  (Strømgren et Bongard, 1987).

Des conséquences néfastes de la contamination des eaux par le TBT sur le captage de naissains ont également été signalées sur les élevages d'huîtres *Ostrea edulis* en Angleterre par Thain (1986) et de coquilles Saint-Jacques en Irlande par Minchin (1987) et sur de

nombreuses populations de palourdes *Scrobicularia plana* sur les côtes anglaises et dans le Bassin d'Arcachon (Ruiz et al., 1997).

### **1.3.2.2. Effets sur la différenciation sexuelle des gastéropodes**

L'influence du TBT sur la sexualité des gastéropodes a été mise en évidence par Smith (1981) et confirmée par Féral et Le Gall (1982). Ces auteurs ont montré que l'apparition de caractères génitaux mâles chez les femelles *Nassarius obsoletus*, et *Ocenebra erinacea*, phénomène connu sous le nom d'imposex, était liée à la présence de TBT dans le milieu. L'imposex a aussi été observé sur les femelles *Nucella lapillus* par Gibbs et Bryan (1987) qui ont défini six stades d'évolution de l'imposex, de la formation de vase déférent (canal entre la prostate et le pénis) (stade 1) jusqu'à la stérilisation de l'individu par blocage de l'oviducte et accumulation des œufs dans la glande (stade 6). Il est généralement accepté que ce phénomène d'imposex, décelé chez plus de 150 espèces de gastéropodes (Matthiessen et al., 1998), apparaisse pour une concentration de TBT de 1 ng.L<sup>-1</sup>. Des expériences en laboratoire ont aussi montré que ce phénomène pouvait être initié par le TPT à la même concentration (Horiguchi et al., 1997). Le mécanisme conduisant à l'imposex est une perturbation endocrinienne et est détaillé dans le paragraphe 2.2.

Le déclin de certaines populations de *Nucella lapillus* a pu ainsi être expliqué par la proximité de sources de TBT. Bech et al. (2002) ont récemment montré que l'établissement d'un port en Thaïlande était responsable de l'apparition et de l'évolution de l'imposex chez *Chicoreus capucinus*. Depuis la réglementation de l'utilisation du TBT, les populations de gastéropodes sont redevenues importantes en Angleterre (Oberdöster, 2001). Malgré les 30 années d'utilisation du TBT comme biocide principal dans les peintures antisalissures, il existe encore des populations de *Nucella lapillus* en bonne santé à quelques kilomètres de plusieurs ports anglais et norvégiens ou d'autres espèces de gastéropodes dans d'autres régions (Evans et al., 1996). Cependant, aucune amélioration n'a été observée le long des côtes portugaises (Barroso et Moreira, 2003), où la contamination globale par le TBT semble avoir augmentée, témoignant de l'inefficacité de la réglementation de 1993 au Portugal (interdisant l'utilisation de peintures à base de TBT pour les bateaux de moins de 25 m; directive européenne 89/677/EEC).

Ce phénomène d'imposex sert d'indicateur biologique spécifique d'exposition au TBT dans de nombreux programmes de surveillance biologique (Evans et al., 1996; Quintela et al., 2000; Oberdöster, 2001). Cependant, l'utilisation abusive de ce biomarqueur a généré des avis très partagés sur la sévérité de la contamination des écosystèmes aquatiques par le

TBT – certains auteurs observant par exemple des perturbations de la reproduction (jusqu'au stade de la stérilité) chez les populations de gastéropodes de la Mer du Nord, alors que d'autres (Evans et al., 1995) font état d'un recouvrement impressionnant de ces populations le long des mêmes zones côtières –, et ce pour plusieurs raisons:

i) les différents programmes de surveillance biologique se sont focalisés sur les zones d'activité nautique intense au détriment des zones côtières,

ii) les mesures de l'imposex ont été utilisées de façon trop pessimiste pour conclure à une stérilité partielle ou totale des populations de gastéropodes (Evans et Nicholson, 2000),

iii) l'induction de l'imposex apparaît beaucoup moins spécifique d'une exposition au TBT que ce qu'on avait pensé à l'origine. En effet, d'autres composés que le TBT, comme le TPT, le cuivre, les nonylphénols, l'éthanol, ainsi qu'un stress environnemental peuvent également induire l'imposex chez *Thais clavigera*, *Nucella lapillus* et *Lepsiella vinosa* (Horiguchi et al., 1997; Nias et al., 1993; Evans et al., 1995). Ainsi, le phénomène d'imposex ne reflèterait pas uniquement les variations des teneurs en butylétains dans les eaux. De plus, Davies et al. (1997) ont observé l'imposex (chez 12% de femelles) dans des populations *Nucella lapillus* qui n'ont pas été exposées au TBT.

Cependant, l'initiation du programme européen BEQUALM ("*Biological Effects Quality Assurance in Monitoring Programmes*"), pourrait contribuer à réduire les disparités observées dans l'interprétation des phénomènes d'imposex et d'intersex, par le développement de procédures d'assurance qualité des techniques de surveillance des effets biologiques du TBT (Davies et Minchin, 2002).

### **1.3.2.3. Autres effets du TBT sur les mollusques**

#### **1.3.2.3.1. Anomalies de calcification de la coquille des huîtres**

La corrélation entre la contamination du milieu et les anomalies de calcification constatées sur la coquille des huîtres *Crassostrea gigas* a été établie par Alzieu et al. (1980). Ces anomalies constituées par un feuillage de la coquille avec formation d'un gel interlamellaire (figure 15) ont été observées pour la première fois en 1975 dans le Bassin d'Arcachon. Chagot et al. (1990) ont montré que le TBT peut inhiber la calcification chez *C. gigas* à des concentrations inférieures à 2 ng.L<sup>-1</sup> (la plus faible concentration testée). Stephenson et al. (1986) ont également signalé des malformations de croissance calcique (arrêt de la croissance en longueur) chez des moules *Mytilus edulis* et *Mytilus californianus* de la baie de San Diego (U.S.A.). Brancato et al. (1997) ont suivi ce phénomène en

transplantant des huîtres *C. gigas* sur plusieurs sites autour de Puget Sound (Washington, USA). Si l'intensité du phénomène apparaît être corrélée avec les concentrations tissulaires en TBT, ces auteurs n'ont cependant observé aucune corrélation des concentrations tissulaires en TBT et de l'apparition de chambrage avec la longueur, le poids et l'indice de condition des huîtres, indiquant que ni les teneurs en TBT, ni le chambrage des coquilles ne semblent affecter la santé de l'organisme. En France, les ostréiculteurs des abers du Nord-Finistère ont observé des anomalies sur les huîtres de leurs élevages susceptibles d'entraîner une dévalorisation des produits mis en marché. Ce constat suggère l'hypothèse d'une altération de la qualité des eaux par la présence de composés organostanniques (peinture anti-salissures), liés à la présence de 461 mouillages permanents. Le syndicat ostréicole des Abers a contractualisé auprès de l'IFREMER une étude sur la contamination des eaux. Les concentrations en TBT dans les eaux des certains abers, supérieures à  $2 \text{ ng.L}^{-1}$  (cette valeur étant le seuil en dessous duquel il n'y a pas d'effet provoquant des anomalies de calcification chez l'huître *Crassostrea gigas*), peuvent expliquer ces anomalies, sans préjuger des effets possibles sur le plancton ou sur les populations de gastéropodes. L'examen d'un échantillon d'huîtres élevées durant deux ans sur le site de l'Aber Benoît confirme ce constat, avec 100 % de chambrage caractéristique d'une présence excessive de TBT.



**Figure I-5: Phénomène de chambrage des coquilles d'huîtres. En haut, des coquilles normales et en bas, des coquilles anormales (source : ORTEPA).**

#### 1.3.2.3.2. Perturbations au niveau physiologique

La plus faible concentration de TBT induisant un effet chez les larves de *Mytilus edulis* a été reportée par Stenalt et al. (1998): ces auteurs ont obtenu une  $EC_{50}$  (concentration entraînant un effet sur 50% des individus) (15 jours) de  $5,4 \text{ ng.L}^{-1}$  (Sn) pour la croissance de la coquille. Widdows et al. (1993) ont aussi montré par des tests réalisés en laboratoire que pour des concentrations tissulaires de  $3-4 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$ , le TBT augmentait la prise

d'oxygène et diminuait la vitesse de filtration et donc de nutrition. Des tests réalisés par Page et al. (1998) ont aussi montré que le TBT augmentait la vulnérabilité de *Mytilus edulis* au stress thermique durant la période d'émersion. Huang et Wang (1995) ont constaté une diminution significative de l'indice de condition (indice d'évaluation du taux de remplissage de la coquille par les tissus mous) de *Mytilus edulis* et ont relevé des anomalies des mitochondries de la glande digestive pour des concentrations de TBT supérieures à 180 ng.L<sup>-1</sup>. De la même façon, Axiak et al. (1995) ont constaté une atrophie des cellules digestives chez des huîtres *Ostrea edulis* exposées en laboratoire à 10 ng.L<sup>-1</sup> de TBT. Le TBT accélère le processus des maladies infectieuses chez *Crassostrea virginia* exposées à des concentrations de 10 à 30 ng.L<sup>-1</sup> de TBT en présence d'un pathogène protozoaire (Fisher, 1999), confirmant l'hypothèse proposée par Anderson et al. (1997) que l'inhibition de la production d'espèces réactives de l'oxygène par des haemocytos de *Crassostrea virginia* exposés in vitro au TBT pouvait accroître la susceptibilité aux maladies infectieuses.

#### 1.3.2.3.3. Perturbations au niveau cellulaire

Le TBT perturbe également l'homéostasie des ions calcium Ca<sup>2+</sup> et les mécanismes contrôlant le cycle cellulaire dans les œufs d'oursin *Paracentrotus lividus* (Girard et al., 1997). Il semblerait que cette altération de l'homéostasie calcique cellulaire soit à l'origine de nombreux autres effets du TBT. Il perturbe la production énergétique cellulaire, endommage les membranes plasmiques, inhibe les pompes ioniques et inhibe à dose très faible (<1µM) la phosphorylation oxydative (responsable de la biosynthèse d'ATP et de la production d'énergie liée à l'oxydation) dans une très grande variété de cellules (Donard et al., 2001). Page et Widdows ont observé que le mécanisme principal de toxicité du TBT chez *Mytilus edulis* était le découplage de la phosphorylation oxydative pour des concentrations tissulaires de TBT supérieures à 85 ng.g<sup>-1</sup> (Page et Widdows, 1991) et le mécanisme secondaire, une diminution rapide du taux d'alimentation et donc de la SFG (allocation d'énergie à la croissance et à la reproduction; "Scope For Growth"), via un effet neurotoxique sur l'activité des cilia des branchies, pour des concentrations de TBT supérieures à 1700 ng.g<sup>-1</sup> (Sn) (Widdows et Page, 1993). Le TBT est également connu pour induire l'apoptose, forme de mort génétiquement programmée de la cellule. Ce phénomène a également été constaté par Micic et al. (2001) chez des moules *Mytilus galloprovincialis* pour des concentrations tissulaires supérieures à 1 µg.g<sup>-1</sup> (Sn).

Les effets du TBT sur la structure génétique de l'huître *C. gigas* ont aussi été démontrés par Tanguy et al. (1999). Des effets cytotoxiques et génotoxiques ont été relevés sur des larves de *Mytilus edulis* exposées à des concentrations de 0,5 à 5 µg.L<sup>-1</sup> (Jha et al., 2000). De la même façon, Cima et al. (1999) ont évalué les effets du TBT sur la réactivité

immunitaire d'haémocytes de palourdes *Tapes philippinarum* en utilisant une série de bio-essais *in vitro* et proposé trois index comme biomarqueurs fournissant des informations relatives aux différentes cibles intracellulaires du TBT : les index amoébocytique (A.I.) et phagocytaire (P.I.) et l'activité lysosomale (L.I.). Clayton et al. (2000) ont proposé l'utilisation des protéines de stress hsp 60 et hsp 70 comme biomarqueurs d'une exposition au TBT chez la moule zébrée *Dreissena polymorpha*. Chez la moule *Mytilus edulis*, l'induction de hsp70 par le TBT a été observée pour une concentration de TBT de  $10^{-12}$  M, alors que le TBT est souvent présent dans les eaux à des concentrations plus élevées dans les milieux contaminés (Sanders et al., 1990). Tujula et al. (2001) ont constaté l'induction de l'activité phénoloxydase *in vivo* chez le tunicier *Styela plicata*, bien que cette activité soit inhibée *in vitro*.

Le TBT et le TPT inhibent le système enzymatique dépendant du cytochrome P450 (ou système de monooxygénases) *in vivo* et *in vitro* chez le poisson (Fent et Stegeman, 1993). Ce système enzymatique est universellement distribué et joue un rôle clé dans la biotransformation des xénobiotiques (conduisant à leur détoxification ou leur bioactivation) mais aussi des composés endogènes, comme les hormones et les acides gras. Il contient plusieurs formes de cytochrome P450: les cytochromes P450, b<sub>5</sub> et c, ainsi que leur réductase respectives, la NADPH cytochrome P450 réductase, la NADH cytochrome b<sub>5</sub> réductase et la NAD(P)H cytochrome c réductase. Morcillo et Porte (1997) ont rapporté une diminution *in vitro* des cytochromes P450 et b<sub>5</sub> et une inhibition de l'activité NAD(P)H cytochrome c réductase induite par le TBT et le TPT à une concentration extrêmement élevée (1 mM) chez la moule *Mytilus galloprovincialis*. Cependant, aucun effet significatif du TBT sur le système enzymatique dépendant du cytochrome P450 n'a été observé *in vivo* (en microcosme et sur le terrain) chez la palourde *Ruditapes decussata*, bien qu'une augmentation des NADPH cytochrome P450 réductases ait été rapportée en laboratoire pour les concentrations les plus faibles (jusqu'à 450 ng.L<sup>-1</sup> en étain) et une diminution de la NADH cytochrome b<sub>5</sub> réductase chez les individus transplantés sur un site portuaire (mais uniquement lors de la première semaine de transplantation) (Morcillo et Porte, 2000).

### 1.3.3 Risques pour l'homme

La prise de conscience des propriétés neurotoxiques des composés organostanniques est apparue en 1954 suite à la grave intoxication par le Stalinon, un médicament contenant du diiodoéthylétain (10%) et utilisé dans le traitement (par voie orale) d'infections de la peau (furonculose), qui causa le décès d'une centaine de personnes. De nombreuses études cliniques et en laboratoire ont pu mettre en évidence les effets immunotoxiques,

neurotoxiques et d'irritation des yeux et des muqueuses sur l'homme et sur des mammifères par les formes di- et trisubstituées de l'étain (Verdier et al., 1991; Yamada et al., 1993), se manifestant par exemple sous forme de troubles de la mémoire, d'insomnies et de malaises, de brûlure cutanées, etc, observées chez des ouvriers exposés sur leur lieu de travail à des composés organostanniques.

Deux voies d'exposition sont envisageables: une exposition indirecte par les produits ménagers contenant des composés organostanniques et une exposition directe par l'ingestion d'aliments contaminés. Un schéma des différentes voies d'exposition humaine est représenté à la figure I-6. Le relargage des composés organostanniques à partir des matériaux en PVC entraîne une contamination des produits alimentaires et des légumes. De nombreux composés organostanniques ont été retrouvés à un niveau supérieur au  $\mu\text{g.g}^{-1}$  dans divers produits ménagers à base de polyuréthane, de polymères plastiques, de silicones, comme le papier cellophane, le papier de cuisson, les éponges, les couches de bébé et les serviettes hygiéniques (Takahashi et al., 1999a). A titre d'exemple, des concentrations supérieures à  $260 \text{ ng.g}^{-1}$  de MBT,  $720 \text{ ng.g}^{-1}$  de DBT et  $15 \text{ ng.g}^{-1}$  de TBT ont été retrouvées dans des cookies cuits sur un support en silicone (Takahashi et al., 1999a). Dans des vins canadiens, Forsyth et al. (1994) ont enregistré des concentrations de  $0,8$  à  $1,6 \mu\text{g.L}^{-1}$  de TBT, de  $0,3$  à  $160 \mu\text{g.L}^{-1}$  de DBT et de  $1,7$  à  $20 \mu\text{g.L}^{-1}$  de MBT. Ces mêmes auteurs ont également retrouvé  $100 \text{ ng.L}^{-1}$  de DBT et  $13 \text{ ng.L}^{-1}$  de MBT dans l'eau de consommation provenant des conduits en PVC récemment installés (Forsyth et Jay, 1997).

Jusqu'à présent, on pensait que les teneurs en composés organostanniques dans les produits de la mer posaient un risque négligeable pour la santé humaine, mais de récents travaux ont montré que sur les 22 pays pour lesquels il existait des données sur les teneurs en TBT dans ces produits, 9 d'entre eux, dont la France, l'Italie, la Pologne, le Canada, les Etats-Unis, la Thaïlande, Taiwan, la Corée et le Japon, dépassent le taux résiduel moyen acceptable (*TARL*, "Tolerable Average Residue Levels") (Belfroid et al., 2000). Cet indice est calculé à partir de la dose journalière tolérable (*TDI*, "Tolerable Daily Intake") et de la consommation moyenne de produits de la mer dans chaque pays. Une valeur de  $0,25 \mu\text{g.kg}^{-1}$  (TBT) de poids corporel/jour [soit  $0,1 \mu\text{g.kg}^{-1}$  (Sn)] proposée par Penninks (1993) est généralement acceptée pour TDI (Robinson et al., 1999). L'Italie présente les résultats les plus inquiétants puisque la concentration moyenne de TBT dans les échantillons de moules dépasse le TARL d'un facteur 2,5 et 90% de ces échantillons contiennent des teneurs en TBT supérieure au TARL ( $237 \text{ ng.g}^{-1}$  pour une personne de 60 kg). Au Japon, la concentration moyenne de TBT dans les produits de la mer est sensiblement identique au TARL et 30% des échantillons collectés sur les marchés de poissons dépassent cet indice ( $77 \text{ ng.g}^{-1}$  pour une personne de 60 kg). Ces résultats mettent en évidence la nécessité de suivre plus précisément et de façon plus systématique les teneurs en TBT dans les différents

produits de la mer afin d'évaluer des limites de teneurs maximales spécifiques à chaque pays et d'établir des directives de conseil pour la consommation des produits de la mer (Kannan et Falandysz, 1997a). Une étude similaire réalisée par Chien et al. (2002) sur l'ingestion de TBT via les produits de la mer par des pêcheurs taiwanais a elle aussi relevé le risque représenté par l'alimentation pour l'homme. L'ingestion journalière de TBT au Japon a été évaluée entre 2,2 et 6,9  $\mu\text{g}$  (Tsuda et al., 1995). Ajoutons à cela la détection de DBT, jusqu'à 6  $\mu\text{g.g}^{-1}$  (poids humide), dans des foies de poulets traités contre des infections parasitaires (Kannan et al., 1999).

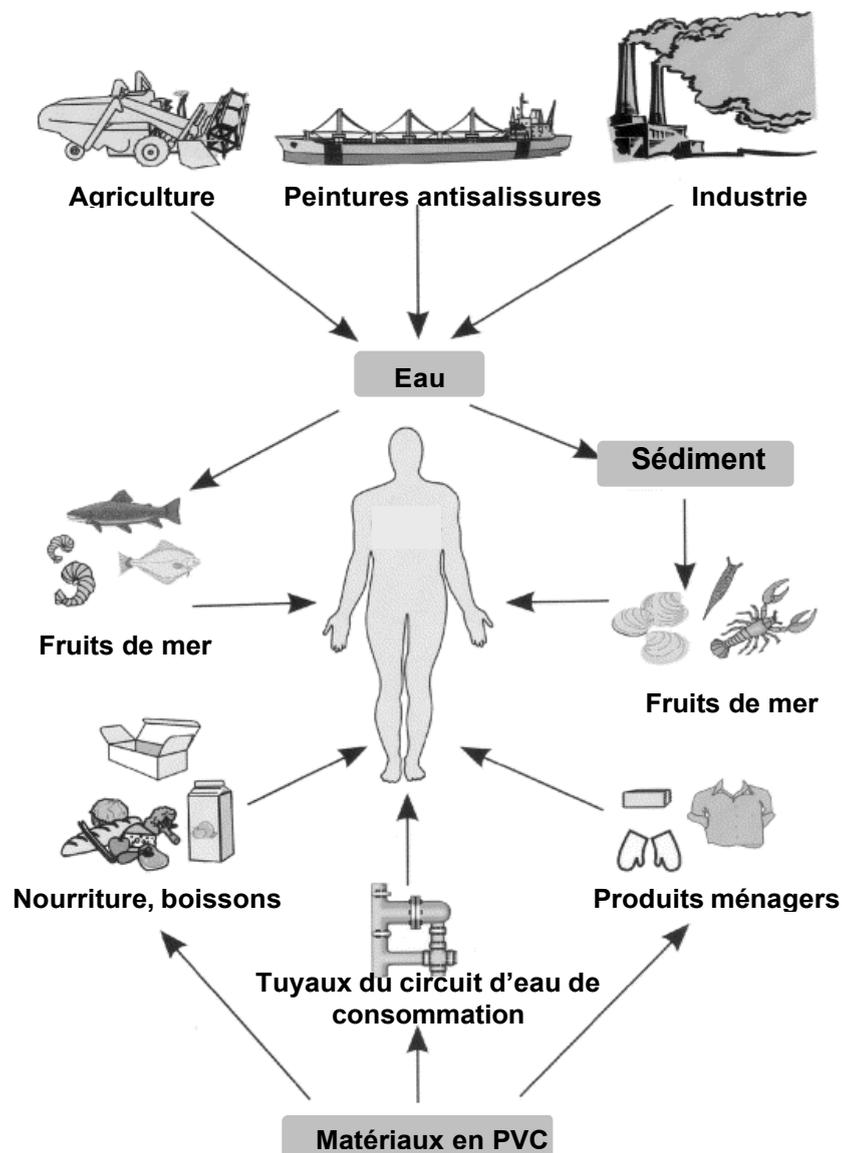


Figure I-6: Sources d'exposition humaine aux composés organostanniques (d'après Hoch, 2001).

Très peu de données sont disponibles sur les teneurs en composés organostanniques dans les tissus humains; des concentrations de 14 à 22 ng.g<sup>-1</sup> (poids humide) de MBT, 45 à 78 ng.g<sup>-1</sup> de DBT et moins de 2 ng.g<sup>-1</sup> de TBT ont été relevées dans le foie de personnes japonaises (Takahashi et al., 1999a). Les premières données sur les concentrations des butylétains dans le sang humain ont été apportées par Kannan et al. (1999) qui ont enregistré des concentrations moyennes de 8,7 ng.L<sup>-1</sup> de MBT, 4,3 ng.L<sup>-1</sup> de DBT et 4,6 ng.L<sup>-1</sup> de TBT. Le TBT affecte les lymphocytes NK ("*Natural Killer*") dans le sang humain, qui constituent les premières défenses immunitaires contre les tumeurs et les cellules infectées viralement, à une concentration de 24 ng.L<sup>-1</sup>.

Les mollusques comptent parmi les espèces les plus sensibles au TBT. Nous venons de voir précédemment un grand nombre d'effets toxiques du TBT sur ces organismes (anomalies de calcification, perturbations de la croissance et de la reproduction, etc...). Nous allons maintenant nous intéresser plus particulièrement à l'aspect perturbation endocrinienne induite par le TBT au travers des mécanismes d'action proposés du TBT sur le système endocrinien des mollusques. Afin d'appréhender au mieux ces mécanismes de toxicité, une synthèse de l'état des connaissances actuelles sur le système endocrinien des mollusques est présentée au préalable.

## **2. Le tributylétain en tant que perturbateur endocrinien**

### **2.1. Etat des connaissances sur le système endocrinien des mollusques bivalves**

A l'exception de quelques travaux (Laufer et Downer, 1989), le système endocrinien des invertébrés n'a pas été documenté de façon exhaustive. Les travaux de recherche se sont focalisés sur les vertébrés. Dans la publication de Kendall et al. (1998) consacrée aux perturbations endocriniennes, seulement quelques lignes sont mentionnées pour les invertébrés.

Bien que la physiologie et la biochimie de quelques espèces exploitées de bivalves marins (*Crassostrea gigas*, *Mytilus edulis*) aient donné lieu à de nombreux travaux, les données sur l'endocrinologie des bivalves restent encore très fragmentaires, car ces mollusques constituent un matériel difficile (Lubet et Mathieu, 1990).

### 2.1.1. La reproduction

La réalisation de cultures d'explants de gonades femelles de plusieurs espèces de bivalves (*Mytilus edulis*, *Crassostrea gigas*, *Ostrea edulis*,...) a montré que les ganglions cérébroïdes sont indispensables à la réalisation de la pré-vitellogenèse et à la vitellogenèse (Lubet et Mathieu, 1978; Mathieu, 1987).

La ponte et la spermiation peuvent être déclenchées par l'action de stimulations provoquant un stress temporaire. Des changements brusques des facteurs environnementaux (thermiques, mécaniques, ioniques) sont d'ailleurs employés en écloséries pour obtenir des gamètes. La sérotonine, présente dans le système nerveux des bivalves, a été identifiée comme le facteur présent dans les gonades de *Spisula sp.* et déclenchant la maturation de l'ovocyte (Kadai et Koide, 1989). Toutefois, d'autres médiateurs chimiques pourraient être aussi impliqués dans les processus de maturation et de ponte, Osada et coll. (1987) ayant décelé une augmentation significative de la dopamine au moment de l'émission des gamètes chez plusieurs bivalves (*Mytilus edulis*, *Crassostrea gigas*, *Patinopecten yessoensis*).

Une part importante de l'énergie provenant de la nutrition est mise en réserve pour couvrir les besoins métaboliques, en particulier ceux de l'effort de reproduction. Ces réserves sont accumulées sous forme de glycogène dans des tissus spécifiques. Houtteville et Lubet (1974) ont montré que les ganglions cérébroïdaux étaient indispensables au maintien de l'activité du tissu de réserve. Le glycogène stocké dans les cellules vésiculeuses (Mytilidés) constitue le métabolite fondamental utilisé pendant le cycle sexuel (Lubet, 1978).

### 2.1.2. Les neurosécrétions

Les cellules neurosécrétrices des Mytilidés sont principalement localisées dans les ganglions cérébroïdaux (80%), mais aussi dans les ganglions viscéraux et pédieux (Illanes, 1979). Chez les bivalves, il a pu être mis en évidence des neurotransmetteurs comme les catécholamines (dopamine, noradrénaline) et les indolamines (sérotonine) (Myers, 1974). Les cycles de neurosécrétion ont été étudiés chez les Mytilidés (Lubet, 1983). Il a pu être mis en évidence une corrélation significative entre les étapes du cycle de reproduction et de l'activité des cellules neurosécrétrices (de type  $\alpha 1$ ). Le nombre de cellule augmente au moment de la reprise automnale de la gamétogenèse et est maximal pendant la maturité sexuelle. Les vidanges axonales sont très nombreuses au moment de la ponte ou de la spermiation. La restauration de neurosécrétat s'effectue très rapidement alors que les gamétogenèses reprennent.

### **2.1.3. Les stéroïdes endogènes chez les mollusques bivalves**

Bien que des hormones connues chez les vertébrés aient été détectées chez un grand nombre de phylas d'invertébrés (Voogt et al., 1985; Hines, 1992), leur rôle dans le système endocrinien des invertébrés n'est pas encore complètement élucidé (Pinder et Pottinger, 1998).

#### **2.1.3.1. Identification des stéroïdes**

Bien que de nombreux stéroïdes et stérols aient été identifiés chez les mollusques bivalves et que quelques recherches aient été effectuées sur leur métabolisme (Idler et Wiseman, 1971; Djerassi, 1981), ces travaux restent encore très fragmentaires. Comme chez les gastéropodes, il est vraisemblable que la synthèse des stéroïdes s'effectue à partir de stérols issus de l'alimentation, ici d'origine phytoplanctonique. Toutefois, les voies de la stéroïdogénèse restent à préciser (Lubet et Matthieu, 1990). La présence d'oestrogènes a été décelée entre autre dans les gonades et les œufs de *Crassostrea gigas* (Mori et coll., 1964) et de *Mytilus edulis* (De Longcamp et coll., 1974). La présence de progestérone et d'androgènes a également été mise en évidence dans les gonades de *Mytilus edulis* (De Longcamp et coll., 1974). Des stéroïdes ont été également trouvés dans d'autres organes que les gonades, en particulier dans la glande digestive et les reins de *Crassostrea gigas* (Mori et coll., 1964) et même dans les fécès de *Tapes japonica* (Yasuda, 1978) où des cétostéroïdes (stérols possédant un groupement carbonyle) pourraient provenir de l'attaque microbienne de stérols d'origine alimentaire, présents dans le tractus digestif. L'application de radio-immuno-essais a permis de déceler la présence d'oestrogènes et d'androgènes. Enfin, plusieurs stéroïdes ont été identifiés chez la moule grâce à l'application de techniques de chromatographie en phase gazeuse et de spectrométrie de masse: progestérone, testostérone, androsténedione, oestradiol et oestrone (Reis-Henriquez et coll., 1990).

#### **2.1.3.2. Biosynthèse et rôle physiologique des stéroïdes**

Le problème de la synthèse des stéroïdes a d'abord été abordé par la mise en évidence des systèmes enzymatiques responsables de la stéroïdogénèse, grâce à la mise en œuvre de techniques histochimiques. De Longcamp et coll. (1974), à partir de précurseurs radioactifs, ont pu mettre en évidence les systèmes enzymatiques suivant chez la moule *Mytilus edulis*: 3 HSD-5 isomérase (HSD: hydroxy-stéroïde déshydrogénase), C<sub>17-20</sub> lyase, 17-HSD,  $\Delta$ 5 réductase, responsables de la stéroïdogénèse. Toutefois, les taux de

conversion restent très bas (0,2 à 1%), excepté pour les réactions effectuées à partir des œstrogènes.

Très peu de recherches expérimentales ont été effectuées pour essayer de préciser le rôle physiologique des stéroïdes chez les mollusques bivalves. Mori et coll. (1969) ont établi que l'accroissement de l'activité des gonades de *Crassostrea gigas* et celle de l'activité de la 3- $\Delta$ 5-HSD sont synchrones. Ils ont formulé l'hypothèse d'un contrôle de la maturité sexuelle par des hormones stéroïdes. L'injection d'œstradiol à des huîtres femelles active la croissance des ovocytes et le développement des gonades. Chez les huîtres mâles juvéniles, les oestrogènes provoqueraient une inversion sexuelle, et, lorsque la spermatogenèse est en cours, l'œstradiol activerait la mobilité du sperme et accélérerait la fragmentation des embryons. Ces auteurs attribuent au 17 $\beta$ -œstradiol qui serait synthétisé dans les gonades un rôle physiologique important dans la régulation des phénomènes de reproduction. Des injections répétées d'œstradiol à des anodontes *Anodonta cynea* provoqueraient une augmentation de la neurosécrétion (Baranyi et coll., 1964). Par ailleurs, l'accroissement de la biosynthèse des neurohormones se déroule parallèlement à celle de l'activité 3- $\Delta$ 5-HSD et à celle de l'accroissement des gonades. L'évacuation massive des neurohormones coïnciderait aussi avec la réduction de l'activité enzymatique et avec la diminution supposée de la stéroïdogénèse. Plus récemment, Reis-Henriquez et Coimbra (1990) ont démontré la présence de progestérone chez *Mytilus edulis*. Les taux de progestérone sont similaires chez les mâles et les femelles, ainsi que leur variations saisonnières au cours d'un cycle annuel; ces auteurs émettent l'hypothèse d'un rôle éventuel de la progestérone dans la régulation de la reproduction, bien que les valeurs maximales encadrent plutôt la période de repos sexuel. Osada et Nomura (1989) ont montré que les variations de catécholamines chez *Patinopecten yessoensis* semblaient être liées à l'évolution sexuelle, suggérant que le 17 $\beta$ -œstradiol pourrait réguler les teneurs en catécholamines impliquées dans le contrôle de la reproduction.

## **2.2. Interaction du TBT avec le système endocrinien des mollusques**

### **2.2.1. Le TBT perturbateur endocrinien**

Les phénomènes d'imposex et d'intersex induits par le tributylétain (TBT) chez les mollusques gastéropodes représentent la plus forte présomption de la présence d'un perturbateur endocrinien dans l'environnement. Le TBT interfère avec le métabolisme des hormones naturelles, entraînant une augmentation des taux d'androgènes (Spooner et al.,

1991) et causant l'apparition de l'imposex (Spooner et al., 1991; Bettin et al., 1996; Gibbs et al., 1996) et de l'intersex (Bauer et al., 1995) chez les femelles gastéropodes pour des concentrations aussi faibles que  $1 \text{ ng.L}^{-1}$ . Chez les bivalves, seulement quelques travaux ont mis en évidence des perturbations du métabolisme des hormones stéroïdiennes et des taux de stéroïdes chez la moule *Mytilus edulis* et la palourde *Ruditapes decussata* (Morcillo et al., 1999, 2000).

### 2.2.2. Les cibles biochimiques du TBT

Deux mécanismes d'action ont été proposés pour l'induction de l'imposex: le premier est basé sur le modèle vertébré et sur l'inhibition de l'activité aromatasase et le second nécessite le relarguage anormal de neurohormones qui contrôlent la différenciation sexuelle chez les gastéropodes.

Le premier mécanisme d'action du TBT proposé est l'inhibition de l'activité aromatasase dépendante du cytochrome P450, responsable de la conversion des androgènes en oestrogènes (Matthiessen, 1998), entraînant une augmentation des niveaux d'androgènes et une diminution des oestrogènes (figure I-7). De plus, l'inhibition de l'activité aromatasase par le TBT a été récemment démontrée chez la moule *Mytilus edulis* (Morcillo et al., 1999). Pour Bettin et al. (1996), les effets du TBT seraient plutôt dus à une inhibition compétitive de l'activité aromatasase, le TBT et la testostérone partageant la même voie de biotransformation, c'est-à-dire l'activité aromatasase, responsable à la fois de la débutylation du TBT et de la conversion de la testostérone en oestradiol. Ronis et al. (1996) ont proposé une hypothèse alternative à celle de l'inhibition de l'aromatasase, suggérant que le TBT pourrait causer l'imposex en bloquant la conjugaison sulfure, et donc l'excrétion, de la testostérone et de ces métabolites de phase I.

En ce qui concerne les bivalves, Morcillo et Porte (1998) ont rapporté une forte diminution de l'aromatase de la testostérone chez la palourde *Ruditapes decussata* exposée au TBT. De plus, ces auteurs ont observé une augmentation significative des taux de testostérone dans des palourdes transplantées dans un port contaminé en Espagne (Morcillo et al., 2000). Ils ont également rapporté une inhibition de l'activité aromatasase induite par le TBT chez la moule *Mytilus galloprovincialis*, bien qu'aucune variation significative du rapport des teneurs en testostérone sur celles en oestradiol n'ait été observée (Morcillo et al., 1999).

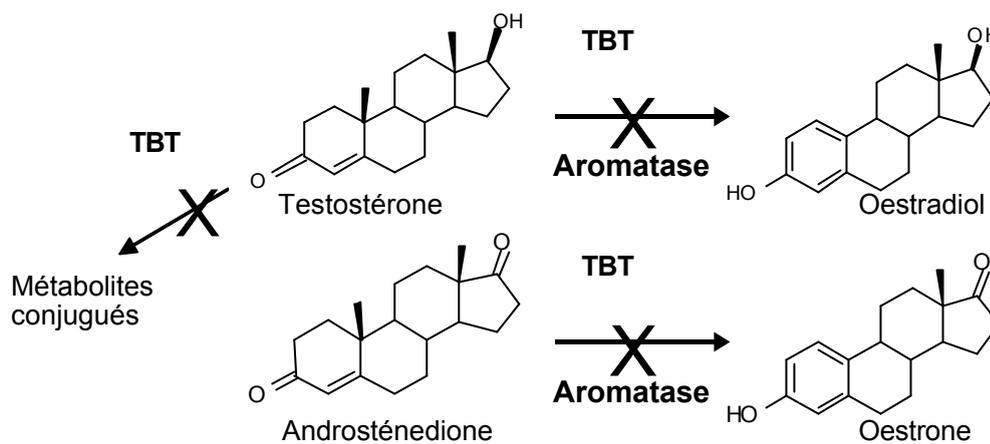
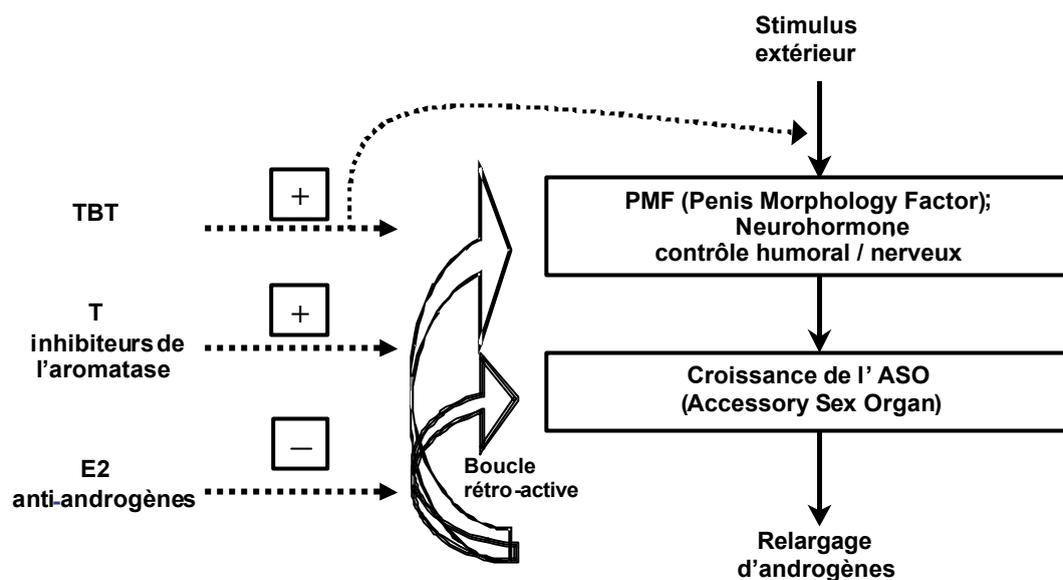


Figure I-7: Les mécanismes d'action proposés du TBT. X: inhibition de la réaction.

Le second mécanisme proposé est une action du TBT sur le système nerveux. Le système endocrinien des mollusques semble dépendre plus des neuropeptides que des hormones stéroïdiennes (Le Blanc et al., 1999). Bien que les mollusques soient capables de synthétiser des stéroïdes, ce sont les neuropeptides qui contrôlent la différenciation sexuelle et la reproduction (Le Gall et al., 1983; Griffond et al., 1992).

De récents travaux (Oberdöster et al., 2000) ont montré que le TBT pourrait agir comme un neurotoxique et induire l'imposex via un relargage anormal d'une neurohormone responsable de la différenciation du pénis, appelée PMF ("*Penis Morphology Factor*"), qui initie le développement de caractères sexuels mâles (ASO, "*Accessory Sex Organ*") (et identifiée par ces mêmes auteurs comme pouvant être l'APGWamide) (figure I-8). Ainsi, les changements dans les taux de stéroïdes endogènes ne seraient qu'un effet secondaire contrôlé par le PMF (Spooner et al., 1991). Ils agiraient sur la boucle rétroactive qui entretient le développement des organes sexuels mâles. Bettin et al. (1996), ont montré que l'augmentation des taux de testostérone (T) n'était pas la cause de l'induction de l'imposex, puisque cette augmentation n'a été décelée que deux mois après l'apparition de l'imposex chez les femelles *Nucella lapillus*. De plus, aucun changement dans les taux d'œstradiol (E2), qui aurait indiqué une inhibition de l'activité aromatasase par le TBT, n'a été observé. Les travaux d'Oberdöster et al. (2000) confirment ainsi les hypothèses de Féral et al. (1983), qui ont observé une augmentation d'un neuropeptide non identifié (PMF) chez *Ocenebra erinacea* après 24h d'exposition au TBT, et de Bryan et al. (1993), suggérant que le système neuronal joue un rôle primordial dans l'induction de l'imposex chez les gastéropodes. Ainsi, l'inhibition de l'aromatase ne serait pas le mécanisme premier induisant l'imposex, et une neurohormone serait indispensable pour l'initiation de l'imposex (Oberdöster et al., 2002)



**Figure I8:** Les mécanismes d'action proposés du TBT (d'après Oberdöster et Mc Clellan-Green, 2002): Le TBT agit sur le système nerveux, tandis que les stéroïdes agissent rétroactivement sur le facteur de croissance de l'organe sexuel, «+» indiquant une induction de l'imposex et «-» une inhibition de l'imposex.

Nous venons de voir dans la partie précédente (paragraphe 2) un certain nombre d'effets du TBT chez les mollusques. Le TBT perturbe un grand nombre d'activités enzymatiques (induction de protéines de stress, activité lysosomale, phosphorylation oxydative, certaines phénoloxydases et estérases; voir paragraphe 1.3.2.3.3.), en plus des effets sur la reproduction des mollusques (aromatase dépendante des cytochromes P450, perturbations neuroendocriniennes). Ces effets biologiques peuvent servir de bioindicateurs (voir paragraphe suivant) de l'impact du TBT sur les organismes et caractériser la qualité de l'environnement aquatique.

Jusqu'à la fin des années 1980, la surveillance de l'environnement reposait essentiellement sur un ensemble de techniques d'analyses physico-chimiques plus ou moins sensibles, menant à l'évaluation des concentrations de polluants dans l'eau, les sédiments et les organismes vivants. L'inconvénient majeur de ces méthodes est peut-être l'absence de renseignements qu'elles fournissent à propos de l'impact réel des molécules chimiques sur les organismes vivants. Le concept de biosurveillance, qui repose sur l'étude de la réponse biologique des êtres vivants aux polluants, répond justement à cette lacune de la chimie conventionnelle; les effets biologiques des produits chimiques déversés dans le milieu

naturel peuvent servir d'indicateurs de pollution (ou biomarqueurs) dans le règne animal et végétal et permettre la mise en évidence précoce de contaminations du milieu naturel avant l'altération de la structure des organismes, et surtout avant que toute la population ou l'écosystème soient perturbés (Lafaurie et al., 1992; Namour, 1992). Après l'épanouissement du concept de biosurveillance à la fin des années 1980, nombre de scientifiques n'étaient pas loin de penser que les biomarqueurs se substitueraient à terme aux analyses chimiques dans l'établissement d'un diagnostic de la pollution. La complexité du métabolisme des xénobiotiques (molécules étrangères à la vie) et des mécanismes de détoxication chez les êtres vivants, la difficulté d'interpréter les désordres constatés ont remis en question cette première approche des biomarqueurs. L'accent est aujourd'hui mis sur l'interface chimie/biologie car l'interdépendance de ces deux disciplines est une composante majeure de la surveillance des effets des polluants.

### **3. Les biomarqueurs**

#### **3.1. Introduction**

Un biomarqueur ou marqueur biologique est 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» (Lagadic et al., 1997). Les biomarqueurs constituent des indicateurs qui répondent de façon précoce et sensible à un dysfonctionnement et leur utilisation rend compte de la biodisponibilité des polluants et des effets qu'ils engendrent sur les organismes et les populations (McCarthy et Shugart, 1990). Toutefois, lorsque l'organisme répond à la présence de contaminants par l'induction de protéines spécifiques, il est possible que pour des expositions intenses, cette synthèse soit réduite du fait de la toxicité qui s'exerce sur l'organisme (en particulier, l'hépatotoxicité), ce qui peut conduire à des faux négatifs (Lagadic et al., 1997).

L'étude de la réponse biologique des organismes vivants aux polluants chimiques présents dans l'environnement marin représente un outil de diagnostic qui n'est pas destiné à dupliquer ou remplacer la surveillance chimique, mais qui doit être intégré dans les programmes de surveillance de l'environnement. Complémentaires des analyses chimiques, ces indicateurs biologiques peuvent jouer le rôle de systèmes d'alarme précoces d'une contamination dont les effets sont réversibles.

La biotransformation de toute molécule xénobiotique à caractère hydrophobe met en jeu des mécanismes permettant d'augmenter son hydrosolubilité afin de faciliter son excrétion (figure I-9). Ce processus se déroule principalement au niveau du foie chez les poissons ou de la glande digestive (hépatopancréas) chez les mollusques et s'effectue en deux étapes (Michel, 1993):

1. une phase de fonctionnalisation (oxydation, réduction, hydrolyse) ou phase I rendant la molécule plus polaire. Ce mécanisme est assuré par les complexes multi-enzymatiques dépendants du cytochrome P450.

2. une phase de conjugaison ou phase II qui intervient soit à la suite des réactions de phase I, soit directement sur les molécules possédant des groupements hydroxyles, sulfhydriles ou carboxyliques. Les enzymes intervenant sont principalement les UDP-glucuronosyl-transférases, les glutathion-S-transférases, les sulfotransférases et catalyse respectivement la conjugaison du substrat avec l'acide glucuronique, le glutathion, le sulfate ou une molécule d'eau.

Des transformations non enzymatiques peuvent également se produire par captage de formes actives de l'oxygène induites par le métabolisme oxydatif cellulaire. Ces activités de peroxydation peuvent constituer une part importante du métabolisme chez certains organismes et notamment la moule (Livingstone et al., 1990).

Les activités enzymatiques les plus employées comme biomarqueurs d'exposition chez les mollusques et les poissons en milieu marin, sont les enzymes dépendantes du cytochrome P450 qui assurent à phase I de détoxification, et les enzymes de phase II, comme la glutathion S-transférase, qui prennent en charge les métabolites de phase I afin d'en faciliter l'excrétion (figure I-9). Des activités enzymatiques moins spécifiques que les précédentes (enzymes dépendantes du cytochrome P450), les enzymes antioxydantes, permettent d'établir que les organismes ont été soumis à un stress oxydant dû à la génération d'espèces réactives de l'oxygène. Chez les mollusques marins exposés à des xénobiotiques organiques mais aussi à des métaux lourds, la pollution chimique augmente fortement les activités enzymatiques antioxydantes (Livingstone et al., 1990).

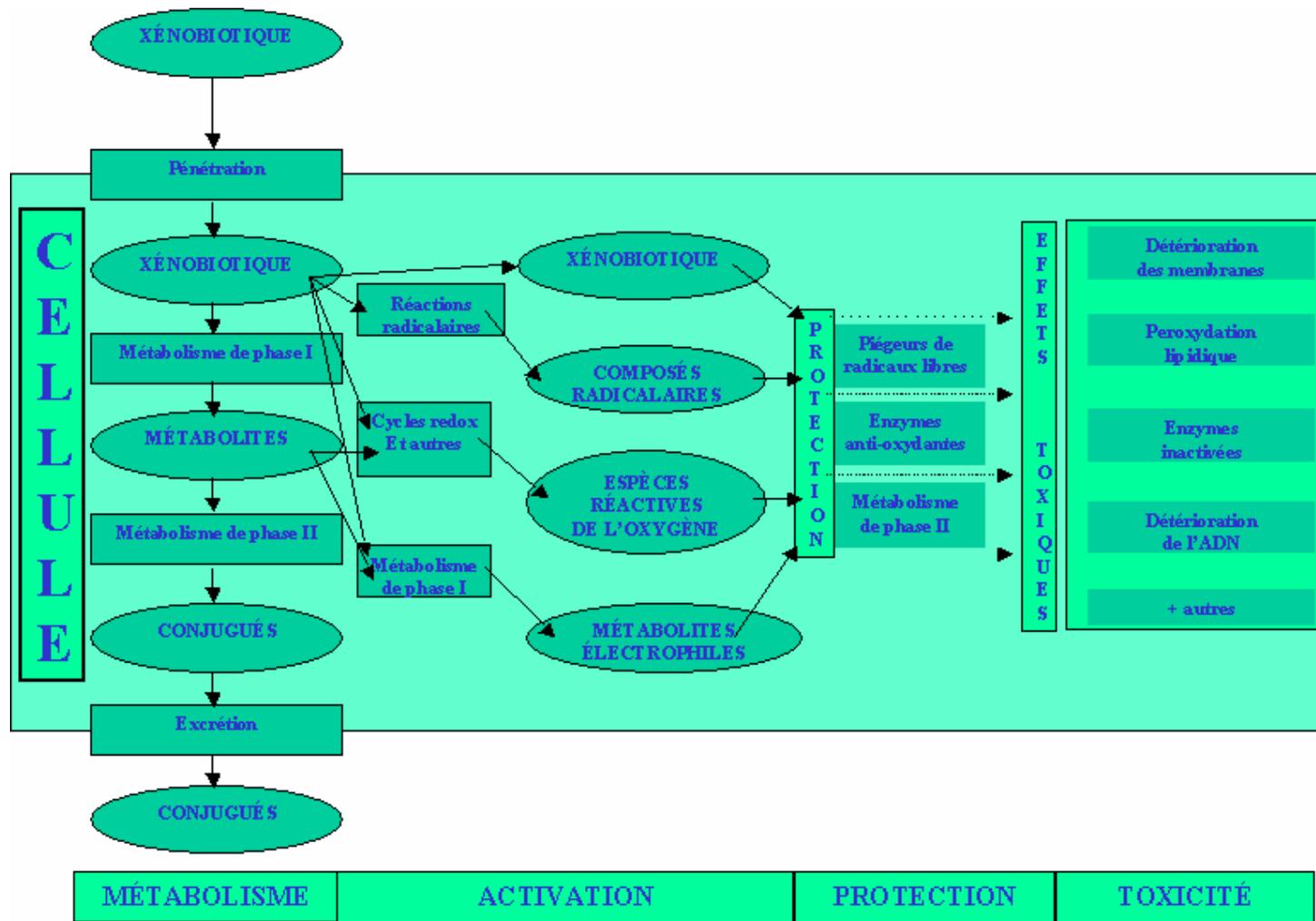


Figure I-9 : Représentation schématique des voies majeures conduisant à la détoxification et à la toxification des xénobiotiques organiques chez les animaux. (d'après Michel, 1993)

Les biomarqueurs que nous avons choisi sont les activités enzymatiques catalase (CAT), glutathion S-transférase (GST), acétylcholinestérase (AChE) et le taux de substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (TBARS). Nous allons vous présenter ces différents indicateurs biologiques, ainsi que leur intérêt dans les études de surveillance biologique.

### **3.2. Les indicateurs de stress oxydant**

L'intérêt majeur des paramètres antioxydants en tant que biomarqueurs réside dans le caractère aspécifique de leur réponse, ce qui constitue un avantage dans le contexte de la contamination multiple des écosystèmes.

#### **3.2.1. Les teneurs en substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (TBARS)**

Le malonedialdéhyde (MDA) est un produit de dégradation des réactions de peroxydation lipidique qui se forme lors de l'attaque des lipides polyinsaturés par des espèces réactives de l'oxygène générés par des contaminants comme les HAP, PCB ou métaux. Le MDA est un agent alkylant puissant capable de réagir avec les macromolécules biologiques. Il est utilisé comme indicateur de stress oxydatif induit par des contaminants dans les bivalves marins (Pellerin-Massicotte, 1994). Quand le stress oxydatif submerge les forces protectrices comme l'activité catalase, un effet délétère sur les membranes peut être observé via une augmentation des teneurs en MDA, puisque celui-ci est un produit de la peroxydation lipidique. Le dosage du MDA (réalisé par HPLC) étant relativement difficile à mettre en œuvre pour un grand nombre d'échantillons, une technique plus rapide bien que moins spécifique a été préférée: le dosage des espèces réactives avec l'acide thiobarbiturique (TBARS).

De Lafontaine et al. (2000) ont reporté de faibles variations des teneurs en TBARS chez la moule zébrée *Dreissena* sur l'ensemble des sites suivis sur le St Laurent (Québec) et n'ont observé aucune corrélation entre les teneurs en TBARS et en métaux traces dans les tissus. Les teneurs en TBARS enregistrées chez la moule *Mytella guyanensis* collectées sur deux sites contaminés de l'île Ste Catherine (Brésil) sont fortement et positivement corrélées avec les concentrations en plomb et en cadmium (Torres et al., 2002). Viarengo et al. (1990) ont également observé de fortes teneurs en MDA chez des moules *Mytilus edulis* et *Mytilus galloprovincialis* après une semaine d'exposition au cuivre. Ces résultats contrastent avec ceux obtenus sur le terrain par Rodriguez-Ariza et al. (1993) où les teneurs en MDA chez la moule *Chamaelea gallina* et chez l'huître *Crassostrea gigas* sont plus faibles malgré des

concentrations tissulaires en métaux traces beaucoup plus élevées que celles reportées par Torres et al. (2002).

### 3.2.2. L'activité catalase (CAT)

Les catalases catalysent la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire. Ce sont des enzymes péroxysoniales dont le rôle est de prévenir les peroxydations des molécules biologiques induites par l'eau oxygénée. Elles sont sensibles à certains contaminants inducteurs de stress oxydatifs au niveau des membranes cellulaires, comme les HAP, les PCB, certains pesticides (Livingstone et al., 1993) et les métaux (Labrot et al., 1996), mais ceci de façon irrégulière *in vivo*, les résultats montrant tantôt une augmentation de l'activité (Di Giulio et al., 1993), tantôt une baisse (Labrot et al., 1996). Une des hypothèses retenue est que cette activité enzymatique semble très sensible aux facteurs environnementaux d'origine anthropique ou naturelle (Pellerin-Massicotte, 1994), hypothèse corroborée par les résultats obtenus par Pellerin-Massicotte et al. (1997), observant une induction de l'activité catalase dans un endroit non pollué qui pourrait être due à un stress physiologique comme une répétition de la ponte. Selon ces auteurs, la catalase pourrait être sensible à des variations subtiles des conditions environnementales, alors que le MDA serait plus représentatif d'une condition de stress non compensée par les forces anti-oxydantes.

Chez *Mytilus edulis* et *Mytilus galloprovincialis* les activités antioxydantes dans la glande digestive sont influencées par la teneur en oxygène, les facteurs climatiques et physiologiques : 1) une anaérobiose (faibles conditions d'oxygénation) temporaire provoquée expérimentalement provoque une diminution des activités antioxydantes et de la lipoperoxydation (Viarengo et al., 1989), 2) la ponte chez *Mytilus galloprovincialis* entraîne une augmentation des activités antioxydantes en mars-avril, suivie d'une diminution progressive au printemps alors que la disponibilité en nourriture et la température augmentent (Solé et al., 1995), 3) l'âge sensibilise aux effets oxydants; ainsi, chez *Mytilus edulis*, les individus de plus de 10 ans ont des capacités antioxydantes significativement plus faibles, ce qui explique un taux de lipoperoxydation plus élevé (Viarengo et al., 1991).

Les bivalves sont considérées comme de bons indicateurs biologiques d'une pollution aquatique associée à la génération d'espèces réactives avec l'oxygène (ROS, "Reactive Oxygen Species") et avec les variations de leurs défenses anti-oxydantes (AD, "Antioxidant Defenses") (Lemaire et Livingstone, 1993; Di Giulio et al., 1995; Sheehan and Power, 1999; Niyogi et al., 2001; Vidal et al., 2002; Cheung et al., 2002; Peña-Llopis et al., 2002). De nombreuses études réalisées en laboratoire et sur le terrain concernent les défenses anti-oxydantes et les enzymes détoxifiantes chez *Mytilus edulis*, montrant généralement des corrélations directes entre les défenses anti-oxydantes, les enzymes détoxifiantes, les

dommages occasionnés sur les biomolécules et les xénobiotiques (Viarengo et al., 1990; Lemaire et Livingstone, 1993; Rodriguez-Ariza et al., 1993; Livingstone, 1998) mais aussi avec les saisons (Sheehan and Power, 1999; Niyogi et al., 2001; Vidal et al., 2002). L'augmentation de l'activité catalase a déjà été relevée chez des poissons et des bivalves exposés à des polluants organiques (HAP, PCB, pesticides et engrais chimiques) (Rodriguez-Ariza et al., 1993; Torreilles et al., 1996; Cossu et al., 1997). Par ailleurs, les travaux effectués sur les biomarqueurs de stress oxydant en laboratoire et surtout *in situ* montrent que le caractère aspécifique de leur réponse constitue un avantage comme indicateur d'un état de pollution mixte (Cossu et al., 1997).

### 3.3. L'activité glutathion S-transférase (GST)

Les GST sont des enzymes de biotransformation de phase II, dont la fonction est de conjuguer à une molécule de glutathion une grande variété de substrats pour permettre leur élimination. Ces substrats peuvent être des molécules endogènes, mais aussi des xénobiotiques comme les HAP, les PCB et les pesticides. Ces enzymes sont présentes sous plusieurs isoformes dont certaines sont inductibles par les contaminants qu'elles détoxiquent. Cette particularité en fait une activité intéressante en tant que biomarqueur de contamination, notamment par les contaminants organiques lipophiles de types HAP, PCB et pesticides (Narbonne et al., 1991). Ces isoformes ne sont pas mesurées en utilisant uniquement le CDNB (dichloronitrobenzène) comme substrat. Ainsi, on ne peut pas exclure des variations dans le profil des isoformes, même si les activités moyennes mesurées avec ce substrat sont similaires (Regoli et al., 1995). Cela pourrait expliquer en partie notre faible capacité à interpréter ces variations dans les études de surveillance biologique, où de nombreux travaux font état, soit d'une diminution, soit d'une augmentation d'activité dans des environnements très similaires.

Ainsi, aucune variation significative de l'activité GST n'a été observée chez la moule *Perna perna* sur différents sites d'étude de l'île Ste Catherine (Brésil) (un site de référence et deux sites contaminés) après 150 jours de transplantation (Bainy et al., 2000). Par contre, une augmentation a été mise en évidence sur les deux sites contaminés après 180 jours. Selon les auteurs, cette augmentation pourrait être associée au très fort index pluviométrique relevé durant la semaine précédant la collecte après 180 jours, trois fois supérieur à celui enregistré juste avant la collecte après 150 jours, entraînant une augmentation des apports en contaminants par lessivage des sols qui pourrait induire des réponses biologiques dans les organismes exposés. Aucune variation significative de l'activité GST n'a été observée chez des moules *Mytilus galloprovincialis* collectées sur un site fortement contaminé en PCB

(lagune de Venise, Italie) (Livingstone et al., 1995). Par contre, Cheung et al. (2002) ont observé une induction de l'activité GST, positivement corrélée à la somme des PCB chez des moules *Perna viridis* transplantées sur de nombreux sites contaminés autour de Hong Kong. Enfin, une forte réserve quant à l'inductibilité des GST chez les bivalves a été émise par Fitzpatrick et al. (1997) qui ont observé une forte activité GST chez *Mytilus edulis* exposées à des effluents industriels, mais n'ont noté aucun changement pour des effluents d'une tannerie de cuir. Regoli et al. (1998) ont observé une inhibition de l'activité GST chez des coquilles St Jacques *Adamussium colbecki* contaminées par du cuivre et du mercure. Regoli et Principato (1995) n'ont observé aucune induction de l'activité GST chez des moules *Mytilus galloprovincialis* également exposées à des métaux traces.

Notons également que Torres et Mason (2002) ont observé une inhibition non compétitive de l'activité GST (in vitro) chez des escargots communs *Helix espersa* exposés à 10 µM de TBT.

### **3.4. L'activité acétylcholinestérase (AChE)**

Cette enzyme ne joue aucun rôle dans la détoxification chez les vertébrés mais est impliquée dans les mécanismes de transmission de l'influx nerveux à travers l'organisme. L'inhibition de l'enzyme par de nombreux neurotoxiques entraîne une accumulation du médiateur chimique, l'acétylcholine (ACh), dans l'espace synaptique, qui maintient de ce fait une transmission permanente de l'influx nerveux, conduisant à la mort de l'individu (Bocquené, 1996). Parmi les composés neurotoxiques, les insecticides organophosphorés et les carbamates sont considérés comme les plus puissants inhibiteurs spécifiques de cholinestérase. Mais des mélanges complexes d'hydrocarbures ont été aussi cités dans la mesure de dépressions de l'AChE (Payne et al., 1996). De plus, des études *in vitro* et *in vivo* menées sur des mammifères, des poissons ou des invertébrés ont relevées un effet inhibiteur de l'AChE par des métaux, incluant le cadmium (Schmidt et Ibrahim, 1994 ; Labrot et al., 1996).

Chez les invertébrés, le rôle des cholinestérases est moins clairement défini, bien que l'existence de motoneurones cholinergiques ainsi que celle de récepteurs spécifiques à l'acétylcholine ait été mise en évidence chez les mollusques et les gastéropodes (Carpenter et al., 1977; Weiss et al., 1993). L'activité AChE est utilisée comme marqueur d'exposition aux pesticides inhibiteurs chez les mollusques. Néanmoins, dans une étude de surveillance biologique menée dans l'estuaire de la Gironde, aucune pollution de ce type n'a été mise en évidence (RNO, 1995) et une inhibition significative de l'AChE a pourtant été observée chez *Mytilus edulis* et *Crassostrea gigas* (Amiard-Triquet et al., 1998).

Enfin, dans une dernière partie, nous avons présenté succinctement les différentes techniques de couplage pour la spéciation des composés organostanniques.

Ce sont les formes chimiques d'un élément qui gouvernent ses propriétés toxicologiques, son devenir, ainsi que ses modes de transfert et de bioaccumulation dans l'environnement en gouvernant partitions liquide/solide ou liquide/gaz et liposolubilité (Donard et Astruc, 1997). Le développement analytique pour la différenciation des formes physico-chimiques des molécules dans l'environnement s'est avéré un outil indispensable pour appréhender la complexité d'un milieu. La spéciation des composés organostanniques est d'un intérêt majeur en raison de la toxicité de ces composés et de leur large utilisation comme biocides.

#### **4. les techniques de couplage en spéciation des composés organostanniques**

L'intérêt croissant pour la détermination des composés organostanniques dans l'environnement a stimulé le développement de techniques analytiques sélectives et sensibles durant ces vingt dernières années.

L'approche classique dans la spéciation des composés organostanniques repose sur des techniques couplées, associant le plus souvent une séparation chromatographique et une détection mono- ou multi-élémentaire (Donard et Martin, 1992). Les combinaisons de ces différentes techniques sont illustrées dans le tableau I-6.

Jusqu'à présent, l'électrophorèse capillaire (CE) a été pratiquement exclusivement appliquée aux échantillons d'eau et une seule séparation de triorganoétains dans des sols par chromatographie électrocinétique micellaire (MEKC) a été proposée (Li et al., 1995). Tout comme l'électrophorèse capillaire, la chromatographie en phase supercritique (SFC) nécessite encore de nombreux développements pour son application à l'analyse de spéciation (Szpunar-Lobinska et al., 1995). Les méthodes d'analyses par chromatographie en phase gazeuse (GC) représentent 64% des différentes méthodes de spéciation des composés organostanniques publiées et les méthodes d'analyses par chromatographie en phase liquide (HPLC) et par piégeage cryogénique (CT, "*cold trapping*") sont chacune décrites dans 13% des publications (Abalos et al., 1997).

TECHNIQUES DE SEPARATION	TECHNIQUES DE DETECTION
<b>Chromatographie en phase gazeuse (GC)</b>	<b>Spectrométrie d'absorption atomique</b> - Flamme (F-AAS) - Four en quartz (Q-AAS) - Four en graphite (G-AAS)
<b>Chromatographie haute performance en phase liquide (HPLC)</b>	<b>Spectrométrie d'émission atomique</b> - Par plasma à couplage inductif (ICP-AES) - Par plasma micro-ondes (MIP-AES)
<b>Chromatographie en phase supercritique (SFC)</b>	<b>Détection à photométrie de flamme</b> - Emission continue (FPD) - Emission pulsée (PFPD)
<b>Electrophorèse capillaire (CE)</b>	<b>Spectrométrie à fluorescence atomique (AFS)</b>  <b>Spectrométrie de masse</b> - Ionisation par impact électronique (EI-MS) - Ionisation dans un plasma à couplage inductif (ICP-MS)

Tableau I-6: Couplages possibles entre les techniques de séparation et de détection (d'après Schmitt, 1997).

## 4.1. Séparations chromatographiques pour l'analyse de spéciation

### 4.1.1. La chromatographie en phase gazeuse (GC)

La chromatographie en phase gazeuse est très largement utilisée en spéciation de l'étain car elle présente une meilleure résolution que la chromatographie en phase liquide (LC), permettant la détection simultanée des méthyl-, éthyl-, butyl-, phenyl-, cyclohexyl- et octylétains. L'inconvénient majeur de cette technique réside dans la nécessité de produire des dérivés volatiles des composés organostanniques pour permettre leur séparation chromatographique.

Les colonnes capillaires sont les plus largement utilisées dans les systèmes couplés, mais quelques études utilisent encore des colonnes mégabore qui rendent possible l'utilisation de débits plus élevés afin de minimiser le volume mort du détecteur (Gomez-Ariza et al., 1995; Chau et al., 1996). En général, ce sont des colonnes apolaires ou faiblement polaires contenant des phases stationnaires diméthylsiloxanes ou 5% diphenyldiméthylsiloxanes qui sont couramment utilisées (DB-1, HP-1, SPB-1, SE-30, DB-5, HP-5, CP-Sil 8CB,...). Bien que des phases stationnaires de polarité moyenne, comme les 50% diphenyldiméthylsiloxanes (DB-17, OV-A) ou 14% cyanopropylphényl 86% méthylpolysiloxanes (DB-1701) soient plus rarement utilisées (Suzuki et al., 1998), elles

rendent possible la résolution entre des espèces organostanniques spécifiques (comme les phénylétains et les cyclohexylétains) qui sont faiblement résolus sur des colonnes apolaires.

Les détecteurs suivants sont les plus couramment utilisés avec une séparation GC dans la spéciation des composés organostanniques: les détecteurs à spectrométrie d'absorption atomique (AAS), à photométrie de flamme (FPD), à émission atomique (AED), à spectrométrie de masse (MS) et à spectrométrie de masse avec ionisation dans un plasma à couplage inductif (ICP-MS, "*inductively coupled plasma-mass spectrometry*"),

Pour la détection par AAS, l'utilisation d'un four en quartz (QF) pour le couplage avec la GC est généralement privilégiée. Néanmoins, ce couplage présente de médiocres performances analytiques avec les injecteurs classiques en GC pour son application en analyse de traces (Lobinski et al., 1994). L'introduction d'injecteurs plus sophistiqués tels que le système PTV ("*programmed temperature vaporizer*"), autorisant la préconcentration des analytes en ligne, a permis d'améliorer les performances analytiques du couplage PTV-GC/QF-AAS et a ainsi rendu possible l'analyse des composés organostanniques dans les matrices environnementales (Szpunar et al., 1996a). Enfin, cette technique AAS est beaucoup plus populaire lorsqu'elle est associée à une technique de préconcentration cryogénique en ligne dans le domaine d'analyse de ces composés (Martin et al., 1994). Mais cette approche est limitée aux espèces organométalliques de faibles températures d'ébullition (méthyle, éthyle, propyle et butyle) et n'offre qu'un faible pouvoir de séparation.

La détection par FPD est la plus populaire et la plus largement diffusée, mais souffre d'interférences des espèces soufrées co-extraites (Martin et al., 1994). La dernière évolution de ce détecteur est le FPD à émission pulsée (PFPD, "*pulsed FPD*") (Jing et Amirav, 1996). La combustion des hydrocarbures est exothermique, irréversible et très rapide tandis que celle des composés contenant des hétéroatomes, moins rapide, est retardée de quelques millisecondes. Il est donc possible par une fenêtre électronique de choisir l'émission des composés désirés et obtenir par conséquent une sélectivité vis-à-vis du carbone supérieure à celle obtenue par un simple FPD (Jing et Amirav, 1996). Son application à l'analyse de spéciation des composés organostanniques a déjà été réalisée dans des échantillons environnementaux (Jacobsen et al., 1997; Aguerre et al., 2001).

Le spectromètre de masse combinant l'ionisation par impact électronique (EI) et le quadripôle, est actuellement le plus répandu. Ce système est intéressant par sa capacité à identifier la structure moléculaire et à évaluer la pureté des solutions étalons, mais les faibles masses des ions sélectionnés en mode EI ou CI (ionisation chimique) altèrent la sélectivité dans les matrices complexes (Abalos et al., 1997). Il est donc nécessaire de choisir judicieusement le rapport  $m/z$  afin d'éviter les interférences isobariques provenant de la matrice. Jusqu'à présent, les spectromètres de masse haute résolution n'ont pas été testés

pour améliorer la sélectivité et les techniques de dilution isotopique n'ont pas encore été appliquées à la spéciation des composés organostanniques. L'ionisation par EI peut aussi être améliorée par l'utilisation d'un faisceau laser (LEI, "*Laser Enhanced Ionisation*"). L'étude des performances d'un tel système a révélé une limite de détection de 750 attogrammes pour le tétraéthylétain, une valeur jusqu'ici jamais atteinte (Colby et al., 1990). Mizuishi et al. (1998) ont obtenu des limites de détection des butyl- et phénylétains dans l'eau 200 fois plus faibles comparativement à l'ionisation EI, par ionisation NICI ("*Negative Ion Chemical Ionization*"). Récemment, le couplage GC-MS-MS ("*Ion Trap*") a permis d'atteindre des limites de détection de 0,2 – 0,35 pg d'étain (Tsunoi et al., 2002) et le couplage SPME-GC-MS-MS a été utilisé pour la détermination des butylétains dans les fluides humains (Dunemann et al., 1999). Parmi les couplages GC-MS, les systèmes les plus performants sont ceux utilisant une ionisation dans un plasma à couplage inductif (GC-ICP-MS) (Prange et Jantzen, 1995; De Smaele et al., 1998; Tao et al., 1999). Actuellement, ils sont souvent employés après une préconcentration des analytes par micro-extraction en phase solide (SPME, "*solide phase microextraction*") (Moens et al., 1997; Aguerre et al., 2001) ou par une barre d'agitation adsorbante ("*stir bar sorptive extraction*") pour les échantillons d'eau (Vercauteren et al., 2001). De plus l'utilisation du détecteur ICP-MS permet la détermination des rapports isotopiques de l'étain et offre donc la possibilité de confirmer la présence de composés organostanniques à de faibles concentrations.

Enfin, la détection par AED est une des détections les plus sélectives et les plus sensibles couplée à la GC pour la spéciation des composés organostanniques, mais représente un investissement conséquent en raison de son coût élevé et de celui de son fonctionnement. Par opposition à la détection AAS, elle donne la possibilité d'une analyse multi-élémentaire avec des performances séduisantes: une sensibilité au niveau du sub-pg et une sélectivité importante par rapport au carbone (Pederson-Bjergaard et Greibrokk, 1996).

#### **4.1.2. La chromatographie en phase liquide (LC)**

En ce qui concerne les techniques de couplage utilisant une séparation par HPLC, il existe de nombreuses méthodes pour les solutions de standards, mais très peu pour les échantillons environnementaux (Abalos et al., 1997). Elle présente l'avantage d'éliminer l'étape de dérivation des composés, mais la sensibilité de la plupart des détecteurs usuels est insuffisante pour les niveaux de concentration enregistrés dans les échantillons environnementaux. De plus, le nombre de composés analysés dans les sédiments et les tissus biologiques est plus limité qu'en GC et se restreint principalement aux butylétains et parfois au triphénylétain. En général, les colonnes échangeuses d'ions sont les plus utilisées et l'élution en mode isocratique est la plus courante.

Les détecteurs utilisés en LC sont les détecteurs AAS, à fluorimétrie, MS, ICP-MS, LEI et ICP-AES. Parmi les modes de détections AAS, le système automatisé LC-GFAAS est le plus récent, mais la résolution chromatographique s'en trouve affectée (Astruc et al., 1992). Dans les couplages LC-ICP-MS, l'utilisation de nébuliseurs plus efficaces que les nébuliseurs pneumatiques conventionnels, tel que ceux de type ultrasonique, a permis de réduire le volume mort causant un élargissement de bande (Yang et al., 1995). Cependant, l'ICP souffre d'une faible compatibilité avec la plupart des phases mobiles et l'insertion d'un générateur d'hydrure entre la colonne et le détecteur (LC-HG-ICP-AES) a permis, par l'évacuation de l'éluant organique, d'améliorer la sensibilité instrumentale (Rivaro et al., 1995). La détection par fluorimétrie nécessite une étape de dérivation par un fluorophore, généralement à l'aide de dérivés flavones.

#### 4.2. Limites de détection des différentes techniques de couplage

Parmi les techniques GC, les détecteurs AED, MS en mode EI (et en SIM, "*Single Ion Monitoring*") et FPD présentent des limites de détection au niveau du sub-pg. Les limites de détection absolues usuellement obtenues par les techniques de couplage utilisant une séparation GC sont décrites dans le tableau 17. Les limites de détection atteintes en GC-MIP-AED sont similaires à celles obtenues avec les meilleurs instruments FPD et les systèmes GC-MS avec un analyseur de masse quadripolaire (en mode SIM) (Rodriguez-Pereiro et al., 2002). Des limites de détection inférieures d'un à deux ordres de grandeur à celles obtenues en GC-MIP-AED sont uniquement atteintes par GC-ICP-MS. Tao et al. (1999) ont même obtenu des limites de détection instrumentales 100 fois plus faibles (de l'ordre du femtogramme) en utilisant une *shield torch*. Cependant, les nouveaux couplages GC-PFPD présentent des limites de détection meilleures qu'en GC-MIP-AED et seulement 2 à 10 fois plus élevées qu'en GC-ICP-MS (Aguerre et al., 2001).

Parmi les techniques LC, seules celles qui utilisent une détection ICP-MS possèdent des limites de détection au niveau du sub-pg et sont comparables aux méthodes GC les plus sensibles (Abalos et al., 1997). Mais les remarquables améliorations des interfaces d'ionisation à pression atmosphérique (APCI) pourraient nettement améliorer la sensibilité du couplage LC-MS (Rosenberg et al., 2000). La sensibilité obtenue avec une détection fluorimétrique dépend à la fois des composés et des fluorophores utilisés et peut atteindre dans certains cas de très basses limites de détection (Companó et al., 1995), de l'ordre du  $\text{ng.g}^{-1}$  (Sn) dans des tissus de moules et d'huîtres (Gonzales-Toledo et al., 2001). Parmi les techniques non chromatographiques, la spectrométrie de masse en tandem (ISMS-MS: "*Ion Spray Mass Spectrometry*") est 4 fois plus sensible que la GFAAS (Abalos et al., 1997).

Systèmes	Limites de détection (pg Sn)	Référence
GC-MIP-AED	1-5	Liu et al., 1993; Stäb et al., 1993
	0,50	Chau et al., 1997b
	0,05	Lobinski et al., 1992b
	0,15	Ceulemans et al., 1993
GC-FPD	2-4	Nagase et al., 1998
	0,2-0,5	Gomez-Ariza et al., 1997
GC-PFPD	0,07-0,38	Aguerre et al., 2001
GC-QFAAS	33-71	Dirkx et al., 1993
GC-MS	1-10	Stäb et al., 1993, 1994b
GC-MS-MS	0,2-0,35	Tsunoi et al., 2002
GC-ICP-MS	0,05	Prange et al., 1995
	0,015-0,034	De Smaele et al., 1998
	0,05-0,08	Aguerre et al., 2001
	0,0007-0,0016	Tao et al., 1999

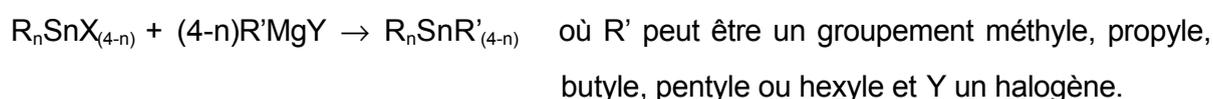
**Tableau I-7: Limites de détection absolues (signal/bruit = 3) atteintes pour les composés organostanniques par les systèmes de chromatographie en phase gazeuse.**

Les couplages GC-PFPD et GC-ICP-MS apparaissent donc être les systèmes les plus performants actuellement pour l'analyse des échantillons environnementaux et leur couplage avec une préconcentration en ligne des analytes par SPME offre de nouvelles perspectives dans la détection et la détermination d'autres formes organiques de l'étain de par les basses limites de détection que ces techniques permettent d'atteindre.

#### 4.3. Les réactions de dérivation pour la chromatographie en phase gazeuse

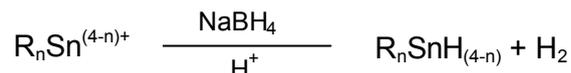
L'analyse par chromatographie en phase gazeuse des composés organostanniques nécessite une étape de dérivation afin de convertir les composés polaires ioniques en espèces totalement alkylées qui peuvent être ainsi chromatographiables. Deux approches sont possibles : i) la dérivation par un organomagnésien après extraction (liquide/liquide) des espèces ioniques par un agent complexant dans une phase organique anhydre, et ii) la dérivation *in situ* à l'aide du borohydrure de sodium ou du tétraéthyleborate de sodium.

La dérivation par la réaction de Grignard consiste à faire réagir un organomagnésien et à substituer l'anion par un groupement alkyle selon la réaction suivante:



Cette approche est la plus ancienne mais sa mise en œuvre est longue et laborieuse; elle exige un milieu anhydre pour que la réaction ait lieu; une étape d'extraction des formes ioniques de la matrice aqueuse, dans un solvant organique par un agent complexant est donc nécessaire (Lobinski et al., 1993). Le solvant doit ensuite être séché avant l'ajout du réactif et l'excès de réactif détruit par un acide fort. La multiplicité des étapes peut entraîner de surcroît la perte ou la dégradation des analytes.

Lors d'une génération d'hydrures, les formes volatiles des composés organostanniques sont produites par hydruation en milieu acide:



Elle présente la capacité de réagir simultanément avec les formes ioniques méthylées et butylées de l'étain et, combinée avec un système de purge et de piégeage cryogénique, offre une efficacité de préconcentration très élevée. Cependant, le rendement de cette réaction pour des échantillons réels peut être diminué par des interférences dues à la présence de métaux, sulfures, matières organiques ou autres (Martin et al., 1994). En outre, elle ne permet pas l'analyse des composés phénylés de l'étain, moins volatiles, qui présentent des problèmes de condensation (Kuballa et al., 1996).

L'éthylation par le tétraéthyleborate de sodium est une substitution nucléophile dont le schéma réactionnel est le suivant:  $R_nSn^{(4-n)+} + (4-n)NaBEt_4 \rightarrow R_nSnEt_{(4-n)} + (4-n)Na^+$ .

Elle présente l'avantage d'être directement applicable en milieux aqueux. Le pH est le principal facteur qui affecte le rendement d'éthylation des composés butylés et phénylés de l'étain. Les conditions optimales se situant autour de 5, une solution tampon d'acide acétique/acétate de sodium est généralement utilisée (Lalère, 1995). Récemment, le tétra(n)propyleborate de sodium a été introduit comme réactif de dérivation (De Smaele et al., 1998). Le  $NaBPr_4$  présentent la même efficacité de dérivation que le  $NaBEt_4$  et des limites de détection similaires (Schubert et al., 2000). Il rend de plus possible la détermination des composés éthylés de l'étain.



## **CHAPITRE II.**

### **DEVELOPPEMENTS ANALYTIQUES**



## DEVELOPPEMENTS ANALYTIQUES

Cette seconde partie porte sur le développement de méthodologies analytiques pour, d'une part, déterminer les composés organostanniques, et d'autre part, mesurer différents marqueurs biochimiques sensibles aux contaminants, afin de réaliser une étude de surveillance biologique du Bassin d'Arcachon.

Pour cela, il a tout d'abord fallu:

√ mettre au point les protocoles d'extraction des composés organostanniques dans les différents compartiments environnementaux (eau, sédiment et biota) et développer une technique d'analyse par chromatographie gazeuse couplée à un détecteur d'émission atomique (GC-AED).

√ mettre au point une méthode de dosage des stéroïdes endogènes chez la moule par chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS). Ce développement a été réalisé en collaboration avec le groupe "Biogéochimie et Analyses Organiques" du laboratoire, dirigé par H. Budzinski.

√ intégrer l'analyse d'autres contaminants réalisée en routine au laboratoire, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et les polychlorobiphényles (PCB) (réalisée par le groupe "Biogéochimie et Analyses Organiques"), les métaux traces, ainsi que la détermination des paramètres biochimiques, réalisée par le groupe "Toxicologie Biochimique" dirigé par J.F. Narbonne.

Les métaux traces ont été déterminés à l'aide d'un plasma à couplage inductif couplé à un spectromètre de masse (ICP-MS), les HAP par GC-MS, les PCB par chromatographie gazeuse couplée à un détecteur à capture d'électrons (GC-ECD) et les marqueurs biochimiques par lecteur UV de microplaque ou spectrophotométrie différentielle.

Enfin, de façon à ne pas alourdir la présentation des résultats (chapitre III), un certain nombre de données relatives à l'étude de surveillance biologique du Bassin d'Arcachon sont présentées dans ce chapitre. Elles concernent le choix de l'espèce sentinelle, la préparation des échantillons, la détermination des paramètres physiologiques des moules, ainsi que la détermination des facteurs d'accumulation des contaminants et la description du traitement statistique des données.



## **1. Analyse des composés organostanniques par GC-MIP-AED**

Parmi toutes les techniques de couplage, l'utilisation du MIP-OES ("*Microwave Induced Plasma-Optical emission spectrometry*"; spectrométrie d'émission atomique par plasma micro-ondes) est devenue de plus en plus populaire pour la détermination des différentes espèces métalliques dans un grand nombre de matrices. Le couplage avec les méthodes de chromatographie en phase gazeuse combine une séparation efficace avec une détection hautement sélective et sensible (Abalos et al., 1997).

### **1.1. La chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à émission atomique: le couplage GC-MIP-AED Hewlett-Packard**

La spectrométrie d'émission atomique est fondée sur les transitions des électrons situés sur les couches externes de l'atome, que ces transitions soient entre les états excités et l'état fondamental ou entre plusieurs états excités. Chaque transition conduit à une raie de longueur d'onde caractéristique; l'ensemble des raies produit le spectre spécifique de l'élément. En spectrométrie atomique, la source de radiation a deux rôles: 1) atomiser l'échantillon afin d'obtenir des atomes libres, généralement dans leur état fondamental, et 2) apporter l'énergie nécessaire pour exciter ces atomes dans des états énergétiques plus élevés.

Le détecteur à émission atomique présente de nombreux avantages: une détection multi-élémentaire et spécifique, une large gamme linéaire de réponses dynamiques ( $10^4$ - $10^5$ ), une sensibilité au niveau du sub-pg et une sélectivité importante par rapport au carbone ( $3 \times 10^5$  pour Sn/C) (Uden, 1995). C'est un outil performant pour déterminer la spéciation des éléments métalliques dans des matrices complexes.

#### **1.1.1. Présentation générale**

Le couplage utilisé est composé d'un détecteur à émission atomique AED G2350A et d'un chromatographe en phase gazeuse HP 6890 Serie II équipé d'un injecteur split/splitless HP 6890 Serie et d'un passeur automatique HP G5912A (figure II-1). L'ensemble est contrôlé par une station informatique HP G2360A. Le gaz vecteur qui est aussi le gaz plasmagène est de l'hélium haute pureté (pureté: 99.999996%).



**Figure II-1: Présentation du couplage GC-MIP-AED Hewlett-Packard (Agilent Technologies, Willmington, DE, USA).**

Le principe de fonctionnement est rappelé ci-dessous:

Dans le détecteur, un plasma d'hélium est généré dans un tube à décharge à l'aide d'une cavité résonante micro-onde. Le chromatographe est couplé au plasma micro-ondes par une ligne de transfert chauffée qui prolonge la colonne directement à l'intérieur du tube à décharge (sans diviseur de flux), l'extrémité de la colonne entrant partiellement dans la cavité. Les effluents chromatographiés sont transformés en atomes excités par le plasma de haute énergie. Les atomes en se désexcitant émettent un spectre d'émission atomique qui est détecté par un spectromètre placé dans une chambre à travers une fenêtre située dans l'axe du plasma. Le spectre émis est séparé en longueurs d'ondes caractéristiques par un réseau holographique et focalisé sur un détecteur à barrettes de diodes (PDA).

## **1.1.2. Caractéristiques du détecteur**

### **1.1.2.1. La source d'émission: MIP ("Microwave Induced Plasma")**

#### Plasma MIP

Bien qu'un plasma d'argon puisse être utilisé avec cette cavité, le plasma d'hélium est préféré car son énergie d'ionisation est supérieure; il permet ainsi d'exciter plus facilement les éléments non-métalliques (F, Cl, Br, O, S, N) et donc d'obtenir une meilleure sensibilité (Pederson-Bjergaard et Greibrokk, 1996). Le plasma d'hélium est généré à pression

atmosphérique dans un tube en quartz de paroi mince appelé tube de décharge et est contenu dans une cavité micro-ondes de type Beenakker. Une vue en coupe de la cavité est représentée sur la figure II-2.

### Cavité micro-ondes

L'énergie produite par le générateur micro-ondes est couplée au plasma d'hélium par cette cavité qui dérive de celle de Beenakker. L'alimentation en énergie micro-ondes se fait au travers d'un magnétron couplé à un guide d'ondes. Le rôle de la cavité est de maintenir une onde stationnaire et de concentrer ainsi le champ électrique au voisinage du gaz, ce qui permet d'apporter l'énergie nécessaire à l'entretien du plasma. Aucun réglage des micro-ondes (2,45 GHz) n'est nécessaire. Un générateur de puissance délivrant 70 W est utilisé. Cette puissance a été optimisée en fonction de la géométrie du tube à décharge et de celle de la cavité.

### Tube à décharge

La géométrie de ce tube en quartz a été optimisée par le constructeur afin d'obtenir un confinement maximal du plasma. Ses dimensions sont: 1 mm de diamètre interne, 0,1 mm d'épaisseur et 42 mm de longueur. La face externe du tube est refroidie par une circulation d'eau thermostatée à 60°C afin d'éviter la formation de dépôts de carbone ou de processus de dévitrification de la face interne. La colonne chromatographique pénètre dans le tube et son extrémité se situe à quelques millimètres du plasma, ce qui conduit à un très faible volume mort et à une introduction totale des composés dans le plasma (Uden et al., 1995).

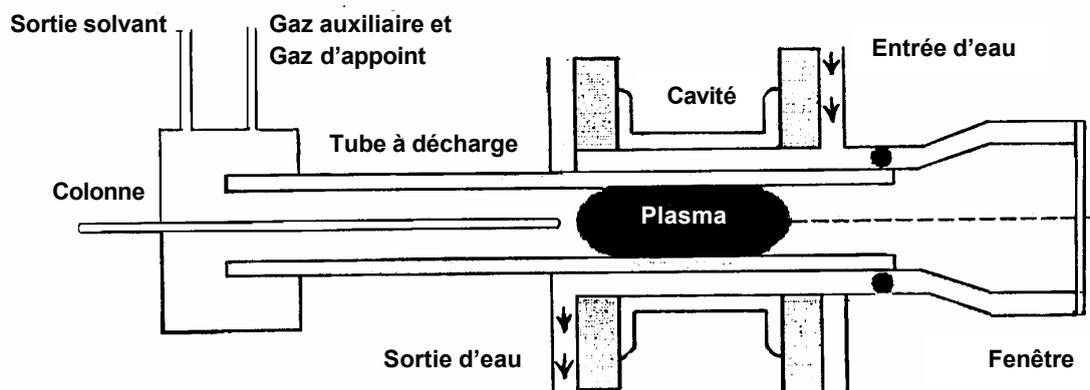


Figure II-2: Schéma de l'interface GC-AED.

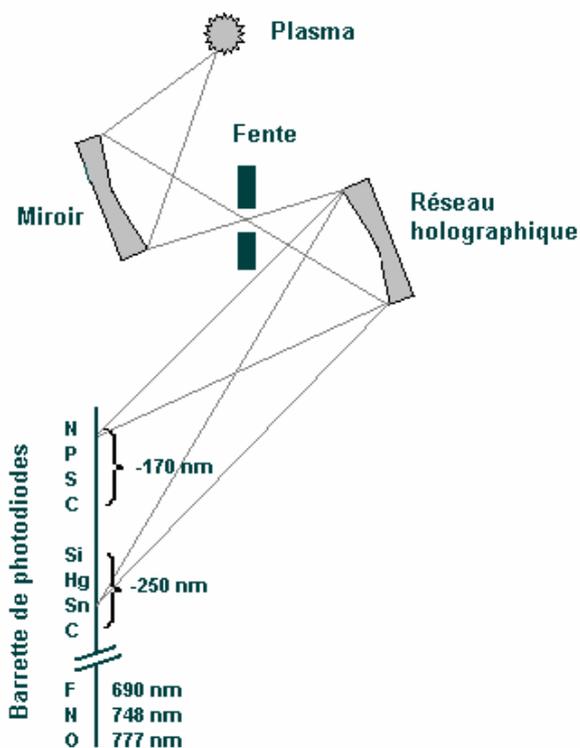
## Le système des gaz

Le débit d'hélium alimentant le plasma est constitué d'une part du flux de gaz vecteur provenant de la colonne chromatographique (de l'ordre du ml/min) et d'autre part d'un débit auxiliaire d'hélium, appelé "make-up" (dizaines à centaines de ml/min). Le débit de gaz auxiliaire influe directement sur les caractéristiques énergétiques et géométriques du plasma. Les gaz réactants sont ajoutés au débit auxiliaire d'hélium pour améliorer la sensibilité du détecteur pour certains éléments et réduire l'élargissement des pics (David et Sandra, 1992). L'ajout d'oxygène permet aussi de minimiser les dépôts de carbone à l'intérieur du tube de décharge. Une vanne d'évent à deux voies contrôle la circulation des gaz. En fonctionnement normal, les flux de la colonne chromatographique et du gaz auxiliaire pénètrent dans le plasma et sortent de la cavité avec le débit de purge de la fenêtre optique. Lorsque la vanne est fermée, le plasma est retrobalayé par le gaz de purge et les flux de la colonne et du gaz auxiliaire sont alors éliminés à l'évent. Ce retrobalayage (ou "solvent vent") permet d'éventer le solvant durant les premières minutes d'analyse afin d'éviter l'extinction du plasma, due à la faible énergie thermique du MIP-AED qui rend peu efficace la désolvatation et l'atomisation d'une grande quantité d'échantillon liquide (Birch et al., 1993).

### **1.1.2.2. Le spectromètre optique**

#### Spectromètre (Czerny Turner 0.25-m)

Le flux lumineux passe à travers une lentille et pénètre dans le spectromètre par une fente de 50  $\mu\text{m}$  (figure II-3). La lentille empêche l'entrée des gaz dans le spectromètre. Une purge constante d'hélium du côté de la cavité permet d'éviter tout encrassement et/ou contamination de la lentille. A l'intérieur du spectromètre, la lumière est réfléchiée sur deux miroirs fixes et un réseau holographique mobile. Ce dernier disperse la lumière en bandes verticales discrètes et les focalise dans un plan horizontal. Ces bandes caractéristiques sont triées en longueur



**Figure II-3: Schéma du spectromètre du détecteur d'émission atomique**

d'onde, de 171 à 837 nm. Comme le détecteur à barrettes de diodes (PDA) n'est pas suffisamment large pour analyser toute cette bande spectrale en même temps, un moteur permet d'orienter le réseau de façon à ne réfléchir qu'une largeur de bande de 20 à 26 nm sur le PDA. Une purge d'azote permet de travailler dans le bas UV (de 160 à 190 nm) et d'éviter la perte de sensibilité, particulièrement dans cette zone, causée par la présence d'oxygène ou d'humidité dans le spectromètre.

#### Détecteur à barrettes de diodes (PDA)

Le PDA est constitué de 512 photodiodes (ou pixels) qui enregistrent l'intensité lumineuse directement à leur surface. La quantité de photons frappant la surface d'une diode détermine la tension transmise par celle-ci au préamplificateur. Ce dernier transmet les signaux analogiques amplifiés des photodiodes à un convertisseur A/D pour le traitement des données. La dispersion linéaire varie de 0,2 nm/pixel dans l'UV lointain jusqu'à 0,07 nm/pixel dans le proche Infrarouge. C'est le domaine de longueurs d'ondes couvert, pouvant aller jusqu'à 40 nm, qui détermine quelle combinaison d'éléments peut être analysée en une seule fois. Ce potentiel d'analyse multi-élémentaire peut être d'un grand secours pour la confirmation de la présence d'un élément, puisqu'il est possible de visualiser les différentes lignes d'émission (ainsi que leur rapport) caractéristiques d'un élément. La réponse électro-optique pour un élément est proportionnelle à la quantité injectée, indépendamment de la structure du composé parent. Cependant, quelques études ont montré l'influence de la structure de certains composés organiques sur les réponses élémentaires pour le carbone et l'hydrogène, affectées par le degré de saturation du composé et par la présence d'halogène, d'azote ou d'oxygène (Andersson, 1993; Augusto, 1998).

#### **1.1.3. Comparaison des performances du détecteur HP G2350A avec la première génération d'instrument AED HP 5921A**

Les limites de détection et les sélectivités d'un grand nombre d'élément ont été comparées sur les deux détecteurs (Quimby et al., 1996; note d'application 228-363 HP). La sélectivité est définie comme le rapport poids de carbone sur poids de l'élément qui produit des réponses égales (Lobinski, 1993). Le détecteur HP G2350A présente des limites de détection similaires ou meilleures que le HP 5921A, à l'exception du C ( $\lambda=248\text{nm}$ ), Fe ( $\lambda=302\text{nm}$ ), Hg ( $\lambda=254\text{nm}$ ) et des isotopes du carbone et de l'azote. Quant aux sélectivités mesurées sur le HP G2350A, seuls O ( $\lambda=171\text{nm}$ ), Fe ( $\lambda=302\text{nm}$ ) et les isotopes ont des sélectivités légèrement plus faibles que celles obtenus avec le HP 5921A. Une meilleure

sélectivité est obtenue pour tous les autres éléments. En ce qui concerne l'étain, seule la raie d'émission Sn ( $\lambda=303\text{nm}$ ) a été comparée sur les deux détecteurs; si la limite de détection mesurée est identique, la sélectivité a été améliorée d'un facteur 40 avec le nouveau détecteur HP G2350A. Les résultats obtenus sur les deux détecteurs pour quelques métaux sont représentés dans le tableau II-1.

Elément	$\lambda$ (nm)	Limites de détection (pg/s)		Sélectivité (/ carbone)	
		G2350A	5921A	G2350A	5921A
Sn	271	1		295 000	
	303	1,4	1	1 500 000	35 000
	326	0,4		3 300 000	
Pb	261	0,8		314 000	
	406	0,2		286 000	
Hg	254	0,6	0,1	258 000	100 000
Se	196	2,3	4	135 000	50 000
Fe	302	0,1	0,05	4 600 000	35 000 000
As	189	2,2	3	320 000	39 000

**Tableau II-1: Limites de détections et sélectivités des métaux avec les systèmes AED G2350A et 5921A.**

## 1.2. Optimisation des conditions d'analyse par GC-MIP-AED

Les paramètres préliminaires d'analyse ont été choisis à partir d'une synthèse bibliographique des conditions analytiques utilisées pour l'analyse des composés organostanniques par GC-AED (tableau II-2), utilisant le détecteur HP 5921A (aucun travail faisant référence au détecteur HP G2350 n'ayant été trouvé au moment de l'optimisation des conditions analytiques). Le débit de gaz vecteur dans la colonne et la programmation en température du four ont été optimisés de façon à obtenir la meilleure séparation sur les composés butylés et phénylés, tout en évitant d'utiliser des débits de colonne supérieurs à 2 ml/min et des montées en température de four supérieures à 10°C/min à partir de 200°C.

HP 5890Series II				HP 5921A				Référence	
colonne	injection	T (°C)	Hélium (ml/min)	Température (°C) LXF* cavité	Hélium (ml/min)	P (psi) O <sub>2</sub> / H <sub>2</sub>	Eléments et raies d'émission (nm)		
HP-5	splitless	250	6	250	250	220	65 / 25	Sn 271, C 248, H 656	Liu et al., 1993
HIRESO	splitless	250	5	210	210	170	-	Sn 303, C 496, H 486	Scott et al., 1991
HP-1	splitless	320	3,9	330	330	250	-	Sn 303	David et al., 1992
HP-5	splitless	300	0,75	300	300	250	-	Sn 303 et 284, C 248, H 656	Gremm et al., 1992
SPB-1	splitless	250	3,9	270	270	240	60 / 20	Sn 271	Chau et al., 1997a
DB-210	splitless	200	5,6	250	250	240	50 / 20	Sn 303	Schmitt, 1997
BPX-5	-	-	5,9	200	200	280	-	Sn 271	Reuther et al., 1999
DB-17MS	splitless	250	7	320	320	250	70 / 20	Sn 271, Pb 261	Chau et al., 1997b
HP-1	splitless	200	6,1	200	250	270	65 / 20	Sn 271, Pb 261, Hg 254	Ceulemans et al., 1996
HP-1	splitless	280	2,6	280	280	250	72,5 / 10	Sn 271, Pb 261, C 248	Schubert et al., 2000
HP-5	on-column	3°C>four	4	280	280	220	65 / 30	Sn 271, C 248	Liu et al., 1994
HP-1	split (1/20)	170	5,6	250	250	240	50 / 20	Sn 303	Lobinski et al., 1992
HP-1	split (1/15) ou splitless	-	-	280	280	300	80 / 25	Sn 271, Pb 261, Hg 254	Minganti et al., 1995

LXF : ligne de transfert

Tableau II-2 : Synthèse bibliographique des conditions analytiques utilisées pour l'analyse des composés organostanniques par GC-AED, utilisant le détecteur HP 5921A.

### 1.2.1. Les raies d'émission de l'étain

Les raies d'émission de l'étain dans le domaine UV sont: 242.2, 242.9, 270.7, 284.0, 286.3, 300.9, 303.4, 317.5 et 326.2 nm. Le bruit de fond du plasma étant toujours présent dans les régions 280-290 et 306-320 nm, il n'est donc pas souhaitable de travailler dans ces domaines. L'«empreinte» de l'étain correspond à plusieurs longueurs d'ondes visibles selon la position de la barrette de diodes, comme le montre la figure I-12. Les longueurs d'ondes les plus utilisées sont 271 et 303 nm, la dernière étant la plus sélective des deux (Stäb et al., 1993). Mais depuis l'apparition de la seconde génération de détecteurs AED, la longueur d'onde de l'étain à 326 nm présente une sensibilité bien meilleure et une sélectivité par rapport au carbone nettement supérieure aux raies 301 et 303. La sensibilité obtenue, évaluée en aires de pics, sur les raies 301 et 303 nm représente 20 et 50%, respectivement, de celle obtenue à 326 nm (figure II-4). De la même façon, Tutschku (1994) a obtenu des limites de détection plus faibles à 326 nm qu'aux longueurs d'ondes plus usuelles, 271 et 303 nm. Toutes les analyses des composés organostanniques ont donc été réalisées à la longueur d'onde 326 nm. La figure II-5 représente le gain de sensibilité obtenu sur la raie d'émission de l'étain à 326 nm, par rapport aux raies à 301 et 303 nm, sur un mélange de composés organostanniques éthylys. En choisissant la raie à 326 nm, une seule raie d'intensité élevée est visible dans le domaine spectral couvert par les photodiodes. Il est donc nécessaire de réaliser une seconde injection regroupant deux autres raies caractéristiques de l'étain (301 et 303 nm) pour identifier de façon irréfutable la présence d'étain.

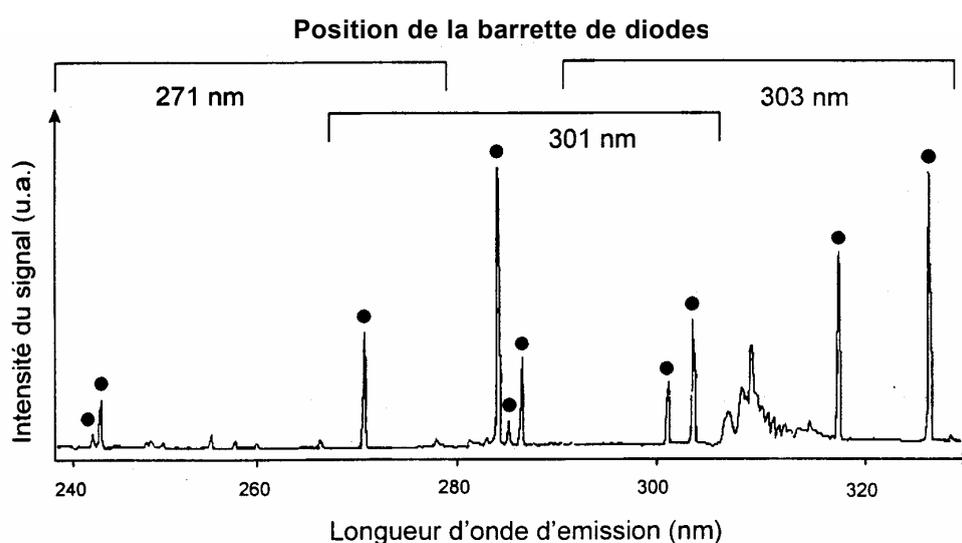


Figure II-4: Spectre des raies d'émission atomique de l'étain au sommet du pic chromatographique du MPT à trois positions de la barrette de diodes (d'après Stäb et al., 1993).

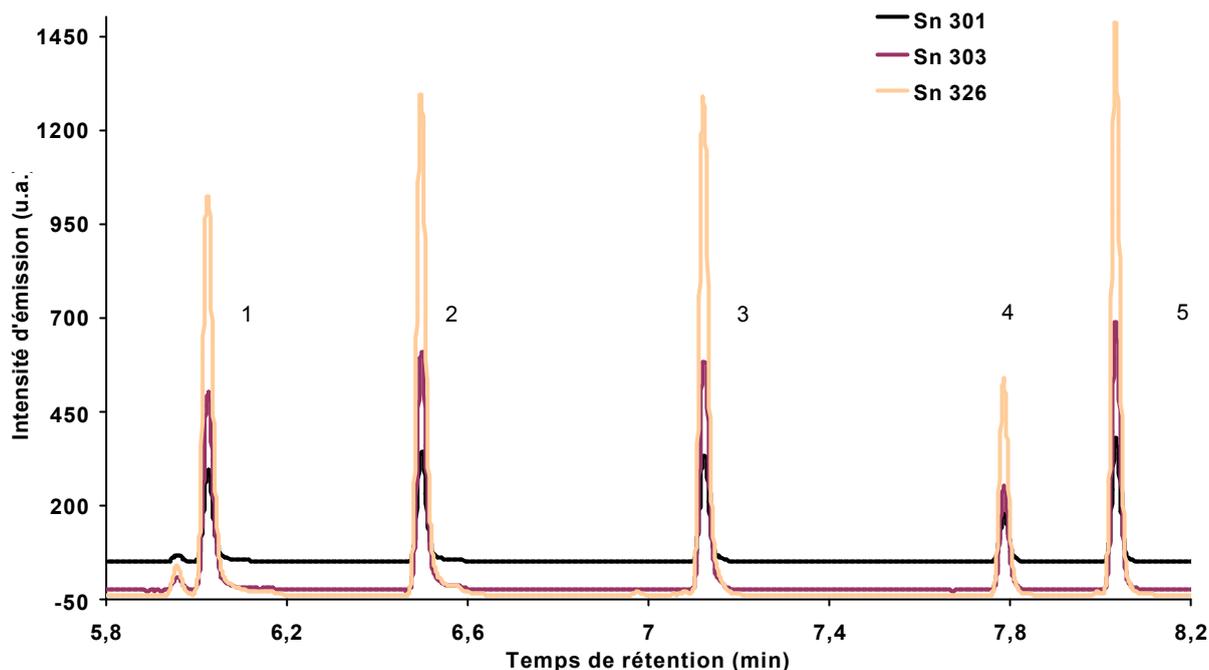


Figure II-5: Extrait d'un chromatogramme d'un mélange étalon (environ  $150 \text{ ng.ml}^{-1}$ ) représentant les différences de sensibilité obtenues sur les raies d'émission de l'étain à 301, 303 et 326 nm. 1, MBT ; 2, TPrT; 3, DBT; 4, MPT; 5, TBT.

### 1.2.2. Optimisation des débits de gaz

En général, un flux d'hélium supérieur à  $200 \text{ ml.min}^{-1}$  est nécessaire à la fois pour empêcher l'interaction des composés organostanniques avec le tube de décharge et pour obtenir une sensibilité maximale. La présence d'oxygène dans le plasma est aussi indispensable pour éviter le dépôt de carbone sur les parois du tube de décharge même si l'oxygène entraîne la formation d'oxydes d'étain réfractaires et une diminution du signal d'émission. L'effet négatif de l'oxygène est compensé par l'ajout d'hydrogène au plasma. L'hydrogène produit des hydrures très volatiles qui sont facilement atomisés et excités, améliorant ainsi les limites de détection de cette technique (Girousi et al., 1997). De plus, l'hydrogène affecte positivement la forme des pics, la sélectivité et la sensibilité pour la détection des principaux éléments du groupe IV (Lobinski, 1993).

Les débits de gaz (plasmagène et réactants) sont optimisés afin d'obtenir une émission maximale sur la raie d'émission de l'étain choisie,  $\lambda=326 \text{ nm}$ . Le débit d'hélium a été optimisé de  $190$  à  $260 \text{ ml.min}^{-1}$  (figure II-6). Une sensibilité maximale pour chacun des composés a été obtenue pour un débit d'hélium de  $230 \text{ ml.min}^{-1}$ .

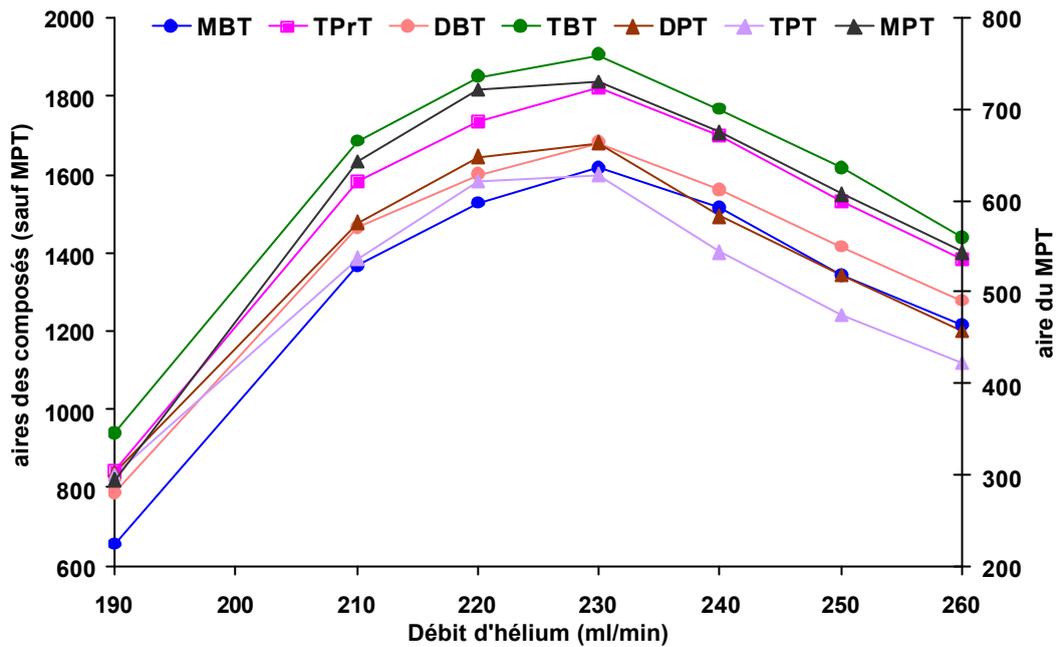


Figure II-6: Effet du débit du make-up d'hélium sur la sensibilité de chaque composé organostannique [ $P(O_2) = 20 \text{ psi}$ ,  $P(H_2) = 15 \text{ psi}$  ;  $1 \text{ psi} \gg 6,895 \text{ kPa}$ ].

La pression en oxygène, testée de 10 à 30 psi, n'a qu'une faible incidence sur l'intensité du signal. Bien que des sensibilités légèrement meilleures soient obtenues pour des pressions d'oxygène minimales, une pression de 20 psi est utilisée pour minimiser le dépôt de carbone sur les parois du tube de décharge. Les meilleurs résultats sont obtenus pour des pressions en oxygène et hydrogène respectivement égales à 20 et 15 psi, soit 138 et 103 kPa (figure II-7).

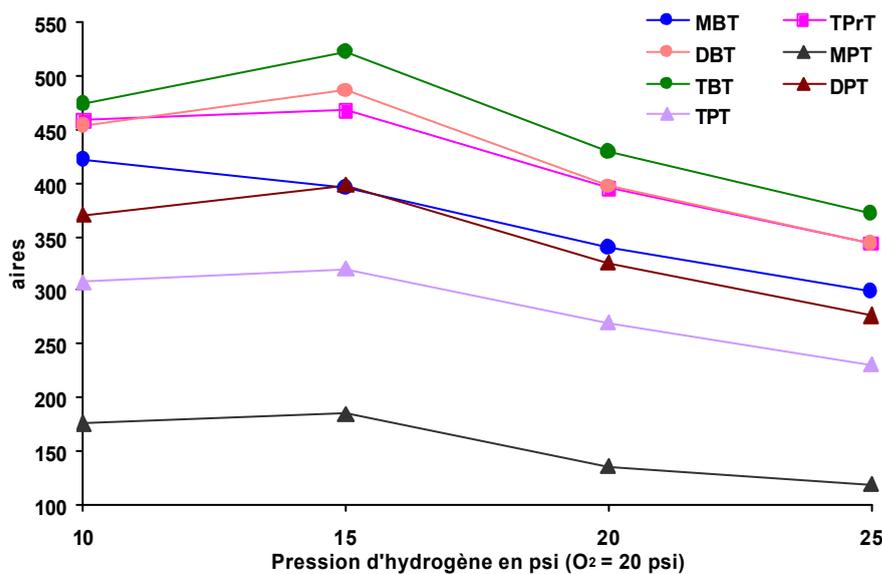


Figure II-7: Effet de la pression d'hydrogène sur la sensibilité de chaque composé organostannique pour un débit d'hélium de 230 ml/min et une pression d'oxygène de 20 psi.

### 1.2.3. Optimisation des conditions d'injection

La technique d'injection est particulièrement critique pour ne pas altérer la qualité de la séparation. La rapidité de transfert de l'échantillon sur la colonne est un facteur crucial. Une vitesse de transfert trop faible peut causer un élargissement des pics et pour les composés de points d'ébullition plus élevés, une altération de l'aire du pic.

#### 1.2.3.1. Choix du mode d'injection

En utilisant une injection avec division de flux ("*split*"), le temps de transfert sur la colonne est réduit en raison du surcroît de débit qui traverse l'injecteur, correspondant à la partie qui est évacuée vers la fuite. Mais ce mode d'injection entraîne une perte de la quantité injectée pouvant affecter négativement les analyses de traces dans les échantillons environnementaux, malgré la sélectivité du détecteur. On a donc préféré utiliser une injection sans division de flux ("*splitless*") pour transférer la totalité de l'échantillon sur la colonne.

Pour pallier aux pertes des composés les plus lourds, les phénylétains, dans l'injecteur, on a utilisé le mode d'injection sans division de flux et avec à-coup de pression ("*pulsed splitless*") permettant de programmer une variation soudaine de pression en tête de colonne. Comme dans l'injection avec division de flux, l'augmentation du flux dans la colonne durant l'injection minimise les pertes d'échantillon dans l'insert d'injection et permet aussi de réduire la discrimination de l'échantillon. La figure II-8 montre le gain de sensibilité obtenue sur le DPT et le TPT en mode pulsé ("*pulsed splitless*") par rapport au mode normal ("*splitless*"), sans altération de la sensibilité des composés butylés.

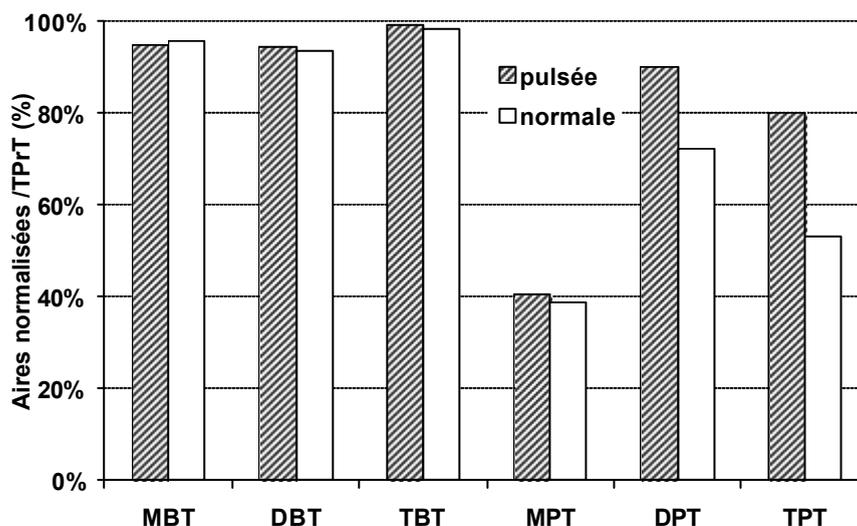


Figure II-8: Réponse du MIP-AED pour chaque composé en fonction du mode d'injection "*splitless*" utilisé (conditions de pression pulsée: Pression = 30 psi et temps = 1 min).

### 1.2.3.2. Optimisation des conditions d'injection à pression de gaz vecteur pulsée

L'optimisation de l'injection a été menée sur la pression et la durée de l'à-coup de pression afin d'évaluer leur influence sur la sensibilité du couplage GC-AED. Ces tests ont été réalisés en triplicats sur un mélange d'environ 100 ng d'étalons éthylés (composés butyl-, phényl- et tripropylétains). Au préalable, les conditions de purge de l'injecteur et la température du port d'injection ont été optimisées.

#### 1.2.3.2.1. Optimisation du débit et du temps de purge

Le débit de purge a peu d'incidence sur la largeur et la hauteur des pics de chaque composé et la variation d'abondance relative de chaque composé est inférieure à 0,3% sur l'ensemble des conditions testées. Par contre, un temps de purge de 0,5 min semble insuffisant pour chaque débit testé, comme le montre la figure II-9. Dans ces conditions, un débit de purge de 30 ml/min pendant 1 min a été retenu.

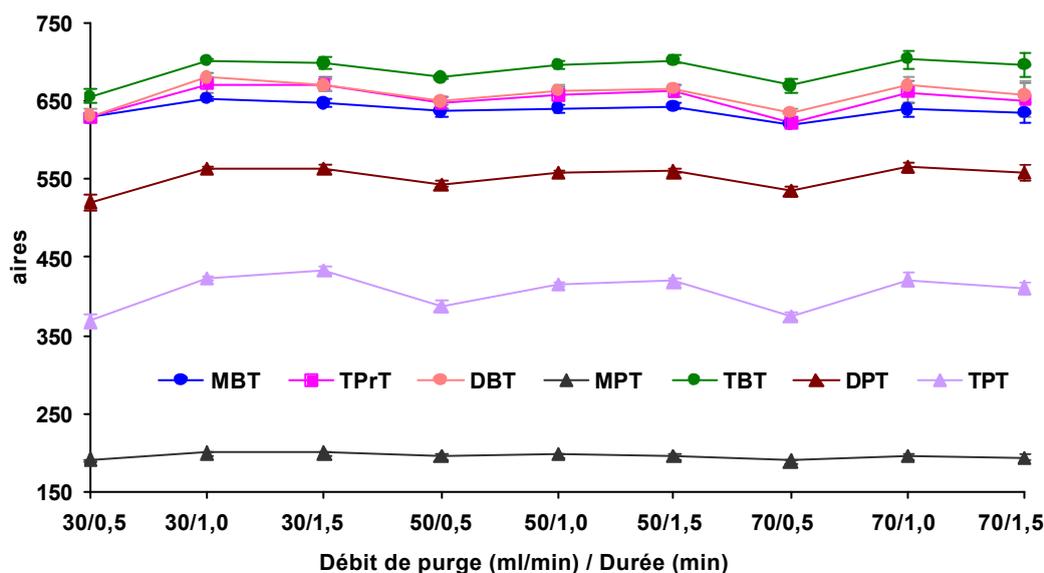


Figure II-9: Variation des aires de chaque composé en fonction des conditions de débit et de temps de purge.

#### 1.2.3.2.2. Optimisation de la température du port d'injection

La température du port d'injection a été optimisée de 190 à 280°C et les aires de chaque composé, obtenues en fonction de la température, sont représentées à la figure II-10. L'aire du pic du TPT augmente fortement avec la température. De la même façon, la hauteur des pics de tous les autres composés augmentent de 250 à 280°C, sans causer d'élargissement des pics, à l'exception du DBT et du TPT (+ 0,001 min de 250 à 280°C). Les deux

températures les plus élevées du port d'injection ont donc été retenues en vue des tests sur l'à-coup de pression à l'injection.

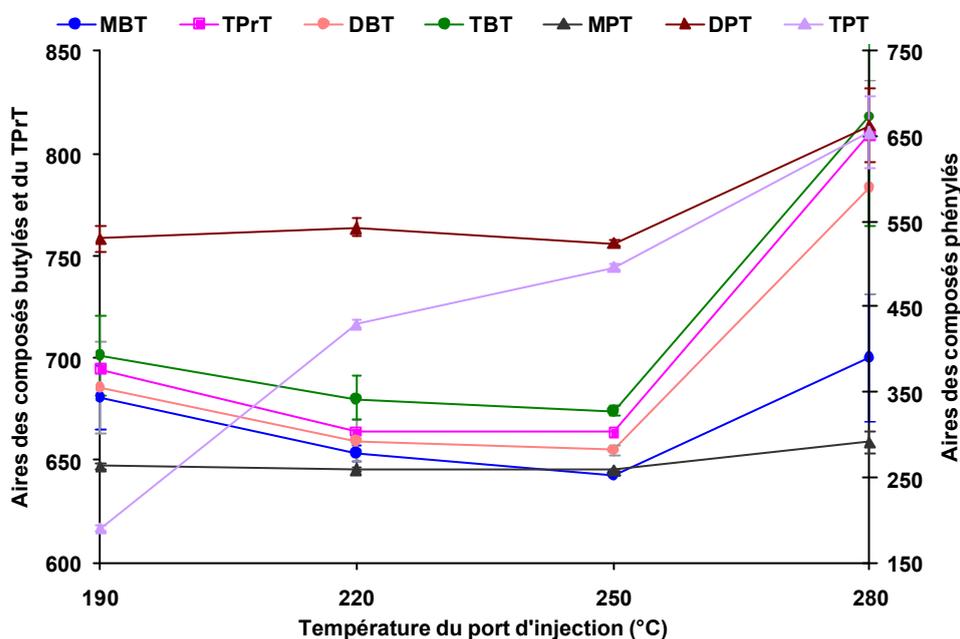


Figure II-10: Aire de chaque composé en fonction de la température du port d'injection.

#### 1.2.3.2.3. Optimisation des conditions de pression de gaz vecteur pulsée (*"pulsed splitless"*)

L'optimisation des conditions d'injection a été réalisée à différentes pressions de gaz vecteur en tête de colonne (15, 30 et 45 psi; soit 103, 207 et 311 kPa, respectivement) et pendant des durées déterminées (0,5; 1 et 1,5 min) à deux températures du port d'injection (250 et 280°C). Les résultats obtenus sont représentés aux figures II-11 a, b et II-12. La hauteur des pics des composés phénylés augmente pour une pression supérieure ou égale à 30 psi. L'utilisation d'un à-coup de pression cause un élargissement des pics, à l'exception du DPT et du TPT, qui devient problématique pour la pression la plus élevée si le temps excède 0,5 min, en particulier pour le MBT (figure II-12). Deux conditions semblent équivalentes en terme de rapport hauteur sur largeur de pics: une pression de 30 psi pendant 1 minute et de 45 psi pendant 0,5 minute, à l'exception du MBT, défavorable dans la seconde condition. Dans les conditions testées, la température du port d'injection n'a que peu d'influence sur les aires du TPT et du MPT; par contre, dans les deux conditions d'à-coup de pression citées précédemment, une température de 280°C améliore les aires du TBT et du DPT, mais détériore dans la seconde condition celles du tripropylétain. Les conditions d'injection suivantes ont donc été sélectionnées: une température du port de

280°C, un débit de purge de 30 ml.min<sup>-1</sup> pendant 1 minute et un à-coup de pression en tête de colonne de 30 psi pendant 1 minute. Elles représentent un bon compromis entre le taux de récupération des composés butylés et phénylés et la résolution chromatographique (élargissement et traînée de pics).

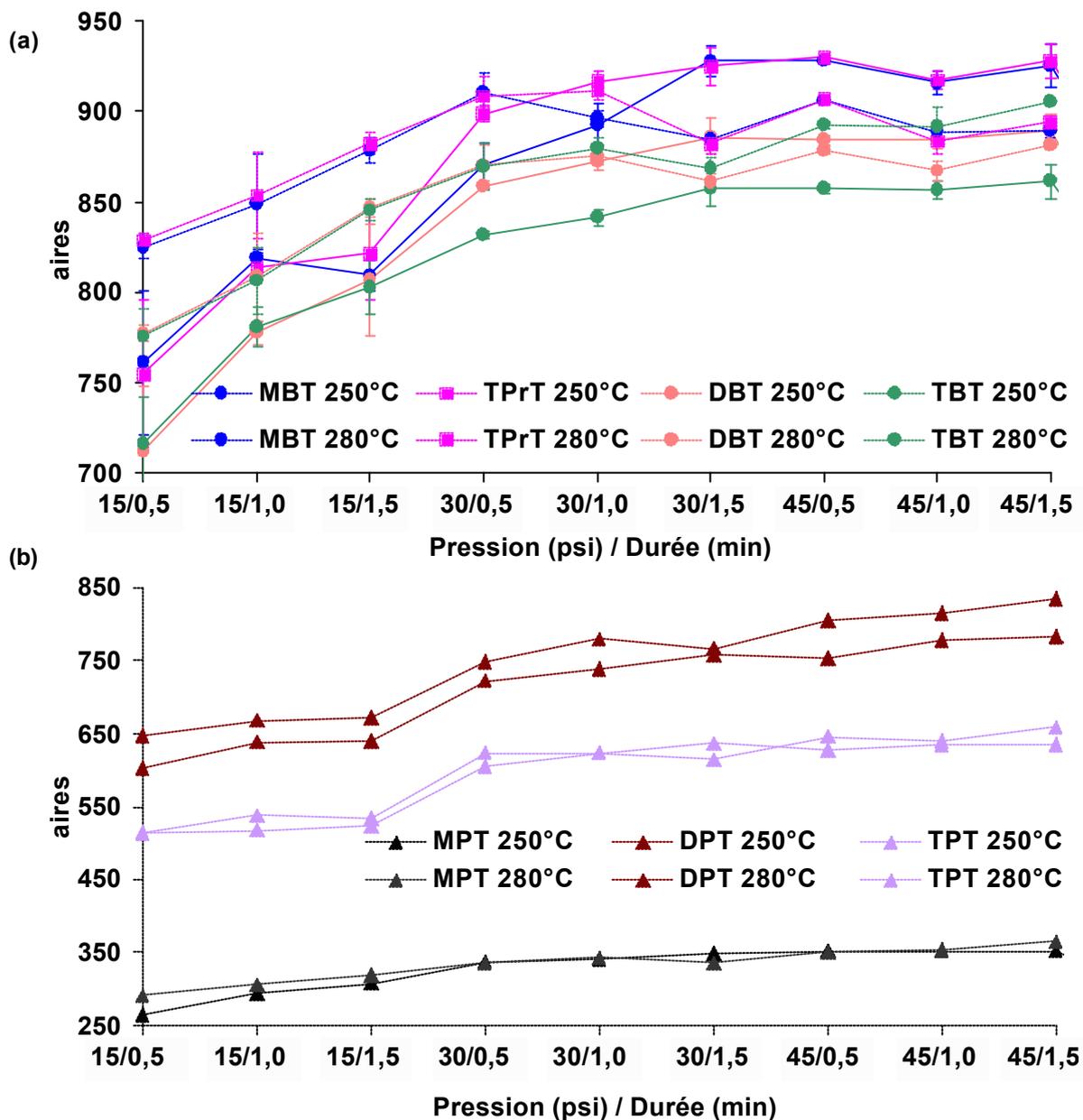


Figure II-11 a,b: Aires des butylétains et du tripropylétain (a) et aires des composés phénylés (b) en fonction des conditions d'injection pulsée, pour des températures de port d'injection de 250°C (courbes pleines) et de 280°C (courbes en pointillés). 1 psi » 6,895 kPa.

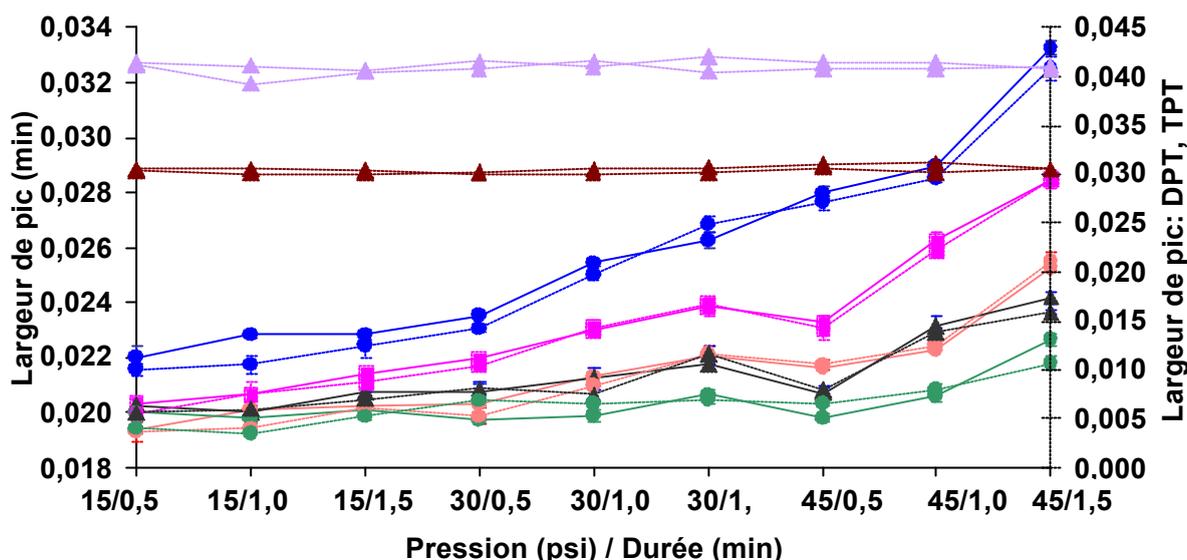


Figure II-12: Largeurs des pics de chaque composé en fonction des conditions d'injection pulsée, pour des températures de port d'injection de 250°C (courbes pleines) et de 280°C (courbes en pointillés). 1 psi » 6,895 kPa.

#### 1.2.4. Performances analytiques

Les conditions analytiques utilisées pour la détermination des composés organostanniques sont résumées dans le tableau ci-dessous (tableau II-3).

Injecteur	Température	280°C
	Mode pulsed splitless	30 psi; 1 min (207 kPa)
	Flux de purge	30 ml.min <sup>-1</sup> ; 0,9 min
	Volume d'injection	1 µl
GC	Colonne capillaire	Supelco SPB-5 (30 m x 0.32 mm x 0.25 µm)
	Gas vecteur	Hélium
	Débit	2 ml/min (75 kPa)
	Programme du four	Rampe 1: 60°C (1 min) / 20°C.min <sup>-1</sup> / 200°C (1 min) Rampe 2: 200°C / 10°C.min <sup>-1</sup> / 250°C (5 min)
AED	Température ligne de transfert	280°C
	Température cavité	280°C
	Débit make-up	230 ml.min <sup>-1</sup>
	Durée de purge du solvant	3,5 min
	Débit des gaz réactants	Oxygène: 20 psi (138 kPa) Hydrogène: 15 psi (103 kPa)
	Raie d'émission Sn suivie	326 nm

Tableau II-3: Synthèse des conditions analytiques GC-AED.

La reproductibilité des temps de rétention est excellente puisqu'elle est inférieure à 0,1% (tableau II-4). Les largeurs de pics mesurées à la moitié de l'intensité sont de l'ordre d'une seconde, à l'exception des pics de DPT et TPT plus larges. Les mesures en mode aire de pic sont légèrement plus précises que celles en mode hauteur de pic, avec une déviation standard de 1 à 2%.

	Temps rétention (min)		Aire de pic		Hauteur de pic		Largeur de pic (min)	
	moyenne	RSD (%)	moyenne	RSD (%)	moyenne	RSD (%)	moyenne	RSD (%)
MBT	6,025	0,01	1736	1,8	1068	1,6	0,0270	0,6
DBT	7,124	0,01	1736	1,6	1278	1,6	0,0227	0,5
TBT	8,035	0,01	1828	1,5	1439	2,0	0,0212	1,2
MPT	7,787	0,01	744	1,8	558	2,4	0,0222	0,8
DPT	10,950	0,01	1660	1,3	907	2,4	0,0309	1,7
TPT	14,616	0,00	1477	1,1	619	1,1	0,0398	1,2

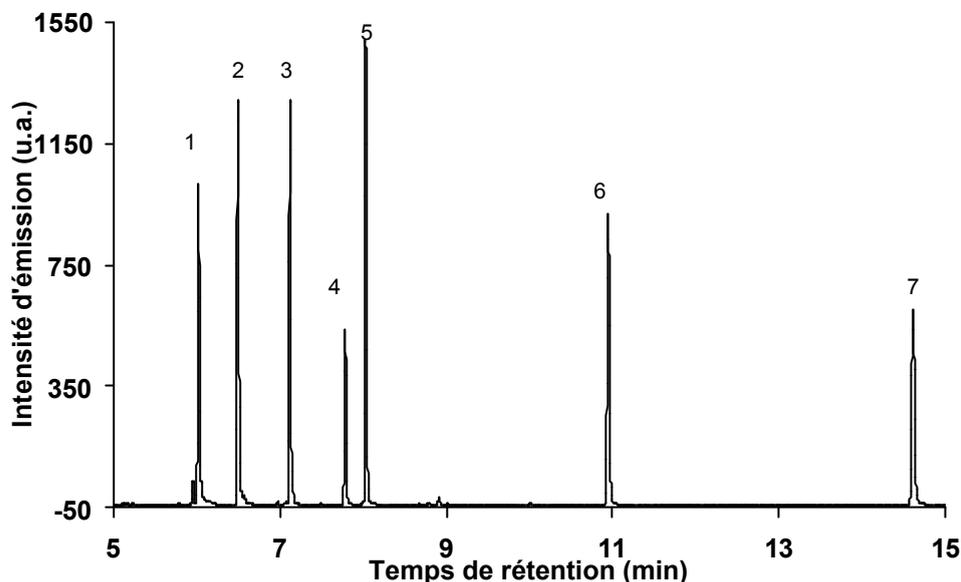
**Tableau II-4: Reproductibilité d'une analyse en GC-AED; résultats obtenus sur 6 injections de 1 µl d'un mélange de composés butylés et phénylés à 150 ng.ml<sup>-1</sup> en étain.**

Les caractéristiques de détection par GC-AED sont représentées dans le tableau II-5. Les facteurs de réponse, exprimés comme l'intensité d'émission par unité de masse injectée, sont sensiblement identiques en mode aire de pic, à l'exception du MPT qui présente un facteur de réponse deux fois plus faible. La limite de détection dans les conditions optimales (pour 1µl injecté), calculée comme 3 fois l'écart-type du bruit de fond d'un blanc (ayant subi l'intégralité du protocole analytique) divisé par un facteur de sensibilité donné par un étalon à 5 µg.l<sup>-1</sup>, varie de 0,1 pg pour la majorité des composés à 0,3 pg pour le MBT, en mode aire de pic. Bien que quelques auteurs aient obtenu des limites de détection inférieures à 0,2 pg d'étain (Lobinski et al., 1992b; Ceulemans et al., 1993; Michel et al., 1999a), la plupart des limites de détection enregistrées sont comprises entre 0,5 et 5 pg (Rodriguez pereiro, 2002).

	Facteur de réponse par pg injecté		Limites de détection (S/3B) (ng/ml en Sn)	
	aire	hauteur	aire	hauteur
MBT	11,6	7,1	0,25	0,38
DBT	11,6	8,5	0,09	0,11
TBT	12,2	9,6	0,06	0,08
MPT	5,0	3,7	0,11	0,15
DPT	11,1	6,0	0,08	0,16
TPT	9,8	4,1	0,06	0,14

**Tableau II-5: Sensibilité et limites de détection d'une analyse GC-AED (1 µl injecté).**

A titre d'exemple, un chromatogramme d'un mélange de composés organostanniques éthylés est représenté à la figure II-13.



**Figure II-13: Chromatogramme (extrait) d'un mélange de composés organostanniques éthylés (~150 ng. ml<sup>-1</sup> chacun). 1, MBT; 2, TPrT; 3, DBT; 4, MPT; 5, TBT; 6, DPT; 7, TPT.**

### 1.3. Les protocoles d'extraction

Les différents protocoles de préparation des échantillons ont fait l'objet d'une mise au point pour les trois matrices étudiées dans ces travaux, les eaux, les sédiments et les tissus biologiques.

#### 1.3.1. Les tissus biologiques

Les tissus de moules sont disséqués, poolés par 5 et stockés au congélateur dans des barquettes aluminium. Les tissus sont ensuite lyophilisés et broyés à l'aide d'un mixeur de cuisine. Ces échantillons sont stockés dans des flacons en polypropylène à l'abri de la lumière et analysés dans les quinze jours suivants.

La méthode que nous avons développée pour la détermination des composés organostanniques contenus dans les tissus biologiques (figure II-14) est adaptée de celle de Carlier-Pinasseau et al. (1996).

Les tissus lyophilisés sont préalablement réhumidifiés dans du méthanol par agitation sur table elliptique (TAE) pendant la nuit. Les composés organostanniques sont extraits par une solution d'acide chlorhydrique méthanolique à 0,15 M par agitation TAE.

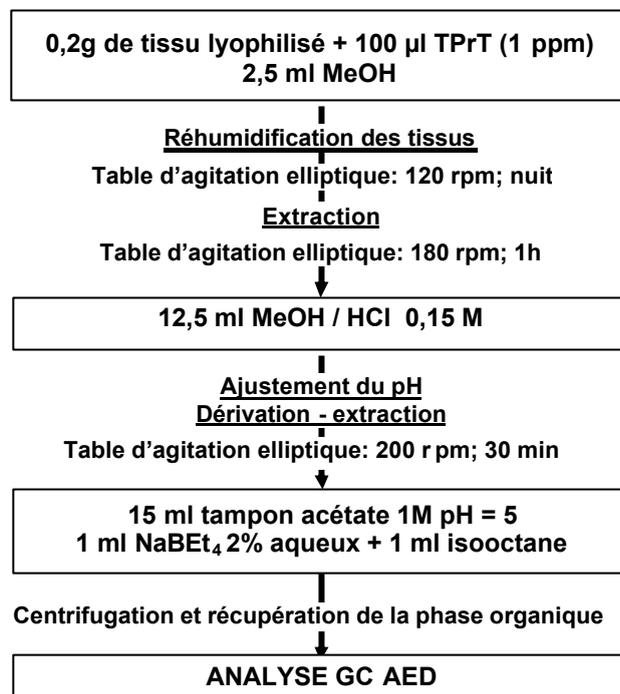
Le réactif de dérivation tétraéthylborate de sodium ( $\text{NaBEt}_4$ ) est préparé juste avant utilisation à 2% (w/v) dans de l'eau Milli-Q. La solution est purifiée par deux extractions successives à l'isooctane afin d'obtenir de plus faibles valeurs dans les blancs (Tao et al., 1999; Michel et al., 1991).

Les conditions optimales de l'éthylation se situant autour de pH 5, l'ajout de 15 ml de tampon acétate pH 5 amène le pH de la solution à 5,3 – 5,4. Plusieurs auteurs ont montré que les rendements d'éthylation par le  $\text{NaBEt}_4$  les plus élevés sont obtenus pour un pH de 5,3 (Moens et al., 1997; Cardellicchio et al., 2001).

Après l'ajout de la solution de dérivation et de l'isooctane, les composés organostanniques sont simultanément dérivés et extraits dans la phase organique par agitation sur TAE. Après centrifugation, la phase organique est directement injectée en GC-AED. Aucune purification de l'extrait avant l'injection en GC-AED n'est nécessaire, en raison de l'importante sélectivité du détecteur MIP-AED vis-à-vis du carbone mais aussi de l'élimination du dépôt de carbone, provenant de la combustion des molécules contenues dans l'extrait, par la présence d'oxygène dans le plasma.

La quantification est basée sur la méthode de l'étalonnage interne par le TPrT.

La figure II-15 représente les chromatogrammes superposés obtenus pour la raie d'émission de l'étain à 326 nm et pour celle du carbone à 264 nm. Des interférences du carbone sur le signal de l'étain apparaissent pour des temps de rétention compris entre 9 et 14 min, perturbant légèrement le signal du DPT.



**Figure II-14: Protocole d'extraction des composés organostanniques dans les tissus biologiques.**

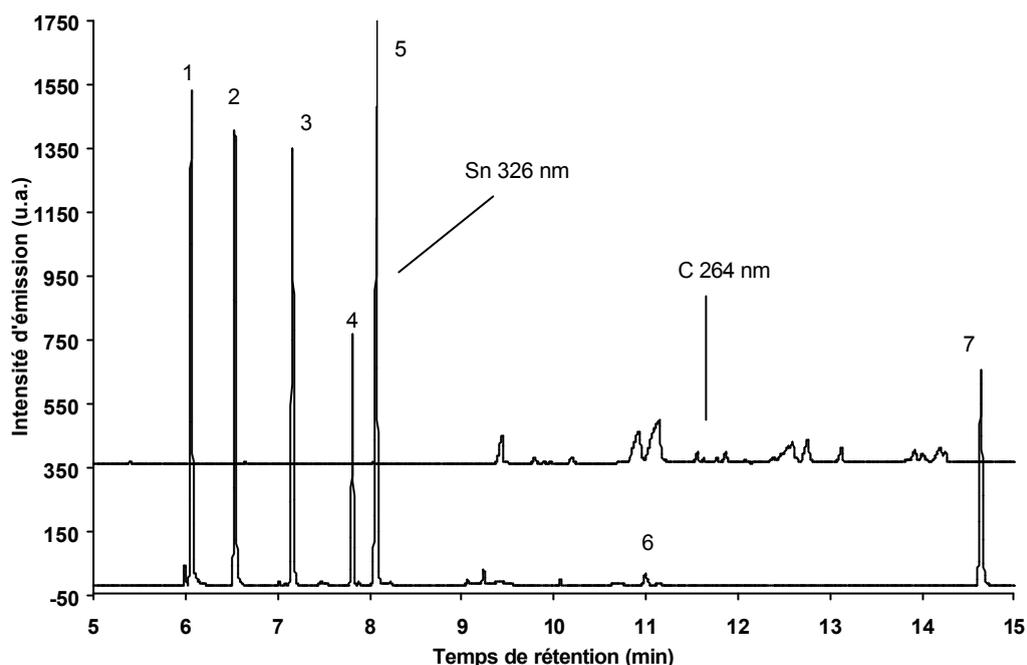


Figure II-15: Extrait d'un chromatogramme du tissu de moule certifié CRM 477; 1, MBT; 2, TPrT; 3, DBT; 4, MPT; 5, TBT; 6, DPT; 7, TPT.

L'étape d'extraction par agitation sur TAE a été comparée à une extraction par sonication (1 heure) (technique utilisée par Carlier-Pinasseau et al., 1996). Des tests comparatifs entre ces deux techniques ont été menés à la fois sur le tissu certifié de moules (CRM 477; BCR, Bruxelles) et sur des tissus de moules à très faibles teneurs en butylétains provenant du Moulleau (Bassin d'Arcachon) (figure II-16 et tableau II-6). Ces deux étapes présentent la même efficacité d'extraction en ce qui concerne le CRM 477. Pour des matrices faiblement contaminées en butylétains, l'extraction du DBT semble étonnamment plus efficace par agitation sur TAE.

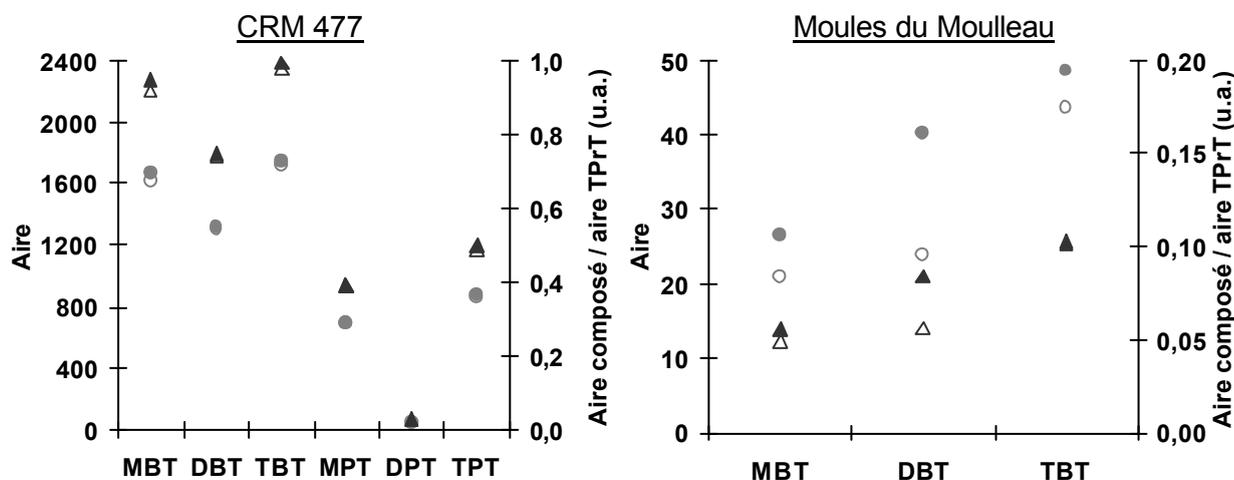


Figure II-16: aires des pics des composés organostanniques (●○) et aires normalisées par le standard interne (▲△) obtenues après extraction par TAE (●▲) et par sonication (○△) sur le CRM 477 et sur des tissus de moules du Moulleau.

Composé	CRM 477 en µg/g (n = 2)			Moulléau en ng/g (n = 3)	
	TAE	Sonication	Val. certifiées	TAE	Sonication
MBT	0,97 ± 0,02	0,89 ± 0,07	1,01 ± 0,18	2,4 ± 0,8	1,2 ± 0,1
DBT	0,76 ± 0,03	0,77 ± 0,02	0,78 ± 0,06	18,4 ± 1,4	12,5 ± 0,8
TBT	1,01 ± 0,04	1,01 ± 0,03	0,90 ± 0,08	26,0 ± 1,2	27,8 ± 0,9
MPT	0,40 ± 0,03	0,41 ± 0,04			
DPT	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00			
TPT	0,51 ± 0,02	0,51 ± 0,04	(0,50)		

**Tableau II-6: Concentrations obtenues après extraction par TAE et par sonication sur le CRM 477 et sur des tissus de moules du Bassin d'Arcachon.**

Ce protocole d'extraction a été validé par l'analyse de deux échantillons certifiés: le tissu de poisson NIES 11 provenant du "National Institute of Environmental Studies of Japan" (Tsukuba, Japon), certifié uniquement pour la teneur en TBT (valeur indicative pour le TPT), et le tissu de moule CRM 477 (La Spezia, Italie) provenant du Bureau Communautaire de Référence (BCR, désormais programme Normes, Mesures et Essais, "Standard, Measurement and Testing", en anglais) et certifié pour les teneurs en butylétains (valeur indicative pour le TPT). Les résultats obtenus sur ces échantillons sont présentés dans le tableau II-7. Un bon accord avec les valeurs certifiées en butylétains est obtenu et les concentrations en TPT déterminées dans les deux échantillons certifiés sont proches des valeurs indicatives. La répétabilité du protocole opératoire a été évaluée sur les deux tissus certifiés. Les résultats obtenus sur cinq échantillons sont représentés dans le tableau II-7. Les incertitudes obtenues sur le CRM 477 sont satisfaisantes pour l'ensemble des composés puisqu'elles sont inférieures à 10%, à l'exception du DPT. Les incertitudes obtenues sur le NIES 11 sont plus élevées en raison des faibles concentrations en composés organostanniques dans ce tissu, et particulièrement pour le MPT.

	CRM 477 [Sn] µg/g poids sec			NIES 11 [Sn] ng/g poids sec		
	[Sn]	RSD	Val. certifiées	[Sn]	RSD	Val. certifiées
MBT	0,97 ± 0,04	3,8 %	1,01 ± 0,18	47 ± 5	10,6 %	
DBT	0,77 ± 0,03	4,0 %	0,78 ± 0,06	59 ± 3	5,1 %	
TBT	1,03 ± 0,04	3,8 %	0,90 ± 0,08	437 ± 16	3,7 %	470 ± 37
MPT	0,43 ± 0,04	9,6 %		225 ± 64	28,4 %	
DPT	0,04 ± 0,01	16,3 %		143 ± 13	9,1 %	
TPT	0,57 ± 0,04	6,5 %	(0,50)	1840 ± 38	2,1 %	(1940)

**Tableau II-7: Répétabilité obtenue sur les échantillons certifiés CRM 477 et NIES 11 (n=5).**

Les CRM 477 analysés tous les mois pendant une année, parallèlement aux échantillons environnementaux, ont été utilisés pour évaluer la reproductibilité du protocole (tableau I-8).

Elle se situe autour de 5 – 7 % pour les composés butylés et de 10 – 16 % pour les composés phénylés. La limite de détection de cette procédure (calculée comme  $3 \times \sigma$  et normalisée à 0,2 g de tissu sec) se situe autour de  $1 \text{ ng.g}^{-1}$  (Sn) pour l'ensemble des composés (1  $\mu\text{l}$  injecté).

CRM 477	Concentrations	Incertitudes	Valeurs certifiées
[Sn] $\mu\text{g/g}$ poids sec			
MBT	$0,97 \pm 0,06$	6,5 %	$1,01 \pm 0,18$
DBT	$0,78 \pm 0,04$	5,2 %	$0,78 \pm 0,06$
TBT	$0,98 \pm 0,06$	6,5 %	$0,90 \pm 0,08$
MPT	$0,42 \pm 0,04$	9,8 %	
DPT	$0,04 \pm 0,01$	13,6 %	
TPT	$0,61 \pm 0,10$	15,8 %	(0,50)

**Tableau II-8: Reproductibilité obtenue sur l'échantillon certifié CRM 477; résultats obtenus sur 12 échantillons.**

La méthode des ajouts dosés a été utilisée pour évaluer les rendements d'extraction de chaque composé pour ce protocole. Trois déterminations indépendantes ont été réalisées sur des extractions différentes et chacune est obtenue par 3 niveaux d'ajouts dosés (tableau II-9).

composé	ajouté (ng)	trouvé (ng)	RSD (%)	rendement (%)
MBT	0	$12,9 \pm 1,0$	7,7	-
	20	$28,5 \pm 0,6$	2,2	77,8
	40	$42,0 \pm 1,5$	3,6	72,7
	80	$68,0 \pm 2,7$	4,0	68,9
DBT	0	$8,5 \pm 0,7$	7,9	-
	20	$25,5 \pm 1,1$	4,2	85,0
	40	$39,6 \pm 1,8$	4,6	77,8
	80	$67,3 \pm 3,6$	5,4	73,5
TBT	0	$19,7 \pm 0,9$	4,4	-
	20	$41,5 \pm 2,0$	4,8	109,1
	40	$59,6 \pm 2,6$	4,3	99,9
	80	$100,5 \pm 5,3$	5,3	101,0
MPT	0	-	-	-
	20	$7,5 \pm 0,2$	2,1	37,5
	40	$10,3 \pm 0,4$	3,5	35,8
	80	$24,0 \pm 1,1$	4,8	33,8
DPT	0	-	-	-
	20	$23,0 \pm 3,0$	12,9	114,9
	40	$41,5 \pm 2,4$	5,8	103,7
	80	$86,7 \pm 7,1$	8,1	108,4
TPT	0	-	-	-
	20	$22,2 \pm 3,9$	17,6	111,1
	40	$44,4 \pm 1,5$	3,4	111,1
	80	$91,4 \pm 4,4$	4,9	114,3

**Tableau II-9: Résultats des tests d'ajouts dosés sur des tissus de moules collectées dans le Bassin d'Arcachon.**

Les rendements trouvés pour les composés di-et trisubstitués sont supérieures à 85%, celui du MBT est plus faible mais acceptable (70%), alors que le MPT n'est pas récupéré quantitativement (de l'ordre de 40%). Dans la suite de l'étude, il faut mentionner que les concentrations trouvées dans les échantillons environnementaux ne sont pas corrigées par les rendements de récupération.

### 1.3.2. Les sédiments

Les échantillons de sédiments collectés sur le terrain avec une louche en Téflon adaptée sur un manche télescopique sont lyophilisés, homogénéisés et tamisés à 200 µm. Ces échantillons sont stockés dans des flacons en polypropylène à l'abri de la lumière et analysés dans les quinze jours suivants.

Le protocole utilisé pour l'extraction des composés organostanniques de sédiments a été adapté à partir de Szpunar (1996b) et Carpinteiro (2001). Le protocole est schématisé à la figure II-17.

Les sédiments sont extraits par sonication pendant 30 min dans de l'acide acétique glacial et immédiatement centrifugés. Le surnageant est transféré dans un flacon à l'aide d'une pipette Pasteur. Le pH de la solution est ajusté à 5 avec une solution d'ammoniac 32% et tamponné avec un tampon acétate pH 5. La solution est laissée au repos pendant 10 min avant l'ajout du réactif de dérivation  $\text{NaBEt}_4$  (2% aqueux) et de l'isooctane. Les composés éthylés sont extraits dans l'isooctane après 5 min d'agitation manuelle et la phase organique est directement injectée en GC-AED.

La quantification est basée sur la méthode de l'étalonnage interne par le TPrT.

L'optimisation du protocole a été effectuée sur l'étape d'extraction des composés organostanniques de la matrice sédimentaire par sonication, et particulièrement sur le temps de sonication, à partir d'un sédiment fluvial certifié en espèces butylées et phénylées de l'étain, le BCR 646 (Bureau Communautaire de Référence, Bruxelles) (figure II-18). Pour une durée de sonication de 30 min, les concentrations trouvées dans le BCR 646 sont en parfait accord avec les concentrations certifiées, à l'exception des composés monosubstitués MBT

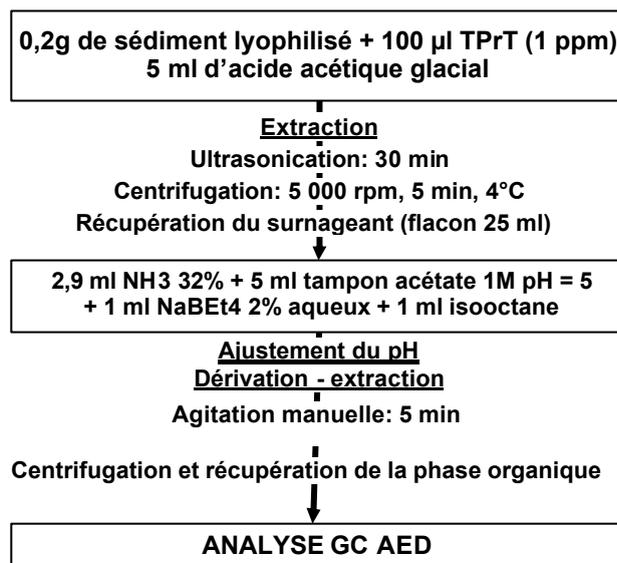


Figure II-17: Protocole d'extraction des composés organostanniques dans les sédiments.

et MPT qui ne sont pas extraits quantitativement. En utilisant le même protocole d'extraction, Carpinteiro et al (2001) n'obtiennent pas non plus des rendements d'extraction quantitatifs pour les composés monoalkylés. Ces derniers peuvent être améliorés en augmentant la durée de sonication, mais l'augmentation de température induite par la sonication entraîne une dégradation du TPT en DPT, MPT, puis en étain inorganique. Après 1h de sonication, Carpinteiro et al (2001) ont montré que le taux de récupération du TPT chutait à 60%, alors qu'il est encore de 90% après 30 min de sonication. Dans ces conditions, nous avons conservé une durée de sonication de 30 min nous permettant d'obtenir des concentrations en accord avec les concentrations certifiées pour les composés di- et trisubstitués, même si les rendements d'extraction du MBT et du MPT sont très faibles.

Le protocole d'extraction des composés organostanniques des sédiments a été validé à partir de deux échantillons certifiés: un sédiment marin PACS-2 (port de Esquimalt, B.C., Canada) provenant du *National Research Council of Canada* (NRCC) et certifié pour les composés butylétains et un sédiment fluvial BCR 646 (Canal de la Mer du Nord, Pays-Bas) provenant du Bureau Communautaire de Référence et certifié à la fois pour les butylétains et les phénylétains. Comme le montre le tableau II-10, une bonne corrélation entre les concentrations déterminées et les concentrations certifiées du CRM PACS-2 est obtenue pour les composés butylés. Les concentrations trouvées dans le BCR 646 sont en parfait accord avec les concentrations certifiées, à l'exception des composés monoalkylés MBT et MPT qui ne sont pas extraits quantitativement.

Les limites de détection sont de l'ordre de 1 ng/g (Sn) de poids sec pour chacun des composés (1 µl injecté).

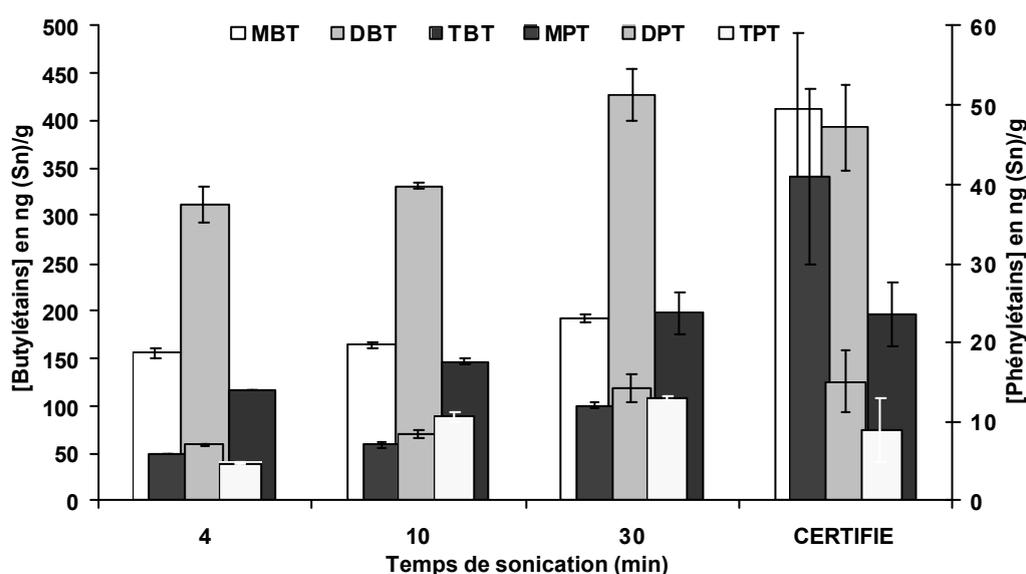


Figure II-18: Concentrations en composés butylés et phénylés trouvées dans le sédiment certifié BCR 646 en fonction du temps de sonication.

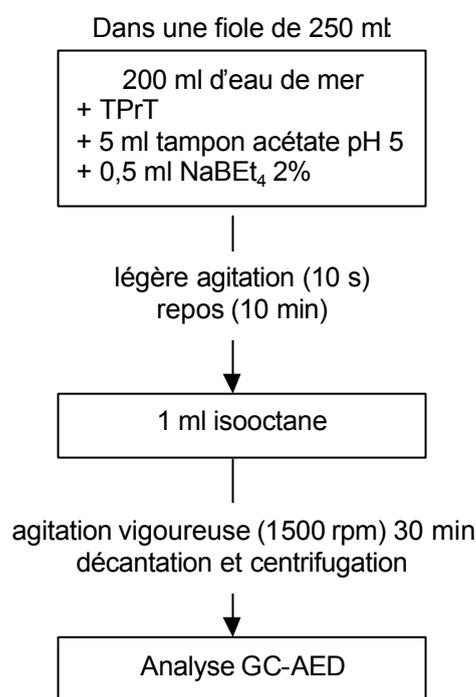
	BCR 646 [Sn] ng/g poids sec			PACS 2 [Sn] µg/g poids sec		
	[Sn]	RSD	Val. certifiées	[Sn]	RSD	Val. certifiées
MBT	184,3 ± 22,3	12,1 %	412 ± 81	0,47 ± 0,04	9,4 %	0,45 ± 0,05
DBT	426,3 ± 9,6	2,2 %	393 ± 46	1,05 ± 0,05	4,4 %	1,09 ± 0,15
TBT	196,1 ± 15,1	7,7 %	196 ± 33	0,89 ± 0,07	7,8 %	0,98 ± 0,13
MPT	9,7 ± 1,6	16,6 %	41 ± 11	0,005 ± 0,001	16,4 %	
DPT	14,0 ± 1,4	9,7 %	15 ± 4	0,003 ± 0,001	24,4 %	
TPT	13,1 ± 1,6	10,6 %	9 ± 4	0,008 ± 0,001	15,8 %	

**Tableau II-10: Répétabilité obtenue sur les échantillons certifiés BCR 646 et PACS 2; résultats obtenus sur 6 échantillons.**

### 1.3.3. Les eaux

Les échantillons d'eau de mer sont prélevés dans des bouteilles en Nalgène de 1 litre, 50 cm sous la surface de l'eau. Ils sont conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$  sans acidification ni filtration et analysés le jour même ou le lendemain de la collecte.

Le protocole que nous avons adapté (figure II-19) est celui de Michel et Averty (1991). 200 ml d'échantillon d'eau spiké avec le standard interne TPrT sont introduits dans une fiole de 250 ml. 5 ml de tampon acétate (pH 5) et 0,5 ml de  $\text{NaBEt}_4$  (2%) sont ajoutés et la solution est homogénéisée par agitation magnétique (10 s) et laissée au repos pendant 10 min. Les composés organostanniques sont simultanément éthylés et extraits dans 1 ml d'isooctane par agitation magnétique avec un barreau aimanté en Téflon pendant 30 min. De l'eau Milli-Q est ajoutée pour faire monter la phase organique dans le col de la fiole. Après décantation, la phase organique et 1 ml de phase aqueuse sous-jacente sont récupérées et centrifugées (10 000 rpm, 5 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ). La phase organique est directement injectée en GC-AED (2,5 µl pour les échantillons d'eau naturels).



**Figure II-19: Protocole d'extraction des composés organostanniques des échantillons d'eau de mer.**

Le réactif de dérivation  $\text{NaBEt}_4$  est préparé juste avant utilisation à 2% (w/v) dans de l'eau Milli-Q. La solution est purifiée par deux extractions successives à l'isooctane afin d'obtenir de plus faibles valeurs dans les blancs (Tao et al., 1999; Michel et al., 1991).

La quantification est basée sur la méthode de l'étalonnage interne par le TPrT.

Les limites de détection de ce protocole sont de  $0,3 \text{ ng.L}^{-1}$  (Sn) pour l'ensemble des composés organostanniques, à l'exception du MBT qui présente une limite de détection deux fois plus élevée ( $0,6 \text{ ng.L}^{-1}$ ), certainement en raison de sa présence dans les blancs d'échantillons.

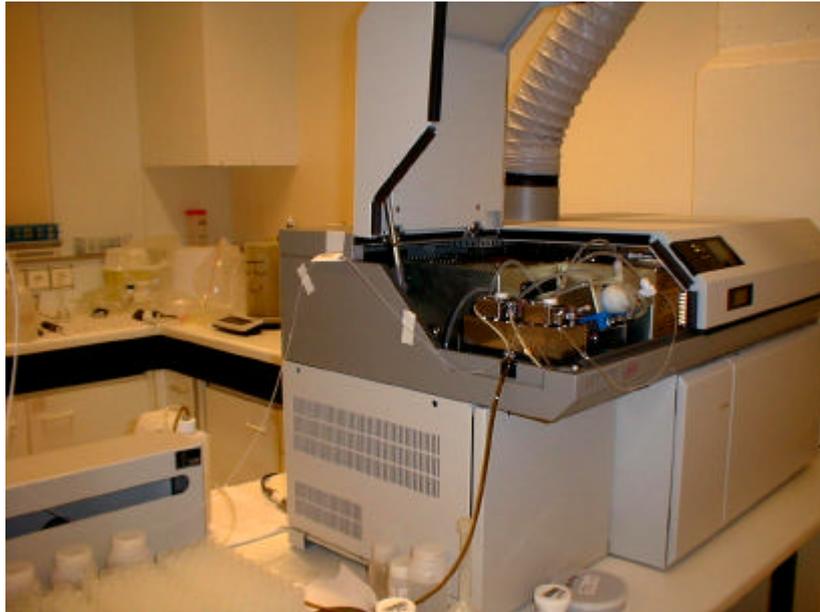
## **2. Analyse des métaux par ICP-MS**

### **2.1. Présentation générale**

L'ICP-MS est une technique de spectrométrie de masse qui utilise en tant que source d'ions un plasma à couplage inductif. Une interface permet de raccorder la source (à pression atmosphérique) et le spectromètre (sous un vide de  $10^{-6}$  torr).

La source ICP s'utilise dans la spectrométrie de masse atomique et isotopique pour la quantification des éléments traces dans des matrices biologiques, géologiques, alimentaires et industrielles. Cette technique présente le double avantage de pouvoir analyser plusieurs éléments simultanément et d'être extrêmement sensible, la limite de détection atteignant le  $\text{ng.L}^{-1}$ , et de posséder de plus une très large gamme dynamique. Le principal intérêt de cette technique réside dans l'important débit d'analyse en simultané. Elle permet de plus la détermination des rapports isotopiques et l'utilisation de la méthode d'étalonnage par dilution isotopique.

L'appareil que nous avons utilisé est un HP 4500 Series (Agilent Technologies, Willmington, DE, USA) (figure II-20). L'appareil est placé dans une salle sous atmosphère contrôlée, ce qui permet d'envisager la détection d'ultra-traces sans risque de contamination extérieure.



**Figure II-20: Présentation de l'ICP-MS HP 4500.**

## **2.2. Principe de l'ICP-MS**

Le principe de base de l' ICP-MS (figure II-21) peut être résumé comme suit:

L'échantillon à analyser est dispersé dans un courant de gaz qui le vaporise en gouttelettes. Ce courant gazeux est injecté au cœur d'un plasma d'argon à très haute température, amorcé grâce à un apport d'énergie par un générateur hautes fréquences. L'échantillon y subit par transfert d'énergie, une dissociation, une atomisation, puis une ionisation. L'interface joue un rôle primordial puisqu'elle permet d'extraire une portion du plasma et assure le passage des ions qui sont formés d'une zone à haute température et à pression atmosphérique vers le filtre de masse à température ambiante où règne un vide poussé. Enfin, un système de lentilles électrostatiques permet d'extraire les ions positifs et les focalise vers le filtre de masse quadripolaire. Ce dernier est constitué de quatre barreaux cylindriques parallèles et soumis à la somme d'un potentiel continu et d'un potentiel alternatif. Pour une valeur donnée du rapport de ces potentiels, seuls les ions possédant un rapport masse sur charge particulier auront une trajectoire stable à l'intérieur du quadripôle et iront frapper le détecteur, constitué par un multiplicateur d'électrons.

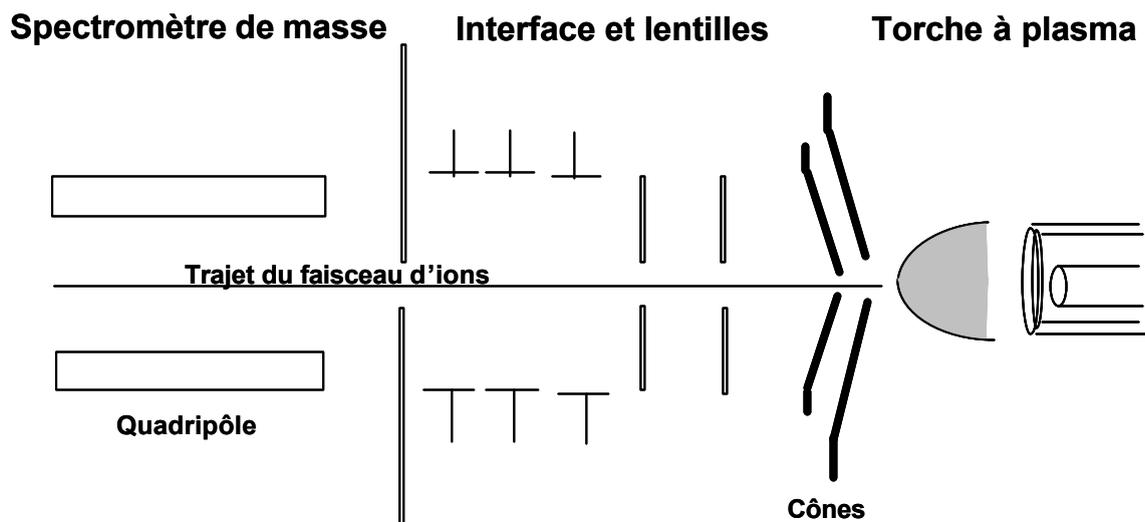


Figure II-21: Schéma général d'un ICP-MS.

### 2.2.1. La source d'émission

#### *Plasma ICP*

Dans l'excitation ICP, une bobine d'induction branchée à un générateur radiofréquence induit un fort champ magnétique. Le plasma est amorcé en exposant un gaz plasmagène, l'argon, à cette décharge Tesla. Il permet l'ionisation des éléments constitutifs de l'échantillon qui sont ensuite séparés selon leur rapport masse/charge ( $m/z$ ). Pour la majeure partie des éléments, le degré d'ionisation est pratiquement de 100% et le taux de seconde ionisation négligeable.



#### *Introduction de l'échantillon*

A l'aide d'un passeur automatique et via une pompe péristaltique, les échantillons sont introduits dans le nébuliseur (figure II-22). La grande vitesse du gaz nébuliseur (l'argon), émergeant d'un petit orifice, pulvérise l'échantillon en gouttelettes qui sont triées en fonction de leur taille dans la chambre de nébulisation. Ainsi, seules les plus petites ( $2-5 \mu\text{m}$ ) atteignent éventuellement le plasma (1-3 % de l'échantillon nébulisé), le reste de l'échantillon étant évacué.

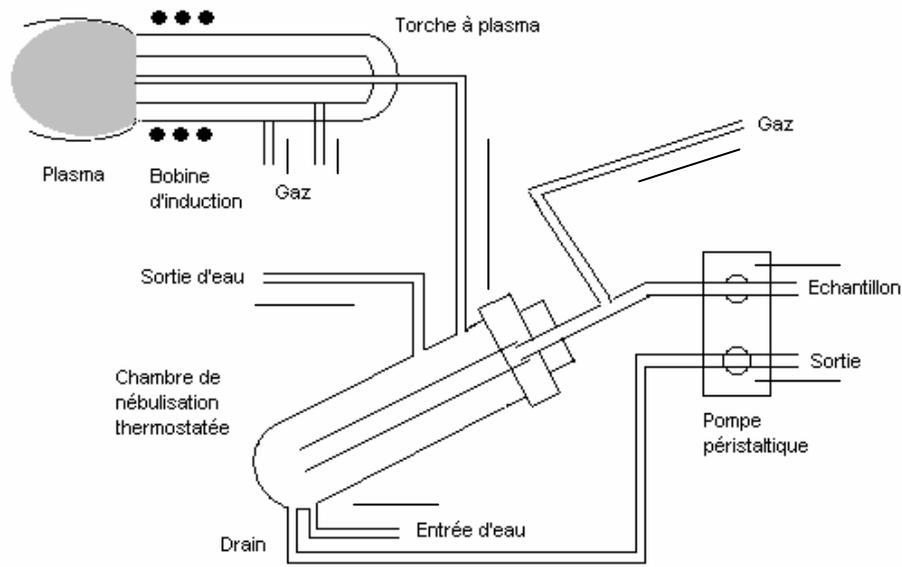


Figure II-22: Introduction de l'échantillon dans la torche à plasma.

### **Torche (quartz) de type Fassel**

Elle est constituée de trois tubes concentriques, parcourus par un courant d'argon ayant un rôle différent:

- \* le tube extérieur ou "plasmagène" qui entretient le plasma et refroidit les parois de la torche pour éviter la fusion. Il est ceinturé par une bobine d'induction à trois spires alimentées par le générateur haute fréquence. Le champ magnétique confine les ions et les électrons sur un parcours annulaire (débit d'argon :  $15 \text{ l.min}^{-1}$ ).

- \* le tube intermédiaire ou "auxiliaire", alimenté par un second flux d'argon ( $1 \text{ l.min}^{-1}$ ) non ionisé qui maintient le plasma, de plus en plus conducteur par effet Joule, isolé des parois.

- \* le tube central ou "injecteur" (2,5 mm de diamètre) qui introduit le mélange constitué d'argon et d'échantillon au cœur du plasma sous forme d'un aérosol.

### **Interface**

Elle représente la partie cruciale de l'appareil en raison des différences de température et de pression entre la source (à  $10\,000 \text{ K}$  et à pression atmosphérique) et le spectromètre (à température ambiante et à pression réduite:  $10^{-6}$  torr). Elle est constituée de deux cônes en nickel percés en leur centre. Le premier cône (1 mm de diamètre), dit "échantillonneur", est directement en contact avec le plasma. A cause des différences de pression entre l'ICP et le premier niveau de pompage du spectromètre (pression voisine de 2 mbars), les ions sont aspirés à travers l'interface et accélérés à des vitesses supersoniques. Le second cône (0,7

mm de diamètre), dit “écrêteur” ou “écorceur”, prélève le centre de ce jet supersonique, ce qui représente environ 1 % des ions formés au sein du plasma.

## 2.2.2. Le détecteur

### *Optique ionique*

A la sortie du second cône, le faisceau d’ions peut diverger fortement. Les ions sont refocalisés à travers des chambres de vide par des séries de lentilles électrostatiques portées à des potentiels négatifs, afin que le jet soit dans l’axe du filtre quadripolaire. Les photons et les électrons émis par le plasma, bien qu’en faible proportion, sont capables de gêner la détection. Ils sont donc séparés des ions grâce à un système de lentilles à axe déporté (figure II-23). Les lentilles Omega dévient puis redressent le faisceau d’ions. Les photons ne sont pas déviés et terminent leur course dans la lentille de polarisation arrière. Cet ensemble optique est plus performant que l’ancien système utilisant un pare-photons puisqu’il permet d’éliminer virtuellement les effets de discrimination de masse.

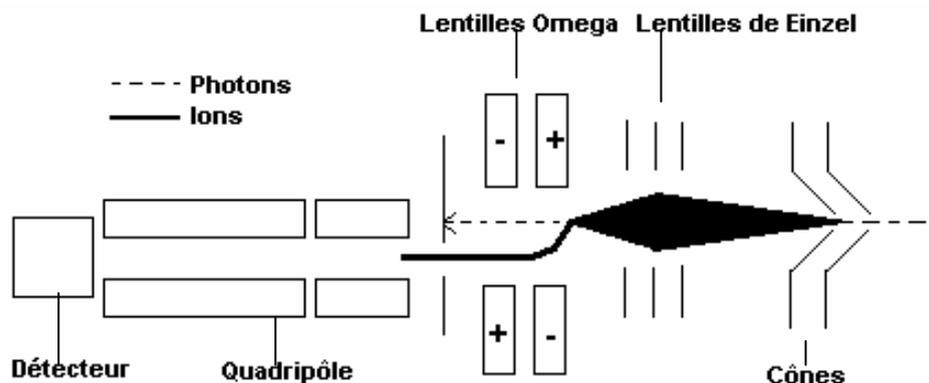


Figure II-23: Optique ionique: système à axe déporté.

### *Spectromètre de masse*

Il s’agit d’un filtre quadripolaire constitué de quatre barreaux de molybdène. Les barreaux opposés sont au même potentiel composé d’une tension continue  $U$  et d’une tension alternative  $V$ . Les ions à séparer sont introduits le long de l’axe à une des extrémités du quadripôle à des vitesses définies par leur énergie et leur masse. Si les tensions  $U$  et  $V$  sont convenablement choisies, le quadripôle agit comme un filtre de masses, transmettant uniquement les ions d’un seul rapport  $m/z$  particulier à la fois. Ainsi, il doit être scanné très

rapidement entre 5 et 255 m/z afin de produire un spectre de masse. Le rapport U/V constant correspond à une résolution d'une u.m.a.

### **Détection**

La détection utilise un multiplicateur d'électrons (EM) à dynode discrète. Quand un ion pénètre l'EM, il heurte la première dynode et arrache une gerbe d'électrons. Ces ions sont accélérés par la différence de potentiel qui existe entre la première et la deuxième dynode, et en frappant celle-ci, chacun arrache à son tour une gerbe d'électrons. De dynode en dynode, une impulsion est finalement engendrée et détectée au collecteur. Le détecteur, grâce à cet effet de cascade, va permettre une amplification du signal d'un facteur  $10^6$  à  $10^8$ .

### **2.2.3. Problèmes liés aux interférences**

L'analyse par ICP-MS pose quelques problèmes liés principalement aux interférences spectroscopiques qui peuvent se produire à cause de l'incapacité du quadripôle à séparer deux ions ayant le même rapport m/z. Elles peuvent être isobariques, c'est-à-dire causées par la présence de deux éléments possédant des isotopes de même masse ou polyatomiques, résultant de la recombinaison à la sortie du plasma de plusieurs espèces atomiques qui peuvent alors présenter la même masse que l'analyte. Les interférences isobariques peuvent être éliminées en choisissant un autre isotope pour l'analyse ou en recourant à des équations de correction d'interférences par élément. Ces équations utilisent les rapports isotopiques naturels de la plupart des éléments pour estimer et tenir compte de la soustraction d'interférences isobariques.

## **2.3. Les conditions d'analyse**

Les conditions analytiques utilisées pour la détermination des métaux traces dans les tissus de moules par ICP-MS sont résumées dans le tableau II-11. Le tableau II-12 rassemble les éléments mesurés et les masses suivies.

La quantification est réalisée par calibration externe avec étalonnage interne (Rh 103) à l'aide d'une solution multi-élémentaire à  $1\text{g.L}^{-1}$ . La gamme d'étalonnage est réalisée à chaque série d'analyse d'échantillons.

Il n'a pas été nécessaire d'effectuer de correction d'interférences sur l'arsenic ( $^{75}\text{As}$ ) due à la formation d'ions polyatomiques  $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$ , puisque aucun solvant chloré n'a été utilisé dans le protocole de préparation des échantillons (uniquement  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  et de l'eau Milli-

Q). Cette absence d'interférences sur l'arsenic est confirmée par les concentrations obtenues sur l'échantillon certifié, en adéquation avec les valeurs certifiées (tableau II-14). Il existe également des interférences des oxydes d'argon ( $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$ ) sur le fer ( $^{56}\text{Fe}$ ). Celles-ci jouent sur la limite de détection de cet élément qui s'en trouve plus élevée mais qui ne gênent en rien les analyses en raison des concentrations très élevées en fer (environ 100 ppm) retrouvées dans les tissus de moules. Aucune correction spécifique n'a donc été utilisée pour les interférences d'ions polyatomiques. Par contre, les interférences isotopiques ont été corrigées par le logiciel ICP-MS utilisant les équations de correction suivantes:

Vanadium (V):  $(51C) - 3,1081 (53C) + 0,3524 (52C)$  avec (NC), où C est l'intensité du  
 Sélénium (Se):  $(78C) - 0,1869 (76C)$  signal enregistré à  $m/z = N$ .  
 Plomb (Pb):  $(208C) + (207C) + (206C)$

Conditions instrumentales	
Puissance Rf	1250 W
Débit du gaz plasmagène	15 l.min <sup>-1</sup>
Débit du gaz nébuliseur	0,98 l.min <sup>-1</sup>
Débit du gaz auxiliaire	0,8 l.min <sup>-1</sup>
Nébuliseur	cross flow
Débit d'échantillon	1 ml/min
Mode d'acquisition	peak hop
Dwell-time	200 ms
Nombre de réplicats	5
Points par pic	3

Tableau II-11: Synthèse des conditions analytiques ICP-MS.

Elément	m/z	Elément	m/z	Elément	m/z	Elément	m/z
Li	7	Mn	55	Se	78	Ba	137
B	11	Fe	57	Rb	85	La	139
Na	23	Co	59	Sr	88	Ce	140
Mg	24	Ni	60	Mo	95	Hg	202
Al	27	Cu	65	Rh	103	Tl	205
K	39	Zn	66	Ag	109	Pb	208
Ca	44	Ga	69	Cd	112	Bi	209
V	51	Ge	72	In	115	Th	232
Cr	53	As	75	Sn	118	U	238

Tableau II-12: Eléments déterminés et masses suivies dans cette étude.

## 2.4. Protocole d'extraction des tissus biologiques

Les tissus entiers de 5 moules sont congelés, puis lyophilisés. Les tissus sont ensuite homogénéisés à l'aide d'un mixeur de cuisine. Les échantillons sont stockés dans des flacons en polypropylène et conservés dans un endroit sec à l'abri de la lumière jusqu'à l'analyse.

Le protocole d'extraction des tissus biologiques utilisé dans cette étude est celui mis en place au laboratoire par Augagneur (1998 et 1999). 0,25 g de tissus lyophilisés sont introduit dans un matra en verre borosilicaté. L'extraction est réalisée par digestion assistée sous champ micro-ondes (Microdigest A301, PROLABO) selon le protocole décrit ci-dessous (tableau II-13). Les digestats sont repris dans 25 ml avec de l'eau Milli-Q. Les échantillons non dilués sont ensuite analysés par ICP-MS, excepté pour la détermination du sodium (Na) et du magnésium (Mg) où ils ont été dilués 10 et 100 fois.

	Etape 1	Etape 2
Réactifs	HNO <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Volume (ml)	8	1
Puissance (W)	30	30
Temps (min)	5	5

Tableau II-13: Protocole d'extraction des tissus biologiques sous champ micro-ondes.

Le protocole est régulièrement validé par l'analyse d'un tissu de moules certifié, le SRM 2976 (*Standard Reference Material*; tissu de moules *Mytilus galloprovincialis* collectées dans l'Etang de Thau, France), et fourni par le NIST (*National Institute of Standards and Technology*, Gaithersburg, MD, USA). La répétabilité du protocole a été évaluée sur les échantillons certifiés SRM 2976 analysés parallèlement aux échantillons environnementaux (tableau II-14). Les concentrations obtenues sont en accord avec les valeurs certifiées, à l'exception de celles enregistrées pour l'étain (Sn), le mercure (Hg), le cérium (Ce) et le thallium (Th), probablement en raison de leurs très faibles teneurs dans l'échantillon certifié. Il aurait été intéressant de comparer les concentrations en composés organostanniques avec la concentration totale en étain dans les échantillons environnementaux, mais au vu des résultats obtenus sur l'échantillon certifié, les concentrations en étain total ne seront pas présentées. Néanmoins, les métaux sur lesquels nous avons porté une attention particulière, le chrome (Cr), le cadmium (Cd), le nickel (Ni), le cuivre (Cu), le plomb (Pb), le sélénium

(Se), l'arsenic (As) et le zinc (Zn), présentent des concentrations en accord avec les valeurs certifiées et une excellente reproductibilité.

SRM 2976 (µg/g p.s.) (n = 7)							
	Val. Obtenues	RSD (%)	Val. Certifiées		Val. Obtenues	RSD (%)	Val. Certifiées
B	53,4 ± 7,8	15		As	15 ± 3	20	13,3
Na	36229 ± 4728	13	35000	Se	2,1 ± 0,5	26	1,8
Mg	7053 ± 556	8	5300	Rb	5,8 ± 1,2	20	4,14
Al	154 ± 21	14	134	Sr	91 ± 14	16	93
K	13896 ± 666	5	9700	Mo	2,1 ± 0,9	42	
Ca	6405 ± 852	13	7600	Cd	1,0 ± 0,3	34	0,82
Cr	0,9 ± 0,1	13	0,5	Sn	1,8 ± 1,4	80	0,096
Mn	46 ± 8	17	33	Ba	0,8 ± 0,4	51	
Fe	245 ± 19	8	171	La	0,8 ± 0,6	73	
Co	0,8 ± 0,3	30	0,61	Ce	0,3 ± 0,2	88	0,109
Ni	1,0 ± 0,4	42	0,93	Hg	0,9 ± 0,8	88	0,061
Cu	3,9 ± 0,4	11	4,02	Pb	1,2 ± 0,3	25	1,19
Zn	133 ± 13	10	137	Th	1,0 ± 0,6	60	0,01

**Tableau II-14: Répétabilité obtenue sur les échantillons certifiés SRM 2976 analysés parallèlement aux échantillons environnementaux (n = 7).**

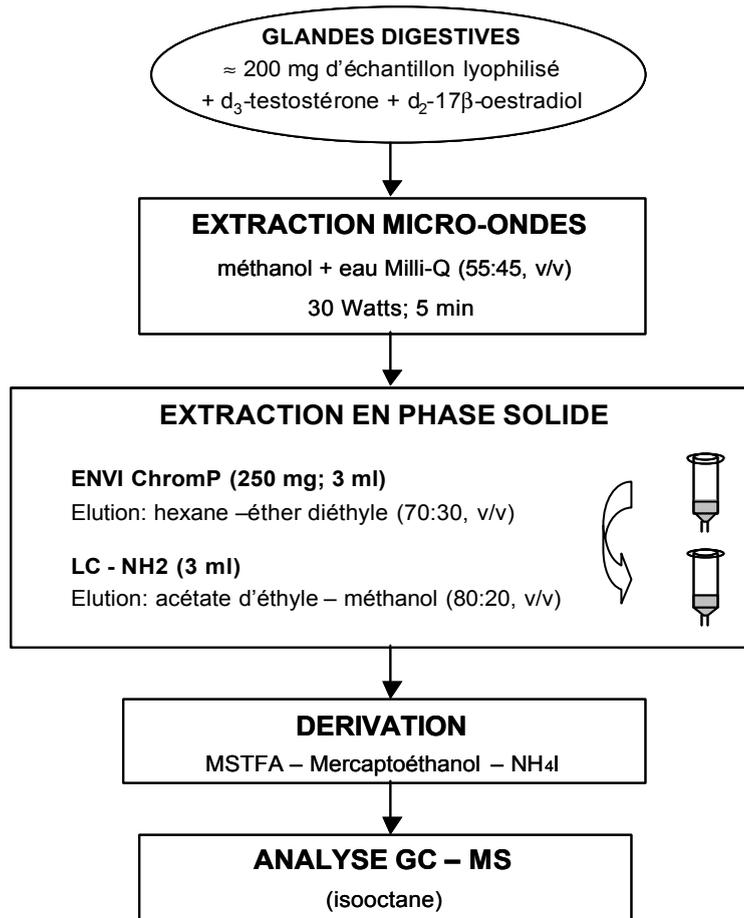
### **3. Autres analyses réalisées dans cette étude**

#### **3.1. Analyse des stéroïdes par GC-MS**

##### **3.1.1. Protocole d'extraction des stéroïdes**

Le protocole utilisé est celui mis en place au laboratoire par Budzinski et al. (en préparation).

Trois à cinq glandes digestives de moules par sexe sont disséquées et immédiatement congelées à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Les échantillons sont lyophilisés et homogénéisés dans un mortier en agate juste avant analyse. Ils sont ensuite extraits sous champ micro-ondes, de nouveau extraits puis purifiés par extraction en phase solide, dérivés par une solution de MSTFA (*N*-méthyl-*N*-triméthylsilyl-trifluoroacétamine / Mercaptoéthanol /  $\text{NH}_4\text{I}$ ) et enfin analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS; HP 5890 Serie II, MSD 5972, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) (figure II-24).



**Figure II-24: Protocole d'extraction des stéroïdes dans les glandes digestives de moules.**

Un blanc (réactifs et standards internes) ainsi qu'un échantillon de contrôle (blanc spiké avec chacun des stéroïdes recherchés) ont été analysés parallèlement aux échantillons de moules. Aucun stéroïde n'a été détecté dans les blancs. La quantification est réalisée par étalonnage interne, relativement à la testostérone et à l'oestradiol perdeutérés. Les facteurs de réponse des différents stéroïdes sont déterminés par injection d'une solution standard de stéroïdes spikée avec la même solution de standards internes que celle utilisée dans les échantillons. Les limites de quantification dans les tissus de moules ont été estimés à 1 ng/g de poids sec pour la testostérone (T), l'androsténedione (A), la progestérone (Pg) et la prégnénolone (Pn). La reproductibilité du protocole analytique obtenue sur un triplicat est de 15% (T), 2% (A) et 10% (Pg et Pn).

### **3.1.2. Identification des stéroïdes endogènes chez la moule *Mytilus edulis***

Les oestrogènes (oestradiol et oestrone), ainsi que les métabolites déhydrogénés de la testostérone (dihydroandrosténedione, dihydrotestostérone) n'ont pas été détectés dans les glandes digestives de moules par GC-MS. La testostérone et l'androsténedione n'ont pas été

détectés dans tous les échantillons et sont difficilement quantifiables, les niveaux de testostérone étant proches des limites de détection ( $1 \text{ ng.g}^{-1}$  de poids sec) et la détermination de l'androstane-3-one souffrant parfois d'interférences matricielles. Seules la progestérone et la prégnénone ont été facilement quantifiables, de par leurs concentrations dans les tissus de moules mais aussi de par l'excellent rapport signal sur bruit obtenu pour ces stéroïdes.

Un extrait d'un chromatogramme obtenu en mode SIM ("Single Ion Monitoring") sur les glandes digestives de moules femelles est représenté à la figure II-25. Seuls les signaux de la progestérone ( $m/z$  458) et de la prégnénone ( $m/z$  445) y sont représentés.

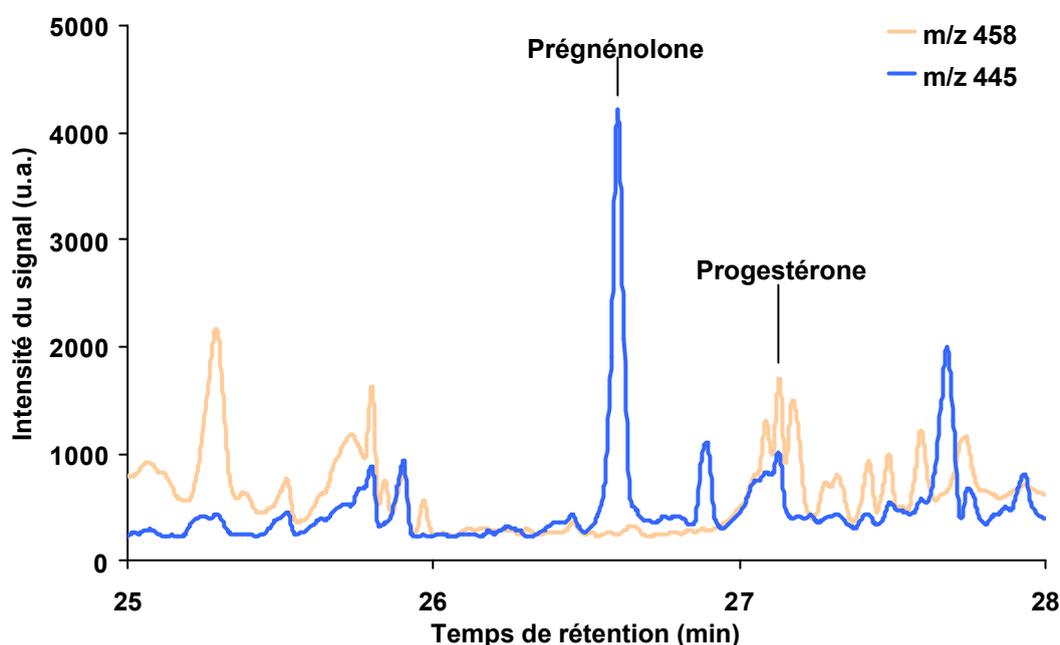


Figure II-25: Extrait d'un chromatogramme en mode SIM d'un extrait de glandes digestives de moules.

### 3.2. Analyse des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) par GC-MS et des polychlorobiphényles (PCB) par GC-ECD

Les analyses des HAP et PCB contenus dans les tissus de moules ont été réalisées au laboratoire par le groupe "Biogéochimie et Analyses organiques". Au moment de la rédaction de ce mémoire, les analyses n'ont pu être réalisées que jusqu'au mois d'Août.

Vingt et un HAP ont été analysés: les 16 HAP indiqués comme polluants prioritaires par l'EPA ("*Environmental Protection Agency*", USA). Les autres composés (le dibenzothiophène, les méthylphénanthrènes et le benzo[e]pyrène) ont été recherchés en raison des informations qu'ils fournissent sur l'identification des sources de contamination de ces composés dans le système aquatique. Le dibenzothiophène et les méthylphénanthrènes sont des HAP caractéristiques d'une pollution pétrolière. Le benzo[e]pyrène a également été analysé puisque de précédents travaux réalisés au laboratoire ont montré que le rapport des concentrations du benzo[e]pyrène sur celles du benzo[a]pyrène (BeP/BaP) pouvait être utilisé comme un indicateur de source des HAP (Baumard, 1997).

La valeur du rapport des concentrations de certains HAP dans les sédiments peut nous renseigner sur leur origine. Ainsi la valeur du rapport fluoranthène sur pyrène permet de déterminer l'origine pyrolytique ( $F/P > 1$ ) ou pétrogénique ( $F/P < 1$ ) d'une contamination par les HAP (Baumard et al., 1997). Un second indice utilisant le rapport du phénanthrène (Phe) sur ses dérivés méthylés (MP) peut également indiquer une origine pétrogénique ( $Phe/MP < 1$ ), caractérisée par la prépondérance des HAP alkylés par rapport à leurs composés parents.

Sept congénères prioritaires de PCB ont également été dosés: les PCB 28, 52, 101, 118, 153, 138 et 180. Le PCB 101 n'a jamais été détecté dans les tissus de moules du Bassin d'Arcachon.

### **3.2.1. Détermination des HAP**

Le protocole utilisé est décrit dans Budzinski et al. (1996). Les tissus lyophilisés sont placés dans un matra et une solution contenant les HAP perdeutérés utilisés comme standards internes de même qu'un antioxydant, le Mercaptoéthanol, sont ajoutés. Les HAP sont extraits dans 40 ml de dichlorométhane sous champ micro-ondes (30 W, 15 min). L'extrait est ensuite filtré sur coton et reconcentré dans un premier temps à l'aide d'un évaporateur rotatif, puis sous flux d'azote. L'extrait est ensuite purifié sur microcolonnes d'alumine et de silice. L'échantillon final est évaporé sous flux d'azote et repris dans de l'isooctane, avant d'être analysé en chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS; HP 5890 Serie II, MSD 5972, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA).

### **3.2.2. Détermination des PCB**

Le protocole utilisé est décrit dans Thompson et Budzinski (1999b). Les tissus lyophilisés sont placés dans un matra et une solution contenant les PCB perdeutérés utilisés comme

standards internes est ajoutée. Les PCB sont extraits dans 40 ml de dichlorométhane sous champ micro-ondes (30 W, 15 min). L'extrait est ensuite filtré sur coton et purifié par plusieurs extractions à l'acide sulfurique 16N. La phase organique est neutralisée par rinçages successifs à l'eau milli-p et séchée ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhydre). L'extrait est ensuite purifié sur microcolonnes de silice. L'échantillon final est évaporé sous flux d'azote et repris dans de l'isooctane, avant d'être analysé en chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à capture d'électrons (GC-ECD; HP 5890 Serie II, ECD, Hewlett-Packard, Avondale, MA, USA).

La quantification est réalisée par étalonnage interne, relativement aux HAP et PCB perdeutérés. Sept HAP perdeutérés ont été utilisés, dont au moins un par classe d'aromaticité. Les facteurs de réponse des différents composés sont déterminés par injection d'une solution certifiée SRM 2260 (*Standard Reference Material*) pour les HAP et par injection d'une solution standard de PCB enrichie avec la même solution de standards internes que celle utilisée dans les échantillons.

### **3.3. Analyse des biomarqueurs**

Les biomarqueurs constituent des indicateurs qui répondent de façon précoce et sensible à un dysfonctionnement et leur utilisation rend compte de la biodisponibilité des polluants et des effets qu'ils engendrent sur les organismes et les populations (McCarthy et Shugart, 1990). Les paramètres biochimiques mesurés dans cette étude sont les teneurs en substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (TBARS, *Thiobarbituric Acid Reactive Species*) et les activités enzymatiques catalase, glutathion S-transférase (GST) et acétylcholinestérase (AChE). Les déterminations de ces biomarqueurs ont été réalisées par le groupe de "Toxicologie Biochimique" du laboratoire.

#### **3.3.1. Préparation des échantillons**

Les glandes digestives et les branchies de moules sont disséquées et congelées individuellement dans des eppendorfs à  $-80^\circ\text{C}$ . Ces organes sont ensuite homogénéisés dans trois volumes (1:3, w/v) de tampon phosphate (0,1M; pH 7,4) à  $4^\circ\text{C}$ . La solution est centrifugée à 9 000g pendant 30 min et le surnageant (S9) stocké à  $-80^\circ\text{C}$  jusqu'à l'analyse.

### 3.3.2. Dosage des protéines

Les teneurs en protéines présentes dans le S9 des glandes digestives et des branchies ont été déterminées selon la méthode de Bradford (1976), en utilisant l'albumine de sérum de bovin comme standard et le bleu de chromatie comme réactif, sur un lecteur UV de microplaque (BIOTEC FL600). Les teneurs en protéines sont exprimées en mg/ml de S9.

### 3.3.3. Dosage des biomarqueurs

#### 3.3.3.1. Les teneurs en substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (TBARS)

La concentration en TBARS est mesurée dans la fraction postmitochondriale des glandes digestives après complexation avec l'acide thiobarbiturique produisant un chromophore rose déterminé sur un lecteur UV de microplaque à 532 nm, selon le protocole de Buege et Aust (1978). Les concentrations sont exprimées en nmol.ml<sup>-1</sup> de S9.

#### 3.3.3.2. L'activité catalase (CAT)

L'équation de la réaction catalysée par la catalase étant  $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ , l'activité catalase est estimée en mesurant la disparition du peroxyde d'hydrogène (à 30 mM dans la cellule) à 240 nm selon une méthode adaptée de celle de Claiborne (1985). Le dosage est effectué sur la fraction postmitochondriale des glandes digestives avec un spectrophotomètre UV différentiel thermostaté à 25°C (Perkin Elmer 550S). L'échantillon est dilué 20 fois de façon à obtenir une vitesse de réaction proche de 0,1 DO/min. L'activité catalase est exprimée en  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  de protéines et calculée selon la formule suivante:

$$\text{Activité CAT} = \frac{\Delta\text{DO}/\text{min}}{[\text{P}] \times 0,040}$$

où  $\Delta\text{DO}/\text{min}$  est la variation de densité optique par minute, 0,04 le coefficient d'extinction molaire du peroxyde d'hydrogène à 240 nm en  $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ , et [P] la concentration en protéines dans le milieu réactionnel en  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

#### 3.3.3.3. L'activité glutathion S-transférase (GST)

L'équation de la réaction catalysée par la GST étant  $\text{CDNB} + \text{GSH} \rightarrow \text{CDNB-GS} + \text{HCl}$ , l'activité GST est estimée en mesurant la vitesse de formation du substrat conjugué (CDNB-GS; chloro-2,4-dinitrobenzène – glutathion) à 340 nm selon une méthode adaptée de celle de Habig (1974). Le dosage est effectué sur la fraction postmitochondriale des glandes

digestives avec un spectrophotomètre UV différentiel thermostaté à 25°C. L'échantillon est dilué 10 fois de façon à obtenir une vitesse de réaction proche de 0.1 DO/min. L'activité GST est exprimée en nmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de protéines et calculée selon la formule suivante:

$$\text{Activité GST} = \frac{\Delta\text{DO}_{\text{diff}}/\text{min}}{[\text{P}] \times 9,6}$$

où  $\Delta\text{DO}_{\text{diff}}/\text{min}$  est la différence entre la variation de densité optique totale par minute moins la variation de densité optique par minute due à la conjugaison spontanée du substrat (blanc sans échantillon); 9,6 est le coefficient d'extinction molaire du CDNB conjugué à 340 nm en mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>, et [P] la concentration en protéines dans le milieu réactionnel en mg.ml<sup>-1</sup>.

#### 3.3.3.4. L'activité acétylcholinestérase (AChE)

La méthode de dosage utilisée consiste à fournir à l'enzyme une molécule analogue au substrat, l'acétylthiocholine (ASCh), dont l'hydrolyse enzymatique libère de la thiocholine (SCh) et de l'acide acétique. La quantité de thiocholine formée par unité de temps donne l'activité enzymatique. Celle-ci est relevée par une méthode colorimétrique faisant intervenir le dithiobisnitrobenzoate (DTNB) qui se lie avec la thiocholine pour former un complexe et libère de l'acide thionitrobenzoate (TNB) de couleur jaune mesuré à 412 nm (Ellman et coll., 1961). Le dosage est effectué sur la fraction postmitochondriale des branchies sur un lecteur UV de microplaque (Mora et al., 1999). L'activité AChE est exprimée en nmol/min/mg de protéines et calculée selon la formule suivante:

$$\text{Activité AChE} = \frac{\Delta\text{DO}/\text{min}}{[\text{P}] \times 13,6}$$

où  $\Delta\text{DO}/\text{min}$  est la variation de densité optique par minute, 13,6 le coefficient molaire d'absorption en l.mmol<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>, et [P] la concentration en protéines dans le milieu réactionnel en mg.ml<sup>-1</sup>.

Enfin, de façon à ne pas alourdir la présentation des résultats (chapitre III), un certain nombre de données relatives à l'étude de surveillance biologique du Bassin d'Arcachon sont présentées dans le paragraphe suivant. Elles concernent le choix de l'espèce sentinelle, la préparation des échantillons, la détermination des paramètres physiologiques des moules, ainsi que la détermination des facteurs d'accumulation des contaminants et la description du traitement statistique des données.

## **4. Données sur l'étude de bio surveillance du Bassin d'Arcachon**

### **4.1. La moule *Mytilus sp.* en tant qu'organisme sentinelle**

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés aux mollusques bivalves marins, et en particulier à la moule *Mytilus sp.*. Dans le Bassin d'Arcachon, deux espèces de moules sont observées: l'espèce *Mytilus galloprovincialis*, dont l'aire de répartition se situe des côtes méditerranéennes jusqu'aux côtes sud-atlantiques, et l'espèce *Mytilus edulis* répartie principalement sur les côtes charentaises et tout le long du littoral atlantique nord. Ces deux espèces pouvant s'hybrider, ce qui semble être le cas dans le Bassin d'Arcachon, nous dénommerons donc cette espèce *Mytilus sp* (Mora, 1998).

La plupart des bivalves sont repartis sur toutes les eaux côtières du globe et fournissent ainsi un dénominateur commun pour l'étude de la contamination du milieu marin. Les moules ont déjà été largement utilisées lors de programmes de surveillance de la qualité des eaux littorales (le RNO, Réseau National d'Observation de l'IFREMER; le



Mussel Watch, le programme européen BIOMAR, "*Biochemical Markers of Environmental Contamination in Marine Ecosystems*"), au cours desquels des dosages chimiques ont été réalisés sur ces animaux capables de concentrer les contaminants dans leurs tissus. Ces organismes sédentaires ont la capacité (1) de bioconcentrer un grand nombre de contaminants dans leurs tissus, (2) d'être relativement tolérants aux environnements contaminés, (3) d'être facilement transplantables et maintenus sur un site, (4) de ne pas métaboliser les contaminants de façon appréciable et (5) de fournir une indication sur la biodisponibilité d'un contaminant pour des espèces aquatiques marines ou dulçaquicoles relativement importantes (Dame et al., 1996). Malgré tout, l'utilisation de mollusques bivalves présente quelques désavantages, notamment le fait que (1) l'accumulation des contaminants varie avec les conditions environnementales telles que la salinité, la turbidité, l'alimentation disponible, (2) les vitesses d'accumulation peuvent être parfois trop lente pour atteindre un état d'équilibre avec le milieu (Sericano et al., 1996), (3) la bioaccumulation peut être affectée par l'état physiologique des organismes, comme le taux de croissance et la période de reproduction (Lobel et al., 1989) et (4) tous les contaminants ne sont pas accumulés par

les bivalves (Luoma et Linville, 1995). Par conséquent, l'analyse des données de biosurveillance nécessite une bonne connaissance de l'importance relative de ces différents co-facteurs.

## **4.2. Suivi saisonnier sur le Bassin d'Arcachon**

### **4.2.1. Préparation des échantillons**

#### **4.2.1.1. Métaux, composés organostanniques, HAP et PCB**

5 individus sont prélevés pour chaque famille de contaminants. Les organismes entiers sont disséqués, poolés et stockés dans des barquettes aluminium au congélateur avant d'être lyophilisés. Les analyses des HAP et des PCB ont été effectuées jusqu'en août 2001.

#### **4. 2.1.2. Biomarqueurs**

Les moules sont immédiatement disséquées sur un lit de glace et 10 glandes digestives et 10 branchies sont ensuite stockées individuellement dans des eppendorfs et placées au congélateur à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Les analyses de biomarqueurs ont été effectuées uniquement sur le site de référence et sur les trois sites portuaires.

#### **4. 2.1.3. Stéroïdes**

Le sexe des moules est déterminé au microscope sur un extrait de gonade. Les glandes digestives de 3 à 5 mâles et 3 à 5 femelles sont ensuite prélevées et stockées individuellement à  $-80^{\circ}\text{C}$  dans des eppendorfs.

### **4.2.2. Détermination des paramètres physiologiques**

#### **4.2.2.1. Indices de condition**

L'indice de condition est le rapport du poids de chair sur le volume interne de la coquille, et représente le premier indicateur du taux de remplissage de la coquille par les tissus mous. Cet indice est généralement utilisé pour évaluer les variations saisonnières des réserves nutritives ou de la qualité des tissus, aussi bien que pour suivre les effets délétères de divers contaminants et/ou maladies (Crosby et Gale, 1990). Il est généralement calculé de la façon suivante:

$$IC = \frac{\text{poids tissus mous (g)} * 1000}{\text{capacité de la cavité interne de la coquille (g)}}$$

Il existe également un autre indice recommandé par l'Association Française pour la Standardisation (AFNOR, Norme Française NF V45056, septembre 1985), calculé de la façon suivante:

$$IC = \frac{\text{poids tissus mous (g)} * 100}{\text{poids total (g)}}$$

Dans notre étude, les indices de condition ont été déterminés tous les mois sur 15 individus, sur le site de référence lors des collectes de moules et sur chaque cage récupérée. Les coquilles sont débarrassées des organismes incrustés, puis mesurées et pesées. Les indices de condition ont été calculés de la façon suivante:

$$IC = \frac{\text{poids tissus mous (g)}}{[\text{poids total (g)} - \text{poids coquille (g)}]}$$

Si ce calcul renseigne peu sur l'état physiologique global de l'animal, il permet par contre de quantifier de manière fiable tout changement de poids des individus et de comparer des échantillons de moules entre eux ou de suivre leur évolution dans le temps.

Un deuxième indice utilisant la taille de moules a aussi été utilisé pour pallier aux erreurs induites par les fluctuations de tailles moyennes dans chaque cage. Ils sont calculés de la façon suivante:

$$IC = \frac{\text{poids tissus mous (g)}}{\text{Taille (cm)}}$$

Les données des indices de condition sont exprimées comme le rapport entre l'indice de condition moyen déterminé sur les moules du Moulleau avant la transplantaion et l'indice de condition moyen déterminé sur les moules de chaque site après un mois de transplantaion, appelé facteur de condition (FC), soit:  $FC = [IC(Y)]_n / [IC(A)]_{n-1}$ , où IC est l'indice de condition, Y le code du site (A: site de référence) et n le mois. Un facteur de condition inférieur à 1 indiquera donc que les individus ont été soumis à un stress physiologique durant la période de transplantaion.

#### **4.2.2.2. Teneurs en lipides et poids sec**

De 0,3 à 0,5 g de tissus lyophilisés sont extraits sous champ micro-ondes dans du dichlorométhane. L'extrait est ensuite filtré sur coton et évaporé à sec sous un flux d'azote. L'extrait sec est ensuite pesé et le taux de matière organique déterminé.

Le poids sec individuel des moules (moyenné sur 2 groupes de 5 individus lyophilisés) a aussi été déterminé sur chaque site tout au long de l'année.

#### **4.2.3. Facteurs d'accumulation**

De la même façon que pour les indices de condition, nous avons utilisé des facteurs de condition pour évaluer l'accumulation des contaminants dans les tissus des bivalves transplantés. Le facteur de condition est calculé comme le rapport de la concentration d'un contaminant dans les bivalves avant la transplantation sur le site étudié sur la concentration de ce composé après un mois de transplantation, selon l'équation suivante:

$$FA = [X(Y)]_n / [X(A)]_{n-1}, \quad \text{où X est le composé déterminé, Y le code du site}$$

(A: site de référence) et n le mois.

Un facteur d'accumulation inférieur à 1 indique que les concentrations dans les bivalves n'ont pas augmenté pendant la période de transplantation, témoignant d'un niveau de contamination faible sur le site, soit en raison d'une dépuración des contaminants par les bivalves, soit d'un niveau de contamination élevée sur le site de référence. Ces facteurs ont été utilisés pour comparer plus aisément les niveaux des contaminants dans les tissus entre les différents sites de transplantation et entre les différentes périodes.

#### **4.2.4. Traitement statistique des données**

Pour mettre en évidence les éventuelles relations entre les différents paramètres mesurés, nous avons réalisé dans un premier temps des matrices de corrélation portant sur l'ensemble des sites. Les coefficients de corrélation sont donnés avec leur probabilité. Pour évaluer la signification des différences observées entre les sites, nous avons utilisé des analyses de variance (ANOVA) suivies de tests de Tukey (logiciel STATISTICA 6.0).

Les analyses statistiques par composantes principales (ACP) présentées dans cette étude ont été réalisées en collaboration avec le Dr J. Devillers (CTIS, Lyon). L'analyse factorielle regroupe un ensemble de méthodes statistiques descriptives qui visent à

présenter, sous une forme graphique, le maximum de l'information contenue dans un tableau de données. L'ACP s'applique à des tableaux à deux dimensions croisant des individus et des variables quantitatives. Les lignes du tableau représentent les individus (dans notre cas, les échantillons de moules) et les colonnes les variables (dans notre cas les différents contaminants, biomarqueurs et indices physiologiques suivis). L'utilisation des analyses en composantes principales dans notre étude permet non seulement de déterminer quels sont les paramètres prépondérants dans le bassin mais également d'établir une stratification des sites d'étude, en tenant compte à la fois des niveaux de contamination et des réponses biologiques.

Le principe de l'ACP peut être résumé comme suit : si un tableau de données comporte  $p$  variables quantitatives, les individus peuvent être représentés dans un espace à  $p$  dimensions. Le but de l'ACP est de trouver des espaces de dimensions plus petites dans lesquels il soit possible d'observer au mieux les individus. L'espace retenu ici sera à deux dimensions. La phase essentielle de l'ACP consiste à transformer les  $p$  variables quantitatives initiales, toutes plus ou moins corrélées entre elles, en  $p$  nouvelles variables quantitatives non corrélées (orthogonales), appelées composantes principales. Ces composantes principales sont des combinaisons linéaires des variables initiales. Elles sont calculées de façon à ce que la première composante principale (PC1) rassemble la plus forte proportion de la variance totale des individus, puis PC2 est calculée et ainsi de suite (en décroissant) jusqu'à l'extraction complète de la variance totale des données (PC $p$ ).

Des ACPs ont été réalisées afin de regarder si les moules transplantées permettaient de discriminer les différents niveaux de contamination rencontrés dans le Bassin d'Arcachon. Ces analyses sont actuellement en cours d'exploitation par Dr J. Devillers (CTIS, Lyon).

## **CHAPITRE III.**

# **EXPOSITION DE MOULES MARINES *MYTILUS SP.* AU TBT : EXPERIENCES EN MICROCOSME ET APPLICATION ENVIRONNEMENTALE AU BASSIN D'ARCACHON**



## **EXPOSITION DE MOULES MARINES MYTILUS SP. AU TBT : EXPERIENCES EN MICROCOSME ET APPLICATION ENVIRONNEMENTALE AU BASSIN D'ARCACHON**

L'ensemble des différents développements réalisés a été appliqué à une étude terrain dans le Bassin d'Arcachon. Des expositions de moules à différentes concentrations de TBT en microcosme ont été réalisées afin de mettre en évidence l'effet du tributylétain sur la composition en stéroïdes endogènes de la moule *Mytilus edulis* et sur différents biomarqueurs. En parallèle, une étude de biosurveillance utilisant la transplantation de moules en cages a été réalisée dans le Bassin d'Arcachon pendant une année dans le but d'en évaluer la qualité, à travers la détermination de nombreuses classes de contaminants et des réponses biologiques, et de valider plusieurs types de biomarqueurs en fonction des variations dues à l'environnement naturel.

La première partie de ce chapitre est consacrée aux résultats obtenus en microcosme. Des moules *Mytilus edulis*, collectées dans le Bassin d'Arcachon, ont été exposées à des concentrations de chlorure de tributylétain (TBTCl) de 1000 et 10 ng.L<sup>-1</sup> (Sn) pendant 4 jours. Cette dernière concentration a été choisie pour sa représentativité environnementale et est de l'ordre de celles régulièrement enregistrées en été dans le port d'Arcachon.

La deuxième partie présente l'étude effectuée *in situ* sur le Bassin d'Arcachon. Des moules provenant d'un site non contaminé en TBT (Le Moulleau, site de référence) ont été transplantées dans des cages pendant un mois sur plusieurs sites du bassin présentant différents niveaux de contamination, et ce durant une année. Les niveaux des principaux contaminants aquatiques (HAP, PCB, métaux, composés organostanniques) ont été déterminés et les effets de l'exposition à ces contaminants chez *Mytilus edulis* ont été évalués par la mesure de biomarqueurs de toxicité (activités enzymatiques AChE, GST, CAT et les teneurs en TBARS) et par le dosage des stéroïdes endogènes chez la moule comme biomarqueur d'une perturbation endocrinienne par le TBT. Les contaminants et les biomarqueurs ont fait l'objet de mesures mensuelles dans les tissus de moules. En même temps, différents indicateurs physiologiques (indices de condition, taux de lipides, poids sec) étaient relevés. Une interprétation intégrée de tous ces paramètres a permis d'identifier les tendances spécifiques à chacun des sites expérimentaux.



# **1. Exposition de moules *Mytilus sp.* au TBT en microcosme**

(Publication en annexe 5)

## **1.1. Description du système d'exposition**

### **1.1.1 Collecte des moules**

Les moules *Mytilus sp.*, d'une taille de 4,5 à 5,5 cm correspondant à un poids de tissus mous compris entre 1,2 à 1,8 g, sont collectées à marée basse sur le site de référence, au Moulleau-Pyla, à l'entrée du Bassin d'Arcachon. L'eau de mer utilisée pour chacun des tests réalisés en aquarium est prélevée sur le même site que les moules, sans aucun traitement ultérieur (filtration et/ou irradiation UV). Les moules prélevées sur ce site contiennent des concentrations en butylétains faibles mais non négligeables (30 – 40 ng.g<sup>-1</sup> p.s.). Cependant, les composés organostanniques n'ont pas été déterminés dans les sédiments de la plage du Moulleau.

### **1.1.2. Système d'étude**

Pour chaque test, nous avons utilisé un aquarium témoin et un aquarium d'exposition au TBT. Les aquariums utilisés sont d'une taille de 25x30x40 cm et contiennent 20 litres d'eau de mer. Ils sont placés sous une hotte aspirante dans une pièce non climatisée. Les moules sont réparties aléatoirement dans les aquariums, à raison de 40 à 50 moules pour 20 litres d'eau.

Avant toute contamination, une période de stabulation de 5 jours a été respectée afin d'acclimater les moules aux nouvelles conditions. Les expositions au TBT ont été réalisées sur une courte période de 4 jours. Les moules ont été nourries deux fois par jours tout au long de la période de test avec une solution nutritive commerciale pour les invertébrés marins Marine Liquifry (INTERPET) à raison de 50 µl de solution par jour et par individu.

Les expositions ont été réalisées selon un mode statique avec un changement journalier de l'eau de mer et une aération permanente de l'eau à l'aide d'une pompe à air (SHEGO Optimal). Un cycle de luminosité de 12 heures a été respecté durant toute la durée des tests. Différents paramètres physico-chimiques de l'eau ont été suivis journalièrement, avant et après chaque renouvellement de l'eau des aquariums: la saturation en oxygène dissous, la température, le pH et la salinité de l'eau prélevée, ainsi que les teneurs en nitrates et nitrites. A chaque renouvellement de l'eau, les aquariums sont abondamment rincés avec la nouvelle

eau de mer. Les moules, fixées sur le fond de l'aquarium, ne sont pas enlevées des aquariums lors de cette opération.

La solution de TBT utilisée pour les expositions est préparée chaque jour dans 10 ml d'eau Milli-Q à partir de la solution stock à  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  (Sn) et directement ajoutée à l'eau de l'aquarium d'exposition.

Un troisième aquarium a été utilisé pour décontaminer les eaux utilisées pour les expositions. Les eaux contaminées ont été filtrées pendant 24h sur coton et charbon actif à l'aide d'une pompe mécanique (EHEIM ECCO 2233, environ  $400 \text{ l.h}^{-1}$  correspondant approximativement à 500 cycles par période de 24h) avant d'être rejetées à l'évier, après avoir constaté l'absence de résidus de butylétains.

### **1.1.3. Préparation des échantillons**

200 ml d'eau sont prélevés en triplicats dans chaque aquarium juste avant le changement de l'eau (soit 24h après la contamination) et juste après la nouvelle contamination de l'eau des aquariums. Les analyses des échantillons d'eau ont été réalisées immédiatement après le prélèvement.

Les moules sont prélevées chaque jour durant le changement de l'eau: le jour de la collecte des moules sur le Bassin, à la fin de la période de stabulation, puis chaque jour durant la période de contamination. Les tissus sont immédiatement disséqués puis rincés à l'eau Milli-Q avant d'être congelés dans des barquettes en aluminium.

Deux individus ont été utilisés pour la détermination des composés organostanniques dans les organismes entiers et six pour la détermination de leur distribution tissulaire dans la glande digestive, les branchies et le reste des tissus mous, correspondant majoritairement au manteau, aux gonades, au pied et au muscle adducteur. Six individus ont été utilisés pour les mesures biochimiques (activités catalase, GST et AChE et les teneurs en TBARS). Les branchies et les glandes digestives sont disséquées et immédiatement congelées individuellement à  $-80^{\circ}\text{C}$  dans des eppendorfs. Pour la détermination des stéroïdes endogènes, les glandes digestives de trois individus mâles et trois femelles sont prélevées et immédiatement congelées individuellement à  $-80^{\circ}\text{C}$  dans des eppendorfs. Ces individus ont été prélevés uniquement à la fin de la période de stabulation et à la fin de la période d'exposition au TBT.

## **1.2. Validation du système d'étude**

Avant d'entreprendre toute expérience de contamination en aquarium, nous avons réalisé des tests préliminaires (1) de stabulation de moules en aquarium pendant 15 jours,

(2) de filtration de l'eau contaminée par le TBT sur charbon actif avant de rejeter les eaux des aquariums dans le système d'eau courante, afin de valider l'utilisation du système d'exposition en microcosme.

### **1.2.1. La période de stabulation de moules en aquarium**

Environ 80 moules d'une taille de 4,5 à 5,5 cm ( $4,83 \pm 0,31$  cm) ont été collectées à la plage du Moulleau (Bassin d'Arcachon) en Novembre 2000 et placées dans deux aquariums de 20 litres d'eau de mer prélevés sur le même site. L'objectif de ce test était (1) d'optimiser les paramètres de maintien des aquariums, comme la fréquence des changements de l'eau des aquariums et les variations des paramètres physico-chimiques de l'eau (température, pH, salinité, saturation en oxygène dissous, et surtout les teneurs en nitrites et nitrates toxiques pour les invertébrés) et (2) suivre l'état physiologique des moules durant les 15 jours de stabulation par la mesure d'un indice de condition avant et après le test.

A la suite de ce test, il est apparu qu'un changement d'eau journalier était nécessaire, le facteur limitant étant les teneurs en nitrites et en nitrates [les teneurs en nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ) et en nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) dans l'eau doivent être inférieures à 0,1 ppm et 20 ppm, respectivement]. Après 24h, les concentrations mesurées dans l'eau sont inférieures ou égales à 0,1 ppm et à 5 ppm, respectivement. La saturation en oxygène dissous est toujours atteinte ( $7,7 - 8,3 \text{ mg.L}^{-1}$ , soit 96 – 100% de saturation), et si le pH et la salinité de l'eau de mer collectée tous les trois jours environ sont des paramètres qui fluctuent relativement peu (pH = 7,8 – 8,4; salinité = 18 – 23), les différences de température de l'eau représentent quant à elles une source possible de perturbation pour les moules ( $14^\circ\text{C}$  lors de la collecte et  $20^\circ\text{C}$  durant la stabulation en aquarium). Les indices de condition, mesurés sur 20 individus avant et après le test ne sont pas significativement différents:  $0,369 \pm 0,067$  (lors de la collecte) et  $0,343 \pm 0,091$  (après 15 jours de stabulation). Aucune croissance des moules n'a donc été observée après 15 jours de stabulation, certainement en raison des teneurs relativement importantes en nitrites et nitrates relevées dans l'eau et au stress induit par les fortes différences de température. Néanmoins, les conditions de maintien en aquariums ont été jugées satisfaisantes et l'utilisation du système d'exposition en mode statique, validée.

### **1.2.2. Test de filtration de l'eau contaminée par les composés organostanniques**

Une concentration de  $2000 \text{ ng.L}^{-1}$  (Sn) de chlorure de TBT (TBTCI) a été utilisée pour ce test. L'eau de mer contaminée a été filtrée pendant 48h sur coton et charbon actif à l'aide d'une pompe mécanique (EHEIM, environ  $400 \text{ L.h}^{-1}$  correspondant approximativement à 500 cycles par période de 24h). Après 24h, la concentration de TBT dans l'eau avoisine  $10 \text{ ng.L}^{-1}$

(Sn) (figure III-1). Le TBT est rapidement dégradé en DBT, MBT et en étain inorganique. Ces produits de dégradation, moins toxiques que le TBT, sont néanmoins retrouvés dans des quantités encore importantes (environ 500 ng.L<sup>-1</sup>) après 24h de filtration. L'efficacité du système de filtration pourrait être améliorée en utilisant du coton sulfhydrique, conjointement au charbon actif pour préconcentrer les butylétains dans l'eau de mer, comme décrit par Huang et Wang (1995).

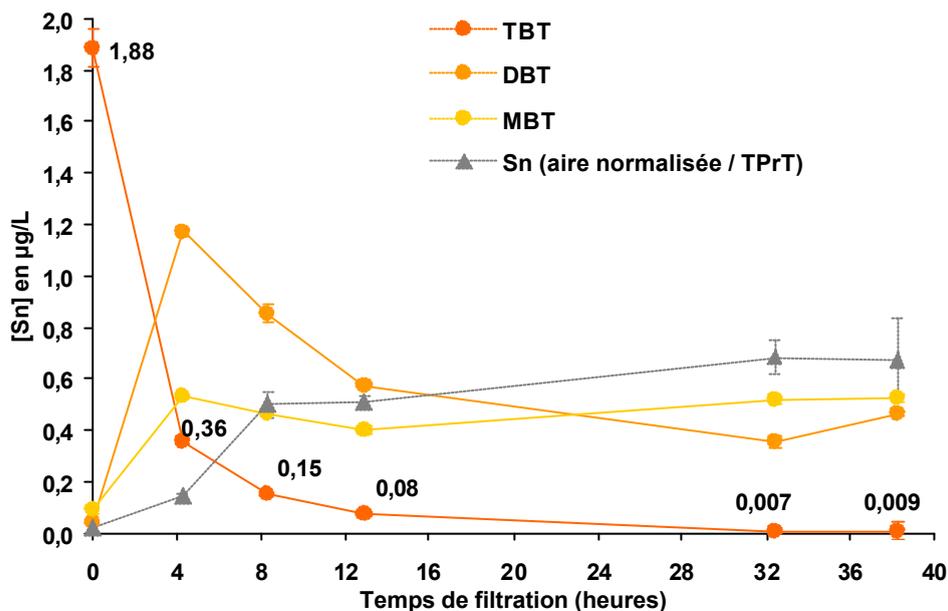
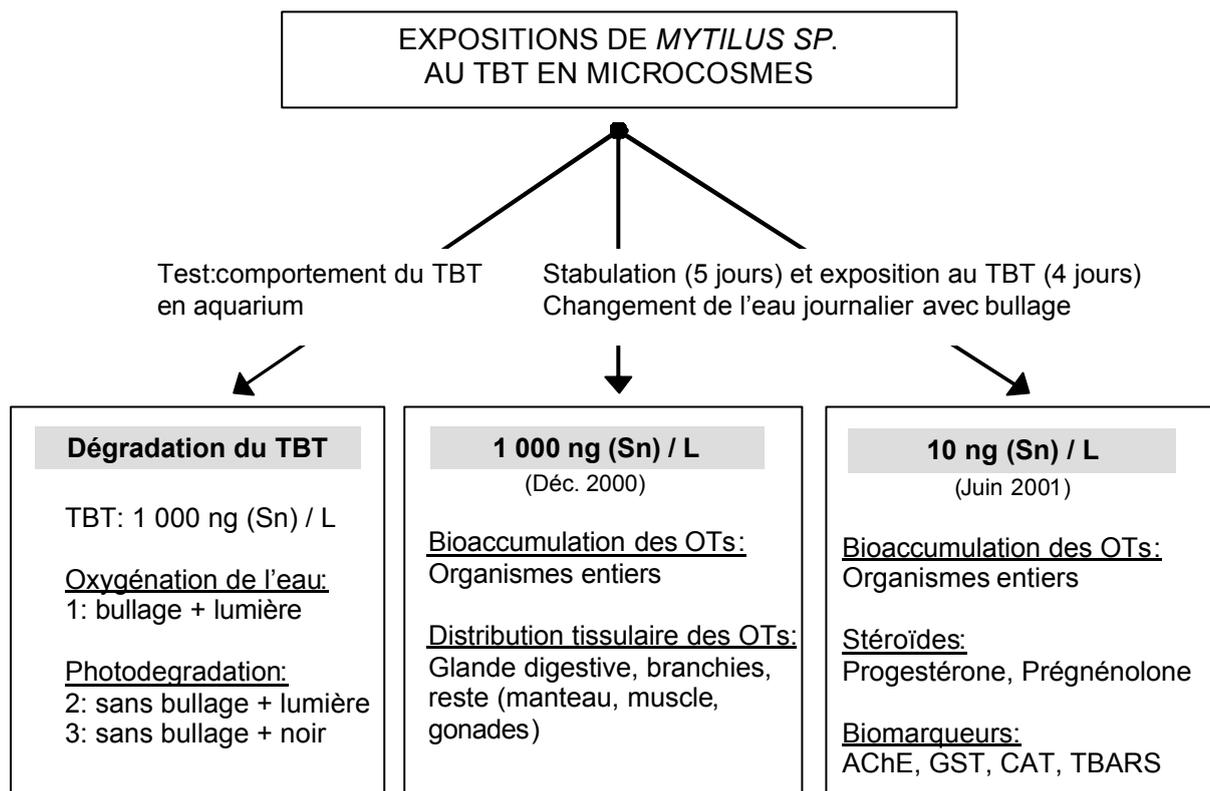


Figure III-1: Concentrations en butylétains et aire normalisée de l'étain inorganique en fonction du temps de filtration de l'eau de mer contaminée à 2 µg.L<sup>-1</sup> (Sn) de TBTCI.

Après avoir validé les conditions de maintien du système d'exposition en microcosme en mode statique, les expériences d'exposition de moules au TBT ont pu être menées. Les différentes expositions en microcosme réalisées dans cette étude sont schématisées à la figure III-2. Avant d'entreprendre toute contamination de moules par le TBT, nous avons étudié la stabilité du TBTCI dans les conditions de maintien des aquariums pour évaluer la concentration effective de TBT à laquelle sont exposées les moules entre deux changements de l'eau.



**Figure III-2: Représentation des différentes expositions en microcosme réalisées dans cette étude.**

### 1.3. Dégradation du TBT en microcosme

Le but de ce test était d'appréhender les processus complexes qui entraînent une diminution des teneurs en TBT dans la colonne d'eau après chaque addition du contaminant, qui peuvent être dus à l'adsorption sur les parois, à la volatilisation, la photodégradation, l'activité microbienne et les réactions chimiques avec l'oxygène pendant l'aération de l'eau de mer.

Trois aquariums contenant  $1000 \text{ ng.L}^{-1}$  (Sn) de TBT ont été utilisés pour ce test. Le premier a été maintenu sous aération permanente de l'eau de mer (pompe à air) et sous lumière, le second sans bullage et sous lumière et le troisième sans bullage et dans l'obscurité, pendant quatre jours. Les échantillons d'eau ont été prélevés tous les jours en triplicat. Ce test a été effectué avec les paramètres physico-chimiques suivants: une température de  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ , un pH de 7,8 et une salinité de 28.

Aucun effet significatif de photodégradation du TBT n'a été observé entre les aquariums exposés ou non à la lumière, les concentrations retrouvées dans l'eau étant relativement similaires dans les deux aquariums. Par contre, l'oxygénation de l'eau semble avoir une

grande incidence sur la concentration en TBT. La chute de la concentration en TBT dans l'aquarium maintenu sous aération permanente pendant une période de 24h a été évaluée à 35%. Cette diminution suit une cinétique d'ordre 2, selon l'équation:  $[TBT] = 0,07t^2 - 0,51t + 1,1$ , où  $[TBT]$  est la concentration en TBT en  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  et  $t$  est le jour ( $R^2 = 0,99$ ) (figure III-3). Ce pourcentage de perte de TBT pourrait avoir une forte incidence sur les évaluations des facteurs de bioconcentration reportées par différents auteurs ayant utilisé des systèmes d'exposition sous aération permanente de l'eau (comme dans les travaux de Huang et Wang, [1995], de Morcillo et al., [1998] ou de Gomez-Ariza et al., [1999], par exemple).

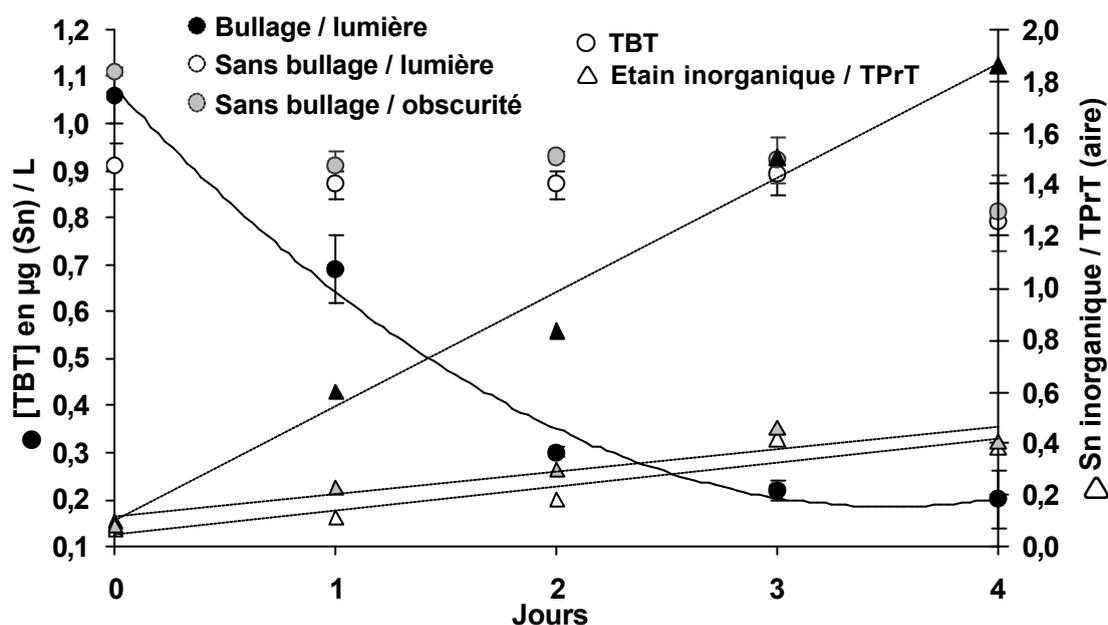


Figure III-3: Evolution de la concentration en TBT et de l'aire de l'étain inorganique (normalisée par celle du standard interne, le TPrT) dans les différentes conditions de maintien des aquariums. Cinétique de disparition du TBT dans l'eau:  $[TBT] = 0,07t^2 - 0,51t + 1,1$  ( $R^2 = 0,99$ ).

Le TBT ajouté dans l'eau aérée est rapidement dégradé en étain inorganique (figure III-3). La "concentration" en étain inorganique extrait par ce protocole (évaluée sous forme de rapport de l'aire d'étain inorganique sur l'aire du standard interne TPrT), est beaucoup plus élevée que celles retrouvées dans les aquariums sans bullage et les concentrations des produits de dégradation du TBT, le monobutyl- et le dibutylétain, sont relativement constantes pendant les quatre jours de test et identiques dans les trois aquariums (figure III-4).

De plus, l'oxygénation de l'eau conduit à la formation de deux nouveaux composés organostanniques non identifiés, OX1-BT et OX2-BT, que l'on suppose être des composés butylés oxydés (pouvant contenir un groupement hydroxybutyle ou oxobutyle par exemple)

puisque'ils n'apparaissent que dans les conditions d'aération de l'eau (figures III-4 et III-5). Ces composés ont également été déterminés dans les tissus de moules lors des expositions au TBT afin de comparer l'accumulation de ces composés oxygénés à celle du TBT chez les moules. Leur vitesse de formation a été évaluée à  $30 \text{ ng.L}^{-1} (\text{Sn})/\text{jour}$  pour OX1-BT et  $10 \text{ ng.L}^{-1} (\text{Sn})/\text{jour}$  pour OX2-BT, pour une eau contaminée à  $1000 \text{ ng.L}^{-1} (\text{Sn})$  de TBT (soit, respectivement, 3 et 1% de la concentration initiale en TBT). En raison de leurs faibles concentrations dans l'eau, ces composés n'ont pas pu être identifiés par GC-MS (HP 6890 Series II / MSD 5973; Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA).

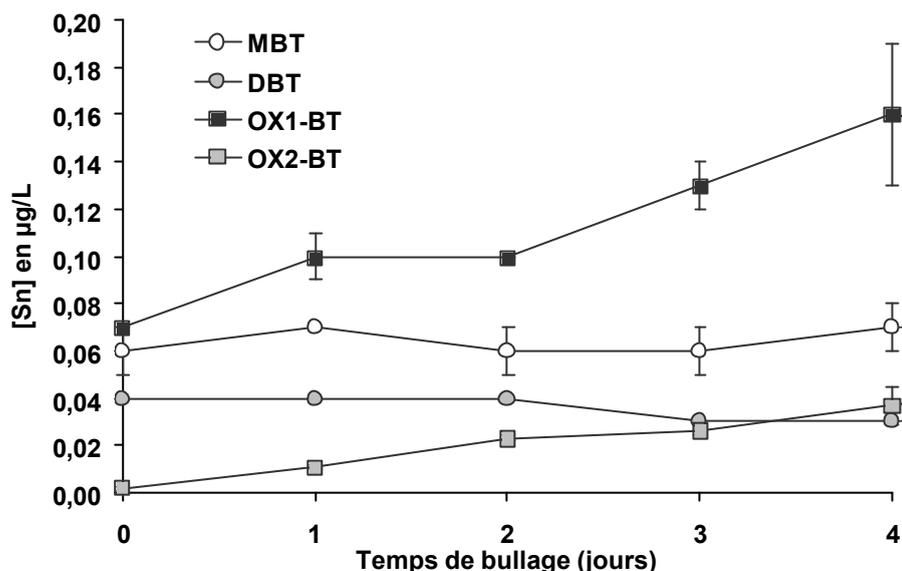


Figure III-4: Evolution des concentrations en MBT, DBT et en composés non identifiés oxydés dans l'aquarium exposé à la lumière et maintenu sous oxygénation permanente de l'eau.

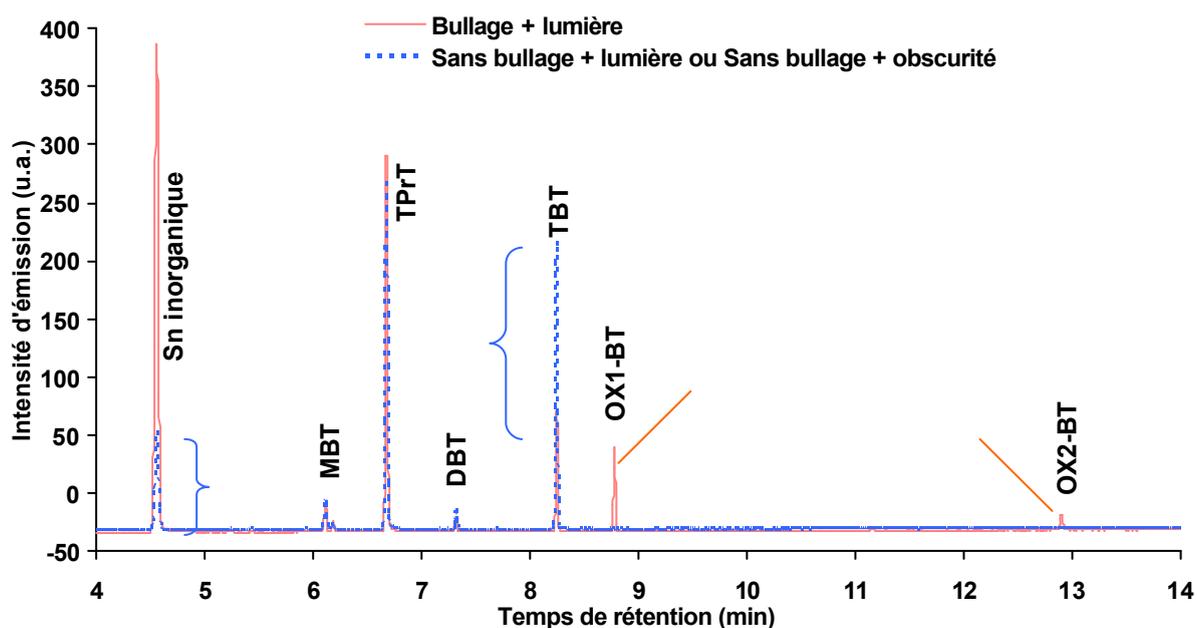


Figure III-5: Chromatogramme GC-AED des échantillons d'eau prélevés dans les différentes conditions de maintien des aquariums (avec ou sans aération de l'eau de mer).

La perte de TBT dans des conditions d'oxygénation de l'eau semble être principalement due à une dégradation directe du TBT en étain inorganique et à des réactions chimiques avec l'oxygène qui conduisent à la formation de deux composés butylétains oxydés. Il faut certainement ajouter à cela la volatilisation du TBT qui peut représenter une part non négligeable des pertes de TBT dans l'eau. Les autres phénomènes susceptibles de conduire à une diminution de la concentration de TBT, comme l'adsorption du contaminant sur les parois des aquariums et les dégradations microbiennes, ne peuvent être estimés dans ces conditions de test.

La formation de ces butylétains oxydés lors de l'aération de l'eau des aquariums peut jouer un rôle crucial dans la biodisponibilité et la bioaccumulation du TBT. Ils ont certainement une biodisponibilité plus importante que le TBT non oxydé et leur formation dans le système d'exposition en microcosme pourrait modifier, dans une certaine mesure, l'impact du TBT sur les moules, en terme de bioaccumulation et de toxicité.

#### **1.4. Expositions en microcosme**

Des moules *Mytilus sp.* ont été exposées à deux concentrations de TBT dans l'eau de mer, 1 000 ng.L<sup>-1</sup> (Sn) (exposition C1) et 10 ng.L<sup>-1</sup> (Sn) (exposition C2) pendant 4 jours. L'ensemble des analyses effectuées pour chacune de ces contaminations est résumé à la figure III-2.

##### **1.4.1. Détermination des butylétains dans l'eau de mer**

Les résultats des analyses des échantillons d'eau, prélevés immédiatement après l'ajout de TBT et 24 heures après, sont représentés dans le tableau III-1.

Dans l'exposition C1, la concentration de TBT déterminée 24 heures après l'ajout du contaminant dans l'eau a chuté à 30 ng.L<sup>-1</sup> le premier jour d'exposition et à 150 ng.L<sup>-1</sup> le quatrième jour, dont 35% de ces pertes peuvent être attribuables à l'oxygénation de l'eau (voir §1.2.). Une augmentation croissante de la concentration de TBT dans l'eau (après 24h d'exposition) a été observée au fur et à mesure des jours d'exposition. Cela pourrait indiquer une diminution de l'accumulation de TBT par les moules, due à une réduction de leur vitesse de filtration. Les métabolites du TBT ont été décelés dans l'eau et leur concentration représente 76% des butylétains (à l'exception des deux composés butylés oxydés). Dans l'exposition C2, les concentrations de TBT juste avant le renouvellement de l'eau ont chuté à 5 ng.L<sup>-1</sup> chaque jour et les concentrations en MBT et DBT représentent 70% des butylétains. Le TBT n'est pas la forme prédominante de butylétains retrouvés dans l'eau après 24h, le

DBT et le MBT étant respectivement les formes majoritaires dans l'exposition C1 et dans l'exposition C2.

[TBT] dans l'eau <sup>a</sup>	C1 = 1 000 ng.L <sup>-1</sup> (Sn)		C2 = 10 ng.L <sup>-1</sup> (Sn)	
	T = 0h <sup>b</sup>	T = 24h <sup>c</sup>	T = 0h	T = 24h
TBT	1061 ± 35	70 ± 1 *	11,9 ± 0,5	5,7 ± 1,0
DBT	30 ± 2	131 ± 1	0,3 ± 0,1	3,9 ± 1,0
MBT	0	94 ± 1	1,2 ± 0,6	7,8 ± 1,6
OX1-BT	0	25 ± 2	11,9 ± 0,5	228,8 ± 6,5
OX2-BT	0	5 ± 1	1,1 ± 0,7	27,7 ± 1,3
<i>BTs</i> <sup>d</sup>	1091 ± 37	295 ± 3	13,4 ± 1,2	17,4 ± 3,6
% (MBT+DBT) / <i>BTs</i>	3	76	11	67
% (OX1-BT+OX2-BT) / Total <sup>e</sup>	0	9	49	94

\* Moyenne des 4 jours d'exposition

<sup>a</sup> en ng.L<sup>-1</sup> (Sn). Les analyses ont été réalisées en triplicats.

<sup>b</sup> juste après l'addition de TBT. <sup>c</sup> 24h après l'addition de TBT.

<sup>d</sup> *BTs* = MBT+DBT+TBT. <sup>e</sup> Total = MBT+DBT+TBT+OX1-BT+OX2-BT.

Tableau III-1: Concentrations en butylétains déterminées dans l'eau des aquariums durant les deux expositions C1 et C2.

#### 1.4.2. Accumulation du TBT chez *Mytilus sp.*

Les concentrations en butylétains déterminées dans les tissus de moules à la fin des périodes d'acclimatation (Témoin) et d'exposition au TBT (Contaminé) sont résumées dans le tableau III-2. Les concentrations enregistrées à la fin de la période d'acclimatation n'étant pas négligeables (somme des butylétains ≈ 100 ng.g<sup>-1</sup>), ces valeurs ont été soustraites de celles retrouvées dans les tissus durant l'exposition au TBT et prises en compte dans l'évaluation des facteurs de bioconcentration (BCF).

Les concentrations de TBT dans les moules *Mytilus sp.* après 4 jours d'exposition sont de 2120 ± 4 et 204 ± 7 ng.g<sup>-1</sup> (Sn) dans les expositions C1 et C2, respectivement. Une augmentation générale de la concentration de TBT dans les tissus avec des concentrations croissantes de TBT dans l'eau est observée (figure III-6). Les cinétiques d'accumulation du TBT par les organismes entiers sont relativement linéaires dans les deux tests et les constantes de vitesse d'accumulation sont de 0,52 ± 0,07 L.g<sup>-1</sup>.jour<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup> = 0,988) et de 3,60 ± 0,50 (R<sup>2</sup> = 0,901) pour les expositions C1 et C2, respectivement.

	C1 = 1 000 ng.L <sup>-1</sup> (Sn)		C2 = 10 ng.L <sup>-1</sup> (Sn)	
	Témoin <sup>b</sup>	Contaminé <sup>c</sup>	Témoin	Contaminé
<b>[TBT] dans les moules<sup>a</sup></b>				
TBT	75 ± 2	2119 ± 4	60 ± 3	204 ± 7
DBT	37 ± 1	1282 ± 7	22 ± 1	85 ± 1
MBT	30 ± 9	331 ± 13	20 ± 2	36 ± 4
OX1-BT	9 ± 1	66 ± 6	7 ± 1	604 ± 25
OX2-BT	2 ± 1	121 ± 3	4 ± 0	251 ± 13
<b>BTs<sup>d</sup></b>	<b>142 ± 9</b>	<b>3732 ± 24</b>	<b>101 ± 6</b>	<b>425 ± 12</b>
% (MBT+DBT) / BTs	47	43	41	52
% (OX1-BT+OX2-BT) / Total <sup>e</sup>	8	5	9	67

<sup>a</sup> ng.g<sup>-1</sup> (Sn) dans l'organisme entier. Les analyses ont été réalisées en triplicats.

<sup>b</sup> à la fin de la période d'acclimatation. <sup>c</sup> à la fin des 4 jours d'exposition.

<sup>d</sup> BTs = MBT+DBT+TBT. <sup>e</sup> Total = MBT+DBT+TBT+OX1-BT+OX2-BT.

Tableau III-2: Bioaccumulation du TBT chez *Mytilus sp.* exposée au TBT pendant 4 jours.

Une plus faible proportion des produits de dégradation du TBT a été retrouvée après 4 jours dans la plus forte dose d'exposition au TBT, mettant en évidence la capacité réduite des bivalves à métaboliser le TBT. De plus, les composés OX1-BT et OX2-BT ont été accumulés de façon beaucoup plus importante (1) dans l'exposition à la plus faible dose, et (2) que le TBT dans l'exposition C2, alors que le TBT prédomine très largement dans l'exposition à la plus forte dose.

Dans une étude réalisée par Huang et Wang (1995), des moules *Mytilus edulis* exposées à 8 ng.L<sup>-1</sup> (Sn) de TBT dans un système à flux continu ont atteint une concentration tissulaire de 400 ng.g<sup>-1</sup> (Sn) de poids sec (p.s.) après 25 jours (état d'équilibre). La vitesse d'accumulation plus élevée rencontrée dans notre étude peut être attribuée à la taille des organismes sélectionnés (4 – 4,5 cm dans notre étude et 3 – 3,5 cm dans Huang et al.) et au type de système d'exposition utilisé (exposition en mode statique ou en mode flux continu), bien que l'on puisse s'attendre à relever une bioaccumulation plus importante dans un système d'exposition à flux continu. D'autres travaux ont utilisé le même système d'exposition en mode statique, mais une autre espèce de bivalve: la palourde. Des palourdes *Venerupis decussata* exposées à 30 ng.L<sup>-1</sup> (Sn) de TBT ont atteint une concentration de 240 ng.g<sup>-1</sup> (Sn) (p.s.) au quatrième jour d'exposition (concentration calculée à partir des constantes de vitesse d'accumulation) (Gomez-Ariza et al., 1999) et *Ruditapes decussata* exposées à environ 90 ng.L<sup>-1</sup> (Sn) de TBT ont atteint une concentration de 270 ng.g<sup>-1</sup> (Sn) (extrapolée en poids sec) après 10 jours d'exposition (Morcillo et al., 1998). Des concentrations similaires ont été trouvées dans notre étude pour une durée d'exposition plus courte, indiquant que la moule *Mytilus sp.* est un meilleur bioindicateur d'une exposition au TBT.

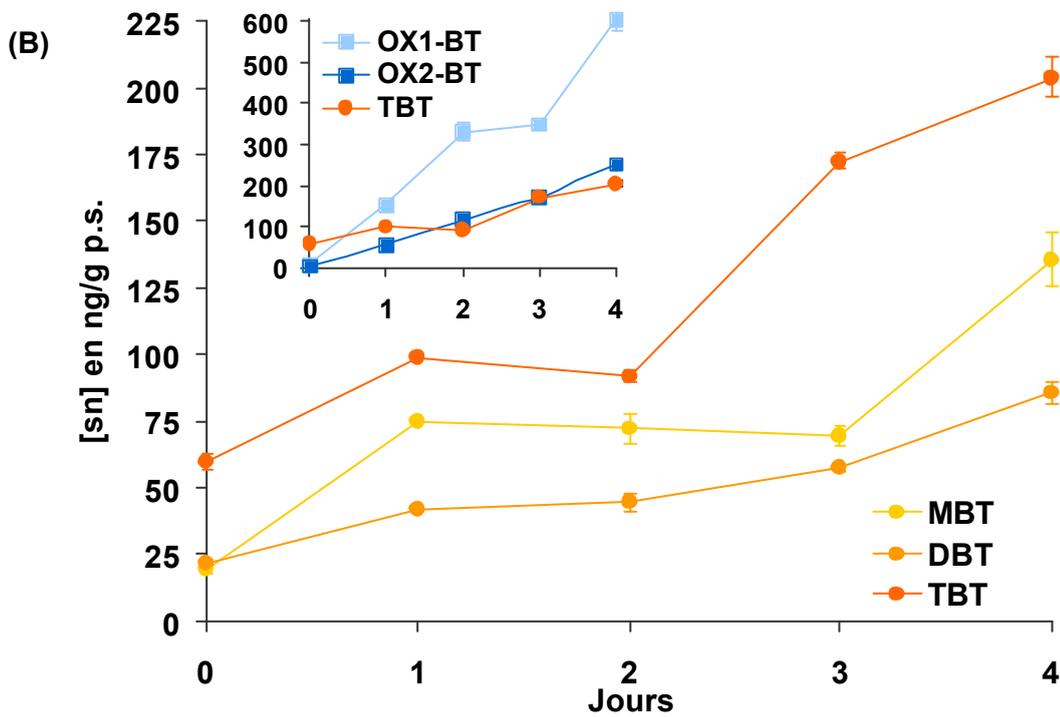
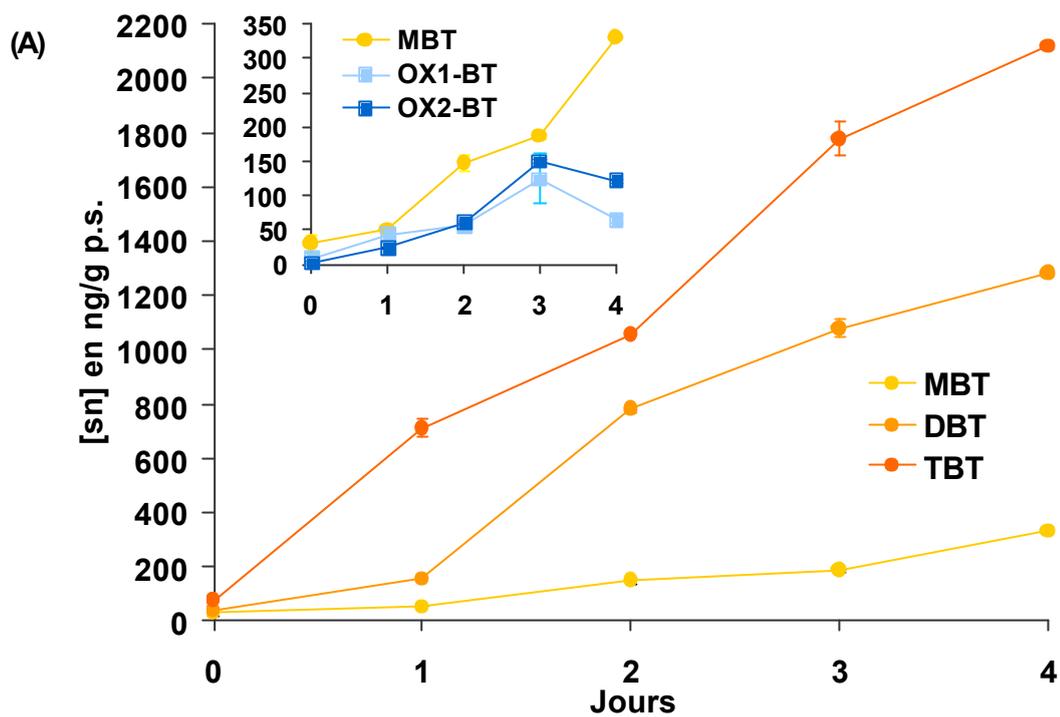


Figure III-6: Bioaccumulation du TBT par les moules *Mytilus sp.* exposées à une concentration de TBT de (A)  $1000 \text{ ng.L}^{-1}$  (Sn) et (B)  $10 \text{ ng.L}^{-1}$  (Sn). Les cinétiques d'accumulation des composés OX1-BT et OX2-BT sont représentées en petit (zoom).

### 1.4.3. Distribution tissulaire du TBT

Les concentrations en TBT ont également été déterminées dans les différents organes et/ou tissus (les organismes entiers, les branchies, les glandes digestives et les tissus restants, regroupant principalement le manteau, le muscle adducteur et les gonades), chaque jour lors de l'exposition C1, et à la fin de la période de contamination pour l'exposition C2. La distribution du TBT dans ces différents organes et/ou tissus après 4 jours d'exposition est représentée à la figure III-7.

Des répartitions tissulaires très différentes ont été observées entre les deux niveaux d'exposition. Le TBT est principalement accumulé dans les branchies dans l'exposition C1 (avec une concentration trois fois supérieure à celle enregistrée dans les organismes entiers) et dans les glandes digestives dans l'exposition C2. L'accumulation du TBT dans les tissus suit l'ordre croissant de concentrations: branchies >> glande digestive > organisme entier > reste (exposition C1) et glande digestive > organisme entier > reste > branchies (exposition C2). Etant donné la courte période d'exposition au TBT utilisée dans cette étude, il semble peu probable que l'accumulation préférentielle des butylétains dans la glande digestive pour l'exposition à la plus faible concentration de TBT résulte d'un transfert des composés des branchies vers l'organe de biotransformation. Par contre, ces différences de distribution tissulaire du TBT pourraient être dues aux deux voies possibles d'accumulation du TBT par les moules: (1) dans le système digestif par la voie trophique, (2) par adsorption sur les branchies (voie directe), puisque les bivalves sont des organismes filtreurs (Laughlin et al., 1986). Ainsi, les différences observées entre ces deux tests seraient directement liées aux paramètres physicochimiques de l'eau collectée dans le Bassin, [en hiver (décembre) pour l'exposition C1 et en été (juin) pour l'exposition C2], c'est-à-dire aux teneurs en matières en suspension (MES) de l'eau prélevée. Rivaro et al. (1997) ont mis en évidence une variation saisonnière significative des concentrations en butylétains dans les tissus de moules *Mytilus galloprovincialis* (port de Gênes, Italie), mais selon ces auteurs, ces variations ne sont pas attribuables aux fluctuations des apports en TBT dans la colonne d'eau par le trafic maritime, ni à une régulation physiologiques des teneurs en butylétains par les moules, mais plutôt aux teneurs en particules en suspension (MES), en relevant deux tendances très marquées: 1) en hiver et au début du printemps, quand l'eau est faiblement chargée en particules, les teneurs en TBT et en DBT dans les branchies ont un rôle particulièrement important, et 2) inversement, les teneurs en TBT et en DBT dans les glandes digestives ont un rôle prépondérant à la fin du printemps et en été, quand l'eau est fortement chargée en particules, sur lesquelles les butylétains pourraient être associés et ingérés par les moules. Il aurait été intéressant de doser les teneurs en MES de l'eau du Bassin d'Arcachon collectée pour ces expositions en aquarium afin de vérifier cette hypothèse.

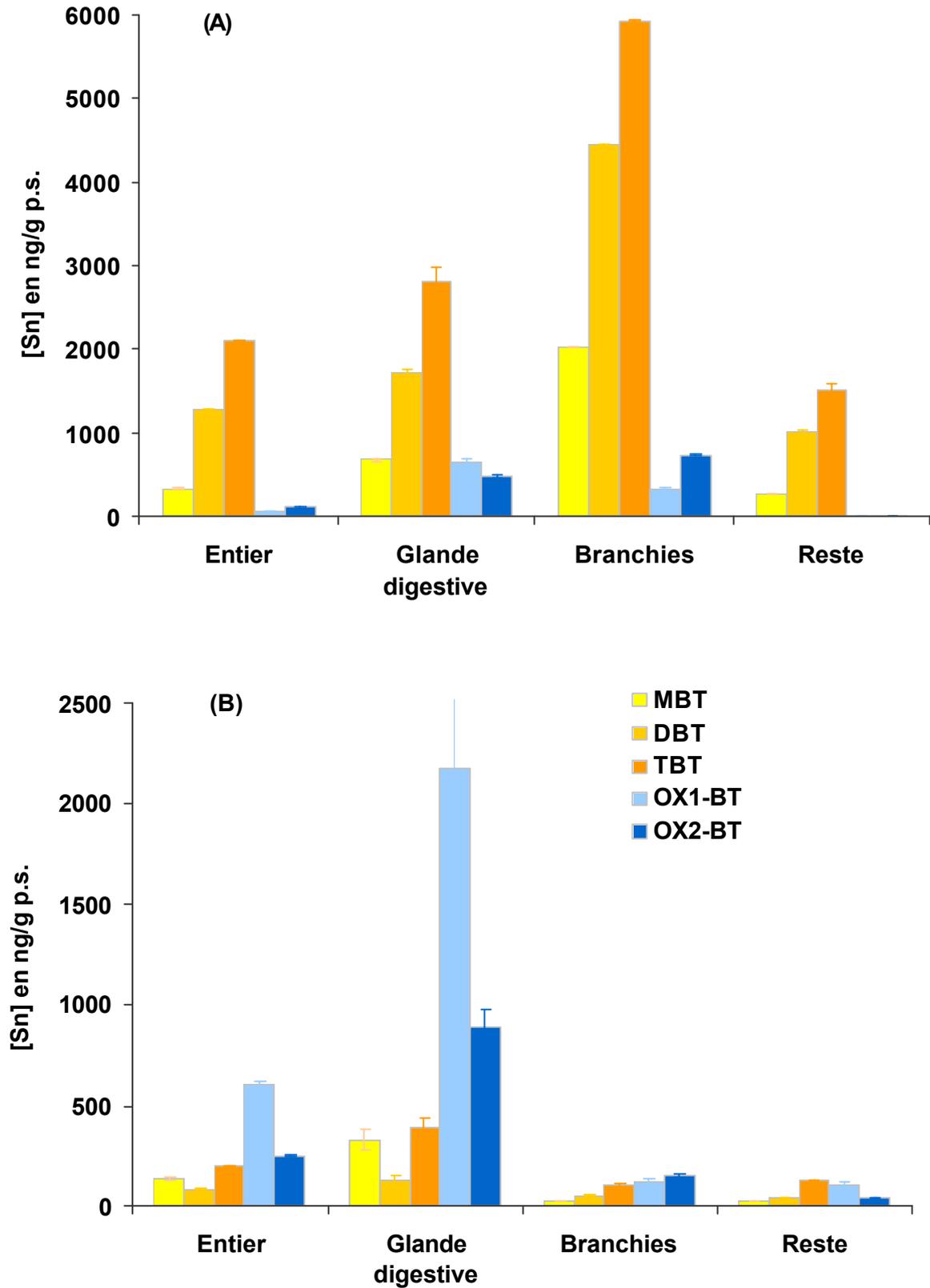


Figure III-7: Distribution du TBT et de ses produits de dégradation dans les tissus de moules *Mytilus sp.* exposées à une concentration de TBT de (A) 1000 ng.L<sup>-1</sup> et (B) 10 ng.L<sup>-1</sup> (Sn).

Cependant, cette accumulation préférentielle du TBT par la voie trophique à la plus faible concentration semble plutôt due à une part plus importante du TBT particulaire, comparativement au TBT dissous dans l'eau. En effet, les animaux ayant été nourris pendant toute la durée d'exposition, il est possible que le TBT adsorbé sur les particules de la solution nutritive constituent une part plus importante de l'accumulation du TBT pour la plus faible concentration d'exposition.

Il est intéressant de noter également la très forte accumulation des butylétains oxydés (OX1-BT et OX2-BT) dans l'exposition C2. Si le TBT prédomine dans l'exposition C1, ce sont les butylétains oxydés qui sont accumulés dans de plus grandes proportions dans l'exposition C2, et préférentiellement dans les glandes digestives.

Les facteurs de bioconcentration (extrapolation des facteurs de bioaccumulation, puisque les moules ont été nourries durant la période d'exposition) ont été calculés selon l'équation suivante (Laughlin et al., 1986):  $BCF (L.kg^{-1}) = [TBT] \text{ dans les tissus de moules } (ng.kg^{-1}) / [TBT] \text{ dans l'eau } (ng.L^{-1})$ . Les BCF sont de  $2\ 000 \pm 10$  et  $12\ 100 \pm 300 L.kg^{-1}$ , pour les expositions C1 et C2, respectivement (tableau III-3). Ils sont plus élevés dans l'exposition à la plus faible dose de TBT, ce qui est en accord avec les résultats obtenus dans d'autres travaux où des moules *Mytilus edulis* exposées au TBT soit par l'eau de mer, soit par du phytoplancton contaminé par du TBT, présentaient des BCF inversement proportionnels à la concentration aqueuse de TBT (Laughlin et al., 1986; Zoulian et al., 1989; Huang et al., 1995). Salazar et Salazar (1996) ont observé que les BCF enregistrés chez *Mytilus edulis* s'échelonnaient de 5000 à 100000 pour des concentrations de TBT dans l'eau inférieures à  $105 ng.L^{-1}$  (TBT), alors qu'ils sont inférieurs à 9000 pour des concentrations supérieures à  $105 ng.L^{-1}$ . Cette relation entre la concentration de TBT dans l'eau et les BCF (inversement exponentielle) a été établie à partir d'expériences réalisées en microcosme, par transplantation sur le terrain ou à partir des populations naturelles de la Baie de San Diego. Les courbes log (BCF) déterminées dans les différents tissus de moules dans l'exposition C1 sont également représentées à la figure III-8.

[TBT] ng.L <sup>-1</sup> (Sn)		Entiers	Branchies	Glandes digestives	Restes
1 000	Jour 1	600 ± 30	2 000 ± 30	600 ± 10	300 ± 10
	Jour 2	900 ± 10	3 500 ± 60	1 300 ± 20	800 ± 30
	Jour 3	1 600 ± 60	5 900 ± 10	2 000 ± 20	1 400 ± 10
	Jour 4	2 000 ± 10	5 600 ± 10	2 700 ± 30	1 500 ± 20
10	Jour 4	12 100 ± 300	6 300 ± 700	23 400 ± 3 800	7 600 ± 200

**Tableau III-3: Facteurs de bioconcentration (BCF en L.kg<sup>-1</sup>) pour les deux niveaux d'exposition.**

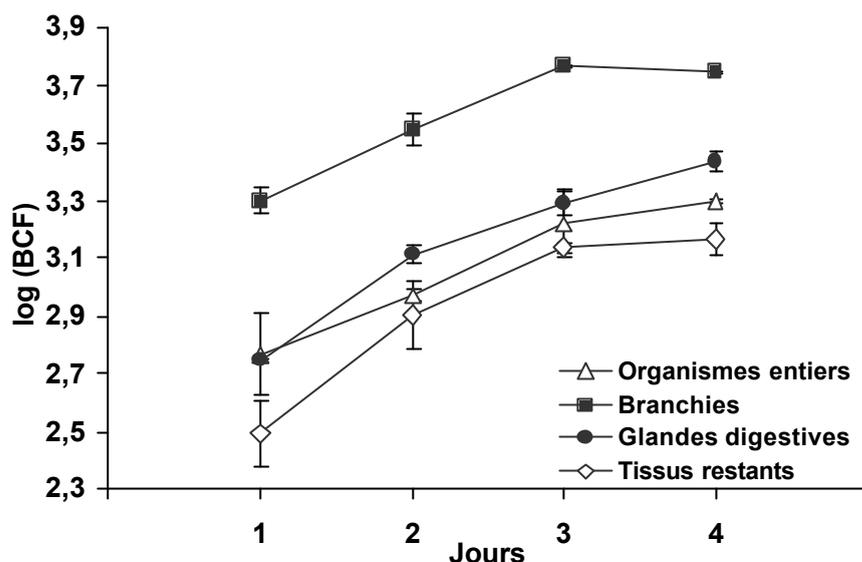


Figure III-8: Courbes log (BCF) déterminées dans les différents tissus de moules dans l'exposition C1.

#### 1.4.4. Effet du TBT sur les marqueurs biochimiques mesurés

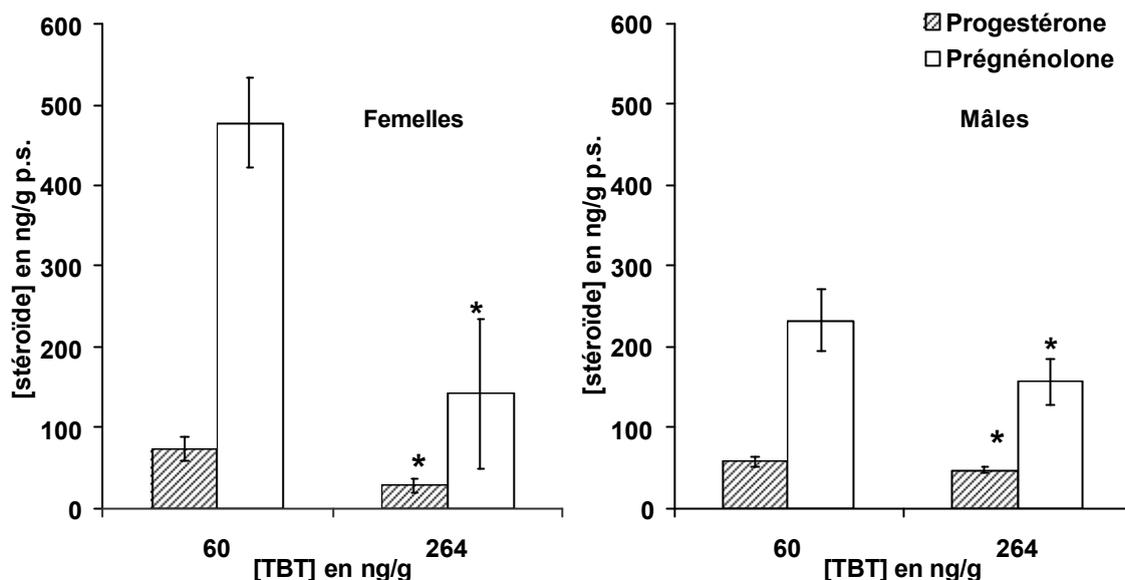
##### 1.4.4.1. Les stéroïdes endogènes

Les concentrations en stéroïdes endogènes des individus femelles et mâles, enregistrées avant et après la période d'exposition au TBT, sont répertoriées dans le tableau III-4 et schématisées à la figure III-9. Un effet de la contamination a été statistiquement démontré ( $p \sim 0,04$ ) mais aucun effet du sexe des moules n'a été observé ( $p = 0,069$ ). Un plus grand nombre d'analyses aurait peut-être amené une discrimination du sexe, mais le nombre maximal de moules placées dans les aquariums demeure le facteur limitant de cette étude en microcosme. Une exposition au TBT à  $10 \text{ ng.L}^{-1}$  (Sn) entraîne une diminution significative après 4 jours des teneurs en progestérone et en prégnénolone, à la fois chez les individus femelles et chez les individus mâles ( $p = 0,041$  et  $p = 0,026$  pour la progestérone et la prégnénolone, respectivement).

[TBT] *	Progestérone		Prégnénolone	
	Femelles	Mâles	Femelles	Mâles
Témoin	$59,7 \pm 2,4$	$73,3 \pm 14,5$	$477,2 \pm 56,4$	$232,9 \pm 39,0$
Jour 4	$264,5 \pm 2,5$	$28,8 \pm 8,5$	$142,3 \pm 92,2$	$157,2 \pm 28,5$

\* en ng/g p.s. dans les organismes entiers.

Tableau III-4: Concentration en stéroïdes endogènes (en  $\text{ng.g}^{-1}$  p.s.) dans les glandes digestives de moules dans l'exposition à  $10 \text{ ng.L}^{-1}$  (Sn) de TBT. Les analyses ont été réalisées en duplicat.



**Figure III-9: Teneurs en progestérone et prégnénolone (en  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  p.s.) chez les individus femelles et mâles exposés à une concentration de TBT de  $10 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  (Sn) en fonction de la concentration en TBT dans les organismes entiers. \* :  $p \leq 0,04$ .**

A notre connaissance, c'est la première fois que la concentration en progestérone dans les mollusques est utilisée comme marqueur d'exposition à un contaminant. De nombreuses recherches doivent être encore réalisées sur la prégnénolone, le substrat de la stéroïdogénèse, et sur la progestérone, le précurseur des androgènes, afin de déterminer le rôle physiologique de ces stéroïdes chez les mollusques et de valider l'effet éventuel des produits chimiques perturbateur endocrinien et/ou de discriminer l'effet des polluants d'une perturbation physiologique des organismes due au stress occasionné par leur maintenance en microcosme. Quelques études ont déjà suggéré que la progestérone et l'oestradiol pourraient jouer un rôle dans la régulation de l'activité sexuelle chez les bivalves (Reis-Henriques et al., 1990; Siah et al., 2002). De plus, il apparaît nécessaire de documenter plus précisément les amplitudes de variations des distributions des stéroïdes sous l'effet notamment de phénomènes naturels (cycle reproducteur) avant d'envisager une utilisation de ces stéroïdes comme marqueurs de perturbations endocriniennes (Siah et al., 2002).

En l'état actuel du développement du protocole, il n'est pas encore possible de pouvoir caractériser une éventuelle perturbation endocrinienne induite par le TBT chez la moule en se basant sur l'étude des stéroïdes hormonaux. Le dosage des androgènes et des oestrogènes chez la moule par GC-MS reste en cours de validation et un certain nombre d'optimisations (purification de l'échantillon, déconjugaison des stéroïdes,...) est en cours au laboratoire.

#### 1.4.4.2. Les biomarqueurs

Les activités enzymatiques acétylcholinestérase (AChE), glutathion S-transférase (GST) catalase (CAT) et les teneurs en espèces réactives avec l'acide thiobarbiturique (TBARS) enregistrées dans les moules en fonction du temps d'exposition à 10 ng.L<sup>-1</sup> (Sn) de TBT sont regroupées dans le tableau III-5.

	Protéines (GD) <sup>a</sup> mg/mL S9 <sup>b</sup>	Protéines (B) <sup>a</sup> mg/mL S9 <sup>b</sup>	GST (GD) nmol/min/mg prot	AChE (B) nmol/min/mg prot	CAT (GD) μmol/min/mg prot	TBARS (GD) nmol/mL S9 <sup>b</sup>
Témoin	10,7 ± 2,5	4,7 ± 0,5	167 ± 42	18 ± 5	126 ± 34	1,0 ± 0,3
Jour 1	10,6 ± 2,3	4,6 ± 1,2	190 ± 50	35 ± 7	159 ± 77	1,0 ± 0,3
Jour 2	10,0 ± 1,6	3,6 ± 0,8	228 ± 40	41 ± 22	163 ± 21	0,9 ± 0,3
Jour 3	10,8 ± 0,9	3,5 ± 1,1	195 ± 25	36 ± 11	122 ± 38	1,1 ± 0,3
Jour 4	9,5 ± 0,9	3,2 ± 1,0	215 ± 30	29 ± 12	172 ± 17	0,7 ± 0,2

**Tableau III-5: Activités enzymatiques (GST, AChE, CAT) et teneurs en TBARS dans les moules exposées à 10 ng.L<sup>-1</sup> (Sn) de TBT. <sup>a</sup> GD, glande digestive; B, branchies. <sup>b</sup> S9, fraction post-mitochondriale.**

Aucune variation significative n'a été observée dans les activités mesurées et les teneurs en TBARS après 4 jours d'exposition au TBT (figure III-10), puisque ni l'effet de la contamination, ni l'effet du temps d'exposition ne sont significatifs.

L'inhibition de l'activité GST par les composés organostanniques a déjà été observée chez les poissons (Al-Ghais et al., 1999) et l'inhibition de l'activité AChE par les composés organomercuriels a été démontrée chez la raie torpille *Torpedo californica* (Kreimer et al., 1994). Par contre, aucune variation de l'activité AChE n'a été mise en évidence chez des poissons d'eau douce *Astyanax bimaculatus* exposés au TBT [environ 25 ng/g (Sn), dissous dans de l'huile de maïs] tous les 6 jours pendant 32 jours (Oliveira Ribeiro et al., 2002).

Dans notre étude, aucune perturbation au niveau biochimique n'a été observée en utilisant cet ensemble de biomarqueurs chez les moules. Deux hypothèses pourraient être envisagées: soit les paramètres biochimiques mesurés ne sont pas sensibles à une contamination environnementale par le TBT, comme suggéré par Oliveira Ribeiro et al. (2002) pour l'activité AChE, soit une durée d'exposition au TBT de l'ordre de quelques jours demeure un temps trop court pour pouvoir enregistrer une réponse de ces biomarqueurs. De plus, le stress occasionné par la stabulation des individus en microcosme pourrait contribuer à l'homogénéisation de la réponse biologique.

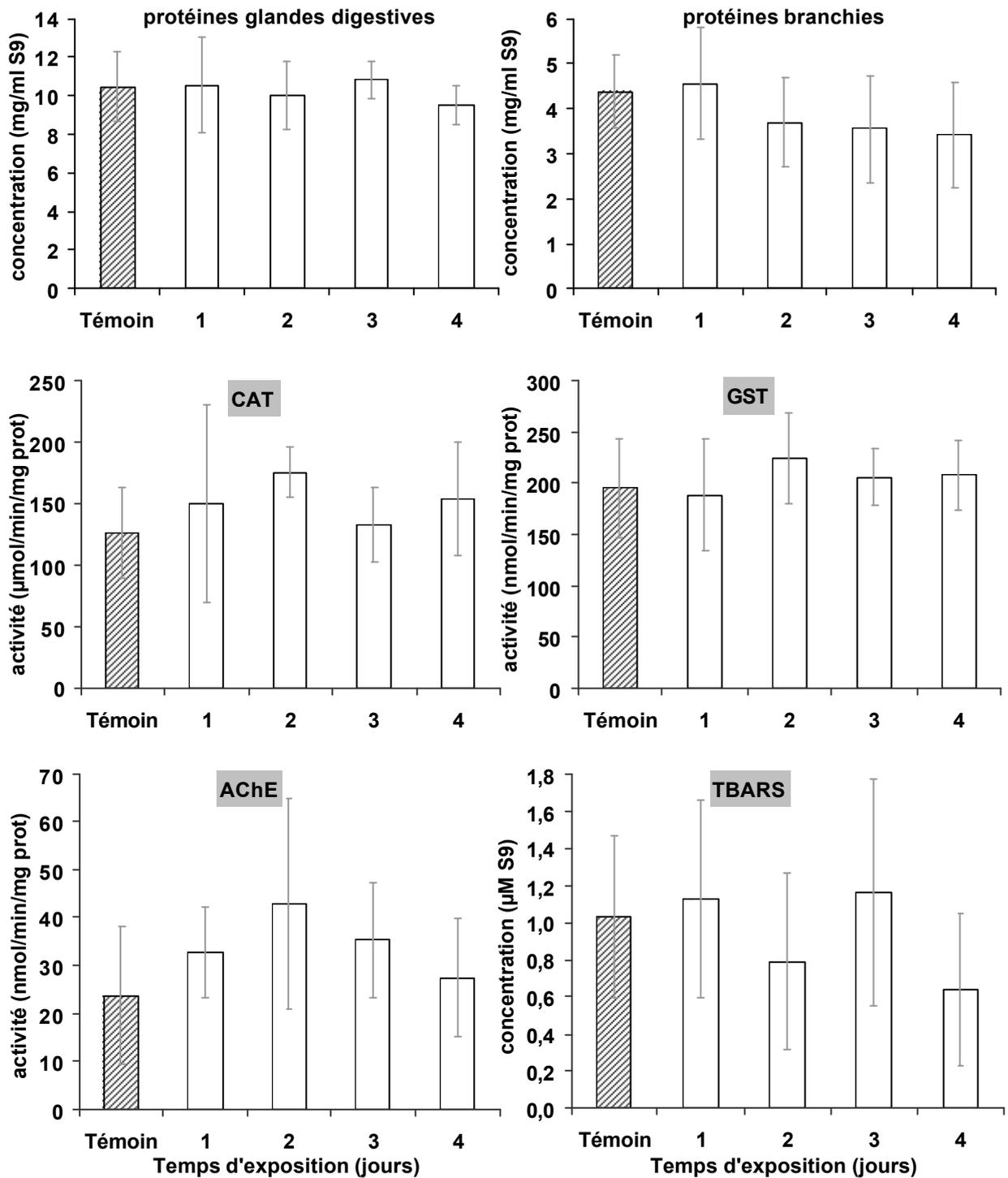


Figure III-10: Effet du TBT sur les teneurs en biomarqueurs chez *Mytilus sp.* exposées à une concentration de TBT de  $10 \text{ ng.L}^{-1}$  (Sn) pendant 4 jours.

## 1.5. Conclusion

Des moules *Mytilus sp.* ont été utilisées dans une étude à court terme en microcosme afin d'évaluer les effets du TBT sur les moules, en terme de bioaccumulation, de distribution tissulaire des composés organostanniques, et de perturbations du système enzymatique.

Un test préliminaire sur la dégradation du TBT en microcosme a montré que l'aération permanente de l'eau entraînait (1) une dégradation directe du TBT en étain inorganique et (2) la formation de deux espèces que nous supposons être des butylétains oxydés. Les pertes de TBT en 24h ont été estimées à 35% environ pour une concentration nominale de 1000 ng.L<sup>-1</sup>. L'aération permanente de l'eau de mer pourrait donc jouer un rôle important dans la biodisponibilité du TBT en modifiant la spéciation de ce dernier par la formation de composés butylétains oxydés.

Les concentrations de TBT dans les tissus de *Mytilus sp.* ont atteint  $2120 \pm 4$  et  $204 \pm 7$  ng.g<sup>-1</sup> (Sn) après 4 jours d'exposition dans les expériences C1 et C2, respectivement. L'analyse des différents tissus a montré que le TBT était accumulé de façon préférentielle dans les branchies pour la dose d'exposition C1 et dans les glandes digestives pour l'expérience C2. Les BCF étaient de  $2\ 000 \pm 10$  et  $12\ 100 \pm 300$  L.kg<sup>-1</sup> pour les expositions C1 et C2, respectivement. Les composés OX1-BT et OX2-BT, formés sous oxygénation de l'eau, ont été accumulés de façon plus importante (1) dans l'exposition à la plus faible dose, (2) que le TBT dans l'exposition C2.

La détermination des stéroïdes endogènes chez la moule a montré qu'une exposition à 10 ng.L<sup>-1</sup> (Sn) de TBT entraînait une diminution significative après 4 jours des teneurs en progestérone et en prégnénone, à la fois chez les individus femelles et chez les individus mâles, bien qu'aucune mise en évidence d'une perturbation endocrinienne induite par le TBT, basée sur l'étude des taux de stéroïdes endogènes, n'ait pu être rendue possible.

Aucune variation significative n'a été observée dans les activités mesurées et les teneurs en TBARS après 4 jours d'exposition au TBT, indiquant soit que les paramètres biochimiques mesurés ne sont pas sensibles à une contamination environnementale par le TBT, soit qu'une durée d'exposition au TBT de l'ordre de quelques jours demeure insuffisante pour pouvoir enregistrer une réponse de ces biomarqueurs.

## **2. Surveillance biologique du bassin d’Arcachon par transplantation de moules *Mytilus sp.***

(Publication en annexe 6)

### **2.1. Introduction**

Le concept de surveillance biologique (ou “*biomonitoring*”, selon le terme anglo-saxon consacré), qui repose sur l'étude de la réponse biologique des organismes aux polluants, est aujourd'hui en plein essor. Les effets biologiques des polluants peuvent en effet être assimilés à des indicateurs biologiques de pollution et la caractérisation de ces biomarqueurs peut permettre la mise en évidence précoce de la manifestation biologique de contaminations chimiques du milieu naturel avant l'altération de la structure des organismes, et surtout avant que toute la population ou l'écosystème soient perturbés. Dans les études de surveillance biologique, l'accent est aujourd'hui mis sur le couplage chimie/biologie car l'interdépendance de ces deux disciplines est une composante majeure de la surveillance des effets des polluants. Il convient de privilégier les approches multimarqueurs, en vue de fournir un indice global de qualité du milieu et, en dépit du manque de spécificité de chaque biomarqueur considéré individuellement, de révéler les principales classes de polluants impliqués.

C'est dans cet esprit que nous avons réalisée une étude de surveillance biologique dans le Bassin d'Arcachon en utilisant des moules transplantées. Le but premier était d'estimer les niveaux de présence des composés organostanniques dans le Bassin d'Arcachon et de regarder les effets éventuels du TBT sur la moule *Mytilus sp.* Mais les paramètres d'accompagnement (présence d'autres contaminants, évaluation de l'état physiologique des bivalves, etc...) n'ont pas été négligés afin, d'une part, de mieux caractériser les éventuels effets biologiques, et d'autre part, d'interpréter les données sur ces contaminants dans le temps et de le comparer aux données déjà existantes sur le bassin. Ce suivi a été réalisé sur toute une année afin d'intégrer le paramètre crucial de la variabilité saisonnière des niveaux des contaminants et des paramètres biochimiques dans les tissus de moules. Des moules *Mytilus sp.* provenant d'un site du bassin non contaminé en TBT ont été transplantées dans des cages pendant un mois sur deux sites portuaires de différents niveaux de contamination en TBT et trois parcs ostréicoles, et ce durant une année. Plusieurs classes de contaminants ont été déterminées dans les tissus de moules (les composés organostanniques, les métaux traces, les HAP et les PCB), ainsi qu'un ensemble de biomarqueurs (les activités AChE,

GST et catalase et les teneurs en TBARS) et différents indicateurs physiologiques (taux de lipides, poids sec, indices de condition).

Nous avons choisi le Bassin d'Arcachon comme site d'étude en raison de l'historique des teneurs en TBT dans cette lagune, où les premiers effets du TBT sur le développement larvaire des bivalves et la calcification de la coquille d'huître ont été reportés et ont conduit à l'interdiction de l'utilisation de peintures antisalissures à base de TBT (pour les bateaux de moins de 25 m) en France en 1982. Depuis, aucun suivi saisonnier ou régulier des teneurs en TBT n'a été réalisé dans le bassin et seulement quelques études ponctuelles (principalement dans les sédiments) ont été rapportées, à l'exception toutefois des analyses d'eau annuelles (juillet et août) réalisées par l'IFREMER Nantes. De plus, jamais une étude de surveillance biologique complète (de par le nombre de contaminants suivis et par l'intégration des réponses biologiques) n'a été réalisée sur le bassin et ce suivi permettra d'obtenir des renseignements complémentaires à ceux du RNO (Réseau National d'Observation, IFREMER) et de caractériser au mieux la qualité des eaux du bassin. Les différents sites d'étude ont été sélectionnés de façon à représenter tous les niveaux suspectés de contamination, du site le plus contaminé (le port d'Arcachon), à un site représentatif d'une contamination moyenne (le port de La Vigne), jusqu'aux sites non contaminés et économiquement importants (les parcs ostréicoles). Nous aurions également souhaité suivre différents points de la partie amont du bassin afin de caractériser les apports de contaminants des principaux cours d'eau, mais les très faibles salinités que l'on y rencontre en automne/hiver (souvent inférieures à 15), en plus de leur très grande fluctuation, rendent quasi inapplicable la technique de transplantation de moules *Mytilus sp.*, espèce très euryhaline (limites salines létales de 19 et 43), dans cette zone (viabilité des transplants et état physiologique).

La moule *Mytilus sp.* a été sélectionnée comme espèce sentinelle dans cette étude, en raison de son abondance dans le bassin et de la facilité d'échantillonnage et de maintien en cages sur les sites qu'elle offre. Elle a été préférée à l'huître *Crassostrea gigas*, cultivée dans le bassin, 1) pour sa capacité plus importante de bioaccumulation, à l'exception d'un certain nombre de métaux (au vu des résultats du RNO), 2) pour une réalisation plus aisée des transplantations et des préparations d'échantillons, vu la durée de l'étude et le nombre d'analyses effectuées, et 3) pour les connaissances déjà acquises au sein du laboratoire sur la bioaccumulation et la biotransformation des contaminants chimiques.

L'évaluation des effets biologiques dans le milieu marin nécessite l'obtention de données sur la relation entre les concentrations de polluants et leurs effets. Dans cette optique, nous avons privilégié une approche multimarqueurs en vue de fournir un indice global de la qualité du bassin et de révéler les principales classes de polluants impliquées. Les biomarqueurs que nous avons choisis sont les activités enzymatiques catalase (CAT),

glutathion S-transférase (GST), acétylcholinestérase (AChE) et le taux de substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (TBARS). L'activité GST est une enzyme participant à la détoxification des contaminants et l'activité AChE est un biomarqueur spécifique d'exposition aux pesticides organophosphorés et bromés et aux carbamates. Cependant, compte tenu des conditions d'exposition dans le milieu, où les organismes sont soumis aux effets simultanés d'un grand nombre de xénobiotiques, il est certain que les déséquilibres mesurés sur une activité enzymatique essentielle telle que l'activité AChE reflètent moins un effet spécifique qu'un impact global de la contamination. Nous avons également suivis des marqueurs de stress oxydatif, l'activité catalase et les teneurs en TBARS, indicateurs de l'état physiologique général des organismes. L'intérêt majeur des paramètres antioxydants en tant que biomarqueurs réside dans le caractère non-spécifique de leur réponse, ce qui constitue un avantage dans le contexte de la contamination multiple des écosystèmes. De plus, de part l'intérêt porté dans ce mémoire aux perturbations endocriniennes induites par le TBT chez les mollusques, nous avons également utilisé les taux de stéroïdes endogènes comme indicateur d'une dérégulation hormonale. Chez les bivalves, seulement quelques travaux ont mis en évidence des perturbations du métabolisme des hormones stéroïdiennes et des taux de stéroïdes chez *Mitylus edulis* et *Ruditapes decussata* (Morcillo et al., 1999, 2000). Ces auteurs ont rapporté une inhibition *in vivo* de l'activité aromatase, responsable de la conversion des androgènes en oestrogènes, chez ces bivalves. Ils ont également observé une augmentation significative des taux de testostérone chez des palourdes *Ruditapes decussata* transplantées pendant 5 semaines dans un port contaminé en TBT (El Masnou, Espagne).

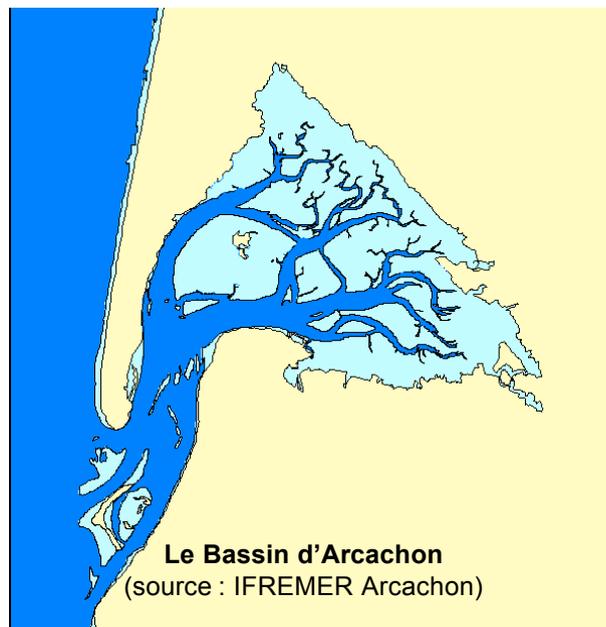
Mais l'évaluation de la santé d'un milieu est extrêmement complexe, avec des pollutions multi-contaminants sujettes à des phénomènes de synergie ou d'antagonisme, et la présence d'autres contaminants que les composés organostanniques dans le bassin, HAP (Baumard, 1997), PCB (Thompson et al., 1999a), métaux traces, nous a amené à suivre également ces différentes classes de contaminants pour évaluer au mieux la qualité des eaux du bassin et confirmer les niveaux de contamination organiques et métalliques. De plus, il apparaît évident, qu'en choisissant des sites portuaires dans cette étude, il existe également une contamination de ces milieux par un grand nombre de contaminants, et leur suivi, bien que non exhaustif, est indispensable pour ne pas biaiser l'interprétation des effets biologiques en les attribuant exclusivement aux composés organostanniques. Bien que toutes les espèces chimiques n'aient pas été déterminées, comme les pesticides par exemple même s'ils présentent des niveaux relativement faibles dans le bassin (Thompson et al, 1999a), notre volonté était d'élargir cette recherche pour aller au-delà d'un seul type de contamination et pour générer une évaluation globale de la contamination du bassin.

## 2.2. Présentation de l'étude réalisée sur le Bassin d'Arcachon

### 2.2.1. Présentation du Bassin

Le Bassin d'Arcachon est localisé au sud-ouest de la côte Atlantique française, à peu près à la même latitude que Bordeaux. Il présente une forme triangulaire d'environ 20 km de côté et une surface avoisinant les 155 km<sup>2</sup>, dont 50 km<sup>2</sup> de bancs de sable et de vase qui émergent entre les chenaux à marée basse. D'une largeur moyenne de 3 km, le couloir d'entrée du Bassin d'Arcachon est délimité par la Dune du Pyla au sud et par la Pointe du Cap Ferret au nord. Entre ces deux points, de vastes bancs de sable particulièrement instables, dont le Banc d'Arguin classé réserve naturelle depuis 1972, dessinent des passes étroites constituant les seules voies d'accès navigables entre le Bassin d'Arcachon et l'Océan Atlantique.

Dans les chenaux du Bassin d'Arcachon, les courants de marée au Cap-Ferret ont des vitesses à mi-profondeur de 1,5 m/s (2,9 nœuds) en vive-eau et de 0,75 m/s (1,5 nœuds) en morte-eau. Sur la barre, le service hydrographique (S.H. 550) donne 1 m/s (environ 2 nœuds) en flot et 1,75 m/s (3,4 nœuds) en jusant, au maximum (Orgeron et al., 1975). Les températures moyennes mensuelles des eaux du Bassin oscillent entre 7,5°C en janvier et 21,6°C en août (Le Dantec et al., 1968). Les températures de l'eau du Bassin



et de celles du large (golfe de Gascogne) tendent à s'équilibrer au printemps (11-12°C) et à l'automne (19-21°C). Le Dantec fait observer que les variations de salinité dans le Bassin d'Arcachon ne sont pas en relation directe avec le régime des eaux météorologiques, mais avec celui des eaux phréatiques; les salinités varient de 26 à 33 dans les chenaux principaux, mais peuvent descendre à 15 dans la partie amont de la lagune. Les autres caractéristiques du bassin sont: un développement phytoplanctonique printanier (mais des concentrations en orthophosphates extrêmement faibles toute l'année), des teneurs annuelles moyennes en chlorophylle a faibles en tout points du bassin, de fortes teneurs en matières en suspension (MES) et silicates en hiver, et aucune influence du pH et du taux d'oxygène dissous dans les chenaux principaux (paramètres stables).

Il reçoit les eaux de plusieurs cours d'eau dont le principal est l'Eyre (Manaud et al., 1997). Le temps de résidence hydrodynamique a été estimé à 35 jours. La zone couverte par les marées s'étend sur 115 km<sup>2</sup> dont 70 sont recouverts par *Zostera noltii* (la plus importante communauté algale d'Europe) et 10 par les parcs ostréicoles (Auby et al., 1993). Les déchets industriels ne sont plus rejetés dans le bassin depuis 1971 et les eaux usées sont traitées et rejetées à l'extérieur du Bassin par un système de collecteurs installé en 1974 et complété en 1988.

Le Bassin d'Arcachon est un milieu économiquement important par sa vocation halieutique et ostréicole. Les parcs à huîtres déployés sur plus de 900 hectares font du Bassin d'Arcachon le premier centre de naissain européen avec des exportations importantes en Bretagne et en Méditerranée. Mais c'est aussi une aire d'importante activité nautique accueillant plus de 15 000 bateaux de plaisance en été. De nombreux ports ou zones de mouillage sont situés sur le pourtour du bassin. Le port d'Arcachon, second port de plaisance de la côte ouest française après celui de la Rochelle, offre à ses plaisanciers 2600 anneaux sur une superficie de 21 hectares. La flottille du port de pêche est composée actuellement de 27 bateaux de 14 à 21 mètres de longueur. Durant l'hiver, la plupart des bateaux sont concentrés dans le port d'Arcachon, mais comme la plupart d'entre eux manœuvrent dans un périmètre bien délimité, leur activité durant la pleine saison (d'avril à août) affecte de façon homogène l'ensemble du bassin (Alzieu et al., 1980). Le nombre de bateaux de plaisance durant la pleine saison est passé d'environ 7500 en 1974 à un maximum de 15 000 en 1980/1981. A cette époque, Alzieu et al. (1980) ont estimé à 8 kg par jour la quantité de TBT relarguée dans les eaux du bassin, soit à 1,2 tonne de TBT par saison. Même si actuellement la flotte a augmenté, la réglementation française sur l'utilisation du TBT en 1982 fait de ces valeurs les apports de TBT les plus importants jamais introduits dans le Bassin d'Arcachon.

### **2.2.2. Description des sites de transplantation**

Nous avons sélectionné comme sites d'étude 3 sites portuaires (B, C: le port d'Arcachon, et D: le port de La Vigne) et 3 sites situés dans des concessions ostréicoles (E: le Grand Banc, F: le Ferret, G: le Banc d'Arguin), et utilisé le Moulleau (A) comme site de référence (figure III-11). Un autre site, La Barbotière (H), n'a été suivi que durant les trois derniers mois de l'étude (de décembre 2001 à février 2002). Pour cette raison, toutes les données enregistrées sur ce site sont reportées uniquement en annexe (annexe 1). Deux cages ont été utilisées dans le port d'Arcachon, le plus important et le plus contaminé du bassin, une au niveau de la station essence (tout comme celle du port de La Vigne) et une autre près du

chantier naval, afin de caractériser d'éventuelles différences d'origine et d'apports de contaminants dans le port.

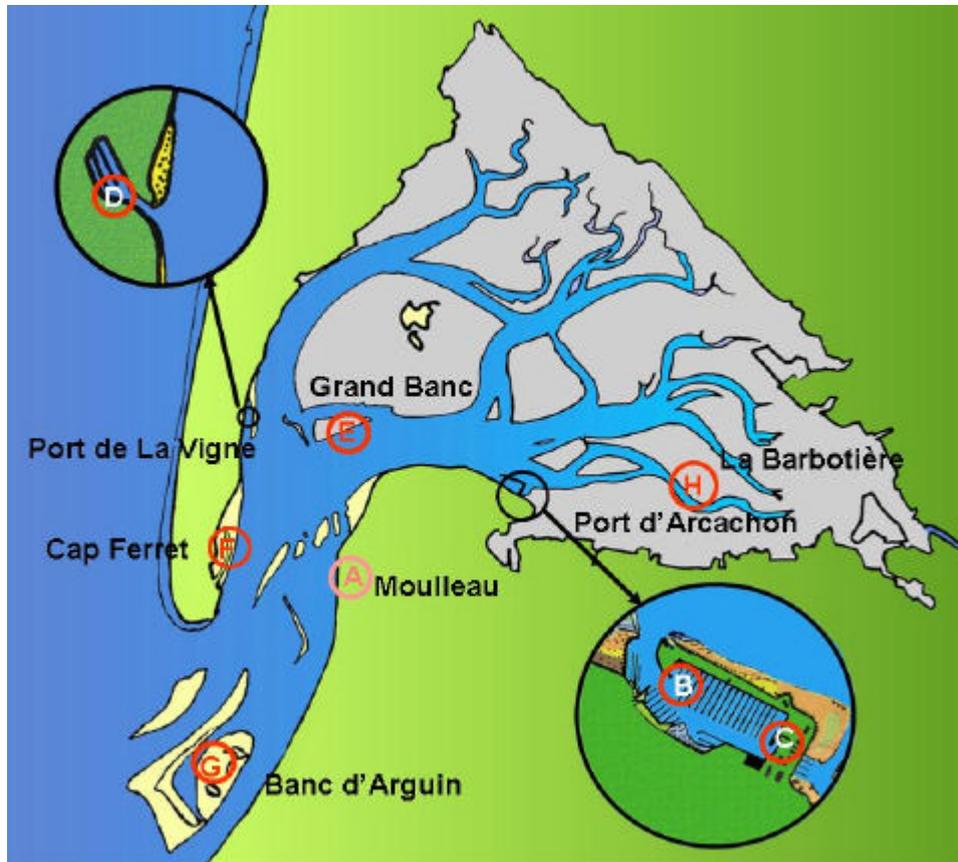


Figure III-11: Localisation des sites de transplantation sur le Bassin d'Arcachon.

A: Plage du Moulleau-Pyla, site de référence:

Situé près de l'entrée du Bassin, après la Dune du Pyla, ce site parsemé de nombreuses digues rocheuses constitue une impressionnante réserve de moules. C'est également une zone de mouillage pour quelques dizaines de bateaux.

B: Port d'Arcachon, à proximité du ponton à essence:

C: Port d'Arcachon, au fond du port, à l'entrée du chantier naval:

Le port d'Arcachon, second port de plaisance de la côte ouest française après celui de la Rochelle, offre à ses plaisanciers 2600 postes sur une superficie de 21 hectares. La flottille du port de pêche est composée actuellement de 27 bateaux.



Port d'Arcachon

D: Port de La Vigne, à proximité du ponton à essence

Ce port construit en 1960 est le premier port de la presqu'île de Lège-Cap Ferret avec 300 postes. Comportant de nombreuses installations, dont une cale de mise à l'eau, le port abrite également plusieurs bateaux de pêche.



Port de La Vigne

E: Parcs ostréicoles du Grand Banc

F: Parcs ostréicoles du Cap Ferret

G: Parcs ostréicoles du Banc d'Arguin

H: La Barbotière, sortie du chenal du port de La Barbotière, suivi uniquement durant l'hiver.



Vue aérienne du Banc d'Arguin



Parcs ostréicoles du Banc d'Arguin

### 2.2.3. Protocole général de l'expérience

Des moules *Mytilus sp.* provenant d'un site du bassin non contaminé ont été transplantées dans des cages pendant un mois sur deux sites portuaires de différents niveaux de contamination et trois parcs ostréicoles, et ce durant une année. Nous avons suivis mensuellement plusieurs classes de contaminants dans les tissus de moules *Mytilus sp.*: les composés organostanniques (OT), les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les polychlorobiphényles (PCB) et des métaux traces sélectionnés (MET), ainsi qu'un ensemble d'indicateurs biologiques: les marqueurs biochimiques (AChE, GST, CAT, TBARS) et les teneurs en stéroïdes (figure III-12).

### **2.2.3.1. Collecte des moules**

600 moules *Mytilus sp.* environ, d'une taille de 4,5 à 5,5 cm (poids des tissus mous de 1,2 à 1,8 g), sont collectées à marée basse sur le site de référence, au Moulleau-Pyla. Ce site a été sélectionné comme site de référence en raison, d'une part, de l'abondance de moules facilitant les collectes mensuelles et, d'autre part, des teneurs extrêmement faibles en composés organostanniques enregistrées sur ce site. Les moules sont nettoyées au couteau (raclage rapide des balanes et des concrétions) puis réparties aléatoirement dans 6 cages de 80 individus. Les moules restantes sont transportées dans un seau au laboratoire et préparées en vue des analyses pour la détermination des conditions initiales.

### **2.2.3.2. Mise en place des cages**

Les cages contenant les moules transplantées sur les sites portuaires sont des cages en plastique utilisées en ostréiculture. Elles mesurent 40 cm de longueur, 30 cm de largeur et 10 cm de hauteur. Elles sont attachées à une allée flottante du port, à une profondeur d'immersion comprise entre 0,5 m et 1 m qui assure leur position à 1 m au-dessus du sédiment à marée basse. Les cages contenant les moules transplantées sur les sites ostréicoles sont des pochons en grillage plastique épais utilisés en ostréiculture avec un maillage de 6 mm. Elles mesurent 100 cm de longueur, 50 cm de largeur et 45 cm de hauteur.

Une cage a aussi été placée sur le site de référence dans le but d'intégrer l'effet de la mise en cage sur la bioaccumulation des contaminants et sur les biomarqueurs des animaux témoins. Malheureusement, les cages n'ont jamais été retrouvées sur ce site en raison de son importante fréquentation, causée par l'abondance de moules que l'on y trouve. La mise en place de cages sur ce site a donc été abandonnée.

### **2.2.3.3. Préparation des échantillons et analyses**

Le protocole général de l'expérience est rappelé à la figure III-13. Les préparations d'échantillons pour chaque type d'analyse sont détaillées dans le chapitre II, paragraphe 4.2.1.

**COMPOSES ORGANOSTANNIQUES**

Nom	Abbrev.
Monobutylétain	MBT
Dibutylétain	DBT
Tributylétain	TBT
Monophénylétain	MPT
Diphénylétain	DPT
Triphénylétain	TPT

**PCB**

Nom	Abbrev.
2,4,4'-trichlorobiphényle	PCB 28
2,2',5,5'-tetrachlorobiphényle	PCB 52
2,3',4,4',5-pentachlorobiphényle	PCB 118
2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphényle	PCB 153
2,2',3,4,4',5'-hexachlorobiphényle	PCB 138
2,2',3,4,4',5,5'-heptachlorobiphényle	PCB 180

**METAUX**

Nom	Abbrev.
Bore	B
Aluminium	Al
Chrome	Cr
Manganèse	Mn
Fer	Fe
Cobalt	Co
Nickel	Ni
Cuivre	Cu
Zinc	Zn
Arsenic	As
Sélénium	Se
Cadmium	Cd
Rubidium	Rb
Strontium	Sr
Plomb	Pb



**HAP**

Nom	Abbrev.
Naphthalène	N
Acénaphthylène	Ay
Acénaphthène	Ae
Fluorène	Fe
Dibenzothiophène	DBT
Phénanthrène	Phe
Anthracène	A
3-Méthylphénanthrène	3 MP
2-Méthylphénanthrène	2 MP
9-Méthylphénanthrène	9 MP
1-Méthylphénanthrène	1 MP
Fluoranthène	F
Pyrène	Pyr
Benzo(a)anthracène	BaA
Chrysène	Chrys
Benzo(b,k,j)fluoranthène	B(b+k+j)F
Benzo(e)pyrène	BeP
Benzo(a)pyrène	BaP
Indénopyrène	Ipyr
Dibenzo(a,h)anthracène	DahA
Benzo(g,h,i)pérylène	Bper

**MARQUEURS BIOCHIMIQUES**

Nom	Abbrev.
Acétylcholinestérase	ACHé
Glutathion S-transférase	GST
Catalase	CAT
Espèces réactives avec l'acide thiobarbiturique	TBARS

**STEROIDES**

Nom	Abbrev.
Progestérone	Pg
Prégnénolone	Pn

Figure III-12: Ensemble des contaminants et des biomarqueurs suivis dans le programme de surveillance biologique du Bassin d'Arcachon.

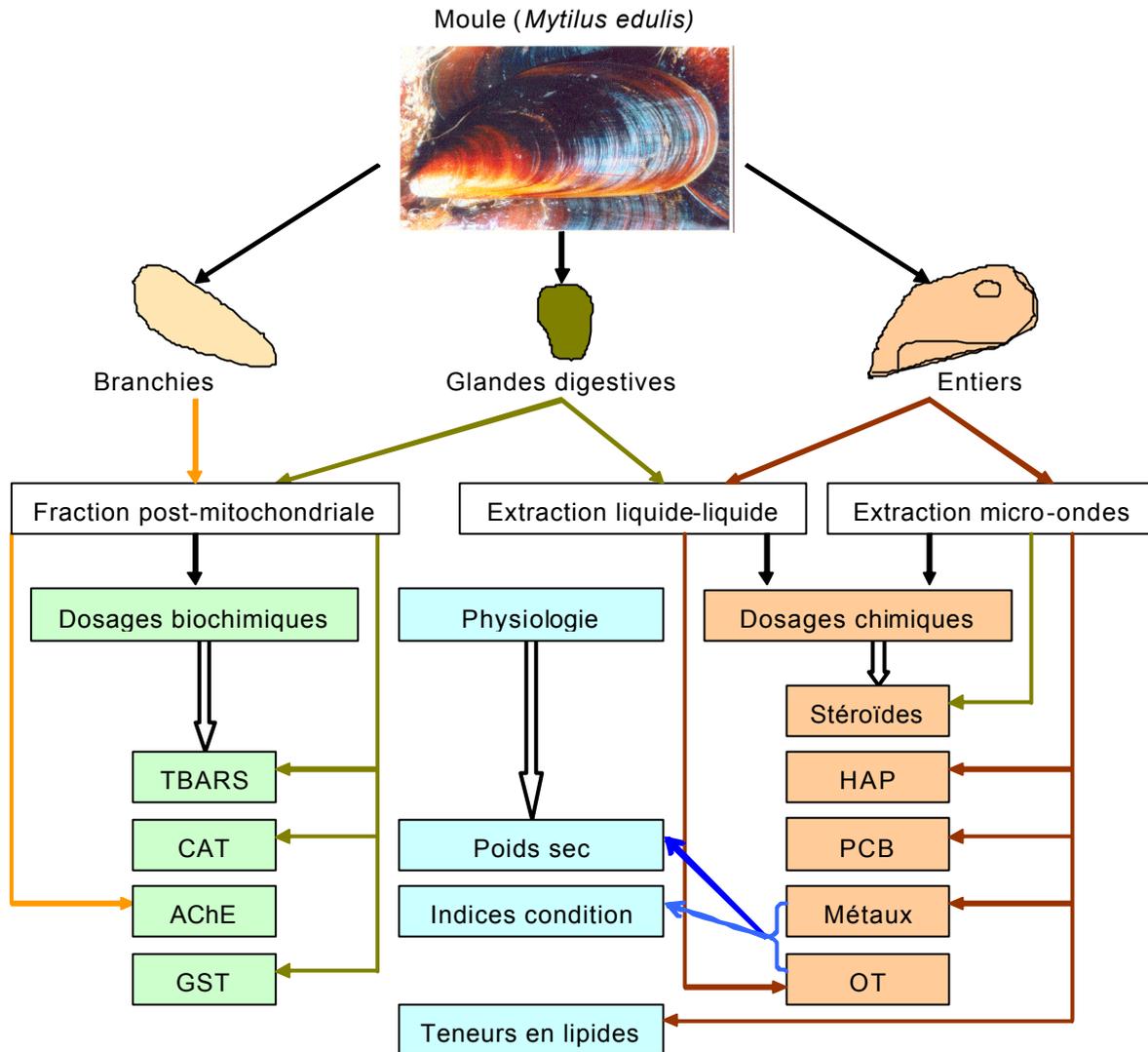


Figure III-13: Schéma général des analyses réalisées dans l'étude de surveillance biologique du Bassin d'Arcachon.

### 2.3. Résultats et discussion

La grande quantité de données recueillies dans cette expérience a rendu leur interprétation relativement complexe. Nous discuterons tout d'abord les résultats des dosages des différents contaminants, nous aborderons ensuite les résultats recueillis sur les paramètres biochimiques. Dans la mesure du possible, nous essaierons de relier les données biologiques aux données chimiques, d'abord d'une façon globale sur l'ensemble des sites, puis de façon plus particulière en fonction des tendances spécifiques observées.

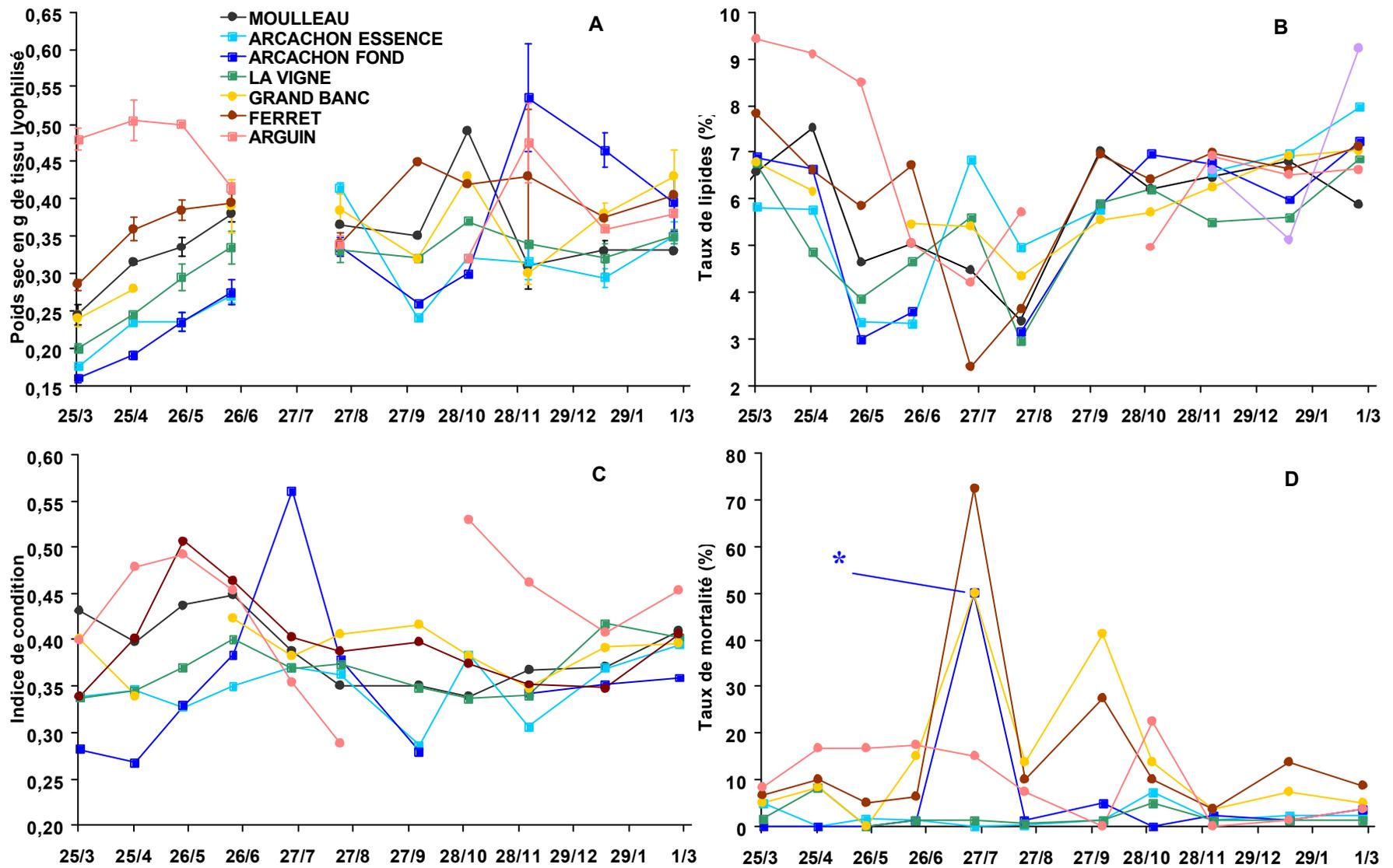


Figure III-4: Paramètres physiologiques des bivalves enregistrés pour chaque site. A: Poids sec individuel; B: Taux de lipides (en % de poids sec); C: Indices de condition; D: Taux de mortalité, \* sur six individus récupérés dans la cage.

### 2.3.1. Etat physiologique des individus transplantés

Les paramètres physiologiques moyens des moules utilisées dans cette étude sont détaillés dans le tableau III-6 et leurs variations saisonnières sont représentées à la figure III-14.

Taille (mm)	Poids (g)		Taux (%)	
	individu	tissus mous	tissus secs	humidité
41,6 ± 1,8	1,6 ± 0,5	0,35 ± 0,05	81,0 ± 2,4	5,9 ± 1,5

**Tableau III-6: Paramètres physiologiques des moules transplantées moyennés sur l'ensemble des sites et des périodes (1160 individus).**

#### 2.3.1.1. Viabilité des transplantations (mortalité)

La mortalité de transplantation a été faible sur l'ensemble des sites (inférieure à 10%) mais a été néanmoins plus élevée sur les sites ostréicoles que sur les sites portuaires, en particulier pour les mois de juillet et septembre au Grand Banc et au Ferret et pour la période d'avril à octobre au Banc d'Arguin (tableau III-7 et figure III-14d). Les valeurs de mortalité sur les parcs ostréicoles indiquent que les conditions environnementales (période d'émersion, hydrodynamisme, température, etc...) à certaines périodes de l'année génèrent un stress physiologiques chez les animaux. Cependant, les facteurs de condition des animaux survivants ne semblent pas affectés pour les périodes de forte mortalité.

	Taux de mortalité (%)										
	26-mars	26-avr	23-mai	20-juin	23-juil	20-août	3-oct	31-oct	4-déc	16-janv	26-févr
B	5	0	2	1	0 **	0	1	8	1	3	3
C	0	0	0	1	50 *	1	5	0	3	1	4
D	2	8	0	1	1	0	1	5	1	1	1
E	5	8	0	15	50	14	41	14	4	8	5
F	7	10	5	6	73	10	28	10	4	14	9
G	8	17	17	18	15	8	0	23	0	1	4
H									0	10	8

**Tableau III-7: Taux de mortalité des individus transplantés pendant un mois (sur un total de 80 individus). \* sur les six individus récupérés dans la cage, \*\* sur deux individus.**

Les fortes mortalités observées ne semblent pas attribuables aux niveaux de contamination des sites, ni aux conditions d'exposition des animaux en cages, puisque ces dernières sont similaires à celles du site de référence (alternance de périodes d'immersion/émersion suivant le cycle des marées), contrairement aux sites portuaires

(immersion permanente des animaux et hydrodynamisme plus faible), d'autant plus que les indices de condition ne révèlent pas de perturbations physiologiques sur les parcs durant la période de transplantation. Il est donc possible que le temps passé en émergence chez l'ostréiculteur, avant le dépôt des cages sur les parcs ostréicoles ou après leur récupération, ait pu affecter l'état physiologique des individus.

### 2.3.1.2. Indices de condition

L'analyse de variance réalisée sur l'ensemble des indices de condition (IC1, sur 1150 individus) a permis de montrer des différences significatives de l'état physiologique des individus transplantés entre les sites d'étude (tableau III-8). Ceux obtenus dans le port d'Arcachon sont plus faibles (sites B : station essence et C : chantier naval) que ceux relevés sur les parcs ostréicoles (sites E: Grand Banc, F: Ferret, G: Arguin) et sur le site de référence (sites A : Moulleau) (figure III-14c). A l'intérieur de ces deux groupes, les sites sont indifférenciés, à l'exception de ceux du Banc d'Arguin (significativement distincts de chacun des autres sites) présentant les indices de condition les plus faibles en été et plus élevés le reste de l'année. De plus, au sein des sites faiblement contaminés, les parcs ostréicoles ne sont pas significativement différents du site de référence et présentent les mêmes profils de variation, indiquant que la technique de transplantation en cage ne génère pas de stress physiologique important chez les moules transplantées sur ces sites.

Les indices de condition enregistrés dans le port de La Vigne (site D) sont intermédiaires entre ceux de ces deux groupes et ne sont pas statistiquement différenciables de tous les autres sites. Le niveau de contamination des sites d'étude pourrait donc influencer sur l'état physiologique des individus transplantés, puisque les indices de condition utilisés pour le caractériser discriminent les sites ne présentant aucune contamination avérée (sites A, E, F, G) des sites les plus fortement contaminés (sites B, C).

N=1150	B	C	D	E	F	G
A	<b>0,044</b>	<b>0,005</b>	0,974	0,952	0,567	<b>0,000</b>
B		0,997	0,476	<b>0,002</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>
C			0,133	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>
D				0,472	0,107	<b>0,000</b>
E					0,998	<b>0,019</b>
F						0,112

Tableau III-8: Degré de significativité du test de Tuckey (valeur de p) de l'analyse de variance réalisée sur les indices de condition des individus. Les données en gras représentent les sites significativement différents entre eux.

Cependant, si on compare maintenant les indices de condition des sites portuaires par rapport à ceux du site de référence pour chaque période annuelle suivie, on constate que les différences intersites significatives ne coïncident pas avec les niveaux des contaminants enregistrés sur ces sites. Par exemple, seuls A et B sont différents en juin alors que C est beaucoup plus contaminé que B (principalement par les HAP) à cette période. De la même façon, aucune différence significative n'est observée en juillet et août alors que la période estivale présente les plus fortes différences de concentration en contaminants par rapport au site de référence. Ainsi, il apparaît que le milieu de transplantation (milieux portuaires plus confinés et animaux soumis à un régime hydrodynamique plus faible) joue un rôle plus important que le niveau de contamination sur l'état physiologique des animaux transplantés. Les indices de conditions sur le site de référence sont les plus élevés au printemps (mars, avril, mai, juin), et sont significativement différents de chaque site portuaire alors qu'ils ne le sont plus pendant l'été. C'est donc durant cette période printanière que l'état physiologique des animaux transplantés semble le plus fortement perturbé.

Globalement, les facteurs de condition  $[IC(\text{site } x, \text{mois } y) / IC(\text{site } A, \text{mois } y-1)]$  enregistrés sur les sites ostréicoles sont supérieurs ou égaux à 1 et ceux des sites portuaires sont sensiblement inférieurs à 1. Cependant, ceux du Banc d'Arguin fluctuent de façon plus conséquente, étant les plus faibles pendant l'été et les plus élevés le reste de l'année.

### **2.3.1.3. Taux de lipides**

Une importante diminution de la teneur en lipides dans les tissus a été observée de la période hivernale à la période estivale (de janvier à août) (figure III-14b). Cette diminution pourrait être due à l'utilisation des réserves lipidiques pour la reproduction en été, mais aussi à un facteur de dilution induit par la croissance des tissus en été. En effet, les variations des taux de lipides étant plus faibles que celles du poids des animaux, une croissance rapide des tissus au printemps pourrait masquer une augmentation ou une diminution des taux de lipides. Si on ne prend en compte que cette première partie de l'année, on observe dans le même temps une corrélation négative entre les teneurs en lipides et les concentrations totales en composés organostanniques et en HAP (pour les sites portuaires uniquement, puisque les concentrations sur les sites ostréicoles sont relativement faibles et constantes). Cette tendance n'est pas en accord avec les travaux de certains auteurs ayant observé une corrélation positive entre les teneurs en contaminants organiques (HAP et PCB) et les teneurs en lipides (Gunther et al., 1999).

Sur la totalité de l'année, aucune corrélation entre les concentrations individuelles ou totales des différents contaminants et les taux de lipides n'a été observée. Par contre, le

rapport des concentrations des deux HAP Phe/A semble être positivement corrélé au taux de lipides ( $r=0,652$ ,  $p<0,001$ ,  $N=38$ ).

### **2.3.2. Les composés organostanniques**

L'ensemble des résultats de cette étude de biosurveillance ont été obtenus sur les tissus de moules, mais des analyses d'échantillons d'eau et de sédiments ont également été réalisées sur les sites portuaires pour les mois de mai et de juin afin de caractériser les niveaux de contaminants présents dans la colonne d'eau ou piégés dans les sédiments et susceptibles d'être remis en suspension par brassage du sédiment.

#### **2.3.2.1. Eaux**

Les concentrations en butylétains retrouvées dans les eaux des ports d'Arcachon et de La Vigne, collectées en mai et juin 2001, sont rassemblées dans le tableau III-9. A titre comparatif, une synthèse bibliographique des concentrations en TBT enregistrées dans les eaux du Bassin de 1986 à 2000, réalisées par les Dr P. Michel et C. Alzieu (IFREMER Arcachon), est aussi mentionnée dans le tableau III-10.

Les concentrations en TBT dans les eaux du port d'Arcachon sont comprises entre 1,5 et 5  $\text{ng.L}^{-1}$ . Le TBT n'a pas été détecté dans les eaux du port de La Vigne. Les concentrations obtenues dans cette étude en mai et juin 2001 sont en accord avec celles mesurées par l'IFREMER en juillet et août 2001. Les deux tableaux de données ne semblent pas indiquer d'amélioration de la qualité des eaux du port d'Arcachon depuis 1992, témoignant de la rémanence de la pollution par le TBT dans le bassin.

Compte tenu d'effets toxiques du TBT sur les organismes marins à une concentration de 1  $\text{ng.L}^{-1}$  (Alzieu et Michel, 1998), on voit que les niveaux de concentration rencontrés actuellement dans le Bassin d'Arcachon sont supérieurs à ce niveau, avec la possibilité des effets rencontrés dans les années 80: effets sur les gastéropodes (Bryan et Gibbs, 1991), effets sur le développement larvaire de *Mytilus edulis* (Alzieu et Michel, 1998) et effets sur la calcification des huîtres *Crassostrea gigas* avec des phénomènes de chambrage (formation de chambres remplies d'une substance gélatineuse) qui, bien que moins importants que dans les années 1980, n'ont pas totalement disparus (Alzieu, 2000). De plus, une étude réalisée par Fernandez Castro et al. (1995) a montré que toutes les femelles de bigorneaux perceurs *Ocenebra erinacea* du Bassin d'Arcachon étaient encore affectées par l'imposex.

ng.L <sup>-1</sup> (Sn)	MBT		DBT		TBT	
	23/05	20/06	23/05	20/06	23/05	20/06
Port d'Arcachon (essence)	3,5 ± 0,8	0,7 ± 0,1	2,5 ± 0,2	3,6 ± 0,2	5,1 ± 0,9	3,4 ± 0,2
Port d'Arcachon (fond)	4,9 ± 1,4	< LQ	3,6 ± 0,4	5,4 ± 0,3	3,8 ± 0,5	1,4 ± 0,1
Port de La Vigne	8,3 ± 0,3	< LQ	< LQ	1,8 ± 0,2	< LQ	< LQ

Tableau III-9: Concentrations en butylétains enregistrées dans les eaux du Bassin d'Arcachon en mai et juin 2001 (analyses en triplicats). LQ : inférieure à 0,5 ng.L<sup>-1</sup>.

[TBT] en ng.L <sup>-1</sup> (Sn)	1982-83-85 *	1986 **	1987 **	05/92
[OTs] totaux:				
Port d'Arcachon (essence)	200-900-<100	3,3-23,4	4,1-20,5	2,9
Port d'Arcachon (criée)				
Ferret				
Grand Banc				
Lahillon	100	<0,8-20,9	0,8 - 2,0	<0,1
Port de La Vigne (sortie)		0,8-36,5	<0,8 - 12,3	1,2

[TBT] en ng.L <sup>-1</sup> (Sn)	08/97	08/98	07/00	08/00	07/01	08/01
Port d'Arcachon (essence)	9,0	3,4	6,2	2,5	7,3	2,3
Port d'Arcachon (criée)	5,2	1,8	8,6	5,9	4,5	2,9
Ferret	0,5	-	0,1	1,0	<0,2	0,3
Grand Banc	1,0	<0,2	0,1	0,2	<0,2	0,5
Lahillon						
Port de La Vigne (sortie)						

Tableau III-10: Historique des concentrations en TBT enregistrées dans les eaux du Bassin d'Arcachon de 1986 à 2001 (données IFREMER Arcachon, et \* données Alzieu et al., 1986 et \*\* données Alzieu et al., 2000).

[Sn] ng.g <sup>-1</sup> p.s.	MBT		DBT		TBT	
	23/05	20/06	23/05	20/06	23/05	20/06
Arcachon essence	330 ± 13	369 ± 29	342 ± 19	346 ± 15	361 ± 12	429 ± 31
Arcachon fond	209 ± 21	912 ± 78	219 ± 17	639 ± 30	239 ± 21	680 ± 53
La Vigne		64 ± 13		42 ± 2		10 ± 3

[Sn] ng.g <sup>-1</sup> p.s.	MPT		DPT		TPT	
	23/05	20/06	23/05	20/06	23/05	20/06
Arcachon essence	9 ± 2	5 ± 1	8 ± 1	7 ± 1	18 ± 3	16 ± 4
Arcachon fond	7 ± 1	3 ± 1	2 ± 0,1	16 ± 0,2	3 ± 0,1	29 ± 5
La Vigne						

Tableau III-11: Concentrations en butylétains enregistrées dans les sédiments des sites portuaires en mai et juin 2001 (analyses en triplicats; les concentrations des composés monoalkylés n'ont pas été corrigées par le taux de récupération de ces composés).

### 2.3.2.2. Sédiments

Seuls les sédiments des sites portuaires ont été analysés pour les mois de mai et de juin 2001 (fraction granulométrique inférieure à 200  $\mu\text{m}$ ). Les résultats obtenus sont synthétisés dans le tableau III-11. De la même façon que pour les données recueillies dans les eaux, une synthèse bibliographique des concentrations en butylétains enregistrées dans les sédiments du Bassin dans différentes études antérieures est présentée dans le tableau III-12.

Les sédiments du port de La Vigne présentent une très faible contamination en TBT et en butylétains totaux (10 et 120  $\text{ng.g}^{-1}$  en poids sec, respectivement) et aucun phénylétain n'a été détecté. Les concentrations en TBT et en butylétains retrouvées dans les sédiments superficiels du port d'Arcachon sont de 350 et 1100  $\text{ng.g}^{-1}$  (p.s.) pour la station essence. Dans les deux échantillons prélevés dans le fond du port, ces concentrations sont plus élevées en moyenne mais totalement inhomogènes entre elles; le sédiment du mois de mai présente des teneurs en TBT et en butylétains de 200 et 600  $\text{ng.g}^{-1}$  (p.s.) respectivement, et celui de juin, de 600 et 2200  $\text{ng.g}^{-1}$  (p.s.). Les composés phénylés de l'étain ont été détectés dans le port d'Arcachon uniquement. Les concentrations en TPT et en phénylétains sont de 17 et 45  $\text{ng.g}^{-1}$  (p.s.) à la station essence et de 3 et 11  $\text{ng.g}^{-1}$  (p.s.) et 30 et 90  $\text{ng.g}^{-1}$ , respectivement pour les deux sédiments prélevés dans le fond du port. Ces importantes disparités relevées dans les concentrations en butylétains des sédiments ont déjà été observées dans les sédiments du port d'Arcachon par Quevauviller et al. (1994) et Sarradin et al. (1994). Selon ce dernier, les remises en suspension hydrodynamiques vigoureuses des couches sédimentaires (bioturbation), probablement durant les tempêtes hivernales et les fortes marées, auraient plus d'incidence sur la composition en butylétains dans les 30 premiers centimètres de sédiments du port d'Arcachon que les phénomènes de dégradation de ces composés.

Les concentrations enregistrées dans les sédiments du port d'Arcachon sont parmi les plus élevées (avec celles obtenues par Amouroux et al., 2000) des concentrations rapportées dans les études antérieures (tableau III-12), y compris pour celles enregistrées dans toutes les couches sédimentaires d'une carotte du port où la concentration en TBT en surface (0-5 cm) est de 110  $\text{ng.g}^{-1}$  (p.s.) et en butylétains de 300  $\text{ng.g}^{-1}$  (p.s.) (Quevauviller et al., 1994). Un seul échantillon prélevé au fond du port, face au bâtiment de la criée, présente des concentrations similaires à celles que nous avons obtenues dans le sédiment du fond le plus contaminé. Une campagne réalisée en octobre 1990 (Sarradin et al., 1994) a montré que sur les 7 ports prospectés, 3 présentaient des concentrations en TBT dans la couche superficielle de 150 à 200  $\text{ng.g}^{-1}$  (p.s.) (Arcachon, Andernos et Larros) et de 450 à 560  $\text{ng.g}^{-1}$

(p.s.) en butylétains (pour la fraction granulométrique inférieure à 100  $\mu\text{m}$ ). Dans de récents travaux, Amouroux et al. (2000) ont enregistré des concentrations en TBT et en butylétains dans les sédiments du port respectivement de 600 et 3600  $\text{ng.g}^{-1}$  (p.s.) pour la fraction vaseuse et de 3340 et 8500  $\text{ng.g}^{-1}$  (p.s.) pour la fraction sablonneuse, représentant les plus fortes concentrations enregistrées dans les sédiments du port. Ces résultats confirment également le fait que le port d'Arcachon constitue la source de contamination en composés organostanniques pour l'ensemble du Bassin. En effet, selon Quevauviller et al. (1994), la source principale de pollution par le TBT semble être la remise en suspension des sédiments contaminés du port d'Arcachon lors des opérations de dragage et de leur dépôt dans le Bassin, ce qui conduirait à la diffusion de la contamination à l'intérieur du Bassin. Les concentrations importantes de TBT retrouvées dans des zones n'accueillant que très peu de bateaux tendent à confirmer cette tendance (Sarradin et al., 1991). Une première approche du devenir du TBT lors des opérations de dragage des ports, menées en 1991, a permis à ces auteurs d'observer le non relargage de TBT dans la colonne d'eau durant le dragage du port de Gujan-Mestras. Par contre, lors du dragage du port d'Arcachon, la remise en suspension du sédiment s'est traduite par le dépôt de sédiment pollué sur le site après dragage; une partie de ce sédiment a donc pu être transportée vers d'autres sites, contribuant à la pollution diffuse du Bassin. La dernière opération de dragage du port d'Arcachon a eu lieu en 2000 (Capitainerie du port d'Arcachon, comm. pers.). Cette opération pourrait expliquer les fortes concentrations en butylétains enregistrées dans cette étude dans les sédiments du port. Notons également que l'interprétation des teneurs en contaminants dans les bivalves ne sera pas biaisée par ce type d'opération, aucun dragage du port n'ayant eu lieu pendant l'expérience de transplantation.

Matthiessen et Thain, (1989) ont montré que des concentrations d'exposition au TBT dans les sédiments de 40  $\text{ng.g}^{-1}$  (p.s.) entraînaient une chute des populations d'organismes benthiques (le polychète *Scoloplos armiger* et l'amphipode *Urothoe poseidonis*) au bout de 5 mois. Langston et al. (1991) ont montré que des concentrations de 300  $\text{ng.g}^{-1}$  produisaient des effets toxiques chez le scrobiculaire *Scrobicularia plana* (disparition de populations sur les sites présentant ces niveaux de contamination dans les sédiments). De plus, Ruiz et al. (1994) ont observé une inhibition significative de la croissance et de l'activité d'enfouissement dans le sédiment (nécessaire pour se soustraire à la prédation) chez ces bivalves exposés à un sédiment contaminé par du TBT (270  $\text{ng.g}^{-1}$  Sn p.s.). D'après ces données, on voit que les niveaux de concentration rencontrés actuellement dans les sédiments du Bassin d'Arcachon sont supérieurs aux concentrations d'effets observés dans d'autres endroits.

Sédiments	MBT ng.g <sup>-1</sup>	DBT (Sn)	TBT p.s.	Remarques	Référence
<u>Carotte sédimentaire</u>					
Port d'Arcachon				collecte: date NP	Quevauviller et al., 1994
0-1 cm	100	86	111	granulométrie: NP	
4-5 cm	98	90	106	(NP: non précisée)	
6-7 cm	95	88	116		
9-10 cm	65	64	49		
11-12 cm	112	86	80		
15-16 cm	156	141	161		
20-21 cm	62	94	92		
25-26 cm	59	87	77		
30-36 cm	38	53	88		
40-41 cm	20	31	30		
50-51 cm	6	5	16		
<u>Sédiments superficiels</u>					
Port d'Arcachon (face créée)				collecte: date NP	Quevauviller et al., 1994
> 60 µm	48	15	17		
< 60 µm	868	131	596		
Port d'Arcachon	244	165	152	couche: 0 - 5 cm granulométrie: <100 µm collecte: 1990	Sarradin et al., 1994
Port de La Teste	61	40	42		
Port de Larros	125	200	200		
Port d'Andernos	49	212	187		
Port de Piraillan	17	18	19		
Arès	24	22	5		
Les Jacquets (+ mouillage)	18	32	27		
Cap Ferret (+ mouillage)	44	143	32		
Pointe du Grand Banc	<LD	5	12		
Le Tès	13	9	16		
Lège	69	31	19	couche: 0 - 5 cm granulométrie: <100 µm collecte: été 1993	Ruiz et al., 1997
Iles aux Oiseaux	41	9	7		
L'Aiguillon	25	29	30		
Cap Ferret (+ mouillage)	71	17	15		
Lanton	38	10	11		
Port d'Arcachon:				couche: 0 - 5 cm collecte: avril 1997	Amouroux et al., 2000
Fraction vaseuse	2460	530	600		
Fraction sablonneuse	2720	2030	3340		
Port d'Arcachon:				couche: 0 - 5 cm granulométrie: <200 µm collecte: juin 2001	Cette étude
Station essence (site B)	370	430	346		
Chantier naval (site C)	910	680	640		
Port de La Vigne (site D)	64	42	10		

**Tableau III-12: Données rapportées dans différents travaux sur les concentrations en butylétains dans les sédiments du Bassin d'Arcachon (ng.g<sup>-1</sup> Sn p.s.).**

### 2.3.2.3. Moules

Les moyennes annuelles des concentrations en composés organostanniques enregistrées sur chacun des sites sont représentées dans le tableau III-13. L'ensemble des données brutes obtenues sur chaque site est détaillé en annexe 1. A titre comparatif, une

synthèse bibliographique des concentrations en butylétains enregistrées dans différents bivalves du Bassin est également présentée dans le tableau III-14.

Site	MBT	Moyennes annuelles (ng/g Sn p.s.)			ΣOTs
		DBT	TBT		
Moulleau	4 ± 3	12 ± 4	27 ± 3	43 ± 8	(32 - 148*)
Arcachon essence	79 ± 46	461 ± 294	1621 ± 455	2191 ± 759	(1172 - 3601)
Arcachon fond	78 ± 28	475 ± 243	1344 ± 354	2026 ± 566	(1032 - 2876)
La Vigne	7 ± 5	23 ± 12	106 ± 53	142 ± 67	(62 - 289)
Grand Banc	3 ± 1	10 ± 3	27 ± 3	40 ± 9	(27 - 55)
Ferret	3 ± 1	10 ± 3	30 ± 7	43 ± 10	(30 - 58)
Arguin	7 ± 10	10 ± 4	27 ± 15	40 ± 20	(23 - 516*)

**Tableau III-13: Moyennes annuelles des concentrations en composés organostanniques (ng.g<sup>-1</sup> Sn p.s.) sur chacun des sites. Les concentrations en composés organostanniques totaux (SOTs) sont présentées sous la forme: moyenne ± écart-type (valeur minimale-valeur maximale). \* valeurs extrêmes non prises en compte dans les moyennes.**

bivalves	[Sn] tot ng.g <sup>-1</sup>	[Sn] org p.s.	Remarques	Références	
<u>Scrobicularia plana</u> Port de La Vigne Intérieur du Bassin	7000 1000-3400	1640 160-480	collecte: 1982 collecte: 1985	Alzieu et al., 1986	
	MBT DBT TBT ng.g <sup>-1</sup> (Sn) p.s.				
<u>Scrobicularia plana</u> Lège Ile aux Oiseaux L'Aiguillon Cap Ferret Le Teich Ile aux Oiseaux Port d'Arcachon	34 13 124 21 ND	50 54 99 25 54	64 38 165 28 29	collecte: juill-août 1993  collecte: printemps 1982 * à partir de [Sn] totale	Ruiz et al., 1997  (* à partir de: Labourg et al., 1982)
<u>Crassostreas gigas</u> Intérieur du Bassin			20 - 30**	collecte: décembre 1994 ** à partir ng/g pds.hum. Rapport IEEB, 1995	
<u>Mytilus sp.</u> *** Moulleau (A) Grand Banc (E) Ferret (F) Arguin (G) Port d'Arcachon (B) Port d'Arcachon (C) Port de La Vigne (D) La Barbotière (H)	4 3 3 7 79 78 7 1	12 10 10 9 461 475 23 12	27 27 30 27 1621 1444 106 35	collecte: fév 01 - fév 02 *** moyennes annuelles Cette étude	

**Tableau III-14: Données rapportées dans différents travaux sur les concentrations en butylétains dans les bivalves du Bassin d'Arcachon.**

### 2.3.2.3.1. Les teneurs dans le Bassin d'Arcachon

#### a) Les parcs ostréicoles

Aucune accumulation des composés organostanniques n'a été observée sur les sites ostréicoles par rapport au site de référence, témoignant d'un niveau de fond des concentrations en composés organostanniques dans le Bassin d'Arcachon (figure III-17). Ce niveau de contamination ambiant est similaire à celui reporté par Langston et al. (1991) pour les côtes du sud-ouest de l'Angleterre dans les tissus du scrobiculaire *Scrobicularia plana* (environ  $50 \text{ ng.g}^{-1}$  p.s.). Nous retrouvons également les mêmes niveaux de concentration en TBT que ceux enregistrés par Ruiz et al. (1997) dans les tissus de *Scrobicularia plana* collectés en été 1993 au Cap Ferret ( $28 \text{ ng.g}^{-1}$ ) et autour de l'Île aux Oiseaux  $38 \text{ ng.g}^{-1}$ ) (tableau III-14). Par contre, le DBT est l'espèce prédominante chez le scrobiculaire, certainement en raison de son mode alimentaire, le scrobiculaire étant un bivalve vivant sur le sédiment (le DBT pouvant provenir des sédiments ou de la biotransformation du TBT dans les tissus). De plus, des concentrations de TBT de  $20 - 30 \text{ ng.g}^{-1}$  ont également été enregistrées dans des huîtres *Crassostrea gigas* collectées en décembre 1994 à l'intérieur du Bassin (IEEB, 1995).

Il est de même possible que les moules dépurent partiellement leur teneur en TBT sur les parcs ostréicoles puisque les facteurs d'accumulation (FA) sont principalement compris entre 0,5 et 1. Par contre, l'effet de la fréquentation touristique du Bassin en juillet et août est marqué par des facteurs d'accumulation supérieurs à 1 pour le Grand Banc, le Ferret (FA=1,4) et le Banc d'Arguin (FA=2). L'accumulation de TBT dans les tissus des individus transplantés au Banc d'Arguin pendant la période estivale pourrait indiquer un apport récent de TBT durant cette période, qui pourrait être relatif à une utilisation frauduleuse de peintures à base de TBT sur les bateaux de plaisance qui viennent y mouiller en juillet et août et/ou au brassage des sédiments sur ce site plus confiné que les autres parcs à huîtres. Cependant, les butylétains étant généralement associés à la fraction la plus fine des sédiments (Quevauvillier et Donard, 1990), on peut penser que les sédiments sableux du Banc d'Arguin ne contiennent pas des concentrations en butylétains importantes. Il aurait été intéressant d'analyser ces sédiments pour avoir une idée du niveau de leur contamination en composés organostanniques.

Deux "accidents" ont pu être mis en évidence au mois de mai sur les sites du Moulleau et du Banc d'Arguin, avec l'apparition de deux composés organostanniques non identifiés (figure III-18). L'origine de ces composés demeure inconnue, aucun dragage n'ayant été effectué à cette période sur ces sites, ni de travaux réalisés sur les parcs ostréicoles du Banc d'Arguin

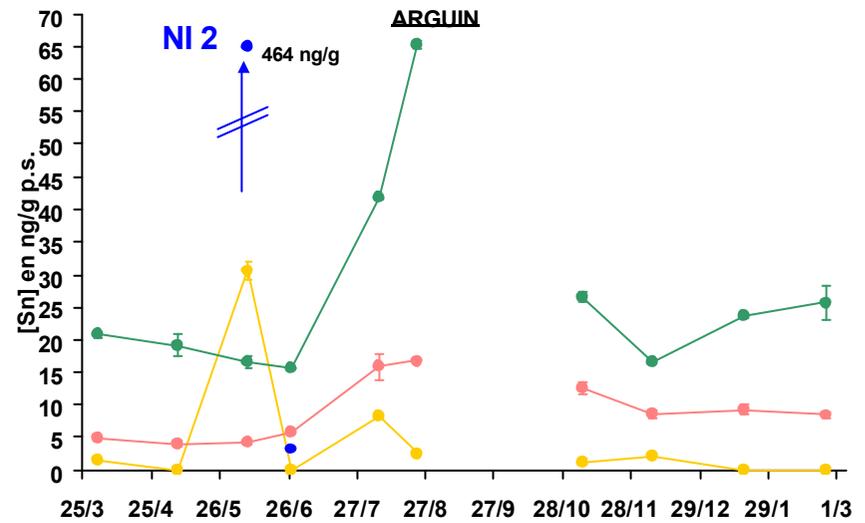
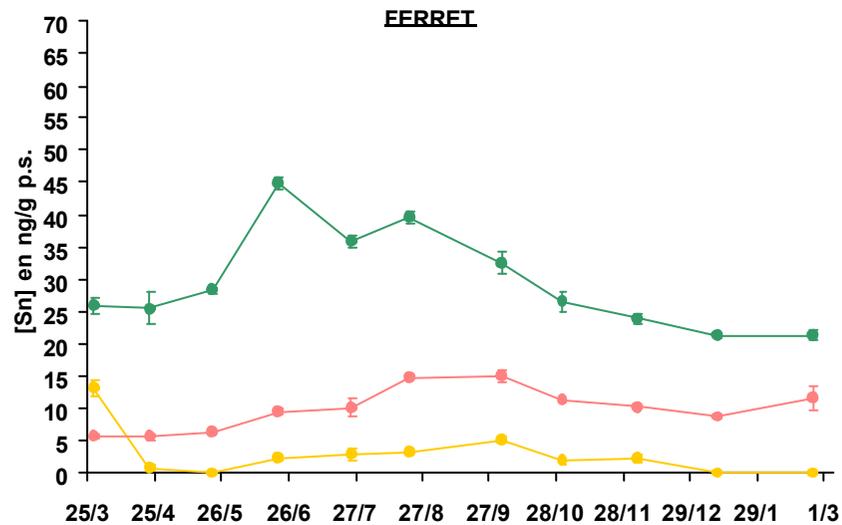
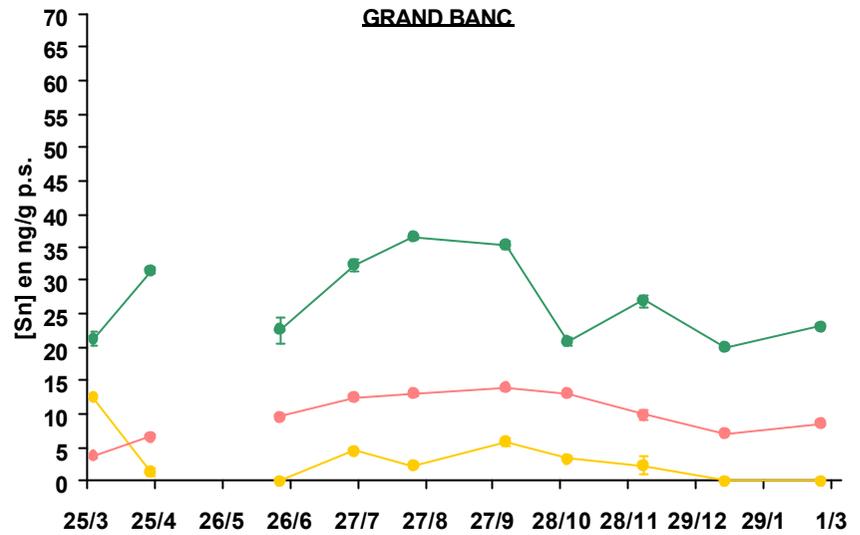
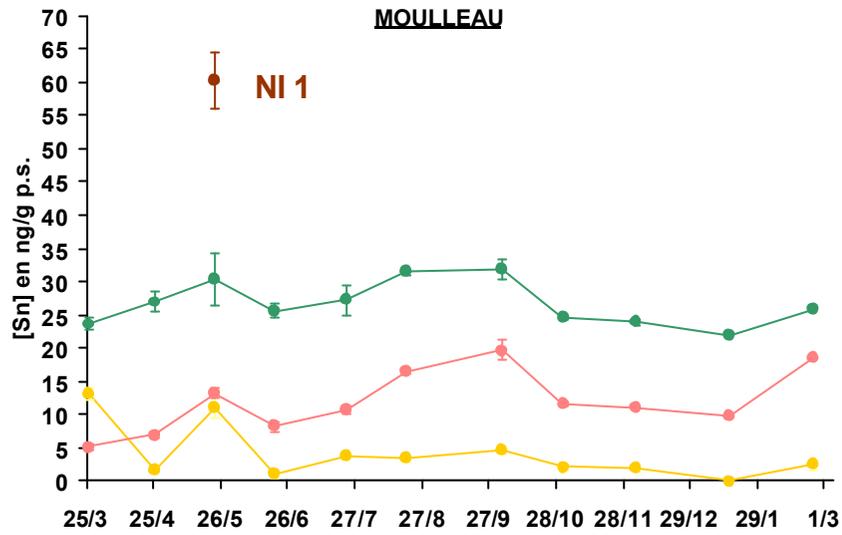


Figure III-17: Concentrations en butylétains enregistrées sur le site de référence (Moulleau) et sur les sites ostréicoles.

Le composé détecté au Mouleau (appelé NI 1) à une concentration de  $60 \text{ ng.g}^{-1}$  n'a pas pu être identifié en mode SCAN en GC-MS et sa présence s'accompagne de fortes teneurs en phénylétains ([TPT]= $20 \text{ ng.g}^{-1}$  et [MPT]= $13 \text{ ng.g}^{-1}$ ). Celui détecté au Banc d'Arguin (appelé NI 2) à une concentration de ( $500 \text{ ng.g}^{-1}$ ) a été identifié comme étant du tétrapropylétain (bibliothèque NIST 98) et sa présence s'accompagne de fortes teneurs en MBT ( $30 \text{ ng.g}^{-1}$ ). Il ne semble pas exister d'application industrielle de ce composé, mais, comme nous n'observons pas l'ion moléculaire de ce composé dans les conditions d'analyse utilisées, il est possible qu'il s'agisse du tétra(1-méthyléthyl)étain. De nouvelles analyses seraient nécessaires afin d'identifier clairement ce composé.

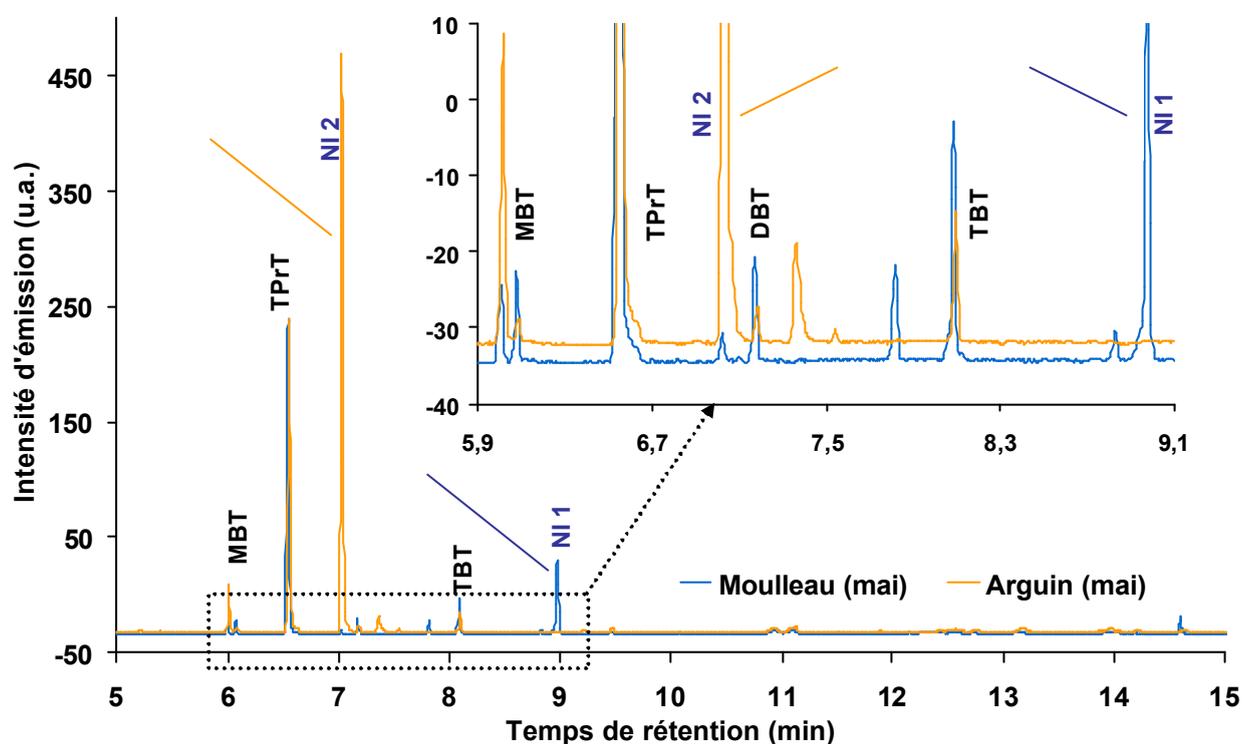


Figure III-18: Détection de deux composés organostanniques non identifiés (NI) présents dans les bivalves du Mouleau (NI 1; en bleu) et du Banc d'Arguin (NI 2; en jaune) en mai 2001.

### b) Les ports

Une forte accumulation de butylétains a été observée dans le port d'Arcachon, témoignant de la présence de TBT dans les eaux du port, avec une augmentation significative d'avril à septembre (figure III-19). Les facteurs d'accumulation (FA) du TBT sont compris entre 35 et 55 d'octobre à mars (niveau min moyen), atteignant 95 en juillet (pic de l'activité nautique) et 80 en avril (remise en état des bateaux). Cette accumulation importante

de TBT sur les sites portuaires en été coïncide avec l'intensification de l'activité nautique à cette période. Les facteurs d'accumulation rapportés par Morcillo et al. (2000) dans des palourdes *Ruditapes decussata* ont atteint une valeur de l'ordre de 60 pour 5 semaines de transplantation dans le port d'El Masnou (Espagne), pour une concentration de TBT dans l'eau de  $25 \text{ ng.L}^{-1}$  (Sn). L'accumulation de TBT est beaucoup plus faible au port de La Vigne (FA de 2 à 9), témoignant d'une contamination en TBT dans l'eau plus faible que celle enregistrée dans le port d'Arcachon. Les facteurs d'accumulation sont compris entre 2 à 4 d'octobre à avril et de 4 à 9 de mai à septembre, avec un maximum en août. Le port de La Vigne est dix fois plus petit que celui d'Arcachon et plus ouvert sur le chenal le longeant que celui d'Arcachon, plus protégé. Cependant, compte tenu de la faible concentration en TBT enregistrée dans les sédiments du port de La Vigne ( $10 \text{ ng.g}^{-1}$  Sn p.s.), la forte accumulation de TBT dans les tissus en août ( $240 \text{ ng.g}^{-1}$  en août et  $50 - 100 \text{ ng.g}^{-1}$  le reste de l'année) semble difficilement attribuable au seul phénomène de remise en suspension des sédiments, lié à l'intensité de l'activité nautique en été. Il se pourrait que l'utilisation illégale de peintures antisalissures à base de TBT par quelques particuliers participe, dans une moindre mesure, à la forte augmentation des teneurs en TBT dans les tissus.

Les deux sites du port d'Arcachon présentent les mêmes profils d'accumulation des butylétains, à l'exception du mois de juillet où les concentrations enregistrées dans les bivalves du fond du port chutent. Ces deux points du port semblent donc soumis à la même contamination dans l'eau. Il est à noter que les cages ont été retrouvées ouvertes en juillet et il ne restait que deux individus dans celle de la station à essence et six dans celle du fond du port, dont trois mortes. Cette diminution de concentrations en butylétains n'est pas attribuable à une mauvaise condition physiologique des moules récupérées ( $IC > 1$ ).

Le triphénylétain a été identifié dans les deux ports ( $5 - 20 \text{ ng.g}^{-1}$  à Arcachon et  $2 - 12$  à La Vigne, mais détecté uniquement d'avril à décembre à La Vigne). Plusieurs autres composés organostanniques ont été retrouvés dans les bivalves des sites portuaires, dont le composé prédominant (différent des deux autres composés détectés en mai sur les sites A et G, et appelé NI 3) a été décelé à  $10 - 30 \text{ ng.g}^{-1}$  à Arcachon et à  $1 - 3 \text{ ng.g}^{-1}$  à La Vigne (mais détecté uniquement de juin à octobre pour La Vigne). Ce composé a probablement été accumulé à partir des sédiments remis en suspension, puisqu'il a été détecté dans les sédiments du port d'Arcachon en mai et juin (site B:  $15-35 \text{ ng.g}^{-1}$ , site C:  $5-25 \text{ ng.g}^{-1}$ , site D:  $< \text{LQ}$ ) (figures III-19 et III-20). La présence de ces composés à la fois dans les sédiments et dans les bivalves confirme le fait que les sédiments constituent une source potentielle de contamination de la colonne d'eau par les composés organostanniques qui sont bioaccumulables.

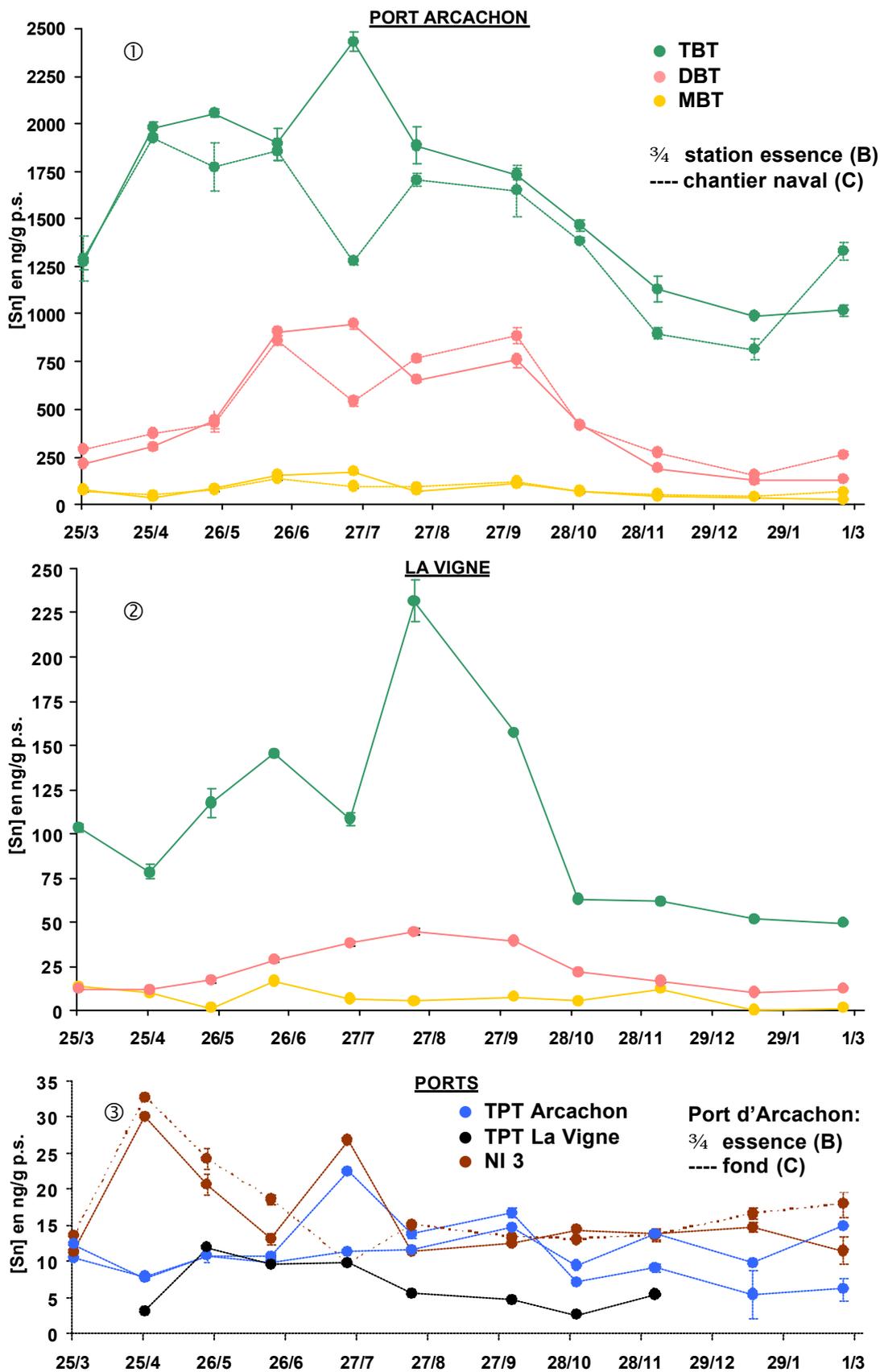


Figure III-19: Concentrations en butylétains sur les sites portuaires: ① d'Arcachon, ② de La Vigne, et ③ : teneurs en triphénylétain et en composé organostannique inconnu (NI 3).

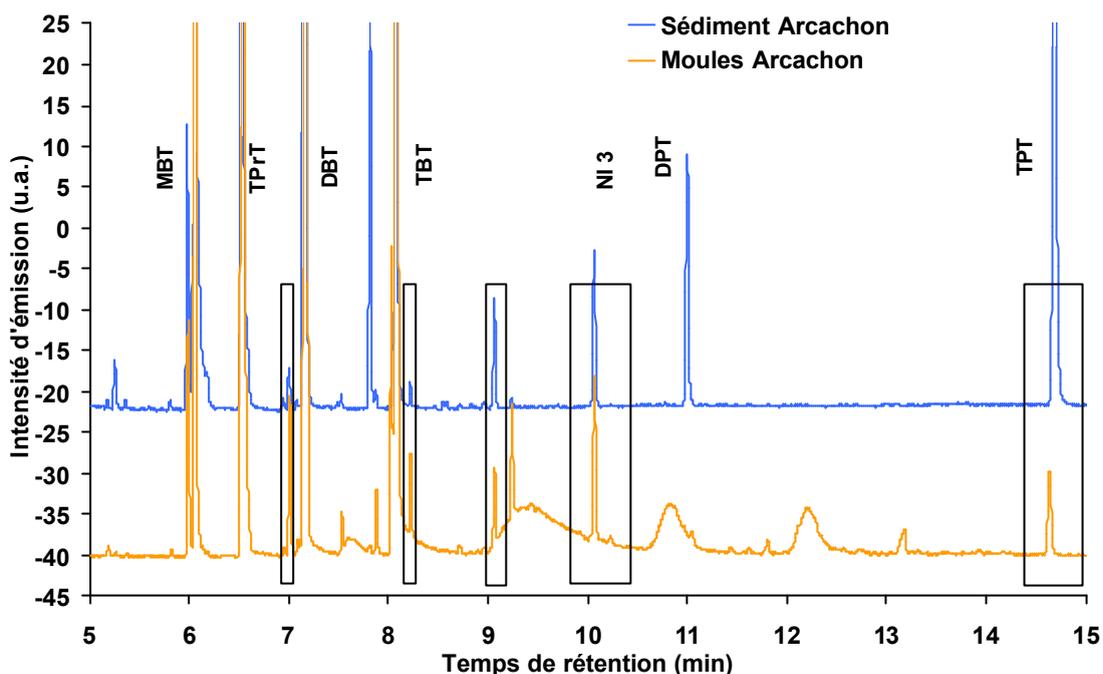


Figure III-20: Superposition des chromatogrammes GC-AED d'un sédiment et de tissus de moules du port d'Arcachon (fond du port, juin 2001).

#### 2.3.2.3.2. Evaluation des niveaux de concentration

A titre comparatif, une synthèse de quelques travaux rapportant des concentrations en TBT enregistrées dans différents bivalves (et un gastéropode, *Nucella lapillus*), soit collectés, soit transplantés, est présentée dans le tableau III-15.

##### a) Différence de bioaccumulation du TBT entre les individus indigènes et transplantés

Quelques travaux ont montré que les teneurs enregistrées dans les individus transplantés étaient largement supérieures aux teneurs retrouvées dans les populations indigènes, d'un facteur 2 pour les moules zébrées *Dreissena polymorpha* (Becker van Slooten et al., 1994) et d'un facteur 4 pour *Mytilus*, même s'il peut exister des différences entre *Mytilus edulis* (indigènes) et *Mytilus graynus* (transplantées) (Suzuki et al., 1998). De plus, les teneurs en TBT retrouvées dans les individus transplantés dans le port d'Arcachon (min: 1000 ng.g<sup>-1</sup> – max: 2400 ng.g<sup>-1</sup>) sont similaires à celles reportées chez des individus *Mytilus galloprovincialis* collectés dans le port de Gênes (min: 300 ng.g<sup>-1</sup> – max: 2300 ng.g<sup>-1</sup>), bien que les concentrations de TBT dans l'eau soient extraordinairement plus élevées dans le port de Gênes (de 90 à 490 ng.L<sup>-1</sup>) que dans celui d'Arcachon (inférieures à 10 ng.L<sup>-1</sup>) (tableau III-15). De la même façon, Abd-Allah et al. (1995) ont reporté des concentrations

relativement faibles de  $420 \text{ ng.g}^{-1}$  dans des moules *Mytilus galloprovincialis* collectées dans le port d'Alexandrie (Egypte) pour des concentrations de TBT dans l'eau de  $30 \text{ à } 80 \text{ ng.L}^{-1}$ . Il semble donc difficile de comparer la qualité d'un milieu par les teneurs retrouvées dans les bivalves sans faire au préalable de distinction entre les populations indigènes et les populations transplantées. Ces différences intraspécifiques de bioaccumulation et/ou de biotransformation entre des animaux indigènes et transplantés pourraient être dues à un phénomène adaptatif à la pollution chronique développé par les organismes indigènes.

Pour cette raison, nous n'avons confronté les niveaux de TBT enregistrés dans le Bassin d'Arcachon qu'avec ceux rapportés par d'autres études utilisant des bivalves transplantés (tableau III-15).

#### b) Comparaison des niveaux de concentration

Des palourdes *Ruditapes decussata* transplantées durant 5 semaines dans le port d'El Masnou (500 bateaux de plaisance; Espagne) ont atteint en 3 semaines une concentration maximale en TBT de  $1500 \text{ ng.g}^{-1}$  (pour une concentration de TBT dans l'eau de  $25 \text{ ng.L}^{-1}$ ), ce qui représente un facteur d'accumulation du TBT de 60, similaires à ceux obtenus en été dans le port d'Arcachon (FA~80) (Morcillo et al., 2000). Par contre, si les facteurs d'accumulation du TBT obtenus sont relativement du même ordre de grandeur, les facteurs de bioconcentration du TBT seront beaucoup plus élevés chez *Mytilus* que chez *Ruditapes decussata* (concentration de TBT plus élevée dans la colonne d'eau et plus faible dans les tissus des palourdes), indiquant que *Mytilus* pourrait être un meilleur organisme sentinelle que la palourde pour une contamination du milieu par les composés organostanniques. Des moules *Mytilus graynus* transplantées pendant 70 jours dans la baie d'Aburatsubo (Japon), fortement contaminée en composés organostanniques, ont atteint une concentration en TBT de  $4500 \text{ ng.g}^{-1}$  et en TPT de  $670 \text{ ng.g}^{-1}$  (pour des concentrations mesurées dans l'eau de  $40 \text{ à } 100 \text{ ng.L}^{-1}$  de TBT et de  $3 \text{ à } 20 \text{ ng.L}^{-1}$  de TPT) (Suzuki et al., 1998). Ces concentrations tissulaires en TBT sont plus élevées que celles enregistrées sur le site le plus contaminé du Bassin, le port d'Arcachon ( $2400 \text{ ng.g}^{-1}$ ), indiquant un niveau de contamination plus faible du Bassin. Cette observation semble tout à fait logique, vu la faible intensité du trafic maritime dans le bassin, comparativement à celui de la baie d'Aburatsubo, et l'absence de bateaux de plus de 25 m (pouvant encore être traités avec des peintures à base de TBT). Cependant, les niveaux de TBT bioaccumulé dans les tissus des moules du bassin sont relativement élevés, malgré les faibles concentrations de TBT dans les eaux du bassin par rapport à celles rapportées dans les autres études sur des sites encore soumis à des apports directs de TBT. Dans des systèmes lacustres, des moules zébrées *Dreissena polymorpha*

transplantées pendant 100 jours dans un port du lac de Genève (accueillant 600 bateaux) ont atteint une concentration de TBT extrêmement élevée de 13 000 ng.g<sup>-1</sup> (Becker van Slooten et al., 1994). Notons tout de même que cette expérience a été réalisée en 1991, juste après la réglementation de l'utilisation du TBT en 1988 en Suisse, qui n'a pris pleinement effet qu'en 1990, et qu'elle coïncide donc certainement avec la période des teneurs maximales de TBT rencontrées dans les eaux du lac de Genève.

Espèce et localisation	TBT (ng/g Sn p.s.)	Référence
<u>Populations indigènes</u>		
<i>Mytilus galloprovincialis</i>		
Port de Gênes (Italie) 1995	500 - 2160	Rivaro et al., 1997
Port de Gênes (Italie) 1997	300 - 2 300	Rivaro et al., 1999
Port de Barcelone (Espagne) 2001	2 300	Cette étude
<i>Mytilus edulis</i>		
Zone côtière est (Angleterre) 1990	50 - 1 300	Widdows et al., 1995
Estuaire du Tamar (Angleterre) 1987-1993	350 - 760	Page et al., 1995a
Reykjavik (Islande) 1993-1994	14 - 120	Skarphédinsdottir et al., 1996
Baie de Moroiso (Japon) 1992	1 100 (TPT: 200)	Suzuki et al., 1998
<i>Venerupis decussata</i>		
Ports de la côte sud (Espagne) 1991-1998	50 - 400	Gomez-Ariza et al., 2000
<i>Dreissena polymorpha</i>		
Systèmes lacustres (Pays-Bas) 1992	10 - 11 500 (TPT: 30 - 3 200)	Stäb et al., 1995
<u>Populations transplantées</u>		
<i>Mytilus graynus</i>		
Baie d'Aburatsubo (Japon) 1992 (10 sem.)	4 500 (TPT: 670) (eau: 40 - 100)	Suzuki et al., 1998
<i>Mytilus sp.</i>		
Port d'Arcachon (France) 2001 (4 sem.)	2500 (eau: 2 - 7)	Cette étude
Port de La Vigne (France) 2001 (4 sem.)	230 (eau: ND)	Cette étude
<i>Ruditapes decussata</i>		
Port d'El Masnou (Espagne) 1996 (5 sem.)	1500 (eau: 25)	Morcillo et al., 2000
<i>Nucella lapillus</i>		
Port d'A Coruna (Espagne) 1997 (4 sem.)	1 500	Quintela et al., 2000
<i>Dreissena polymorpha</i>		
Port d'Ouchy (Suisse) 1991 (14 sem.)	13 000	Becker van Slooten et al., 1994

**Tableau III-15: Concentrations en TBT rapportées dans différents bivalves (et un gastéropode, *Nucella lapillus*), collectés ou transplantés. Lorsque ces travaux rapportaient des concentrations en TPT extrêmement élevées, ces dernières ont été mentionnées entre parenthèse (en ng.g<sup>-1</sup> Sn p.s.). Pour les individus transplantés, la durée de l'exposition est également mentionnée entre parenthèse (en semaines), ainsi que les concentrations en TBT dans l'eau (en ng.L<sup>-1</sup> Sn) quand elles étaient précisées.**

#### 2.3.2.3.3. Niveaux de concentration et effets biologiques possibles

Des effets délétères ont été mesurés chez des moules *Mytilus edulis* adultes pour des concentrations tissulaires supérieures à  $85 \text{ ng.g}^{-1}$  p.s. (Page et Widdows, 1991; Widdows et Page, 1993). Ces auteurs ont observé que le mécanisme principal de toxicité du TBT chez *Mytilus edulis* était le découplage de la phosphorylation oxydative pour des concentrations de TBT supérieures à  $85 \text{ ng.g}^{-1}$  et le mécanisme secondaire, une diminution rapide du taux d'alimentation et donc de la SFG (allocation d'énergie à la croissance et à la reproduction; "Scope For Growth"), via un effet neurotoxique sur l'activité des cilia des branchies, pour des concentrations de TBT supérieures à  $1700 \text{ ng.g}^{-1}$ . Il se pourrait donc que les concentrations en TBT enregistrées dans les moules transplantées dans le port d'Arcachon ( $900 - 2400 \text{ ng.g}^{-1}$ ) aient subi des perturbations physiologiques qui pourraient également altérer les réponses des biomarqueurs suivis dans cette étude. Par contre, les conséquences des niveaux de concentration enregistrés dans le Bassin d'Arcachon ( $30 \text{ ng.g}^{-1}$ ) sur les organismes sont encore mal connues, aucune étude n'ayant rapporté des effets du TBT sur des organismes présentant des concentrations tissulaires aussi faibles.

#### 2.3.2.3.4. Variations saisonnières des teneurs en TBT

Au Moulleau, les variations saisonnières semblent très peu marquées (amplitude des concentrations inférieure à 2), même si une légère augmentation des concentrations en été est observée. Par contre, Skarphedinsdottir et al. (1996) ont observé d'importantes variations saisonnières significatives des concentrations en TBT dans les tissus de *Mytilus edulis* collectées près du port de Reykjavik (Islande), avec des teneurs moyennes 10 fois plus élevées en été ( $250 \pm 190 \text{ ng.g}^{-1}$  p.s.) qu'en hiver ( $30 \pm 25 \text{ ng.g}^{-1}$  p.s.). Ces variations ne sont pas attribuées par ces auteurs à l'activité nautique autour de Reykjavik (les variations saisonnières de cette dernière n'étant pas significatives) mais plutôt reliées à l'activité d'alimentation des bivalves et donc aux teneurs en phytoplancton dans l'eau, minimales de novembre à mars (faible croissance des moules et faibles teneurs en TBT pendant la période la plus froide de l'année) et maximales à partir d'avril-mai, montrant également de ce fait, une forte capacité de dépuración au cours de l'année par les moules. De nombreux facteurs (biologiques, climatiques et géographiques) sont également susceptibles d'affecter les teneurs en TBT dans les tissus de moules, comme les variations saisonnières du poids sec des individus, l'activité nutritionnelle des bivalves (température de l'eau et disponibilité du phytoplancton), ainsi que les variations saisonnières importantes du régime hydrodynamique, principalement pour les systèmes lacustres où l'apport important en eau douce peut être un facteur de dilution important (Page et al., 1995; Gomez-Ariza et al.,

2000). Dans le Bassin d'Arcachon, malgré une activité phytoplanctonique relativement faible (rapport IFREMER Arcachon, 1997), le bloom phytoplanctonique survient fin avril (avec certaines années, l'apparition d'une floraison automnale, plus ou moins fugace). La légère augmentation des concentrations en TBT dans les tissus en été sur les parcs ostréicoles pourrait être attribuée à l'activité nutritionnelle des bivalves à cette période.

#### 2.3.2.3.5. Bioaccumulation du TBT par *Mytilus sp.*

##### *a) Facteurs de bioconcentration*

Les facteurs de bioconcentration (BCF; concentration dans les tissus secs divisée par la concentration dans l'eau) du TBT ont été estimés de mai à août à partir des données des concentrations de TBT dans l'eau obtenues dans cette étude et par l'IFREMER Arcachon, lorsque celui-ci a détecté dans l'eau ( $[TBT] < 0,5 \text{ ng.L}^{-1}$ ), ce qui n'a pas été le cas du Moulleau et du port de La Vigne (tableau III-9). A titre comparatif, les BCF rapportés par de nombreux auteurs chez différents bivalves (collectés et transplantés) sont synthétisés dans le tableau III-16.

Site/Date	BCF			
	23-mai <sup>a</sup>	20-juin <sup>a</sup>	12-juillet <sup>b</sup>	23-août <sup>b</sup>
B	604 100	1 350 900	332 600	819 700
C	465 500	1 322 000	283 900	586 600
E				73 100
F				132 200

**Tableau III-16: Evaluation des BCF du TBT des individus transplantés, <sup>a</sup> à partir des concentrations de TBT obtenues dans cette étude en mai et juin 2001, <sup>b</sup> à partir de celles enregistrées par l'IFREMER en juillet et août 2001.**

Les BCF estimés dans cette étude (tableau III-16) sont extrêmement élevés comparativement à ceux mentionnés dans le tableau III-17 et atteignent 1 300 000 en juin dans le port d'Arcachon, une valeur jamais reportée dans la littérature. Cependant, au vu des très faibles concentrations de TBT enregistrées dans les eaux du bassin, plus que leurs valeurs, c'est l'ordre de grandeur des BCF qu'il faut garder à l'esprit. Ainsi, ils sont toujours supérieurs à 200 000, constituant les valeurs les plus élevées jamais enregistrées chez *Mytilus sp.* Ils sont tout de même comparables à ceux enregistrés par Becker van Slooten et al. (1994) sur des moules zébrées *Dreissena polymorpha* transplantées dans un port contaminé du lac de Genève (Suisse). Les BCF sont relativement homogènes entre les deux

sites du port d'Arcachon (B et C), à l'exception du mois d'août où le BCF est plus faible pour les individus exposés dans le fond du port. Les BCF enregistrés sur les parcs ostréicoles E et F sont inférieurs d'un facteur 10 à ceux du port d'Arcachon. Il convient cependant de rester prudent sur ce dernier résultat, les échantillons d'eau ayant été collectés en plein chenal et non directement sur les parcs (IFREMER Arcachon), ce qui pourrait conduire à une sous-estimation des concentrations de TBT dans l'eau sur ces deux sites.

Les BCF rapportés pour les bivalves sont compris dans une très large gamme, allant de 1 000 à 900 000 (tableau III-17). Mais le facteur de bioconcentration à partir de la colonne d'eau est influencé par un grand nombre de facteurs biotiques et abiotiques, incluant le temps d'exposition, la salinité et la température, des effets compétitifs avec d'autres contaminants, l'âge des individus, la physiologie et le mode alimentaire des organismes. Considérant la multitude de ces paramètres affectant le processus de bioaccumulation, il n'est pas surprenant que les BCF du TBT varient dans une très large gamme. Les différentes contributions du mode alimentaire sur le processus de bioaccumulation pourraient représenter une part importante dans les différences inter-spécifiques observées (Coehlo et al., 2002b). De plus, au sein d'un même groupe de bivalves (habitat et mode alimentaire similaires), il peut également exister des variations interspécifiques prononcées dans le potentiel de bioaccumulation du TBT, la capacité de biotransformation et d'excrétion influençant fortement les concentrations tissulaires du TBT (Langston et Burt, 1991).

Bivalves	BCF	Référence
<i>Mytilus edulis</i>	5 000	Laughlin et al., 1986
	1 000 - 3 000	Laughlin et French, 1988
	10 500	Suzuki et al., 1998
	5 000 - 60 000	Zoulian et al., 1989
	4 700 - 105 600	Salazar et Salazar, 1996
<i>Mytilus graynus</i>	10 500	Suzuki et al., 1998
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	11 000	Takahashi et al., 1999
	3 700	Rivaro et al., 1999
	31 000 - 55 000	Tolosa et al., 1992
<i>Venerupis decussata</i>	18 000 - 91 000	Gomez-Ariza et al., 2000
<i>Ruditapes decussata</i>	60 000	Morcillo et al., 2000
<i>Mya arenaria</i>	133 000	Langston et al., 1987
<i>Dreissena polymorpha</i>	6 700 - 260 000	Becker van Slooten et al., 1992
	900 000	Becker van Slooten et al., 1994

**Tableau III-17: Facteurs de bioconcentration (BCF) rapportés pour différents bivalves dans des études de terrain.**

b) Etat d'équilibre avec le milieu

L'état d'équilibre avec le milieu semble atteint durant la durée de transplantation (30 jours en moyenne), puisque les teneurs en butylétains retrouvées dans les individus transplantés 1, 2 ou 3 mois sur un site sont similaires à celles obtenues sur les individus récupérés à la même période et semblent donc refléter les niveaux ambiants dans le milieu (tableau III-18).

Site	[Sn] en ng/g p.s.			Transplantation		
	MBT	DBT	TBT	Pose	Récupération	Durée
Arguin		4,0 ± 0,4	19,1 ± 1,7	26-mars	26-avr.	1 mois
Arguin	1,5 ± 0,2	5,0 ± 0,1	20,7 ± 0,5	25-févr.	26-avr.	2 mois
Ferret	2,8 ± 0,9	10,2 ± 1,2	35,9 ± 1,0	20-juin	23-juil.	1 mois
Ferret	2,7 ± 0,3	11,1 ± 0,5	33,7 ± 1,6	26-avr.	23-juil.	3 mois
Ferret	0,9 ± 0,5	5,7 ± 0,5	25,5 ± 2,5	26-mars	26-avr.	1 mois

**Tableau III-18: Concentrations tissulaires en butylétains pour différentes durées de transplantation.**

Cette observation a également été rapportée par plusieurs auteurs: des moules *Mytilus graynus* transplantées sur un site contaminé au mois d'août (les concentrations de TBT dans l'eau durant cette période étaient comprises entre 100 et 300 ng.L<sup>-1</sup>) ont atteint un état d'équilibre en 48 jours (Suzuki et al., 1998). Des palourdes *Ruditapes decussata* transplantées dans le port d'El Masnou (Espagne) pendant 5 semaines, ont atteint un état d'équilibre en 3 semaines avec une concentration tissulaire de TBT de 1500 ng.g<sup>-1</sup> p.s. (pour une concentration de TBT dans l'eau de 24 ± 5 ng.L<sup>-1</sup>) (Morcillo et al., 2000). Cette bioaccumulation rapide du TBT a aussi été observée chez les moules *Mytilus edulis* et *Dreissena polymorpha* transplantées dans des environnements pollués en TBT et dans lesquelles les concentrations en TBT tendaient à se stabiliser après 35 jours d'exposition (Zoulian et Jensen, 1989; Becker van Slooten et al., 1994).

2.3.2.3.6. La dégradation du TBT

a) Le rapport TBT/DBT

Le TBT étant dégradé par désalkylation, les rapports des homologues TBT/DBT ou TBT/BTs sont généralement utilisés comme indicateurs de dégradabilité du TBT dans les différents compartiments environnementaux (et/ou d'apports récents de TBT) ou de

biotransformation du TBT dans les organismes aquatiques (Stäb et al., 1995). Les moyennes annuelles des rapports des concentrations TBT/DBT, ainsi que les teneurs relatives en produits de dégradation du TBT par rapports aux butylétains totaux, sont présentés dans le tableau III-19 pour chacun des sites.

	Site	Moyennes annuelles	
		TBT/DBT	%MBT, DBT
A	Plage du Moulleau	2,5 ± 0,9	34 ± 6
B	Port d'Arcachon, essence	4,8 ± 2,1	23 ± 8
C	Port d'Arcachon, fond	3,6 ± 1,3	27 ± 7
D	Port de La Vigne, essence	5,0 ± 1,6	22 ± 6
E	Parcs du Grand Banc	3,1 ± 1,2	31 ± 6
F	Parcs du Ferret	3,2 ± 1,1	29 ± 7
G	Parcs du Banc d'Arguin	3,2 ± 0,9	28 ± 7

**Tableau III-19: Moyennes annuelles des rapport des concentrations TBT/DBT et teneurs relatives en produits de dégradation du TBT par rapports aux butylétains totaux pour chacun des sites. %MBT, DBT= (MBT+DBT)/(MBT+DBT+TBT).**

Le TBT est largement majoritaire dans les tissus de moules et est donc fortement corrélé aux teneurs en butylétains totaux ( $r=0,9853$ , sur l'ensemble des données). La biotransformation du TBT est réalisée par le système de mono-oxygénases dépendantes du cytochrome P450 (Lee, 1991) et l'activité limitée de ce système enzymatique chez les mollusques pourrait expliquer la prédominance du TBT dans les tissus de moules. Les teneurs en DBT et en MBT sont fortement corrélées à celles du TBT ( $r=0,908$  et  $r=0,895$ , respectivement), indiquant que la majeure partie du DBT et du MBT dans les tissus provient du TBT. Cependant, si l'on considère maintenant la relation entre le TBT et la somme de ses produits de dégradation (MBT+DBT), seules les stations essence des ports (sites B et D) présentent une forte corrélation ( $r=0,80$  ;  $p=0,003$  ;  $n=11$ ). Une faible corrélation est observée pour le chantier naval (site C) et le site de référence (site A) ( $r=0,65$  ;  $p=0,03$ ), tandis qu'aucune relation significative n'est visible sur les parcs ostréicoles (sites E, F, G).

Le pourcentage de produits de dégradation du TBT par rapport aux butylétains totaux semble plus faible sur les parcs ostréicoles (28-31%), où aucune accumulation de butylétains n'a été observée, que sur le site de référence (34%) (tableau III-19). Cette plus faible proportion de produits de dégradation du TBT, bien que non significative, pourrait indiquer une légère diminution de l'activité enzymatique de biotransformation du TBT, probablement relative à un stress physiologique induit par la technique de transplantation.

Les moyennes annuelles du rapport TBT/DBT sont voisines de 3 sur les parcs ostréicoles et légèrement plus faibles sur le site de référence du Moulleau (TBT/DBT=2,5). Les sites portuaires présentent des rapports plus élevés, particulièrement pour les stations essence (TBT/DBT=5) (tableau III-19). Le rapport TBT/DBT différencie d'ailleurs de façon significative les stations à essence (sites B et D) des autres sites, à l'exception toutefois du chantier naval du port d'Arcachon (site C) (tableau III-20). Les rapports plus élevés observés aux stations essence ne sont pas dus à des apports récents de TBT, tout d'abord parce que les valeurs maximales ont été enregistrées en hiver et au début du printemps (correspondant à la période creuse de l'activité nautique dans le Bassin) et deuxièmement, parce que le chantier naval (site C), affecté par les mêmes niveaux de concentration que le site B, ne présente pas un rapport aussi élevé. L'impact des stations essence sur les teneurs relatives en TBT et en DBT dans les tissus de moules pourrait être interprétée en terme de diminution de l'activité enzymatique de biotransformation du TBT et/ou de biodisponibilité du TBT (présence de composés susceptibles d'affecter la biotransformation du TBT ou d'augmenter sa lipophilicité).

N = 70	B	C	D	E	F	G
A	<b><u>0,0003</u></b>	0,2772	<b><u>0,0001</u></b>	0,9412	0,7782	0,8663
B		0,1938	0,9997	<b>0,0133</b>	<b>0,0284</b>	<b>0,0244</b>
C			0,0654	0,9482	0,9926	0,9835
D				<b><u>0,0032</u></b>	<b><u>0,0070</u></b>	<b><u>0,0062</u></b>
E					1,0000	1,0000
F						1,0000

**Tableau III-20: Degré de significativité du test de Tuckey (valeur de p) de l'analyse de variance réalisée sur les valeurs du rapport TBT/DBT enregistrés dans les tissus de moules sur chacun des sites. Les données en gras représentent les sites significativement différents entre eux, pour des valeurs de p: en gras:  $p < 0,05$ ; en gras et soulignées:  $p < 0,01$ ; en gras et doublement soulignées:  $p < 0,001$ .**

Gomez-Ariza et al. (2000) ont obtenu des rapports TBT/DBT de 3 à 4 dans les tissus de *Venerupis decussata* (sud-ouest de l'Espagne), mais aucune corrélation de ce rapport avec les sites d'étude ou les saisons de collecte n'a été observée et il n'apparaît pas non plus être fonction de la teneur totale en butylétains dans les bivalves. Abd-Allah (1995) ont enregistré des rapports compris entre 2,5 et 3,5 dans des moules *Mytilus galloprovincialis* et entre 4,4 et 6,2 dans des palourdes *Ruditapes decussata* collectées sur différents points du port d'Alexandrie (Egypte), mettant ainsi en évidence des différences interspécifiques de la biotransformation du TBT par les bivalves. Les rapports obtenus chez *Mytilus galloprovincialis* sont plus faibles que ceux que nous avons enregistré dans les ports

d’Arcachon et de La Vigne (4 - 5), malgré les concentrations élevées de TBT dans les eaux du port d’Alexandrie (jusqu’à 390 ng.L<sup>-1</sup>). Ces différences pourraient être dues à un phénomène adaptatif à la pollution chronique développé par les organismes indigènes, et par là même à une biotransformation plus active des xénobiotiques.

Le rapport TBT/DBT reporté en fonction des concentrations en TBT dans les tissus permet de discriminer les sites portuaires des sites ostréicoles, mais également les ports entre eux (figure III-21). Par contre, aucune différenciation des parcs ostréicoles n’a été observée. Les teneurs annuelles en butylétains étant relativement faibles sur ces sites, il apparaît plus difficile de discerner la part de la biotransformation du TBT par les bivalves des différents facteurs environnementaux affectant les teneurs en butylétains dans les tissus. De plus, le rapport TBT/DBT dans les tissus est négativement corrélé à la concentration en TBT, mais uniquement pour le port d’Arcachon (figure III-22). Cette observation est opposée à celles de plusieurs auteurs (Stäb et al., 1995; Abd-Allah, 1995; Hong et al., 2002) qui ont reporté des rapports croissants du TBT/DBT avec la concentration de TBT dans les tissus de la moule zébrée *Dreissena polymorpha* collectées à la fin de l’été. Cependant, il faut noter que les sites suivis dans ces études sont soumis à des apports récents de TBT, accueillant des bateaux de plus de 25m encore autorisés à utiliser des peintures à base de TBT, ce qui n’est plus le cas dans le Bassin d’Arcachon depuis 1982.

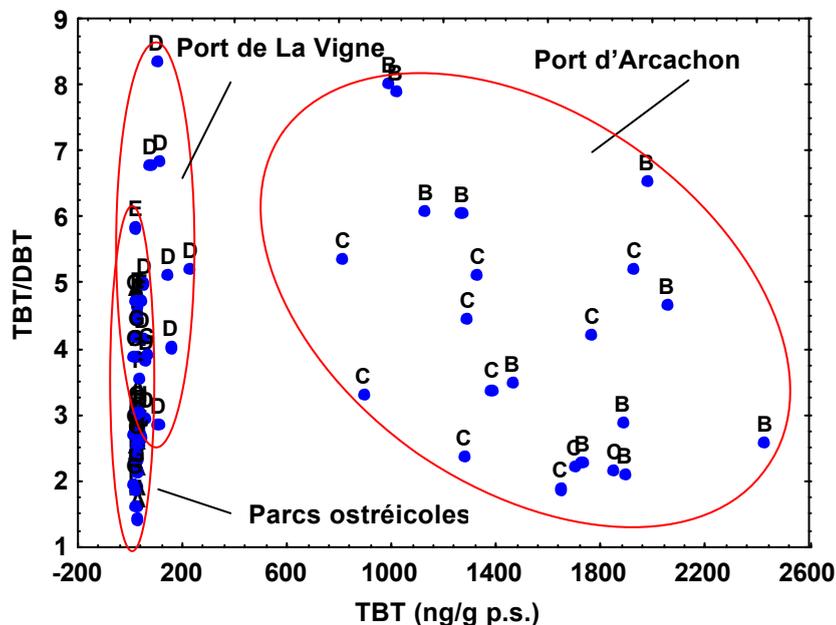


Figure III-21: Rapport des concentrations TBT / DBT en fonction des concentrations en TBT dans les tissus de moules pour l’ensemble des sites.

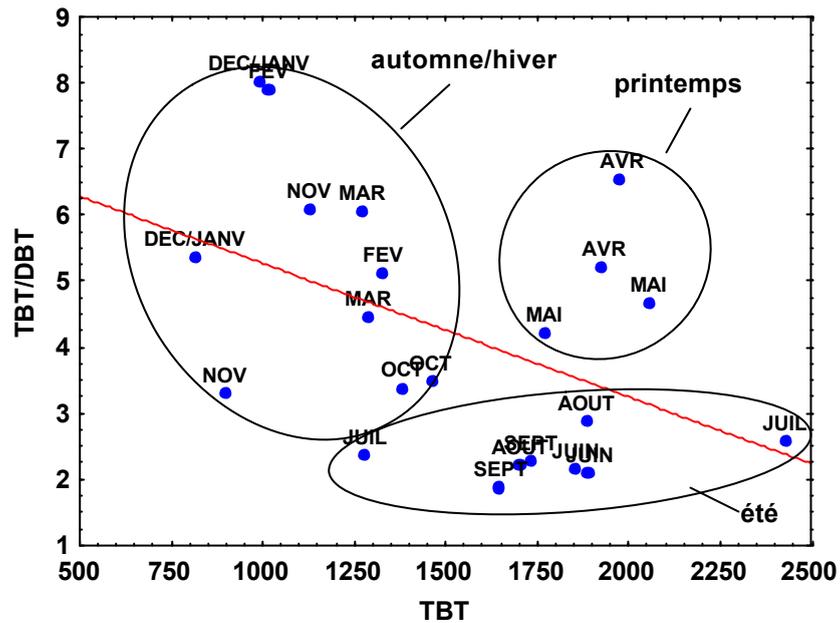


Figure III-22: Rapport des concentrations TBT / DBT en fonction des concentrations en TBT dans les tissus de moules du port d'Arcachon suivant la période de transplantation.

Les variations saisonnières du rapport TBT/DBT pour chacun des sites sont également représentées à la figure III-23. Si les rapports enregistrés sur les parcs ostréicoles et sur le site de référence sont relativement constants (bien que plus élevés au printemps), ceux obtenus sur les sites portuaires présentent une grande variabilité. Sur ces sites, les rapports présentent des valeurs maximales au printemps et en hiver et minimales en été.

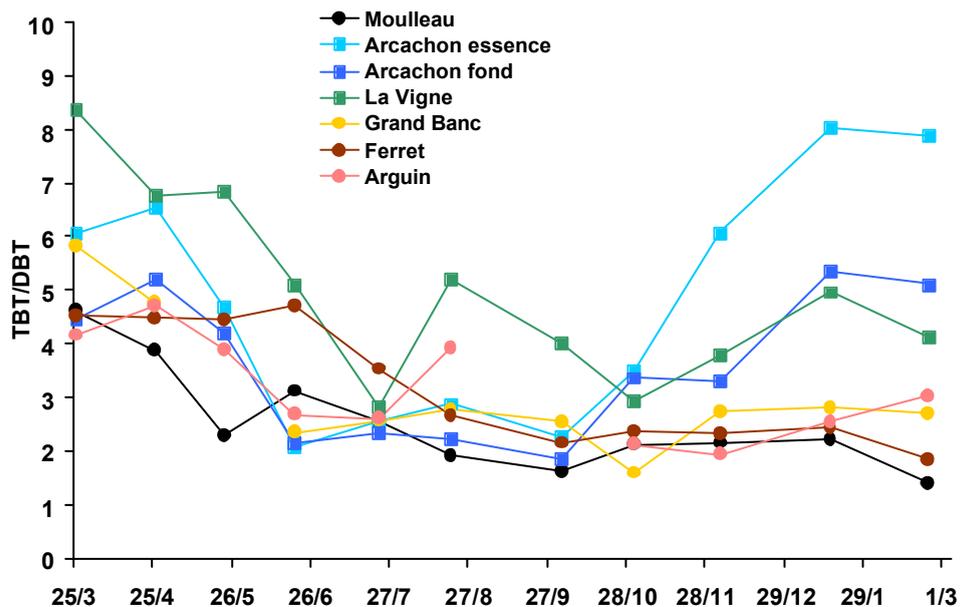


Figure III-23: Variations saisonnières du rapport TBT/DBT dans les moules sur chaque site.

Les valeurs minimales du rapport TBT/DBT en été dans le port d'Arcachon s'expliquent par l'accumulation plus importante du DBT en été (d'un facteur 4 par rapport au reste de l'année) comparativement à celle du TBT (d'un facteur deux). La même observation a été rapportée par Rivaro et al. (1999) chez des moules *Mytilus galloprovincialis* collectées dans le port de Gênes, dans lesquelles les concentrations en DBT étaient trois fois plus élevées en juillet qu'en mars, alors que les teneurs en TBT variaient relativement peu tout au long de l'année. Cette tendance pourrait être attribuée à la remise en suspension des sédiments du port d'Arcachon, liée à l'intensification de l'activité nautique en été et, dans une moindre mesure, à l'augmentation de l'activité métabolique en été chez les bivalves. Par contre, le rapport TBT/DBT enregistré dans le port de La Vigne présente singulièrement une forte augmentation en août. Compte tenu de la faible concentration en TBT enregistrée dans les sédiments du port de La Vigne ( $10 \text{ ng.g}^{-1}$  Sn p.s.), la forte accumulation de TBT dans les tissus en août ( $240 \text{ ng.g}^{-1}$  en août et  $50 - 100 \text{ ng.g}^{-1}$  le reste de l'année) semble difficilement attribuable au seul phénomène de remise en suspension des sédiments. Il se pourrait que l'utilisation illégale de peintures antisalissures à base de TBT par quelques particuliers participe à la forte augmentation des teneurs en TBT dans les tissus. Cela semble être également le cas au Banc d'Arguin en août.

#### *b) Teneurs relatives en butylétains dans les moules et les sédiments*

Les teneurs relatives en butylétains sont relativement équivalentes dans les sédiments du port d'Arcachon, alors que le TBT est l'espèce prédominante dans les tissus de moules (tableau III-21). Un pourcentage de TBT plus élevé (90%) a été reporté dans les tissus de *Ruditapes decussata* (Morcillo et al., 2000). Cette prédominance du TBT dans les tissus peut s'expliquer par la capacité restreinte des bivalves à métaboliser le TBT et par la forte affinité du TBT pour les matrices biologiques. Le pourcentage de TBT dans les tissus diminue de mai (80%) à juin (65%), compensé par une nette augmentation des teneurs relatives en DBT. Les sédiments superficiels des deux ports présentent une très forte différence des teneurs relatives en butylétains, le TBT étant nettement minoritaire dans ceux du port de La Vigne. Ceci pourrait être dû aux fortes perturbations de la couche sédimentaire du port d'Arcachon (paragraphe 2.3.2.2.) et/ou aux très faibles concentrations en butylétains dans les sédiments du port de La Vigne. Sarradin et al. (1991) ont reporté des pourcentages moyens de chaque butylétain de 30 à 38% dans des sédiments prélevés dans plusieurs zones de mouillage du Bassin et de 22 à 48 % dans ceux collectés à l'intérieur du Bassin. Un pourcentage moyen de TBT de 59 % a été reporté dans les sédiments marins des côtes américaines, prélevés lors de deux campagnes réalisées en 1982-1985 et en 1994 (Chau et Maguire, 1997).

Date	Matrice	Teneurs relatives en butylétains (%)								
		Arcachon essence			Arcachon fond			La Vigne		
		MBT	DBT	TBT	MBT	DBT	TBT	MBT	DBT	TBT
23 mai	coquilles	3	17	80	3	19	78			
	sédiments	32	35	33	31	36	33			
20 juin	coquilles	5	31	64	5	30	65	9	15	76
	sédiments	32	38	30	41	30	29	55	36	9

**Tableau III-21: Teneurs relatives en butylétains (%) dans les tissus de moules et dans les sédiments collectés en mai et juin sur les sites portuaires.**

#### 2.3.2.4. Conclusion

Les concentrations en TBT dans les eaux du port d’Arcachon en mai et juin 2001 (1,5 – 5 ng.L<sup>-1</sup>) ne semblent pas indiquer d’amélioration de la qualité des eaux du port depuis 1992, témoignant de la rémanence de la pollution par le TBT dans le bassin, et sont supérieures à celles pouvant entraîner des effets toxiques du TBT sur les organismes marins (2 ng.L<sup>-1</sup>: phénomène d’imposex chez certaines espèces de gastéropodes, calcification de la coquille chez *Crassostrea gigas*, perturbation du développement larvaire chez *Mytilus edulis*).

Dans les sédiments portuaires, si la concentration en TBT dans le port de La Vigne est relativement faible (10 ng.g<sup>-1</sup> p.s.), celles enregistrées dans le port d’Arcachon sont relativement élevées (240 – 680 ng.g<sup>-1</sup> p.s.). Ces résultats confirment le fait que le port d’Arcachon constitue la source de contamination en composés organostanniques pour l’ensemble du Bassin (Quevauviller et al., 1994). Le triphénylétain a également été détecté dans les sédiments du port d’Arcachon (3 – 30 ng.g<sup>-1</sup> p.s.).

Dans les bivalves, aucune accumulation des butylétains n’a été observée sur les sites ostréicoles par rapport au site de référence ([TBT] = 30 ng.g<sup>-1</sup>, ([BT] = 40 ng.g<sup>-1</sup> p.s.), témoignant d’un niveau de fond des concentrations en composés organostanniques dans le Bassin d’Arcachon. Par contre, l’accumulation de TBT dans les tissus des individus transplantés au Banc d’Arguin pendant la période estivale pourrait indiquer un apport récent de TBT durant cette période, qui pourrait être relatif à une utilisation frauduleuse de peintures à base de TBT sur les bateaux de plaisance qui viennent y mouiller en juillet et août et/ou au brassage des sédiments sableux sur ce site plus confiné que les autres parcs à huîtres. Une forte accumulation de TBT a été observée dans les bivalves transplantés dans le port d’Arcachon ([TBT] = 1000 – 2000 ng.g<sup>-1</sup> p.s.; facteurs d’accumulation compris entre 35 et 95), comparativement à celle rapportée pour le port de La Vigne ([TBT] = 50 –

230 ng.g<sup>-1</sup> p.s.; facteurs d'accumulation compris entre 2 et 9). Les deux sites du port d'Arcachon présentent les mêmes profils d'accumulation des butylétains.

Les BCF enregistrés dans le port d'Arcachon (de mai à août 2001) sont extrêmement élevés (500 000 – 1 300 000) comparativement à ceux mentionnés dans la littérature et atteignent 1 300 000 en juin, une valeur jamais rapportée chez *Mytilus sp.*

### 2.3.3. Les métaux

#### 2.3.3.1. Niveaux de concentration

Les concentrations moyennes annuelles en métaux ont été reportées pour chacun des 8 métaux suivis préférentiellement (Cr, Cd, Cu, As, Pb, Se, Ni et Zn) (tableau III-22). Toutes les données obtenues dans cette étude sont détaillées en annexe 1.

Les concentrations annuelles dans les tissus de moules des 8 métaux ne présentent pas de différences significatives entre les sites portuaires et les parcs ostréicoles. Les facteurs d'accumulation (FA) indiquent que la bioaccumulation des métaux traces est beaucoup plus faible que pour les contaminants organiques, même s'il est difficile de les comparer directement puisque nous ne connaissons pas ici la spéciation des métaux, qui gouverne leur bioaccumulation dans les organismes. Les facteurs d'accumulation des métaux totaux varient de 0,8 à 2,5 sur les parcs ostréicoles et de 0,5 à 1,8 dans les ports (annexe 2).

	<u>Moyennes annuelles (µg/g p.s.)</u>							
	Cr	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd	Pb
A	1,8 ± 0,5	1,4 ± 0,8	6,0 ± 1,7	204 ± 54	14 ± 4	9 ± 7	0,8 ± 0,4	1,4 ± 0,6
B	1,7 ± 0,4	1,1 ± 0,8	19,0 ± 11,2	235 ± 63	15 ± 3	10 ± 6	0,9 ± 0,4	1,7 ± 0,6
C	1,5 ± 0,6	1,3 ± 0,5	16,8 ± 6,1	230 ± 79	16 ± 4	12 ± 7	1,0 ± 0,4	1,5 ± 0,6
D	1,9 ± 0,9	1,5 ± 0,9	22,7 ± 12,1	201 ± 92	15 ± 4	10 ± 6	0,8 ± 0,4	1,6 ± 0,4
E	1,7 ± 0,5	1,5 ± 0,9	8,4 ± 5,4	211 ± 59	15 ± 6	12 ± 8	0,8 ± 0,4	1,6 ± 0,6
F	1,6 ± 0,8	1,4 ± 0,8	7,3 ± 1,7	171 ± 73	15 ± 5	11 ± 7	0,9 ± 0,4	1,5 ± 0,5
G	1,3 ± 0,6	1,3 ± 0,8	6,6 ± 1,2	158 ± 64	16 ± 5	11 ± 8	0,8 ± 0,3	1,5 ± 0,5

**Tableau III-22: Concentrations moyennes annuelles des 8 métaux suivis préférentiellement pour chacun des sites (en µg.g<sup>-1</sup> p.s.). Les données concernant les autres métaux suivis dans cette étude sont détaillées en annexe 1.**

Les teneurs dans les 8 métaux sélectionnés dans cette étude sont inférieures ou similaires à celles rapportées par d'autres auteurs (tableau III-23). En dépit des différences interspécifiques de bioaccumulation des métaux, les concentrations enregistrées dans le bassin sont inférieures à celles rapportées dans l'estuaire du St Laurent (Canada) (De Lafontaine et al., 2000), la côte basque espagnole (Franco et al., 2002) ou la côte sud du Brésil (Torres et al., 2002). Des moules *Mytilus galloprovincialis* transplantées pendant un mois dans la baie de Nice (Stien et al. 1997) présentaient des teneurs en métaux relativement similaires à celles que nous avons retrouvées dans le Bassin d'Arcachon. Cependant, les concentrations en arsenic et en sélénium apparaissent relativement élevées, même s'il existe peu de données relatives aux teneurs de ces métaux dans l'environnement.

La contamination du Bassin d'Arcachon a également été estimée à l'aide des critères d'évaluation de la contamination métallique, définis par l'IFREMER Toulon (rapport RINBIO) utilisant des moules *Mytilus galloprovincialis* transplantées pendant 100 jours sur 38 sites de la côte méditerranéenne (tableau III-24). En règle générale la contamination du Bassin d'Arcachon par les métaux traces est relativement faible, voire non avérée. Seules les teneurs en chrome, cuivre et zinc représentent des niveaux de contamination plus élevés (de faible à forte), généralement en automne et en hiver. La contamination des ports par le cuivre, par contre, est relativement forte.

Les profils des variations saisonnières des teneurs en métaux dans les bivalves sont similaires pour les parcs ostréicoles et les ports, montrant i) que les ports d'Arcachon et de La Vigne ne semblent pas particulièrement contaminés par les métaux, et ii) que ces variations peuvent être attribuées aux variations des différents facteurs environnementaux (état physiologique des bivalves, paramètres physico-chimiques de l'eau) plutôt qu'à une origine anthropique. Les variations saisonnières des métaux n'ont donc été représentées que pour le site de référence du Moulleau (figure III-24).

Espèce	Cr	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd	Pb	Référence
<i>Dreissena polymorpha</i> Estuaire St Laurent, Canada	0,5-9,5	9-53	14-36	140-340	3,3-8,2	4,1-7,4	1,4-7,4	0,3-1,8	De Lafontaine et al., 2000
<i>Mytella guyanensis</i> Côte sud du Brésil	4,5		56				2	4,5	Torres et al., 2002
<i>Mytilus edulis</i> Côte sud du Chili	0,6-2,6						1,4-3,6		Manly et al., 1996
<i>Mytilus sp.</i> Pays Basque, Espagne	3,2	4,4	47	1205	2,8		3,1	5,7	Franco et al., 2002
<i>Mytilus galloprovincialis</i> Baie de Nice, France			8,6-9,7	125-150			0,9-1,2		Stien et al. 1998
<i>Mytilus sp.</i> Côte Atlantique française			7,1	109			0,7	1,3	IFREMER, 2002 *
<i>Mytilus sp.</i> Bassin d'Arcachon, France	1,3-1,9	1,3-1,5	6-23	160-230	14-16	9-12	0,8-1,0	1,4-1,7	* moyenne 1995-1999 Cette étude ** ** moyennes annuelles

Tableau III-23: Niveaux de métaux traces  $\mu\text{g.g}^{-1}$  p.s.) enregistrés dans différents bivalves.

Contamination		Cr		Ni		Cu		Zn		As		Cd		Pb	
		RINBIO	Arca.	RINBIO	Arca.	RINBIO	Arca.	RINBIO	Arca.	RINBIO	Arca.	RINBIO	Arca.	RINBIO	Arca.
non avérée	0	<1		<3	TOUS (~ 1,3)	<6,7		<157,6	F, G (~ 160)	<23	TOUS (~ 15)	<0,9	A, D, E, F, G (~ 0,8)	<1,7	TOUS (~ 1,6)
faible	1	1,1-1,7	B, C, F, G (~ 1,6)	3,1-4,5		6,8-10,1	A, E, F, G (~ 7)	157,7-233,4	A, D, E (~ 200)	23,1-34,1		1,0-1,6	B, C (~ 1)	1,8-3,3	
moyenne	2	1,8-2,3	A, D, E (~ 1,8)	4,6-6		10,2-13,5		233,5-309,1	B, C (~ 230)	34,2-45,3		1,7-2,2		3,4-5	
élevée	3	2,4-3		6,1-7,4		13,6-17		309,2-384,9		45,4-56,4		2,3-2,8		5,1-6,5	
forte	4	>3		>7,4		>17	B, C, D (17-23)	>384,9		>56,4		>2,8		>6,5	

Tableau III-24: Evaluation des niveaux de contamination en métaux dans le Bassin d'Arcachon (Arca.) à l'aide de l'échelle de contamination établie par l'IFREMER Toulon (RINBIO). Les concentrations sont exprimées en  $\mu\text{g.g}^{-1}$  de poids sec. Les concentrations mentionnées entre parenthèses (données Arcachon) représentent les valeurs moyennes annuelles.

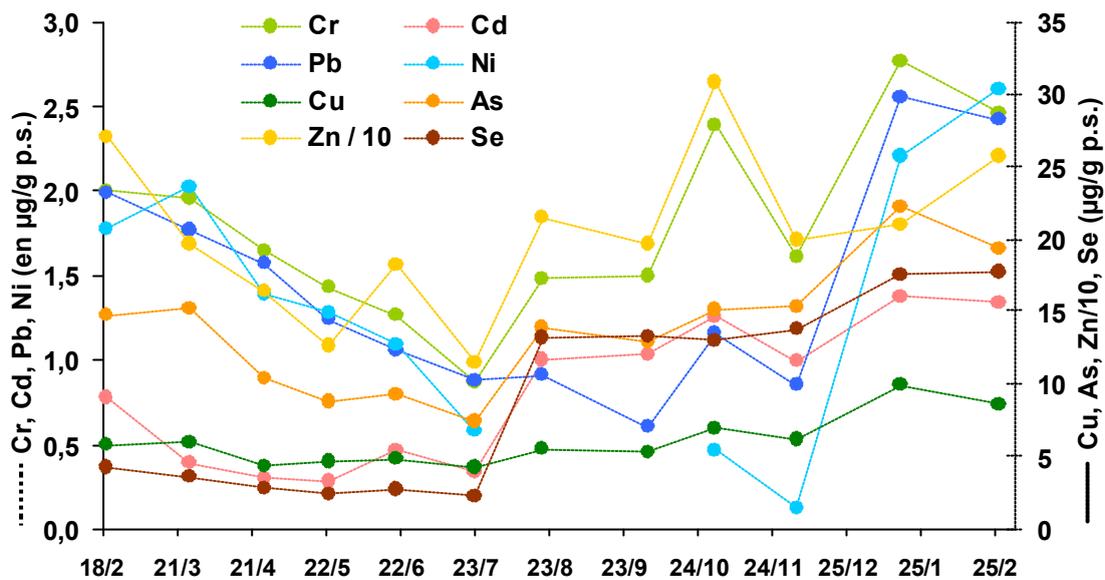


Figure III-24: variations saisonnières des 8 métaux suivis préférentiellement dans les tissus des moules collectées sur le site de référence du Moulleau.

Par contre, le cuivre et le plomb semblent présenter une accumulation particulière dans les bivalves transplantés sur les sites portuaires par rapport aux parcs ostréicoles (figure III-25). Des teneurs élevées en cuivre et en plomb sont observées en été dans les ports, mettant en évidence des apports anthropiques de ces métaux durant la période estivale caractérisée par une forte activité nautique. Le plomb présente des FA sensiblement plus élevés en Août dans les ports, même si cette tendance est beaucoup moins marquée que pour le cuivre. Pour le cuivre, les facteurs d'accumulation sont généralement toujours supérieurs à 1 sur l'ensemble des sites et significativement plus élevés dans les ports (de 1,5 à 8) que sur les parcs (de 0,8 à 1,8). De plus, les facteurs d'accumulation sont plus élevés à La Vigne qu'à Arcachon, indiquant un apport anthropique plus important, alors qu'il est très faiblement contaminé par les composés organostanniques et l'étain en général. L'augmentation des facteurs d'accumulation sur les sites portuaires pendant la période estivale pourrait être due à la recrudescence de l'utilisation de peintures antisalissures à base de cuivre (Stephenson et Leonard, 1994). De plus, dans le cadre du RNO, l'IFREMER a observé une tendance significative à la hausse de la contamination des huîtres par le cuivre depuis quelques années (Claisse et Alzieu, 1993). Ces auteurs ont suggéré que la contamination par le cuivre a pu remplacer celle par l'étain, à partir de 1982, suite à la réglementation sur les peintures à base de TBT qui aurait conduit à un retour à l'utilisation des peintures à base de cuivre, l'utilisation du sulfate de cuivre par les ostréiculteurs pour nettoyer les salissures sur les parcs ayant diminué. Cependant, les moyennes des teneurs

en cuivre dans les huîtres du Bassin restent inférieures à la moyenne calculée à partir des tous les sites du littoral Manche-Atlantique.

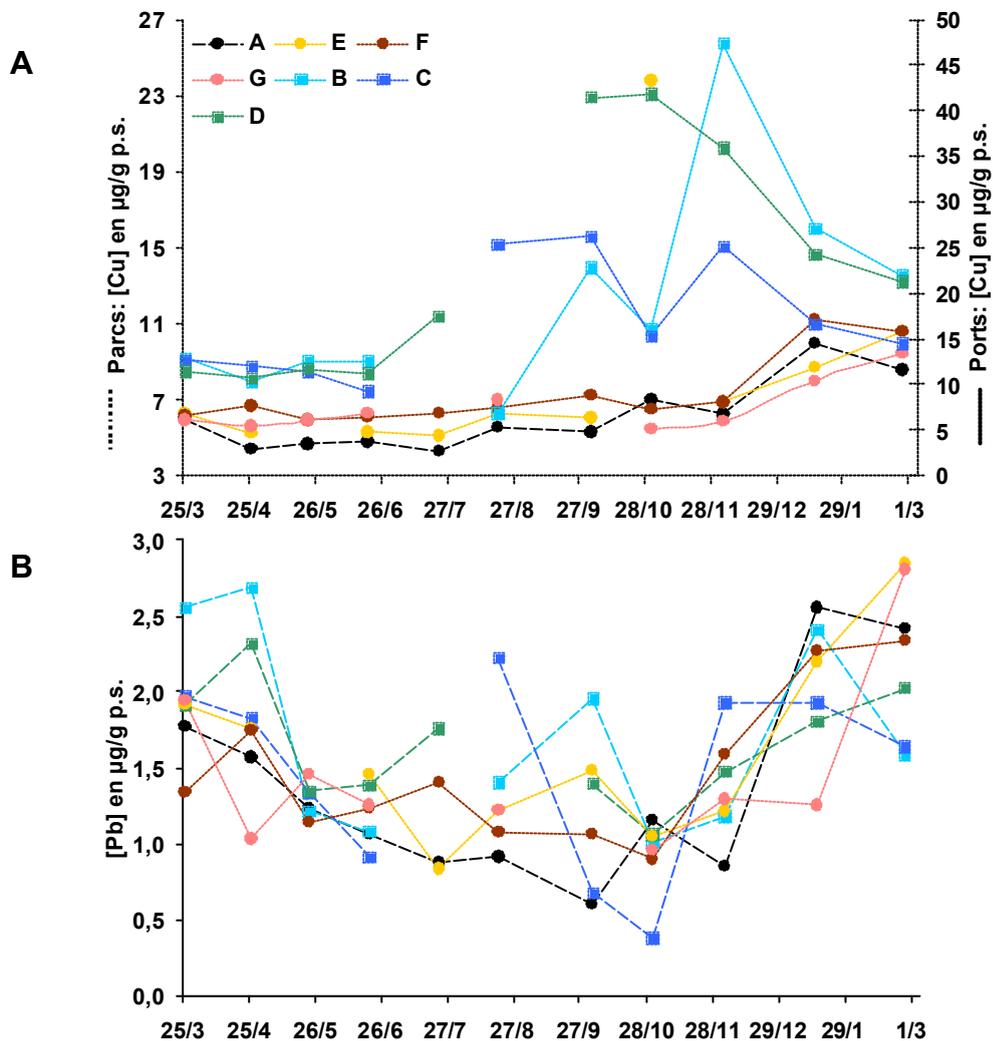


Figure III-25: Concentrations en cuivre (A) et en plomb (B) dans les tissus des moules pour l'ensemble des sites.

Comme pour les autres classes de contaminants suivis, nous pouvons nous demander si l'état d'équilibre des concentrations en métaux dans les tissus avec celles du milieu est atteint pendant la durée de transplantation. Les concentrations reportées dans des moules *Modiolus demissus* indigènes et transplantées sur un site portuaire (New Bedford, USA) pendant 56 jours présentait un état d'équilibre en moins de 30 jours pour Fe, Cr, Zn, Ni, Cu, Mn, mais pas pour Cd et Pb (durée de transplantation: 56 jours) (Nelson et al., 1995). De plus, Ritz et al. (1982) ont relevé une accumulation linéaire du plomb dans les tissus de moules *Mytilus edulis planulatus* sur une période d'exposition de plus de 86 jours. Néanmoins, Regoli et Orlando (1994) ont observé que l'état d'équilibre est atteint relativement rapidement, en 2 semaines, pour Fe, Cd, Mn, Pb, and Zn chez la moule *Mytilus*

*galloprovincialis*. Cependant, au vu des faibles concentrations en métaux dans le bassin, nous pouvons raisonnablement penser que l'état d'équilibre avec le milieu a été atteint en un mois.

### **2.3.3.2. Variations saisonnières**

La biodisponibilité d'une part et la biotransformation ou les mécanismes de régulation d'autre part conditionnent de manière complexe les concentrations globales dans les tissus des mollusques. Malgré la difficulté à identifier, en milieu naturel, l'influence individuelle des facteurs biotiques et abiotiques gouvernant la bioaccumulation des métaux, nous disposons actuellement chez les bivalves de données relatives à l'influence de la saison (Popham et al., 1983; Couillard et al., 1995; Franco et al., 2002), de la salinité (Mouneyrac et al., 1998), de l'âge (Cossa et al., 1980; Popham et al., 1983; Wang et al., 1997), de la maturité sexuelle (Cossa et al., 1980; Amiard et al., 1994). De nombreuses études ont enregistré des variations saisonnières significatives des teneurs en métaux dans les tissus de bivalves (Pillai et Vasala, 1995; De Dregori et al., 1996; Swaileh, 1996).

Pour la plupart des métaux suivis, une diminution des teneurs est observée de mars à juillet sur l'ensemble des sites, puis une lente augmentation d'août à février, présentant un maximum en automne et en hiver (figure III-24). Le cadmium et le sélénium présentent un profil saisonnier beaucoup plus marqué avec une très rapide augmentation des teneurs en août. D'autres études ont également relevé des concentrations en métaux traces dans les tissus de moules *Mytilus sp.* plus élevées en automne-hiver qu'au printemps-été. Ces différences ont été attribuées au cycle saisonnier de la reproduction et de la croissance (Philips and Rainbow, 1993; Franco et al., 2002) et à la recrudescence des pluies en hiver, augmentant de ce fait le lessivage des sols et l'introduction concomitante de matières en suspension (Fowler et al., 1976; Popham et al., 1980; Popham et al., 1983).

En plus des différents facteurs cités précédemment affectant les teneurs en métaux dans les bivalves (conditions climatiques et état physiologique), les moules sont également capables de réguler leur concentration interne en métaux (Viarengo et al., 1993). Une certaine homéostasie pour des métaux comme le fer, le manganèse, le zinc et le cuivre paraît vraisemblable en raison de leur rôle biologique. Le cuivre par exemple, entre dans la composition de certains pigments hémolympatiques des mollusques tel que l'hémocyanine. Le zinc participe en tant que co-facteur à de nombreuses réactions enzymatiques et avec le cuivre ces composés sont présents naturellement dans les métallothionéines (Cosson et al., 1998). Il n'est donc pas étonnant que leur concentration dans les tissus puisse être régulée.

Cependant, aucune corrélation entre les teneurs en métaux dans les tissus et les différents paramètres physiologiques suivis (taux de lipides ou poids sec des individus) n'a été observée dans cette étude. D'autres métaux comme le chrome, le nickel et le cadmium, ou métalloïdes (arsenic et sélénium) considérés autrefois comme toxiques, sont reconnus maintenant chez l'homme comme indispensables. Il se pourrait qu'ils le soient également chez les autres espèces et qu'il existe une certaine homéostasie de ces métaux chez les mollusques. De ce fait, parmi les huit métaux suivis dans cette étude, seul le plomb n'a pas de rôle biologique connu. Cette régulation biologique des métaux pourrait contribuer au nivellement des différences intersites si ces concentrations ne sont pas très élevées dans le milieu. Au vu des profils saisonniers et de l'absence de différences intersites marquées, les teneurs en métaux dans les moules semblent suffisamment faibles pour ne pas submerger la capacité d'homéostasie des métaux dans les tissus et caractérisent un niveau de contamination en métaux relativement faible dans le Bassin d'Arcachon.

### **2.3.3.3. Conclusion**

Nous avons vu que les concentrations en métaux dans les moules ne permettent pas de discriminer les différents sites de translocation et sont similaires à celles enregistrées sur le site de référence. A l'exception du cuivre, aucune accumulation particulière n'a été observée sur les sites portuaires, témoignant du très faible niveau global de la contamination métallique dans le Bassin d'Arcachon. Cette faible contamination métallique du bassin a également été reportée par l'IFREMER dans le cadre du RNO, les teneurs moyennes en métaux étant inférieures à celles qui ont été calculées à partir de l'ensemble des échantillons d'huîtres prélevés sur la façade Manche-Atlantique.

Les fortes variations saisonnières observées sont donc exclusivement liées i) aux variations saisonnières naturelles (paramètres physico-chimiques et état physiologique des individus) et ii) à la capacité de régulation des teneurs en métaux par les moules. Cependant, les apports anthropiques en cuivre dans les ports en été/automne semblent être suffisamment importants pour surpasser la régulation des teneurs de ce métal par les moules. Ces apports en cuivre pourraient refléter l'intensification de son usage dans les peintures antisalissures dans le Bassin depuis l'interdiction de l'utilisation du TBT.

Au vu de la similarité des teneurs en métaux et de leurs profils saisonniers sur les différents sites d'étude, on peut s'attendre à n'observer aucune incidence des métaux sur les éventuelles variations spatiales des paramètres biochimiques étudiés. Cependant, les métaux ayant des modes de spéciation très complexes capables de générer des composés aux propriétés toxicologiques très différentes, des effets éventuels sur les différents biomarqueurs ne sont pas à exclure.

### 2.3.4. Les contaminants organiques: HAP et PCB

Les moyennes annuelles des concentrations en HAP et en PCB totaux pour chacun des sites sont représentées dans le tableau III-25. Les concentrations des HAP et PCB, considérés individuellement, sont détaillées en annexe 1 et sont exprimées sur la base du ng/g de poids sec. Au sein des 21 HAP suivis, les 16 HAP dont la présence est la plus préoccupante dans l'environnement d'après l'EPA (HAP EPA: N, Ay, Ae, Fe, Phe, A, F, Pyr, BaA, Chrys, BbkjF, BaP, Ipyr, DahA et Bper) sont considérés séparément des 6 autres : le DBT, le BeP et les 4 méthylphénanthrènes (HAP autres: DBT, BeP et les 4 MP).

Site	Moyennes annuelles (ng/g p.s.)					
	$\Sigma$ 15 HAP EPA		$\Sigma$ 6 HAP autres		$\Sigma$ PCB	
A Moulleau	124 ± 59	(57 - 258)	38 ± 18	(10 - 68)	37 ± 7	(25 - 45)
B Arcachon ess.	582 ± 129	(432 - 811)	256 ± 101	(89 - 404)	38 ± 7	(27 - 47)
C Arcachon fond	1454 ± 320	(981 - 1923)	1619 ± 887	(168 - 2698)	35 ± 7	(25 - 47)
D La Vigne	559 ± 152	(321 - 745)	185 ± 46	(111 - 254)	36 ± 10	(25 - 54)
E Grand Banc	116 ± 13	(97 - 131)	30 ± 5	(23 - 35)	33 ± 4	(29 - 39)
F Ferret	113 ± 22	(90 - 154)	36 ± 9	(22 - 48)	30 ± 9	(17 - 43)
G Arguin	74 ± 25	(37 - 109)	23 ± 11	(11 - 45)	30 ± 13	(12 - 53)

**Tableau III-25: Moyennes annuelles (de février à Août 2001) des concentrations en HAP et en PCB totaux dans les tissus de moules pour chacun des sites. Les 16 HAP prioritaires (HAP EPA), et les 6 autres HAP suivis (HAP autres) sont considérés séparément. Les résultats sont présentés sous la forme: moyenne ± écart-type (valeur minimale-valeur maximale).**

Les PCB et les HAP dans le Bassin d'Arcachon s'opposent en terme de comportement. Les concentrations en PCB sont relativement faibles et varient peu, alors que les HAP présentent de fortes variations, à la fois saisonnières et intersites (tableau III-25).

#### 2.3.4.1. Les teneurs en PCB

Les concentrations en PCB totaux sont relativement faibles et homogènes sur l'ensemble des sites du bassin (figure III-26). Les profils de concentration en PCB étant similaires sur les parcs ostréicoles et sur les sites portuaires, les variations saisonnières observées semblent donc uniquement attribuables aux facteurs environnementaux naturels affectant la bioaccumulation et la biotransformation de ces composés (biodisponibilité et état physiologique des individus). Cependant, quelques différences intersites apparaissent ponctuellement. Les concentrations enregistrées en mai sur les sites A et B, et en août sur

les sites D et G sont plus élevées que sur les autres sites à la même période. Ces variations spatiales ne sont pas attribuables à des apports anthropiques.

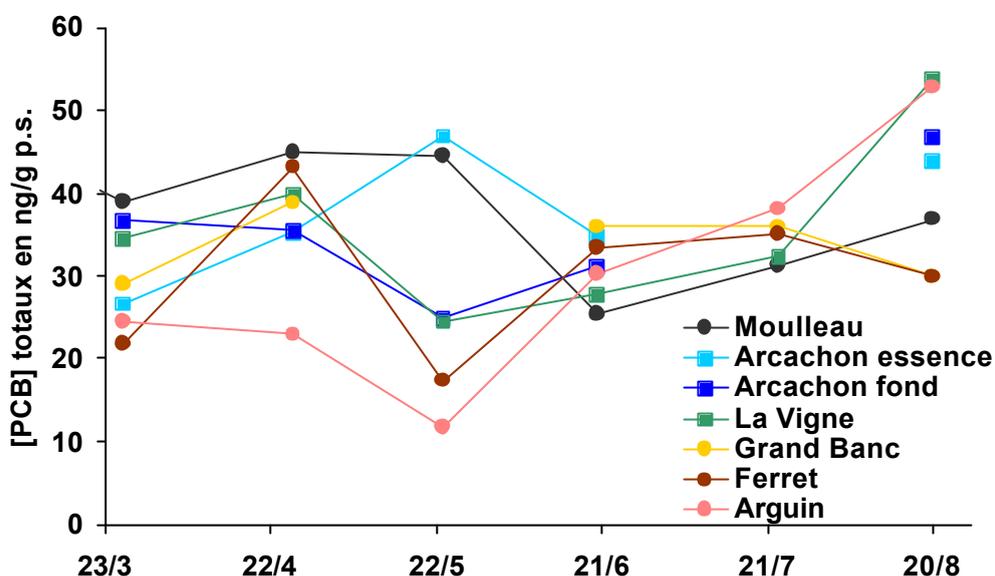


Figure III-26: Concentrations en PCB totaux de février à août 2001 pour chaque site.

En intégrant l'ensemble des variations spatio-temporelles, les teneurs en PCB totaux dans les tissus de moules du bassin sont généralement comprises dans une faible gamme de concentrations allant de 20 à 50  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  (p.s.). N'ayant observé aucune accumulation des PCB dans les individus transplantés (facteurs d'accumulation systématiquement inférieurs à 2; annexe 2), ce niveau de concentration en PCB semble donc représentatif du niveau de fond rencontré dans le Bassin d'Arcachon. Ces résultats confirment ceux précédemment obtenus par Thompson et al. (1999a) qui ont montré que le Bassin d'Arcachon présentait des concentrations extrêmement faibles en PCB; des moules collectées sur des piquets dans le Bassin renfermaient des concentrations en PCB de 21  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  (Chenal de Graveyron, septembre 1997) et de 13  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  (Graouères, décembre 1997). De plus, dans notre étude, même les sites portuaires sont relativement exempts de PCB, bien que Piérard et al. (1995) aient fait état de très fortes concentrations en PCB dans les sédiments vaseux du port d'Arcachon (200  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Cependant, les teneurs en PCB dans les sédiments portuaires déterminées dans cette étude (juin 2001) sont relativement plus faibles (site B: 86  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ; site C: 67  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ; site D: 16  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  p.s.). Si l'on compare maintenant les données de cette étude à l'échelle de niveaux de contamination établie par le Laboratoire côtier de Toulon, IFREMER (rapport RINBIO) (tableau III-26), les concentrations en PCB 138 et 153 enregistrées dans les moules du bassin caractérisent une contamination de non avérée à faible sur l'ensemble des sites du bassin. Cette échelle ayant été établie à partir des

données obtenues dans des moules *Mytilus galloprovincialis* transplantées pendant 100 jours sur 38 sites de la côte méditerranéenne, nous avons spécifié dans ce tableau une échelle plus appropriée aux niveaux rencontrés dans le Bassin d’Arcachon.

Contamination		PCB138		PCB153	
		RINBIO	Arcachon	RINBIO	Arcachon
non avérée	0	<10,3	<5	<19,6	<15 (TOUS)
faible	1	10,4-16,4	5-10 (E, F, G, C, D)	19,7-31,1	15-30
moyenne	2	16,5-22,4	10-20 (A, B)	31,2-42,7	30-45
élevée	3	22,5-28,5	>20	42,8-54,3	>45
forte	4	>28,5		>54,3	

**Tableau III-26: Comparaison des niveaux de contamination en PCB 138 et PCB 153 dans le Bassin d’Arcachon à l’aide de l’échelle de contamination établie par l’IFREMER Toulon (RINBIO), et de celle établie dans cette étude (Arcachon). Les sites du bassin (mentionnés entre parenthèse) sont reportés suivant l’échelle Arcachon. Les concentrations sont exprimées en ng.g<sup>-1</sup> de poids sec.**

#### **2.3.4.2. Les teneurs en HAP**

Les espèces prépondérantes de HAP dans le Bassin d’Arcachon sont le pyrène et le fluoranthène (majoritaires sur l’ensemble des sites et prédominants sur les parcs ostréicoles), le benzo(e)pyrène, les benzo(b,k,j)fluoranthènes et le chrysène, puis les méthylphénanthrènes (sur les sites portuaires) et, dans une moindre mesure, le naphthalène, le phénanthrène et le benzo(g,h,i)pérylène. Au Moulleau, l’apparition des méthylphénanthrènes au mois de juillet révèle l’impact de l’activité nautique dans le secteur du site de référence. Enfin, dans le port d’Arcachon, une forte augmentation générale des HAP apparaît en août à la station essence (site B), alors que pour le fond du port (site C), les concentrations reportées en août sont largement plus faibles qu’aux mois de mai et de juin, en particulier pour les méthylphénanthrènes.

##### 2.3.4.2.1. Niveaux de concentrations

Les moyennes annuelles des concentrations en HAP totaux pour chacun des sites sont représentées dans le tableau III-26. Dans les tissus de moules, des variations importantes des concentrations en HAP ont été observées (figure III-27). Les concentrations moyennes en HAP totaux (HAP EPA) sont de l’ordre de 110 ng.g<sup>-1</sup> de tissus secs sur les parcs ostréicoles et de 550 ng.g<sup>-1</sup> pour les sites portuaires B et D, alors que le fond du port

d'Arcachon (site C) est plus fortement contaminé, avec des concentrations moyennes 3 fois plus élevées. Ces différences de niveaux de contamination des sites s'appliquent également aux 6 autres HAP suivis: les concentrations sur les parcs sont de l'ordre de 30 ng.g<sup>-1</sup>, de 200 ng.g<sup>-1</sup> aux stations essence (B et D) et sont 8 fois plus élevées au fond du port d'Arcachon (1600 ng.g<sup>-1</sup>), dominées par les méthylphénanthrènes, et supérieures aux teneurs des 16 HAP EPA.

Baumard et al. (1997) ont reporté des concentrations en HAP de 290 – 390 ng.g<sup>-1</sup> dans les tissus de moules collectées dans les ports français et espagnols de la Méditerranée (campagnes BIOMAR, octobre 1995 et août 1996) et de 360 ng.g<sup>-1</sup> dans le port de Kiel (Allemagne, août 1995). Ces concentrations sont 2 à 5 fois plus faibles que celles enregistrées dans les ports d'Arcachon et de la Vigne. Cependant, il est vraisemblable que les moules transplantées dans le Bassin d'Arcachon présentent des teneurs plus élevées (et plus représentatives de la contamination du milieu) que les moules indigènes, en raison d'une biotransformation des HAP probablement plus efficace dans les moules indigènes due à leur adaptation à ces milieux contaminés, et, dans une moindre mesure, des différences d'espèce et de taille (âge) des individus collectés. Les concentrations relevées sur les parcs ostréicoles du Bassin (70 – 120 ng.g<sup>-1</sup>) sont représentatives des teneurs généralement reportées pour les zones côtières. Baumard et al. (1997) ont rapporté des concentrations en HAP de 25 – 120 ng.g<sup>-1</sup> dans les tissus de moules *Mytilus galloprovincialis* collectées le long des côtes françaises (mer Méditerranée, programme BIOMAR, octobre 1995) et de 30 – 80 ng.g<sup>-1</sup> le long des côtes françaises et espagnoles (mer Méditerranée, programme BIOMAR, août 1996).

Les deux stations à essences (B et D) présentent des niveaux de concentrations similaires malgré la grande différence de taille de ces deux ports. Les importantes différences de concentrations entre les deux sites du port d'Arcachon aux mois de mai et juin ne semblent pas être liées à la remise en suspension des sédiments durant les forts brassages causés par les déplacements des bateaux dans le fond du port (profondeur minimale au fond du port et maximale à la station essence), puisque cette hypothèse est en contradiction avec le fait i) que les concentrations s'équilibrent à nouveau au mois d'août sur ces deux sites et ii) que les concentrations des composés organostanniques et des métaux, également piégés dans les sédiments du port, ne sont pas différentes de celles enregistrées à la station essence en mai et juin. Il apparaît donc que cette forte contamination du fond du port en HAP soit directement reliée à des apports directs du chantier naval adjacent au site (vidanges, lavages des cuves des bateaux, ...). De plus, les fortes concentrations en HAP autres (dominées par celles des méthylphénanthrènes), composés caractéristiques des apports pétrogéniques, enregistrées au fond du port tendent à confirmer cette hypothèse.

Notons également que les concentrations en HAP totaux chutent considérablement en avril, et plus particulièrement dans le port d'Arcachon (figure II-15). Cette diminution des teneurs en HAP est encore plus prononcée pour les méthylphénanthrènes. De nouvelles analyses réalisées sur ces échantillons ont confirmé les niveaux de concentration précédemment obtenus. Cette chute de concentration, également décelable sur les parcs ostréicoles, pourrait être due à la ponte des organismes. Cependant, une telle dépuración en contaminants n'a pas été observée pour les autres classes de contaminants. Ce phénomène témoigne des différences de comportement de chaque type de contaminants (sources, biodisponibilité et biotransformation) et de la complexité de l'appréhension des processus gouvernant la bioaccumulation des contaminants dans les organismes. Il souligne également l'avantage de la technique de transplantation par rapport aux analyses d'eaux ou de sédiments qui n'auraient pas permis d'observer de telles variations ponctuelles dans le milieu aquatique.

De la même façon que pour les PCB, nous pouvons comparer nos données obtenues sur le fluoranthène avec les niveaux de contamination établis pour ce composé par l'IFREMER Toulon (RINBIO) (tableau III-27). Dans l'échelle RINBIO, l'indice d'une contamination forte en fluoranthène ( $>17 \text{ ng.g}^{-1}$ ) semble extrêmement faible par rapport aux niveaux de concentrations rencontrés dans les organismes marins. De plus, l'amplitude de chaque niveau de contamination ( $4 \text{ ng.g}^{-1}$ ) apparaît beaucoup trop réduite pour être réellement représentative de niveaux de contamination distincts. Pour cette raison, nous avons également spécifié notre échelle de contamination à partir des niveaux enregistrés dans le bassin (tableau III-27). Les niveaux de fluoranthène rencontrés nous ont permis de caractériser les différents niveaux de contamination des sites étudiés: le Banc d'Arguin présente une contamination non avérée ( $10 - 20 \text{ ng.g}^{-1}$ ), le Moulleau et les autres parcs ostréicoles sont caractérisés par une faible contamination en fluoranthène ( $20 - 50 \text{ ng.g}^{-1}$ ), alors que les ports présentent des niveaux très divers selon la saison, de faibles à élevés pour les stations essence ( $20 - 150 \text{ ng.g}^{-1}$ ) et de faibles à forts pour le fond du port d'Arcachon ( $20 - 240 \text{ ng.g}^{-1}$ ). Baumard et al. (1997) ont également reporté des concentrations en fluoranthène de  $20 - 40 \text{ ng.g}^{-1}$  dans des moules transplantées sur plusieurs sites du bassin (février 1995) et de  $50 \text{ ng.g}^{-1}$  dans le port d'Arcachon. Ces concentrations sont comparables à celles que nous avons obtenues (pour la même période, mars 2001) sur les parcs ostréicoles ( $10 - 40 \text{ ng.g}^{-1}$ ) et aux stations essence des ports ( $60 \text{ ng/g}$ ).

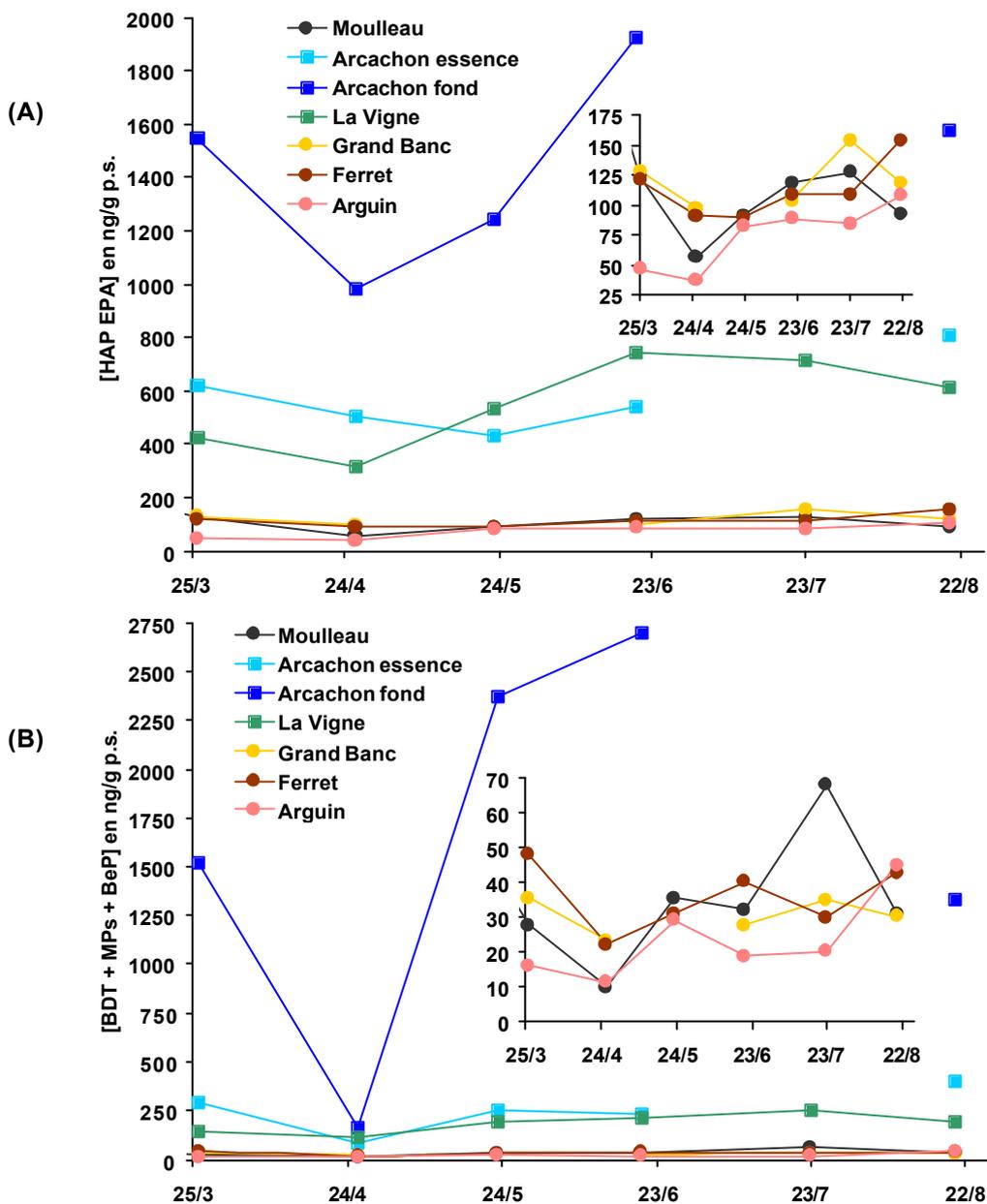


Figure III-27: Concentrations en (A) HAP EPA totaux et en (B) HAP autres totaux pour chaque site (en  $\text{ng.g}^{-1}$ ). Les concentrations enregistrées sur les parcs ostréicoles et le site de référence sont reportées en zoom.

Contamination		Fluoranthène	
		RINBIO	Arcachon
non avérée	0	<5,8	<10
faible	1	5,9-9,7	10-20 (G)
moyenne	2	9,8-13,6	20-50 (A, E, F)
élevée	3	13,7-17,4	50-150 (B, C, D)
forte	4	>17,4	>150

Tableau III-27: Comparaison des niveaux de contamination en fluoranthène dans le Bassin d'Arcachon à l'aide de l'échelle de contamination établie par l'IFREMER Toulon (RINBIO), et de celle établie dans cette étude (Arcachon). Les sites du bassin (mentionnés entre parenthèse) sont reportés suivant l'échelle Arcachon. Les concentrations sont exprimées en  $\text{ng.g}^{-1}$  de poids sec.

Nous avons également regardé la distribution relative des HAP pour préciser l'origine des HAP présents dans les tissus de moules, puisque les composés tétra-aromatiques, par exemple, sont souvent associée à une origine pétrogénique. Le tableau ci-dessous (tableau III-28) représente les distributions relatives des teneurs en HAP par classe d'aromaticité (exprimées en % de la concentration totale des 16 HAP EPA). La dernière colonne représente la proportion des 6 HAP autres en pourcentage des HAP totaux (HAP EPA + HAP autres).

Site	Distributions relatives des HAP EPA (%)					autres EPA (%)
	Σ Di-	Σ Tri-	Σ Tétra-	Σ Penta-	Σ Hexa-	
A Moulleau	13 ± 6	9 ± 2	55 ± 3	15 ± 4	8 ± 2	23 ± 6
B Arcachon essence	4 ± 1	4 ± 1	64 ± 9	19 ± 8	9 ± 3	33 ± 2
C Arcachon fond	1 ± 1	9 ± 3	65 ± 7	18 ± 8	7 ± 2	55 ± 8
D La Vigne	4 ± 1	7 ± 2	59 ± 3	18 ± 4	12 ± 2	25 ± 2
E Grand Banc	10 ± 3	7 ± 2	57 ± 3	17 ± 2	9 ± 2	20 ± 1
F Ferret	13 ± 6	10 ± 1	54 ± 5	13 ± 2	9 ± 3	24 ± 3
G Arguin	15 ± 3	13 ± 2	50 ± 7	12 ± 4	10 ± 4	21 ± 4

**Tableau III-28: Distributions relatives des concentrations en HAP (HAP EPA) par classe d'aromaticité pour chacun des sites [les di- (S Di-: N, Ay, Ae, Fe), les tri- (S Tri-: Phe, A), les tétra- (S Tetra-: F, Pyr, BaA, Chrys), les penta- (S Penta-: BbkjF, BaP, DahA) et les hexa-aromatiques (S Hexa-: lpyr, Bper)] et proportion relative des 6 HAP autres par rapport aux HAP totaux (HAP EPA + HAP autres).**

Les HAP tétra-aromatiques dans les bivalves sont prédominants sur tous sites, mais plus particulièrement dans le port d'Arcachon. Cette observation est en accord avec celle de travaux antérieurs montrant que les ports étaient caractérisés par une proportion plus importante de composés tétra-aromatiques, ces composés étant plus abondants que les HAP penta- ou hexa-aromatiques dans les pétroles (Baumard, 1997). De plus, les sites portuaires sont caractérisés par des teneurs plus élevées en HAP penta-aromatiques, alors que les sites ostréicoles présentent des teneurs plus élevées en HAP di- et tri-aromatiques. Ces différences de distribution entre les sites portuaires et les parcs ostréicoles sont relatives aux caractéristiques du sédiment auquel sont exposés les bivalves, la fraction fine des sédiments vaseux des ports étant enrichie en HAP les plus hydrophobes, alors que les sédiments sableux des parcs ostréicoles renferment principalement les HAP les plus légers (Piérard, 1995). Le port de La Vigne présente une situation intermédiaire entre les parcs et le port d'Arcachon. De plus, les fortes concentrations en HAP autres (dominées par celles des méthylphénanthrènes), composés caractéristiques des apports pétrogéniques, tendent à

confirmer cette observation. Le pourcentage des 6 HAP (HAP autres) par rapport aux HAP totaux représente 55% au site C, contre 33% au site B et de 20 à 25% sur les autres sites, y compris le port de La Vigne. Les HAP présents dans le port d’Arcachon présentent donc une origine fortement pétrogénique, contrairement au port de La Vigne. En ce qui concerne les parcs ostréicoles, la distribution relative des classes d’aromaticité observée au Grand Banc est très similaire de celle du port de La Vigne, à l’exception toutefois des HAP di-aromatiques.

#### 2.3.4.2.2. Teneurs en HAP dans les sédiments portuaires

Les teneurs en HAP dans les sédiments collectés en juin 2001 ont été étudiées sur les sites portuaires (B, C, D) et sont représentées dans le tableau III-29.

Site		Concentrations en ng/g p.s.							
		N	Phe	A	F	Pyr	BaA	Chrys	
Arcachon essence	B	55	227	24	686	673	358	484	
Arcachon fond	C	43	263	11	623	774	293	629	
La Vigne	D	36	211	32	550	433	308	439	
Site		BbkF	BeP	BaP	IP	DahA	Bper	ΣHAP	MPs
Arcachon essence	B	491	377	418	404	42	4572	4572	114
Arcachon fond	C	684	430	340	434	53	4925	4925	159
La Vigne	D	445	326	344	250	53	3725	3725	62

**Tableau III-29: Concentrations en HAP EPA dans les sédiments de juin 2001 pour chacun des sites portuaires (fraction granulométrique < 200 µm). Les concentrations en méthylphénanthrènes totaux sont également mentionnées.**

Les teneurs en HAP totaux dans les sédiments portuaires sont relativement importantes (>3700 ng.g<sup>-1</sup>), le port d’Arcachon présentant les teneurs les plus élevées (4500– 5000 ng.g<sup>-1</sup>), et sont en accord avec les teneurs obtenues dans des travaux antérieurs (Baumard, 1997). Cependant, les deux sites du port d’Arcachon ne présentent pas de différences importantes des teneurs en HAP dans les sédiments, contrairement à celles observées dans les moules. De plus, les concentrations en méthylphénanthrènes dans les sédiments du chantier naval ne sont pas très élevées (tableau III-29), comparativement à celles de la station essence, éliminant de ce fait la possibilité d’une origine sédimentaire des méthylphénanthrènes observés dans les bivalves du fond du port. Ces observations tendent à confirmer l’hypothèse que le chantier naval pourrait constituer la source principale de contamination en HAP du port.

La distribution des HAP dans les sédiments et dans les moules des sites portuaires (juin) a été étudiée en fonction de leur classe d'aromaticité (figure III-28).

Les bivalves sont enrichis en HAP les plus légers (tri- et tétra-aromatiques) par rapport aux sédiments. Cette observation est en contradiction avec les travaux de Baumard et al. (1999) qui ont observé un enrichissement en HAP les plus lourds (penta- et hexa-aromatiques) dans les moules transplantées en cage pendant trois mois sur plusieurs sites du Bassin d'Arcachon. Ces auteurs ont suggéré que cet enrichissement pouvait être dû à la remise en suspension des sédiments, et plus particulièrement de la fraction fine des sédiments enrichies en HAP les plus hydrophobes (Piérard, 1995). Les eaux du bassin étant caractérisées par une grande turbidité, les différences de concentrations relatives en HAP dans les moules entre cette étude et les travaux de Baumard (1997) pourraient s'expliquer par les différentes saisons de transplantation. En effet, les teneurs en matières en suspension dans les eaux du bassin sont maximales en hiver (étude de Baumard et al.) et minimales en été (cette étude).

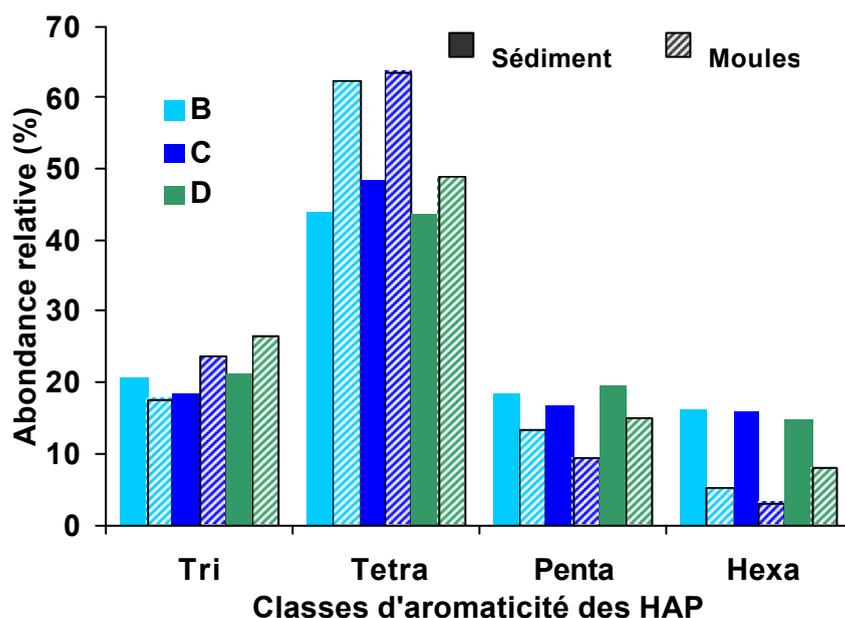


Figure III-28: Concentrations relatives des HAP par classe d'aromaticité dans les sédiments (symbole plein) et les moules (symbole hachuré) pour chacun des sites portuaires (juin 2001).

#### 2.3.4.2.3. Origine des HAP présents dans les bivalves

La valeur du rapport des concentrations de certains HAP peut nous renseigner sur leur origine. Ainsi la valeur du rapport fluoranthène sur pyrène permet de déterminer l'origine pyrolytique ( $F/P > 1$ ) ou pétrogénique ( $F/P < 1$ ) d'une contamination des sédiments par les

HAP (Baumard et al., 1997). Un second indice utilisant le rapport du phénanthrène (Phe) sur ses métabolites méthylés (MP) peut également indiquer une origine pétrogénique ( $Phe/MP < 1$ ), caractérisée par la prépondérance des HAP alkylés par rapport à leurs composés parents. Cependant, la valeur de ces indices ayant été déterminée pour les sédiments et appliquée dans cette étude aux tissus biologiques, ces rapports ont été utilisés dans le but de discriminer les sites d'étude par l'origine des composés et d'observer leurs variations saisonnières.

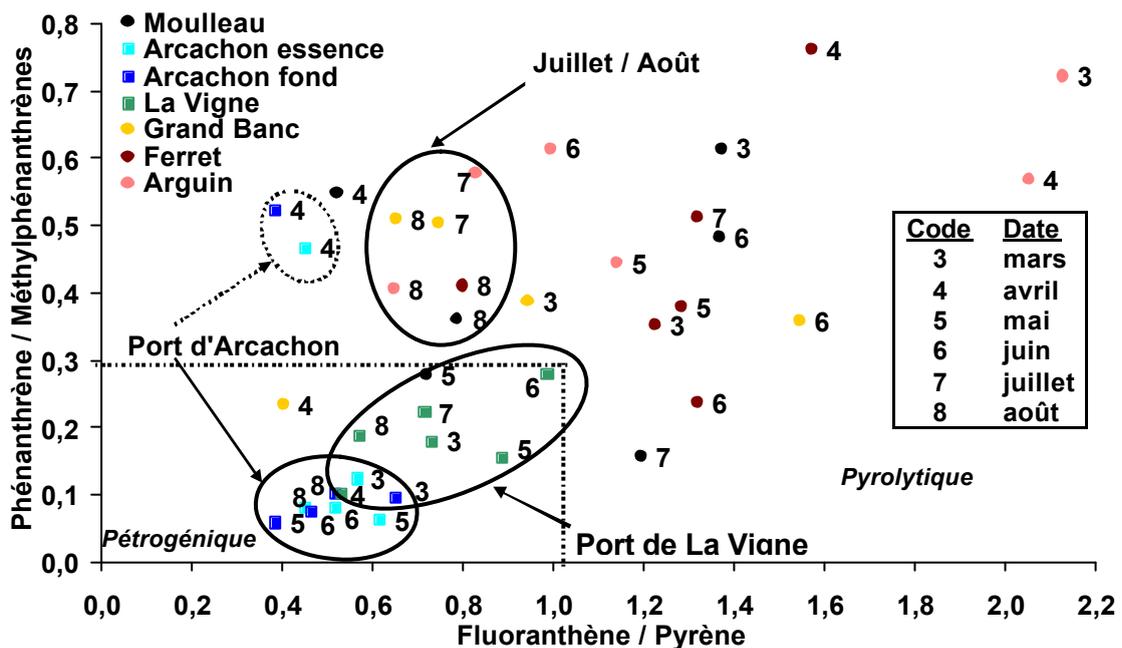


Figure III-29: Représentation des sites de février à août 2001 selon le rapport Phénanthrène/ Méthylphénanthrènes en fonction du rapport Fluoranthène/Pyrene détecté dans les bivalves.

Dans le Bassin d'Arcachon, l'origine des HAP est un mélange des deux sources, pyrolytique et pétrogénique, avec des influences différentes selon les sites et la saison (figure III-29). Pour la majorité des sites ostréicoles, la valeur de ces indices indique une origine pyrolytique très marquée des HAP ( $F/Pyr > 1$ ), alors que les sites portuaires sont caractérisés par une origine pétrogénique prédominante ( $F/Pyr < 1$ ). La représentation du rapport Phe/MP en fonction du rapport F/Pyr permet de discriminer les parcs ostréicoles des ports, mais également les deux ports entre eux. L'origine pétrogénique des HAP dans le port de La Vigne est néanmoins moins prononcée que dans le port d'Arcachon, bien que les concentrations en HAP EPA aux deux stations essence (sites D et B) soient relativement similaires. A l'inverse, les deux sites du port d'Arcachon (B et C) sont inclus dans le même groupement de points, alors que le fond du port est plus contaminé en HAP. De plus, les

chutes de concentration en HAP totaux, et plus particulièrement en méthylphénanthrènes, observées en avril dans le port d’Arcachon sont également visibles sur cette représentation (figure III-29). Sur les parcs, si l’origine pyrolytique reste prépondérante, l’impact de l’activité nautique en été est nettement visible, les mois de juillet et août formant un groupement de points à caractère pétrogénique marqué. De plus, le Banc d’Arguin présente une tendance saisonnière plus marquée, les relevés mensuels étant alignés selon l’axe origine pyrolytique (points hivernaux) – origine pétrogénique (points estivaux), témoignant de l’importance de l’impact de l’activité nautique sur ce milieu plus confiné (couronné de bancs de sable) que les autres parcs.

Il est également intéressant de noter qu’une corrélation positive a été observée entre les taux de lipides et le rapport des concentrations Phe/A ( $r=0,652$ ;  $p<0,001$ ;  $N=38$ ), alors qu’aucune relation n’existe entre les taux de lipides et la concentration de chacun de ces HAP dans les tissus de moules. De la même façon, le rapport du poids des individus sur leur taille (indice de condition IC2) est fortement corrélé avec les rapports des concentrations F/Pyr ( $r=0,742$ ;  $p<0,001$ ;  $N=39$ ) et Phe/MP ( $r=0,653$ ;  $p<0,001$ ;  $N=39$ ). Ces corrélations entre les rapports des concentrations de certains HAP, utilisés pour caractériser l’origine de la contamination, et les paramètres physiologiques constituent les seules relations que nous avons observé entre les teneurs en contaminants et l’état physiologique global des individus transplantés.

#### **2.3.4.3. Conclusion**

Le Bassin d’Arcachon est caractérisé par une contamination extrêmement faible en PCB, y compris dans les zones portuaires. Au vu de ces faibles teneurs en PCB dans le bassin, on peut s’attendre à n’observer aucune incidence des PCB sur les différents paramètres biochimiques étudiés.

A l’inverse, les HAP présentent de très fortes variations, à la fois saisonnières et intersites. Les parcs ostréicoles sont faiblement pollués par les HAP et les ports sont caractérisés par une contamination élevée en HAP et par une origine pétrogénique très marquée. De plus, le chantier naval génère des apports conséquents de HAP et représente la source principale de HAP dans les eaux du port, confortant de ce fait l’intérêt de l’utilisation de deux cages dans le port d’Arcachon. Cependant, bien que la somme des HAP soit similaire à celle de la station essence d’Arcachon, le port de La Vigne présente une origine pétrogénique beaucoup moins marquée (la distribution relative des HAP par classe d’aromaticité étant intermédiaire entre celle d’Arcachon et celles des parcs, et le

pourcentage des 6 HAP autres par rapport aux HAP totaux étant identique à ceux des parcs).

Les métabolites des HAP vont également être déterminés dans les échantillons du bassin au laboratoire et ces nouveaux résultats nous permettront peut-être d'observer des effets chez la moule entre les trois niveaux de contamination en HAP dans le bassin (parcs ostréicoles, stations essence des ports et chantier naval du port d'Arcachon) et d'obtenir une caractérisation du milieu plus précise.

Notons également que sur les sites fortement contaminés en HAP (le fond du port d'Arcachon dans le cas du Bassin, par exemple), la concentration totale des 6 HAP suivis en plus des HAP prioritaires (HAP autres) est équivalente à celle des HAP EPA. Cette observation peut se révéler extrêmement importante dans les études de biosurveillance, qui ne suivent généralement que ces 16 HAP prioritaires, dans le sens où les relations observées entre la somme des concentrations en HAP et biomarqueurs peuvent être biaisées par la présence importante d'autres HAP dans les milieux fortement contaminés.

A partir de toutes les données sur les concentrations des contaminants dans les tissus de moules, on peut donc établir une cartographie des niveaux de contamination dans le Bassin d'Arcachon, pour les sites étudiés (tableau III-30).

Site	TBT	OT	METAUX	
Site de référence (A)	20 - 40 (30)	25 - 60 (40)	Cr, Cd,	Cu (7)
Parcs ostréicoles (E, F, G)				
Port de La Vigne, essence (D)	50 - 230 (100)	60 - 290 (140)	Ni, As,	Cu (20)
Port d'Arcachon, essence (B)	900 - 2400 (1500)	1000 - 3600 (2100)	Se, Pb,	
Port d'Arcachon, chantier naval (C)			Zn	

Site	HAP EPA	HAP autres	PCB
Site de référence (A)	50 - 150 (100)	10 - 50 (30)	20 - 50 (35)
Parcs ostréicoles (E, F, G)			
Port de La Vigne, essence (D)	300 - 800 (600)	100 - 250 (190)	
Port d'Arcachon, essence (B)	900 - 2000 (1500)	100 - 400 (250)	
Port d'Arcachon, chantier naval (C)		200 - 2700 (1600)	

**Tableau III-30: Niveaux de concentration des différentes classes de contaminants suivies dans le Bassin d'Arcachon à partir des sites étudiés. Les concentrations sont exprimées en ng.g<sup>-1</sup> (p.s.), sauf pour les métaux (µg.g<sup>-1</sup>), et sont représentées sous la forme: concentration minimale – concentration maximale (moyenne annuelle).**

**OT: MBT, DBT, TBT, MPT, DPT, TPT; METAUX: Cr, Ni, Cu, Zn, Cd, As, Se, Pb; PCB: 28, 52, 118, 138, 153, 180; HAP EPA: N, Ay, Ae, Fe, Phe, A, F, Pyr, BaA, Chrys, BbkjF, BaP, Ipyr, DahA, Bper; HAP autres: DBT, 3-MP, 2-MP, 9-MP, 1-MP, BeP.**

L'évaluation des effets biologiques dans le milieu marin nécessite l'obtention de données sur la relation entre les concentrations de polluants et leurs effets. Le développement de bioindicateurs mesurés dans des organismes collectés ou transplantés sur des sites exposés à des apports de polluants offre des promesses intéressantes pour l'estimation des impacts biologiques causés par une contamination de l'environnement. C'est dans ce but, que nous avons également suivi dans cette étude de biosurveillance du bassin un ensemble de biomarqueurs validés au laboratoire (les activités enzymatiques AChE, GST et catalase et les teneurs en TBARS).

### 2.3.5. Les marqueurs biochimiques

Ces analyses ont été réalisées uniquement sur le site de référence et sur les 3 sites portuaires. Les moyennes annuelles des niveaux des biomarqueurs pour chacun des sites sont résumées dans le tableau III-31 et leurs variations mensuelles représentées à la figure 18. Les niveaux des biomarqueurs mesurés mensuellement sont détaillés en annexe 1. Aucune détermination des biomarqueurs n'a pu être réalisée en septembre au Moulleau (perte des échantillons) et en Juillet pour le port d'Arcachon, les cages ne contenant plus que 3 individus (utilisés pour la détermination des composés organostanniques). Le mois de janvier est également manquant pour l'ensemble des sites. Les quatre biomarqueurs suivis ont été mesurés sur le même individu et 10 individus ont été utilisés pour déterminer la moyenne mensuelle de chaque biomarqueur.

Site	Moyennes annuelles			
	AChE nmol/min/mg prot	GST nmol/min/mg prot	CAT μmol/min/mg prot	TBARS μM S9
A	27 ± 8 (12 - 42)	144 ± 65 (90 - 304)	101 ± 33 (50 - 159)	32 ± 14 (7 - 57)
B	27 ± 7 (15 - 37)	169 ± 66 (114 - 301)	87 ± 31 (39 - 136)	23 ± 10 (7 - 40)
C	23 ± 5 (13 - 27)	180 ± 73 (120 - 307)	87 ± 33 (43 - 134)	27 ± 17 (6 - 69)
D	27 ± 8 (14 - 38)	146 ± 40 (96 - 230)	105 ± 42 (51 - 206)	29 ± 11 (10 - 53)

**Tableau III-31: Moyennes annuelles des niveaux de chaque biomarqueur pour le site de référence et les sites portuaires. Les résultats sont présentés sous la forme: moyenne ± écart-type (valeur minimale-valeur maximale). Description des sites: A: plage du Moulleau, B: port d'Arcachon (station essence), C: port d'Arcachon (chantier naval), D: port de La Vigne (station essence).**

Les moyennes annuelles des niveaux de biomarqueurs sont extrêmement homogènes sur l'ensemble des sites. Les niveaux extrêmes des réponses (valeurs minimale et maximale) sont également identiques sur l'ensemble des sites. L'ensemble des données moyennées sur l'année ne permet pas de visualiser une discrimination spatiale de la contamination, en terme de réponses biologiques.

De plus, il est intéressant de noter que les différents biomarqueurs présentent des profils saisonniers relativement similaires sur tous les sites (figure III-31). D'ores et déjà, cette similitude nous indique qu'il n'y pas d'effet visible de la contamination sur les réponses biologiques, mais cependant qu'il existe la même perturbation partout. Les réponses biologiques présentent de très fortes variations pendant la période printemps/été (mars à juillet), et semblent caractériser un niveau de fond le reste de l'année (août à février). Notons qu'aucune relation n'a été établie pour cette période (mars à juillet) entre chaque minimum et maximum des biomarqueurs et les différents paramètres physiologiques suivis (particulièrement les indices de condition qui auraient pu révéler une perturbation de l'état physiologique à cette période) ou les concentrations des contaminants. Il se pourrait que les fortes variations observées au printemps/début été soient dues à la maturité sexuelle des animaux et plus particulièrement à la ponte des organismes, même s'il existe très peu d'études documentant l'éventuelle influence du cycle reproducteur sur les réponses biologiques. Il aurait cependant été intéressant d'évaluer un indice gonadique comme paramètre physiologique de maturité sexuelle. Nous pouvons également nous demander si, au vu de ces variations, il ne vaut pas mieux suivre les différents indicateurs biologiques utilisés pendant la période de très faible variabilité naturelle dans le Bassin d'Arcachon (automne et hiver), plutôt que toute l'année, pour pouvoir caractériser un effet éventuel des contaminants. Notons également que pendant la période de forte variabilité naturelle dans le Bassin d'Arcachon, l'activité GST s'oppose en terme de comportement aux activités AChE et catalase (quand l'activité GST atteint une valeur maximale, les activités AChE et catalase présentent des niveaux faibles, et inversement).

Au vu du nombre important de données ( $n=333$ ), les différents biomarqueurs suivis apparaissent significativement corrélés sur l'ensemble des sites (tableau III-32). Cependant, les faibles coefficients de corrélation observés ( $r < 0,3$ ) témoignent de la faible représentativité de ces corrélations, montrant que les paramètres biochimiques suivis dans cette étude ne sont pas redondants. La même absence de relation a été observée sur chacun des sites ( $N = 84$ ) ou pour chaque période mensuelle ( $N = 26$ ).

N = 333	GST	CAT	TBARS
AChE	r = - 0,236 p = 0,000	r = 0,292 p = 0,000	r = - 0,190 p = 0,001
GST		r = - 0,248 p = 0,000	r = 0,174 p = 0,001
CAT			r = 0,004 p = 0,945

**Tableau III-32: Relation entre les paramètres biochimiques suivis dans cette étude (tous sites et toutes périodes confondus, N = 333 mesures).**

Nous regarderons plus en détail par la suite l'évolution de ces réponses biologiques pour chaque période mensuelle et nous les confronterons aux données chimiques obtenues sur chacun des sites. Mais auparavant, nous avons étudié la variabilité spatiotemporelle des biomarqueurs suivis et leur éventuelle relation avec les différents paramètres physico-chimiques de l'eau et les paramètres physiologiques des bivalves.

### **2.3.5.1. Variabilité spatiotemporelle des réponses biologiques**

Pour chaque échantillon, la détermination des biomarqueurs a été réalisée sur chaque individu (N = 10, et non sur des pools d'individus). Sur l'ensemble des données obtenues, nous avons évalué pour chaque biomarqueur, leur variabilité temporelle (évaluée par le rapport des moyennes les plus élevées sur les moyennes les plus faibles des niveaux de biomarqueur enregistrés au cours de l'année sur chacun des sites d'étude) (tableau III-33), leur variabilité spatiale (niveaux des biomarqueurs dans les moules transplantées dans les ports exprimés en pourcentage des niveaux trouvés sur le site de référence) (tableau III-34) et leur variabilité interindividuelle (coefficients de variation évalués sur 10 individus pour chaque mois) (tableau III-35). Les données sont présentées sous la forme: variation minimale – variation maximale.

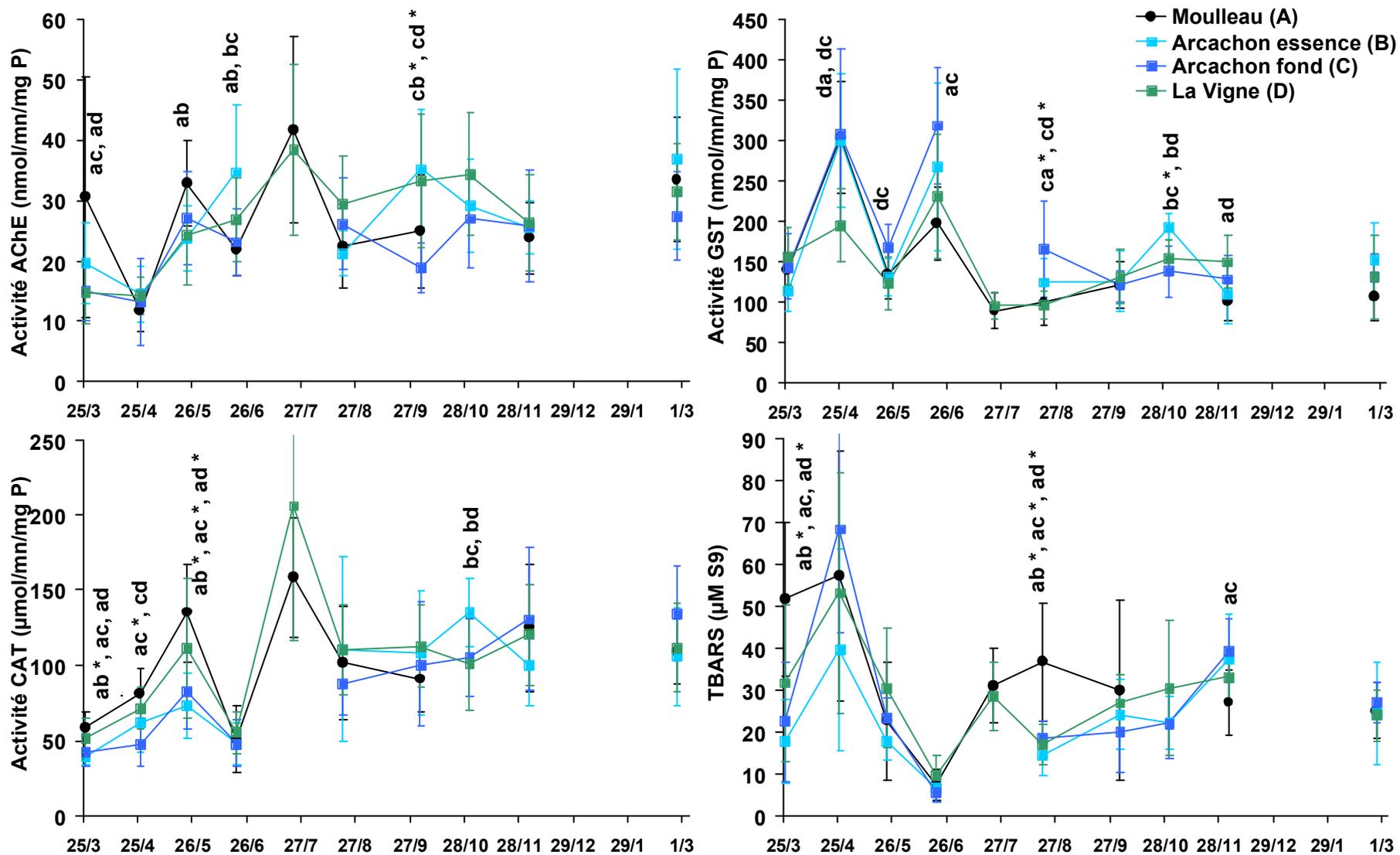


Figure III-30: Niveaux de chaque biomarqueur dans les tissus des moules du site de référence et des sites portuaires. Les différences significatives ( $p < 0,05$  et \*  $p < 0,01$ ) entre les sites sont mentionnées sur les graphes.

Site	Variabilité temporelle (max/min)			
	AChE	GST	CAT	TBARS
A: Plage du Moulleau	3,5	3,4	3,2	8,1
B: Port d'Arcachon (essence)	2,5	2,6	3,5	5,7
C: Port d'Arcachon (fond)	2,1	2,6	3,1	11,5
D: Port de La Vigne (essence)	2,7	2,4	4,0	5,3

**Tableau III-33: Variabilité temporelle des biomarqueur, évaluée par le rapport des moyennes les plus élevées sur les moyennes les plus faibles des niveaux de biomarqueur enregistrés au cours de l'année sur chacun des sites d'étude.**

Site	Variabilité spatiale (en % du site de référence)			
	AChE	GST	CAT	TBARS
B: Port d'Arcachon (essence)	64 - 160	80 - 143	66 - 120	34 - 140
C: Port d'Arcachon (fond)	50 - 116	100 - 167	57 - 123	44 - 146
D: Port de La Vigne (essence)	48 - 134	64 - 148	82 - 130	61 - 135

**Tableau III-34: Variabilité spatiale des biomarqueurs, exprimée en pourcentage des niveaux trouvés sur le site de référence pour chaque mois. Les données sont présentées sous la forme : variation minimale – variation maximale.**

Site	Variabilité interindividuelle (RSD %; n = 10)			
	AChE	GST	CAT	TBARS
A: Plage du Moulleau	25 - 65	18 - 28	18 - 44	29 - 72
B: Port d'Arcachon (essence)	17 - 40	8 - 39	14 - 56	25 - 61
C: Port d'Arcachon (fond)	22 - 55	16 - 36	23 - 41	17 - 63
D: Port de La Vigne (essence)	25 - 37	14 - 40	24 - 44	19 - 59

**Tableau III-35: Variabilité interindividuelle des biomarqueurs évaluée sur 10 individus (ou coefficient de variation des déterminations des biomarqueurs) pour chaque mois. Les données sont présentées sous la forme: coefficient de variation minimal – coefficient de variation maximal (en %).**

Les variations intra-annuelles sont très importantes (tableau III-33). Les niveaux des biomarqueurs fluctuent d'un facteur 2 à 4 pour les activités enzymatiques et jusqu'à 5 à 12 pour les teneurs en TBARS. Par contre, leurs variations spatiales sont beaucoup plus faibles (tableau III-34). Les augmentations observées sur les sites portuaires par rapport au site de référence n'excèdent jamais un facteur 1,6 et les diminutions un facteur 2, à l'exception toutefois des teneurs en TBARS à la station essence du port d'Arcachon qui atteignent des niveaux jusqu'à trois fois plus faibles que ceux enregistrés au Moulleau. Quant à la variabilité interindividuelle d'un même échantillon (coefficient de variation), elle s'échelonne de 10 à 70% (tableau III-35). L'activité GST présente la plus faible variabilité (< 40%) et les teneurs

en TBARS la plus élevée (jusqu'à 70%). De plus, parmi tous les biomarqueurs, les teneurs en TBARS présentent à la fois les variabilités temporelles et interindividuelles les plus importantes, rendant par là même ambiguë la représentativité des variations de ce paramètre biochimique dans les études de biosurveillance.

Il apparaît donc que la variabilité spatiale de chaque biomarqueur (qui pourrait être représentative d'une exposition aux contaminants, puisque l'ensemble des sites présente sensiblement les mêmes conditions écologiques et climatiques) est très largement dominée par les variabilités temporelles et interindividuelles. Au vu de ces résultats, nous pouvons penser que la variabilité spatiotemporelle des biomarqueurs étudiés n'est pas suffisante pour discriminer les différents sites d'étude. De plus, nous pouvons facilement envisager qu'il devient extrêmement difficile, au vu de ces importantes variabilités, de pouvoir différencier les éventuels effets des contaminants présents dans le bassin des effets environnementaux naturels. Enfin, la très forte variabilité interindividuelle observée pour chaque biomarqueur peut nous amener à remettre en question la méthodologie utilisée pour la détermination des paramètres biochimiques (en particulier pour les teneurs en TBARS) et/ou la nécessité d'utiliser des organismes d'élevage pour minimiser ces importantes différences intraspécifiques. Quelques études ayant rapporté l'influence du sexe sur les niveaux des indicateurs biologiques (Kirchin et al., 1992), il se pourrait que la détermination des biomarqueurs réalisée indépendamment du sexe des animaux joue également sur cette variabilité.

Pour qu'un indice comme la variation des activités enzymatiques ait une signification écotoxicologique, il faut prioritairement faire la distinction entre une inhibition/induction et une variation physiologique naturelle de l'organisme considéré. Le compartiment biologique présentant la complexité qu'on lui connaît, la réponse est à la mesure de cette complexité. Pour faire ressortir uniquement l'effet des polluants, il est indispensable de comparer les valeurs obtenues sur les sites pollués avec des valeurs mesurées sur un site de référence non contaminé. Nous avons donc tenté, dans un premier temps, d'appréhender les différentes causes possibles de variabilité naturelle des biomarqueurs étudiés sur le site de référence.

### ***2.3.5.2. Variations saisonnières des niveaux des biomarqueurs***

#### **2.3.5.2.1. Variations saisonnières des biomarqueurs sur le site de référence**

En avril, les niveaux de biomarqueurs sont les plus élevés pour l'activité GST et les teneurs en TBARS, et les plus faibles pour l'activité AChE (figure III-30). En juin, l'activité

catalase et les teneurs en TBARS atteignent des valeurs minimales, alors que les niveaux des activités AChE et GST sont élevés. Enfin, en juillet, les niveaux des activités AChE et catalase sont les plus élevés, alors que l'activité GST atteint son niveau le plus faible. De façon générale, les niveaux de chaque biomarqueur sont extrêmement fluctuants pendant la période printemps/été, alors qu'ils sont relativement stables en automne/hiver dans le Bassin d'Arcachon. En ce sens, les différents niveaux des biomarqueurs ne reflètent pas de tendances saisonnières très nettes.

D'autres études ont rapporté des variations saisonnières significatives de ces biomarqueurs chez différentes espèces de moules. Chez la moule *Mytilus galloprovincialis* (baie d'Agadir, Maroc), Najimi et al. (1997) ont observé deux maxima d'activité AChE en mars et en décembre, avec un minimum au mois de septembre, le rapport entre les moyennes les plus faibles et les moyennes les plus élevées étant supérieur à trois. D'autres études ont également relevé des variations saisonnières naturelles des niveaux d'activité AChE, mais sur des sites recevant des apports anthropiques non négligeables, rendant de ce fait impossible l'estimation des variations naturelles de ce biomarqueur. Escartin et Porte (1997) ont reporté des niveaux maximum en janvier et minimum d'Avril à mai de l'activité AChE chez *Mytilus galloprovincialis*. Ces moules étaient mensuellement collectées dans le Delta de L'Ebre en Espagne, zone de riziculture soumise à d'importants apports de composés organophosphorés et de carbamates. Ces variations pourraient être interprétées comme résultant d'une exposition à ces composés nulle en hiver et maximale au printemps lors de l'épandage de ces pesticides. Des niveaux d'activité AChE minimum en automne-hiver, suivis d'une augmentation progressive jusqu'à la fin de l'été ont également été observés chez des moules *Mytilus edulis* transplantées dans l'estuaire de Vilaine (Forget, 1998) et dans la baie de La Rochelle (Radenac et al., 1998), sites également soumis à des apports de pesticides.

Les activités antioxydantes des bivalves sont, à l'inverse, extensivement contrôlés par le cycle saisonnier. Plusieurs auteurs ont rapporté des niveaux d'activités anti-oxydantes plus élevés en été qu'en hiver (novembre à mars) dans les glandes digestives de *Mytilus sp.* (Viarengo et al., 1991; Power et Sheehan, 1996; Dellali et al., 2001), bien que ces différences saisonnières soient beaucoup moins prononcées que celles observées dans le Bassin d'Arcachon. Cependant, Viarengo et al. (1991) ont observé que la diminution des niveaux d'activité catalase correspondait à une augmentation des teneurs en produits de peroxydation lipidique (TBARS), ce qui n'est pas le cas dans notre étude, les teneurs en TBARS présentant également des niveaux élevés au printemps et en été. Dellali et al., (2001) ont rapporté que les niveaux élevés de l'activité catalase en été étaient corrélés au

taux d'oxygène dissous lié à l'importante eutrophisation du site de transplantation (lagune de Bizerte, Tunisie).

Power et Sheehan (1996) n'ont pas observé de variations saisonnières significatives de l'activité GST dans les glandes digestives de *Mytilus edulis* (Cork Harbour, Irlande), mais par contre, ils ont rapporté des niveaux d'activité GST plus élevés dans les branchies et des variations significatives dans ces tissus, avec une forte augmentation de septembre à mars (activités exprimées en mg de tissus et non en mg de protéines dans ces tissus) (cette enzyme pourrait avoir un rôle tissulaire spécifique en protégeant les branchies contre le stress oxydatif hivernal).

#### 2.3.5.2.2. Relation avec les paramètres physiologiques et physico-chimiques

Aucune corrélation significative n'a été observée entre les réponses des biomarqueurs et les différents indices physiologiques suivis (indice de condition, taux de lipides, poids sec), à l'exception d'une relation linéaire positive de l'activité catalase avec le poids sec des individus ( $r=0,644$ ,  $p<0,0001$ ,  $N=34$ ), tous sites confondus. Cependant, la très forte variabilité des réponses biologiques observée de mars à juillet pourrait être dues aux changements physiologiques liés à l'activité de reproduction des bivalves dans le Bassin, et plus particulièrement à la ponte. En effet, les changements associés à la reproduction et aux variations de température, en terme de stockage et d'utilisation de la nourriture, entraînent des changements des statuts hormonal et nutritionnel chez les mollusques, qui pourraient également affecter les niveaux des molécules bioindicatrices (Sheehan et al., 1999). Dans le Bassin d'Arcachon, la principale période de ponte de *Mytilus sp.* a lieu en avril (Lubet, 1959) et coïncide généralement avec le bloom phytoplanctonique (fin avril).

Nous avons également regardé s'il existait des corrélations significatives entre les niveaux de biomarqueurs enregistrés sur chacun des sites et les différents indices physiologiques (taux de lipides, poids sec et indices de condition), mais aussi avec les paramètres physico-chimiques de l'eau, relevés quatre fois par mois par l'IFREMER Arcachon (température, salinité, MES [matières en suspension], MESO [matière organique particulaire] et teneurs en chlorophylle a, phéopigments, nitrates+nitrites, phosphates, silicates et ammonium). Les principales caractéristiques des paramètres physicochimiques dans le Bassin d'Arcachon sont: des températures comprises entre 7 et 22°C, des salinités variant de 26 à 33 dans les chenaux principaux, mais pouvant descendre jusqu'à 15 dans la partie amont de la lagune, un développement phytoplanctonique printanier (mais des teneurs annuelles moyennes en chlorophylle a et en orthophosphates relativement faibles en tout point du bassin), de fortes teneurs en matières en suspension (MES) et en silicates au

printemps. Les paramètres tels que le pH ou la teneur en oxygène dissous présentent peu d'intérêt puisque les stations étudiées se situent dans les chenaux principaux du bassin (valeurs très stables). Néanmoins, la teneur en oxygène dissous aurait été intéressante à suivre dans les zones confinées que représentent les ports. A titre indicatif, les variations saisonnières des différents paramètres physico-chimiques dans le Bassin d'Arcachon (données IFREMER Arcachon) sont représentées en annexe 4.

Les variations saisonnières des paramètres biochimiques et physico-chimiques sont représentées à la figure III-31 pour le site de référence. Les niveaux des biomarqueurs ne semblent pas varier dans le même sens que les deux facteurs prépondérants que sont la température et la salinité. Cependant, l'activité AChE semble tout de même augmenter avec la température de mars à août. Cette relation des niveaux d'AChE avec la température a été démontrée dans plusieurs études (Edwards et Fisher, 1991). De plus, les valeurs maximales de l'activité GST et des teneurs en TBARS, et minimales de l'activité AChE enregistrées en avril coïncident avec le bloom phytoplanctonique (fin avril), mais également avec les teneurs en MES et en nitrates les plus élevées et avec la période de fluctuations maximales de la salinité (figure III-31).

Aucune corrélation significative n'a été observée entre chacun des biomarqueurs (tous sites confondus; N=33) et les différents paramètres physico-chimiques de l'eau. En regardant chaque site individuellement (N=8), des corrélations linéaires apparaissent entre l'activité AChE et les teneurs en MES au Moulleau ( $r=0,78$ ,  $p=0,02$ ), entre l'activité catalase et la salinité (sites B et C;  $r=0,81$ ,  $p=0,015$ ) et les teneurs en chlorophylle a (site C;  $r= - 0,86$ ,  $p=0,003$ ) dans le port d'Arcachon et entre l'activité AChE et la température ( $r=0,82$ ,  $p=0,007$ ), la salinité ( $r=0,85$ ,  $p=0,004$ ) et les teneurs en chlorophylle a ( $r= - 0,78$ ,  $p=0,013$ ) dans le port de La Vigne. Les corrélations enregistrées sont positives avec la température et la salinité et négatives avec les teneurs en chlorophylle a et en MES. Cependant, au vu i) du faible nombre de données disponibles pour chacune des analyses statistiques (N=8), ii) de l'utilisation de données moyennées (moyenne sur les 10 individus pour les réponses biologiques, et moyenne des valeurs basse mer et pleine mer pour les paramètres physico-chimiques) et iii) de la période suivie (de mars à décembre uniquement), ces observations ne sont peut-être pas représentatives d'une réelle influence des paramètres physico-chimiques du milieu sur la réponse des biomarqueurs. Il aurait été intéressant de suivre également les variations des teneurs en oxygène dissous dans l'eau, plus particulièrement dans les zones confinées que représentent les ports, pour regarder une éventuelle relation avec les paramètres biochimiques de stress oxydatif (CAT, TBARS).

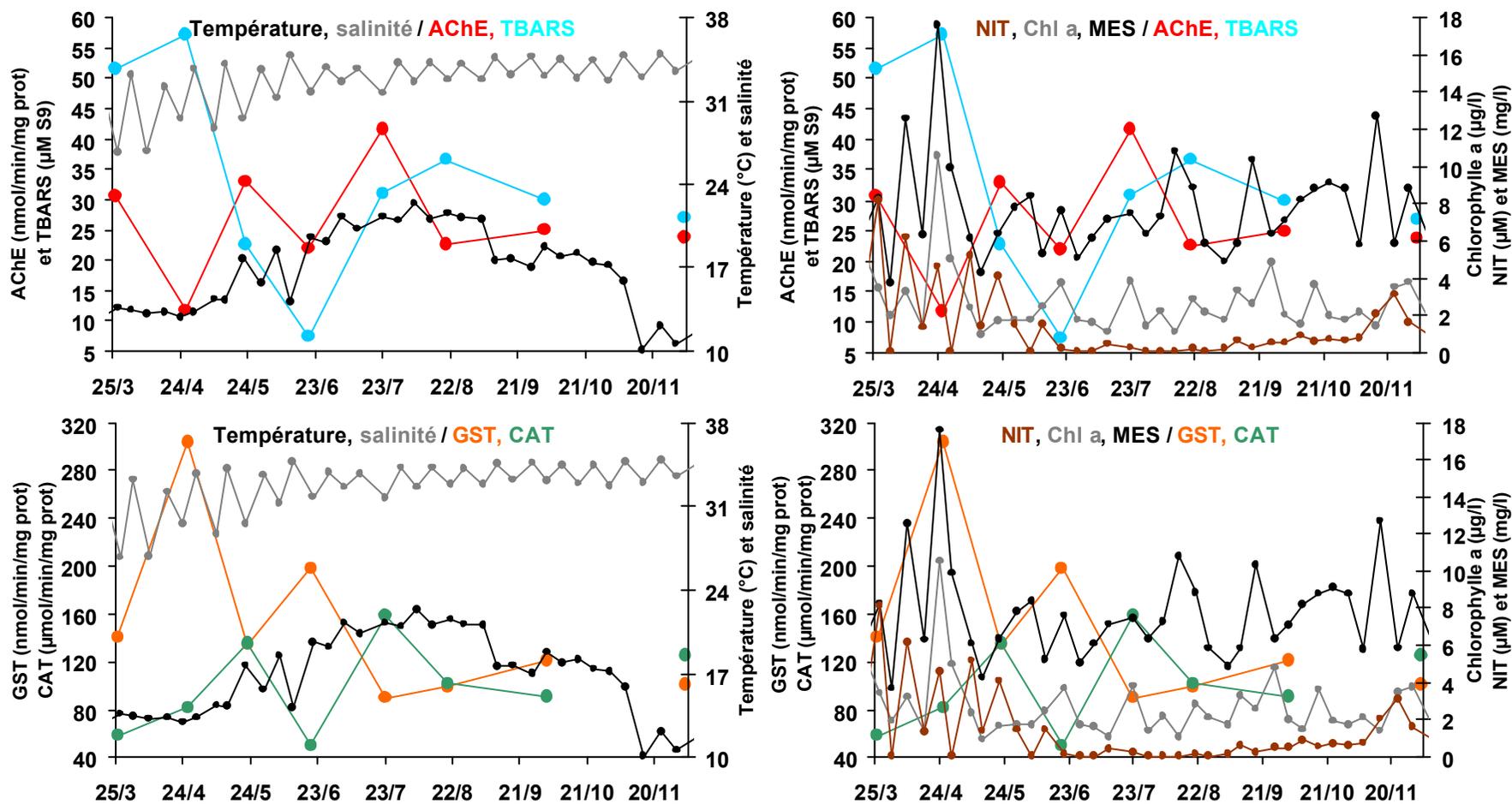


Figure III-31: Variations saisonnières des biomarqueurs et des paramètres physico-chimiques de l'eau : température, salinité, teneurs en matières en suspension (MES), en nitrates et nitrites (NIT) et en chlorophylle a (Chl a) sur le site de référence du Moulleau.

Très peu d'études documentant l'influence des paramètres environnementaux (paramètres physico-chimiques de l'eau, hydrodynamisme, niveau d'eutrophisation, etc.) ou prenant en compte la mesure de ces paramètres lors des études de biosurveillance ont été réalisées jusqu'à présent. La réponse de l'activité catalase dépend de facteurs abiotiques du milieu, notamment la température de l'eau (corrélation positive) et le taux d'oxygène dissous (corrélation négative) chez des moules *Mytilus galloprovincialis* de la lagune de Bizerte en Tunisie (Dellali et al., 2001). Ces auteurs ont rapporté une augmentation de l'activité catalase en période d'hyper-eutrophisation. Par contre, aucune corrélation n'a été observée avec le pH (variations saisonnières très faibles) et la salinité, bien que cette dernière soit significativement corrélée à la température de l'eau. Cependant, les données concernant les teneurs en contaminants sur chaque site ne sont pas mentionnées et font l'objet d'une autre publication (Khessiba et al., 2001). Pellerin-Massicote et al. (1994) ont déjà observé chez les moules (*Mytilus edulis*) d'une zone estuarienne l'effet stimulant d'une élévation de température sur l'activité catalase. De Lafontaine et al. (2000) ont mis en évidence une corrélation entre les teneurs en TBARS dans des dreissènes *Dreissena polymorpha* et les différentes masses d'eau du St Laurent, catégorisées en eaux fortement minéralisées (forte conductivité), eaux mixtes et eaux faiblement minéralisées (faible conductivité), les TBARS étant plus sensibles et plus spécifiques pour les eaux fortement minéralisées. La raison de cette variabilité n'est pas connue, mais un élément de réponse a été proposé, à savoir que le type de masse d'eau a également une incidence sur les niveaux de contaminants dans les eaux du St Laurent (Cossa et al., 1998). Cependant, il convient de rester prudent sur ces observations puisque aucun point de référence non contaminé n'a été utilisé dans cette étude et que l'on ne sait donc pas quelle part de la réponse des biomarqueurs aux conditions de stress résulte d'une exposition aux contaminants ou de la variabilité environnementale naturelle.

#### 2.3.5.2.3. Différences intersites des réponses biologiques

Une analyse de variance Anova à un facteur permet de constater si les variations des niveaux de biomarqueurs en fonction du site de transplantation présentent des différences significatives. Quand l'analyse de variance est significative, les comparaisons entre les sites sont réalisées à l'aide du test de Tukey. Les différents biomarqueurs suivis présentent de faibles variations spatiales, pouvant potentiellement résulter d'une exposition aux contaminants. Pour chaque biomarqueur étudié, les différences intersites significatives sont mentionnées sur les graphes pour chaque période (figure III-30).

Pour l'activité AChE, des variations significatives ont été observées en mars (A avec C et D), en mai (A et B), en juin (B avec C et A) et en septembre (C avec B et D). Pour l'activité

GST, les sites (au moins deux d'entre eux) sont différenciés pour chaque période, à l'exception des mois de mars, juillet, septembre et février. Pour l'activité catalase, des différences intersites significatives ont été observées en mars, avril et octobre, les trois sites portuaires étant différenciés du site de référence du Moulleau. Les variations des teneurs en TBARS ne sont significatives que pour les mois de mars, août et novembre, et, tout comme l'activité catalase, discriminent les sites portuaires du site de référence. Au vu des profils saisonniers des biomarqueurs et des différences intersites observées, trois mois semblent présenter de très fortes perturbations des différentes activités enzymatiques et des teneurs en TBARS: mars, avril et juin. Cependant, aucune de ces perturbations importantes n'a pu être mise en relation avec les événements ponctuels de contamination chimique sur chacun des sites.

Un autre facteur environnemental qui pourrait avoir une influence à la fois sur les réponses biologiques et sur la bioaccumulation des contaminants (même si nous ne savons pas dans quel sens ce facteur pourrait les faire évoluer) est caractérisé par les conditions de maintenance des cages dans la colonne d'eau, différentes entre les ports (immersion totale des individus, "*subtidal condition*") et les parcs ostréicoles et le site de référence (période d'immersion/émersion selon le cycle des marées, "*intertidal condition*"). Durand et al. (2002) ont observé une dépuración plus lente du BaP chez des moules *Mytilus edulis* exposées au BaP (1 ppb) et maintenues dans des conditions d'immersion continue par rapport aux individus maintenus en conditions d'alternance des périodes immersion/émersion, ainsi qu'une peroxydation lipidique dans le manteau 3 fois plus élevée (teneurs en MDA), bien que les concentrations tissulaires de BaP soient équivalentes dans les deux situations. Ces résultats semblent montrer un accroissement de la toxicité du BaP, en terme de dommages oxydatifs, dans le manteau sous l'effet du cycle des marées (alternance de périodes d'immersion et d'émersion).

### **2.3.5.3. Confrontation des données chimiques et biochimiques**

L'évaluation des effets biologiques dans le milieu marin nécessite l'obtention de données sur la relation entre les concentrations de polluants et leurs effets. Dans les études de biosurveillance, l'accent est aujourd'hui mis sur l'interface chimie/biologie (approches complémentaires et indissociables). Mais cette approche devrait également intégrer les différents facteurs régulant la bioaccumulation des contaminants dans les organismes (biodisponibilité/biotransformation) qui ne sont pas souvent pris en compte.

### 2.3.5.3.1. Corrélations observées entre contaminants et biomarqueurs

Un faible nombre de corrélations significatives entre les concentrations en contaminants et les niveaux d'indicateurs biologiques mesurés dans les tissus de moules est apparu dans cette étude (tableau III-36). Les coefficients de corrélation entre les biomarqueurs et les contaminants, considérés individuellement, sont détaillés en annexe 3.

Corrélation	positive	négative
AChE	F/Pyr	<u>B</u> , <u>Fe</u> , <u>PCB 52</u> , PCB 28, Cr, Mn, TBT/DBT
GST		Se, Cd
CAT		B
TBARS	PCB 52, <u>Mn</u> , Cr, Fe, Rb	<u>Ae</u> , <u>E</u> , <u>A</u> , Pyr, Ay, Fe, DBT (HAP), Phe; MBT, DBT

**Tableau III-36: Corrélations observées entre les biomarqueurs et les contaminants (classés selon le degré de corrélation, de la plus forte à la plus faible). Police des contaminants: en normal:  $p < 0,05$ ; en soulignées:  $p < 0,01$ ; en doublément soulignées:  $p < 0,001$ . Nombre de données disponibles pour l'analyse statistique: 18 pour les PCB, 22 pour les HAP, 27 pour les métaux et 37 pour les composés organostanniques.**

Les activités GST et catalase ne présentent pas de corrélation avec les différents contaminants suivis, à l'exception d'une relation négative avec le bore (catalase) et le sélénium et le cadmium (GST). Par contre, l'activité AChE semble présenter une corrélation avec plusieurs métaux (B, Fe, Cr, Mn) et PCB (PCB 52 et PCB 28). Un certain nombre d'entre eux (PCB 52 et métaux essentiels: Fe, Cr, Mn) sont à la fois corrélés à une augmentation des teneurs en TBARS et à une diminution de l'activité AChE. Les teneurs en TBARS paraissent diminuer en présence des HAP les plus légers, les di- et tri-aromatiques, et dans une moindre mesure, au mono- et au dibutylétain. L'activité AChE est également positivement corrélée au rapport des concentrations F/Pyr, utilisé pour caractériser l'origine des HAP présents dans les tissus. Cependant, ces résultats doivent être considérés avec prudence au vu i) du nombre restreint de données disponibles pour l'analyse statistique (18 pour les PCB, 22 pour les HAP, 27 pour les métaux et 37 pour les composés organostanniques), ii) du fait qu'ils aient été obtenus pour tous sites et périodes confondus, ce qui pourrait masquer un effet visible sur un seul site par exemple et iii) des fortes dispersions des points liées aux plages importantes des niveaux de concentrations des contaminants et de la faible variation de chaque paramètre enzymatique (ou l'inverse, dans le cas des HAP légers, des PCB et du MBT et du DBT). L'association de ces deux facteurs amoindrit certainement la représentativité de ces corrélations. De plus, les diminutions ou

augmentations des biomarqueurs pourraient également être liées à d'autres facteurs que la contamination, tel que l'état de faiblesse général des moules dans ces milieux confinés que sont les ports.

Cette étude de corrélation a été réalisée sur l'ensemble des données (tous les sites confondus) afin de déterminer quel contaminant pouvait avoir une influence sur les biomarqueurs sélectionnés. La même analyse a été effectuée sur chacun des sites, afin i) de vérifier si chacun des sites considérés individuellement présente aussi cette corrélation et ii) si les différences intersites observées pouvaient être mise en relation avec la présence d'un contaminant particulier dans les tissus. Une corrélation négative significative entre l'activité AChE et le fer a été observée aux deux stations essence (sites B et C) ( $r = -0,75$ ;  $p = 0,03$ ;  $N = 7$ ), où apparaissent de fortes concentrations en fer dans les tissus en mars et en avril. Les teneurs en TBARS semblent positivement corrélées avec Cr ( $r = 0,70$ ;  $p = 0,04$ ;  $N = 9$ ) et Mn ( $r = 0,77$ ;  $p = 0,02$ ;  $N = 9$ ) dans le port de La Vigne. Par contre, aucune relation entre le TBT et les biomarqueurs n'a été observée. Notons également qu'il n'a été observé aucune corrélation significative entre les différents biomarqueurs et les HAP regroupés par classe d'aromaticité. En effet, Gowland et al. (2002) ont observé une forte corrélation entre l'activité GST et les teneurs en HAP totaux (de 15 à 930  $\text{ng.g}^{-1}$  en poids humide) chez des moules *Mytilus edulis* indigènes et transplantées sur des sites soumis à des effluents contenant des HAP (embouchure du Loch Leven, Ecosse). De plus, ces auteurs ont montré que cette forte corrélation était relative aux HAP de haut poids moléculaire, suggérant que les HAP penta- et hexa-aromatiques jouaient un rôle plus prononcé dans l'induction de l'activité GST chez les moules que les di- à tétra-aromatiques.

Les sites impactés par des contaminants spécifiques n'ont pas été nécessairement révélés par les biomarqueurs suivis. En effet, la forte contamination du port d'Arcachon par les HAP et le TBT ne semble avoir aucune incidence sur les moules transplantées, puisque aucune variation significative des réponses des biomarqueurs suivis n'a été observée sur ces sites. Cependant, les fortes concentrations en contaminants enregistrées dans les moules transplantées dans le port d'Arcachon pourraient être suffisamment élevées pour occasionner une détérioration générale de l'état de santé des individus pouvant, à son tour, entraîner une diminution de la réponse inductive (Livingstone et al., 1993). Les concentrations en TBT dans les bivalves (900 – 2400  $\text{ng.g}^{-1}$  p.s.), par exemple, sont supérieures à celles connues pour induire des effets toxiques chez *Mytilus edulis*. Des concentrations tissulaires de TBT supérieures à 85  $\text{ng.g}^{-1}$  (Sn, p.s.) entraînent un découplage de la phosphorylation oxydative (Page et Widdows, 1991) et, pour des concentrations supérieures à 1700  $\text{ng.g}^{-1}$ , une diminution rapide du taux d'alimentation et donc de la SFG ("Scope For Growth", allocation d'énergie à la croissance et à la

reproduction) est observée, via un effet neurotoxique sur l'activité des cilia des branchies (Widdows et Page, 1993). De plus, les bivalves transplantés dans les ports sont soumis en permanence aux effets de mélanges complexes de contaminants et leurs interactions (effets synergiques, additifs ou antagonistes) pourraient également affecter le système de défense enzymatique des organismes. Padros et al. (2000) ont, par exemple, rapporté des effets antagonistes du TBT sur la biotransformation du BaP et du TBT et du BaP sur l'activité EROD chez la truite *Salvelinus fontinalis*. De même, toutes les classes de contaminants n'ont pas été déterminées dans cette étude, ni même tous les contaminants appartenant à la même classe, et leur présence dans les eaux du Bassin pourrait également avoir affecté les réponses biologiques.

#### 2.3.5.3.2. Analyses statistiques multivariées (ACP)

Des analyses par composantes principales (ACP) ont été réalisées afin regarder si les moules transplantées permettent de discriminer les différents niveaux de contamination rencontrés dans le Bassin d'Arcachon. Les variables prises en compte dans ces analyses sont les 3 butylétains, les 21 HAP, les 6 PCB, 5 métaux (les métalloïdes As et Se, ainsi que le Zn non pas été suivis), les 4 biomarqueurs et les 2 indices de conditions (IC1 et IC2) mesurés dans les tissus de moules. Un changement d'échelle a été effectué pour permettre une comparaison directe des données. Les données ont tout d'abord été exprimées sur une base molaire, puis transformées en  $\log_{10}$  afin de réduire les effets générés par les importantes différences de grandeur entre les paramètres suivis tout en conservant le poids de chaque variable. Par exemple, les paramètres exprimés en ng/g sont transformés en  $\log_{10}$  (nmol/g). Pour faciliter la lecture des cartes ACP, les échantillons ont été codés. Les sites sont indiqués par leur lettre respective et les dates de transplantation par le numéro du mois. Par exemple, l'échantillon correspondant au Moulleau du 23/05/2001 sera codé A05. La matrice utilisée pour ces analyses comporte 42 variables (les polluants et les paramètres biochimiques et physiologiques) et 21 objets (les échantillons) (42x21).

Une ACP normée (Devilleers et Karcher, 1991) a tout d'abord été effectuée sur la totalité de la matrice (Figure III-32). Les deux premières composantes principales PC1 et PC2 expliquent à peu près 60% de la variance totale (figure III-32C). L'examen de la carte des échantillons (figure III-32B) révèle un gradient marqué de contamination par sites le long de l'axe PC1 très nette pour le site de référence (site A). Le niveau de contamination augmente en allant vers les  $x < 0$  ( $A < D < B < C$ ) et est principalement déterminé par les HAP (à l'exception des di-aromatiques), les butylétains et le cuivre, localisés à l'extrémité négative de l'axe PC1 (figure III-32A). C'est effectivement ce que nous avons observé lors de l'étude des niveaux de contaminants dans le Bassin (tableau III-30).

Pour identifier les variables les plus influentes, deux analyses multivariées distinctes ont été réalisées sur les polluants (figure III-33) et sur les paramètres biochimiques et physiologiques (figure III-34).

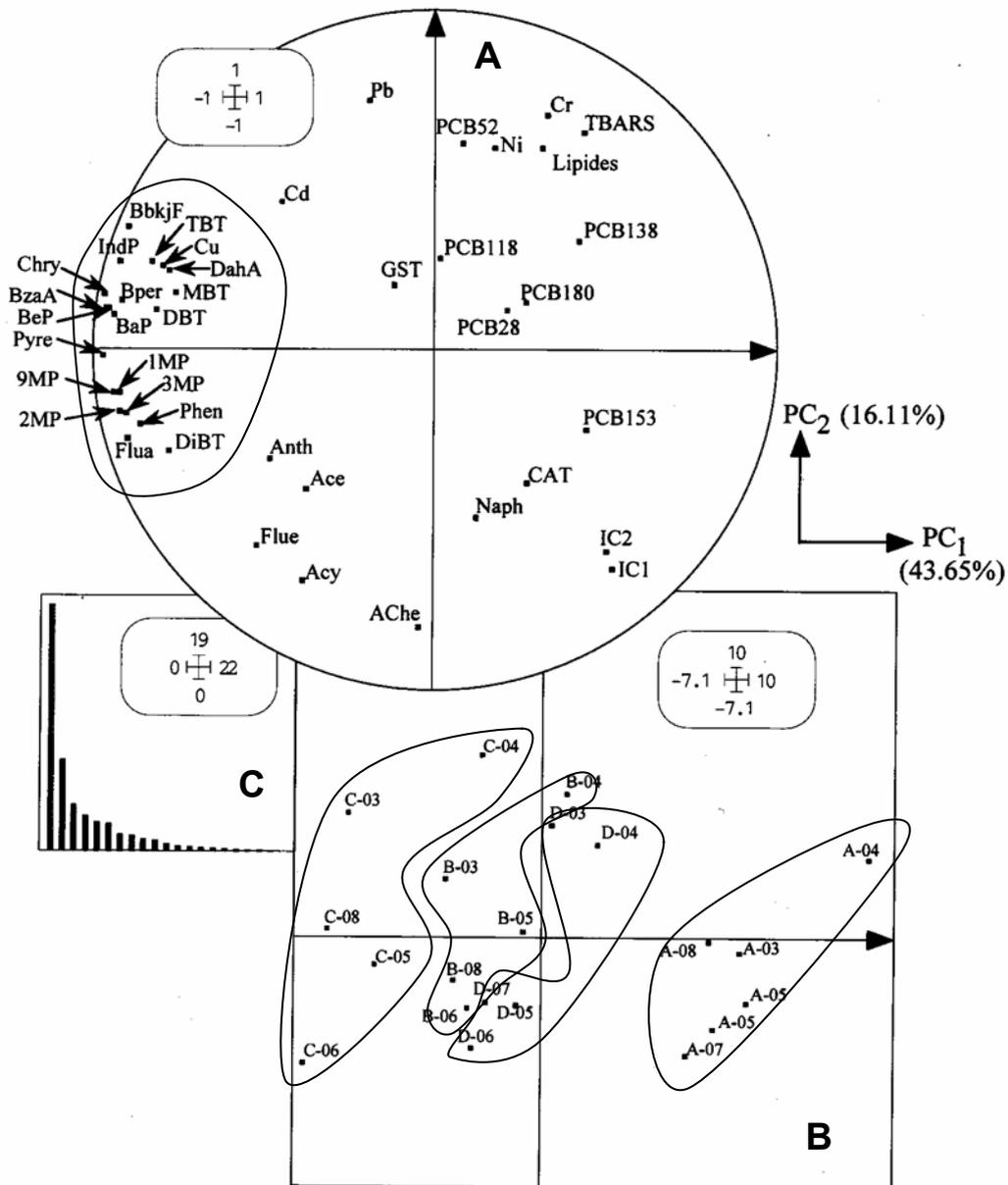


Figure III-32: ACP normée de la matrice totale (42x21).  
Cartes de contaminants (A) et des échantillons (B). Graphe des valeurs propres (C).

Les deux composantes principales PC1 et PC2 de l'ACP centrée par colonne des contaminants expliquent à peu près 79% de la variance totale (figure III-33C). La carte des contaminants révèle un regroupement des variables par classes de polluants (figure III-33A). Au sein même des HAP, trois groupes apparaissent : les di- et tri-aromatiques, les HAP lourds et les méthylphénanthrènes (MP). Chacun des groupes isolés aura donc un

comportement différent. De nouveau, on observe une discrimination des sites par niveau de contamination (figure III-33B). Ce gradient de contamination est principalement conditionné par les HAP et les butylétains, localisés à l'extrémité négative de l'axe PC1 (figure III-33A). Les différents échantillons correspondant aux sites du port d'Arcachon (sites B et C) appartiennent au même groupe. Cependant, la forte contamination du chantier naval du port d'Arcachon (site C) par les MP semble également visible sur ces cartes. En effet, les échantillons du site C sont situés dans la partie positive de l'axe PC2, qui semble dominée par les MP, alors que les échantillons du site B sont localisés dans la partie négative, plutôt conditionnée par les butylétains. Seul l'échantillon C-04 est situé dans la partie négative, corroborant les très faibles concentrations en HAP, et plus particulièrement en MP, enregistrées sur ce site en avril (voir figure III-27).

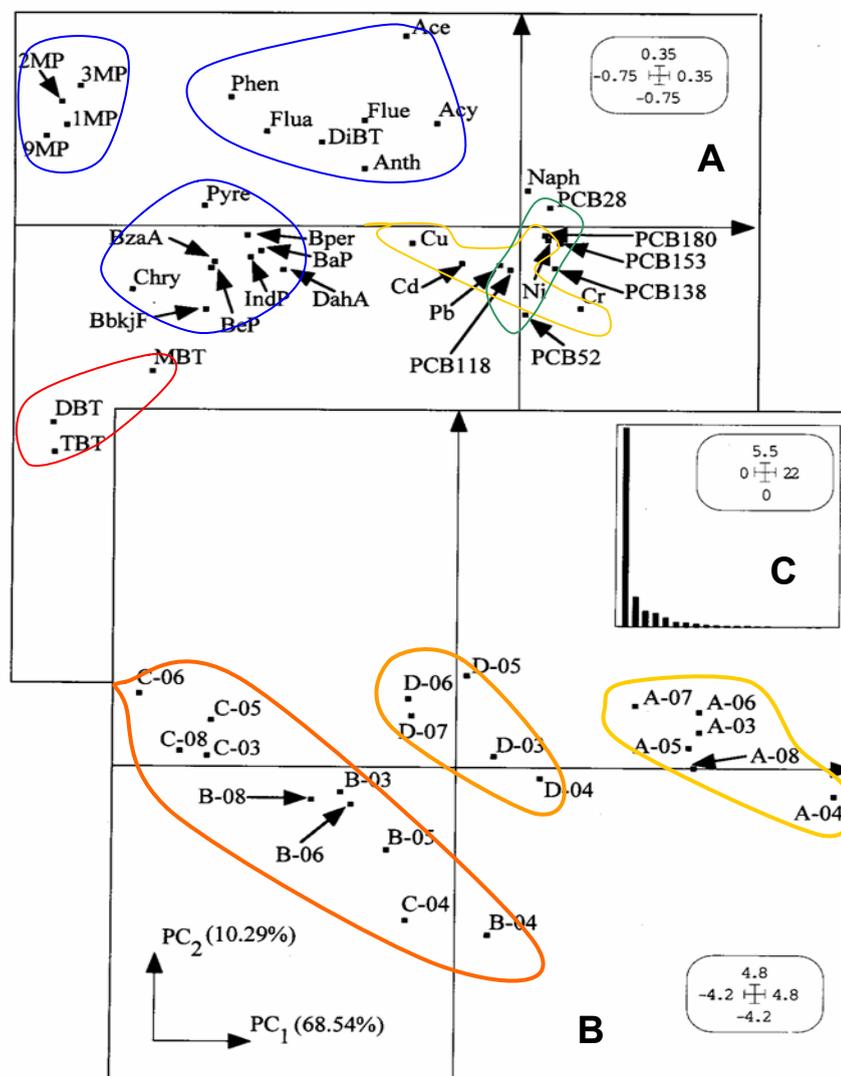
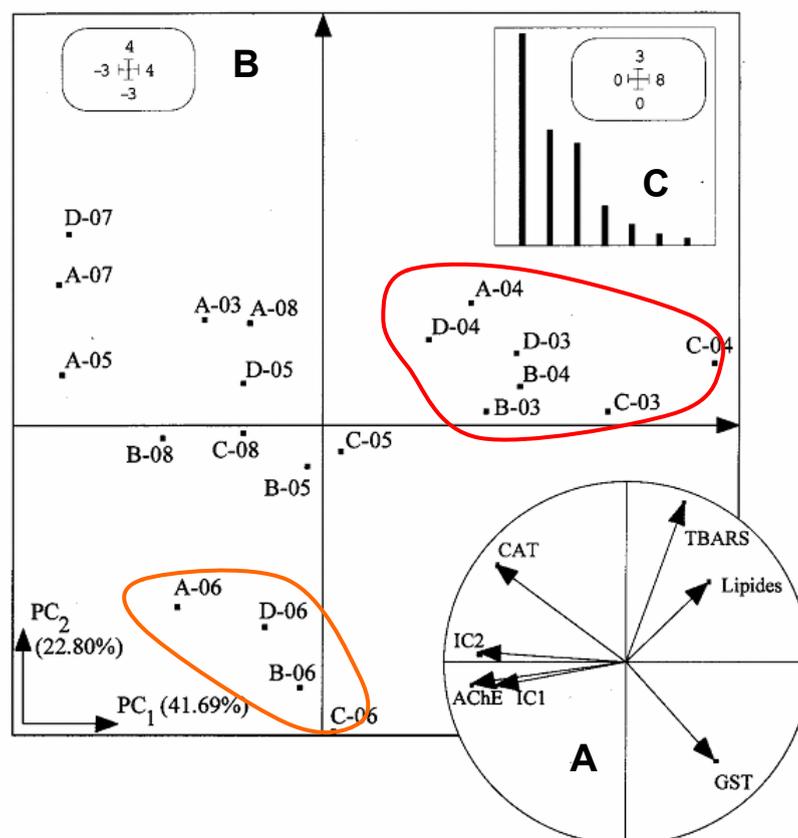


Figure III-33: ACP centrée par colonne des contaminants (35x21). Cartes de contaminants (A) et des échantillons (B). Graphe des valeurs propres (C).

Enfin, la figure III-34 représente les résultats de l'ACP normée des paramètres biochimiques et physiologiques. Les biomarqueurs suivis sont anti-corrélés, chacun pointant dans une direction x et y différentes des trois autres (figure III-34A). Deux groupes distincts ressortent de l'analyse, mars/avril et juin (figure III-34B), correspondant à la période de grande variabilité à la fois des réponses biologiques (de mars à juillet) observée sur tous les sites, et des indices de conditions, significativement plus faibles de mars à juin sur les sites portuaires comparativement au site de référence. De plus, le groupe des échantillons de juin, situés à l'extrémité négative de l'axe PC2 est dominé par l'activité GST. C'est effectivement en juin que les niveaux de GST sont les plus élevés, tandis que les autres biomarqueurs présentent des niveaux relativement faibles (voir figure III-30). Cependant, ces paramètres n'expliquant que 66% de la variance, il serait nécessaire des tester également les composantes suivantes, notamment PC3 relativement importantes (figure III-34C). Par contre, les paramètres biochimiques et physiologiques ne semblent pas discriminer les différents niveaux de contamination, comme nous l'avons déjà pressenti au vu des similitudes des profils saisonniers des biomarqueurs (voir figure III-30).



**Figure III-34: ACP normée des paramètres biochimiques et physiologiques (7x21). Cartes de contaminants (A) et des échantillons (B). Graphe des valeurs propres (C).**

Les deux matrices (celles des contaminants et celle des paramètres biochimiques et physiologiques) présentent chacune une structure, mais semblent fournir une information différente. Il serait donc intéressant de voir s'il existe une co-structure entre ces deux matrices, c'est-à-dire si les biomarqueurs et les indices physiologiques répondent aux différents niveaux de contamination enregistrés dans le Bassin d'Arcachon. Pour cela, des analyses statistiques de co-inertie sont actuellement en cours en collaboration avec le CTIS, Lyon.

Au vu de ces résultats, la transplantation de moules ("caging") s'avère être un très bon outil pour la caractérisation des niveaux de contamination d'un milieu et donne une très bonne typologie des sites d'étude. Par contre, les paramètres physiologiques et biochimiques ne sont pas capables de caractériser une forte contamination du milieu, mais reflètent plutôt des changements de l'état physiologique des bivalves (mars/avril et juin). Il aurait été intéressant de ne regarder que la matrice des biomarqueurs pour s'affranchir du poids des paramètres physiologiques, mais malheureusement le nombre des variables disponibles pour l'analyse est insuffisant.

#### 2.3.5.3.3. Comparaison avec d'autres études de biosurveillance

D'autres travaux de biosurveillance utilisant la moule comme espèce sentinelle (individus collectés ou transplantés) ont rapporté des variations des niveaux des biomarqueurs suivis dans cette étude, sur des sites présentant diverses formes de contamination. Les résultats d'un certain nombre d'entre eux sont résumés dans le tableau III-37.

L'ensemble de ces résultats révèle la complexité de l'interprétation des réponses biologiques et la difficulté de comparer les variations des niveaux des biomarqueurs entre ces différentes études. Si les niveaux de biomarqueurs peuvent être altérés par une exposition à des contaminants, certaines études environnementales observent une augmentation de ces niveaux et d'autres une diminution chez des moules exposées aux mêmes classes de polluants. Ces différences pourraient être dues aux niveaux de contamination différents entre ces études, aux méthodologies utilisées pour déterminer les niveaux des biomarqueurs, ainsi qu'à de nombreux facteurs environnementaux (les variations d'activité propres à l'espèce considérée, les conditions écologiques et climatiques du milieu, le temps d'exposition, ...). La caractérisation de la contamination des sites d'étude (diversité des classes de contaminants suivies et niveaux individuels) peut jouer un rôle important dans les différences observées. Compte tenu des conditions d'exposition dans le milieu, où les organismes sont soumis aux effets simultanés d'un grand nombre de xénobiotiques, il est certain que les déséquilibres mesurés sur une activité enzymatique essentielle, telle que l'activité AChE par exemple, reflètent moins un effet spécifique des

PCB qu'un impact global de la contamination (Bocquené et al., 1995). De plus, concernant les PCB, la plupart des auteurs comparent les réponses enregistrées avec la somme des congénères, alors qu'il existe d'importantes différences écotoxicologiques entre les PCB coplanaires et les PCB globulaires. Une corrélation linéaire entre les teneurs en PCB globulaires et les niveaux de l'activité GST a été observée chez *Mytilus sp.* (Narbonne et al., comm. pers.), alors que cette relation est rarement rapportée avec les PCB coplanaires. De la même façon, la spéciation des métaux traces joue un rôle déterminant dans leurs propriétés écotoxicologiques. Notons également que l'initiation d'un programme d'intercalibration (BEQUALM, "*Biological Effects Quality Assurance in Monitoring Programmes*", 2000) pourra confirmer ou améliorer l'efficacité des techniques analytiques recommandées pour les études de biosurveillance.

Il existe également des différences de réponses biologiques entre des individus collectés et des individus transplantés dans des sites contaminés, en raison d'un phénomène adaptatif à la pollution chronique développé par les organismes indigènes (Regoli et al., 1995).

Enfin, il est à noter que ces études prennent rarement en compte les variations saisonnières des biomarqueurs (bien que dans certains cas, deux périodes distinctes soient suivies), ce qui rend difficile l'interprétation des données et l'évaluation de la part de la contamination dans les variations des réponses biologiques observées. Pour l'instant, on n'est pas encore capable de différencier à l'aide des biomarqueurs d'exposition les perturbations dues aux changements dans l'environnement et celles dues à la variabilité d'autres facteurs (saison, température, sexe, poids ...).

Indicateur	Localisation et contamination	Espèce	Réponses biologiques	Référence
AChE (B)	Delta de L'Ebre (Espagne) PCB, organophosphorés, carbamates	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	diminution	Escartin et Porte, 1997
	Estuaire de Vilaine (France) PCB, pesticides	<i>Mytilus edulis</i>	diminution	Forget, 1998
GST (GD)	Lagune de Venise (Italie) PCB (forte contamination)	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	aucun effet	Livingstone et al., 1995
	Ile Ste Catherine (Brésil) essivage des sols (pas d'analyse de polluants)	<i>Perna perna</i>	aucun effet (en 150 jours), augmentation (en 180 jours)	Bainy et al., 2000
	Baie de Hong-Kong (Chine) PCB (forte contamination: 150 à 800 ng/g p.s.) effluents industriels	<i>Perna viridis</i>	augmentation (linéaire avec la somme des [PCB])	Cheung et al., 2002
	effluents d'une tannerie de cuir	<i>Mytilus edulis</i>	forte augmentation	Fitzpatrick et al., 1997
	Zone littorale (Espagne) Métaux traces	<i>Chamaelea gallina</i>	augmentation	Rodriguez-Ariza et al., 1993
	Côte nord mer Tyrrénienne (Italie) Métaux traces	<i>Crassostrea gigas</i>	aucun effet	Reqli et Principato, 1995
			<i>Mytilus galloprovincialis</i>	aucun effet
CAT (GD)	Ile Ste Catherine (Brésil) lessivage des sols (pas d'analyse de polluants)	<i>Perna perna</i>	aucun effet	Bainy et al., 2000
	Ile Ste Catherine (Brésil) Métaux traces	<i>Mytella guyanensis</i>	augmentation	Torres et al., 2002
	Lagune de Venise (Italie): contamination urbaine	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	augmentation (ind. transplantés) diminution (ind. indigènes)	Nasci et al., 2002
	Lagune de Venise (Italie): contamination industrielle		diminution (ind. transplantés)	
	Baie de Hong-Kong (Chine) PCB (forte contamination: 150 à 800 ng/g p.s.)	<i>Perna viridis</i>	aucun effet	Cheung et al., 2002
	Puget Sound, Washington (Etats-Unis) PCB	<i>Mytilus edulis</i>	diminution	Casillas et al., 1996
	Rivière Fensch (France) Effluents	<i>Umio tumidus</i>	aucun effet	Doyotte et al., 1997
TBARS (GD)	Estuaire du St Laurent (Canada) Métaux traces	<i>Dreissena polymorpha</i>	aucun effet	De Lafontaine et al., 2000
	Ile Ste Catherine (Brésil) Métaux traces: plomb et cadmium	<i>Mytella guyanensis</i>	augmentation	Torres et al., 2002
MDA (GD)	Zone littorale (Espagne) Métaux traces	<i>Chamaelea gallina</i>	diminution	Rodriguez-Ariza et al., 1993
		<i>Crassostrea gigas</i>	diminution	

**Tableau III-37: Variations des niveaux des biomarqueurs observés dans d'autres études de biosurveillance utilisant la moule comme espèce sentinelle (individus collectés ou transplantés), sur des sites présentant diverses formes de contamination.**

#### **2.3.5.4. Conclusion**

Les différents biomarqueurs suivis présentent des profils saisonniers relativement similaires sur tous les sites. Les réponses biologiques fluctuent de façon très importante de mars à juillet (ces fortes variations pourraient être relatives aux changements physiologiques liés à l'activité de reproduction des bivalves) et semblent caractériser un niveau de fond le reste de l'année. Il apparaît de plus que la variabilité spatiale de chaque biomarqueur (qui pourrait être représentative d'une exposition aux contaminants, puisque l'ensemble des sites présente sensiblement les mêmes conditions écologiques et climatiques) est très largement dominée par les variations saisonnières des biomarqueurs, mais également par leur variabilité interindividuelle.

Des variations significatives entre les différents sites ont été observées, mais les facteurs responsables de ces variations n'ont pas été identifiés. Malgré l'observation de corrélations significatives entre les contaminants chimiques et les biomarqueurs, on peut s'interroger sur la sensibilité des biomarqueurs utilisés dans cette étude. En effet, la forte contamination des ports (surtout dans le port d'Arcachon) ne semble avoir aucune incidence sur les moules transplantées, puisque aucune variation significative des réponses des biomarqueurs suivis n'a été observée sur ces sites. La variabilité méthodologique et la variabilité naturelle semblent donc plus importantes que le stress induit par une exposition à de fortes concentrations en contaminants.

De part l'intérêt porté dans ce travail aux perturbations endocriniennes induites par le TBT chez les mollusques, nous avons également utilisé les taux de stéroïdes endogènes comme indicateur d'une dérégulation hormonale. De la même façon que pour les marqueurs biochimiques, nous avons réalisé un suivi saisonnier des variations naturelles des taux de stéroïdes sur le site de référence et tenté par la suite de caractériser les effets éventuels du TBT sur les individus transplantés sur les sites portuaires.

#### **2.3.6. Les stéroïdes**

Les taux de stéroïdes mesurés mensuellement dans les glandes digestives des moules transplantées sur les sites portuaires et du site de référence sont détaillés en annexe 1.

### **2.3.6.1. Variations saisonnières des teneurs en stéroïdes endogènes sur le site de référence**

Les variations saisonnières des teneurs en stéroïdes endogènes ont également été estimées pendant une année dans les moules indigènes du site de référence (plage du Moulleau). Les profils saisonniers des taux de stéroïdes enregistrés dans les individus mâles et femelles sont représentés à la figure III-32.

La progestérone présente des variations saisonnières similaires chez les mâles et les femelles. Cette similitude des profils entre les deux sexes a déjà été observée chez *Mytilus edulis* (lagune d'Aveiro, Portugal) (Reis-henriques et al., 1990) et *Mya arenaria* (estuaire du St Laurent, Canada) (Siah et al., 2002). Les taux de progestérone enregistrés sont toute fois beaucoup plus élevés que ceux reportés par ces deux auteurs, extrapolés en poids sec à environ 25 ng.g<sup>-1</sup>.

Les concentrations en progestérone dans les glandes digestives augmentent fortement de janvier à mars et semblent présenter un maximum au printemps, avec un nouveau pic en juillet/août, et une diminution progressive d'août à janvier. Bien qu'il puisse exister des différences géographiques, les gonades des mollusques bivalves en Europe de l'ouest demeurent faiblement actives jusqu'en octobre/novembre avant d'atteindre une activité culminante au début du printemps où elles deviennent mûres. Une ponte peut alors avoir lieu à ce moment, suivi par une reprise de la gamétogénèse jusqu'à ce que les gonades soient à nouveau mûres au début de l'été (Seed et Suchanek, 1992). Dans le Bassin d'Arcachon, la période de ponte principale a lieu en avril, une deuxième ponte pouvant avoir lieu en août/septembre (Lubet, 1959). Les variations saisonnières des niveaux de progestérone semblent coïncider avec les différents stades du développement sexuel et pourraient être liées à la gamétogénèse chez *Mytilus sp.* Ces périodes de niveaux extrêmes coïncident avec celles rapportées chez *Mytilus edulis* par Reis-henriques et al. (1990) et chez *Mya arenaria* par Siah et al. (2002). Ces auteurs ont également observé une concordance entre les taux de progestérone et les différents stades du cycle reproducteur et suggéré que la progestérone pourrait avoir, au même titre que l'oestradiol, un rôle dans l'activité sexuelle de ces bivalves. Des études histologiques seraient nécessaires afin de caractériser le cycle reproducteur des moules du Bassin d'Arcachon pour pouvoir mettre en évidence une corrélation entre les différents stades de la reproduction et les taux de stéroïdes.

Notons également que les fortes amplitudes des variations saisonnières naturelles des concentrations de ces deux stéroïdes pourraient masquer l'effet éventuel d'un contaminant sur la synthèse des stéroïdes.

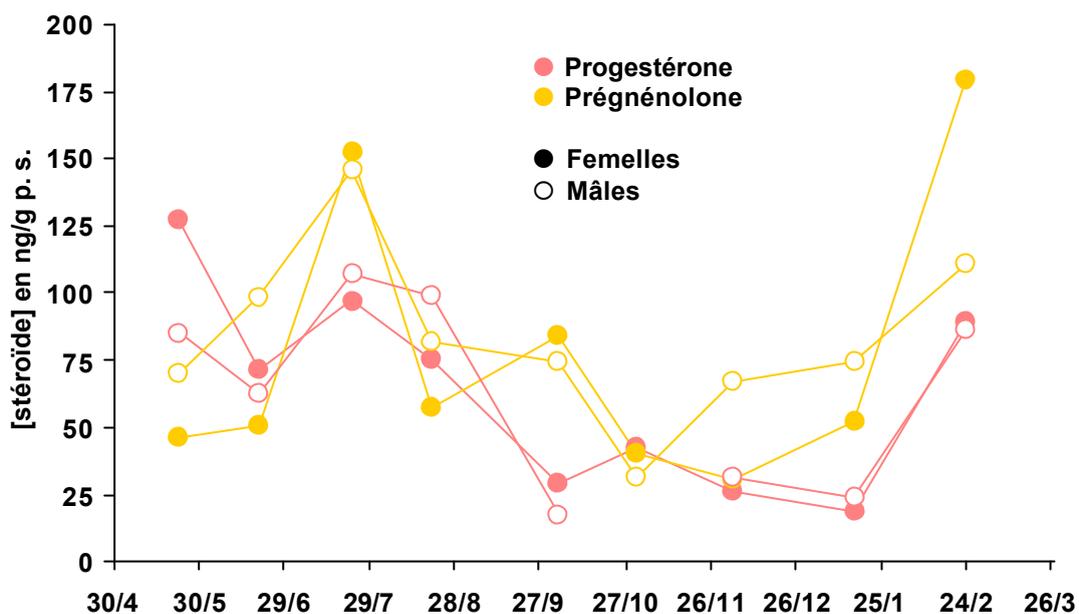


Figure III-32: Variations saisonnières des taux de progestérone (rouge) et de prégnénolone (jaune) dans les glandes digestives de moules mâles (symbole vide) et femelles (symbole plein) collectées sur le site de référence (plage du Moulleau).

### 2.3.6.2. Corrélation des teneurs en stéroïdes avec les paramètres physiologiques

Une corrélation négative ( $p = 0,005$ ) a été observée entre les teneurs en progestérone et les taux de lipides (tableau III-38), mais uniquement pour le site de référence (figure III-33). L'absence de corrélation avec les taux de lipides chez les moules transplantées pourrait être due à l'importante variabilité intersite des taux de stéroïdes mais aussi des taux de lipides. A titre d'exemple, la variabilité intersite des taux de lipides s'échelonne de 2 à 50% de ceux enregistrés à la même période sur le site de référence. Il n'est donc pas possible d'attribuer cette absence de corrélation à une éventuelle perturbation physiologique chez les individus transplantés, due à une exposition aux contaminants ou à un stress environnemental. Par contre aucune corrélation n'a été observée pour la prégnénolone.

Sites	Pg / lipides		Pn / lipides	
	r	p	r	p
A	<b>- 0,837</b>	<b>0,005</b>	- 0,221	0,568
B	0,289	0,548	- 0,618	0,191
C	0,468	0,349	- 0,170	0,747
D	0,511	0,159	0,464	0,246

Tableau III-38: Corrélations des taux de stéroïdes (mâles et femelles confondus) avec les taux de lipides (N = 29).

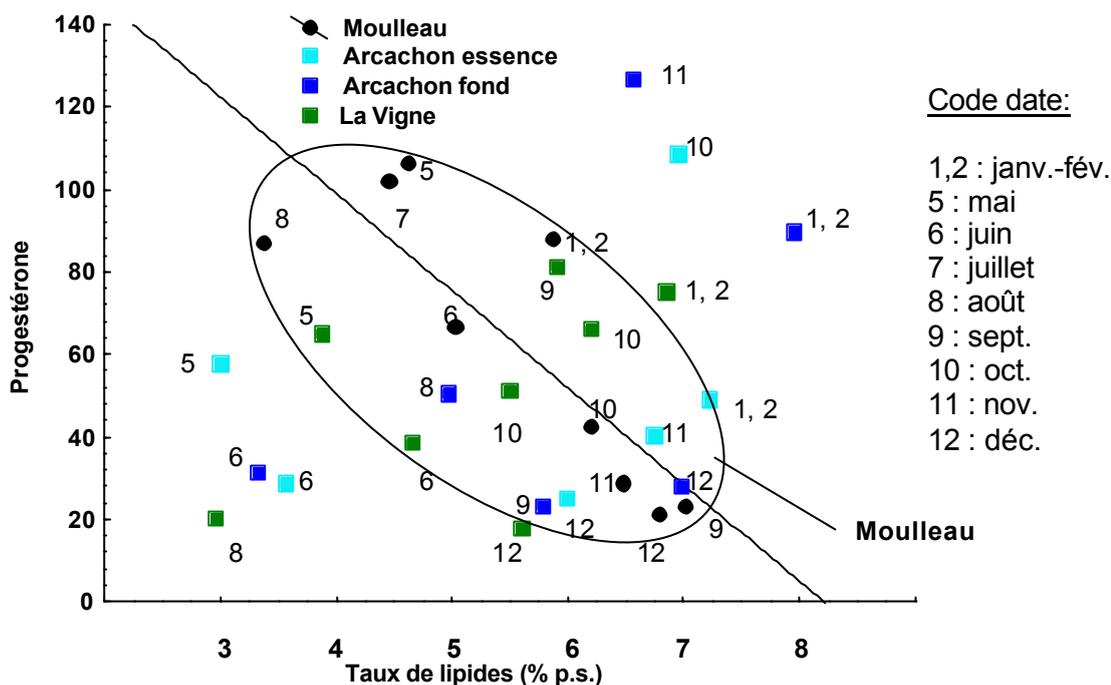


Figure III-33: Teneurs en progestérone ( $\text{ng.g}^{-1}$ ) dans les glandes digestives de moules en fonction du taux de lipides des individus transplantés.

Une forte corrélation entre les teneurs en progestérone chez les femelles et chez les mâles a été observée (tableau III-39 et figure III-34). Ce résultat conforte les observations de Reis-henriques et al. (1990) et de Siah et al. (2002) qui ont reporté les même profils des taux de progestérone des individus mâles et femelles, chez *Mytilus edulis* et chez la palourde *Mya arenaria*, respectivement, suggérant que la progestérone pourrait jouer le même rôle pour les deux sexes. Par contre, aucune corrélation n'a été observée pour la prégnénolone.

	Progestérone		Prégnénolone	
	r	p	r	p
M / F	<b>0,7259</b>	<b>0,00002</b>	0,1264	0,5135

Tableau III-39: Corrélations des taux de stéroïdes chez les individus mâles (M) et femelles (F) (N = 28).

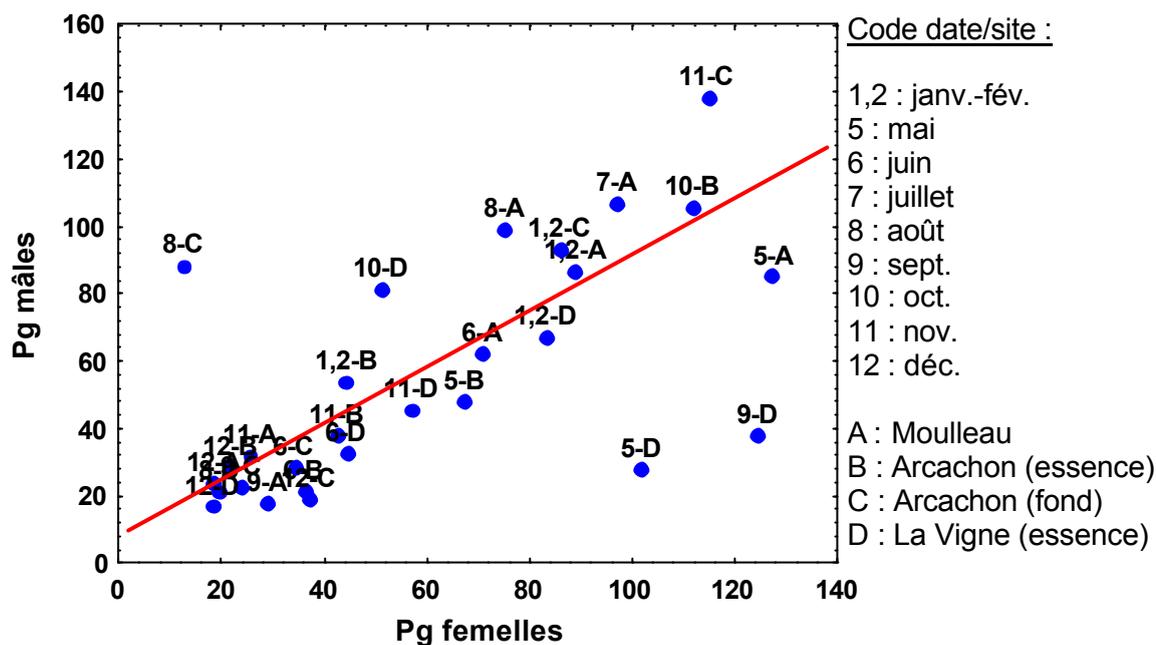


Figure III-34: Corrélation des teneurs en progestérone dans les glandes digestives des individus femelles et des individus mâles.

### 2.3.6.3. Effet du TBT sur les teneurs en stéroïdes

Aucune corrélation significative entre les taux de stéroïdes et les concentrations de TBT bioaccumulé dans les tissus n'a pu être mise en évidence (tableau III-40 et figure III-35).

Sites	Pg / TBT		Pn / TBT	
	r	p	r	p
A	0,414	0,267	0,103	0,792
B	0,158	0,765	0,328	0,526
C	0,466	0,351	0,133	0,802
D	- 0,257	0,539	0,010	0,982

Tableau III-40: Corrélations des taux de stéroïdes (mâles et femelles confondus) avec les concentrations en TBT dans les bivalves (N = 29).

Mais d'autres facteurs que le TBT, comme les paramètres physico-chimiques de l'eau, les nutriments disponibles et la présence d'autres contaminants chimiques dans la colonne d'eau peuvent aussi affecter la synthèse des stéroïdes. C'est peut être pour cette raison que des variations significatives des taux de stéroïdes ont été observées en exposition en microcosme et pas sur le terrain, où des effets synergiques ou antagonistes des

contaminants, ainsi qu'un stress physiologique généré par les facteurs environnementaux naturels, peuvent avoir lieu.

Aucune corrélation n'a également été observée entre les taux de stéroïdes et les autres contaminants chimiques suivis dans cette étude.

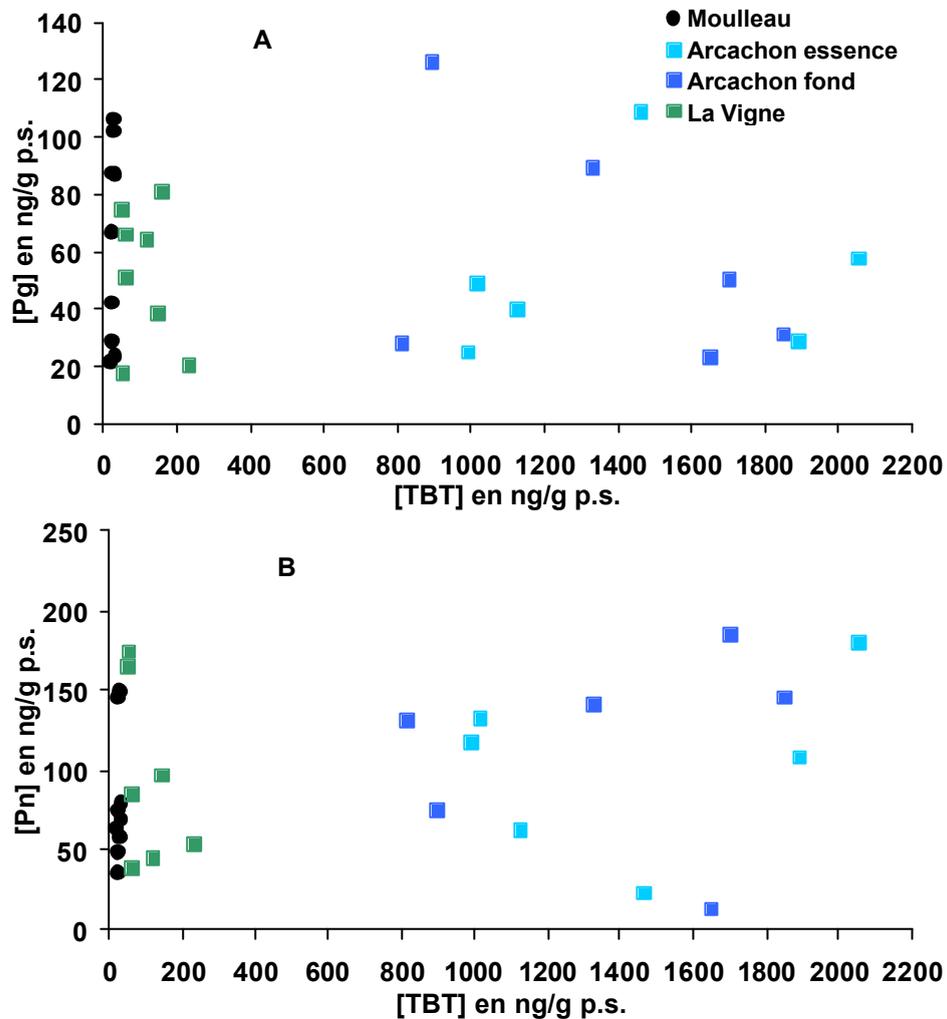


Figure III-35: Teneurs en progestérone (A) et en prégnérolone (B) dans les glandes digestives de moules en fonction des concentrations tissulaires en TBT des individus transplantés ( $\text{ng.g}^{-1}$ ).

#### 2.3.6.4. Conclusion

En l'état actuel du développement du protocole, il n'est pas encore possible de pouvoir caractériser une éventuelle perturbation endocrinienne induite par le TBT ou par d'autres contaminants (comme les PCB, les alkylphénols, etc...) chez la moule en se basant sur l'étude des stéroïdes hormonaux. De plus, de nombreuses recherches doivent encore être

réalisées sur la progestérone (précurseur des androgènes) afin de déterminer son rôle physiologique chez les mollusques.

Il apparaît également nécessaire de documenter plus précisément les amplitudes des variations naturelles des stéroïdes afin de pouvoir discriminer l'effet des polluants d'une perturbation physiologique naturelle (stress environnemental, cycle reproducteur) et d'envisager leur utilisation comme marqueurs de perturbations endocriniennes.

## **2.4. Conclusion**

Le niveau de contamination des sites d'étude apparaît influencer sur l'état physiologique des individus transplantés, puisque les indices de condition utilisés pour le caractériser discriminent les sites ne présentant aucune contamination avérée (sites A, E, F, G) des sites les plus fortement contaminés (sites B, C). Par contre, la technique de transplantation en cage ne génère pas de stress physiologique décelable chez les moules transplantées (indices de condition des individus transplantés sur les parcs ostréicoles identiques à ceux des individus indigènes du site de référence). Cependant, aucune corrélation n'a été observée entre les paramètres physiologiques suivis et les niveaux de contaminants ou de biomarqueurs dans les tissus de moules.

En ce qui concerne les contaminants, les différents niveaux de contamination de chaque classe de polluants enregistrés dans le Bassin d'Arcachon sont synthétisés à la figure III-36. Nous avons vu que les concentrations en métaux dans les moules ne permettent pas de discriminer les différents sites de transplantation et sont similaires à celles enregistrées sur le site de référence, témoignant du très faible niveau global de la contamination métallique dans le Bassin d'Arcachon. Cependant, des concentrations en cuivre importantes ont été observées sur les sites portuaires. Ces apports en cuivre pourraient refléter l'intensification de son usage dans les peintures antisalissures dans le Bassin depuis l'interdiction de l'utilisation du TBT. Les faibles concentrations de butylétains enregistrées sur les parcs ostréicoles et le site de référence constituent un niveau de contamination de base dans le Bassin d'Arcachon. Par contre le port d'Arcachon demeure encore fortement contaminé par les composés organostanniques. La source principale de pollution par le TBT semble être la remise en suspension des sédiments contaminés du port d'Arcachon par un brassage naturel (marées, tempêtes...) ou artificiel (dragages), ce qui conduirait à la diffusion de la contamination à l'intérieur du bassin et qui pourrait également représenter un risque écologique important. De la même façon, les faibles concentrations en PCB enregistrées sur l'ensemble des sites, y compris les sites portuaires, représentent également un niveau de

fond de la contamination par ces composés et témoigne de l'absence d'apports anthropiques dans les ports. Par contre, les HAP présentent un comportement totalement différent de celui des PCB et révèlent différents niveaux de contamination. Les parcs ostréicoles sont faiblement pollués par les HAP et les ports sont caractérisés par une contamination élevée en HAP et par une origine pétrogénique très marquée. De plus, le chantier naval génère des apports conséquents de HAP et représente la source principale de HAP dans les eaux du port, confortant de ce fait l'intérêt de l'utilisation de deux cages dans le port d'Arcachon.

	Niveaux de contamination			
	faible	moyenne	élevée	forte
OT (ng/g)	25 - 60	60 - 300	300 - 1000	1000 - 3600
MET (µg/g)	Tous (sauf Cu)		Cu	
PCB (ng/g)	20 - 50			
HAP (ng/g)	50 - 150	150 - 300	300 - 800	800 - 2000

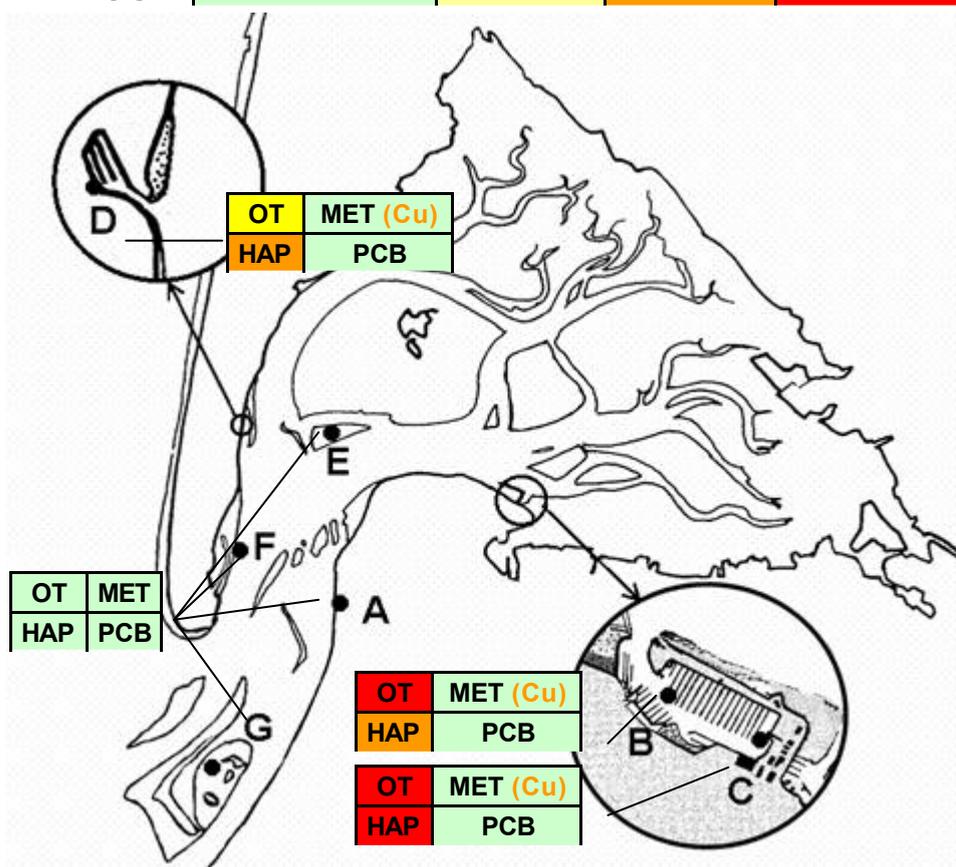


Figure III-36: Cartographie des niveaux de contamination en organoétains (OT), métaux traces (MET), PCB et HAP des sites suivis dans le Bassin d'Arcachon.

L'inconvénient majeur de l'utilisation des biomarqueurs réside dans les nombreuses interférences des facteurs abiotiques et biotiques, des variations naturelles à la fois des apports en polluants et des processus biochimiques, qui rendent très difficile l'interprétation des réponses des biomarqueurs. A cela, des effets synergiques ou antagonistes des différents contaminants présents dans le milieu, ainsi que le fait qu'une exposition à une contamination élevée puisse entraîner une diminution de la réponse inductive par la détérioration générale de l'état de santé des individus, viennent encore compliquer la compréhension des liens entre la présence de contaminants et les effets biologiques observés.

Malgré l'observation de corrélations significatives entre les contaminants chimiques et les biomarqueurs, on peut s'interroger sur la sensibilité des biomarqueurs utilisés dans cette étude. En effet, la forte contamination des ports (surtout dans le port d'Arcachon) ne semble avoir aucune incidence sur les moules transplantées, puisque aucune variation significative des réponses des biomarqueurs suivis n'a été observée sur ces sites. La variabilité méthodologique et la variabilité naturelle semblent donc plus importantes que le stress induit par une exposition à de fortes concentrations en contaminants. En ce sens, cette étude contribue à la connaissance des limites naturelles de la variabilité des activités enzymatiques et sur leur sensibilité envers de nombreux polluants. De par l'intégration des variations saisonnières, cette étude souligne toute la complexité de la confrontation chimie – biochimie dans les études de biosurveillance, mais aussi la réelle représentativité de l'utilisation des réponses biologiques et de leur interprétation dans ces programmes si les variations circannuelles ne sont pas prises en compte. Il apparaît donc indispensable de réaliser au préalable, avant l'initiation de toute étude de biosurveillance, un suivi à long terme des variations circannuelles de chaque biomarqueur sur un site de référence dont on connaît parfaitement la typologie (niveau de contamination, conditions écologiques et climatiques, etc ...) pour acquérir une meilleure connaissance de leurs variations naturelles, si l'on veut être capable d'interpréter au mieux les données obtenues dans les milieux contaminés et d'isoler de façon plus fiable la part d'une exposition aux xénobiotiques sur les effets biologiques observés.

Si les bases conceptuelles de l'utilisation de biomarqueurs pour l'évaluation diagnostique et prédictive des effets des polluants sur les organismes vivants sont maintenant clairement établies, le manque de connaissances sur la signification écotoxicologique des variations de ces marqueurs constitue encore actuellement l'obstacle majeur à leur utilisation opérationnelle pour l'évaluation de l'impact des pollutions sur l'environnement. Le rôle prédictif des biomarqueurs sur les perturbations des écosystèmes demeure encore faible dans l'état actuel de nos connaissances, et les biomarqueurs ne peuvent souvent pas être pleinement utilisés comme marqueurs d'effet mais seulement comme marqueurs

d'exposition (Lagadic et al., 1997). Ainsi, il semblerait que l'écotoxicologie délaisse momentanément les activités enzymatiques utilisées comme biomarqueurs d'exposition (tant que les connaissances sur leur variabilité naturelle ne sont pas complétées) dans les études de biosurveillance, au profit des biomarqueurs d'effets (indicateurs de génotoxicité, d'hépatotoxicité, de déstabilisation lysosomale, etc...).



## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**



## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les travaux présentés dans ce mémoire ont contribué aux études du devenir et des effets des composés organostanniques, et plus particulièrement du tributylétain, dans l'environnement marin. Ces composés ont été étudiés dans une double optique : d'une part, de déterminer leurs niveaux de concentration dans le Bassin d'Arcachon, où les premiers effets du TBT sur les mollusques ont été caractérisés, entraînant en 1982 le bannissement partiel du TBT, et d'autre part, de caractériser les effets biologiques du TBT chez un bivalve, la moule *Mytilus edulis*.

La première partie de ce travail a consisté à mettre au point et optimiser les conditions d'analyse des composés organostanniques étudiés dans les différentes matrices environnementales. La détermination de ces composés a été validée sur des échantillons certifiés. Il a également été nécessaire de développer une méthode de dosage des stéroïdes endogènes chez la moule. Les protocoles développés ont été appliqués à une étude environnementale menée dans le Bassin d'Arcachon.

Des expositions de moules à différentes concentrations de TBT en microcosme ont été réalisées afin d'observer l'effet du tributylétain sur la composition en stéroïdes endogènes de la moule *Mytilus edulis* et sur différents biomarqueurs. En parallèle, une étude de biosurveillance utilisant la transplantation de moules en cages a été réalisée dans le Bassin d'Arcachon pendant une année, à travers la détermination de nombreuses classes de contaminants et d'indicateurs biologiques.

Des moules *Mytilus sp.* ont été utilisées dans une étude à court terme en microcosme afin d'évaluer les effets du TBT sur les moules, en terme de bioaccumulation, de distribution tissulaire des composés organostanniques, et de perturbations du système enzymatique. L'analyse des différents tissus a montré que le TBT était accumulé de façon préférentielle dans les branchies pour l'exposition à  $1000 \text{ ng.L}^{-1}$  et dans les glandes digestives pour celle à  $10 \text{ ng.L}^{-1}$ . Les concentrations de TBT dans les tissus de moules exposées pendant quatre jours à  $10 \text{ ng.L}^{-1}$  de TBT atteignent une concentration tissulaire comparable à celle enregistrée dans les individus transplantés sur le site le plus contaminé, le port d'Arcachon. Par contre, les facteurs de bioconcentration du TBT obtenu en microcosme (12 000) sont cent fois plus faibles que celui enregistré dans le port d'Arcachon (1 300 000), pour des

concentrations de TBT dans la colonne d'eau relativement similaires ( $10 \text{ ng.L}^{-1}$ ) et pour la même période annuelle (juin). La détermination des stéroïdes endogènes chez la moule a montré qu'une exposition à  $10 \text{ ng.L}^{-1}$  de TBT entraînait une diminution significative après 4 jours des teneurs en progestérone et en prégnénolone, à la fois chez les individus femelles et chez les individus mâles, bien qu'aucune mise en évidence d'une perturbation endocrinienne induite par le TBT, basée sur l'étude des taux de stéroïdes endogènes, n'ait pu être rendue possible. Cependant, aucune variation significative n'a été observée dans les activités mesurées et les teneurs en TBARS, indiquant soit que les paramètres biochimiques mesurés ne sont pas sensibles à une contamination environnementale par le TBT, soit qu'une durée d'exposition au TBT de l'ordre de quelques jours demeure insuffisante pour pouvoir enregistrer une réponse de ces biomarqueurs.

Les résultats obtenus dans l'étude de biosurveillance du Bassin d'Arcachon nous ont permis de valider la technique de transplantation de moules et d'évaluer leur contamination. Cette étude contribue à la connaissance des limites naturelles de la variabilité des activités enzymatiques et sur leur sensibilité envers de nombreux polluants. De par l'intégration des variations saisonnières, elle souligne également toute la complexité de la confrontation chimie – biochimie dans les études de biosurveillance, mais aussi la réelle représentativité de l'utilisation des réponses biologiques et de leur interprétation dans ces programmes si les variations circannuelles ne sont pas prises en compte. Des analyses statistiques multivariées (analyses en composantes principales, ACP) et de co-inertie sur l'ensemble des données (chimiques et biochimiques) de cette étude sont en cours de réalisation. Ces analyses nous permettront de vérifier si les paramètres biochimiques utilisés permettent de discriminer les différents niveaux de contamination observés dans le bassin (ou du moins de différencier les sites non contaminés des sites fortement contaminés, en particulier le port d'Arcachon).

On peut envisager, comme développements futurs, un certain nombre d'améliorations aux travaux effectués ou de nouveaux axes de recherche.

#### *Etudes en microcosmes :*

√ En ce qui concerne l'étude des effets du TBT sur le système endocrinien des mollusques, il pourrait être intéressant, en complément des études sur les stéroïdes endogènes des mollusques, de réaliser des expositions en microcosme pour déterminer les concentrations de TBT qui seraient susceptibles d'affecter éventuellement l'activité GST, enzyme responsable de l'élimination des stéroïdes dans les organismes. En effet, deux

mécanismes ont été proposés pour l'apparition de l'imposex chez les gastéropodes et de l'accumulation des androgènes chez les mollusques: 1/ une action directe du TBT sur le système nerveux (via un relargage anormal de neurohormones) et 2/ une inhibition de l'activité aromatasase des cytochrome P450 (responsable de la conversion des androgènes en oestrogènes), mais également une possible inhibition de diverses estérases et transférases, telle que l'activité GST (Al-Ghais et Ali, 1999). De plus, une récente étude réalisée par Torres et al. (non publiée, site Internet, 2002) a mis en évidence une inhibition non compétitive de l'activité GST (*in vitro*) chez des escargots communs *Helix espersa* exposés à 10 µM de TBT.

√ Les organismes marins sont soumis en permanence aux effets de mélanges complexes de contaminants et leurs interactions sont extrêmement difficiles à déterminer. Quelques études ont tenté de caractériser le type d'interaction (effet synergique ou antagoniste) d'un mélange de deux contaminants. Des effets synergiques entre des métaux et des organophosphorés ou des carbamates sur l'inhibition de l'activité AChE ont été observés (Bocquené et al., 1995) et entre le PCB 126 et le TBT sur l'activité CYP1A chez le poisson chat *Ictalurus punctatus*, bien que dans ce dernier cas les effets soient additifs plutôt que synergiques (Rice et al., 1998). Padros et al. (2000) ont rapporté des effets antagonistes du TBT sur la biotransformation du BaP et du TBT et du BaP sur l'activité EROD chez la truite *Salvelinus fontinalis*. Il serait donc intéressant, au niveau du laboratoire, de tester en microcosme un certain nombre de mélanges de contaminants et de suivre leurs effets à la fois sur la bioaccumulation de chaque polluant et sur les réponses biologiques, de façon à mieux appréhender les effets de mélanges de contaminants dans le milieu naturel.

#### *Etudes de biosurveillance:*

Si les expériences de transplantation de moules *Mytilus sp.* au niveau des différentes stations du Bassin ont permis d'apporter de nombreuses données et de confirmer l'intérêt de cette espèce en tant qu'organisme sentinelle, plusieurs études complémentaires pourraient améliorer la représentativité des résultats obtenus et, donc, notre capacité d'interprétation des données.

√ Au vu des résultats obtenus dans cette étude, il apparaît important de poursuivre ce suivi environnemental à long terme (des niveaux et des variations saisonnières à la fois des contaminants et des réponses biologiques), toujours dans l'objectif d'améliorer la fiabilité et la représentativité de l'interprétation des données recueillies, et par conséquent, l'évaluation de la qualité du milieu.

√ Il serait aussi important de compléter ce travail par l'étude de la variation de chaque activité enzymatique, ainsi que des taux de stéroïdes (utilisés comme marqueurs de perturbations endocriniennes) suivis chez *Mytilus sp.* en fonction de sa maturité sexuelle, l'état physiologique étant un facteur important dans la variation des biomarqueurs, mais aussi sur les mécanismes d'accumulation et de biotransformation des xénobiotiques. Des déterminations histologiques auraient été intéressantes pour caractériser la maturité sexuelle des individus (par l'évaluation d'un indice gonadique, par exemple).

√ Il serait également intéressant de réaliser en parallèle un suivi sur des espèces indigènes (si tant est qu'il en existe encore dans les zones portuaires contaminées), et d'évaluer les différences d'accumulation des contaminants et de réponses biologiques, afin de caractériser le potentiel d'adaptation des individus indigènes à la contamination du milieu dans lequel ils évoluent. Cette estimation du potentiel d'adaptation des organismes à la pollution pourrait nous éclairer sur l'impact réel des niveaux de contamination détectés au niveau de la population et sur la représentativité des études de biosurveillance d'un milieu utilisant la technique de transplantation d'organismes marins.

√ Si nous avons réalisé une approche multi-marqueurs dans cette étude, il pourrait être également utile d'utiliser conjointement une approche multi-espèces (différences interspécifiques de bioaccumulation des contaminants et surtout de sensibilité des biomarqueurs étudiés) pour améliorer la détection des effets des contaminants sur un écosystème. Mais cette approche augmenterait considérablement le temps et le coût des analyses et reste donc difficilement applicable aux études de biosurveillance. Nous pouvons toutefois envisager l'utilisation de poissons comme espèces sentinelles (comme les cyprinidés ou les anguilles) pour améliorer la sensibilité des biomarqueurs étudiés et caractériser d'éventuelles perturbations endocriniennes (dosage en routine au laboratoire des stéroïdes dans le plasma de poissons, y compris ceux qui n'ont pas été détectés chez la moules, comme les androgènes et les oestrogènes, ainsi que plusieurs métabolites de la testostérone).

√ Enfin, de façon moins générale et plus spécifique à une contamination liée à l'utilisation des peintures antisalissures, il serait intéressant de développer de nouvelles techniques de dosages des nouveaux "*antifouling*" afin de suivre la contamination du Bassin par ces composés.

# **BIBLIOGRAPHIE**



## BIBLIOGRAPHIE

- Abalos M**, Bayona JM, Compano R, Granados M, Leal C, Prat MD. **1997**. Analytical procedures for the determination of organotin compounds in sediment and biota: a critical review. *J Chromatogr A*, 788, 1-49.
- Abd-Allah AMA**. **1995**. Occurrence of organotin compounds in water and biota from Alexandria harbours. *Chemosphere*, 30, 4, 707-715.
- Abel R**. **1996**. European policy and regulatory action for organotin-based antifouling paints. Dans: Organotin: environmental fate and effects. Champ and Seligman, eds. Chapman and Hall, London, 27-54.
- Aguerre S**, Lespes G, Desauziers V, Potin-Gautier M. **2001**. Speciation of organotins in environmental samples by SPME-GC : comparison of four specific detectors : FPD, PFPD, MIP-AES and ICP-MS. *J Anal At Spectrom*, 16, 263-269.
- Albalat A**, Potrykus J, Pempkowiak J, Porte P. **2002**. Assessment of organotin pollution along the Polish coast (Baltic Sea) by using mussels and fish as sentinel organisms. *Chemosphere*, 47, 165-171.
- Albanis TA**, Lambropoulou DA, Sakkas VA, Konstantinou IK. **2002**. Antifouling paint booster biocide contamination in Greek marine sediments. *Chemosphere*, 48, 475-485.
- Aldridge WN**, Street BW. **1974**. Oxidative phosphorylation: biochemical effects and properties of trialkyltins. *Biochem J*, 91, 287-297.
- Al-Ghais SM**, Ali B. **1999**. Inhibition of glutathion-S-transferase catalysed xenobiotic detoxication by organotin compounds in tropical marine fish tissues. *Bull Environ Contam Toxicol*, 62, 207-213.
- Alzieu C**, Thibaud Y, Heral M, Boutier B. **1980**. Evaluation des risques dus à l'emploi des peintures antisalissures dans les zones conchylicoles. *Rev Trav Pêches Marit*, 44, 301-348.
- Alzieu C**, Heral M, Thibaud Y, Dardignac MJ, Feuillet M. **1982**. Influence des peintures antisalissures à base d'organostanniques sur la calcification de la coquille de l'huître *Crassostrea gigas*. *Rev Trav Inst Peches Marit*, 45, 101-116.
- Alzieu C**, Heral M, Thibaud Y, Dardignac MJ, Feuillet M. **1986**. Tin contamination in Arcachon Bay: Effects on oyster shell anomalies. *Mar Pollut Bull*, 17, 11, 494-498.
- Alzieu C**. **1991a**. Environmental problems caused by TBT in France. Assessment, regulation, prospects. *Mar Pollut Bull*, 32, 7-17.
- Alzieu C**, Michel P, Tolosa I, Bacci E, Mee LD, Readman JW. **1991b**. Organotin compounds in the Mediterranean: a continuing cause of concern. *Mar Environ Res*, 32, 261-270.
- Alzieu C**, Michel P. **1998**. L'étain et les organoétains en milieu marin: Biogéochimie et écotoxicologie. *Rapport scientifiques et techniques de l'IFREMER*, 15, 1-104.
- Alzieu C**. **2000**. Environmental impact of TBT: the French experience. *Sci Tot Environ*, 258, 99-102.
- Amiard JC**, Métayer C, Baud JP, Ribeyre F. **1994**. Influence of some ecological and biological factors on metal bio-accumulation in young oysters (*Crassostrea gigas*, Thunberg) during their spat rearing. *Water Res*, 28, 219-231.

- Amiard-Triquet C**, Altmann F, Amiard JC, Ballan-Dufrançais C, Baumard P, Budzinski H, Crouzet C, Garrigues P, His E, Jeantet AY, Menasria R, Mora P, Mouneyrac C, Narbonne JF, Pavillon JF. **1998**. Fate and effects of micropollutants in the Gironde Estuary, France: a multidisciplinary approach. *Hydrobiologia*, 373-374, 259-279.
- Amouroux D**, Tessier E, Donard OFX. **2000**. Volatilization of organotin compounds from estuarine and coastal environments. *Environ Sci Technol*, 34, 988-995.
- Anderson RS**, Brubacher LL, Ragone Calvo LM, Burreson EM, Unger MA. **1997**. Effect of *in vitro* exposure to tributyltin on generation of oxygen metabolites by oyster hemocytes. *Environ Res*, 74, 84-90.
- Andersson JT**, Schmidt B. **1993**. The atomic emission detector in gas chromatographic trace analysis. Some studies on the performance and applications. *Fres J Anal Chem*, 346, 403-409.
- Astruc M**, Astruc A, Pinel R. **1992**. *Mikrochim Acta*, 109, 83.
- Auby I**. **1993**. Evolution de la richesse biologique du Bassin d'Arcachon. *Rapport IFREMER/SSA*, n° 91, 5527019.
- Auby I**, Maurer D, Masson N, Sautour B, Taris N, Valvason ML, d'Amico F, Guillard F, Guegen C, Trut G, Cantin ., Pellier C. **2002**. Etude de la reproduction de l'huître creuse dans le Bassin d'Arcachon- Année 2001. Rapport Interne Ifremer. RST.DEL/02.03/ARCACHON,160 p.+ Annexes.
- Augagneur S**, Budzinski H, garrigues P, Narbonne JF. **1998**. Trace metal profile in sediment and blue mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from western mediterranean sea. 8<sup>th</sup> Annual Meeting of SETAC-Europe, April 14-18, Bordeaux, France.
- Augagneur S**, garrigues P. **1999**. Determination of trace metals in marine organisms by ICP-MS after open focused microwave digestion. Pittcon99, March 7-12, Orlando, Florida.
- Augusto F**, Valente ALP. **1998**. Compound retention dependence of the response in a gas chromatography-atomic emission detection system. *J of Chromatogr A*, 819, 85-91.
- Axiak V**, Sammut M, Chircop P, Vella A, Mintoff B. **1995**. Laboratory and field investigations on the effects of organotin (tributyltin) on the oyster, *Ostrea edulis*. *Sci Tot Environ*, 171, 117-120.
- Bainy ACD**, Almeida EA, Müller IC, Ventura EC, Medeiros ID. **2000**. Biochemical responses in farmed mussel *Perna perna* transplanted to contaminated sites on Santa Catarina Island, SC, Brazil. *Mar Environ Res*, 50, 411-416.
- Baranyi IB**. **1964**. Alkaline and acid phosphatase activity in the central nervous system of *Anodonta cygnea* L. and its correlation with seasonal neurosecretory changes. *Acta Biol Acad Sci hung*, 6, 35-36.
- Barron MG**. **1990**. Bioconcentration. *Environ Sci Technol*, 24, 1012-1016.
- Barroso CM**, Moreira MH. **2003**. Spatial and temporal changes of TBT pollution along the Portuguese coast: inefficacy of the EEC directive 89/677.
- Basheer C**, Tan KS, Lee HK. **2002**. Organotin and tgarol-1051 contamination in Singapore coastal waters. *Mar Pollut Bull*, 44, 697-703.
- Bauer B**, Fioroni P, Die I, Liebe S, Oehlmann J, Stroben E, Watermann B. **1995**. TBT effects on the female genital system of *Littorina littorea*: a possible indicator of tributyltin pollution. *Hydrobiologia*, 309,15-27.
- Baumard P**. **1997**. Les composés aromatiques dans l'environnement marin: biogéochimie et biodisponibilité. *Thèse de l'Université de Bordeaux I*, n° d'ordre 1788.

- Baumard P**, Budzinski H, Garrigues P. **1998**. PAHs in the Arcachon Bay: Origin and biomonitoring with caged organisms. *Mar Pollut Bull*, 36, 577-586.
- Baumard P**, Budzinski H, Garrigues P, Narbonne JF, Burgeot T, Michel X, Bellocq J. **1999**. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) burdens of mussels (*Mytilus sp.*) in different marine environments in relation with sediment PAH contamination, and bioavailability. *Mar Environ Res*, 47, 415-439.
- Beaumont AR**, Budd MD. **1984**. High mortality of the larvae of the common mussel at low concentrations of tributyltin. *Mar Pollut Bull*, 15, 402-405.
- Bech M**. **2002**. Imposex and tributyltin contamination as a consequence of the establishment of a marina, and increasing yachting activities at Phuket Island, Thailand. *Environ Pollut*, 117, 421-429.
- Becker van Slooten K**, Merlini L, de Bertrand N, de Alencastro LF, Tarradellas J. **1992**. Elevated levels of organotins in lake Geneva: bivalves as sentinel organism. *Bull Environ Contam Toxicol*, 48, 37-44.
- Becker van Slooten K**, Tarradellas J. **1994a**. Accumulation, depuration and growth effects of tributyltin in the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha* under field conditions. *Environ Toxicol Chem*, 13, 755-762.
- Becker van Slooten K**, Merlini L, Stegmüller AM, de Alencastro LF, Tarradellas J. **1994b**. Contaminations des boues des stations d'épuration suisses par les organoétains. *Gas Wasse Abwasse*, 74, 104.
- Becker van Slooten K**, Tarradellas J. **1995**. Organotins in Swiss lakes after their ban: assessment of water, sediment, and *Dreissena polymorpha* contamination over a four-year period. *Environ Contam Toxicol*, 29, 384-392.
- Belfroid AC**, Purperhart M, Ariese F. **2000**. Organotin levels in seafood. *Mar Pollut Bull*, 40, 226-232.
- BEQUALM**. (Biological Effects Quality Assurance in Monitoring Programmes). **2000**. BEQUALM Newsletter. BEQUALM Office, Centre for the Environment, Fisheries and Aquaculture Science, Essex, UK.
- Bettin C**, Oehlmann J, Stroben E. **1996**. TBT-induced imposex in marine neogastropods is mediated by an increasing androgen level. *Helgol Meeresunters*, 50, 299-317.
- Birch ME**. **1993**. Solvent venting technique for gas chromatography with microwave-induced plasma atomic emission spectroscopy. *Anal Chimica Acta*, 282, 451-458.
- Birchenough AC**, Barnes N, Evans SM, Hinz H, Krönke I, Moss C. **2002**. A review and assessment of tributyltin contamination in the North Sea, based on surveys of butyltin tissue burdens and imposex/intersex in four species of neogastropods. *Mar Pollut Bull*, 44, 534-543.
- Biselli S**, Bester K, Hühnerfuss H, Fent K. **2000**. Concentrations of the antifouling compound Irgarol 1051 and of organotins in water and sediments of German North and Baltic Sea marinas. *Mar Pollut Bull*, 40, 3, 233-243.
- Bocquené G**, Bellanger C, Cadiou Y, Galgani F. **1995**. Joint action of combinations of pollutants on the acetylcholinesterase activity of several marine species. *Ecotoxicol*, 4, 266-279.
- Bocquené G**. **1996**. L'acétylcholinestérase, marqueur de neurotoxicité. Application à la surveillance des effets biologiques des polluants chez les organismes marins. *Thèse de Doctorat, Ecole Pratique des Hautes Etudes*, 250 p.
- Bradford M**. **1976**. A rapid and sensitive assay of protein utilizing the principle of dye binding. *Analyt Biochem*, 772, 248-264.

- Bryan GW**, Bright DA, Hummerstone LG, Burt GR. **1989**. Uptake and transformation of <sup>14</sup>C-labelled tributyltin chloride by the dog-whelk *Nucella lapillus*: Importance of absorption from the diet. *Mar Environ Res*, 28, 241-245.
- Bryan GW**, Gibbs PE. **1991**. Impact of low concentrations of tributyltin (TBT) on marine organisms: a review. Dans: Metal ecotoxicology: concepts and applications. Newman MC, McIntosh AW, eds. Lewis Publisher, Inc. Ann Arbor, Boca Raton, Boston, pp 323-361.
- Bryan GW**, Bright DA, Hummerstone LG, Burt GR. **1993**. Uptake, tissue distribution and metabolism of <sup>14</sup>C-labelled tributyltin (TBT) in the dog-whelk *Nucella lapillus*. *J Mar Biol Assoc UK*, 73, 889-912.
- Budzinski H**, Baumard P, Papineau A, Wise S, Garrigues P. **1996**. Focused microwave assisted extraction of polycyclic aromatic compounds from standard reference materials, sediment and biological tissues. *Pol Arom Comp*, 9, 225-232.
- Budzinski H**, Letellier M, Thompson S, Le Menach K, Garrigues P. **2000**. Combined protocol for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorobiphenyls (PCBs) from sediments using focussed microwave assisted (FMW) extraction. *Fres J Anal Chem*, 367, 165-171.
- Buege JA**, Aust SD. **1978**. Microsomal lipid peroxidation. *Meth Enzymol*, 50, 302-310.
- Cardellichio N**, Giandomenica S, Decataldo A, Di Leo A. **2001**. Speciation of butyltin compounds in marine sediment with head space solid phase microextraction and GC-MS. *Fres J Anal Chem*, 369, 6,510.
- Carlier-Pinasseau C**, Astruc A, Lespes G, Astruc M. **1996**. Detection of butyltin and phenyltin compounds in biological material by gas chromatography – flame photometric detection after ethylation with sodium sodium tetraethylborate. *J of Chrom A*, 750, 317-325.
- Carpenter DO**, Swann JW, Yarowsky PJ. **1977**. Effect of curare on responses to different putative transmitters in *Aplysia* neurons. *J Neurobiol*, 8, 2, 119-132.
- Carpinteiro J** Rodriguez I, Cela R. **2001**. Simultaneous determination of butyltin and phenyltin species in sediments using ultrasound-assisted leaching. *Fres J Anal Chem*, 370, 872-877.
- Casillas E** Krishnakumar PK, Snider RG, Varanasi U. **1996**. Effects of chemical contaminants on subcellular changes in digestive cells of the marine bivalve, *Mytilus edulis*, from Puget Sound, Washington. *Mar Environ Res*, 42, 107.
- Ceulemans M** Adams .C. **1996**. Integrated sample preparation and speciation analysis for the simultaneous determination of methylated species of tin, lead and mercury in water by purge-and-trap injection-capillary gas chromatography-atomic emission spectrometry. *J of Anal Atom Spectrom*, 11, 201-206.
- Ceulemans M**, Lobinski R, Dirx WMR, Adams FC. **1993**. Rapid sensitive speciation analysis of butyl- and phenyltin compounds in water by capillary gas chromatography atomic emission spectrometry (GC-AED) after in-situ ethylation and in-liner preconcentration. *Fres J Anal Chem*, 347, 256.
- Chagot D**, Alzieu C, Sanjuan J, Grizel H. **1990**. Sublethal and histopathological effects of trace levels of tributyltin fluoride on adult oysters *Crassostrea gigas*. *Aquat Living Ressour*, 3, 121-130.
- Champ MA**, Seligman PF. **1996**. An introduction to organotin compounds and their use in antifouling coatings. Dans: Organotin – Environmental fate and effects. Champ MA, Seligman PF, eds. Chapman and Hall, London, pp 1-25.
- Chassard-Bouchaud C**. **1995**. L'écotoxicologie. Que sais-je ?, Paris, PUF, 127 p.

- Chau YK**, Yang F, Maguire RJ. **1996**. Improvement of extraction recovery for the monobutyltin species from sediment. *Anal Chim Acta*, 320, 165.
- Chau YK**, Maguire RJ, Brown M, Yang F, Batchelor SP, Thompson JAJ. **1997a**. Occurrence of butyltin compounds in mussels in Canada. *Applied Organomet Chem*, 11, 903-912.
- Chau YK**, Yang F. **1997b**. A novel technique for direct derivatization of ionic organotin and alkyl-lead compounds in sediments: simultaneous determination of organotin and alkyl-lead compounds in sediments by gas chromatography-atomic emission (GC-AED) dual-channel detection. *Applied Organomet Chem*, 11, 851-858.
- Chau YK**, Maguire RJ, Brown M, Yang F, Batchelor SP. **1997c**. Occurrence of organotin compounds in the Canadian aquatic environment five years after regulation of antifouling use tributyltin. *Water Qual Res J Canada*, 32, 453-521.
- Chau YK**, Yang F, Brown M. **1997d**. Evaluation of derivatization techniques for the analysis of organotin compounds in biological tissue. *Anal Chim Acta*, 338, 51-55.
- Cheung CCC**, Zheng GJ, Lam PKS, Richardson BJ. **2002**. Relationships between tissue concentrations of chlorinated hydrocarbons, polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Mar Pollut Bull*, 45, 1-2, 181-191.
- Chien LC**, Hung TS, Choang KY, Yeh CY, Meng PJ, Shieh MJ, Han BC. **2002**. Daily intake of TBT, Cu, Zn, Cd and As for fishermen in Taiwan. *Sci Tot Environ*, 285, 177-185.
- Cima F**, Marin MG, Matozzo V, Da Ros L, Ballarin L. **1999**. Biomarkers for TBT immunotoxicity studies on the cultivated clam *Tapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850). *Mar Pollut Bull*, 39, 1-2, 112-115.
- Claiborne A**. **1985**. Catalase activity. Dans: Handbook of methods for oxygen radical research, Greenwald RA, ed, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp 283-284.
- Claissé D**, Alzieu C. **1993**. Copper contamination as a result of antifouling paint regulation? *Mar Pollut Bull*, 26, 7, 395-397.
- Clayton M**, Steinmann R, Fent K. **2000**. Different expression patterns of heat shock proteins hsp 60 and hsp 70 in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) exposed to copper end tributyltin. *Aquat Toxicol*, 47, 213-226.
- Coehlo MR**, Bebianno MJ, Langston WJ. **2002a**. Routes of TBT uptake in the clam *Ruditapes decussatus*. I. Water and sediments as vector of TBT uptake. *Mar Environ Res*, 54, 179-192.
- Coehlo MR**, Bebianno MJ, Langston WJ. **2002b**. Routes of TBT uptake in the clam *Ruditapes decussatus*. II. Food as vector of TBT uptake. *Mar Environ Res*, 54, 193-207.
- Colby SM**, Stewart M, Reilly JP. **1990**. Laser ionization gas chromatography/mass spectrometry of tetraethyltin. *Anal Chem*, 14, 164.
- Companó R**, Granados M, Leal C, Prat MD. **1995**. Liquid chromatographic determination of triphenyltin and tributyltin using fluorimetric detection. *Anal Chim Acta*, 314, 175.
- Cossa D**, Bourget E, Pouliot D, piuze J, Chanut JP. **1980**. Geographical and seasonal variations in the relationship between trace metal content and body weight in *Mytilus edulis*. *Mar Biol*, 58, 7-14.
- Cossa T**, Pham TT, Rondeau B, Quémerais B, Proulx S, Surette C. **1998**. Bilan massique des contaminants chimiques dans le fleuve Saint Laurent. Rapport Scientifique et Technique ST-163. Environnement Canada Région du Québec, Conservation de l'environnement, Centre Saint Laurent, pp 258.

- Cosson RP. 1998.** Utilisation des métallothionéines comme marqueurs d'exposition aux métaux. Dans : Utilisation des biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement. Lagadic L, Caquet T, Amiard JC, ramade F, eds, Editions Lavoisier, Tec et Doc, pp 77-109.
- Cossu C, Doyote A, Jacquin MC, Vasseur P. 1997.** Biomarqueurs du stress oxydant chez les animaux aquatiques. Dans: Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux. Lagadic L, Caquet T, Amiard JC, Ramade F, eds, Masson, Paris, Milan, Barcelone, pp 149-163.
- Couillard Y, Campbell PGC, Tessier A, Pellerin-Massicotte J, Auclair JC. 1995.** Field transplantation of a freshwater bivalve, *Pyganodon grandis*, across a metal contamination gradient. I: Temporal changes in metallothionein and metals (Cd, Cu and Zn) concentrations in soft tissues. *Can J Fish Aquat Sci*, 52, 690-702.
- Crosby MP, Gale LD. 1990.** A review and evaluation of bivalve condition index methodologies with a suggested standard method. *Journal of Shellfish Research*, 9, 1, 233-237.
- Dahl B, Blanck H. 1996.** Toxic effect of antifouling agent Irgarol-1051 on periphyton communities in coastal water microcosms. *Mar Pollut Bull*, 32, 342-350.
- Dahlggaard H. 1986.** Effects of season and temperature on long-term *in situ* loss rates of Pu, Am, Np, Eu, Ce, Ag, Tc, Zn, Co and Mn in a Baltic *Mytilus edulis* population. *Mar Ecol Prog Ser*, 33, 157-165.
- Dame RF. 1996.** Ecology of marine bivalves: an ecosystem approach. CRC Press, Boca Raton, FL.
- David F, Sandra P. 1992.** Analysis of organotin compounds using the HP 5921A atomic emission detector. *Analisis*, 20, M53.
- Davies IM, Harding MJC, Bailey SK, Shanks AM, Långe R. 1997.** Sublethal effects of tributyltin oxide on the dogwhelk *Nucella lapillus*. *Mar Ecol Prog Ser*, 158, 191-204.
- Davies IM, Minchin A. 2002.** Quality assurance of imposex and intersex measurements in marine snails. *J Environ Monit*, 4, 5, 788-790.
- De Dregori I, Pinochet H, Gras N, Munoz L. 1996.** Variability of cadmium, copper and zinc levels in molluscs and associated sediments from Chile. *Environ Pollut*, 92, 359-368.
- De Lafontaine Y, Gagné F, Blaise C, Costan G, Gagnon P, Chan HM. 2000.** Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for assessment of water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aquat Toxicol*, 50, 51-71.
- Dellali M, Romée M, Aissa P. 2001.** Suivi annuel de l'activité catalase chez des moules et des palourdes originaires de la lagune de Bizerte. *Oceanol Acta*, 24, 3, 263-271.
- De Longcamp D, Lubet P, Drodowsky M. 1974.** The *in vitro* biosynthesis of steroids by the gonad of the mussel (*Mytilus edulis*). *Gen Comp Endocrinol*, 22, 116-127.
- De Mora SJ, Stewart C, Philipps D. 1995.** Sources and rate of degradation of tri(n-butyl)tin in marine sediment near Auckland, New Zealand. *Mar Pollut Bull*, 30, 50.
- De Smaele T, Moens L, Dams R, Sandra P, Van der Eyquen J, Vandyck J. 1998.** Sodium tetra(n-propyl)borate: a novel aqueous *in situ* derivatization reagent for the simultaneous determination of organomercury, -lead and -tin compounds with gas chromatography- inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 793, 99-106.
- Dévier MH, Augagneur S, Budzinski H, Mora P, Narbonne JF, Garrigues P. 2003.** Microcosm TBT bioaccumulation and multi-biomarker assessment in the blue mussel *Mytilus sp.* *Environ Toxicol Chem*, sous presse.

- Devillers J**, Karcher W. **1991**. Applied Multivariate Analysis in SAR and Environmental Studies. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 530 p.
- Diez S**, Abalos M, Bayona LM. **2002**. Organotin contamination in sediments from the Western Mediterranean enclosures following 10 years of TBT regulation. *Wat Res*, 36, 905-918.
- Di Giulio RT**, Habig C, Gallagher EP. **1993**. Effects of Black Rock Harbor sediments on indices of biotransformation, oxidative stress and DNA integrity in channel fish. *Aquat Toxicol*, 26, 1-22.
- Dirkx WMR**, Lobinski R, Adams FC. **1993**. *Anal Sci*, 9, 273-278.
- Djerassi C**. **1981**. Recent studies in the marine sterol field. *Pure Appl Chem*, 53, 873-890.
- Donard OFX**, Weber JH. **1988**. Volatilization of tin as stannane in anoxic environments. *Nature*, 332, 339-340.
- Donard OFX**, Martin F. **1992**. Hyphenated techniques applied to environmental speciation studies. *Trends Anal Chem*, 11, 1, 55-59.
- Donard OFX**, Astruc M. **1997**. Spéciation des métaux et métalloïdes : mythe ou réalité ? *Analisis Mag*, 25, 2, 14-17.
- Donard OFX**, Lespes G, Amouroux D, Morabito R. **2001**. Organotin compounds in the environment: still a most critical issue. Dans: Trace element speciation for environment, food and health. Cornelis R, Crews H, Donard O, Ebdon L, Quevauviller P, eds. Royal Society of Chemistry.
- Doyotte A**, Cossu C, Jacquin MC, Babut M, Vasseur P. **1997**. Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental and field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Aquat Toxicol*, 39, 93-110.
- Dunemann L**, Hajimiragha H, Begerow J. **1999**. Simultaneous determination of Hg(II) and alkylated Hg, Pb, and Sn species in human body fluids using SPME-GC/MS-MS. *Fres J Anal Chem*, 363, 466-468.
- Durand F**, Peters LD, Livingstone DR. **2002**. Effect of intertidal compared to subtidal exposure on the uptake, loss and oxidative toxicity of water-born benzo[a]pyrene in the mantle and whole tissues of the mussel, *Mytilus edulis* L. *Mar Environ Res*, 54, 271-274.
- Edwards CA**, Fisher SW. 1991. The use of cholinesterase measurements in assessing the impacts of pesticides on terrestrial and aquatic invertebrates. Dans: Cholinesterase-inhibiting insecticides. Their impact on wildlife and the environment. Mineau P, ed. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp 255-275.
- Elgethun K**, Neumann C, Blake P. **2000**. Butyltins in shellfish, finfish, water and sediment from the Coos Bay estuary (Oregon, USA). *Chemosphere*, 41, 953-964.
- Ellman GL**, Courtney KD, Andres V, Featherstone R Jr. **1961**. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, 7, 88-95.
- Escartin E**, Porte C. **1997**. The use of cholinesterase and carboxylesterase activities from *Mytilus galloprovincialis* in pollution monitoring. *Environ Toxicol Chem*, 16, 10 2090-2095.
- Evans SM**, Evans PM, Leksono T, McKinnell PD. **1995**. Tributyltin pollution: a diminishing problem following legislation limiting the use of TBT-based antifouling paints. *Mar Pollut Bull*, 30, 14-21.
- Evans SM**, Evans PM, Leksono T. **1996**. Widespread recovery of dogwhelks, *Nucella lapillus* (L.), from tributyltin contamination in the North Sea and Clyde Sea. *Mar Pollut Bull*, 32, 263-269.
- Evans SM**, Nicholson GJ. **2000**. The use of imposex to assess tributyltin contamination in coastal waters and open seas. *Sci Tot Environ*, 258, 73-80.

- Fent K, Stegeman JJ. 1993.** Effects of tributyltin in vivo on hepatic cytochrome P450 forms in marine fish. *Aquat Toxicol*, 24, 219-240.
- Fent K. 1996.** Ecotoxicology of organotin compounds. *CRC Crit Rev Toxicol*, 26/1,1.
- Féral C, Le Gall S. 1982.** Induction expérimentale par un polluant marin, le tributylétain de l'activité neuro endocrine contrôlant la morphogénèse du pénis chez les femelles d'*Ocenebra erinacea*, Mollusque, Prosobranchie gonochorique. *CR Acad Sc Paris*, 295, III, 627-630.
- Féral C, LeGall S. 1983.** The influence of a pollutant factor (tributyltin) on the neuroendocrine mechanism responsible for the occurrence of a penis in the females of *Ocenebra erinacea*. Dans: Molluscan Neuroendocrinology. Lever J, Boer H, eds. North Holland Publishing, Amsterdam, The Netherlands, pp 173-175.
- Fernandez-Castro N, His E, Cantin C. 1995.** Contamination par le tributylétain (TBT) du Bassin d'Arcachon évaluée à l'aide d'un indicateur biologique: l'imposex chez *Ocenebra erinacea*, Mollusque gastéropode. Poster, *XXI Coll Union Oceano France*, Cherbourg, 6-8 décembre 1995.
- Fisher WS, Oliver LM, Walker WW, Manning CS, Lytle TF. 1999.** Decreased resistance of eastern oysters (*Crassostrea virginia*) to a protozoan pathogen (*Perkinsus marinus*) after sublethal exposure to tributyltin oxide. *Mar Environ Res*, 47, 185-191.
- Fitzpatrick PJ, O'halloran J, Sheehan D, Walsh AR. 1997.** Assessment of a glutathione S-transferase and related proteins in the gill and digestive gland of *Mytilus edulis* (L.), as potential organic pollution biomarkers. *Biomarkers*, 2, 51-56.
- Følsvik N, Brevik EM, Berge JA, Dam M. 1998.** Organotin and imposex in the littoral zone in the Faroe Islands. *Sci Tot Environ*, 245, 131-136.
- Forget J. 1998.** Impact neurotoxique de contaminants (pesticides et métaux) sur un crustacé marin *Tigriopus brevicornius* (Müller). Caractérisation de la cholinestérase et application à la surveillance des effets des polluants sur l'environnement marin. *Thèse de l'Université de Paris 6*.
- Forsyth DS, Sun WF, Daldlish K. 1994.** Survey of organotin compounds in blended wines. *Food Add Contam*, 11, 343-350.
- Forsyth DS, Jay B. 1997.** Organotin leachates in drinking water from chlorinated polyvinyl chloride (CPVC) pipe. *Appl Organomet Chem*, 11, 551-558.
- Fowler SW, Oregioni B. 1976.** Trace metals in mussels from the N.W. Mediterranean. *Mar Pollut Bull*, 7, 26-29.
- Franco J, Borja A, Solaun O, Perez V. 2002.** Heavy metals in molluscs from the Basque Coast (Northern Spain) : results from a 11-year monitoring programme. *Mar Pollut Bull*, 44, 973-976.
- Geyer H, Sheehan P, Kotzias D, Freitag D, Korte F. 1982.** Prediction of ecotoxicological behavior of chemicals: relationship between physico-chemical properties and bioaccumulation of organic chemicals in the mussel *Mytilus edulis*. *Chemosphere*, 11, 1121-1124.
- Gibbs PE, Bryan GW. 1987.** TBT paints and the demise of the dogwhelk *Nucella lapillus*, Gastropoda. *OCEAN'S 87 Conference Proceedings, Organotin Symposium*, 4, 1482-1487, Halifax, 28 Sept.-1 Oct.
- Gibbs PE, Bryan GW. 1996.** TBT induces imposex in the neogastropods. Dans: Tributyltin: case study of an environmental contaminant. de Mora, ed; *Cambridge Environmental Chemistry Series*, 8, 212-236.
- Girard JP, Ferrua C, Pesando D. 1997.** Effects of tributyltin on Ca<sup>2+</sup> homeostasis and mechanisms controlling cell cycling in sea urchin eggs. *Aquat Toxicol*, 38, 225-239.

- Girousi S**, Rosenberg E, Voulgaropoulos A, Grassbauer M. **1997**. Speciation of organotin compounds in Thermaikos Gulf by GC-MIP-AED. *Fres J Anal Chem*, 358, 828-832.
- Gomez-Ariza JL**, Beltran R, Morales E, Giraldez I, Ruiz-Benitez M. **1995**. Acid extraction treatment of sediment samples for organotin speciation: occurrence of butyltin and phenyltin compounds on the Cadiz Coast, South West Spain. *Appl Organomet Chem*, 9, 51.
- Gomez-Ariza JL**, Morales E, Giraldez I, Beltran R, Pozas-Escobar JA. **1997**. Acid/extraction treatment of bivalves for organotin speciation. *Fres J Anal Chem*, 357, 1007-1009.
- Gomez-Ariza JL**, Morales E, Giraldez I. **1999**. Uptake and elimination of tributyltin in clams, *Venerupis decussata*. *Mar Environ Res*, 47, 399-413.
- Gomez-Ariza JL**, Giraldez I, Morales E. **2000**. Temporal fluctuations of tributyltin in the bivalve *Venerupis decussata* at five stations in southwest Spain. *Environ Pollut*, 108, 279-290.
- Gonzales-Toledo E**, Benzi M, Companó R, Granados M, Prat MD. **2001**. Speciation of organotin compounds in shellfish by liquid chromatography – fluorimetric detection. *Anal Chim Acta*, 443, 183-190.
- Gowland BTG**, McIntosh AD, Davies IM, Moffat CF, Webster L. **2002**. Implications from a field study regarding the relationship between polycyclic aromatic hydrocarbons and glutathione S-transferase activity in mussels. *Mar Environ Res*, 54, 231-235.
- Gremm TJ**, Frimmel FH. **1992**. Determination of organotin compounds in aqueous samples by means of HPGC-AED. *Wat Res*, 26, 9, 1163-1169.
- Griffond B**, Van Minnen J, Colard C. **1992**. Distribution of APGWamide-immunoreactive substances in the central nervous system and reproductive apparatus of *Helix aspersa*. *Zool Sci*, 9, 533-539.
- Gunther AJ**, Davis JA, Hardin DD, Gold J, Bell D, Crick JR, Scelfo GM, Sericano J, Stephenson M. **1999**. Long-term bioaccumulation monitoring with transplanted bivalves in the San Francisco Estuary. *Mar Pollut Bull*, 38, 3, 170-181.
- Habig WH**, Pabst, Jakoby B. **1974**. The enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*, 249, 7130-7139.
- Hamoutene D**, Rahimtula A, Payne J. **2000**. Development of a new biochemical assay for assessing toxicity in invertebrate and fish sperm. *Wat Res*, 34, 16, 4049-4053.
- Harino H**, Fukushima M, Yamamoto Y, Kawai S, Miyazaki N. **1998**. Contamination of butyltin and phenyltin compounds in the marine environment of Otsuchi Bay, Japan. *Environ Pollut*, 101, 209-214.
- Hashimoto S**, Watanabe M, Noda Y, Hayashi T, Kurita Y, Takasu Y, Otsuki A. **1998**. Concentration and distribution of butyltin compounds in a heavy tanker route in the Strait of Malacca and in Tokyo Bay. *Mar Environ Res*, 45, 2, 169-177.
- Hassan MA**, Juma HA. **1992**. Assessment of tributyltin in the marine environment of Bahrain. *Mar Pollut Bull*, 24, 408.
- Hines GA**, Watts SA, Sower SA, Walker CW. **1992**. Sex steroid levels in the testes, ovaries, and pyloric caeca during gametogenesis in the sea star *Asterias vulgaris*. *Gen Comp Endocrin*, 87, 451-460.
- His E** Robert R. **1983-1985**. Développement des véligères de *Crassostrea gigas* dans le Bassin d'Arcachon. Etudes sur les mortalités larvaires. *Rev Trav Pêches Marit*, 47, 1-2, 63-88.
- Hoch M**. **2001**. Organotin compounds in the environment: an overview. *Appl Geochem*, 16, 719-743.

- Hong HK**, Takahashi S, Min BY, Tanabe S. **2002**. Butyltin residues in blue mussels (*Mytilus edulis*) and arkshells (*Scapharca broughtonii*) collected from Korean coastal waters. *Environ Pollut*, 117, 475-486.
- Horiguchi T**, Shiraishi H, Shimizu M, Masatoshi M. **1997**. Imposex in sea snails, caused by organotin (tributyltin and triphenyltin) pollution in Japan: a survey. *Appl Organomet Chem*, 11, 451-455.
- Horiguchi T**, Takigushi N, Cho HS, Kojima M, Kaya M, Shiraishi H, Morita M, Hirose H, Shimizu M. **2000**. Ovo-testis and disturbed reproductive cycle in the giant abalone, *Haliotis madaka*: possible linkage with organotin contamination in a site of population decline. *Mar Environ Res*, 50, 223-229.
- Houtteville P**, Lubet P. **1974**. Analyse expérimentale en culture organotypique de l'action des ganglions nerveux cérébraux-pleuraux et viscéraux sur le manteau de la moule mâle. *C R Acad Sci Paris*, 278, 2469-2472.
- Huang G**, Wang Y. **1995**. Effects of tributyltin chloride on marine bivalve mussels. *Wat Res*, 29, 1877-1884.
- Hung TC**, Hsu WK, Mang PJ, Chuang A. **2001**. Organotins and imposex in the rock shell, *Thais clavigera*, from oyster mariculture areas in Taiwan. *Environ Pollut*, 112, 145-152.
- Hwang HM**, Oh JR, Kahng SH, Lee KW. **1999**. Tributyltin compounds in mussels, oysters and sediments of Chinhae Bay, Korea. *Mar Environ Res*, 47, 61-70.
- Idler DR**, Wiseman P. **1971**. Sterols of molluscs. *IntJ Biochem*, 516-528.
- IEEB (rapport)**. **1995**. Etudes complémentaires sur la connaissance des teneurs en certains composés organiques ou inorganiques dans le Bassin d'Arcachon. Note IEEB à la Commission SMVM « Eau et Milieu Naturel » du 01/06/1995, 8 p.
- IFREMER Arcachon (rapport)**. **1997**. Manaud F, Bouchet JM, Deltreil JP, Maurer D, Trut G, Auby I, Dreno JP, Masson N, Pellier C, L'Yavanc J. Etude intégrée du Bassin d'Arcachon. DEL/AR/RDN/1997-09.
- IFREMER**. **2002**. Résultats : contaminants chimiques par région.  
<http://www.ifremer.fr/envlit/region/reg08girlapyr/index.htm#>
- Illanes J**. **1979**. Recherches cytologiques et expérimentales sur la neurosécrétion chez la moule (*Mytilus edulis*, L.). *Thèse doct 3° cycle, Caen*, 134p.
- Iwata H**, Tanabe S, Mizuno T, Tatsukawa R. **1995**. High accumulation of toxic butyltins in marine mammals from Japanese coastal waters. *Environ Sci Technol*, 29, 2959-2962.
- Jacobsen JA**, Stuer-Lauridsen F, Pritzl G. **1997**. Organotin speciation in environmental samples by gas chromatography and pulsed flame photometer detection (PFPD). *Appl Organomet Chem*, 11, 9, 737-741.
- Jacobsen JA**, Asmund G. **2000**. TBT in marine sediments and blue mussels (*Mytilus edulis*) from central-west Greenland. *Sci Tot Environ*, 245, 131-136.
- Jha AN**, Hagger JA, Hill SJ, Depledge MH. **2000**. Genotoxic, cytotoxic and developmental effects of tributyltin oxide (TBTO): an integrated approach to the evaluation of the relative sensitivities of two marine species. *Mar Environ Res*, 50, 565-573.
- Jing H**, Amirav A. **1996**. Universal heteroatom selective GC detection with the pulsed flame photometer detector. *J Chromatogr A*, .
- Kadai AL**, Koide SS. **1989**. Characterisation of a factor with oocyte maturation inducing activity in *Spisula*. *Biol Bull*, 176, 8-13.

- Kan-ati-reklap S**, Tanabe S, Sanguansin J, Tabucanon MS, Hungspreungs M. **1997**. Contamination by butyltin compounds and organochlorine residues in the green mussel (*Perna viridis*, L.) from Thailand coastal waters. *Environ Poll*, 97, 79-89.
- Kannan K**, Corsolini S, Focardi F, Tanabe S, Tatsukawa R. **1996**. Accumulation pattern of butyltin compounds in dolphin, tuna, and shark collected from Italian coastal waters. *Arch Environ Contam Toxicol*, 31, 19-23.
- Kannan K**, Falandysz J. **1997a**. Butyltin residues in sediment, fish, fish-eating birds, harbour porpoise and human tissues from the Polish coast of the Baltic Sea. *Baseline*, 34, 203-207.
- Kannan K**, Senthilkumar K, Logannathan BG, Takahashi S, Odell DK, Tanabe S. **1997b**. Elevated accumulation of tributyltin and its breakdown products in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) found stranded along the US Atlantic and Gulf coasts. *Environ Sci Technol*, 31, 296-301.
- Kannan K**, Guruge KS, Thomas NJ, Tanabe S, Giesy JP. **1998**. Butyltin residues in Southern Sea Otters (*Enhydra lutris nereis*) found dead along California coastal waters. *Environ Sci Technol*, 32, 1169-1175.
- Kannan K**, Senthilkumar K, Giesy JP. **1999**. Occurrence of butyltin compounds in human blood. *Environ Sci Technol*, 33, 1776-1779.
- Kendall R**, Dickerson R, Giesy J, Suk W (editors). **1998**. Principles and processes for evaluating ED in wildlife. Proceedings for a workshop, 6 March 1996, Kiawah Island SC. Pensacola FL. Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), 515p.
- Khessiba A**, Hoarau P, Gnassia-Barelli M, Aissa P, Roméo M. **2001**. Biochemical response of the mussel *Mytilus galloprovincialis* from Bizerta (Tunisia) to chemical pollutant exposure. *Arch Contam Toxicol*, 40, 222-229.
- Kim GB**, Tanabe S, Tatsukawa R, Loughlin TR, Shimazaki K. **1996**. Characteristics of butyltin accumulation and its biomagnification in Stellar sea lion (*Eumetopias jubatus*). *Environ Toxicol Chem*, 15, 2043-2048.
- Kirchin MA**, Wiseman A, Livingstone DR. **1992**. Seasonal and sex variation in the mixed-function oxygenase system of digestive gland microsomes of the common mussel, *Mytilus edulis* L. *Comp Biochem Physiol C*, 101, 81-91.
- Ko MMC**, Bradley GC, Neller AH, Broom MJ. **1995**. Tributyltin contamination of marine sediments of Hong Kong. *Mar Pollut Bull*, 31, 249-253.
- Kreimer DI**, Dolgina EA, Raves M, Sussman JL, Silman I, Weimer I. **1994**. A metastable state of *Torpedo californica* acetylcholinesterase generated by modification with organomercurials. *Biochem*, 33, 14407-14418.
- Kuballa J**, Jantzen E, Wilken RD. **1996**. Organotin compounds in sediments of the rivers Elbe and Mulde. Dans: Sediments and toxic substances. Calmano W, Förstner U, eds. Springer, Berlin, pp 245-270.
- Labourg PJ**. **1982**. Répartition de l'étain et du zinc au sein des communautés benthiques intertidales proches du port de plaisance d'Arcachon (Gironde). Rapport Convention de recherche n°81060, Ministère de l'Environnement, 30p.
- Labrot F**, Ribera D, Saint-Denis M, Narbonne JF. **1996**. *In vitro* and *in vivo* studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: lipid peroxidation, acetylcholinesterase, catalase and glutathione peroxidase activities in three non-mammalian species. *Biomarkers*, 1, 21-28.
- Lafaurie M**, Narbonne JF, Galgani F. **1992**. Indicateurs biochimiques de contamination de l'environnement marin. *Anal Mag*, 20, 6, 27-33

- Lagadic L**, Caquet T, Amiard JC. **1997**. Biomarqueurs en écotoxicologie: principes et définitions. Dans: Biomarqueurs en en écotoxicologie, aspects fondamentaux. Lagadic L, Caquet T, Amiard JC, Ramade F, eds. Masson, p1-9.
- Lalère B**. **1995**. Spéciation des composés organostanniques dans l'environnement par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à photométrie de flamme après préparation de l'échantillon sous champ micro-ondes. *Thèse d'université n°1269, Université de Bordeaux I*.
- Langston WJ**, Burt GR, Zhou M. **1987**. Tin and organotin in water, sediments and benthic organisms of Poole Harbour. *Mar Pollut Bull*, 18, 634-639.
- Langston WJ**, Burt GR. **1991**. Bioavailability and effects of sediment-bound TBT in deposit-feeding clams, *Scrobicularia plana*. *Mar Environ Chem*, 32, 61.
- Lapota D**, Rosenberg DE, Platter Rieger MF, Seligman PF. **1993**. Growth and survival of *Mytilus edulis* larvae exposed to low levels of dibutyltin and tributyltin. *Mar Biol*, 115, 413.
- Lascourrèges-Berdeü JF**. **1996**. Rôle des sulfactobactéries dans la remobilisation et la transformation des métaux et des composés organostanniques (butylétains et phénylétains) stockés dans les sédiments lagunaires. *Thèse Université de Bordeaux 1, N° d'ordre 1530*.
- Laufer H**, Downer RGH. **1989**. Endocrinology of selected invertebrate types. New York: Alan R liss.
- Laughlin RB**, French W, Guard HE. **1986b**. Accumulation of bis(tributyltin) oxide by the marine mussel *Mytilus edulis*. *Environ Sci Technol*, 20, 884-890.
- Laughlin RB**, Guard HE, Coleman WN. **1986a**. Tributyltin in seawater: speciation and octanol-water partition coefficient. *Environ Sci Technol*, 20, 201-204.
- Laughlin RB**, French W. **1988**. Concentration dependence of bis(tributyltin) oxide accumulation in the mussel *Mytilus edulis*. *Environ Toxicol Chem*, 7, 1021-1026.
- Law RJ**, Waldock MJ, Allchin CR, Lasler RE, Bailey KJ. **1994**. Contaminants in sea water around England and Wales: results from monitoring surveys: 1990-1992. *Mar Pollut Bull*, 28, 668.
- Le Blanc GA**, Campbell PM, den Besten P, Brown RP, Chang ES, Coats JR, de Fur PL, Dhadialla T, Edwards J, Riddiford LM, Simpson MG, Snell TW, Thorndyke M, Matsumura F. **1999**. The endocrinology of invertebrates. In: de Fur PL, Crane M, Ingersoll C, Tattersfield L, eds. Endocrine disruption in invertebrates: endocrinology, testing and assessment. Pensacola, FL, SETAC Press, pp 23-106.
- Le Dantec** . **1968**. Ecologie et reproduction de l'huître portugaise *Crassostrea angulata* (L.) dans le Bassin d'Arcachon et sur la rive gauche de la Gironde. *Rev Trav Inst Pêches Marit*, 32, 3, 237-262.
- Le Gall S**, Le Gall P, Feral C. **1983**. The neuroendocrine mechanism responsible for penis differentiation in *Crepidula fornicata*. Dans: Molluscan Neuro-Endocrinology. Lever J, Boehr H, eds. North Holland Publishing, Amsterdam, The Netherlands, pp169-173.
- Lee RF**. **1986**. Metabolism of bis tributyltin oxide by estuarine animals. *OCEAN'S 86 Conference Proceedings. Organotin Symposium*, 4, 1182-1188, Washington, 23-25 Sept.
- Lemaire P**, Livingstone DR. **1993**. Pro-oxidant/antioxidant processes and organic xenobiotic interactions in marine organisms, in particular the flounder *Platichthys flesus* and the mussel *Mytilus edulis*. *Trends Comp Physiol*, 1, 1119-1150.
- Letellier M**. **1998**. Extraction assistée par micro-ondes de contaminants organiques dans les matrices environnementales. *Thèse de l'Université de Bordeaux I, n° d'ordre 1957*.

- Li K, Li SFY. 1995.** *J Chromatogr Sci*, 33, 309.
- Liu Y, Lopez-Avila V, Alcaraz M. 1993.** Determination of organotin compounds in environmental sample by supercritical fluid extraction and gas chromatography with atomic emission detection. *J High Resol Chromatogr*, 16, 106-112.
- Liu Y, Lopez-Avila V, Alcaraz M. 1994.** Off-line complexation/supercritical fluid extraction and gas chromatography with atomic emission for the determination and speciation of organotin compounds in soils and sediments. *Anal Chem*, 66, 3788.
- Livingstone DR. 1990.** Cytochrome P-450 and oxidative metabolism in invertebrates. *Biochem Soc Trans*, 18, 1, 15-19.
- Livingstone DR. 1993a.** Biotechnology and biomonitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *J Chem Tech Biotechnol*, 57, 195-211.
- Livingstone DR, Lemaire P, Matthews A, Peters LD, Bucke D, Law RJ. 1993b.** Pro-oxidant, antioxidant and 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity in the liver of Dab (*limanda limanda*) exposed to sediment contaminated with hydrocarbons and other chemicals. *Mar Pollut Bull*, 26, 602-606.
- Livingstone DR, Lemaire P, Matthews A, Peters LD, Porte C, Fitzpatrick PJ, Forlin L, Nasci C, Fossato V, Wooton N, Goldfarb P. 1995.** Assessment of the impact of organic pollutants on goby (*Zosterisessor Ophiocephalus*) and mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from the Venice lagoon, Italy: biochemical studies. *Mar Environ Res*, 39, 235-240.
- Livingstone DR. 1998.** The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. *Comp Biochem Physiol A*, 120, 43-49.
- Lobel PB, Belkhole SP, Jackson SE, Longuerich HP. 1989.** A universal method for quantifying and comparing the residual variability of element concentrations in biological tissues using 25 elements in the mussel *Mytilus edulis* as a model. *Marine Biology*, 102, 513-518.
- Lobinski R, Adams FC. 1992a.** Ultratrace speciation analysis of organolead in water by gas chromatography with atomic emission spectroscopy after in-liner preconcentration. *J Anal Atom Spectrom*, 7, 987.
- Lobinski R, Dirx W, Ceulemans M, Adams FC. 1992b.** Optimization of comprehensive speciation of organotin compounds in environmental sample by gas chromatography helium microwave induced plasma emission spectrometry. *Anal Chem*, 64, 159-165.
- Lobinski R, Adams FC. 1993.** Recent advances in speciation analysis by capillary gas chromatography- microwave-induced plasma and atomic emission spectroscopy. *Trends Anal Chem*, 12, 2, 8.
- Lobinski R. 1994.** Gas chromatography with element selective detection in speciation analysis. Status and future prospects. *Analisis*, 22, 37-48.
- Lubet P. 1959.** Recherches sur le cycle sexuel et l'émission de gamètes chez les Mytilidés et les Pectinides (Mollusques bivalves). *Rev Trav Instit Pêches Mar*, 23, 387-548.
- Lubet P, Herlin P, Mathieu M, Colin F. 1978.** Tissu de réserve et cycle sexuel chez les lamellibranches. *Haliotis*, 7, 59-62.
- Lubet P. 1983.** Experimental studies on the action of the temperature on the reproductive activity of the mussel (*Mytilus edulis*). *Journal of Malacology Studies*, London, 12A, 100-105.
- Lubet P, Mathieu M. 1990.** Les régulations endocriniennes chez les mollusques bivalves. *Année biologique*, pp 235-252.

- Luoma SN**, Linville R. **1995**. A comparison of selenium and mercury concentrations in transplanted and resident bivalves from North San Francisco Bay. Dans: Annual Report of the Regional Monitoring Program for Trace Substances, San Francisco Estuary Institute, Richmond, CA, pp 160-170.
- Ma H**, Dai S, Huang G. **2000**. Distribution of tributyltin chloride in laboratory simulated estuarine microcosms. *Water Res*, 34, 10, 2829-2841.
- Maguire RJ**, Chau YK, Bengert GA, Hale EJ, Wong PTS, Kramer O. **1982**. Occurrence of organotin compounds in Ontario lakes and rivers. *Environ Sci Technol*, 16, 698-702.
- Maguire RJ**. **2000**. Review of the persistence, bioaccumulation and toxicity of tributyltin in aquatic environments in relation to Canada's toxic substances management policy. *Water Res J Canada*, 35, 4, 633-679.
- Manaud F**, Bouchet JM, Deltreil JP, Maurer D, Trut G, Auby I, Dreno JP, L'Yavanc J, Masson N, Pelletier C. **1997**. Etude intégrée du Bassin d'Arcachon; tome 1, Physique, IFREMER.
- Manly R**, Blundell SP, Field FW, McCabe PJ. **1996**. Trace metal concentrations in *Mytilus edulis* L. From the laguna San Rafael, southern Chile. *Mar Pollut Bull*, 32, 444-448.
- Martin F**. **1994**. Interference mechanisms and reduction during the speciation of organotin compounds by hydride generation, cryoseparation and detection by atomic absorption spectrometry. *J Anal At Spectrom*, 9, 1143.
- Mathieu M**. **1987**. Etudes expérimentale des contrôles exercés par les ganglions nerveux sur la gamétogenèse et les processus métaboliques associés chez la moule *Mytilus edulis* L. (Mollusque Lamellibranche). *Thèse de l'université de Caen*.
- Matthiessen P**, Thain JE. **1989**. A method for studying the impact of polluted marine sediments on intertidal colonising organisms; tests with diesel-based drilling mud and tributyltin antifouling paint. *Hydrobiol*, 188/189, 477-485.
- Matthiessen P**, Gibbs PE. **1998**. Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. *Environ Toxicol Chem*, 17, 37-43.
- May-Ming Lau M**. **1991**. Tributyltin antifouling: a threat to the Hong Kong marine environment. *Arch Environ Contam Toxicol*, 20, 229.
- McCarthy J.F.**, Shugart LR. **1990**. Biomarkers of environmental contamination. Lewis publishers, Boca Raton, Florida, USA, pp 3-14.
- Mensink BP**, Boon JP, Ten Hallers-Tjabbes CC, Van Hattum B, Koeman JH. **1997**. Bioaccumulation of organotin compounds and imposex occurrence in a marine food chain (Eastern Scheldt, The Netherlands). *Environ Technol*, 18, 12, 1235-1244.
- Michel P**, Averty B. **1991**. TBT analysis in seawater by GC-FPD after direct aqueous-phase ethylation using sodium tetraethylborate. *Applied Organomet Chem*, 5, 393-397.
- Michel P**, Averty B. **1996**. Bilan 1992 de la contamination des côtes françaises par les composés organostanniques. Rapport interne IFREMER, DEL/96.06/Nantes, 12p.
- Michel P**, Averty B. **1999a**. Contamination of French coastal waters by organotin compounds: 1997 update. *Mar Pollut Bull*, 38, 4, 268-275.
- Michel P**, Averty B. **1999b**. Distribution and fate of tributyltin in surface and deep waters of the northwestern Mediterranean. *Environ Sci Technol*, 33, 2524-2528.
- Michel P**, Averty B, Andral B, Chiffolleau JF, Galgani F. **2001**. Tributyltin along the coasts of Corsica (Western Mediterranean): A persistent problem. *Mar Pollut Bull*, 42, 1128-1132.

- Michel X. 1993.** Contribution à l'étude des interactions entre les contaminants chimiques organiques et les organismes marins : bases moléculaires et applications à la biosurveillance de l'environnement côtier. *Thèse de l'Université de Bordeaux I*, n° d'ordre 993.
- Micic M, Bihari N, Labura Z, Müller WEG, Batel R 2001.** Induction of apoptosis in the blue mussel *Mytilus edulis* by tri-*n*-butyltin chloride. *Aquat Toxicol*, 55, 61-73.
- Minchin D, Duggan CB, King W. 1987.** Possible effects of organotins on scallop recruitment. *Mar Pollut Bull*, 18, 11, 604-608.
- Minchin D, Ohlmann J, Duggan CB, Stroben E, Keatinge M. 1995.** Marine TBT antifouling contamination in Ireland, following legislation in 1987. *Mar Pollut Bull*, 30, 633-639.
- Minganti V, Capella R, De Pellegrini R. 1995.** Evaluation of different derivatization methods for the multi-element detection of Hg, Pb and Sn compounds by gas chromatography-microwave induced plasma-atomic emission spectrometry in environmental samples. *Fres J Anal Chem*, 351, 471-477.
- Mizuishi K, Takeuchi M, Hobo T. 1998.** Trace analysis of tributyltin and triphenyltin compounds in sea water by gas chromatography-negative ion chemical ionization mass spectrometry. *J Chrom A*, 800, 267-273.
- Moens L, De Smaele T, Dams R, Van Den Broeck P, Sandra P. 1997.** Sensitive, simultaneous determination of organomercury, -lead, and -tin compounds with headspace solid phase microextraction capillary gas chromatography combined with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Chem*, 69, 1604-1611.
- Mora P, Michel X, Narbonne JF. 1999.** Cholinesterase activity as potential biomarker in two bivalves. *Environ Toxicol Pharmacol*, 7, 253-260.
- Morcillo Y, Ronis MJJ, Porte C. 1997.** Interaction of tributyl- and triphenyltin on the microsomal monooxygenase system of molluscs and fish from the western Mediterranean. *Aquat Toxicol*, 38, 35-46.
- Morcillo Y, Porte C. 1998.** Effects of tributyltin on the phase I testosterone metabolism and steroid titres of the clam *Ruditapes decussata*. *Aquat Toxicol*, 42, 1-13.
- Morcillo Y, Abalat A, Porte C. 1999.** Mussels as sentinels of organotin pollution: bioaccumulation and effects on P450-mediated aromatase activity. *Environ Toxicol Chem*, 18, 1203-1208.
- Morcillo Y, Porte C. 2000.** Evidence of endocrine disruption in clams - *Ruditapes decussata* - transplanted to a tributyltin-polluted environment. *Environ Pollut*, 107, 47-52.
- Mori K, Tamate H, Imai T. 1964.** Presence of 5 $\beta$ -hydroxysteroid deshydrogenase activity in the tissues of maturing oysters. *Tohoku J Agr Res*, 15, 269-277.
- Mori K, Muramatsu T, Nakamura Y. 1969.** Effect of steroid on oyster. III - Sex reversal from male to female in *Crassostrea gigas*. *Ibid*, 35, 1072-1077.
- Mouneyrac C, Amiard JC, Amiard-Triquet C. 1998.** Effects of natural factors (salinity and body weight) on cadmium, copper, zinc and metallothionein-like protein levels in resident populations of oysters *Crassostrea gigas* from a polluted estuary. *Mar Ecol Prog Ser*, 162, 125-135.
- Myers PR. 1974.** Dopamine: localisation uptake in the pedal ganglion of *Quadrula pustulosa* (Pelecypoda). *Tissue and Cell*, 6, 49-64.
- Nagase M, Toba M, Kondo H, Hasebe K. 1998.** Determination of butyltin compounds in soft polyurethane foam by gas chromatography with flame photometric detection. *Analyst*, 123, 1091-1094.

- Najimi S**, Bouhaimi A, Daubeze M, Zekhnini A, Pellerin J, Narbonne JF, Moukrim A. **1997**. Use of acetylcholinesterase in *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of pollution in Agadir Marine Bay (south of Morocco). *Bull Environ Contam Toxicol*, 58, 901-908.
- Namour P**. **1992**. Les mono-oxygénases de poissons, un outil pour la caractérisation des pollutions chroniques. Etudes du CEMAGREF, série Ressources en Eau, n° 6, 232 p.
- Narbonne JF**, Garrigues P, Ribera D, Raoux C, Mathieu A, Lemaire P, Salaün JP, Lafaurie M. **1991**. Mixed-function oxygenase enzymes as tools for pollution monitoring: field studies on the French coast of the Mediterranean sea. *Comp Biochem Physiol C*, 100, 37-42.
- Nasci C**, Nesto N, Monteduro RA, Da Ros L. **2002**. Field application of biochemical markers and a physiological index in the mussel, *Mytilus galloprovincialis*: transplantation and biomonitoring studies in the lagoon of Venice (NE Italy). *Mar Environ Res*, 54, 3-5, 811-816.
- Nelson WG**, Bergen BJ, Cobb DJ. **1995**. Comparison of PCB and trace metal bioaccumulation in the blue mussel *Mytilus edulis*, and the ribbed mussel, *Modiolus demissus*, in New Bedford Harbor, Massachusetts. *Environ Toxicol Chem*, 14, 3, 513-521.
- Nias DJ**, McKillup SC, Edyvane KS. **1993**. Imposex in *Lepsiella vinosa* from southern Australia. *Mar Pollut Bull*, 26, 380-384.
- Niyogi S**, Biswas S, Sarker S, Datta AG. **2001**. Antioxidant enzymes in brackishwater oyster, *Saccostrea cucullata*, as potential biomarkers of polyaromatic hydrocarbon pollution in Hooghly Estuary (India): seasonality and its consequences. *Sci Tot Environ*, 281, 237-246.
- Oberdöster E**, Cheek AO. **2000**. Gender benders at the beach: endocrine disruption in marine and estuarine organisms. *Environ Toxicol Chem*, 20, 23-36.
- Oberdöster E**, McClellan-Green P. **2001**. The neuropeptide APGWamide induces imposex in the mud snail, *Ilyanassa obsoleta*. *Peptides*, 21, 1321-1330.
- Oberdöster E**, McClellan-Green P. **2002**. Mechanisms of imposex induction in the mud snail, *Ilyanassa obsoleta*: TBT as a neurotoxin and aromatase inhibitor. *Mar Env Res*, 54, 1-4.
- Okamura H**, Aoyama I, Liu D, Maguire RJ, Pacepavicius GJ, Lau YL. **2000**. Phytotoxicity of the new antifouling compound Irgarol 1051 and a major degradation product. *Mar Pollut Bull*, 40, 9, 754-763.
- Oliveira Ribeiro CA**, Schatzmann M, Silva de Assis HC, Silva PH, Pelletier E, Akaishi FM. **2002**. Evaluation of subchronic effects of TBT in tropical freshwater fish (*Astyanax bimaculatus*, Linnaeus 1758). *Ecotoxicol Environ Safety*, 51, 161-167.
- ORTEPA (Organotin Environmental Programme Association)**. <http://www.ortepa.org/>
- Osada M**, Matsutani T, Nomura T. **1987**. Implication of catecholamine during spawning in bivalve molluscs. *Int J Invert Reprod Dev*, 12, 241-252.
- Padros J**, Pelletier E, Reader S, Denizeau F. **2000**. Mutual interactions between benzo[a]pyrene and tributyltin in brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Environ Toxicol Chem*, 19, 4, 1019-1027.
- Page DS**, Widdows J. **1991**. Temporal and spatial variation in levels of alkyltins in mussel tissues: a toxicological interpretation of field data. *Mar Environ Res*, 32, 113-129.
- Page DS**. **1995a**. A six-year monitoring study of TBT and DBT in mussel tissues from the Lynher River, Tamar Estuary, UK. *Mar Pollut Bull*, 30, 746-749.
- Page DS**, Dassanayake TM, Gilfillan ES. **1995b**. Tissue distribution and depuration of tributyltin for field-exposed *Mytilus edulis*. *Mar Environ Res*, 40, 409-421.

- Page DS**, Widdows J, Staff FJ. **1998**. Effects of thermal stress and tri(n)butyltin on anaerobic energy metabolism in *Mytilus edulis*. *Mar Environ Res*, 46, 433-437.
- Payne JF**, Mathieu A, Melvin W, Fancey LL. **1996**. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Mar Pollut Bull*, 32, 225-231.
- Pederson-Bjergaard S**, Greibrokk T. **1996**. Environmental applications of capillary gas chromatography coupled with atomic emission detection – A review. *J High Resol Chromatogr*, 19, 597.
- Pellerin-Massicote J**. **1994**. Oxidative processes as indicators of chemical stress in marine bivalves. *J Aquat Ecosyst Health*, 3, 101-111.
- Pellerin-Massicote J**. **1997**. Influence of elevated temperature and air-exposure on MDA levels and catalase activities in digestive gland of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.). *J Rech Oceanogr*, 22, 91-98.
- Peña-Llopis S**, Ferrando MD, Peña JB. **2002**. Impaired glutathione redox status is associated with decreased survival in two organophosphate-poisoned marine bivalves. *Chemosphere*, 47, 485-497.
- Penninks AH**. **1993**. The evaluation of data-derived safety factors for bis(tri-*n*-butyltin)oxide. *Food Add Contam*, 10, 351-361.
- Philips DJH**, Rainbow PS. **1993**. Biomonitoring of trace aquatic contaminants. Elsevier Science Publisher, 362 pp.
- Piérard C**. **1995**. Détermination des composés polychlorobiphényles dans l'environnement sédimentaire marin et estuarien. *Thèse de l'Université de Bordeaux I*, n° d'ordre 1346.
- Pillai VK**, Valsala KK. **1995**. Seasonal variations of some metals in bivalve mollusc *Sunetta scripta* from the Cochin coastal waters. *Ind J Mar Sci*, 24, 113-115.
- Pinder LCV**, Pottinger TG. **1998**. Endocrine function in aquatic invertebrates and evidence for disruption by environmental pollutants. Institute of Freshwater Ecology, Center for Ecology and Hydrology, Natural Environmental Research Council.
- Popham JD**, Johnson DJ, D'Auria JM. **1980**. Mussels (*Mytilus edulis*) as point source indicators of pollution. *Mar Pollut Bull*, 11, 261.
- Popham JD**, D'Auria JM. **1983**. Combined effect of body size, season, and location on trace element levels in mussels (*Mytilus edulis*). *Arch Environ Contam Toxicol*, 12, 1-14.
- Power A**, Sheehan D. **1996**. Seasonal variation in the antioxidant defence systems of gill and digestive gland of the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Comp Biochem Physiol C*, 114, 99-103.
- Prange A**, Jantzen E. **1995**. Determination of organometallic species by gas chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Anal At Spectrom*, 10, 105-109.
- Quevauvillier P**, Donard OFX. **1990**. Variability of butyltin determination in water and sediment samples from European coastal environments. *Appl Organomet Chem*, 4, 353-367.
- Quevauvillier P**, Donard OFX, Etcheber H. **1994**. Butyltin distribution in a sediment core from the Arcachon harbour (France). *Environ Pollut*, 84, 89-92.
- Quimby BD**, Larson PA, Dryden PC. **1996**. A comparison of the G2350A AED vs. HP 5921A AED for average values of MDL and selectivity for selected elements. *Application note 228-363 Hewlett-Packard*.

- Quintela M**, Barreiro R, Ruiz JM. **2000**. The use of *Nucella lapilus* (L.) transplanted in cages to monitor tributyltin (TBT) pollution. *Sci Tot Environ*, 247, 227-237.
- Radenac G**, Bocquené G, Fichet D, Miramand P. **1998**. Contamination of a dredged-material disposal site (La Rochelle Bay, France). The use of the acetylcholinesterase activity of *Mytilus edulis* (L.) as biomarker of pesticides: the need for a critical approach. *Biomarkers*, 3, 4-5, 305-315.
- Rainbow PS**. **1995**. Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. *Mar Pollut Bull*, 31, 181-192.
- Rajendran RB**, Tao H, Ramesh A, Ramachandran S. Determination of butyl-, phenyl-, octyl- and tributylmonomethyltin compounds in a marine environment (Bay of Bengal, India) using gas chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Environ Monit*, 3, 6, 627-634.
- Readman JW**, Liong WKL, Grondlin D, Bartocci J, Villeneuve JP, Mee L. **1993**. Coastal water contamination from a triazine herbicide used in antifouling paints. *Environ Sci Technol*, 27, 1940-1942.
- Regoli F**, Orlando E. **1994**. Accumulation and subcellular distribution of metal (Cu, Fe, Mn, Pb, Zn) in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Mar Pollut Bull*, 28, 592-600.
- Regoli F**, Principato G. **1995**. Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. *Aquat Toxicol*, 31, 143-164.
- Regoli F**, Hummel H, Amiard-Triquet C, Larroux C, Sukhotin A. **1998**. Trace metals and variations of antioxidant enzymes in Arctic bivalve populations. *Arch Environ Contam Toxicol*, 35, 594-601.
- Reis-Henriques MA**, LeGellec D, Remy-Martin JP, Adessi GL. **1990**. Studies of endogenous steroids from the marine mollusc *Mytilus edulis* by gas chromatography and mass spectrometry. *Comp Biochem Physiol B*, 95, 303-309.
- Reuther R**, Jaeger L, Allard B. **1999**. Determination of organometallic forms of mercury, tin and lead by in-situ derivatization, trapping and gas chromatography- atomic emission detection. *Anal Chimica Acta*, 394, 259-269.
- Rice CD**, Roszell LE. **1998**. Tributyltin (TBT) modulates 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB 126)-induced hepatic CYP1A1 activity in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J Toxicol Environ Health*, 55, 101-116.
- RINBIO** (Rapport) (Réseau Intégrateurs Biologiques). **1999**. Andral B, Stanisière JY, Hervé G. Evaluation de la qualité des eaux basée sur l'utilisation de stations artificielles de moules en Méditerranée: résultats de la campagne 1998. *Rapport IFREMER, DEL/TL/99-038*.
- Ritz DA**, Swain R, Elliot NG. **1982**. Use of the mussel *Mytilus edulis planulatus* (Lamarck) in monitoring heavy metal levels in seawater. *Australian J Mar Freshwater Res*, 33, 491-506.
- Rivaro P**, Zaratin L, Frache R, Mazzucotelli A. **1995**. Determination of organotin compounds in marine mussel samples by using high performance liquid chromatography-hydride generation inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Analyst*, 120, 1937.
- Rivaro P**, Frache R, Leardi R. **1997**. Seasonal variations in levels of butyltin compounds in mussel tissues sampled in an oil port. *Chemosphere*, 34, 99-106.
- Rivaro P**, Pensiero G, Frache R. **1999**. Occurrence of butyltin compounds in water and mussel samples collected in an oil port. *Applied Organomet Chem*, 13, 727-732.
- R.N.O**. **1995**. Surveillance du milieu marin. Ministère de l'Environnement, 32p.

- Robinson S**, Volosin J, Heithly J, Cardwell R. **1999**. Comment on: butyltin residues in sediment, fish, fish-eating birds, harbour porpoise and human tissues from the Polish coast of the Baltic Sea. *Mar Pollut Bull*, 38, 57-61.
- Rodriguez-Ariza A**, Martinez-Lara E, Pascual P, Pedrajas JR, Abril N, Dorato G, Toribio F, Bárcena JA, Peinado J, Pueyo C, López-Barea J. **1993**. Biochemical and genetic indices of marine pollution in Spanish littoral. *Sci Tot Environ (Suppl.)*, 109-116.
- Rodriguez-pereiro I**, Carro Diaz A. **2002**. Speciation of mercury, tin, and lead compounds by gas chromatography with microwave-induced plasma and atomic emission detection (GC-MIP-AED). *Anal Bioanal Chem*, 372, 74-90.
- Ronis MJJ**, Mason AZ. **1996**. The metabolism of testosterone by the periwinkle (*Littorina littorea*) in vitro and in vivo: Effects of tributyltin. *Mar Environ Res*, 42, 161-166.
- Rosenberg E**, Kmetov V, Grasserbauer M. **2000**. Investigating the potential of high-performance liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry as an alternative method for the speciation analysis of organotin compounds. *Fres J Anal Chem*, 366, 400-407.
- Ruiz JM**, Bryan GW, Gibbs PE. **1994**. Bioassaying the toxicity of tributyltin-(TBT)-polluted sediment to spat of the bivalve *Scrobicularia plana*. *Mar Ecol Prog Ser*, 113, 119-130.
- Ruiz JM**, Bachelet G, Caumette P, Donard OFX. **1996**. Three decades of tributyltin in the coastal environment with emphasis on Arcachon Bay, France. *Environ Pollut*, 93, 2, 195-203.
- Ruiz JM**, Szpunar J, Donard OFX. **1997**. Butyltins in sediments and deposit-feeding bivalves *Scrobicularia plana* from Arcachon Bay, France. *Sci Tot Environ*, 198, 225-231.
- Salazar MH**, Salazar SM. **1987**. Tributyltin effects on juvenile mussel growth; *OCEAN'S 87 Conference Proceedings, Organotin Symposium*, 4, 1482-1487, Halifax, 28 Sept.-1 Oct.
- Salazar MH**, Salazar SM. **1991**. Assessing site-specific effects of TBT contamination with mussel growth rates. *Mar Environ Res*, 32, 131-150.
- Salazar MH**, Salazar SM. **1996**. Mussels as bioindicators: Effects of TBT on survival, bioaccumulation and growth under natural conditions. Dans: *Organotin – Environmental fate and effects*. Champ MA, Seligman PF, eds. Chapman and Hall, London, chapitre 15.
- Sanders BM**. **1990**. Stress proteins : potential as multitiered biomarkers. Dans: *Biomarkers of environmental contamination*. McCarthy JF, Shugart RL, eds. Lewis Publishers, Boca Raton, 165-191.
- Sarradin PM**, Astruc A, Desauziers V, Pinel R, Astruc M. **1991**. Butyltin pollution in surface sediments of Arcachon Bay after 10 years of restricted use of TBT based paints. *Environ Technol*, 12, 537-543.
- Sarradin PM**. **1993**. Répartition et évolution du tributylétain dans les sédiments marins. *Thèse de l'université de Pau et des Pays de l'Adour*.
- Sarradin PM**, Astruc A, Sabrier R, Astruc M. **1994**. Survey of butyltin compounds in Arcachon Bay sediments. *Mar Pollut Bull*, 28, 10, 621-628.
- Schmidt GH**, Ibrahim NMM. **1994**. Heavy metal content ( $Hg^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ) in various body parts : its impact on cholinesterase activity and binding glycoproteins in the grasshopper *Aiolopus thalassinus* adults. *Ecotoxicol Environ Saf*, 29, 148-164.
- Schmitt V**. **1997**. Dosage rapide des composés organostanniques par chromatographie multicapillaire en phase gazeuse après préparation de l'échantillon sous champ micro-ondes. *Thèse de l'Université de Bordeaux I, n° d'ordre 1835*.

- Schubert P**, Rosenberg E, Grasserbauer M. **2000**. Comparison of sodium tetraethylborate and sodium tetra(n-propyl)borate as derivatization reagents for the speciation of organotin and organolead compounds in water samples; *Fres J Anal Chem*, 366, 356-360.
- Scott BF**, Chau YK, Rais-Firouz A. **1991**. Determination of butyltin species by GC / atomic emission spectroscopy. *Applied Organomet Chem*, 5, 151-157.
- Seligman PF**, Grovhoug JG, Richter KE. **1986**. Measurements of butyltins in San Diego Bay, CA: a monitoring strategy. *OCEAN'S 86 Conference Proceedings, Organotin Symposium*, 4, 1189-1194, Washington, 23-25 Sept.
- Sericano JL**, Wade TL, Brooks JM. **1996**. Accumulation and depuration of organic contaminants by the American oyster (*Crassostrea virginia*). *Sci Tot Environ*, 179, 149-160.
- Sheehan D**, Power A. **1999**. Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve mollusc. *Comp Biochem Physiol C*, 123, 193-199.
- Shim W**, Oh R, Khang S, Shim J, Lee S. **1998**. Accumulation of tributyl- and triphenyltin compounds in pacific oysters, *Crassostrea gigas*, from the Chinhae Bay system, Korea. *Arch Environ Contam Toxicol*, 35, 41-47.
- Siah A**, Pellerin J, Benosman A, Gagné JP, Amiard JC. **2002**. Seasonal gonad progesterone pattern in the soft-shell clam *Mya arenaria*. *Comp Biochem Physiol A*, 132, 2, 499-511.
- Skarphédinsdóttir H** Ólafsdóttir K, Svavaron J, Johannesson T. **1996**. Seasonal fluctuations of tributyltin (TBT) and dibutyltin (DBT) in the dogwhelk, *Nucella lapillus* (L.), and the blue mussel, *Mytilus edulis* (L.), in icelandic waters. *Mar Pollut Bull*, 32, 4, 358-361.
- Smith BS**. **1981**. Tributyltin compounds induce male characteristics on female mud snails *Nassarius obsoletus*. *J Appl Toxicol*, 1, 3, 141-144.
- Sole M**, Porte C, Albaiges J. **1995**. Seasonal variation in the mixed-function oxygenase system and antioxidant enzymes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Environ Toxicol Chem*, 14, 157-164.
- Sole M**. **2000**. Assessment of the results of chemical analyses combined with the biological effects of organic pollution on mussels. *Trends Anal Chem*, 19, 1, 1-9.
- Spooner N**, Gibbs PE, Bryan GW, Goal LJ. **1991**. The effect of tributyltin upon steroid titres in the female dogwhelk, *Nucella lapillus*, and the development of imposex. *Mar Environ Res*, 32, 37-49.
- Stäb JA**, Cofino WP, van Hattum B, Brinckman UAT. **1993**. Comparison of GC/MSD and GC/AED for the determination of organotin compounds in the environment. *Fres J Anal Chem*, 347, 247-255.
- Stäb JA**, Brinckman UAT, Cofino WP. **1994a**. Assessment of transport routes of triphenyltin used in potato culture in the Netherlands. *Anal Chim Acta*, 286, 335.
- Stäb JA**, Brinckman UAT, Cofino WP. **1994b**. Validation of the analysis of organotin compounds in biological tissues using alkylation and gas chromatography. *Appl Organomet Chem*, 8, 577-585.
- Stäb JA**, Frenay M, Frericks IL, Brinckman UAT, Cofino WP. **1995**. Survey of nine organotin compounds in the Netherlands using zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) as biomonitor. *Anal Chim Acta*, 286, 335.
- Stegeman JJ**, Brouwer M, Di Giulio RT, Forlin L, Fowler BA, Sanders BM, Van Veld PA. **1992**. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. Dans: Huggett RJ, Kimerle RA, Mehrle PM, Bergman HL, eds; Biomarkers, Lewis Publishers, Boca Raton, pp 235-335.

- Stenalt E**, Johansen B, Lillenskjold SV, Hansen BW. **1998**. Mesocosm study of *Mytilus edulis* larvae and postlarvae, including settlement phase, exposed to a gradient of tributyltin. *Ecotoxicol Environ Safety*, 40, 212-225.
- Stephenson MD**, Smith DR, Goetzl J, Ichikawa G, Martin M. **1986**. Growth abnormalities in mussels and oysters from areas with high levels of tributyltin in San Diego Bay. *OCEAN'S 86 Conference Proceedings, Organotin Symposium*, 4, 1246-1251, Washington, 23-25 Sept.
- Stephenson MD**, Leonard GH. **1994**. Evidence for the decline of silver and lead and the increase of copper from 1977 to 1990 in the coastal marine waters of California. *Mar Pollut Bull*, 28, 3, 148-153.
- Stewart C**, Thompson JAJ. **1994**. Extensive butyltin contamination in southwestern coastal British Columbia, Canada. *Mar Pollut Bull*, 28, 601.
- Stien X**, Percic P, Gnassia-Barelli M, Roméo M, Lafaurie M. **1998**. Evaluation of biomarkers in caged fishes and mussels to assess the quality of waters in a bay of the NW Mediterranean Sea. *Environ Pollut*, 99, 339-345.
- Strømgren T**, Bongard T. **1987**. The effect of tributyltin oxide on growth of *Mytilus edulis*. *Mar Pollut Bull*, 18, 30-31.
- Suzuki T**, Yamamoto I, Yamada H, Kaniwa N, Kondo K, Murayama M. **1998**. Accumulation, metabolism and depuration of organotin compounds in the marine mussels *Mytilus graynus* and *Mytilus edulis* under natural conditions. *J Agric Food Chem*, 46, 304-313.
- Suzuki T**, Kondo K, Uchiyama M, Murayama M. **1999**. Chemical species of organotin compounds in sediment at a marina. *J Agric Food Chem*, 47, 3886-3894.
- Swaileh KM**. **1996**. Seasonal variations in the concentrations of Cu, Cd, Pb and Zn in *Arctica islandica* L. (Mollusca: Bivalvia) from Kiel Bay, Western Baltic Sea. *Mar Pollut Bull*, 32, 631-635.
- Szpunar-Lobinska J**, Witte C, Lobinski R, Adams FC. **1995**. Separation techniques in speciation analysis of organometallic species. *Fres J Anal Chem*, 351, 351.
- Szpunar J**, Ceulemans M, Schmitt VO, Adams FC, Lobinski R. **1996a**. Microwave accelerated speciation analysis for butyltin compounds in sediments and biomaterials by large volume injection capillary gas chromatography quartz furnace atomic absorption spectrometry. *Anal Chim Acta*, 332, 225.
- Szpunar J**, Schmitt V, Monod JL, Lobinski R. **1996b**. Rapid speciation of butyltin compounds in sediments and biomaterials by gas chromatography with microwave-induced plasma and atomic emission spectrometry after microwave-assisted leaching/digestion. *J Anal Atom Spectrom*, 11, 193.
- Takahashi S**, Tanabe S, Kubodera T. **1997**. Butyltin residues in deep-sea organisms collected from Suruga Bay, Japan. *Environ Sci Technol*, 31, 3103-3109.
- Takahashi S**, Mukai S, Tanabe S, Sakayama K, Miyazaki T, Masuno H. **1999a**. Butyltin residues in livers of human and wild terrestrial mammals and in plastic products. *Environ Sci Technol*, 106, 213-218.
- Takahashi S**, Tanabe S, Takeuchi I, Miyazaki N. **1999b**. Distribution and specific bioaccumulation of butyltin compounds in a marine ecosystem. *Arch Environ Contam Toxicol*, 37, 50-61.
- Tanguy A**, Fernandez Castro N, Marhic H, Moraga D. **1999**. Effects of an organic pollutant (tributyltin) on genetic structure in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar Pollut Bull*, 38, 7, 550-559.

- Tao H**, Rajendran RB, Quetel C, Nakazato T, Tominaga H, Miyazaki A. **1999**. Tin speciation in the femtogram range in open ocean seawater by gas chromatography / inductively coupled plasma mass spectrometry using a shield torch at normal plasma conditions. *Anal Chem*, 71, 4208-4215.
- Ten Hallers-Tjabbes CC**, Kemp JJ, Boon JP. **1994**. Imposex in whelks (*Buccinum undatum*) from the open North Sea: relation to shipping traffic intensities. *Mar Pollut Bull*, 28, 311-313.
- Ten Hallers-Tjabbes CC**, Everaarts JM, Mensink BP, Boon JP. **1996**. The decline of the North Sea whelk (*Buccinum undatum* L.) between 1970 and 1990: a natural or a human-induced event? *Mar Ecol*, 17, 1-3, 333-343.
- Thain JE**, Waldock MJ. **1986**. The impact of tributyltin, TBT antifouling paints on molluscan fisheries; *Wat Sci Technol*, 18, 193-202.
- Thompson S**, Budzinski H, Garrigues P. **1999a**. Comparison of PCB and DDT distribution between water-column and sediment-dwelling bivalves in Arcachon Bay, France. *Mar Poll Bull*, 38, 8, 655-662.
- Thompson S**, Budzinski H. **1999b**. Determination of polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides in environmental biological samples using focused microwave-assisted extraction. *Int J environ anal chem*, 76, 1, 49-60.
- Tolosa I**, Merlini L, de Bertrand N, Bayona JM, Albaigés J. **1992**. Occurrence and fate of tributyl- and triphenyltin compounds in Western Mediterranean coastal enclosures. *Environ Toxicol Chem*, 11, 145-155.
- Tolosa I**, readman JW, Blaevoet A, Ghilini S, Bartolucci J, Horvat M. **1996**. Contamination of Mediterranean (Côte d'Azur) coastal waters by organotins and Irgarol 1051 used in antifouling paints. *Environ Toxicol Chem*, 11, 145-155.
- Toreilles J**, Guérin MC, Roch P. **1996**. Espèces oxygénées réactives et systèmes de défense des bivalves marins. *C R Acad Sci III*, 319, 209-218.
- Torres MA**, Testa CP, Gáspari C, Masutti MB, Panitz CMN, Curi-Pedrosa R, Almeida EA, Di Mascio P, Filho DW. **2002**. Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. *Mar Pollut Bull*, 44, 9, 923-932.
- Torres R**, Mason AZ. **2002**. The effect of tributyl tin (TBT) on glutathione-s-transferase (GST) of the common garden snail, *Helix aspersa*. Molecular Toxicology Laboratory, Department of Biological Sciences, California State University, Long Beach, CA, USA. [http://www.cnsmlb.edu/programs/nsfs/students/current/research/ronnatorres/ronna\\_introduction.html](http://www.cnsmlb.edu/programs/nsfs/students/current/research/ronnatorres/ronna_introduction.html).
- Tselensis BS**, Maroulakou M, Lascourreges JF, Szpunar J, Schmitt V, Donard OFX. **1999**. Organotins in sediments and biological tissues from Greek coastal areas: preliminary results. *Mar Pollut Bull*, 38, 2, 146.
- Tsuda T**, Inoue T, Kojima M, Aoki S. **1995**. Daily intakes of tributyltin and triphenyltin compounds from meals. *J AOAC Intern*, 78, 941-943.
- Tujula N**, Radford J, Nair SV, Raftos DA. **2001**. Effects of tributyltin and other metals on the phenoloxidase activating system of the tunicate, *Styela plicata*. *Aquat Toxicol*, 55, 191-201.
- Tutschku S**, Mothes S, Dittrich K. **1994**. Determination and speciation of organotin compounds by gas chromatography-microwave induced plasma atomic emission spectrometry. *J of Chromatogr A*, 683, 269-276.
- Uden PC**. **1995**. Elemental-specific chromatographic detection by absorption, plasma atomic emission and plasma mass spectrometry. *J Chromatogr*, 7063, 393.

- Uhler AD**, Durell GS, Steinhauer WG, Spellacy AM. Tributyltin levels in bivalve mollusks from the east and west coasts of the United States: results from the 1988-1990 National Status and Trend Mussel Watch Project. *Environ Toxicol Chem*, 12, 139-153.
- Valkirs AO**, Davidson B, Kear LL, Fransham RL. **1991**. Long-term monitoring of tributyltin in San Diego Bay, California. *Mar Environ Res*, 32, 151-167.
- Van der Oost R**, Goksoyr A, Celander M, Heida H, Vermeulen NPE. **1992**. Biomonitoring of aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*): II. Biomarkers: pollution-induced biochemical responses. *Aquat Toxicol*, 36, 189-222.
- Vella AJ**, Mintoff B, Axiak V. **2000**. Analytical aspects of the gas chromatographic determination of tributyltin and metabolites in environmental samples. *Sci Tot Environ*, 258, 81-88.
- Vercauteren J**, Peres C, Devos C, Sandra P, Vanhaecke F, Moens L. **2001**. Stir bar sorptive extraction for the determination of ppq-level traces of organotin compounds in environmental samples with thermal desorption-capillary gas chromatography-ICP mass spectrometry. *Anal Chem*, 73, 7, 1509-1514.
- Verdier F**, Virat M, Schweinfurth H, Descotes J. **1991**. Immunotoxicity of bis(tri-n-butyltin) oxide in the rats. *J Toxicol Environ Health*, 32, 307.
- Viarengo A**, Pertica M, Canesi L, Accomando R, Mancinelli G, Orunesu M. **1989**. Lipid peroxidation and levels of antioxidant compounds (GSH, vitamin E) in the digestive glands of mussels of three different age group exposed to anaerobic and aerobic conditions. *Mar Environ Res*, 28, 291-295.
- Viarengo A**, Canesi L, Pertica M, Poli G, Moore MN, Orunesu M. **1990**. Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis* L. *Comp Biochem Physiol C*, 97, 37-42.
- Viarengo A**, Canesi L, Pertica M, Livingstone DR. **1991**. Seasonal variations in the antioxidant defence systems and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels. *Comp Biochem Physiol C*, 100, 187-190.
- Viarengo A**, Nott JA. **1993**. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comp Biochem Physiol C*, 104, 355-372.
- Vidal ML**, Bassères A, Narbonne JF. **2002**. Seasonal variations of pollution biomarkers in two populations of *Corbicula fluminea* (Müller). *Comp Biochem Physiol C*, 131, 133-151.
- Voogt PA**, Broerstjes JJS, Oudejans RCHM. **1985**. Vitellogenesis in sea star: Physiological and metabolic implications. *Comp Biochem Physiol A*, 80, 141-147.
- Wade TL**, Garcia-Romero B, Brooks JM. **1990**. Butyltins in sediments and bivalves from US coastal areas. *Chemosphere*, 20, 647.
- Waldock MJ**, Miller D. **1983a**. The determination of total and tributyltin in seawater and oysters in areas of high pleasure craft activity. *CIEM C.M. 1983/E*, 12.
- Waldock MJ**, Thain JE, Miller D. **1983b**. The accumulation and depuration of bis, tributyltin oxide in oysters : a comparison between the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* and the flat European oyster, *Ostrea edulis*. *ICES C.M. 1983/E*, 59.
- Wang WX**, Fisher NS. **1997**. Modelling the influence of body size on trace element accumulation in the mussel *Mytilus edulis*. *Mar Ecol Prog Ser*, 161, 103-115.
- Weiss KR**, Brezina V, Cropper EC, Heierhorst J, Hooper SL, Probst WC, Rosen SC, Vilim FS, Kupfermann I. **1993**. Physiology and biochemistry of peptidergic cotransmission in *Aplysia*. *J Physiol*, 87, 141-151.

- Widdows J, Donkin P. 1992.** Mussels and environmental contaminants: Bioaccumulation and physiological aspects. Dans: The mussel *Mytilus*: Ecology, physiology, genetics and culture. Gosling E, ed, Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands, pp 383-424.
- Widdows J, Page DS. 1993.** Effects of tributyltin and dibutyltin on the physiological energetics of the mussel, *Mytilus edulis*. *Mar Environ Res*, 35, 3, 233-249.
- Widdows J, Donkin P, Brinsley MD, Evans SV, Salkeld PN, Franklin A, Law RJ, Waldock MJ. 1995.** Scope for growth and contaminant levels in North Sea mussels *Mytilus edulis*. *Mar Ecol Prog Ser*, 127, 131-148.
- Yamada S, Fuji Y, Mikami E, Kawamura N, Hayakawa J, Aoki K, Fukaya M, Terao C. 1993.** Small-scale survey of organotin compounds in household commodities. *J AOAC Int*, 76, 436.
- Zoulian C, Jensen A. 1989.** Accumulation of organic and inorganic tin in blue mussel, *Mytilus edulis* under natural conditions. *Mar Pollut Bull*, 20, 281-286.

## ANNEXES

ANNEXE 1: Données brutes de l'étude de biosurveillance du Bassin d'Arcachon: concentrations des contaminants et niveaux des paramètres physiologiques et biochimiques.

ANNEXE 2: Données brutes de l'étude de biosurveillance du Bassin d'Arcachon: facteurs d'accumulation des contaminants.

ANNEXE 3: Représentations graphiques des variations saisonnières des paramètres physico-chimiques de l'eau du Bassin d'Arcachon pour l'année 2001 (données IFREMER Arcachon, comm. pers.).

ANNEXE 4: Corrélations observées entre contaminants et biomarqueurs sur l'ensemble des sites.

ANNEXE 5: Publication 1: *"Microcosm tributyltin bioaccumulation and multi-biomarkers assessment in the blue mussel Mytilus edulis."*, acceptée à la revue *"Environmental Toxicology and Chemistry"*.

ANNEXE 6: Publication 2: *"Biomonitoring using transplanted bivalves for the assessment of water quality of the Arcachon Bay (France)"*. Bien que cette publication ne soit pas sous sa forme définitive (n'ayant subie aucune correction), elle est tout de même présentée dans ce mémoire afin de faciliter la lecture et la compréhension de ces travaux par Mme Cinta Porte, rapporteur de cette thèse. Elle sera, après correction, soumise à la revue *"Marine Environmental Research"*.



# **ANNEXE 1:**

**Données brutes de l'étude de biosurveillance du Bassin d'Arcachon:  
Concentrations des contaminants et niveaux des paramètres physiologiques et  
biochimiques.**



**Concentrations en butylétains et phénylétains (ng.g<sup>-1</sup> p.s.) dans les bivalves (1/4)**

Site	Code	Date	MBT	DBT	TBT	NI1, NI2	TPT	BT	OT
Moulleau	A	20/02/01	6,8	10,8	26,4			54	54
Moulleau	A	26/03/01	3,1	5,1	23,7			42	42
Moulleau	A	26/04/01	1,6	7,0	27,0			36	36
Moulleau	A	23/05/01	11,0	13,2	30,3	60,3 **	20,4	55	148
Moulleau	A	20/06/01	1,1	8,2	25,6		† (MPT:12,8)	35	35
Moulleau	A	23/07/01	3,8	10,7	27,2			42	42
Moulleau	A	20/08/01	3,4	16,4	31,5			51	51
Moulleau	A	03/10/01	4,7	19,7	31,9			56	56
Moulleau	A	31/10/01	2,2	11,6	24,6			38	38
Moulleau	A	04/12/01	2,0	11,1	23,9			37	37
Moulleau	A	16/01/02	<0,5	9,8	21,9			32	32
Moulleau	A	26/02/02	2,4	18,4	26,0			47	47
Grand Banc	E	26/03/01	2,5	3,7	21,3			37	37
Grand Banc	E	26/04/01	1,4	6,6	31,5			39	39
Grand Banc	E	23/05/01							
Grand Banc	E	20/06/01	<0,5	9,6	22,6			32	32
Grand Banc	E	23/07/01	4,5	12,6	32,3			49	49
Grand Banc	E	20/08/01	2,4	13,1	36,5			52	52
Grand Banc	E	03/10/01	5,7	13,9	35,3			55	55
Grand Banc	E	31/10/01	3,3	13,1	20,9			37	37
Grand Banc	E	04/12/01	2,3	9,9	27,0			39	39
Grand Banc	E	16/01/02	<0,5	7,1	19,9			27	27
Grand Banc	E	26/02/02	<0,5	8,5	23,1			32	32
Ferret	F	26/03/01	3,1	5,7	25,9			45	45
Ferret	F	26/04/01	0,9	5,7	25,5			32	32
Ferret	F	23/05/01	<0,5	6,4	28,3			35	37
Ferret	F	20/06/01	2,3	9,5	44,9			57	57
Ferret	F	23/07/01	2,8	10,2	35,9			49	49
Ferret	F	20/08/01	3,3	14,9	39,7			58	58
Ferret	F	03/10/01	5,2	15,0	32,5			53	53
Ferret	F	31/10/01	1,9	11,3	26,6			40	40
Ferret	F	04/12/01	2,2	10,2	23,8			36	36
Ferret	F	16/01/02	<0,5	8,7	21,3			30	30
Ferret	F	26/02/02	<0,5	11,6	21,3			33	33
Arguin	G	26/03/01	1,5	5,0	20,7			27	27
Arguin	G	26/04/01	<0,5	4,0	19,1			23	23
Arguin	G	23/05/01	30,5	4,3	16,6	463,1 *	1,8	51	516
Arguin	G	20/06/01	<0,5	5,8	15,6	3,2 *		21	25
Arguin	G	23/07/01	8,2	15,9	41,7			66	66
Arguin	G	20/08/01	2,5	16,7	65,3			84	84
Arguin	G	03/10/01							
Arguin	G	31/10/01	1,2	12,4	26,5			40	40
Arguin	G	04/12/01	2,2	8,5	16,6			27	27
Arguin	G	16/01/02	<0,5	9,3	23,7			33	33
Arguin	G	26/02/02	<0,5	8,5	25,7			34	34
La Barbotière	H	04/12/01	1,7	13,3	39,3			54	54
La Barbotière	H	16/01/02	<0,5	11,4	29,5			41	41
La Barbotière	H	26/02/02	2,8	11,9	36,1			51	51

NI: non identifié: \* NI2: pic à 7 min, \*\* NI1: pic à 9 min

**Concentrations en butylétains et phénylétains (ng.g<sup>-1</sup> p.s.) dans les bivalves (2/4)**

Site	Code	Date	MBT	DBT	TBT	NI3	TPT	BT	OT
Arcachon essence	B	26/03/01	76,6	209,5	1270,1	11,3	10,6	1556	1578
Arcachon essence	B	26/04/01	36,6	302,4	1974,4	30,1	7,9	2313	2351
Arcachon essence	B	23/05/01	82,3	440,6	2053,9	20,6	10,8	2577	2608
Arcachon essence	B	20/06/01	153,3	904,8	1891,3	13,1	10,8	2949	2973
Arcachon essence	B	23/07/01	172,9	944,5	2428,2	26,7	22,5	3546	3601
Arcachon essence	B	20/08/01	73,2	655,1	1885,2	11,4	13,8	2614	2651
Arcachon essence	B	03/10/01	108,1	758,2	1732,3	12,5	16,8	2599	2628
Arcachon essence	B	31/10/01	62,3	420,0	1462,5	14,4	7,1	1945	1966
Arcachon essence	B	04/12/01	41,2	185,9	1128,2	13,8	9,1	1355	1378
Arcachon essence	B	16/01/02	37,7	123,4	990,8	14,8	5,4	1152	1172
Arcachon essence	B	26/02/02	23,9	128,5	1015,8	11,4	6,2	1168	1186
Arcachon fond	C	26/03/01	71,6	289,5	1288,8	13,6	12,4	1650	1676
Arcachon fond	C	26/04/01	45,8	369,9	1925,6	32,6	7,8	2341	2382
Arcachon fond	C	23/05/01	78,5	422,0	1768,8	24,2	10,9	2269	2304
Arcachon fond	C	20/06/01	136,7	859,6	1850,8	18,6	10,0	2847	2876
Arcachon fond	C	23/07/01	92,1	542,0	1277,7	9,8	11,3	1912	1935
Arcachon fond	C	20/08/01	88,8	766,1	1701,1	15,1	11,6	2556	2587
Arcachon fond	C	03/10/01	115,1	883,9	1648,0	13,4	14,7	2647	2675
Arcachon fond	C	31/10/01	70,5	410,6	1385,3	13,0	9,4	1866	1889
Arcachon fond	C	04/12/01	52,2	271,2	895,4	13,7	13,8	1219	1246
Arcachon fond	C	16/01/02	38,9	151,8	813,1	16,6	9,8	1004	1032
Arcachon fond	C	26/02/02	64,1	259,5	1328,6	17,9	14,8	1652	1685
La Vigne	D	26/03/01	13,4	12,4	103,2			129	129
La Vigne	D	26/04/01	9,7	11,6	78,3		3,0	103	106
La Vigne	D	23/05/01	1,6	17,1	117,4		11,9	136	148
La Vigne	D	20/06/01	16,7	28,4	145,0	1,2	9,5	190	201
La Vigne	D	23/07/01	6,2	38,1	108,4	1,6	9,8	153	164
La Vigne	D	20/08/01	5,2	44,5	231,7	2,1	5,6	281	289
La Vigne	D	03/10/01	7,3	39,2	157,7	2,3	4,7	204	211
La Vigne	D	31/10/01	5,1	21,5	63,1	1,2	2,6	90	93
La Vigne	D	04/12/01	11,9	16,2	61,6		5,5	90	95
La Vigne	D	16/01/02	<0,5	10,4	51,7			62	62
La Vigne	D	26/02/02	1,0	12	49,8			63	63

NI: non identifié: NI3: pic à 10,1 min

### Rapports TBT/DBT et TBT/(MBT+DBT) enregistrés dans les bivalves (3/4)

Site	Code	Date	TBT/DBT	TBT/(MBT+DBT)
Moulleau	A	20/02/01	2,4	0,96
Moulleau	A	26/03/01	4,63	1,30
Moulleau	A	26/04/01	3,88	3,15
Moulleau	A	23/05/01	2,30	1,25
Moulleau	A	20/06/01	3,13	2,75
Moulleau	A	23/07/01	2,54	1,87
Moulleau	A	20/08/01	1,92	1,59
Moulleau	A	03/10/01	1,62	1,31
Moulleau	A	31/10/01	2,12	1,79
Moulleau	A	04/12/01	2,15	1,82
Moulleau	A	16/01/02	2,23	2,23
Moulleau	A	26/02/02	1,41	1,25
Grand Banc	E	26/03/01	5,83	1,32
Grand Banc	E	26/04/01	4,76	3,94
Grand Banc	E	23/05/01		
Grand Banc	E	20/06/01	2,34	2,34
Grand Banc	E	23/07/01	2,57	1,90
Grand Banc	E	20/08/01	2,79	2,36
Grand Banc	E	03/10/01	2,54	1,80
Grand Banc	E	31/10/01	1,59	1,27
Grand Banc	E	04/12/01	2,73	2,21
Grand Banc	E	16/01/02	2,80	2,80
Grand Banc	E	26/02/02	2,71	2,71
Ferret	F	26/03/01	4,53	1,37
Ferret	F	26/04/01	4,48	3,90
Ferret	F	23/05/01	4,45	4,45
Ferret	F	20/06/01	4,73	3,80
Ferret	F	23/07/01	3,54	2,77
Ferret	F	20/08/01	2,66	2,18
Ferret	F	03/10/01	2,16	1,61
Ferret	F	31/10/01	2,36	2,02
Ferret	F	04/12/01	2,34	1,92
Ferret	F	16/01/02	2,45	2,45
Ferret	F	26/02/02	1,84	1,84
Arguin	G	26/03/01	4,17	3,22
Arguin	G	26/04/01	4,73	4,73
Arguin	G	23/05/01	3,89	0,48
Arguin	G	20/06/01	2,70	2,70
Arguin	G	23/07/01	2,62	1,73
Arguin	G	20/08/01	3,92	3,40
Arguin	G	03/10/01		
Arguin	G	31/10/01	2,13	1,94
Arguin	G	04/12/01	1,94	1,55
Arguin	G	16/01/02	2,55	2,55
Arguin	G	26/02/02	3,02	3,02
La Barbotière	H	04/12/01	2,96	2,63
La Barbotière	H	16/01/02	2,59	2,59
La Barbotière	H	26/02/02	3,03	2,46

NI: non identifié: \* NI2: pic à 7 min, \*\* NI1: pic à 9 min

**Rapports TBT/DBT et TBT/(MBT+DBT) enregistrés dans les bivalves (4/4)**

Site	Code	Date	TBT/DBT	TBT/(MBT+DBT)
Arcachon essence	B	26/03/01	6,06	4,44
Arcachon essence	B	26/04/01	6,53	5,82
Arcachon essence	B	23/05/01	4,66	3,93
Arcachon essence	B	20/06/01	2,09	1,79
Arcachon essence	B	23/07/01	2,57	2,17
Arcachon essence	B	20/08/01	2,88	2,59
Arcachon essence	B	03/10/01	2,28	2,00
Arcachon essence	B	31/10/01	3,48	3,03
Arcachon essence	B	04/12/01	6,07	4,97
Arcachon essence	B	16/01/02	8,03	6,15
Arcachon essence	B	26/02/02	7,91	6,67
Arcachon fond	C	26/03/01	4,45	3,57
Arcachon fond	C	26/04/01	5,21	4,63
Arcachon fond	C	23/05/01	4,19	3,53
Arcachon fond	C	20/06/01	2,15	1,86
Arcachon fond	C	23/07/01	2,36	2,02
Arcachon fond	C	20/08/01	2,22	1,99
Arcachon fond	C	03/10/01	1,86	1,65
Arcachon fond	C	31/10/01	3,37	2,88
Arcachon fond	C	04/12/01	3,30	2,77
Arcachon fond	C	16/01/02	5,36	4,26
Arcachon fond	C	26/02/02	5,12	4,11
La Vigne	D	26/03/01	8,35	4,00
La Vigne	D	26/04/01	6,78	3,69
La Vigne	D	23/05/01	6,85	6,27
La Vigne	D	20/06/01	5,10	3,21
La Vigne	D	23/07/01	2,84	2,45
La Vigne	D	20/08/01	5,21	4,66
La Vigne	D	03/10/01	4,02	3,39
La Vigne	D	31/10/01	2,93	2,37
La Vigne	D	04/12/01	3,80	2,19
La Vigne	D	16/01/02	4,97	4,97
La Vigne	D	26/02/02	4,15	3,84

**NI: non identifié: NI3: pic à 10,1 min**

**Concentrations en métaux ( $\mu\text{g.g}^{-1}$  p.s.) dans les bivalves (1/4)**

Site	Code	Date	B	Al	Mn	Fer	Co	Rb	Sr
Moulleau	A	20/02/01	54,1	347,3	10,5	596,4	1,4	6,5	31,7
Moulleau	A	26/03/01	52,9	339,3	10,6	585,9	1,0	7,1	29,3
Moulleau	A	26/04/01	54,2	360,0	10,2	516,8	0,8	6,5	26,9
Moulleau	A	23/05/01	41,9	307,2	8,3	478,4	0,8	5,1	17,4
Moulleau	A	20/06/01	63,8	213,0	8,5	384,9	0,7	5,4	21,3
Moulleau	A	23/07/01	30,4	127,0	5,8	320,5	0,6	4,5	18,4
Moulleau	A	20/08/01	40,3	137,0	11,0	361,0	0,3	6,5	27,5
Moulleau	A	03/10/01	37,5	93,3	7,8	284,0	0,2	5,9	28,7
Moulleau	A	31/10/01	48,3	222,0	13,9	570,0	0,6	7,0	48,8
Moulleau	A	04/12/01	42,1	216,0	12,2	511,0	0,3	7,1	29,3
Moulleau	A	16/01/02	54,0	204,0	15,5	580,0	1,4	9,6	41,0
Moulleau	A	26/02/02	51,6	911,0	16,9	634,0	1,4	9,5	47,8
Grand Banc	E	26/03/01	57,8	281,1	11,9	623,6	1,5	7,3	22,8
Grand Banc	E	26/04/01	40,4	1890,3	12,0	587,0	1,2	7,5	22,3
Grand Banc	E	23/05/01							
Grand Banc	E	20/06/01	43,2	325,0	10,0	536,0	0,9	5,7	22,3
Grand Banc	E	23/07/01	38,3	138,9	6,8	317,8	0,6	5,2	16,3
Grand Banc	E	20/08/01	37,0	110,0	16,1	325,0	0,4	6,6	33,2
Grand Banc	E	03/10/01	32,5	106,0	9,1	296,9	0,9	5,2	20,6
Grand Banc	E	31/10/01	38,2	76,3	15,9	305,0	0,4	7,0	28,4
Grand Banc	E	04/12/01	45,8	286,0	14,0	648,0	0,7	8,1	33,2
Grand Banc	E	16/01/02	39,9	172,0	15,0	500,0	1,3	11,2	35,3
Grand Banc	E	26/02/02	47,0	357,0	24,8	908,0	1,9	10,8	49,0
Ferret	F	26/03/01	65,6	261,3	9,4	361,9	1,0	8,6	22,5
Ferret	F	26/04/01	59,5	593,4	14,6	681,6	1,3	8,0	25,9
Ferret	F	23/05/01	41,2	322,7	9,3	492,5	1,2	6,5	21,3
Ferret	F	20/06/01	51,8	220,5	7,8	355,1	0,8	6,0	27,4
Ferret	F	23/07/01	46,6	303,9	8,0	415,0	0,7	5,9	18,0
Ferret	F	20/08/01	39,1	165,0	15,1	434,0	0,5	7,3	33,0
Ferret	F	03/10/01	37,4	835,8	10,9	513,0	0,5	6,5	27,1
Ferret	F	31/10/01	42,6	99,7	8,2	299,0	0,3	6,6	29,7
Ferret	F	04/12/01	45,7	272,0	15,7	611,0	0,6	8,1	36,7
Ferret	F	16/01/02	48,0	222,0	18,1	637,0	1,6	10,8	62,1
Ferret	F	26/02/02	42,6	322,0	22,7	851,0	1,8	10,7	47,8
Arguin	G	26/03/01	48,5	342,9	8,3	421,2	1,0	7,5	23,3
Arguin	G	26/04/01	44,2	189,1	8,1	315,1	0,9	6,2	22,0
Arguin	G	23/05/01	62,7	377,3	10,2	566,8	1,2	7,3	24,2
Arguin	G	20/06/01	53,6	293,7	12,1	457,6	0,8	6,3	24,6
Arguin	G	23/07/01							
Arguin	G	20/08/01	35,1	858,0	16,1	445,0	0,5	7,9	28,5
Arguin	G	03/10/01							
Arguin	G	31/10/01	36,0	177,3	10,5	472,0	0,3	6,2	42,6
Arguin	G	04/12/01	39,0	236,0	13,8	533,0	0,3	8,0	30,6
Arguin	G	16/01/02	41,3	45,3	8,7	377,0	1,2	9,4	33,2
Arguin	G	26/02/02	46,9	1019,0	23,1	1057,0	1,6	11,9	50,0
La Barbotière	H	04/12/01	47,1	330,0	17,1	1024,0	1,7	nd	nd
La Barbotière	H	16/01/02	37,4	267,0	10,9	691,0	1,0	nd	nd
La Barbotière	H	26/02/02	43,1	700,0	19,3	1025,0	1,6	nd	nd

nd = non déterminé

### Concentrations en métaux ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ p.s.) dans les bivalves (2/4)

Site	Code	Date	Cr	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd	Pb
Moulleau	A	20/02/01	2,0	1,8	5,8	271,2	14,7	4,2	0,8	2,0
Moulleau	A	26/03/01	2,0	2,0	5,9	196,4	15,2	3,6	0,4	1,8
Moulleau	A	26/04/01	1,6	1,4	4,4	164,0	10,4	2,8	0,3	1,6
Moulleau	A	23/05/01	1,4	1,3	4,6	125,8	8,8	2,4	0,3	1,2
Moulleau	A	20/06/01	1,3	1,1	4,8	182,4	9,3	2,7	0,5	1,1
Moulleau	A	23/07/01	0,9	0,6	4,3	114,6	7,5	2,2	0,3	0,9
Moulleau	A	20/08/01	1,5	<0,1	5,5	215,0	13,9	13,2	1,0	0,9
Moulleau	A	03/10/01	1,5	<0,1	5,3	197,0	12,9	13,3	1,0	0,6
Moulleau	A	31/10/01	2,4	0,5	7,0	309,0	15,1	13,0	1,3	1,2
Moulleau	A	04/12/01	1,6	0,1	6,2	200,0	15,3	13,8	1,0	0,9
Moulleau	A	16/01/02	2,8	2,2	9,9	210,0	22,3	17,5	1,4	2,6
Moulleau	A	26/02/02	2,5	2,6	8,6	257,0	19,4	17,8	1,3	2,4
Grand Banc	E	26/03/01	1,7	2,5	6,3	206,1	15,2	3,7	0,6	1,9
Grand Banc	E	26/04/01	1,6	1,8	5,2	175,7	13,2	3,3	0,4	1,8
Grand Banc	E	23/05/01								
Grand Banc	E	20/06/01	1,5	1,4	5,2	217,1	9,9	2,7	0,6	1,5
Grand Banc	E	23/07/01	1,0	0,7	5,1	91,9	8,1	2,6	0,3	0,8
Grand Banc	E	20/08/01	0,7	0,1	6,3	197,0	12,3	12,7	0,9	1,2
Grand Banc	E	03/10/01	2,3	1,1	6,0	157,0	10,6	26,2	0,7	1,5
Grand Banc	E	31/10/01	1,4	<0,1	23,8	288,0	13,1	13,7	1,2	1,1
Grand Banc	E	04/12/01	2,0	0,7	6,8	217,0	17,7	15,5	1,2	1,2
Grand Banc	E	16/01/02	2,4	2,4	8,6	284,0	22,8	20,3	1,2	2,2
Grand Banc	E	26/02/02	2,3	2,6	10,5	273,0	28,2	21,7	1,4	2,8
Ferret	F	26/03/01	1,3	1,8	6,2	84,3	15,6	4,2	0,4	1,3
Ferret	F	26/04/01	2,0	2,1	6,7	95,1	13,9	4,0	0,5	1,7
Ferret	F	23/05/01	0,7	1,9	5,9	115,6	11,5	3,5	0,4	1,1
Ferret	F	20/06/01	0,4	1,2	6,1	82,8	9,2	3,5	0,4	1,2
Ferret	F	23/07/01	0,4	1,3	6,3	88,6	9,3	3,4	0,3	1,4
Ferret	F	20/08/01	2,8	0,7	6,5	225,0	13,8	17,0	1,1	1,1
Ferret	F	03/10/01	1,3	0,6	7,2	213,0	13,6	13,0	1,1	1,1
Ferret	F	31/10/01	1,6	0,2	6,4	202,0	14,5	14,5	1,1	0,9
Ferret	F	04/12/01	2,1	0,8	6,9	277,0	17,2	15,5	1,4	1,6
Ferret	F	16/01/02	2,2	2,7	11,2	244,0	23,7	22,4	1,5	2,3
Ferret	F	26/02/02	2,9	2,4	10,6	249,0	23,7	22,9	1,3	2,3
Arguin	G	26/03/01	1,4	2,5	5,9	183,7	13,8	3,5	0,5	1,9
Arguin	G	26/04/01	0,3	1,8	5,6	78,7	13,2	3,3	0,3	1,0
Arguin	G	23/05/01	0,9	1,5	5,9	87,9	9,6	3,9	0,9	1,5
Arguin	G	20/06/01	0,4	1,0	6,2	70,5	9,3	3,5	0,4	1,2
Arguin	G	23/07/01								
Arguin	G	20/08/01	1,5	0,1	7,0	190,0	15,2	16,0	1,0	1,2
Arguin	G	03/10/01								
Arguin	G	31/10/01	1,4	0,1	5,5	170,0	14,2	12,9	0,9	1,0
Arguin	G	04/12/01	1,6	0,7	5,9	146,0	16,9	14,2	0,9	1,3
Arguin	G	16/01/02	1,5	1,6	8,0	257,0	22,7	20,3	1,3	1,3
Arguin	G	26/02/02	2,3	2,5	9,4	235,0	25,2	25,2	1,4	2,8
La Barbotière	H	04/12/01	2,9	2,5	10,8	341,0	20,1	18,0	1,9	2,5
La Barbotière	H	16/01/02	1,8	1,4	8,1	233,0	17,0	13,5	1,3	1,7
La Barbotière	H	26/02/02	2,2	2,1	10,7	230,0	22,6	22,5	1,8	2,3

**Concentrations en métaux ( $\mu\text{g.g}^{-1}$  p.s.) dans les bivalves (3/4)**

Site	Code	Date	B	Al	Mn	Fer	Co	Rb	Sr
Arcachon essence	B	26/03/01	40,8	449,5	13,6	914,9	1,3	6,7	25,3
Arcachon essence	B	26/04/01	59,2	488,0	15,3	848,3	1,0	6,6	22,1
Arcachon essence	B	23/05/01	54,5	130,3	8,6	343,1	0,6	4,5	17,1
Arcachon essence	B	20/06/01	42,3	95,7	9,1	261,5	0,6	4,5	19,4
Arcachon essence	B	23/07/01							
Arcachon essence	B	20/08/01	42,1	114,0	9,0	302,0	0,2	6,3	31,3
Arcachon essence	B	03/10/01	39,2	90,1	9,4	325,0	0,6	6,2	31,2
Arcachon essence	B	31/10/01	39,4	53,2	7,1	322,0	0,2	5,9	27,9
Arcachon essence	B	04/12/01	42,1	144,0	11,9	422,0	0,5	7,2	31,4
Arcachon essence	B	16/01/02	43,9	202,0	14,7	657,0	1,1	10,0	36,9
Arcachon essence	B	26/02/02	40,9	688,0	10,8	401,0	1,2	8,2	33,5
Arcachon fond	C	26/03/01	52,9	475,9	12,5	832,9	1,5	7,6	34,7
Arcachon fond	C	26/04/01	60,4	529,3	16,5	759,6	1,5	7,1	32,3
Arcachon fond	C	23/05/01	44,1	212,0	11,1	387,5	0,8	5,7	17,5
Arcachon fond	C	20/06/01	44,7	83,5	5,8	212,8	0,5	4,9	16,7
Arcachon fond	C	23/07/01							
Arcachon fond	C	20/08/01	41,4	144,0	29,7	506,0	0,5	7,4	32,0
Arcachon fond	C	03/10/01	38,6	73,1	9,0	349,0	0,1	6,5	28,6
Arcachon fond	C	31/10/01	37,5	99,4	9,7	438,0	<0,1	6,1	32,6
Arcachon fond	C	04/12/01	40,7	221,0	13,4	669,0	0,3	7,2	28,9
Arcachon fond	C	16/01/02	43,6	145,0	10,4	597,0	1,1	10,5	35,0
Arcachon fond	C	26/02/02	41,7	388,0	13,7	443,0	1,1	8,7	36,7
La Vigne	D	26/03/01	79,3	614,1	16,2	958,1	1,7	9,3	33,6
La Vigne	D	26/04/01	61,4	856,1	19,4	1114,8	1,5	9,3	26,0
La Vigne	D	23/05/01	47,3	386,1	12,3	521,2	1,0	6,3	21,3
La Vigne	D	20/06/01	47,6	396,5	10,0	508,9	0,7	5,6	18,7
La Vigne	D	23/07/01	49,7	449,9	14,6	679,5	0,9	6,5	25,7
La Vigne	D	20/08/01							
La Vigne	D	03/10/01	41,4	77,3	10,8	354,0	0,2	6,5	29,6
La Vigne	D	31/10/01	40,7	102,3	11,3	383,0	0,6	6,8	32,3
La Vigne	D	04/12/01	41,4	184,0	13,0	459,0	0,3	7,6	31,6
La Vigne	D	16/01/02	48,8	202,0	14,1	672,0	1,4	10,9	37,5
La Vigne	D	26/02/02	41,7	431,0	15,2	576,0	1,3	8,6	41,7

**Concentrations en métaux ( $\mu\text{g.g}^{-1}$  p.s.) dans les bivalves (4/4)**

Site	Code	Date	Cr	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd	Pb
Arcachon essence	B	26/03/01	2,2	2,0	12,9	277,5	16,2	3,9	0,7	2,6
Arcachon essence	B	26/04/01	2,0	1,4	10,2	218,5	12,4	3,0	0,6	2,7
Arcachon essence	B	23/05/01	1,2	0,8	12,4	193,5	10,4	2,6	0,5	1,2
Arcachon essence	B	20/06/01	1,2	0,9	12,4	249,8	10,5	2,7	0,5	1,1
Arcachon essence	B	23/07/01								
Arcachon essence	B	20/08/01	1,7	0,5	6,8	169,0	14,2	15,4	0,9	1,4
Arcachon essence	B	03/10/01	1,9	<0,1	22,8	340,0	15,1	13,8	1,3	2,0
Arcachon essence	B	31/10/01	1,6	<0,1	16,0	149,0	13,9	11,4	1,0	1,0
Arcachon essence	B	04/12/01	1,8	0,2	47,3	260,0	15,1	12,9	1,1	1,2
Arcachon essence	B	16/01/02	2,1	2,8	27,1	325,0	20,3	21,9	1,5	2,4
Arcachon essence	B	26/02/02	1,2	1,4	22,0	172,0	20,2	14,5	1,2	1,6
Arcachon fond	C	26/03/01	2,2	2,1	12,6	288,7	14,9	4,5	0,8	2,0
Arcachon fond	C	26/04/01	1,9	1,4	11,9	210,5	14,9	4,2	0,8	1,8
Arcachon fond	C	23/05/01	1,3	0,8	11,2	116,0	10,8	3,5	0,5	1,3
Arcachon fond	C	20/06/01	0,1	0,6	9,2	95,2	9,1	2,9	0,4	0,9
Arcachon fond	C	23/07/01								
Arcachon fond	C	20/08/01	1,1	<0,1	25,3	334,0	16,7	14,5	1,4	2,2
Arcachon fond	C	03/10/01	1,4	<0,1	26,3	221,0	13,8	15,2	1,1	0,7
Arcachon fond	C	31/10/01	1,3	<0,1	15,2	240,0	13,9	19,2	1,2	0,4
Arcachon fond	C	04/12/01	1,9	<0,1	25,1	176,0	15,1	12,4	1,0	1,9
Arcachon fond	C	16/01/02	2,1	1,3	16,5	306,0	21,4	21,5	1,5	1,9
Arcachon fond	C	26/02/02	1,3	1,4	14,5	314,0	24,4	17,8	1,2	1,6
La Vigne	D	26/03/01	2,7	2,9	11,4	172,3	16,7	5,0	0,7	1,9
La Vigne	D	26/04/01	2,6	2,2	10,6	121,1	13,3	4,2	0,5	2,3
La Vigne	D	23/05/01	1,0	1,4	11,7	82,6	11,0	3,8	0,4	1,3
La Vigne	D	20/06/01	0,6	1,1	11,2	62,4	8,7	3,3	0,3	1,4
La Vigne	D	23/07/01	0,8	1,3	17,5	217,6	11,4	3,5	0,5	1,8
La Vigne	D	20/08/01								
La Vigne	D	03/10/01	1,9	<0,1	41,5	226,0	15,4	17,6	1,0	1,4
La Vigne	D	31/10/01	1,9	0,3	41,8	330,0	16,0	14,8	1,4	1,1
La Vigne	D	04/12/01	1,6	0,2	36,0	197,0	16,6	12,2	1,0	1,5
La Vigne	D	16/01/02	3,7	2,8	24,3	244,0	21,3	18,9	1,3	1,8
La Vigne	D	26/02/02	1,8	1,5	21,2	356,0	19,8	17,3	1,4	2,0

### Concentrations en HAP (ng.g<sup>-1</sup> p.s.) dans les bivalves (1/2).

Site	Code	Date	N	Ay	Ae	Fe	DBT	Phe	A	3MP	2MP	9MP	1MP	F	Pyr
Arcachon ess.	B	26/03/01	9,8	3,7	2,6	10,1	3,8	27,5	5,7	37,3	61,7	68,6	52,6	63,2	112,0
Arcachon ess.	B	26/04/01	10,6	0,9	0,4	1,4	1,2	10,3	3,7	3,9	5,1	8,0	5,0	29,6	65,4
Arcachon ess.	B	23/05/01	<10	5,0	0,1	13,0	2,1	12,9	3,0	38,8	59,9	71,6	37,6	60,7	98,6
Arcachon ess.	B	20/06/01	9,8	3,9	3,6	10,0	3,1	14,9	10,4	30,7	44,9	62,4	43,2	76,7	147,2
Arcachon ess.	B	23/07/01													
Arcachon ess.	B	20/08/01	9,4	4,1	2,2	4,4	4,5	25,4	13,6	59,6	104,6	110,0	44,8	118,1	262,5
Arcachon fond	C	26/03/01	5,5	1,0	<1	1,0	11,6	135,1	11,6	339,7	370,1	363,9	320,0	193,2	296,5
Arcachon fond	C	26/04/01	3,7	0,9	0,6	1,2	1,0	28,5	4,7	9,0	13,3	20,5	11,6	40,7	104,9
Arcachon fond	C	23/05/01	<10	1,9	<1	13,2	8,1	133,3	<5	475,0	615,6	716,6	471,7	128,1	331,5
Arcachon fond	C	20/06/01	6,4	6,2	4,5	25,8	13,8	189,3	49,2	539,7	704,9	747,9	562,5	235,9	508,1
Arcachon fond	C	23/07/01													
Arcachon fond	C	20/08/01	4,6	2,2	5,1	15,8	14,5	116,3	20,8	243,3	376,7	314,7	226,3	205,8	397,2
La Vigne	D	26/03/01	6,6	2,3	0,9	2,6	1,1	19,7	5,3	30,7	31,4	29,2	18,9	72,6	98,9
La Vigne	D	26/04/01	7,5	1,7	0,7	1,7	1,6	7,7	3,6	10,8	14,8	30,3	20,0	37,3	70,3
La Vigne	D	23/05/01	<10	6,9	6,0	9,7	2,3	22,5	25,0	35,5	43,4	43,4	23,7	91,2	103,0
La Vigne	D	20/06/01	15,0	14,8	4,3	9,7	3,4	37,0	20,1	37,1	40,0	34,2	21,2	152,5	154,5
La Vigne	D	23/07/01	9,1	5,4	0,9	5,8	3,4	42,7	20,9	47,3	62,3	61,6	20,8	129,5	181,0
La Vigne	D	20/08/01	8,4	3,6	2,6	3,8	2,7	20,1	17,6	24,1	34,7	32,6	15,6	79,7	139,4
Moulleau	A	20/02/01	5,1	1,8	4,0	5,1	0,8	10,2	1,5	4,4	5,2	8,1	4,0	41,6	33,7
Moulleau	A	26/03/01	7,3	2,1	2,4	9,3	1,6	10,7	1,6	4,5	5,4	4,3	3,2	30,5	22,2
Moulleau	A	26/04/01	10,6	0,5	0,5	1,1	1,2	3,7	0,3	2,1	2,1	1,5	1,1	7,6	14,6
Moulleau	A	23/05/01	9,9	3,1	2,4	1,9	1,2	7,5	1,9	6,0	8,1	7,2	5,7	15,2	21,0
Moulleau	A	20/06/01	<10	2,9	3,2	3,3	1,2	9,4	2,3	4,5	4,7	4,7	5,6	27,0	19,7
Moulleau	A	23/07/01	10,8	1,6	1,7	2,3	3,5	8,4	3,3	12,1	14,6	16,1	10,6	25,1	21,0
Moulleau	A	20/08/01	2,7	1,4	1,7	1,9	1,7	6,0	2,3	3,5	4,8	4,6	3,7	13,7	17,4
Grand Banc	E	26/03/01	8,0	1,5	0,9	2,2	2,6	8,5	1,4	5,11	4,91	7,73	4,16	24,02	25,5
Grand Banc	E	26/04/01	5,4	0,7	0,6	0,7	1,9	3,0	0,5	2,7	3,3	4,0	2,7	13,3	32,9
Grand Banc	E	23/05/01													
Grand Banc	E	20/06/01	5,9	3,3	2,3	4,7	4,0	5,8	1,8	2,5	3,5	5,1	5,0	25,1	16,2
Grand Banc	E	23/07/01	5,7	2,6	0,3	2,6	3,5	8,4	3,1	2,96	3,71	6,14	3,94	26,7	35,7
Grand Banc	E	20/08/01	5,2	1,6	2,4	2,0	1,9	7,9	2,2	3,3	4,5	5,5	2,2	17,3	26,5
Ferret	F	26/03/01	4,0	1,3	2,0	3,6	1,1	12,5	1,0	7,0	8,4	12,7	7,3	29,9	24,4
Ferret	F	26/04/01	5,8	1,8	4,0	6,3	0,5	9,2	1,2	2,0	3,6	3,5	2,9	18,0	11,5
Ferret	F	23/05/01	1,3	0,8	0,8	1,7	1,4	8,3	1,4	4,6	6,6	6,3	4,2	22,9	17,8
Ferret	F	20/06/01	8,0	6,8	2,1	6,8	2,4	7,1	2,5	6,0	6,6	9,8	7,4	23,0	17,4
Ferret	F	23/07/01	9,3	1,5	1,5	4,8	3,0	7,6	3,3	3,1	3,9	4,8	3,1	18,5	14,0
Ferret	F	20/08/01	5,4	2,4	1,3	2,5	0,8	10,2	4,3	5,6	8,0	6,6	4,6	25,8	32,2
Arguin	G	26/03/01	5,5	0,8	<1	1,4	3,9	6,3	0,8	1,1	2,4	3,7	1,6	10,4	4,9
Arguin	G	26/04/01	4,1	0,3	0,4	0,7	1,2	4,0	0,3	2,0	2,0	1,8	1,3	8,4	4,1
Arguin	G	23/05/01	<10	3,9	2,7	4,5	2,6	10,4	1,9	6,3	6,6	7,8	2,7	19,1	16,8
Arguin	G	20/06/01	7,2	4,6	0,6	3,7	0,6	7,0	4,4	3,6	3,0	2,8	2,0	14,9	15,0
Arguin	G	23/07/01	8,9	2,1	1,8	2,9	2,4	6,5	4,4	2,4	3,6	3,2	2,0	11,2	13,5
Arguin	G	20/08/01	2,9	5,1	1,4	2,4	0,8	7,4	3,5	3,6	4,9	6,0	3,7	13,5	20,9

## Concentrations en HAP (ng.g<sup>-1</sup> p.s.) dans les bivalves (2/2).

Site	Code	Date	BaA	Chrys	BbkjF	BeP	BaP	lpyr	DahA	Bper	S EPA	Sautres
Arcachon ess.	B	26/03/01	43,8	133,1	81,3	67,3	39,2	39,3	7,2	42,2	621	291
Arcachon ess.	B	26/04/01	44,2	115,8	140,1	65,5	29,3	24,7	4,5	26,1	507	89
Arcachon ess.	B	23/05/01	27,9	121,0	37,8	45,2	18,2	11,0	2,0	20,2	432	255
Arcachon ess.	B	20/06/01	33,0	131,0	49,3	56,1	19,2	11,3	2,8	18,2	541	240
Arcachon ess.	B	23/07/01										
Arcachon ess.	B	20/08/01	51,5	149,9	75,1	80,3	36,1	16,9	2,1	39,5	811	404
Arcachon fond	C	26/03/01	82,9	316,2	317,5	117,7	59,0	64,1	12,7	56,0	1552	1523
Arcachon fond	C	26/04/01	80,6	321,8	258,3	112,7	40,4	33,1	6,3	55,7	981	168
Arcachon fond	C	23/05/01	39,9	397,4	91,7	87,3	22,7	31,8	7,0	42,4	1241	2374
Arcachon fond	C	20/06/01	86,9	550,9	133,4	129,1	54,3	26,1	7,5	39,1	1923	2698
Arcachon fond	C	23/07/01										
Arcachon fond	C	20/08/01	84,1	366,0	166,8	154,6	64,8	48,2	11,1	64,9	1574	1330
La Vigne	D	26/03/01	25,6	55,9	66,8	34,2	15,2	17,9	2,3	30,3	423	146
La Vigne	D	26/04/01	21,2	52,2	61,5	33,2	14,5	16,1	1,6	23,7	321	111
La Vigne	D	23/05/01	32,4	60,0	73,0	47,1	29,4	22,3	4,0	47,5	533	195
La Vigne	D	20/06/01	53,0	105,4	72,8	74,9	37,8	24,9	4,8	38,8	745	211
La Vigne	D	23/07/01	45,5	101,3	54,7	58,6	36,0	23,2	3,9	54,5	714	254
La Vigne	D	20/08/01	49,8	101,1	62,4	81,9	34,8	22,4	4,4	64,8	615	192
Moulleau	A	20/02/01	21,1	50,5	37,9	37,1	16,1	10,9	3,5	15,2	258	60
Moulleau	A	26/03/01	4,7	14,3	7,3	8,7	3,8	2,9	0,7	4,8	125	28
Moulleau	A	26/04/01	1,6	5,8	4,6	2,1	2,0	1,4	0,4	2,0	57	10
Moulleau	A	23/05/01	3,0	7,1	6,1	7,4	5,7	3,2	0,4	2,9	91	35
Moulleau	A	20/06/01	9,2	14,9	11,2	11,4	8,3	3,3	0,5	3,7	119	32
Moulleau	A	23/07/01	8,2	14,0	10,3	10,7	5,4	5,1	1,0	8,9	127	68
Moulleau	A	20/08/01	6,2	11,5	9,8	12,6	5,7	4,8	1,3	6,1	93	31
Grand Banc	E	26/03/01	5,5	12,7	20,5	10,9	2,6	5,0	2,6	7,4	128	35
Grand Banc	E	26/04/01	3,8	10,6	11,9	8,6	4,9	3,7	0,7	4,3	97	23
Grand Banc	E	23/05/01										
Grand Banc	E	20/06/01	6,3	11,4	11,8	7,6	2,4	2,6	0,7	3,0	103	28
Grand Banc	E	23/07/01	10,3	16,6	14,8	14,7	7,3	9,4	1,7	10,1	155	35
Grand Banc	E	20/08/01	8,2	12,7	13,1	13,1	6,1	5,3	1,5	6,7	119	30
Ferret	F	26/03/01	3,9	12,8	8,4	11,4	3,9	5,1	1,6	6,7	121	48
Ferret	F	26/04/01	3,2	13,3	6,8	9,4	2,9	2,8	0,6	4,0	91	22
Ferret	F	23/05/01	3,7	10,7	6,7	7,9	5,0	4,1	0,6	4,0	90	31
Ferret	F	20/06/01	3,7	9,8	8,7	8,1	6,2	3,7	0,8	2,7	109	40
Ferret	F	23/07/01	6,1	12,5	8,3	11,8	5,3	10,1	1,5	5,2	110	30
Ferret	F	20/08/01	10,3	20,1	15,8	17,3	7,6	5,8	1,4	9,5	154	43
Arguin	G	26/03/01	1,8	6,0	4,0	3,6	0,4	2,2	0,3	1,9	47	16
Arguin	G	26/04/01	1,4	4,8	4,4	3,2	1,9	0,9	0,1	1,2	37	11
Arguin	G	23/05/01	3,7	12,6	2,9	3,1	1,9	0,6	0,2	1,6	83	29
Arguin	G	20/06/01	3,2	8,0	7,6	6,7	3,3	5,1	0,3	4,3	89	19
Arguin	G	23/07/01	3,9	6,9	6,1	6,8	2,4	8,1	0,8	4,7	84	20
Arguin	G	20/08/01	5,5	11,3	12,9	i	4,7	5,9	1,4	9,7	109	19

i: interférent

### Concentrations en PCB (ng.g<sup>-1</sup> p.s.) dans les bivalves.

Site	Code	Date	PCB 28	PCB 52	PCB 118	PCB 153	PCB 138	PCB 180	Σ PCB
Arcachon ess.	B	26/03/01	0,9	1,8	6,6	8,8	7,3	1,3	26,7
Arcachon ess.	B	26/04/01	0,8	6,7	5,2	13,0	8,4	1,2	35,2
Arcachon ess.	B	23/05/01	0,6	3,2	10,0	9,8	20,9	2,6	47,1
Arcachon ess.	B	20/06/01	0,4	0,5	9,2	13,9	9,6	1,0	34,7
Arcachon ess.	B	23/07/01							
Arcachon ess.	B	20/08/01	0,7	5,1	14,0	15,1	7,5	1,5	43,9
Arcachon fond	C	26/03/01	1,0	8,4	8,0	8,8	9,4	1,3	36,8
Arcachon fond	C	26/04/01	0,1	8,0	9,4	8,5	9,3	0,3	35,6
Arcachon fond	C	23/05/01	0,5	4,4	3,8	8,6	6,7	0,9	24,9
Arcachon fond	C	20/06/01	0,5	2,2	9,6	8,9	9,0	0,9	31,1
Arcachon fond	C	23/07/01							
Arcachon fond	C	20/08/01	0,9	6,2	16,0	13,8	8,6	1,4	46,8
La Vigne	D	26/03/01	0,7	5,0	10,4	4,4	12,2	1,8	34,6
La Vigne	D	26/04/01	0,9	6,2	12,9	11,3	8,4	1,3	40,9
La Vigne	D	23/05/01	0,6	4,3	6,5	8,8	3,7	0,6	24,5
La Vigne	D	20/06/01	0,7	1,6	5,9	13,2	5,4	1,0	27,8
La Vigne	D	23/07/01	0,2	3,1	7,4	14,9	5,9	0,8	32,3
La Vigne	D	20/08/01	0,5	4,2	22,0	14,7	11,2	1,4	53,9
Moulleau	A	20/02/01	0,1	4,1	13,7	14,4	13,6	2,1	48,1
Moulleau	A	26/03/01	0,9	3,3	7,3	14,1	11,1	2,4	39,0
Moulleau	A	26/04/01	0,5	1,2	8,7	9,4	21,3	3,2	44,3
Moulleau	A	23/05/01	0,7	6,0	8,5	15,4	12,6	1,4	44,6
Moulleau	A	20/06/01	0,7	1,6	4,3	11,6	6,7	0,5	25,5
Moulleau	A	23/07/01	0,2	1,3	4,8	14,5	9,8	0,8	31,3
Moulleau	A	20/08/01	0,7	2,3	6,6	16,0	10,4	1,0	37,0
Grand Banc	E	26/03/01	0,2	5,0	6,1	8,9	7,7	1,2	29
Grand Banc	E	26/04/01	0,8	7,1	9,2	11,7	8,9	1,1	39
Grand Banc	E	23/05/01							
Grand Banc	E	20/06/01	0,8	2,9	6,7	14,3	10,2	1,1	36
Grand Banc	E	23/07/01	0,5	3,2	5,4	16,6	9,1	1,2	36
Grand Banc	E	20/08/01	0,2	3,8	7,1	13,0	5,3	0,6	30
Ferret	F	26/03/01	0,3	8,9	4,0	4,5	3,6	0,5	22
Ferret	F	26/04/01	1,0	7,7	11,7	11,9	9,7	1,2	43
Ferret	F	23/05/01	0,6	3,7	3,3	5,1	4,3	0,5	17
Ferret	F	20/06/01	0,7	2,5	5,0	17,1	7,4	0,9	34
Ferret	F	23/07/01	0,2	2,7	6,1	16,5	8,9	0,9	35
Ferret	F	20/08/01	0,5	2,8	8,4	14,8	9,9	1,1	38
Arguin	G	26/03/01	0,8	5,2	5,8	3,0	8,1	1,7	25
Arguin	G	26/04/01	1,1	2,4	2,2	11,3	4,6	1,3	23
Arguin	G	23/05/01	0,5	2,1	3,9	2,1	3,2	0,2	12
Arguin	G	20/06/01	0,6	1,9	5,3	15,0	6,5	0,9	30
Arguin	G	23/07/01	0,3	2,9	5,4	17,8	10,6	1,2	38
Arguin	G	20/08/01	0,3	4,8	12,5	22,0	12,2	1,1	53

### Paramètres physiologiques des bivalves (1/2)

Site	Code	Date	Indices de condition		Facteur de condition IC <sub>n</sub> /IC(A) <sub>n-1</sub>	Taux de lipides (%)	Poids sec individuel (g)
			(IC 1)	(IC 2)			
Moulleau	A	20/02/01	0,313	0,284		5,0	nd
Moulleau	A	26/03/01	0,431	0,415	1,378	6,6	0,25
Moulleau	A	26/04/01	0,399	0,370	0,925	7,5	0,32
Moulleau	A	23/05/01	0,438	0,397	1,098	4,6	0,34
Moulleau	A	20/06/01	0,449	0,430	1,025	5,0	0,38
Moulleau	A	23/07/01	0,388	0,377	0,865	4,5	
Moulleau	A	20/08/01	0,351	0,354	0,905	3,4	0,37
Moulleau	A	03/10/01	0,351	0,397	1,082	7,0	0,35
Moulleau	A	31/10/01	0,339	0,410	0,803	6,2	0,49
Moulleau	A	04/12/01	0,368	0,382	0,821	6,5	0,31
Moulleau	A	16/01/02	0,372	0,385	0,798	6,8	0,33
Moulleau	A	26/02/02	0,410	0,464	0,826	5,9	0,33
Grand Banc	E	26/03/01	0,401	0,357	1,280	6,8	0,24
Grand Banc	E	26/04/01	0,340	0,341	0,788	6,2	0,28
Grand Banc	E	23/05/01					
Grand Banc	E	20/06/01	0,424	0,463	0,968	5,5	0,39
Grand Banc	E	23/07/01	0,383	0,427	0,853	5,4	nd
Grand Banc	E	20/08/01	0,406	0,379	1,046	4,3	0,39
Grand Banc	E	03/10/01	0,416	0,543	1,186	5,6	0,32
Grand Banc	E	31/10/01	0,383	0,413	1,090	5,7	0,43
Grand Banc	E	04/12/01	0,348	0,383	1,023	6,2	0,30
Grand Banc	E	16/01/02	0,392	0,407	1,066	6,9	0,38
Grand Banc	E	26/02/02	0,397	0,503	1,141	7,0	0,43
Ferret	F	26/03/01	0,339	0,360	1,084	7,8	0,29
Ferret	F	26/04/01	0,402	0,427	0,933	6,6	0,36
Ferret	F	23/05/01	0,507	0,402	1,271	5,8	0,39
Ferret	F	20/06/01	0,464	0,455	1,059	6,7	0,40
Ferret	F	23/07/01	0,403	0,415	0,899	1,3	nd
Ferret	F	20/08/01	0,387	0,379	0,997	3,6	0,34
Ferret	F	03/10/01	0,398	0,445	1,133	6,9	0,45
Ferret	F	31/10/01	0,374	0,429	1,066	6,4	0,42
Ferret	F	04/12/01	0,352	0,358	1,036	7,0	0,43
Ferret	F	16/01/02	0,348	0,379	0,945	6,6	0,38
Ferret	F	26/02/02	0,406	0,495	1,165	7,1	0,41
Arguin	G	26/03/01			1,287	9,4	0,48
Arguin	G	26/04/01	0,479	0,490	1,112	9,1	0,51
Arguin	G	23/05/01	0,492	0,513	1,234	8,5	0,50
Arguin	G	20/06/01	0,454	0,483	1,036	5,0	0,42
Arguin	G	23/07/01	0,355	0,373	0,790	4,2	nd
Arguin	G	20/08/01	0,289	0,312	0,745	5,7	0,34
Arguin	G	03/10/01					
Arguin	G	31/10/01	0,530	0,452	1,510	5,0	0,32
Arguin	G	04/12/01	0,462	0,529	1,359	6,9	0,48
Arguin	G	16/01/02	0,408	0,440	1,108	6,5	0,36
Arguin	G	26/02/02	0,454	0,444	1,299	6,6	0,38
La Barbotière	H	04/12/01	0,315	0,389	0,927	6,6	0,34
La Barbotière	H	16/01/02	0,392	0,390	1,066	5,1	0,36
La Barbotière	H	26/02/02	0,371	0,429	1,066	9,2	0,38

nd = non déterminé

### Paramètres physiologiques des bivalves (2/2)

Site	Code	Date	Indices de condition		Facteur de condition $IC_n/IC(A)_{n-1}$	Taux de lipides (%)	Poids sec individuel (g)
			(IC 1)	(IC 2)			
Arcachon essence	B	26/03/01	0,339	0,296	0,936	6,9	0,18
Arcachon essence	B	26/04/01	0,346	0,339	0,902	6,6	0,24
Arcachon essence	B	23/05/01	0,328	0,326	0,622	3,0	0,24
Arcachon essence	B	20/06/01	0,350	0,338	0,832	3,6	0,27
Arcachon essence	B	23/07/01	0,371	0,372	0,880	nd	nd
Arcachon essence	B	20/08/01	0,363	0,407	1,249	3,1	0,42
Arcachon essence	B	03/10/01	0,287	0,300	0,977	5,9	0,24
Arcachon essence	B	31/10/01	0,384	0,349	1,080	7,0	0,32
Arcachon essence	B	04/12/01	0,306	0,352	0,800	6,8	0,32
Arcachon essence	B	16/01/02	0,370	0,386	0,931	6,0	0,30
Arcachon essence	B	26/02/02	0,395	0,428	0,915	7,2	0,35
Arcachon fond	C	26/03/01	0,282	0,269	0,824	5,8	0,16
Arcachon fond	C	26/04/01	0,268	0,270	0,963	5,8	0,19
Arcachon fond	C	23/05/01	0,330	0,304	0,995	3,4	0,24
Arcachon fond	C	20/06/01	0,385	0,334	1,280	3,3	0,28
Arcachon fond	C	23/07/01	0,561	0,401	0,788	6,8	nd
Arcachon fond	C	20/08/01	0,379	0,373	0,968	5,0	0,34
Arcachon fond	C	03/10/01	0,280	0,307	0,853	5,8	0,26
Arcachon fond	C	31/10/01	nd	nd	1,046	nd	0,30
Arcachon fond	C	04/12/01	0,343	0,401	1,084	6,6	0,54
Arcachon fond	C	16/01/02	0,352	0,399	0,933	7,0	0,47
Arcachon fond	C	26/02/02	0,359	0,386	1,271	8,0	0,40
La Vigne	D	26/03/01	0,338	0,321	1,080	6,8	0,20
La Vigne	D	26/04/01	0,345	0,358	0,800	4,9	0,25
La Vigne	D	23/05/01	0,371	0,355	0,931	3,9	0,30
La Vigne	D	20/06/01	0,401	0,393	0,915	4,7	0,34
La Vigne	D	23/07/01	0,370	0,402	0,824	5,6	nd
La Vigne	D	20/08/01	0,374	0,392	0,963	3,0	0,33
La Vigne	D	03/10/01	0,349	0,378	0,995	5,9	0,32
La Vigne	D	31/10/01	0,337	0,381	0,961	6,2	0,37
La Vigne	D	04/12/01	0,341	0,353	1,004	5,5	0,34
La Vigne	D	16/01/02	0,418	0,391	1,136	5,6	0,32
La Vigne	D	26/02/02	0,403	0,459	1,158	6,8	0,35

nd = non déterminé

### Niveaux des biomarqueurs dans les bivalves

Site	Code	Date	ACHe (nmol/mn/mg P)	GST (nmol/mn/mg P)	CAT ( $\mu$ mol/mn/mg P)	TBARS ( $\mu$ M S9)	prot B* (mg/ml S9)	prot GD** (mg/ml S9)
Moulleau	A	26/03/01	30,6	140,9	58,5	51,7	2,7	23,6
Moulleau	A	26/04/01	11,8	303,9	81,8	57,3	5,7	10,5
Moulleau	A	23/05/01	32,9	134,1	135,4	22,6	3,2	14,0
Moulleau	A	20/06/01	21,9	197,8	50,3	7,3	4,0	12,7
Moulleau	A	23/07/01	41,7	89,5	159,0	31,0	2,7	12,8
Moulleau	A	20/08/01	22,5	98,9	101,8	36,7	3,9	11,2
Moulleau	A	03/10/01	24,9	120,7	90,9	30,0	3,3	13,0
Moulleau	A	31/10/01						
Moulleau	A	04/12/01	23,8	100,7	125,3	27,0	2,5	15,0
Moulleau	A	16/01/02						
Moulleau	A	26/02/02	33,5	106,0	109,3	25,0	2,9	16,6
Arcachon essence	B	26/03/01	19,7	114,1	38,9	17,8	3,5	19,6
Arcachon essence	B	26/04/01	14,5	300,5	61,8	39,7	5,4	9,5
Arcachon essence	B	23/05/01	23,7	130,6	73,4	17,8	3,0	14,3
Arcachon essence	B	20/06/01	34,7	267,0	47,7	6,6	2,4	11,7
Arcachon essence	B	23/07/01						
Arcachon essence	B	20/08/01	21,2	123,9	110,8	14,5	3,5	11,6
Arcachon essence	B	03/10/01	35,3	125,4	108,6	24,3	2,0	9,9
Arcachon essence	B	31/10/01	29,2	192,7	135,5	22,3	3,0	12,6
Arcachon essence	B	04/12/01	25,6	109,9	100,5	37,5	2,4	17,1
Arcachon essence	B	16/01/02						
Arcachon essence	B	26/02/02	36,9	152,0	105,9	24,4	2,3	13,6
Arcachon fond	C	26/03/01	15,0	143,2	42,6	22,5	3,5	15,3
Arcachon fond	C	26/04/01	13,1	307,3	47,0	68,5	4,2	10,2
Arcachon fond	C	23/05/01	27,1	166,3	82,9	23,3	3,3	13,3
Arcachon fond	C	20/06/01	23,1	318,1	47,9	5,6	3,1	11,0
Arcachon fond	C	23/07/01						
Arcachon fond	C	20/08/01	26,2	165,6	87,4	18,4	3,0	11,5
Arcachon fond	C	03/10/01	18,9	119,9	100,6	20,1	3,2	10,1
Arcachon fond	C	31/10/01	26,9	138,0	105,2	22,0	2,8	15,4
Arcachon fond	C	04/12/01	25,8	128,5	130,9	39,3	2,9	17,1
Arcachon fond	C	16/01/02						
Arcachon fond	C	26/02/02	27,4	132,0	134,3	27,1	2,7	15,9
La Vigne	D	26/03/01	14,7	156,2	51,2	31,6	3,3	17,1
La Vigne	D	26/04/01	14,2	194,5	71,2	53,3	6,1	10,9
La Vigne	D	23/05/01	24,4	166,3	111,5	30,5	3,8	14,9
La Vigne	D	20/06/01	26,9	318,1	55,3	9,6	3,2	12,7
La Vigne	D	23/07/01	38,4	95,6	206,3	28,6	2,9	13,6
La Vigne	D	20/08/01	29,3	96,0	110,7	16,9	2,9	10,2
La Vigne	D	03/10/01	33,3	131,3	112,9	26,8	2,5	10,8
La Vigne	D	31/10/01	34,4	154,2	101,0	30,4	2,3	14,2
La Vigne	D	04/12/01	26,4	149,3	120,8	33,1	3,2	14,9
La Vigne	D	16/01/02						
La Vigne	D	26/02/02	31,5	130,1	112,0	23,9	2,5	12,6

\* B: branchies

\*\* GD: glande digestive

**Taux de stéroïdes (ng.g<sup>-1</sup> p.s.) dans les bivalves mâles (M) et femelles (F)**

Site	Code	Date	Pg F	Pn F	Pg M	Pn M	Moyenne (F+M)	
							Pg	Pn
Moulleau	A	23/05/01	127,5	45,7	84,9	70,1	106,2	57,9
Moulleau	A	20/06/01	71,0	50,4	62,3	98,3	66,7	74,3
Moulleau	A	23/07/01	97,1	152,2	106,7	146,1	101,9	149,1
Moulleau	A	20/08/01	75,4	57,1	98,8	81,2	87,1	69,2
Moulleau	A	03/10/01	29,0	83,9	17,5	74,0	23,3	79,0
Moulleau	A	31/10/01	42,3	40,0	i	31,6	42,3	35,8
Moulleau	A	04/12/01	25,7	30,2	31,6	67,2	28,7	48,7
Moulleau	A	16/01/02	18,8	52,0	23,7	74,5	21,2	63,2
Moulleau	A	26/02/02	89,2	179,6	86,2	110,9	87,7	145,2
Arcachon essence	B	23/05/01	67,4	261,9	47,6	98,8	57,5	180,4
Arcachon essence	B	20/06/01	36,4	100,4	21,1	115,5	28,7	107,9
Arcachon essence	B	23/07/01						
Arcachon essence	B	20/08/01						
Arcachon essence	B	03/10/01						
Arcachon essence	B	31/10/01	112,0	22,7	105,3	24,0	108,6	23,4
Arcachon essence	B	04/12/01	42,7	49,9	37,8	74,2	40,3	62,1
Arcachon essence	B	16/01/02	22,0	74,3	28,4	161,5	25,2	117,9
Arcachon essence	B	26/02/02	44,5	42,0	53,7	223,5	49,1	132,8
Arcachon fond	C	23/05/01						
Arcachon fond	C	20/06/01	34,4	93,5	28,1	196,8	31,3	145,1
Arcachon fond	C	23/07/01						
Arcachon fond	C	20/08/01	12,8	206,9	88,0	163,3	50,4	185,1
Arcachon fond	C	03/10/01	24,2	10,8	22,3	14,8	23,2	12,8
Arcachon fond	C	31/10/01						
Arcachon fond	C	04/12/01	115,0	88,0	138,1	62,1	126,6	75,1
Arcachon fond	C	16/01/02	37,2	146,8	18,8	116,8	28,0	131,8
Arcachon fond	C	26/02/02	86,4	167,4	92,7	115,1	89,5	141,3
La Vigne	D	23/05/01	102,0	52,5	27,6	36,6	64,8	44,5
La Vigne	D	20/06/01	44,6	79,7	32,5	114,6	38,6	97,1
La Vigne	D	23/07/01						
La Vigne	D	20/08/01	19,7	65,7	20,9	42,7	20,3	54,2
La Vigne	D	03/10/01	124,8	i	37,9	60,3	81,3	333,7
La Vigne	D	31/10/01	51,4	46,8	80,8	30,6	66,1	38,7
La Vigne	D	04/12/01	57,2	112,6	45,2	57,9	51,2	85,2
La Vigne	D	16/01/02	18,7	204,1	16,6	145,1	17,7	174,6
La Vigne	D	26/02/02	83,5	113,4	66,8	216,8	75,2	165,1
Arguin	G	23/05/01	75,8	103,1	116,1	64,9	96,0	84,0
Arguin	G	04/12/01	68,7	161,0	13,6	92,0	41,1	126,5

i = interférent



## **ANNEXE 2:**

**Données brutes de l'étude de biosurveillance du Bassin d'Arcachon:  
Facteurs d'accumulation des contaminants**



### Facteurs d'accumulation des butylétains et des métaux traces dans les bivalves (1/2)

Site	Code	Date	MBT	DBT	TBT	Total	B	Al	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd	Sr	Rb	Pb
Grand Banc	E	26/03/01	0,7	0,3	0,8	<b>0,7</b>	1,1	0,8	0,8	1,1	1,0	1,1	1,4	1,1	0,8	1,0	0,9	0,8	0,7	1,1	1,0
Grand Banc	E	26/04/01	0,1	1,3	1,3	<b>0,9</b>	0,8	5,6	0,8	1,1	1,0	1,2	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	1,0	0,8	1,1	1,0
Grand Banc	E	23/05/01																			
Grand Banc	E	20/06/01		0,7	0,7	<b>0,6</b>	1,0	1,1	1,1	1,2	1,1	1,2	1,1	1,1	1,7	1,1	1,1	1,9	1,3	1,1	1,2
Grand Banc	E	23/07/01	4,1	1,5	1,3	<b>1,4</b>	0,6	0,7	0,8	0,8	0,8	0,8	0,7	1,1	0,5	0,9	1,0	0,7	0,8	1,0	0,8
Grand Banc	E	20/08/01	0,6	1,2	1,3	<b>1,2</b>	1,2	0,9	0,8	2,8	1,0	0,6	0,1	1,5	1,7	1,6	5,8	2,7	1,8	1,5	1,4
Grand Banc	E	03/10/01	1,7	0,8	1,1	<b>1,1</b>	0,8	0,8	1,6	0,8	0,8	2,6		1,1	0,7	0,8	2,0	0,7	0,8	0,8	1,6
Grand Banc	E	31/10/01	0,7	0,7	0,7	<b>0,7</b>	1,0	0,8	0,9	2,0	1,1	1,7		4,5	1,5	1,0	1,0	1,2	1,0	1,2	1,8
Grand Banc	E	04/12/01	1,1	0,9	1,1	<b>1,0</b>	0,9	1,3	0,8	1,0	1,1	1,1	1,5	1,0	0,7	1,2	1,2	0,9	0,7	1,2	1,0
Grand Banc	E	16/01/02		0,6	0,8	<b>0,7</b>	0,9	0,8	1,5	1,2	1,0	4,9	20,0	1,4	1,4	1,5	1,5	1,2	1,2	1,6	2,6
Grand Banc	E	26/02/02		0,7	0,9	<b>1,0</b>	0,9	1,8	0,8	1,6	1,6	1,4	1,2	1,1	1,3	1,3	1,2	1,0	1,2	1,1	1,1
<b>Moyenne annuelle</b>			<b>1,3</b>	<b>0,9</b>	<b>1,0</b>	<b>0,9</b>	<b>0,9</b>	<b>1,4</b>	<b>0,9</b>	<b>1,4</b>	<b>1,1</b>	<b>1,6</b>	<b>1,0</b>	<b>1,5</b>	<b>1,1</b>	<b>1,1</b>	<b>1,7</b>	<b>1,2</b>	<b>1,0</b>	<b>1,2</b>	<b>1,3</b>
<b>Ecart-type</b>			<b>1,2</b>	<b>0,3</b>	<b>0,2</b>	<b>0,3</b>	<b>0,2</b>	<b>1,4</b>	<b>0,4</b>	<b>0,6</b>	<b>0,2</b>	<b>1,2</b>	<b>0,4</b>	<b>1,0</b>	<b>0,4</b>	<b>0,3</b>	<b>1,4</b>	<b>0,6</b>	<b>0,3</b>	<b>0,2</b>	<b>0,5</b>
Ferret	F	26/03/01	0,6	0,5	1,0	<b>0,8</b>	1,2	0,8	0,7	0,9	0,6	0,7	1,0	1,1	0,3	1,1	1,0	0,5	0,7	1,3	0,7
Ferret	F	26/04/01	0,1	1,1	1,1	<b>0,8</b>	1,1	1,7	1,0	1,4	1,2	1,3	1,0	1,1	0,5	0,9	1,1	1,2	0,9	1,1	1,0
Ferret	F	23/05/01		0,9	1,0	<b>1,0</b>	0,8	0,9	0,4	0,9	1,0	1,4	1,3	1,4	0,7	1,1	1,2	1,5	0,8	1,0	0,7
Ferret	F	20/06/01	0,2	0,7	1,5	<b>1,0</b>	1,2	0,7	0,3	0,9	0,7	1,0	1,0	1,3	0,7	1,0	1,5	1,3	1,6	1,2	1,0
Ferret	F	23/07/01	2,6	1,2	1,4	<b>1,4</b>	0,7	1,4	0,3	0,9	1,1	1,0	1,2	1,3	0,5	1,0	1,2	0,7	0,8	1,1	1,3
Ferret	F	20/08/01	0,9	1,4	1,5	<b>1,4</b>	1,3	1,3	3,2	2,6	1,4	0,8	1,3	1,5	2,0	1,9	7,7	3,3	1,8	1,6	1,2
Ferret	F	03/10/01	1,5	0,9	1,0	<b>1,0</b>	0,9	6,1	0,9	1,0	1,4	1,4		1,3	1,0	1,0	1,0	1,1	1,0	1,0	1,2
Ferret	F	31/10/01	0,4	0,6	0,8	<b>0,7</b>	1,1	1,1	1,1	1,0	1,1	1,5		1,2	1,0	1,1	1,1	1,1	1,0	1,1	1,5
Ferret	F	04/12/01	1,0	0,9	1,0	<b>0,9</b>	0,9	1,2	0,9	1,1	1,1	1,0	1,8	1,0	0,9	1,1	1,2	1,1	0,8	1,2	1,4
Ferret	F	16/01/02		0,8	0,9	<b>0,8</b>	1,1	1,0	1,4	1,5	1,2	5,9	22,1	1,8	1,2	1,6	1,6	1,5	2,1	1,5	2,7
Ferret	F	26/02/02		1,2	1,0	<b>1,0</b>	0,8	1,6	1,1	1,5	1,5	1,3	1,1	1,1	1,2	1,1	1,3	1,0	1,2	1,1	0,9
<b>Moyenne annuelle</b>			<b>0,9</b>	<b>0,9</b>	<b>1,1</b>	<b>1,0</b>	<b>1,0</b>	<b>1,6</b>	<b>1,0</b>	<b>1,3</b>	<b>1,1</b>	<b>1,6</b>	<b>1,2</b>	<b>1,3</b>	<b>0,9</b>	<b>1,2</b>	<b>1,8</b>	<b>1,3</b>	<b>1,2</b>	<b>1,2</b>	<b>1,2</b>
<b>Ecart-type</b>			<b>0,8</b>	<b>0,3</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>	<b>1,5</b>	<b>0,8</b>	<b>0,5</b>	<b>0,3</b>	<b>1,4</b>	<b>0,3</b>	<b>0,2</b>	<b>0,4</b>	<b>0,3</b>	<b>1,9</b>	<b>0,7</b>	<b>0,5</b>	<b>0,2</b>	<b>0,5</b>
Arguin	G	26/03/01	0,2	0,5	0,8	<b>0,5</b>	0,9	1,0	0,7	0,8	0,7	0,7	1,4	1,0	0,7	0,9	0,8	0,6	0,7	1,1	1,0
Arguin	G	26/04/01		0,8	0,8	<b>0,6</b>	0,8	0,6	0,1	0,8	0,5	0,9	0,9	0,9	0,4	0,9	0,9	0,8	0,8	0,9	0,6
Arguin	G	23/05/01	19,1	0,6	0,6	<b>1,4</b>	1,2	1,0	0,5	1,0	1,1	1,4	1,1	1,4	0,5	0,9	1,4	3,1	0,9	1,1	0,9
Arguin	G	20/06/01		0,4	0,5	<b>0,4</b>	1,3	1,0	0,3	1,5	1,0	1,0	0,8	1,4	0,6	1,1	1,4	1,5	1,4	1,2	1,0
Arguin	G	23/07/01	7,5	1,9	1,6	<b>1,9</b>															
Arguin	G	20/08/01	0,7	1,6	2,4	<b>2,0</b>	1,2	6,8	1,7	2,8	1,4	0,8	0,2	1,6	1,7	2,0	7,3	2,8	1,6	1,8	1,4
Arguin	G	03/10/01																			
Arguin	G	31/10/01	0,3	0,6	0,8	<b>0,7</b>	1,0	1,9	0,9	1,3	1,7	1,1		1,0	0,9	1,1	1,0	0,9	1,5	1,0	1,6
Arguin	G	04/12/01	1,0	0,7	0,7	<b>0,7</b>	0,8	1,1	0,7	1,0	0,9	0,5	1,6	0,8	0,5	1,1	1,1	0,7	0,6	1,1	1,1
Arguin	G	16/01/02		0,8	1,0	<b>0,9</b>	1,0	0,2	0,9	0,7	0,7	4,3	13,7	1,3	1,3	1,5	1,5	1,3	1,1	1,3	1,5
Arguin	G	26/02/02		0,9	1,2	<b>1,1</b>	0,9	5,0	0,8	1,5	1,8	1,2	1,1	0,9	1,1	1,1	1,4	1,0	1,2	1,2	1,1
<b>Moyenne annuelle</b>			<b>4,8</b>	<b>0,9</b>	<b>1,0</b>	<b>1,0</b>	<b>1,0</b>	<b>2,1</b>	<b>0,7</b>	<b>1,3</b>	<b>1,1</b>	<b>1,3</b>	<b>1,0</b>	<b>1,2</b>	<b>0,8</b>	<b>1,2</b>	<b>1,9</b>	<b>1,4</b>	<b>1,1</b>	<b>1,2</b>	<b>1,1</b>
<b>Ecart-type</b>			<b>6,9</b>	<b>0,5</b>	<b>0,5</b>	<b>0,5</b>	<b>0,2</b>	<b>2,1</b>	<b>0,4</b>	<b>0,6</b>	<b>0,4</b>	<b>1,1</b>	<b>0,4</b>	<b>0,2</b>	<b>0,4</b>	<b>0,3</b>	<b>1,9</b>	<b>0,9</b>	<b>0,3</b>	<b>0,2</b>	<b>0,3</b>
La Barbotière	H	04/12/01	0,8	1,1	1,6	<b>1,4</b>	1,0	1,5	1,2	1,2	1,8	2,7	5,4	1,5	1,1	1,3	1,4	1,5			2,1
La Barbotière	H	16/01/02		1,0	1,2	<b>1,1</b>	0,9	1,2	1,1	0,9	1,4	3,8	11,8	1,3	1,2	1,1	1,0	1,4			2,0
La Barbotière	H	26/02/02	2,8	1,2	1,6	<b>1,6</b>	0,8	3,4	0,8	1,2	1,8	1,1	0,9	1,1	1,1	1,0	1,3	1,3			0,9
<b>Moyenne annuelle</b>			<b>1,8</b>	<b>1,1</b>	<b>1,5</b>	<b>1,4</b>	<b>0,9</b>	<b>2,1</b>	<b>1,0</b>	<b>1,1</b>	<b>1,6</b>	<b>2,5</b>	<b>6,0</b>	<b>1,3</b>	<b>1,1</b>	<b>1,2</b>	<b>1,2</b>	<b>1,4</b>			<b>1,7</b>
<b>Ecart-type</b>			<b>1,0</b>	<b>0,1</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>	<b>0,1</b>	<b>1,0</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>	<b>1,1</b>	<b>4,5</b>	<b>0,2</b>	<b>0,0</b>	<b>0,1</b>	<b>0,2</b>	<b>0,1</b>			<b>0,6</b>

### Facteurs d'accumulation des butylétains et des métaux traces dans les bivalves (2/2)

Site	Code	Date	MBT	DBT	TBT	Total	B	Al	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd	Sr	Rb	Pb
Arcachon essence	B	26/03/01	4,6	19,4	48,1	<b>28,8</b>	0,8	1,3	1,1	1,3	1,5	0,9	1,1	2,2	1,0	1,1	0,9	0,8	0,8	1,0	1,3
Arcachon essence	B	26/04/01	2,8	59,3	83,3	<b>55,3</b>	1,1	1,4	1,0	1,4	1,4	0,9	0,7	1,7	1,1	0,8	0,8	1,4	0,8	0,9	1,5
Arcachon essence	B	23/05/01	51,5	62,9	76,1	<b>72,5</b>	1,0	0,4	0,7	0,8	0,7	0,7	0,6	2,8	1,2	1,0	0,9	1,6	0,6	0,7	0,8
Arcachon essence	B	20/06/01	13,9	68,5	62,4	<b>54,1</b>	1,0	0,3	0,9	1,1	0,5	0,8	0,7	2,7	2,0	1,2	1,1	1,8	1,1	0,9	0,9
Arcachon essence	B	23/07/01	157,1	115,2	94,9	<b>101,4</b>															
Arcachon essence	B	20/08/01	19,3	61,2	69,3	<b>62,7</b>	1,4	0,9	2,0	1,6	0,9	0,3	0,8	1,6	1,5	1,9	7,0			1,4	
Arcachon essence	B	03/10/01	31,8	46,2	55,0	<b>50,6</b>	1,0	0,7	1,3	0,9	0,9	1,6		4,1	1,6	1,1	1,0	1,3	1,1	0,9	2,1
Arcachon essence	B	31/10/01	13,3	21,3	45,8	<b>34,5</b>	1,1	0,6	1,0	0,9	1,1	0,8		3,0	0,8	1,1	0,9	1,0	1,0	1,0	1,7
Arcachon essence	B	04/12/01	18,7	16,0	45,9	<b>35,3</b>	0,9	0,6	0,8	0,9	0,7	0,8	0,4	6,8	0,8	1,0	1,0	0,9	0,6	1,0	1,0
Arcachon essence	B	16/01/02	18,9	11,1	41,5	<b>31,1</b>	1,0	0,9	1,3	1,2	1,3	4,2	22,9	4,4	1,6	1,3	1,6	1,5	1,3	1,4	2,8
Arcachon essence	B	26/02/02	23,9	13,1	46,4	<b>36,9</b>	0,8	3,4	0,4	0,7	0,7	0,9	0,6	2,2	0,8	0,9	0,8	0,9	0,8	0,9	0,6
<b>Moyenne annuelle</b>			<b>32,3</b>	<b>44,9</b>	<b>60,8</b>	<b>51,2</b>	<b>1,0</b>	<b>1,0</b>	<b>1,0</b>	<b>1,1</b>	<b>1,0</b>	<b>1,2</b>	<b>0,7</b>	<b>3,2</b>	<b>1,2</b>	<b>1,1</b>	<b>1,6</b>	<b>1,2</b>	<b>0,9</b>	<b>1,0</b>	<b>1,4</b>
<b>écart-type</b>			<b>41,4</b>	<b>30,9</b>	<b>17,1</b>	<b>20,8</b>	<b>0,2</b>	<b>0,8</b>	<b>0,4</b>	<b>0,3</b>	<b>0,3</b>	<b>1,0</b>	<b>0,2</b>	<b>1,5</b>	<b>0,4</b>	<b>0,3</b>	<b>1,8</b>	<b>0,3</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>	<b>0,7</b>
Arcachon fond	C	26/03/01	4,3	26,8	48,8	<b>30,5</b>	1,0	1,4	1,1	1,2	1,4	1,1		2,2	1,1	1,0	1,1	1,1	1,1	1,2	1,0
Arcachon fond	C	26/04/01	3,5	72,5	81,2	<b>55,9</b>	1,1	1,6	1,0	1,6	1,3	1,4	0,7	2,0	1,1	1,0	1,2	1,9	1,1	1,0	1,0
Arcachon fond	C	23/05/01	49,1	60,3	65,5	<b>63,9</b>	0,8	0,6	0,8	1,1	0,7	0,9	0,6	2,6	0,7	1,0	1,3	1,6	0,7	0,9	0,8
Arcachon fond	C	20/06/01	12,4	65,1	61,1	<b>52,2</b>	1,1	0,3	0,1	0,7	0,4	0,6	0,5	2,0	0,8	1,0	1,2	1,4	1,0	1,0	0,7
Arcachon fond	C	23/07/01	83,7	66,1	49,9	<b>54,7</b>															
Arcachon fond	C	20/08/01	23,4	71,6	62,5	<b>61,3</b>	1,4	1,1	1,3	5,1	1,6	0,7	0,0	5,9	2,9	2,2	6,6	4,2	1,7	1,7	2,5
Arcachon fond	C	03/10/01	33,8	53,9	52,3	<b>51,5</b>	1,0	0,5	0,9	0,8	1,0	0,4		4,8	1,0	1,0	1,2	1,1	1,0	1,0	0,7
Arcachon fond	C	31/10/01	15,0	20,8	43,4	<b>33,1</b>	1,0	1,1	0,9	1,2	1,5	0,0		2,9	1,2	1,1	1,4	1,2	1,1	1,0	0,6
Arcachon fond	C	04/12/01	23,7	23,4	36,4	<b>31,8</b>	0,8	1,0	0,8	1,0	1,2	0,4	0,0	3,6	0,6	1,0	1,0	0,8	0,6	1,0	1,7
Arcachon fond	C	16/01/02	19,4	13,7	34,0	<b>27,1</b>	1,0	0,7	1,3	0,9	1,2	4,0	10,6	2,7	1,5	1,4	1,6	1,5	1,2	1,5	2,3
Arcachon fond	C	26/02/02	64,1	26,5	60,7	<b>52,1</b>	0,8	1,9	0,5	0,9	0,8	0,8	0,6	1,5	1,5	1,1	1,0	0,9	0,9	0,9	0,6
<b>Moyenne annuelle</b>			<b>30,2</b>	<b>45,5</b>	<b>54,2</b>	<b>46,7</b>	<b>1,0</b>	<b>1,0</b>	<b>0,9</b>	<b>1,4</b>	<b>1,1</b>	<b>1,0</b>	<b>0,4</b>	<b>3,0</b>	<b>1,2</b>	<b>1,2</b>	<b>1,7</b>	<b>1,6</b>	<b>1,0</b>	<b>1,1</b>	<b>1,2</b>
<b>écart-type</b>			<b>24,3</b>	<b>22,0</b>	<b>13,2</b>	<b>12,8</b>	<b>0,2</b>	<b>0,5</b>	<b>0,3</b>	<b>1,3</b>	<b>0,4</b>	<b>1,1</b>	<b>0,3</b>	<b>1,3</b>	<b>0,6</b>	<b>0,4</b>	<b>1,6</b>	<b>0,9</b>	<b>0,3</b>	<b>0,2</b>	<b>0,7</b>
La Vigne	D	26/03/01	0,8	1,1	3,9	<b>2,4</b>	1,5	1,8	1,4	1,5	1,6	1,2	1,6	2,0	0,6	1,1	1,2	0,9	1,1	1,4	1,0
La Vigne	D	26/04/01	0,7	2,3	3,3	<b>2,4</b>	1,2	2,5	1,3	1,8	1,9	1,5	1,1	1,8	0,6	0,9	1,2	1,2	0,9	1,3	1,3
La Vigne	D	23/05/01	1,0	2,4	4,3	<b>3,8</b>	0,9	1,1	0,6	1,2	1,0	1,2	1,0	2,7	0,5	1,1	1,3	1,3	0,8	1,0	0,9
La Vigne	D	20/06/01	1,5	2,2	4,8	<b>3,5</b>	1,1	1,3	0,4	1,2	1,1	0,9	0,8	2,4	0,5	1,0	1,4	0,9	1,1	1,1	1,1
La Vigne	D	23/07/01	5,6	4,7	4,2	<b>4,4</b>	0,8	2,1	0,6	1,7	1,8	1,2	1,1	3,7	1,2	1,2	1,3	1,0	1,2	1,2	1,7
La Vigne	D	20/08/01	1,4	4,2	8,5	<b>6,7</b>															
La Vigne	D	03/10/01	2,2	2,4	5,0	<b>4,0</b>	1,0	0,6	1,3	1,0	1,0	0,5		7,5	1,1	1,1	1,3	1,0	1,1	1,0	1,5
La Vigne	D	31/10/01	1,1	1,1	2,0	<b>1,6</b>	1,1	1,1	1,2	1,4	1,3	2,7		7,9	1,7	1,2	1,1	1,4	1,1	1,1	1,8
La Vigne	D	04/12/01	5,4	1,4	2,5	<b>2,3</b>	0,9	0,8	0,7	0,9	0,8	0,5	0,4	5,2	0,6	1,1	0,9	0,8	0,6	1,1	1,3
La Vigne	D	16/01/02		0,9	2,2	<b>1,7</b>	1,2	0,9	2,3	1,2	1,3	5,0	23,4	3,9	1,2	1,4	1,4	1,3	1,3	1,5	2,1
La Vigne	D	26/02/02	1,0	1,2	2,3	<b>2,0</b>	0,8	2,1	0,6	1,0	1,0	0,9	0,7	2,1	1,7	0,9	1,0	1,0	1,0	0,9	0,8
<b>Moyenne annuelle</b>			<b>2,1</b>	<b>2,2</b>	<b>3,9</b>	<b>3,2</b>	<b>1,0</b>	<b>1,4</b>	<b>1,0</b>	<b>1,3</b>	<b>1,3</b>	<b>1,6</b>	<b>1,0</b>	<b>3,9</b>	<b>1,0</b>	<b>1,1</b>	<b>1,2</b>	<b>1,1</b>	<b>1,0</b>	<b>1,2</b>	<b>1,3</b>
<b>écart-type</b>			<b>1,8</b>	<b>1,2</b>	<b>1,8</b>	<b>1,5</b>	<b>0,2</b>	<b>0,6</b>	<b>0,5</b>	<b>0,3</b>	<b>0,4</b>	<b>1,3</b>	<b>0,4</b>	<b>2,1</b>	<b>0,4</b>	<b>0,2</b>	<b>0,1</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>	<b>0,4</b>

## Facteurs d'accumulation des HAP dans les bivalves (1/2)

Site	Code	Date	N	Ay	Ae	Fe	DBT	Phe	A	3 MP	2 MP	9 MP	1 MP	F
Grand Banc	E	26/03/01	1,6	0,8	0,2	0,4	3,4	0,8	0,9	1,2	0,9	1,0	1,0	0,6
Grand Banc	E	26/04/01	0,7	0,4	0,2	0,1	1,2	0,3	0,3	0,6	0,6	0,9	0,8	0,4
Grand Banc	E	23/05/01												
Grand Banc	E	20/06/01	0,6	1,1	1,0	2,5	3,4	0,8	0,9	0,4	0,4	0,7	0,9	1,7
Grand Banc	E	23/07/01	6,5	1,0	0,2	1,4	2,7	2,8	0,8	0,6	0,5	0,9	0,9	0,4
Grand Banc	E	20/08/01	0,5	1,0	1,4	0,9	0,5	0,9	0,7	0,3	0,3	0,3	0,2	0,7
<b>Moyenne annuelle</b>			<b>2,0</b>	<b>0,9</b>	<b>0,6</b>	<b>1,0</b>	<b>2,2</b>	<b>1,1</b>	<b>0,7</b>	<b>0,6</b>	<b>0,6</b>	<b>0,8</b>	<b>0,8</b>	<b>0,8</b>
<b>Ecart-type</b>			<b>2,3</b>	<b>0,3</b>	<b>0,5</b>	<b>0,8</b>	<b>1,2</b>	<b>0,9</b>	<b>0,2</b>	<b>0,3</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>	<b>0,3</b>	<b>0,5</b>
Ferret	F	26/03/01	0,8	0,7	0,5	0,7	1,4	1,2	0,7	1,6	1,6	1,6	1,8	0,7
Ferret	F	26/04/01	0,8	0,9	1,7	0,7	0,3	0,9	0,7	0,4	0,7	0,8	0,9	0,6
Ferret	F	23/05/01	0,1	1,7	1,6	1,5	1,2	2,2		2,2	3,2	4,4	3,8	3,0
Ferret	F	20/06/01	0,8	2,2	0,9	3,6	2,1	1,0	1,3	1,0	0,8	1,4	1,3	1,5
Ferret	F	23/07/01		0,5	0,5	1,5	2,5	0,8	1,5	0,7	0,8	1,0	0,5	0,7
Ferret	F	20/08/01	0,5	1,5	0,7	1,1	0,2	1,2	1,3	0,5	0,5	0,4	0,4	1,0
<b>Moyenne annuelle</b>			<b>0,6</b>	<b>1,2</b>	<b>1,0</b>	<b>1,5</b>	<b>1,3</b>	<b>1,2</b>	<b>1,1</b>	<b>1,1</b>	<b>1,3</b>	<b>1,6</b>	<b>1,5</b>	<b>1,3</b>
<b>Ecart-type</b>			<b>0,3</b>	<b>0,6</b>	<b>0,5</b>	<b>1,0</b>	<b>0,8</b>	<b>0,5</b>	<b>0,3</b>	<b>0,6</b>	<b>0,9</b>	<b>1,3</b>	<b>1,1</b>	<b>0,8</b>
Arguin	G	26/03/01	0,6	0,2	0,2	0,1	0,8	0,4	0,2	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3
Arguin	G	26/04/01		8,2	5,1	4,0	2,2	2,8		3,0	3,2	5,3	2,5	2,5
Arguin	G	23/05/01	0,7	1,5	0,3	2,0	0,6	0,9	2,4					1,0
Arguin	G	20/06/01		0,7	0,6	0,9	2,0	0,7	2,0					0,4
Arguin	G	23/07/01	0,3	3,2	0,8	1,0	0,2	0,9	1,1	0,3	0,3	0,4	0,4	0,5
Arguin	G	20/08/01												
<b>Moyenne annuelle</b>			<b>0,5</b>	<b>2,8</b>	<b>1,4</b>	<b>1,6</b>	<b>1,1</b>	<b>1,1</b>	<b>1,4</b>	<b>1,2</b>	<b>1,3</b>	<b>2,0</b>	<b>1,1</b>	<b>0,9</b>
<b>Ecart-type</b>			<b>0,2</b>	<b>2,9</b>	<b>1,9</b>	<b>1,4</b>	<b>0,8</b>	<b>0,9</b>	<b>0,8</b>	<b>1,2</b>	<b>1,3</b>	<b>2,3</b>	<b>1,0</b>	<b>0,8</b>
Arcachon essen	B	26/03/01	1,9	2,1	0,6	2,0	4,9	2,7	3,9	8,5	11,8	8,5	13,1	1,5
Arcachon essen	B	26/04/01	1,5	0,4	0,2	0,1	0,8	1,0	2,3	0,9	0,9	1,9	1,5	1,0
Arcachon essen	B	23/05/01		10,5	0,1	11,7	1,8	3,5		18,6	29,0	49,4	33,9	8,0
Arcachon essen	B	20/06/01	1,0	1,2	1,5	5,3	2,7	2,0	5,6	5,1	5,5	8,7	7,6	5,1
Arcachon essen	B	23/07/01												
Arcachon essen	B	20/08/01	0,9	2,6	1,3	1,9	1,3	3,0	4,1	4,9	7,2	6,8	4,2	4,7
<b>Moyenne annuelle</b>			<b>1,3</b>	<b>3,4</b>	<b>0,7</b>	<b>4,2</b>	<b>2,3</b>	<b>2,4</b>	<b>4,0</b>	<b>7,6</b>	<b>10,9</b>	<b>15,1</b>	<b>12,1</b>	<b>4,0</b>
<b>écart-type</b>			<b>0,4</b>	<b>3,6</b>	<b>0,6</b>	<b>4,1</b>	<b>1,5</b>	<b>0,9</b>	<b>1,2</b>	<b>6,0</b>	<b>9,7</b>	<b>17,3</b>	<b>11,6</b>	<b>2,6</b>
Arcachon fond	C	26/03/01	1,1	0,6		0,2	15,0	13,3	0,0	77,0	70,6	45,2	80,0	4,6
Arcachon fond	C	26/04/01	0,5	0,5	0,3	0,1	0,6	2,7	3,0	2,0	2,5	4,8	3,6	1,3
Arcachon fond	C	23/05/01		3,9		11,9	6,8	36,1		227,2	298,0	494,0	425,1	16,9
Arcachon fond	C	20/06/01	0,6	2,0	1,9	13,6	11,8	25,3	26,5	90,2	86,9	104,4	99,5	15,6
Arcachon fond	C	23/07/01												
Arcachon fond	C	20/08/01	0,4	1,4	2,9	6,8	4,2	13,8	6,3	20,1	25,8	19,5	21,3	8,2
<b>Moyenne annuelle</b>			<b>0,7</b>	<b>1,7</b>	<b>1,7</b>	<b>6,5</b>	<b>7,7</b>	<b>18,3</b>	<b>8,9</b>	<b>83,3</b>	<b>96,8</b>	<b>133,6</b>	<b>125,9</b>	<b>9,3</b>
<b>écart-type</b>			<b>0,3</b>	<b>1,3</b>	<b>1,1</b>	<b>5,7</b>	<b>5,2</b>	<b>11,5</b>	<b>10,4</b>	<b>79,3</b>	<b>105,1</b>	<b>183,4</b>	<b>153,7</b>	<b>6,0</b>
La Vigne	D	26/03/01	1,3	1,3	0,2	0,5	1,5	1,9	3,6	7,0	6,0	3,6	4,7	1,7
La Vigne	D	26/04/01	1,0	0,8	0,3	0,2	1,0	0,7	2,2	2,4	2,7	7,0	6,2	1,2
La Vigne	D	23/05/01		14,4	11,6	8,7	1,9	6,1		17,0	21,0	29,9	21,3	12,0
La Vigne	D	20/06/01	1,5	4,8	1,8	5,1	2,9	5,0	10,8	6,2	4,9	4,8	3,7	10,1
La Vigne	D	23/07/01		1,8	0,3	1,8	2,8	4,5	9,3	10,5	13,3	13,1	3,7	4,8
La Vigne	D	20/08/01	0,8	2,3	1,5	1,6	0,8	2,4	5,3	2,0	2,4	2,0	1,5	3,2
<b>Moyenne annuelle</b>			<b>1,1</b>	<b>4,2</b>	<b>2,6</b>	<b>3,0</b>	<b>1,8</b>	<b>3,4</b>	<b>6,2</b>	<b>7,5</b>	<b>8,4</b>	<b>10,1</b>	<b>6,9</b>	<b>5,5</b>
<b>écart-type</b>			<b>0,3</b>	<b>4,7</b>	<b>4,1</b>	<b>3,0</b>	<b>0,8</b>	<b>1,9</b>	<b>3,3</b>	<b>5,1</b>	<b>6,7</b>	<b>9,6</b>	<b>6,6</b>	<b>4,1</b>

## Facteurs d'accumulation des HAP dans les bivalves (2/2)

Site	Code	Date	Pyr	BaA	Chrys	BbkjF	BeP	BaP	Ipyr	DahA	Bper	S EPA	S autres
Grand Banc	E	26/03/01	0,8	0,3	0,3	0,5	0,3	0,2	0,5	0,7	0,5	9	8
Grand Banc	E	26/04/01	1,5	0,8	0,7	1,6	1,0	1,3	1,3	1,0	0,9	12	5
Grand Banc	E	23/05/01											
Grand Banc	E	20/06/01	0,8	2,1	1,6	1,9	1,0	0,4	0,8		1,0	19	7
Grand Banc	E	23/07/01		1,6	1,6	2,0	2,0	1,1	2,9	0,8	2,3	20	8
Grand Banc	E	20/08/01		1,0	0,9	1,3	1,2	1,1	1,0	1,5	0,8	15	3
<b>Moyenne annuelle</b>			<b>1,0</b>	<b>1,2</b>	<b>1,0</b>	<b>1,5</b>	<b>1,1</b>	<b>0,8</b>	<b>1,3</b>	<b>1,0</b>	<b>1,1</b>	<b>15</b>	<b>6</b>
<b>Écart-type</b>			<b>0,3</b>	<b>0,6</b>	<b>0,5</b>	<b>0,5</b>	<b>0,5</b>	<b>0,4</b>	<b>0,8</b>	<b>0,3</b>	<b>0,6</b>	<b>4</b>	<b>2</b>
Ferret	F	26/03/01	0,7	0,2	0,3	0,2	0,3	0,2	0,5	0,5	0,4	8	8
Ferret	F	26/04/01	0,5	0,7	0,9	0,9	1,1	0,8	1,0	0,9	0,8	13	4
Ferret	F	23/05/01	1,2	2,2	1,9	1,4	3,8	2,5	3,0		2,0	31	19
Ferret	F	20/06/01	0,8	1,2	1,4	1,4	1,1	1,1	1,1		0,9	21	8
Ferret	F	23/07/01		0,7	0,8	0,7	1,0	0,6	3,1	2,9	1,4	16	7
Ferret	F	20/08/01		1,2	1,4	1,5	1,6	1,4	1,1	1,4	1,1	18	4
<b>Moyenne annuelle</b>			<b>0,8</b>	<b>1,0</b>	<b>1,1</b>	<b>1,1</b>	<b>1,5</b>	<b>1,1</b>	<b>1,6</b>	<b>1,4</b>	<b>1,1</b>	<b>18</b>	<b>8</b>
<b>Écart-type</b>			<b>0,3</b>	<b>0,7</b>	<b>0,5</b>	<b>0,5</b>	<b>1,1</b>	<b>0,7</b>	<b>1,0</b>	<b>0,9</b>	<b>0,5</b>	<b>7</b>	<b>5</b>
Arguin	G	26/03/01	0,2	0,3	0,3	0,6	0,4	0,5	0,3		0,3	4	7
Arguin	G	26/04/01	1,2	2,2	2,2	0,6	1,5	0,9	0,4	0,6	0,8	4	3
Arguin	G	23/05/01	0,7	1,1	1,1	1,3	0,9	0,6	1,6		1,5	38	18
Arguin	G	20/06/01	0,7	0,4	0,5	0,5	0,6	0,3	2,5	1,5	1,3	17	3
Arguin	G	23/07/01		0,7	0,8	1,3		0,9	1,2	1,4	1,1	13	5
Arguin	G	20/08/01										16	2
<b>Moyenne annuelle</b>			<b>0,7</b>	<b>0,9</b>	<b>1,0</b>	<b>0,9</b>	<b>0,8</b>	<b>0,6</b>	<b>1,2</b>	<b>1,2</b>	<b>1,0</b>	<b>16</b>	<b>6</b>
<b>Écart-type</b>			<b>0,3</b>	<b>0,7</b>	<b>0,7</b>	<b>0,3</b>	<b>0,4</b>	<b>0,2</b>	<b>0,8</b>	<b>0,4</b>	<b>0,4</b>	<b>11</b>	<b>5</b>
Arcachon essen	B	26/03/01	3,3	2,1	2,6	2,1	1,8	2,4	3,6	2,0	2,8	36	49
Arcachon essen	B	26/04/01	2,9	9,3	8,1	19,3	7,5	7,8	8,5	6,3	5,4	74	13
Arcachon essen	B	23/05/01	6,8	17,1	21,0	8,2	21,5	9,1	8,0		10,1	129	154
Arcachon essen	B	20/06/01	7,0	11,0	18,5	8,1	7,6	3,4	3,5		6,3	86	37
Arcachon essen	B	23/07/01											
Arcachon essen	B	20/08/01		6,3	10,7	7,3	7,5	6,6	3,3	2,1	4,4	72	32
<b>Moyenne annuelle</b>			<b>5,0</b>	<b>9,2</b>	<b>12,2</b>	<b>9,0</b>	<b>9,2</b>	<b>5,9</b>	<b>5,4</b>	<b>3,5</b>	<b>5,8</b>	<b>79</b>	<b>57</b>
<b>Écart-type</b>			<b>1,9</b>	<b>5,0</b>	<b>6,7</b>	<b>5,6</b>	<b>6,5</b>	<b>2,6</b>	<b>2,4</b>	<b>2,0</b>	<b>2,4</b>	<b>30</b>	<b>50</b>
Arcachon fond	C	26/03/01	8,8	3,9	6,3	8,4	3,2	3,7	5,9	3,6	3,7	72	291
Arcachon fond	C	26/04/01	4,7	17,0	22,4	35,6	12,9	10,8	11,4	8,8	11,5	130	26
Arcachon fond	C	23/05/01	22,8	24,5	69,0	19,8	41,5	11,3	23,1		21,2	279	1492
Arcachon fond	C	20/06/01	24,2	28,9	77,7	21,9	17,4	9,5	8,1		13,5	288	410
Arcachon fond	C	23/07/01											
Arcachon fond	C	20/08/01		10,2	26,2	16,3	14,4	11,9	9,4	11,1	7,3	151	105
<b>Moyenne annuelle</b>			<b>15,1</b>	<b>16,9</b>	<b>40,3</b>	<b>20,4</b>	<b>17,9</b>	<b>9,4</b>	<b>11,6</b>	<b>7,8</b>	<b>11,4</b>	<b>184</b>	<b>465</b>
<b>Écart-type</b>			<b>8,5</b>	<b>9,1</b>	<b>27,9</b>	<b>8,9</b>	<b>12,7</b>	<b>3,0</b>	<b>6,1</b>	<b>3,1</b>	<b>5,9</b>	<b>85</b>	<b>531</b>
La Vigne	D	26/03/01	2,9	1,2	1,1	1,8	0,9	0,9	1,6	0,7	2,0	23	24
La Vigne	D	26/04/01	3,2	4,5	3,6	8,5	3,8	3,9	5,5	2,2	4,9	43	23
La Vigne	D	23/05/01	7,1	19,9	10,4	15,8	22,4	14,6	16,2		23,7	254	114
La Vigne	D	20/06/01	7,4	17,7	14,9	12,0	10,1	6,6	7,7		13,4	131	33
La Vigne	D	23/07/01	9,2	4,9	6,8	4,9	5,2	4,3	7,1	7,5	14,9	82	49
La Vigne	D	20/08/01		6,1	7,2	6,1	7,7	6,4	4,3	4,4	7,3	66	16
<b>Moyenne annuelle</b>			<b>5,9</b>	<b>9,0</b>	<b>7,3</b>	<b>8,2</b>	<b>8,3</b>	<b>6,1</b>	<b>7,1</b>	<b>3,7</b>	<b>11,0</b>	<b>100</b>	<b>43</b>
<b>Écart-type</b>			<b>2,5</b>	<b>7,1</b>	<b>4,5</b>	<b>4,6</b>	<b>6,9</b>	<b>4,2</b>	<b>4,5</b>	<b>2,6</b>	<b>7,2</b>	<b>77</b>	<b>33</b>

## Facteurs d'accumulation des PCB dans les bivalves

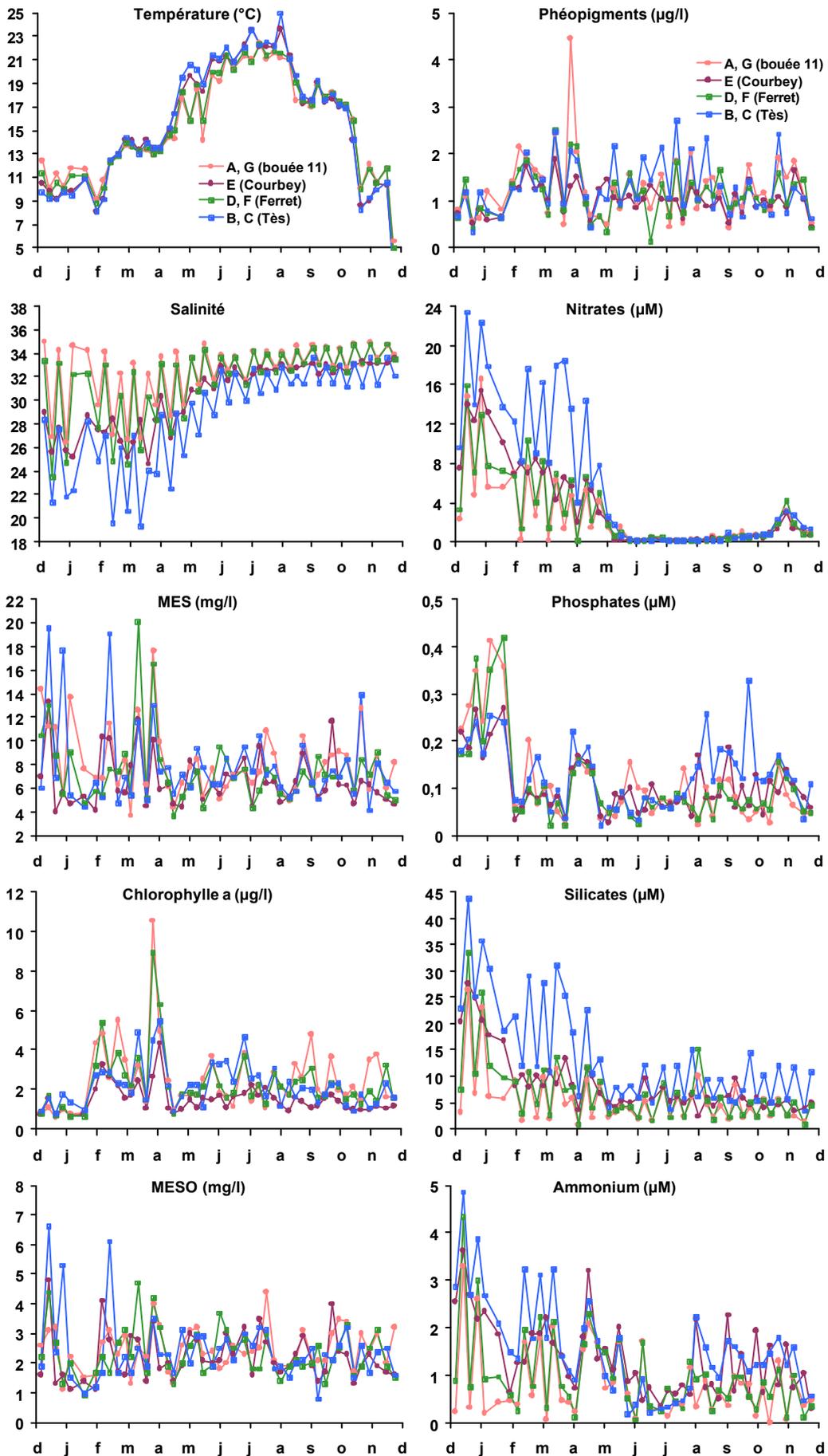
Site	Code	Date	PCB 28	PCB 52	PCB 118	PCB 153	PCB 138	PCB 180	S PCB
Grand Banc	E	26/03/01	1,7	1,2	0,4	0,6	0,6	0,6	<b>0,6</b>
Grand Banc	E	26/04/01	0,9	2,2	1,3	0,8	0,8	0,5	<b>1,0</b>
Grand Banc	E	23/05/01							
Grand Banc	E	20/06/01	1,1	0,5	0,8	0,9	0,8	0,8	<b>0,8</b>
Grand Banc	E	23/07/01	0,7	2,1	1,2	1,4	1,4	2,3	<b>1,4</b>
Grand Banc	E	20/08/01	0,8	3,0	1,5	0,9	0,5	0,8	<b>1,0</b>
<b>Moyenne annuelle</b>			<b>1,0</b>	<b>1,8</b>	<b>1,0</b>	<b>0,9</b>	<b>0,8</b>	<b>1,0</b>	<b>1,0</b>
<b>Ecart-type</b>			<b>0,4</b>	<b>0,9</b>	<b>0,4</b>	<b>0,3</b>	<b>0,3</b>	<b>0,7</b>	<b>0,3</b>
Ferret	F	26/03/01	2,3	2,2	0,3	0,3	0,3	0,2	<b>0,5</b>
Ferret	F	26/04/01	1,1	2,4	1,6	0,8	0,9	0,5	<b>1,1</b>
Ferret	F	23/05/01	1,1	3,1	0,4	0,5	0,2	0,1	<b>0,4</b>
Ferret	F	20/06/01	0,9	0,4	0,6	1,1	0,6	0,6	<b>0,8</b>
Ferret	F	23/07/01	0,2	1,7	1,4	1,4	1,3	1,6	<b>1,4</b>
Ferret	F	20/08/01	0,8	3,0	1,5	0,9	0,5	0,8	<b>1,0</b>
<b>Moyenne annuelle</b>			<b>1,1</b>	<b>2,1</b>	<b>1,0</b>	<b>0,9</b>	<b>0,6</b>	<b>0,7</b>	<b>0,8</b>
<b>Ecart-type</b>			<b>0,6</b>	<b>0,9</b>	<b>0,6</b>	<b>0,4</b>	<b>0,4</b>	<b>0,5</b>	<b>0,3</b>
Arguin	G	26/03/01	1,1	0,7	0,3	0,8	0,4	0,6	<b>0,6</b>
Arguin	G	26/04/01	0,3	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	<b>0,1</b>
Arguin	G	23/05/01	0,9	1,8	0,4	0,2	0,1	0,1	<b>0,3</b>
Arguin	G	20/06/01	0,4	1,9	1,3	1,5	1,6	2,2	<b>1,5</b>
Arguin	G	23/07/01	1,4	3,7	2,6	1,5	1,2	1,4	<b>1,7</b>
Arguin	G	20/08/01							
<b>Moyenne annuelle</b>			<b>0,8</b>	<b>1,6</b>	<b>1,0</b>	<b>0,8</b>	<b>0,7</b>	<b>0,8</b>	<b>0,8</b>
<b>Ecart-type</b>			<b>0,4</b>	<b>1,2</b>	<b>0,9</b>	<b>0,6</b>	<b>0,6</b>	<b>0,8</b>	<b>0,6</b>
Arcachon essen	B	26/03/01	7,1	0,4	0,5	0,6	0,5	0,6	<b>0,6</b>
Arcachon essen	B	26/04/01	0,8	2,0	0,7	0,9	0,8	0,5	<b>0,9</b>
Arcachon essen	B	23/05/01	1,2	2,7	1,1	1,0	1,0	0,8	<b>1,1</b>
Arcachon essen	B	20/06/01	0,6	0,1	1,1	0,9	0,8	0,7	<b>0,8</b>
Arcachon essen	B	23/07/01							
Arcachon essen	B	20/08/01	3,3	4,0	3,0	1,0	0,8	1,8	<b>1,4</b>
<b>Moyenne annuelle</b>			<b>2,6</b>	<b>1,9</b>	<b>1,3</b>	<b>0,9</b>	<b>0,8</b>	<b>0,9</b>	<b>0,9</b>
<b>écart-type</b>			<b>2,4</b>	<b>1,5</b>	<b>0,9</b>	<b>0,2</b>	<b>0,1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,3</b>
Arcachon fond	C	26/03/01	7,8	2,0	0,6	0,6	0,7	0,6	<b>0,8</b>
Arcachon fond	C	26/04/01	0,1	2,5	1,3	0,6	0,8	0,1	<b>0,9</b>
Arcachon fond	C	23/05/01	1,0	3,7	0,4	0,9	0,3	0,3	<b>0,6</b>
Arcachon fond	C	20/06/01	0,7	0,4	1,1	0,6	0,7	0,6	<b>0,7</b>
Arcachon fond	C	23/07/01							
Arcachon fond	C	20/08/01	4,3	4,9	3,4	1,0	0,9	1,8	<b>1,5</b>
<b>Moyenne annuelle</b>			<b>2,8</b>	<b>2,7</b>	<b>1,4</b>	<b>0,7</b>	<b>0,7</b>	<b>0,7</b>	<b>0,9</b>
<b>écart-type</b>			<b>2,9</b>	<b>1,5</b>	<b>1,1</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>	<b>0,6</b>	<b>0,3</b>
La Vigne	D	26/03/01	5,2	1,2	0,8	0,3	0,9	0,9	<b>0,7</b>
La Vigne	D	26/04/01	1,0	1,9	1,8	0,8	0,8	0,5	<b>1,0</b>
La Vigne	D	23/05/01	1,2	3,6	0,7	0,9	0,2	0,2	<b>0,6</b>
La Vigne	D	20/06/01	1,0	0,3	0,7	0,9	0,4	0,7	<b>0,6</b>
La Vigne	D	23/07/01	0,3	2,0	1,7	1,3	0,9	1,5	<b>1,3</b>
La Vigne	D	20/08/01	2,4	3,3	4,6	1,0	1,1	1,8	<b>1,7</b>
<b>Moyenne annuelle</b>			<b>1,8</b>	<b>2,0</b>	<b>1,7</b>	<b>0,9</b>	<b>0,7</b>	<b>0,9</b>	<b>1,0</b>
<b>écart-type</b>			<b>1,6</b>	<b>1,1</b>	<b>1,4</b>	<b>0,3</b>	<b>0,3</b>	<b>0,6</b>	<b>0,4</b>



## **ANNEXE 3:**

**Représentations graphiques des variations saisonnières des paramètres physico-chimiques de l'eau du Bassin d'Arcachon pour l'année 2001  
(à partir des données IFREMER Arcachon, comm. pers.).**







## **ANNEXE 4:**

**Corrélations observées entre contaminants et biomarqueurs sur l'ensemble des sites.**



### Composés organostanniques

N = 37	MBT	DBT	TBT	TBT/DBT	N=18	CB 28	CB 52	CB 118	CB 153	CB 138	CB 180
AChE	-0,08	-0,07	-0,21	<b>-0,34</b>	AChE	<b>-0,51</b>	<b>-0,63</b>	-0,26	0,20	-0,27	-0,24
GST	0,23	0,24	0,28	0,17	GST	0,12	0,29	0,05	0,03	0,13	0,00
CAT	-0,31	-0,22	-0,30	-0,30	CAT	-0,35	-0,10	0,03	0,43	-0,05	-0,12
TBARS	<b>-0,41</b>	<b>-0,38</b>	-0,21	0,29	TBARS	0,19	<b>0,57</b>	0,10	0,17	0,42	0,26

### Polychlorobiphényles

### Métaux traces

N = 27	B	Al	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd	Rb	Sr	Pb
AChE	<b>-0,68</b>	-0,28	<b>-0,40</b>	<b>-0,40</b>	<b>-0,59</b>	-0,38	-0,36	0,22	0,14	0,03	0,33	0,25	-0,23	0,03	-0,34
GST	0,32	-0,01	-0,24	-0,08	0,00	-0,02	0,01	-0,25	-0,36	-0,38	<b>-0,44</b>	<b>-0,42</b>	-0,26	-0,35	0,00
CAT	<b>-0,48</b>	-0,07	-0,27	-0,02	-0,24	-0,28	-0,31	0,19	0,07	0,11	0,36	0,22	0,05	0,14	-0,20
TBARS	0,30	0,35	<b>0,49</b>	<b>0,49</b>	<b>0,46</b>	0,34	0,21	0,04	0,00	0,18	-0,02	0,00	<b>0,40</b>	0,28	0,33

### Hydrocarbures aromatiques polycycliques

N=22	N	Ay	Ae	Fe	DiBT	Phe	A	3 MP	2 MP	9 MP	1 MP	F	Pyr
AChE	0,40	0,29	0,43	0,23	0,02	-0,05	0,19	-0,10	-0,07	-0,08	-0,11	0,07	-0,03
GST	0,09	0,26	0,13	0,27	0,05	0,16	0,22	0,20	0,20	0,23	0,23	0,10	0,17
CAT	0,20	-0,02	-0,11	-0,24	-0,15	-0,22	-0,01	-0,26	-0,23	-0,25	-0,29	-0,12	-0,17
TBARS	-0,35	<b>-0,57</b>	<b>-0,67</b>	<b>-0,55</b>	<b>-0,51</b>	<b>-0,48</b>	<b>-0,63</b>	-0,45	-0,46	-0,46	-0,44	<b>-0,65</b>	<b>-0,58</b>

N=22	BaA	Chrys	BbkjF	BeP	BaP	lpyr	DahA	Bper	F/P	Phe/MP	Phe/A	BeP/BaP
AChE	-0,20	-0,21	-0,46	-0,19	-0,16	-0,32	-0,22	-0,05	<b>0,45</b>	-0,01	-0,40	-0,01
GST	0,26	0,37	0,27	0,25	0,15	0,04	0,09	-0,12	-0,32	0,09	0,11	0,14
CAT	-0,30	-0,36	-0,43	-0,30	-0,23	-0,34	-0,35	-0,01	0,14	-0,01	-0,30	-0,34
TBARS	-0,39	-0,30	0,02	-0,37	-0,44	-0,25	-0,35	-0,42	-0,13	0,37	0,26	0,00

Valeurs en **gras**: p<0,05; en **gras et soulignées**: p<0,01 ; en **gras et doublement soulignées**: p<0,001.



## **ANNEXE 5:**

**Publication 1: “*Microcosm tributyltin bioaccumulation and multi-biomarkers assessment in the blue mussel *Mytilus edulis**”, acceptée après révision à la revue “*Environmental Toxicology and Chemistry*”.**



# Microcosm tributyltin bioaccumulation and multi-biomarker assessment in the blue mussel *Mytilus edulis*.

Marie-Hélène DEVIER, Sylvie AUGAGNEUR, Hélène BUDZINSKI, Karyn LE MENACH, Laurent PELHUET, Pascal MORA, Jean-François NARBONNE, Philippe GARRIGUES.

Laboratoire de Physico- et Toxicochimie des Systèmes Naturels (LPTC),  
UMR 5472 CNRS, Université de Bordeaux 1, 351 Cours de la Libération,  
33405 Talence Cedex, France.

In press in "*Environmental Toxicology and Chemistry*".

## Abstract

Blue mussels *Mytilus edulis* were exposed to two different concentrations of TBT in seawater, 1000 ng Sn L<sup>-1</sup> (C1 experiment) and 10 ng Sn L<sup>-1</sup> (C2 experiment), for 4 days, in order to evaluate the bioaccumulation of TBT by mussels *Mytilus edulis* in microcosms and to test the ability of a multi-markers analysis to evidence the effects of TBT on the biochemical parameters in mussels. Tissue burdens of *Mytilus edulis* were 204 ± 7 and 2120 ± 4 ng Sn g<sup>-1</sup> TBT after the 4-day tests for the C2 and C1 experiments, respectively. Analyses of dissected organs and/or tissues demonstrated that TBT accumulated to the greatest extent in gills at the C1 experiment, and in digestive gland at the C2 experiment. BCF (bioconcentration factors) were 12 100 ± 300 and 2 000 ± 10 for mussels exposed in the C2 and C1 experiments, respectively. The four biomarkers used in this work were acetylcholinesterase (AChE), glutathion S-Transferase (GST), catalase (CAT) activities and thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) contents. No significant changes were observed in the measured enzyme activities or in TBARS concentration after the 4-day TBT exposure.

*Key words:* Tributyltin; blue mussels; bioaccumulation; biomarkers; enzymatic activities

## INTRODUCTION

Organotin compounds, and particularly tributyltin (TBT) and triphenyltin (TPT) are widely used as biocides in a variety of consumer and industrial products. Among them, antifouling paint leachates constitute the main input of TBT into the marine environment. The ecotoxicological hazards of triorganotin compounds were recognized after deleterious effects occurred in the late 1970s on oyster populations in Arcachon Bay in France [1]. French authorities regulated the use of TBT paints in 1982, followed by most of the developed countries in 1987 [2]. In spite of efforts to reduce their use, organotin compounds are still measured at high levels in marine environment [3-6].

The effects of TBT on gastropods were the most complete example of the effects of an endocrine disrupter chemical on marine invertebrates. TBT interfered with hormone metabolism, increasing the levels of androgens in the snails [7] and causing the appearance of male sex characters in female, termed imposex [7, 8] and intersex [9] for concentrations as low as  $1 \text{ ng Sn L}^{-1}$ . The TBT-mediated inhibition of the cytochrome P450-aromatase activity was proposed as the most probable mechanism [10] even if an interference with the phase II-metabolism resulting in reduced excretion of testosterone was proposed [11]. A recent work suggested that TBT could act as a neurotoxin to induce imposex via abnormal release of APGWamide neuropeptide [12]. Since neurohormones are key in molluscan sexual development, TBT may alter neurohormone secretion that secondarily affects the enzymes that control vertebrate-like steroid hormones turn-over [13], as earlier hypothesized by Féral and Le Gall [14]. In bivalves, TBT has been shown responsible for shell thickening and decreased spatfall in *Crassostrea gigas* (TBT >  $1 \text{ ng Sn L}^{-1}$ ) and induction of spermatogenesis in ovaries for various bivalves including *Crassostrea gigas*, *Ostrea edulis* and *Mytilus edulis* (TBT >  $10 \text{ ng Sn L}^{-1}$ ) [15]. Increases in the testosterone levels or imbalance in the androgens/estrogens ratio have been described in clams *Ruditapes decussata* after exposure to TBT [16]. In addition, the TBT-mediated inhibition of the cytochrome P450-aromatase activity was recently demonstrated in marine mussels [17].

The use of biomarkers measured at the molecular or cellular level have been proposed as sensitive "early warning" tools for biological effect measurement in environmental quality assessment [18]. The selected biomarkers should indicate that the organism has been exposed to pollutant (exposure biomarkers) and / or the magnitude of the organism's response to the pollutant (effect biomarkers or biomarkers of stress). Biomarkers are then defined as short-term indicators of long-term biological effects. In contrast to the simple measurement of contaminants accumulating in body tissues, they can offer more complete and biologically relevant information on the potential impact of toxic pollutants on the health of organisms [19]. A suite of four biomarkers were used in this work to evaluate the biological effects of a TBT exposure in blue mussels: acetylcholinesterase (AChE) activity, catalase (CAT) activity and thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) content, (both oxidative stress markers), and glutathione S-transferase (GST) activity (a phase II metabolism marker).

Bivalve molluscs, particularly mussels are routinely used as "sentinel" organisms in environmental monitoring programmes throughout the world because they are widely distributed, sedentary, relatively tolerant to a wide range of environmental conditions and filter-feeders that pump large volumes of water and bioconcentrate many chemicals in their tissues [20]. The aim of this work was to evaluate the bioaccumulation of TBT by mussels *Mytilus edulis* in microcosms at two different TBT concentrations (C1 =  $1000 \text{ ng Sn L}^{-1}$  and C2 =  $10 \text{ ng Sn L}^{-1}$ ) and to test the ability of a multi-markers analysis to evidence the biochemical effects of TBT in mussels. The C2 concentration of exposure was environmentally relevant as it was similar to those usually recorded in summer in the Arcachon marina (Arcachon Bay, France), whereas the C1 one was arbitrary chosen in order to compare bioaccumulation of TBT between high and moderate levels of exposure.

## MATERIALS AND METHODS

### *Reagents and standards*

Normapur glacial acetic acid, 37% hydrochloric acid, anhydrous sodium acetate and HPLC grade isooctane and methanol were purchased from Merck Eurolab (Darmstadt, Germany). Analytical grade chemicals and water deionised and further purified in a Milli-Q system (Millipore, USA) were used throughout. The glassware was washed with RBS (bactericidal agent), rinsed with Milli-Q water, decontaminated in a 10% (v/v) nitric acid solution for at least 24h, and then carefully rinsed again and dried.

Monobutyltin trichloride (MBT, >95%), dibutyltin dichloride (DBT, 97%), tributyltin chloride (TBT, 96%), tripropyltin chloride (TPrT, 98%), monophenyltin trichloride (MPT, 98%), diphenyltin chloride

(DPT, 96%), triphenyltin chloride (TPT, >95%) and tetrabutyltin (TeBT, 94%) were purchased from Strem Chemicals (Bischheim, France). Stock organotin solutions (about 1000 mg Sn L<sup>-1</sup>) were prepared in methanol. Working standards (10 mg Sn L<sup>-1</sup>) were gravimetrically prepared in Milli-Q water. They were stored refrigerated in the dark (one month) and diluted weekly in Milli-Q water to give the 1 mg L<sup>-1</sup> individual and mixed working solutions. Tripropyltin was used as internal standard and was prepared similarly.

The derivatization reagent was a 2% (w/v) aqueous solution of sodium tetraethyl borate (NaBEt<sub>4</sub>, Strem Chemicals, Bischheim, France; stored in a dry atmosphere) and was prepared just prior to use. This solution was purified by two successive extractions by isooctane to obtain lower blank values. The pH was controlled by means of 1M acetate buffer (pH 5). The latter was prepared by dissolving anhydrous sodium acetate in 1l Milli-Q water, followed by pH adjustment with glacial acetic acid.

### *Laboratory exposure experiments*

Specimens of blue mussels *Mytilus edulis* of uniform shell length (4-5 cm and 1.4 to 1.8 g soft body weight) used for these experiments were collected in December 2000 (for the 1000 ng Sn L<sup>-1</sup> TBT exposure, either the C1 experiment) and in June 2001 (for the 10 ng Sn L<sup>-1</sup> TBT exposure, either the C2 experiment) at Moulleau, at the entrance of the Arcachon Bay (France), in a location known to be not polluted by TBT and considered as reference site (Devier et al., in preparation). Mussels were determined to contain low residues of butyltin compounds (see below). Seawater was collected in the same location as mussels.

The exposure protocol consisted of a daily static renewal of water with cleaning of tanks with seawater. Seawater was continuously aerated to reach oxygen saturation (air-bubbler system). Temperature, pH, dissolved oxygen, salinity, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> and NO<sub>3</sub><sup>-</sup> contents were checked twice a day, before and after the seawater renewal. Nitrates and nitrites were not detected. The average temperature of the seawater was determined at 22 ± 2°C during both tests. The salinity of seawater was in the range of 32 ± 1, and pH of 8.06 ± 0.05 for the C1 experiment and salinity of 26 ± 4, pH of 8.20 ± 0.50 for the C2 experiment.

Two groups of 60 mussels (C2 experiment) and 40 mussels (C1 experiment) each were placed in two glass aquaria (control and exposure tanks) containing 20 l of seawater. Mussels were fed twice a day with Marine Liquifry, a commercial nutritive solution for marine invertebrates (50 µl/individual/day). Mussels were allowed to acclimatize for four days in aerated seawater before the beginning of the contamination. After this acclimatization period, mussels were randomly redistributed in the two tanks. No mussels died during either experiment.

Experiments were conducted for 4 days. For the C1 experiment, two ml of a 10 mg Sn L<sup>-1</sup> TBT solution in Milli-Q water were added to the exposure tank in order to obtain a nominal concentration of 1000 ng Sn L<sup>-1</sup> TBT in the aquarium and the same standard solution was used during the exposure period. For the C2 experiment, two ml of 100 µg Sn L<sup>-1</sup> TBT in Milli-Q water were prepared daily and added to the exposure tank in order to obtain a nominal concentration of 10 ng Sn L<sup>-1</sup> TBT in the aquarium. Mean TBT concentrations in these aquaria were 1060 ± 60 ng Sn L<sup>-1</sup> TBT and 12 ± 1 ng Sn L<sup>-1</sup> TBT, respectively.

### *Sampling*

200 ml seawater samples were collected in triplicate from control and exposure tanks just before and after the water renewal. Water analyses were immediately performed.

Mussel sampling was performed every morning during the water renewal and then every day until day 4 in the exposure tank, and at days 0 and 4 in the control tank. The contaminated mussel tissues were rinsed with Milli-Q water before processing and storage. For the C1 experiment, eight mussels were sampled for organotin determination (two whole bodies and a pool of six digestive glands and six gills). For the C2 experiment, two whole body mussels were used for organotin compounds determination; the remaining mussels at day 4 were dissected in gills, digestive glands and remaining tissues were pooled. Six digestive glands and gills were immediately dissected out and individually stored in eppendorf tubes at -80°C for biomarkers measurements.

### *Evaluation test of TBT degradation in continuous air-bubbling aquarium*

The aim of this test was to evaluate the complex processes which give rise to a decrease in TBT concentration in the water column after each contaminant addition, due to adsorption on aquaria surfaces, volatilisation, photodegradation, microbial activity and chemical reaction with oxygen during the aeration of the seawater.

Seawater of each 20l-aquarium was contaminated with 1000 ng Sn L<sup>-1</sup> TBT and maintained for 4 days under different test conditions: one aquarium was continuously air-bubbled and maintained under light exposure, a second one was maintained under light exposure without water oxygenation, and a third one was maintained in the dark without water oxygenation. Temperature was in the range 21 ± 1°C, pH was 7.8 and salinity was 28.

### *Organotin analysis*

#### *Mussel tissues*

Mussel samples were freeze-dried and homogenized with a blender. The extraction protocol was adapted from Carlier-Pinasseau [21]. 0.2g of lyophilised mussel sample was introduced in a glass flask with a 1 µg Sn mL<sup>-1</sup> TPrT solution and 2.5 ml of methanol. Flasks were gently shaken for one night. 12.5 ml of 0.15M HCl in methanol were then added and the mixture was shaken (rotative shaking table) for 1h, followed by pH adjustment to 5 with sodium acetate buffer. In situ ethylation was carried out by addition of 1 ml of a 2% NaBEt<sub>4</sub> solution in the presence of 1 ml of isooctane. The mixture was vigorously shaken for 30 min. Milli-Q water was added to obtain about 3 cm high level in the narrow neck (1 cm i.d.). After decantation, the 1 ml supernatant plus the 1 ml underlying aqueous phase was transferred into a 2 ml eppendorf tube and centrifuged for 5 min at 10 000 rpm at 4°C. Aliquots of 500 µl of the isooctane extracts were transferred into auto sampler vials and analysed by GC-AED within 24h without any purification step.

#### *Seawater*

Seawater samples were stored refrigerated at 4°C in the dark until laboratory analysis (within 1 day). The extraction protocol was adapted from Michel and Averty [22]. 50 µl of a daily prepared 100 ng Sn mL<sup>-1</sup> TPrT solution was used as internal standard. Ethylation of organotin compounds was performed in a 250-ml flask with a narrow neck (1 cm i.d.) using a magnetic stirring rod, and pH was adjusted to 5 with 5 ml of sodium acetate buffer. 100 µl of a 2% NaBEt<sub>4</sub> solution was added and the mixture was stirred for 10s. The reaction was allowed to develop for 10 min in the dark, before the extraction of the derivatives by means of 500 µl of isooctane with vigorous magnetic stirring for 15 min. Milli-Q water was added to obtain about 3 cm high level in the narrow neck. After decantation, the 0.5 ml supernatant plus the 1 ml underlying aqueous phase was transferred into a 2 ml eppendorf tube and centrifuged for 5 min at 10 000 rpm at 4°C. Aliquots of 200 µl of the isooctane extracts were transferred into auto sampler vials and immediately analysed by GC-AED.

### *Gas Chromatography / Helium Atmospheric pressure Microwave-induced Plasma / Atomic Emission Detection (GC-MIP-AED) and procedure performance*

The ethylated organotin species were separated on a SPB-5 capillary column (30m length x 0.320 mm i.d. x 0.25 µm film thickness, Supelco, USA) using a HP 6890 Series GC equipped with a split/splitless injection port (HP 6890 Series automatic sampler) operated at 280°C in the pulsed splitless flow mode (207 kPa, for 1 min), and detection was achieved at the Sn 326 nm wavelength with an HP G2350A Atomic Emission Detector (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA). Data were handled using a HP G2360A Chemstation. The plasma and carrier gas used for GC was helium, and the reagents gases were hydrogen and oxygen; all gases were supplied by Linde gas (France) at =99.99999% purity. 1 microliter of sample was injected on the chromatographic column at a flow of 2 ml.min<sup>-1</sup> and oven temperature program was as follows: an initial temperature of 60°C was held for 1 min and raised at a rate of 20°C.min<sup>-1</sup> to 200°C (for 1 min) and further at a rate of 10°C.min<sup>-1</sup> to 250°C (for 5 min). The detector transfer line (HP-5 capillary column; Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA) and the cavity were both kept at 280°C. In the cavity, the column effluent was mixed with helium make-up gas at a flow rate of 230 ml min<sup>-1</sup>. The solvent vent-off time was set at 3.5 min. Hydrogen at 103 kPa and oxygen at 138 kPa were used as plasma dopants.

The tin derivatives were quantified using chromatographic peak areas normalised to the tripropyltin (TPrT) internal standard. The accuracy of the analytical procedure was monitored by periodic analyses of a certified reference material of mussel tissues, CRM 477, together with biological

samples series. This material, provided by the European Commission (Standard, Measurement and Testing Programmes, Brussels), is certified for TBT, DBT and MBT contents ( $0.90 \pm 0.08$ ,  $0.78 \pm 0.06$  and  $1.01 \pm 0.19 \mu\text{g Sn g}^{-1}$ , respectively) and an indicative value for TPT is also given ( $0.5 \mu\text{g g}^{-1}$ ). The results obtained for the determination of organotin compounds in the certified material were in good agreement with the certified values for all the compounds and good reproducibility was obtained (Table 1). Limits of quantification, calculated as three times baseline noise, were  $1 \text{ ng Sn g}^{-1}$  for butyltins in mussel tissues. For seawater samples, the limit of quantification was  $0.3 \text{ ng Sn L}^{-1}$ , with the exception of MBT ( $0.6 \text{ ng Sn L}^{-1}$ ).

Throughout this paper the organotin salts and their ethylated derivatives are indicated by the same abbreviations. All organotin concentrations reported in this paper are expressed as tin on a dry weight basis ( $\text{ng Sn g}^{-1} \text{ d.w.}$ ).

### *Biomarkers measurements*

Six mussels were sampled each day during the water renewal. The digestive glands and gills were immediately dissected out and individually stored at  $-80^\circ\text{C}$ . For the post-mitochondrial fraction preparation (S9), individual digestive glands and gills were homogenised in a pH 7.4 phosphate buffer (1:3, w/v) and centrifuged at  $10\,500 \times g$  for 30 min. The supernatant was stored at  $-80^\circ\text{C}$  until analysis. Biomarkers measurements were performed on 6 individuals, in gills for AChE and in digestive glands for GST, TBARS and catalase. The S9 protein concentrations were determined by the Bradford method using bovine serum albumin as standard [23] by microplate-reading UV-spectrophotometer (Biotek FL600). Protein yields were measured and expressed as protein content per milliliter of S9 fraction of gills and digestive glands.

The glutathione-S-transferase (GST) activity was measured at 340 nm by using a differential UV-spectrophotometer (Perkin Elmer 550 S) and performed according to Habig [24], using CDNB as substrate at 1 mM (pH 7.4). The acetylcholinesterase (AChE) activity was measured according to protocol adapted from Ellman [25] by microplate-reading UV-spectrophotometer at 405 nm, using acetylthiocholine as substrate (1 mM) at  $25^\circ\text{C}$  with DTNB in 0.1M phosphate buffer (pH 7.4) [26]. The catalase (CAT) activity was determined according to Claiborne [27] by measuring the decrease in hydrogen peroxide (30 mM) concentration at 240 nm by differential UV-spectrophotometer. The level of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) resulting from lipid peroxide breakdown was evaluated according to protocol adapted from Buege and Aust [28] and quantified at 530 and 590 nm by microplate-reading UV-spectrophotometer. Results were expressed as  $\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  of protein for GST and AChE activities, as  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  of protein for catalase activity and in  $\mu\text{M}$  of S9 post-mitochondrial fraction for TBARS contents. The four biomarkers were determined on the same individual and measurements performed on 6 individuals.

### *Statistical analysis*

Results are expressed as mean  $\pm$  SD. Statistical significance was assessed by using MANOVA, followed by Tukey's test (STATISTICA 5.5 software).

## RESULTS AND DISCUSSION

### *Evaluation test of TBT degradation in continuous air-bubbling aquarium.*

*Photodegradation effect.* No significant effect was observed between the light exposed and the tank maintained in the dark. Losses of butyltins could be mainly attributed to adsorption on aquaria surfaces and/or volatilisation processes.

*Seawater oxygenation effect.* The average decrease of TBT concentration during a 24h cycle was about 35%. This decrease followed a second order kinetic ( $[\text{TBT}] = 0.07t^2 - 0.51t + 1.1$ ;  $R^2 = 0.99$ ) (Figure 1). This percentage of TBT loss may have a strong influence on the bioconcentration factors reported by authors who have used microcosms under continuous water oxygenation [16, 29, 30]. An important increase in the inorganic tin detected by GC-AED was observed (Figures 1 and 2), compared to the tests without water oxygenation (by a factor of 5, if expressed as the Sn / TPrT area ratio in Figure 1). The seawater oxygenation leads to TBT volatilisation and to direct TBT degradation in inorganic tin, as MBT and DBT concentrations were constant and similar in all treatments. Moreover, two unidentified butyltin compounds (named OX1-BT and OX2-BT) (Figure 2), appeared in this test condition. They respectively represented around 3% and 1% of the initial TBT concentration in

water (formation rate of about 30 and 10 ng Sn L<sup>-1</sup> per day, respectively, for a nominal TBT concentration of 1000 ng L<sup>-1</sup>). These tin compounds are supposed to contain a hydroxybutyl group or an oxobutyl group in a TBT (or even DBT) molecule, due to their formation under water bubbling. They were also quantified to estimate the proportion of these oxygenated species in TBT bioaccumulated by mussels. GC-MS identification was not possible due to the low level of these two compounds. With regard to the elevated levels of OX1-BT and OX2-BT compounds accumulated in mussels, particularly for the C2 experiment (i.e. for realistic environmental exposure level), further investigations are needed for their identification.

The permanent aeration of the seawater could play an important role in TBT bioavailability due to changes in TBT speciation by means of the formation of oxygenated species of butyltin compounds. These compounds could have greater bioavailability and their formation in this exposure system could result in slight changes in the impact of TBT on mussels, in terms of bioaccumulation and toxicity.

#### *Butyltin compounds in seawater*

The static renewal exposure resulted in different TBT concentrations in water at the beginning and at the end of each 24-hour exposure period (Table 2). For the C1 experiment, concentrations in water just before the water renewal fell to 30 ng L<sup>-1</sup> for the first day of exposure, up to 150 ng L<sup>-1</sup> for the fourth day of exposure (whose 35% of TBT losses could be attributed to the water oxygenation; see the evaluation test of TBT degradation section). The day by day increase in TBT concentration remaining in water after 24h of exposure may indicate a decrease in TBT bioaccumulation by mussels, due to reduced filtration rate. TBT metabolites (MBT and DBT) were detected in water and they represented 76% of total butyltin compounds. For the C2 experiment, concentrations in water just before the water renewal fell to 5 ng L<sup>-1</sup> and MBT and DBT total concentration was about 70% of total butyltin compounds. TBT was not the major form of butyltin recovered in the contaminated seawater throughout the experiment. DBT was the major butyltin compound in the C1 experiment and MBT predominated in the C2 experiment.

#### *TBT bioaccumulation by mussels*

Blue mussels *Mytilus edulis* were exposed to two different concentrations of TBT in seawater (10 and 1000 ng Sn L<sup>-1</sup>) for 4 days and the butyltin concentrations in water and mussels, as well as background concentrations determined at the end of the acclimatization period on control mussels, were recorded in Table 2. Control mussels were determined to have a small concentration of butyltins (about 100 ng g<sup>-1</sup>). Since they are by no means negligible, background values have been subtracted from measured biota values and were also taken into account in the BCF data.

TBT tissue burdens of *Mytilus edulis* were 2120 ± 4 and 204 ± 7 ng g<sup>-1</sup> after the 4-day tests for the C1 and C2 experiments, respectively (Table 2). A general increase in tissue burdens with increasing TBT concentrations was observed, indicating that partitioning of TBT between seawater and mussels was an important accumulation mechanism (Figure 3). TBT accumulation kinetic was linear in the two experiments and rate constants for uptake were 0.52 ± 0.07 L g<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup> = 0.988) and 3.60 ± 0.50 (R<sup>2</sup> = 0.901) for the C1 and C2 experiments, respectively. A lower proportion of TBT metabolites in mussel tissues was found in the highest TBT exposure level, underlying the limited capacity of mussels for metabolising TBT. Furthermore, the OX1-BT and OX2-BT compounds were accumulated to a greater extent i) than TBT for the C2 experiment and ii) in the C2 compared with the C1 experiment. In a previous study [29], *M. edulis* exposed to 8 ng Sn L<sup>-1</sup> TBT in a flow-through system reached a tissue concentration of approximately 400 ng g<sup>-1</sup> d.w. after 25 days (steady state). The slightly greater TBT bioaccumulation rate by mussels in our study might be due to differences in size of sampled mussels (3 – 3.5 cm in Guolan and Yong) and in the test conditions (static renewal and flow-through systems). In other studies, clams were exposed in a similar static renewal system; clams *Venerupis decussata* exposed at about 30 ng L<sup>-1</sup> reached a TBT tissue concentration of 240 ng g<sup>-1</sup> d.w. at day 4 (based on the calculated rate constant for uptake) [30] and clams *Ruditapes decussata* exposed to about 90 ng L<sup>-1</sup> reached a tissue concentration of approximately 270 ng g<sup>-1</sup> d.w. after a 7-day test [16]. A similar tissue concentration in mussels *Mytilus edulis* for a lower exposure level was obtained in the present work, indicating that *Mytilus edulis* is a better bioindicator of TBT exposure. Furthermore, it is worth noting that animals were also fed in the studies mentioned above, except in the experiments conducted by Gomez-Ariza et al. [30] where animals were not exposed during the feeding days. Thus, feeding mussels could not solely account for the slightly greater TBT accumulation in our study.

Analyses of dissected organs and/or tissues demonstrated that TBT accumulated to the greatest extent in gills during the C1 experiment, with TBT concentration approximately three times that of whole animal homogenates, and in digestive gland in the C2 experiment. Butyltin accumulation in tissues followed the concentration order from the highest to the lowest: gills >> digestive gland > whole body > remaining tissues (C1 experiment) and digestive gland > whole body > remaining tissues > gills (C2 experiment). Laughlin et al. have reported that absorption of <sup>14</sup>C-labeled tributyltin oxide by various organs of *Mytilus edulis* was greatest in gill and viscera, indicating a partitioning process within the animals [32]. Final burdens of TBT in tissues appeared to be dependent on its proportional lipid contents and followed the concentration order from the highest to the lowest: gills > viscera >> mantle > adductor muscle. The difference observed in tissue distribution of TBT in this study between the two exposure levels could be related to the two different routes of TBT uptake by mussels under our experimental conditions: accumulation in the digestive system (trophic route), and adsorption of TBT by gills (direct route). As animals were fed during the exposure period (with a commercial solution for filter-feeding invertebrates), hydrophobic partitioning of TBT between water and food could have occurred. Although the aqueous phase is the most important way of TBT uptake by filter-feeding bivalves, the loading of TBT adsorbed on fine particles of food ingested by mussels, compared to TBT dissolved in water, could account for a more important process of TBT accumulation in the digestive system during exposure at the lowest TBT dose (C2 experiment). Furthermore, as seawater collected in the Arcachon Bay was not filtered before use in the laboratory experiments, an other factor that could have influenced TBT partitioning in tissues is the different content of particulate matter in the seawater, collected in winter for the C1 experiment and in summer for the C2 experiment. Rivaro et al. [31] have reported that, in winter, when the waters are lower in particulate matter, the loading of TBT contained in gills of *Mytilus galloprovincialis* had an important role; on the contrary, the loading of TBT found in digestive glands was important in summer when the waters are higher in particulate matter to which butyltins could associate and ingested by mussels. A different trend from that of butyltins was observed for the unidentified compounds (OX-BTs). Although butyltins predominated at the C1 experiment for each tissue, unidentified compounds (OX-BTs) were in majority at the C2 experiment. They were accumulated to a greater extent in digestive glands in both exposure levels. This pattern could be due to a high lipophilic character of these oxygenated butyltin compounds.

Bioconcentration factors (extrapolated bioaccumulation factor, since mussels were fed throughout the exposure period) were calculated by the following equation [31]:  $BCF = \text{TBT concentration in mussel tissues (ng kg}^{-1} \text{ d.w.)} / \text{TBT concentration in seawater (ng L}^{-1})$ . They were  $2\,000 \pm 10$  and  $12\,100 \pm 300$  for mussels exposed in the C1 and C2 experiments, respectively (Table 3). BCF was highest at the lowest exposure concentration. This result was in accordance with other studies where *Mytilus edulis* has been found to absorb TBT from seawater and TBT-exposed phytoplankton with bioconcentration factors conversely proportional to the TBT-source aqueous concentration [29, 32, 33]. BCF were highest in gills (5600) in the C1 experiment and in digestive glands (23400) in the C2 experiment. With regard to the short exposition period (steady-state not reached), it is difficult to compare BCF obtained in this study with those reported for bivalves by several authors. However, they were consistent with BCF obtained for *Mytilus edulis* (5000 w.w., [32]; 1500-7300 w.w., [34]; 7700-11000 w.w., [29]), clams *Ruditapes decussata* (370-590 w.w.) [16] and *Venerupis decussata* (11000-39000 d.w.) [30]. When mussels *Mytilus edulis* were exposed to  $8 \text{ ng Sn L}^{-1}$  TBT in a flow-through system (and intermittently fed with algae *Dunaliella sp.*), Guolan and Yong [29] found BCF about 10 000 (w.w.) after a 60-day test. Slight differences found between BCF values could be attributed to the sizes of the sampled mussels and to the exposure system, although BCF was expected to be higher in a flow-through system. Clam *Ruditapes decussata* exposed to  $90 \text{ ng Sn L}^{-1}$  TBT in a static renewal system for 7 days (and intermittently fed with a commercial plankton preparation) exhibited relatively lower BCF of about 400 (w.w.), indicating that *Mytilus edulis* is a better bioindicator of TBT exposure.

### *Biomarkers of TBT toxicity*

Enzymatic activities and TBARS contents obtained in mussels during the C2 experiment are represented in Table 4. No significant changes were observed in the measured activities and in TBARS concentrations after the 4day TBT exposure (Figure 5), since neither a TBT exposure effect and nor exposure time effect were significant. Inhibition of GST by organotin compounds was already observed in marine fishes [35] Torres and Mason [36] have reported that the efficiency of molluscan GST from the garden snail, *Helix aspersa*, is greatly reduced *in vitro* by the presence of  $10 \mu\text{M}$  TBT (either approximately  $1.2 \text{ mg Sn L}^{-1}$ ). The inhibition of AChE by organomercurial compounds in the ray

*Torpedo californica* has also been demonstrated [37]. But a recent study has shown that AChE activity was not affected in adult freshwater fish *Astyanax bimaculatus* exposed to TBT dissolved in corn oil (about 25 ng Sn g<sup>-1</sup>) every 6 days for 32 days [38]. In our study, no changes were observed at the biochemical level using these biomarkers in mussels. The reason could be that either measured biochemical parameters are not sensitive to environmental TBT contamination, as supported by Oliveira Ribeiro et al. [38] for AChE activity, or TBT exposure time was too short to register biomarkers responses.

#### *Preliminary results on endogenous steroid levels*

A phase I metabolism biomarker was also used in this work to evaluate the biological effects of a TBT exposure in blue mussels, as testosterone metabolism via endogenous steroid level measurements. The steroids levels were checked in the C2 experiment (results not shown).

The steroids extraction protocol was described somewhere else (Budzinski et al., in preparation). Briefly, lyophilised mussel digestive glands were extracted using a focused microwave extraction system. Samples were further extracted and purified by SPE, derivatized with MSTFA (MSTFA-Mercaptoethanol-NH<sub>4</sub>I) and then analysed by GC-MS. The estrogens (estradiol and estrone) were not detected in the mussel digestive glands by GC-MS. Testosterone and androstenedione were not detected in all samples and were difficult to quantify, as testosterone was close to detection limits and androstenedione suffered from some matrix interferences. The preliminary results obtained on those steroids should be considered with caution. Progesterone and pregnenolone were easily quantified compared to others steroids as they showed higher concentrations in mussel tissues and cleaner chromatograms.

Progesterone (Pg) and pregnenolone (Pn) levels in digestive glands of mussels were reported in function of TBT concentration in females and males, for both control and exposed mussels (Figure 6). An effect of the contamination was statistically demonstrated but no effect of sex was observed ( $p=0.07$ ). Among detected steroids, only decreases in progesterone and pregnenolone concentrations were significant in both sexes after a 4-day TBT exposure ( $p<0.04$  and  $p<0.03$  for progesterone and pregnenolone, respectively). To our knowledge, it was the first time that progesterone levels in molluscs had been used to check a contamination effect. TBT exposure was shown to cause a decrease in the progesterone levels in both sexes. Further investigations must be performed on progesterone, a precursor of androgens, in order to assess any endocrine disrupter effect. Some authors have already proposed progesterone (as well as estradiol) as regulator of sexual activity in bivalves [39, 40]. Although testosterone has been shown to be a useful biomarker of TBT toxicity in molluscs [8, 16], no evidence of a significant increase in androgen levels in both sexes was observed for this TBT contamination level. In the present state of the protocol development, it is not yet possible to evidence any endocrine disruption induced by TBT in mussels based on the steroid study.

## **CONCLUSION**

Bivalve mussels *Mytilus edulis* were used in a short-term laboratory study in order to evaluate the effects of TBT on mussels such as bioaccumulation, tissue distribution of organotins, and enzymatic activities disturbances.

A preliminary test on the degradation of TBT in a static renewal system has shown that continuous water oxygenation leads i) to degradation of TBT in inorganic tin and ii) to the formation of two unidentified organotin compounds that are supposed to be oxygenated species of butyltin compounds. Losses of TBT was 35% after 24-hour for a nominal TBT concentration of 1 000 ng L<sup>-1</sup>. Permanent aeration of the seawater could play an important role in TBT bioavailability due to changes in TBT speciation by means of the formation of oxygenated species of butyltin compounds.

Tissue burdens of *Mytilus edulis* were  $2120 \pm 4$  and  $204 \pm 7$  ng Sn g<sup>-1</sup> after the 4-day tests for the C1 and C2 experiments, respectively. Analyses of dissected organs and/or tissues demonstrated that TBT accumulated to the greatest extent in gills during the C1 experiment, with TBT concentration approximately three times that of whole animal homogenates, and in digestive gland during the C2 experiment. BCF were  $2\ 000 \pm 10$  and  $12\ 100 \pm 300$  for mussels exposed in the C1 and C2 experiments, respectively. The OX1-BT and OX2-BT compounds, formed under water oxygenation, were accumulated to a greater extent i) than TBT for the C2 experiment and ii) in the C2 compared with the C1 experiment.

No significant changes were observed in the measured activities and in TBARS concentrations after the 4-day TBT exposure. The reason could be that either measured biochemical parameters are

not sensitive to environmental TBT contamination, or TBT exposure time was too short to register biomarkers responses.

Preliminary results on endogenous steroids in mussels have shown that TBT exposure caused a significant decrease in progesterone and pregnenolone levels in both sexes, although endocrine disruption induced by TBT in mussels, based on the steroid study, could not be definitively determined.

## Acknowledgments

The French Ministry of Research is acknowledged for the PhD grant of one of us (M.H. Devier). The Conseil Régional d'Aquitaine is also acknowledged for partial fundings of equipment (grant number 9804024). Financial support was also received from the European Union through the BEEP Project (contract number EVK3-CT-2000-00025). Members of the laboratory LCABIE from the Université de Pau et des Pays de l'Adour and particularly Brice Bouyssière are also acknowledged for technical advises in GC-AED experiments.

## References

1. Alzieu C, Heral M, Thibaud Y, Dardignac MJ, Feuillet M. 1982. Influence des peintures antisalissures à base d'organostanniques sur la calcification de la coquille de l'huître *Crassostrea gigas*. *Rev Trav Inst Peches Marit* 45:101-116.
2. Alzieu C. 1991. Environmental problems caused by TBT in France. Assessment, regulation, prospects. *Mar Pollut Bull* 32:7-17.
3. Minchin D, Ohlmann J, Duggan CB, Stroben E, Keatinge M. 1995. Marine TBT antifouling contamination in Ireland, following legislation in 1987. *Mar Pollut Bull* 30:633-639.
4. Page DS. 1995. A six-year monitoring study of TBT and DBT in mussel tissues from the Lynher River, Tamar Estuary, UK. *Mar Pollut Bull* 30:746-749.
5. Chau YK, Maguire RJ, Brown M, Yang F, Batchelor SP. 1997. Occurrence of organotin compounds in the Canadian aquatic environment five years after regulation of antifouling use tributyltin. *Water Qual Res J Canada* 32:453-521.
6. Michel P, Averty B, Andral B, Chiffolleau JF, Galgani F. 2001. Tributyltin along the coasts of Corsica (Western Mediterranean): A persistent problem. *Mar Pollut Bull* 42:1128-1132.
7. Spooner N, Gibbs PE, Bryan GW, Goal LJ. 1991. The effect of tributyltin upon steroid titres in the female dogwhelk, *Nucella lapillus*, and the development of imposex. *Mar Environ Res* 32:37-49.
8. Bettin C, Oehlmann J, Stroben E. 1996. TBT-induced imposex in marine neogastropods is mediated by an increasing androgen level. *Helgol Meeresunters* 50:299-317.
9. Bauer B, Fioroni P, Die I, Liebe S, Oehlmann J, Stroben E, Watermann B. 1995. TBT effects on the female genital system of *Littorina littorea*: a possible indicator of tributyltin pollution. *Hydrobiologia* 309:15-27.
10. Matthiessen P, Gibbs PE. 1998. Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. *Environ Toxicol Chem* 17:37-43.
11. Ronis MJJ, Mason AZ. 1996. The metabolism of testosterone by the periwinkle (*Littorina littorea*) in vitro and in vivo: Effects of tributyltin. *Mar Environ Res* 42:161-166.
12. Oberdöster E, McClellan-Green P. 2001. The neuropeptide APGWamide induces imposex in the mud snail, *Ilyanassa obsoleta*. *Peptides* 21:1321-1330.
13. Oberdöster E, Cheek AO. 2000. Gender benders at the beach: endocrine disruption in marine and estuarine organisms. *Environ Toxicol Chem* 20:23-36.
14. Féral C, LeGall S. 1983. The influence of a pollutant factor (tributyltin) on the neuroendocrine mechanism responsible for the occurrence of a penis in the females of *Ocenebra erinacea*. In Lever J, Boer H, eds, *Molluscan Neuroendocrinology*. North Holland Publishing, Amsterdam, The Netherlands, pp 173-175.
15. Alzieu JH, Michel P, Tolosa I, Bacci E, Mee LD, Readman JW. 1991. Organotin compounds in the Mediterranean: a continuing cause of concern. *Mar Environ Res* 32:261-270.
16. Morcillo Y, Ronis MJJ, Porte C. 1998. Effects of tributyltin on the phase I testosterone metabolism and steroid titres of the clam *Ruditapes decussata*. *Aquat Toxicol* 42:1-13.
17. Morcillo Y, Abalat A, Porte C. 1999. Mussels as sentinels of organotin pollution: bioaccumulation and effects on P450-mediated aromatase activity. *Environ Toxicol Chem* 18:1203-1208.

18. McCarthy JF, Shugart LR. 1990. Biomarkers of environmental contamination. Lewis publishers, Boca Raton, FL, USA, pp 3-14.
19. Van der Oost R, Goksoyr A, Celander M, Heida H, Vermeulen NPE. 1992. Biomonitoring of aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*): II. Biomarkers: pollution-induced biochemical responses. *Aquat Toxicol* 36:189-222.
20. Widdows J, Donkin P. 1992. Mussels and environmental contaminants: Bioaccumulation and physiological aspects. In Gosling E, ed, The mussel *Mytilus*: Ecology, physiology, genetics and culture. Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands, pp 383-424.
21. Carlier-Pinasseau C, Astruc A, Lespes G, Astruc M. 1996. Determination of butyl- and phenyltin compounds in biological material by gas chromatography-flame photometric detection after ethylation with sodium tetraethylborate. *J Chromatogr A* 750:317-325.
22. Michel P, Averty B. 1991. Tributyltin analysis in seawater by GC-FPD after direct aqueous-phase ethylation using sodium tetraethylborate. *Applied Organomet Chem* 5:393-397.
23. Bradford M. 1976. A rapid and sensitive assay of protein utilizing the principle of dye binding. *Analyt Biochem* 772:248-264.
24. Habig WH, Pabst, Jakoby B. 1974. The enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249:7130-7139.
25. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone R Jr. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7:88-95.
26. Mora P, Michel X, Narbonne JF. 1999. Cholinesterase activity as potential biomarker in two bivalves. *Environ Toxicol Pharmacol* 7:253-260.
27. Claiborne A. 1985. Catalase activity. In Greenwald RA, ed, Handbook of methods for oxygen radical research, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp 283-284.
28. Buege JA, Aust SD. 1978. Mitochondrial lipid peroxidation. *Meth Enzymol* 50:302-310.
29. Guolan H, Yong W. 1995. Effects of tributyltin chloride on marine bivalve mussels. *Wat Res* 29:1877-1884.
30. Gomez-Ariza JL, Morales E, Giraldez I. 1999. Uptake and elimination of tributyltin in clams, *Venerupis decussata*. *Mar Environ Res* 47:399-413.
31. Rivaro P, Frache R, Leardi R. 1997. Seasonal variations in levels of butyltin compounds in mussel tissues sampled in an oil port. *Chemosphere* 34: 99-106.
32. Laughlin RB, French W Jr, Guard HE. 1986. Accumulation of bis(tributyltin) oxide by the marine mussel *Mytilus edulis*. *Environ Sci Technol* 20:884-890.
33. Salazar MH, Salazar SM. 1996. Mussels as bioindicators: Effects of TBT on survival, bioaccumulation and growth under natural conditions. In Champ MA, Seligman PF, eds, Organotin – Environmental fate and effects. Chapman and Hall, London, chapter 15.
34. Laughlin RB, French W. 1988. Concentration dependence of bis(tributyltin) oxide accumulation in the mussel *Mytilus edulis*. *Environ Toxicol Chem* 7: 1021-1026.
35. Al-Ghais SM, Ali B. 1999. Inhibition of glutathion-S-transferase catalysed xenobiotic detoxication by organotin compounds in tropical marine fish tissues. *Bull Environ Contam Toxicol* 62:207-213.
36. Torres R, Mason AZ. 2002. The effect of tributyltin (TBT) on glutathione-S-transferase (GST) of the common garden snail, *Helix aspersa*. Molecular Toxicology Laboratory, Department of Biological Sciences, California State University, Long Beach, CA, USA. [http://www.cnsu.edu/programs/nsfs/students/current/research/ronnatorres/ronna\\_introduction.html](http://www.cnsu.edu/programs/nsfs/students/current/research/ronnatorres/ronna_introduction.html).
37. Kreimer DI, Dolgina EA, Raves M, Sussman JL, Silman I, Weimer I. 1994. A metastable state of *Torpedo californica* acetylcholinesterase generated by modification with organomercurials. *Biochem* 33:14407-14418.
38. Oliveira Ribeiro CA, Schatzmann M, Silva de Assis HC, Silva PH, Pelletier E, Akaishi FM. 2002. Evaluation of subchronic effects of TBT in tropical freshwater fish (*Astyanax bimaculatus*, Linnaeus 1758). *Ecotoxicol Environ Safety* 51:161-167.
39. Reis-Henriques MA, LeGellec D, Remy-Martin JP, Adessi GL. 1990. Studies of endogenous steroids from the marine mollusc *Mytilus edulis* by gas chromatography and mass spectrometry. *Comp Biochem Physiol B* 95:303-309.
40. Siah A, Pellerin J, Benosman A, Gagné JP, Amiard JC. 2002. Seasonal gonad progesterone pattern in the soft-shell clam *Mya arenaria*. *Comp Biochem Physiol A* 132: 499-511.

**Table 1:** Results for the determination of organotin compounds in the certified reference mussel tissues CRM 477 (data are expressed in  $\mu\text{g Sn g}^{-1}$  d.w.).

	MBT	DBT	TBT	MPT	DPT	TPT
C1 experiment <sup>a</sup>	0.96 ± 0.11	0.75 ± 0.09	0.89 ± 0.09	0.39 ± 0.06	0.03 ± 0.01	0.56 ± 0.14
C2 experiment <sup>b</sup>	0.99 ± 0.06	0.75 ± 0.01	0.98 ± 0.01	0.44 ± 0.04	0.04 ± 0.00	0.64 ± 0.01
Certified values	1.01 ± 0.19	0.78 ± 0.06	0.90 ± 0.08	nc	nc	0.50*

\* Indicative value. <sup>a</sup> n = 12. <sup>b</sup> n = 4. nc = non certified.

**Table 2:** Bioconcentration of TBT by mussels exposed to TBT in seawater for 4 days.

	C1 experiment		C2 experiment	
	T = 0h <sup>b</sup>	T = 24h <sup>c</sup>	T = 0h	T = 24h
<u>Experimental aqueous [TBT] <sup>a</sup></u>				
TBT	1061 ± 35	70 ± 1	11,9 ± 0,5	5,7 ± 1,0
DBT	30 ± 2	131 ± 1	0,3 ± 0,1	3,9 ± 1,0
MBT	nd <sup>d</sup>	94 ± 1	1,2 ± 0,6	7,8 ± 1,6
OX1-BT	nd	25 ± 2	11,9 ± 0,5	28,8 ± 6,5
OX2-BT	nd	5 ± 1	1,1 ± 0,7	27,7 ± 1,3
<i>Total butyltins</i>	<i>1091 ± 37</i>	<i>295 ± 3</i>	<i>13,4 ± 1,2</i>	<i>17,4 ± 3,6</i>
<i>% MBT, DBT / BTs</i>	<i>3</i>	<i>76</i>	<i>11</i>	<i>67</i>
<i>% OX1-BT, OX2-BT / OTs</i>	<i>nd</i>	<i>9</i>	<i>49</i>	<i>94</i>
	Control <sup>f</sup>	TBT <sup>g</sup>	Control	TBT
<u>Butyltins mussel residues <sup>e</sup></u>				
TBT	75 ± 2	2119 ± 4	60 ± 3	204 ± 7
DBT	37 ± 1	1282 ± 7	22 ± 1	85 ± 1
MBT	30 ± 9	331 ± 13	20 ± 2	36 ± 4
OX1-BT	9 ± 1	66 ± 6	7 ± 1	604 ± 25
OX2-BT	2 ± 1	121 ± 3	4 ± 0	251 ± 13
<i>Total butyltins</i>	<i>142 ± 9</i>	<i>3732 ± 24</i>	<i>101 ± 6</i>	<i>425 ± 12</i>
<i>% MBT, DBT / BTs</i>	<i>47</i>	<i>43</i>	<i>41</i>	<i>52</i>
<i>% OX1-BT, OX2-BT / total</i>	<i>8</i>	<i>5</i>	<i>9</i>	<i>67</i>

<sup>a</sup> Data in  $\text{ng Sn L}^{-1}$ . <sup>b</sup> just after the TBT addition. <sup>c</sup> 24h after the TBT addition.

<sup>d</sup> nd = non detected.

<sup>e</sup> Data in  $\text{ng Sn g}^{-1}$  d.w. at the whole body level. <sup>f</sup> at the end of the acclimatization period.

<sup>g</sup> at the end of the 4-day exposure. Values are mean ± SD (n = 3).

**Table 3:** Bioconcentration factors (BCFs) for the two contamination levels.

[TBT] ng Sn.L <sup>-1</sup>		whole body	gills	digestive glands	remaining tissues
1 000	Day 1	600 ± 30	2 000 ± 30	600 ± 10	300 ± 10
	Day 2	900 ± 10	3 500 ± 60	1 300 ± 20	800 ± 30
	Day 3	1 600 ± 60	5 900 ± 10	2 000 ± 20	1 400 ± 10
	Day 4	2 000 ± 10	5 600 ± 10	2 700 ± 30	1 500 ± 20
10	Day 4	12 100 ± 300	6 300 ± 700	23 400 ± 3 800	7 600 ± 200

**Table 4:** Enzymatic activities (GST, AChE, CAT) and TBARS contents in mussels for the C2 experiment.

	DG proteins* <i>mg. mL<sup>-1</sup> S9**</i>	G proteins* <i>mg. mL<sup>-1</sup> S9</i>	(DG) GST <i>nmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>prot</i>	(G) AChE <i>nmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>prot</i>	(DG) CAT <i>μmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>prot</i>	(DG) TBARS <i>nmol. mL<sup>-1</sup> S9</i>
control	10.7 ± 2.5	4.7 ± 0.5	167 ± 42	18 ± 5	126 ± 34	1.0 ± 0.3
day 1	10.6 ± 2.3	4.6 ± 1.2	190 ± 50	35 ± 7	159 ± 77	1.0 ± 0.3
day 2	10.0 ± 1.6	3.6 ± 0.8	228 ± 40	41 ± 22	163 ± 21	0.9 ± 0.3
day 3	10.8 ± 0.9	3.5 ± 1.1	195 ± 25	36 ± 11	122 ± 38	1.1 ± 0.3
day 4	9.5 ± 0.9	3.2 ± 1.0	215 ± 30	29 ± 12	172 ± 17	0.7 ± 0.2

\* DG, digestive glands; G, gills. \*\* S9, post-mitochondrial fraction.

### List of figures:

Figure 1: A: Tributyltin concentrations (A) and inorganic tin normalized areas (B) in seawater for the different conditions of aquarium handling;

\* (A): For the oxygenated water and light exposure condition:  $C[\text{TBT}] = 0.07 t^2 - 0.51 t + 1.10$  ( $C[\text{TBT}]$  is the TBT concentration in  $\mu\text{g.L}^{-1}$  and  $t$  is day).

Figure 2: superposed GC-AED chromatograms of seawater samples for two conditions of aquarium handling: oxygenated water and light exposure (full line), no water oxygenation but light exposure (dotted line).

Figure 3: Butyltin accumulation in whole organisms for the C1 (A) and the C2 (B) experiments (n=3).

Figure 4: Butyltin distribution in mussel tissues for the C1 (A) and C2 (B) experiments (n=3, except for gills: n=1).

Figure 5: Biomarkers values registered in mussel digestive glands or gills during the C2 experiment (n=6).

Figure 6: Progesterone (Pg) and pregnenolone (Pn) levels in digestive glands of mussels in function of TBT concentration in females (F) and males (M), for both control and exposed mussels (n=2).

\*  $p < 0.04$ .

Figure 1

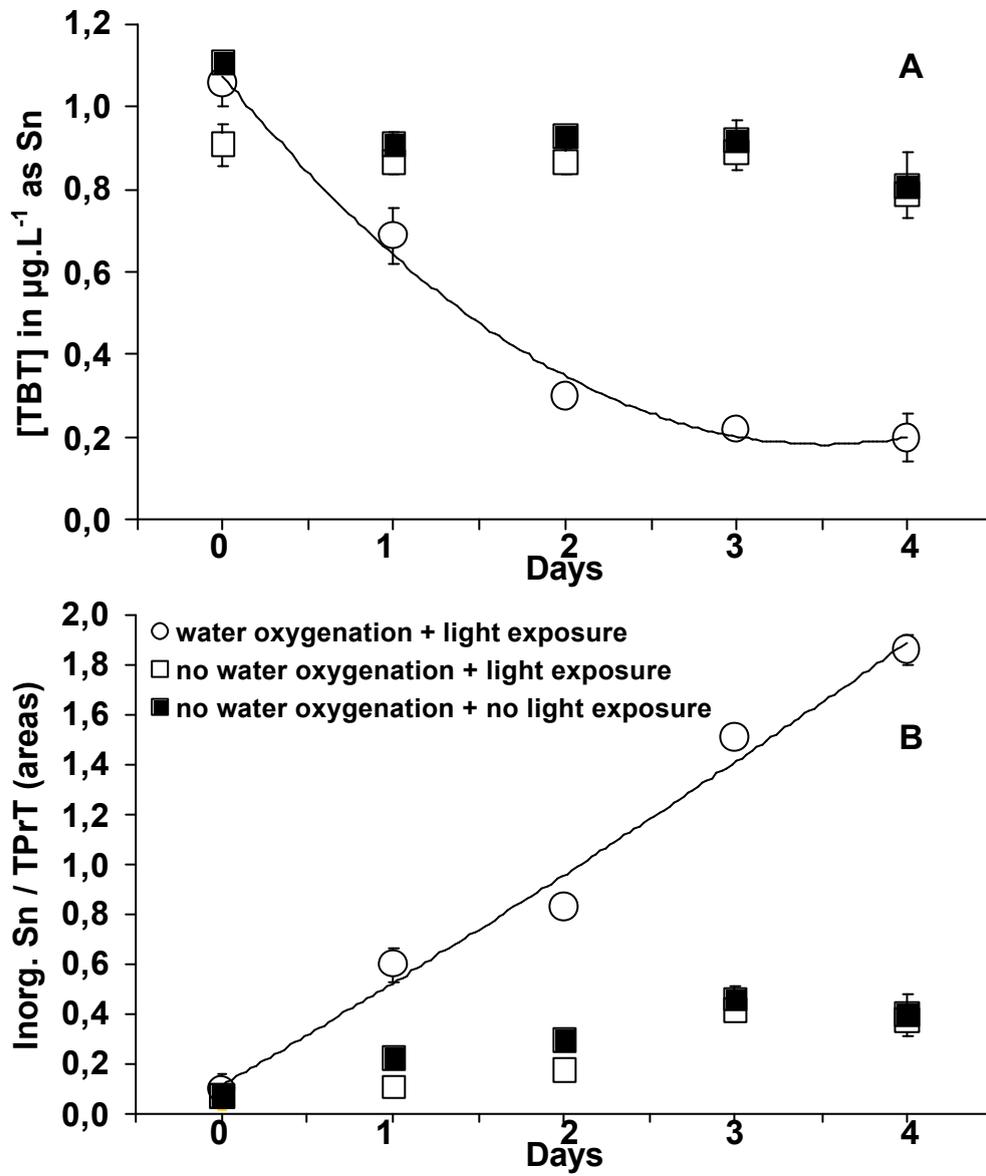


Figure 2

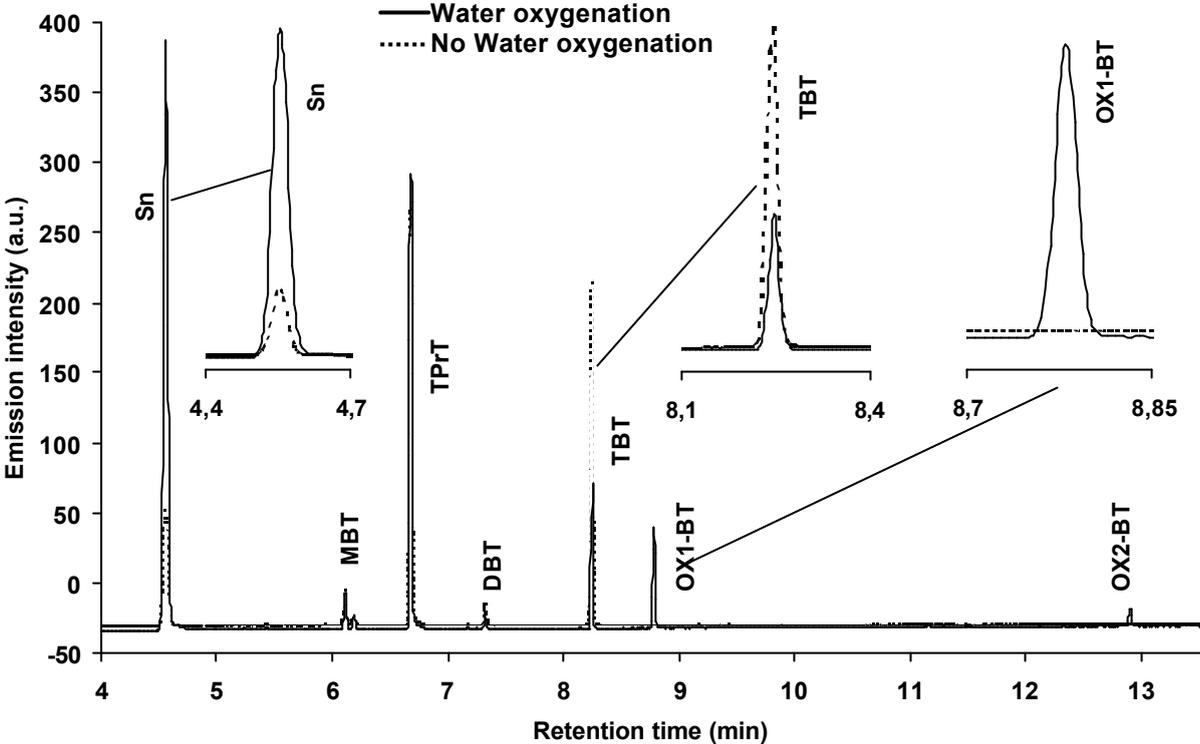


Figure 3

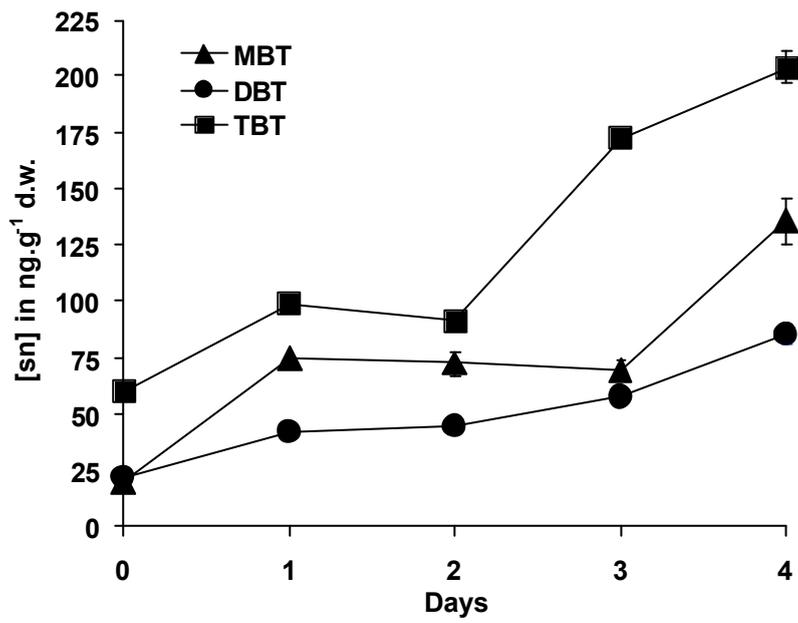
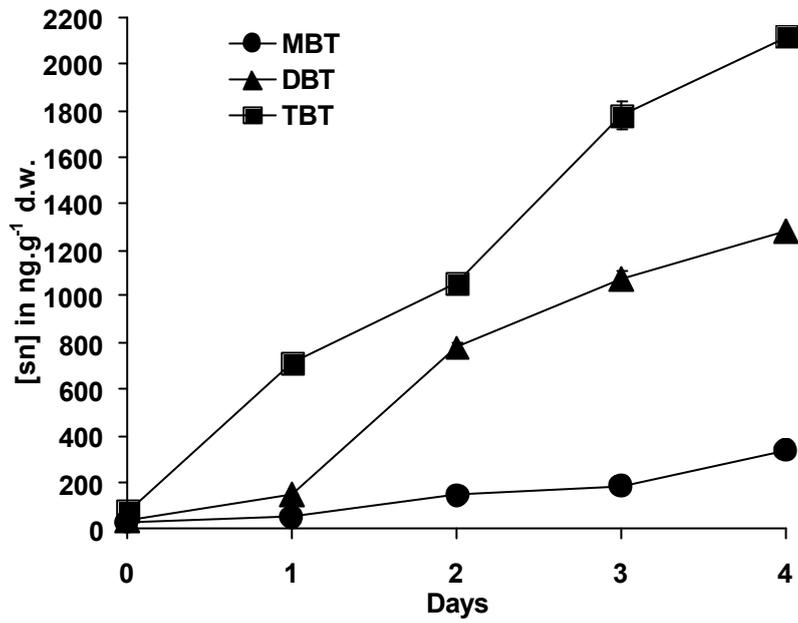


Figure 4

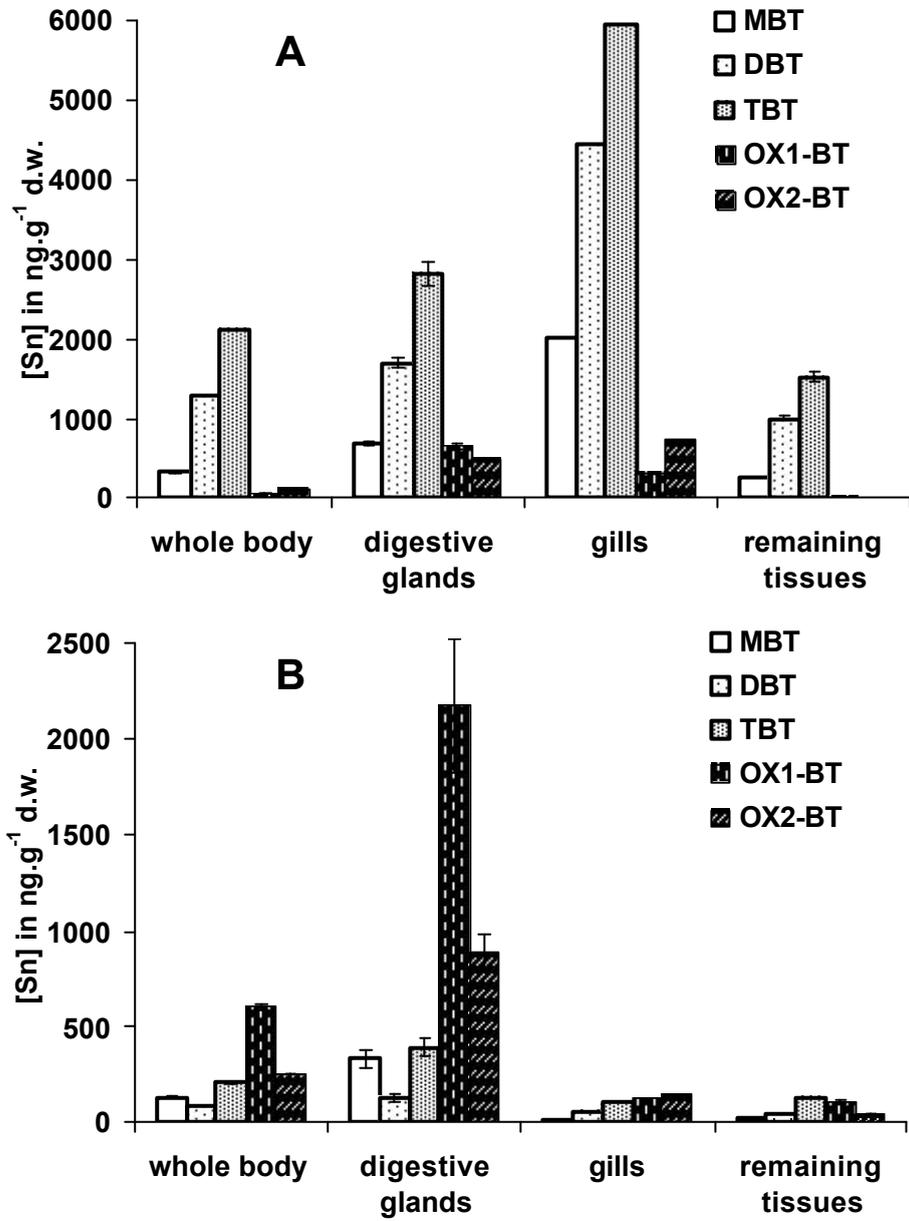


Figure 5

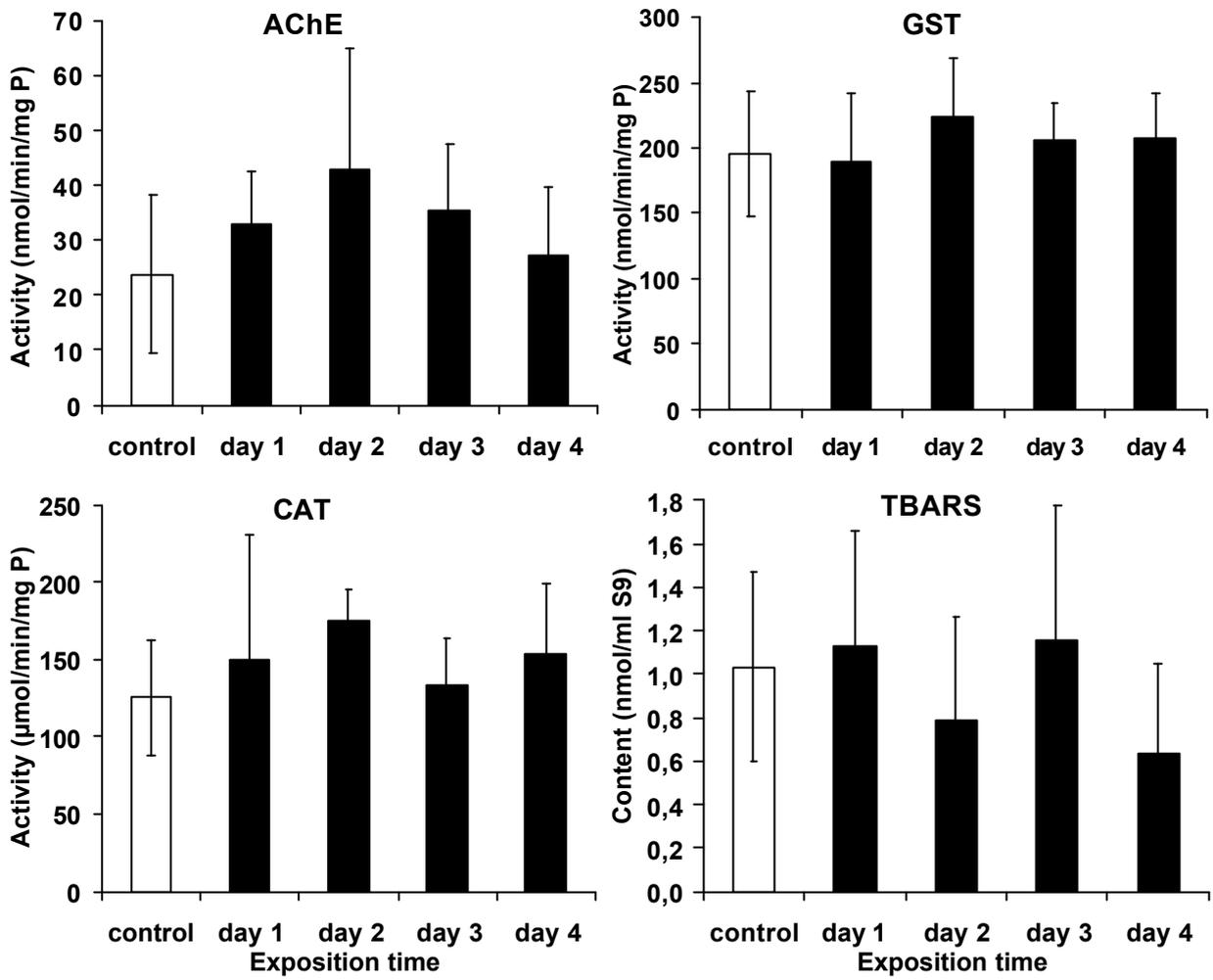
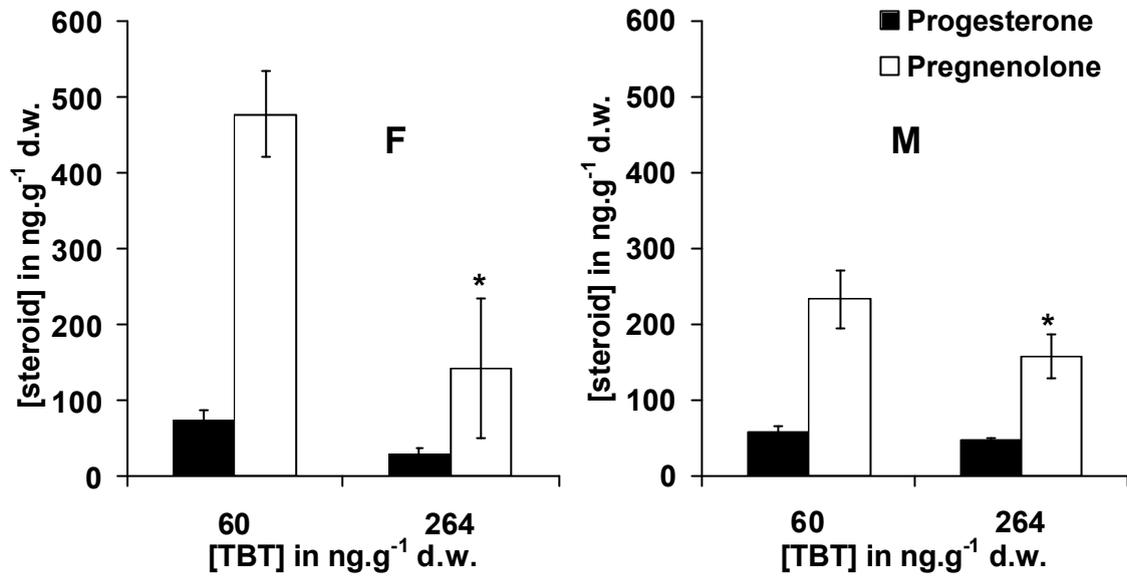


Figure 6





## ANNEXE 6

**Publication 2: “One-year monitoring survey of organic compounds (TBT, PAHs, PCBs), heavy metals and biomarkers in blue mussels from the Arcachon Bay (France)”, forme non définitive.**

N.B.: Bien que cette publication ne soit pas sous sa forme définitive (n’ayant subie aucune correction), elle est tout de même présentée dans ce mémoire afin de faciliter la lecture et la compréhension de ces travaux par Mme Cinta Porte, rapporteur de cette thèse. Elle sera, après correction, soumise à la revue “*Marine Environmental Research*”.



# One-year monitoring survey of organic compounds (PAHs, PCBs, TBT), heavy metals and biomarkers in blue mussels from the Arcachon Bay, France.

Marie-Hélène DEVIER, Sylvie AUGAGNEUR, Hélène BUDZINSKI, Pascal MORA, Jean-François NARBONNE, Philippe GARRIGUES\*.

Laboratoire de Physico- et Toxicochimie des Systèmes Naturels (LPTC), UMR 5472 CNRS, Université de Bordeaux 1, 351 Cours de la Libération, 33405 Talence Cedex, France.

## *Abstract*

Marine mussels *Mytilus sp.* were monthly transplanted in cages for one year to oyster parks and harbours in the Arcachon Bay (France) in order to assess water quality of the bay. Contaminant levels (organotin compounds, trace metals, PCBs and PAHs) were measured in tissues of transplanted mussels and of mussels from a reference station, together with physiological parameters of mussels (condition indexes, lipid content and dry weight). Four biomarkers (AChE: acetylcholinesterase activity, GST: glutathion S-transferase activity, CAT: catalase activity and TBARS: thiobarbituric acid-reactive substance content) were also monitored. The Arcachon Bay exhibited relatively low contamination levels by metals and PCBs. The elevated chemical contamination of the biggest harbour can be interpreted in terms of persistence of organotin compounds and PAHs in sediments and, to a lesser extent, of direct inputs of PAHs generated by the activity of the dockyard. Biomarker responses were not able to discriminate the different chemical contamination levels recorded in the Arcachon Bay and rather reflected changes in environmental factors.

**Key words:** Blue mussels; Arcachon Bay; biomonitoring; caging; organotins; heavy metals, PCBs, PAHs; biomarkers

\* To whom correspondence must be addressed.

## 1. INTRODUCTION

The use of biomarkers measured at the molecular or cellular level have been proposed as sensitive “early warning” tools for biological effect measurement in environmental quality assessment (McCarthy & Shugart, 1990). The selected biomarkers should indicate that the organism has been exposed to pollutant (exposure biomarkers) and/or the magnitude of the organism’s response to the pollutant (effect biomarkers or biomarkers of stress). Biomarkers are then defined as short-term indicators of long-term biological effects. Sole (2000) and Porte, Biosca, Sole, & Albaiges (2001) proposed that chemical determination of environmental contaminants should be integrated with the use of biomarkers of exposure and/or their effects to provide a better picture of the stress conditions. The application in the field of such a combined approach using bivalves has been successfully applied in a number of environmental situations (Narbonne et al., 2001; Cheung, Zheng, Lam, & Richardson, 2002).

Bivalve molluscs, particularly mussels are routinely used as “sentinel” organisms in environmental monitoring programmes throughout the world because they are widely distributed, sedentary, relatively tolerant to a wide range of environmental conditions and filter-feeders that bioconcentrate many chemicals in their tissues (Widdows & Donkin, 1992).

Organotin compounds, and particularly tributyltin (TBT) and triphenyltin (TPT) are widely used as biocides in a variety of consumer and industrial products. Among them, antifouling paint leachates constitute the main input of TBT into the marine environment. The ecotoxicological hazards of triorganotin compounds have been recognized after deleterious effects (shell malformations and population decline) occurred in the late 1970s on oyster populations in Arcachon Bay in France (Alzieu, Heral, Thibaud, Dardignac, & Feuillet, 1982). TBT is known to interfere with hormone metabolism, increasing the levels of androgens in the snails (Spooner, Gibbs, Bryan, & Goal, 1991) and causing the appearance of male sex characters in female, termed imposex (Bettin, Oehlmann, & Stroben, 1996) for concentrations as low as 1 ng Sn l<sup>-1</sup>. French authorities regulated the use of TBT paints in 1982, followed by most of the developed countries from 1987 (Alzieu, 1991).

An historical reconstruction of data on TBT-related events that occurred in Arcachon Bay, as well as organotin levels in water and sediment compartments are reviewed in Ruiz, Bachelet, Caumette, & Donard (1996). Other classes of contaminants (PAHs, PCBs, DDTs, trace metals ...) have been also regularly monitored in the bay (Piérard, 1995; RNO, 1998; Thompson, Budzinski, & Garrigues, 1998; Baumard, Budzinski, & Garrigues, 1998). The Arcachon Bay is characterized by relatively low levels of PCBs and DDTs (Thompson & Budzinski, 1999), whereas PAHs represented non negligible levels of contamination due to their persistence in the sediments of the Bay, and particularly in the Arcachon harbour (Baumard et al., 1998).

In this biomonitoring study, marine mussels *Mytilus edulis* were monthly transplanted in cages to oyster parks and harbours of the Arcachon Bay (France) from February 2001 to February 2002 in order to assess water quality of the bay. Contaminant levels (organotin compounds, heavy metals, PCBs and PAHs) were measured in tissues of transplanted mussels and of inhabiting mussels (reference station), together with physiological parameters of mussels (condition indexes, lipid content and dry weight). In parallel, four biomarkers (AChE: acetylcholinesterase activity, GST: glutathion S-transferase activity, CAT: catalase activity and TBARS: thiobarbituric acid-reactive substance content) were also monitored.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Caging experiments

#### Sampling sites:

Arcachon Bay is located on the South West Atlantic Coast of France (Figure 1). This 155 km<sup>2</sup> tidal shallow coastal lagoon is well-known for important oyster farming activity, but also as a major mooring and sailing area receiving up to 15000 pleasure boats in summer. Intertidal flats stretch over 115 km<sup>2</sup>, 70 km<sup>2</sup> of which are covered by *Zostera noltii* (Hornerm), 10 km<sup>2</sup> by oyster parks and the rest by beaches of diverse characteristics (Auby, 1993). The bulk of industrial waste has not been dumped into the bay since 1971, and sewage is treated and discharged off-shore by a pipe system set up in 1974 and complete in 1988 (Ruiz et al., 1996). Numerous pleasure harbours and seasonal berths encircle the bay.

#### *Collection of bivalves:*

Approximately 600 specimens of blue mussels *Mytilus sp.* of uniform shell length (4-5 cm) were monthly collected at low tide from February 2001 to February 2002 at Moulleau (Figure 1), at the entrance of the Arcachon Bay (France), in a site known to be not polluted by TBT and considered in this study as a reference station. Mussels were randomly distributed in 6 cages containing 80 mussels each and placed on sites, 1 hour after collection for the harbour stations and sometimes the next day for the oyster park sites. If it was the case, mussels were kept in fattening ponds before their deployment. The remaining mussels were carried dry to the laboratory within two hours of collection for assessing the initial condition.

#### *Transplantation experiment:*

The six transplantation stations were selected according to expected different degree of their exposure to contaminant sources: open oyster parks: Grand Banc (E), Ferret (F) and Banc d'Arguin (G); harbour sites: the Arcachon harbour (B and C) (2600 pleasure boats and 27 fishing boats; south coast of the bay), the second pleasure harbour of the French West Atlantic Coast, and La Vigne harbour (D) (300 pleasure boats; north coast of the bay), the less polluted of the two harbour stations (Figure 1). Two cages were used in the Arcachon harbour, one near the gas station (B) and the other close to the dockyard (C). The La Vigne harbour cage was also placed near the gas station. The oyster park cages were deployed on sites by a local oyster farmer. The three plastic cages (100 x 50 x 5 cm) of trellis (0.6 x 0.6 cm), containing 80 mussels each, and used on the oyster parks were those traditionally used in oyster farming in the Arcachon Bay. Three plastic cages (40 x 30 x 10 cm) of trellis (0.5 x 0.5 cm) containing 80 mussels each were attached to a landing stage in harbours, 1 m under the sea surface and about 50 cm above sediment bottom. Thus, the mussels permanently remained in water in harbours sites. Such experimental conditions were defined from a practical point of view, but based on methods used in oyster farming. A cage was also use at the reference station (Le Moulleau) to monitor the caging effect on mussels, but was never recovered, as this station is much visited.

#### *Tissue preparation:*

15 mussels were used at each station for the condition index measurement. For each determination of contaminants (organotin compounds, heavy metals, PAHs and PCBs), whole body tissues of 5 organisms from each station were dissected out, pooled, and stored at -20°C until their freeze-drying and homogenization with a blender. For biomarker determination, 10 organisms were dissected out and the individual digestive gland and gills were immediately stored at -80°C. Biomarker analyses were performed on individual tissues (n=10).

## *2.2. Measurement of condition*

Lipid contents were determined using a microwave assisted extraction. 200 mg of freeze-dried tissue was extracted in dichloromethane (30 W for 10 min). The sample was filtered on purified cotton and evaporated to dryness under a flow of nitrogen. Lipid content was determined gravimetrically. Mean tissue dry weights were determined gravimetrically after freeze-drying of pooled tissues (2 x 5 individuals).

The condition index (CI) is used to follow seasonal change in gross nutrient reserves or meat quality, as well as to monitor various pollutants and diseases (Crosby & Gale, 1990). This index is calculated as follows:

$$CI = (\text{dry soft tissue weight (g)} * 1000) / (\text{internal shell cavity capacity (g)}).$$

In our study, an easier formula was used:

$$CI = (\text{soft tissue weight (g)}) / (\text{total weight (g)} - \text{shell weight (g)}).$$

Mussels were scrubbed free of encrusting organisms and weighted (total weight). Then, the soft tissues were separated from the shell, mopped up on absorbent paper, and tissues and shell weighted (soft tissue weight and shell weight). Data for body condition are expressed as a ratio of the post-experiment condition index at each station to the pre-experiment condition index (condition factor, CF). A condition factor < 1 indicates that the ratio of body mass to shell content decreases during the experiment period.

In the same way, accumulation factors (AFs) are calculated as the ratio of the concentration of a contaminant in mussels during experiment to the pre-experiment concentration. AFs < 1 indicate that concentrations in transplanted mussels do not increase during experiment.

### 2.3. Organotin analysis

#### *Mussel tissues:*

Mussel samples were freeze-dried and homogenized with a blender. The extraction protocol was adapted from Carlier-Pinasseau, Astruc, Lespes, & Astruc (1996). 0.2 g of lyophilised mussel sample was introduced in a glass flask with a  $1 \mu\text{g Sn ml}^{-1}$  tripropyltin (TPrT) solution and 2.5 ml of methanol. Flasks were gently shaken for one night. 12.5 ml of 0.15M HCl in methanol were then added and the mixture was shaken (rotative shaking table) for 1h, followed by pH adjustment to 5 with 1M sodium acetate buffer (prepared by dissolving anhydrous sodium acetate in 1l Milli-Q water, followed by pH adjustment to 5 with glacial acetic acid). In situ ethylation was carried out by addition of 1 ml of a 2%  $\text{NaBEt}_4$  (Strem Chemicals, Bischheim, France; stored under dry atmosphere) solution in the presence of 1 ml of isooctane. The derivatization solution was prepared just prior to use and was purified by two successive extractions by isooctane to obtain lower blank values. The sample solution was vigorously shaken for 30 min. Milli-Q water was added to obtain about 3 cm high level in the narrow neck (1 cm i.d.). After decantation, the 1 ml supernatant plus the 1 ml underlying aqueous phase was transferred in 2 ml eppendorf and centrifuged for 5 min at 10 000 rpm at  $+4^\circ\text{C}$ . Aliquots of 500  $\mu\text{l}$  of the isooctane extracts were transferred into auto sampler vials and analysed by GC-AED within 24h without any purification step.

#### *Sediments:*

Sediment samples were freeze-dried and sieved at  $200 \mu\text{m}$  using a Teflon mesh. 0.2 g of lyophilised sediment sample was placed in a 50-ml centrifuged tube, spiked with  $1 \mu\text{g Sn ml}^{-1}$  internal standard TPrT solution, and 5 ml of glacial acetic acid was added. The closed tubes were placed in an ultrasound bath (Bransonic 32 sonicator, 150 W, 50 kHz) for 25 min and then immediately centrifuged for 5 min at 5 000 rpm at  $+4^\circ\text{C}$ . The supernatant was adjusted to pH 5 with 2.9 ml of 38%  $\text{NH}_3$  and 5 ml of sodium acetate buffer (pH 5). After 10 min, derivatization and extraction were simultaneously performed with 1 ml of a 2%  $\text{NaBEt}_4$  solution in the presence of 1 ml of isooctane by a 5 min hand shaking. After decantation, the 1 ml supernatant plus the 1 ml underlying aqueous phase was transferred in 2 ml eppendorf and centrifuged for 5 min at 10000 rpm at  $+4^\circ\text{C}$ . Aliquots of 500  $\mu\text{l}$  of the isooctane extracts were transferred into auto sampler vials and analysed by gas chromatography – atomic emission detection (GC-AED) within 24h without any purification step.

#### *Seawater:*

Seawater samples were stored refrigerated at  $+4^\circ\text{C}$  in the dark until laboratory analysis within day. The extraction protocol was adapted from Michel & Averty (1991). 50  $\mu\text{l}$  of a daily prepared 100 ng  $\text{Sn ml}^{-1}$  TPrT solution was used as internal standard. Ethylation of organotin compounds was performed in a 250-ml flask with a narrow neck (1 cm i.d.) using a magnetic stirring rod, and pH was adjusted to 5 with 5 ml of sodium acetate buffer. 100  $\mu\text{l}$  of a 2%  $\text{NaBEt}_4$  solution was added and the mixture was stirred for 10s. The reaction was allowed to develop for 10 min in the dark, before the extraction of the derivatives by means of 500  $\mu\text{l}$  of isooctane with vigorous magnetic stirring for 15 min. Milli-Q water was added to obtain about 3 cm high level in the narrow neck. After decantation, the 0,5 ml supernatant plus the 1 ml underlying aqueous phase was transferred in 2 ml eppendorf and centrifuged for 5 min at 10 000 rpm at  $+4^\circ\text{C}$ . Aliquots of 200  $\mu\text{l}$  of the isooctane extracts were transferred into auto sampler vials and immediately analysed by GC-AED.

#### *Organotin analysis by GC-MIP-AED and procedure performance:*

The ethylated organotin species were separated on a SPB-5 capillary column (30m length x 0.320 mm i.d. x 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness, Supelco, USA) using a HP 6890 Series GC equipped with a split/splitless injection port (pulsed splitless flow mode), and detection was achieved at the Sn 326 nm wavelength with an HP G2350A Atomic Emission Detector (Agilent Technologies, Willmington, DE, USA). The analytical conditions for organotin compounds determination are detailed in Dévier, Augagneur, Budzinski, Mora Narbonne, & Garrigues (in press). The resulting chromatograms were quantified using peak areas normalised to the tripropyltin (TPrT) internal standard. The accuracy of the analytical procedure was monitored by periodic analyses of a certified reference material of mussel tissues, CRM 477, together with biological samples series. This material, provided by the European

Commission (Standard, Measurement and Testing Programmes, Brussels), is certified for TBT, DBT and MBT contents ( $0.90 \pm 0.08$ ,  $0.78 \pm 0.06$  and  $1.01 \pm 0.19 \mu\text{g Sn g}^{-1}$ , respectively) and an indicative value for TPT is also given ( $0.5 \mu\text{g g}^{-1}$ ). For sediment sample analyses, the certified reference material PACS2, marine sediment (National Research Council of Canada, NRCC) was used. The results obtained for the determination of organotin compounds in the certified materials (mussel tissues and sediments) are in good agreement with the certified values for all the compounds and a good reproducibility is obtained. Limits of quantification, calculated as three times baseline noise, were  $1 \text{ ng Sn g}^{-1}$  for both butyltins and phenyltins in mussel tissues and in sediments. For seawater samples, the limit of quantification was  $0.3 \text{ ng Sn l}^{-1}$  for both butyltins and phenyltins, with the exception of MBT ( $0.6 \text{ ng Sn l}^{-1}$ ).

Throughout this paper the organotin salts and their ethylated derivatives are indicated by the same abbreviations. All organotin concentrations reported in this paper are expressed as tin on a dry weight basis ( $\text{ng Sn g}^{-1} \text{ dw}$ ).

#### *2.4. Heavy metal determination*

Mussel samples were freeze-dried and homogenized with a blender. The extraction protocol was adapted from Augagneur, Budzinski, Garrigues, & Narbonne (1998). 0.2 g of lyophilised mussel sample was digested with 8 ml of nitric acid and 1 ml of hydrogen peroxide in a microwave oven (Microdigest 301, PROLABO). Volume sample was adjusted to 25 ml with Milli-Q water. Determination was carried out by ICP-MS (HP 4500 Series, Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA). The analytical procedure was checked using the mussel tissue standard reference material SRM 2976 (NIST, Gaithersburg, MD, USA). Heavy metals monitored in this study are listed in Table 1. Although only results obtained on the eight metals listed were presented in this study, levels of other metals (B, Al, Mn, Fe, Co, Rb and Sr) were also determined in mussels.

#### *2.5. PAH and PCB determination*

Mussel samples were freeze-dried and homogenized with a blender. The PCB and PAH extraction protocols were described in Thompson et al. (1999) and in Budzinski, Baumard, Papineau, Wise, & Garrigues (1996), respectively. Briefly, 2 g of lyophilised mussel tissues were extracted by microwave assisted extraction (30 Watts for 15 min) with 40 ml dichloromethane and the extract was filtered. For PCB determination, the sample was further purified by shaking several times with 36N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . The organic phase was neutralised with deionised water and dried with anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . The extract was further purified on a column of silica gel and then concentrated under a gentle flow of nitrogen. The extract was transferred to iso-octane and analysed by gas chromatography-electron capture detection (GC-ECD; HP 5890 Series II, ECD, Agilent Technologies, Avondale, MA, USA). For PAH determination, the sample was then dried by mean of rotary evaporator first and then under a stream of nitrogen and successively purified on columns of alumina and silica gel. The extract was concentrated under a gentle flow of nitrogen, transferred to iso-octane and analysed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS; HP 5890 Series II, MSD 5972, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Quantification was performed relatively to the perdeuterated internal standards. The relative response factors of the different compounds were determined by injecting a standard solution of PCBs (resp. PAHs) spiked with the same solution of internal standards as that used for spiking the samples. Methods were periodically checked with the analysis of a certified mussel tissue, SRM 1974a (NIST, Gaithersburg, MD, USA). PCB 28, 52, 111, 118, 138, 153 and 180, were determined (Table 1). PCB 111 was never detected in mussel tissues. 22 PAHs were monitored in this study: the PAHs nominated in the Environmental Protection Agency priority list, that we called EPA PAHs, and six other PAHs (Dibenzothiophene, Benzo(e)pyrene, and four methylphenanthrenes), that we called Other PAHs (Table 1).

#### *2.6. Biomarkers measurements*

For the post-mitochondrial fraction preparation (S9), individual digestive gland and gills were homogenised in a pH 7.4 phosphate buffer (1:3, w/v) and centrifuged at  $10\ 500 \times g$  for 30 min. The supernatant was stored at  $-80^\circ\text{C}$  until analysis. Biomarkers measurements were performed on 10 individual mussels, in gills for acetylcholinesterase activity (AChE) and in digestive glands for glutathione-S-transferase (GST) and catalase (CAT) activities, and contents in thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). The S9 protein concentrations were determined by the Bradford method using bovine serum albumin as standard (Bradford, 1976) by microplate-reading UV-

spectrophotometer (Biotek Fl600). Protein yields were measured and expressed as protein content per milliliter of S9 fraction of gills or digestive glands. The GST activity was measured at 340 nm by using a differential UV-spectrophotometer (Perkin Elmer 550 S) and performed according to Habig, Pabst, & Jakoby (1974), using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) as substrate at 1 mM (pH 7.4). The AChE activity was measured according to protocol adapted from Ellman, Courtney, Andres, & Featherstone (1961) by microplate-reading UV-spectrophotometer at 405 nm, using acetylthiocholine as substrate (1 mM) at 25°C with 0.1 mM 5,5'-dithiobis-2-dinitrobenzoic acid (DTNB) in 0.1M phosphate buffer (pH 7,4) (Mora, Michel, & Narbonne, 1999). The CAT activity was determined according to Claiborne (1985) by measuring the decrease in hydrogen peroxide (30 mM) concentration at 240 nm by differential UV-spectrophotometer. TBARS contents resulting from lipid peroxide breakdown was evaluated according to protocol adapted from Buege & Aust (1978) and quantified at 530 (excitation) and 590 nm (emission) by microplate-reading UV-spectrophotometer. Results were expressed as  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  of proteins for GST and AChE activities, as  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  of proteins for catalase activity and in  $\mu\text{M}$  of S9 post-mitochondrial fraction for TBARS contents. The four biomarkers were determined at the same time on the same individual and measurements performed on 10 individuals.

## 2.8. Statistical analyses

Results are mean  $\pm$  SD. Statistical significance was assessed by using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's test (STATISTICA 6.0 software).

## 3. RESULTS

### 3.1. Body condition of transplanted mussels

Mean physiological parameters of the bivalves used in this survey (evaluated on about 1150 mussels) were  $42 \pm 2$  mm in length and  $1.6 \pm 0.5$  g wet weight. Lipid contents varied between 2.4% and 9.4% (vs. dry weight content), with a mean of  $5.9 \pm 1.5$  %, and individual dry weight (evaluated by freeze-drying) varied from 0.18 to 0.54 g, with a mean of  $0.35 \pm 0.05$  g. No correlation between lipid contents and any classes of contaminant levels (OTs, metals, PAHs or PCBs) or individual pollutant levels in mussel tissues was observed. *Mytilus sp.* transplants demonstrated consistently high survival (above 90%), except in summer at the oyster parks (from 50 to 90%, data not shown). Condition factors in mussels were consistently  $> 1$ , except in July, at the oyster farming stations and usually  $< 1$  at the harbour stations (Figure 2). Condition indexes obtained in the Arcachon harbour were significantly lower than those registered in the oyster parks and in the reference site ( $p < 0.04$ ,  $N = 1150$ ). Among oyster parks and reference sites, only Banc d'Arguin station exhibit significantly different indexes (the lowest in summer and the highest the rest of the year). Condition indexes in La Vigne harbour were not significantly different from all the others, exhibiting intermediate level between oyster parks and Arcachon harbours values.

### 3.2. Organotin compounds in the Arcachon Bay

#### 3.2.1. Organotin levels in transplanted mussels

The annual means of butyltins in mussel tissues recorded at each station are summarized in Table 2 and their seasonal variations represented in Figure 3.

Mussels transplanted to the oyster parks exhibited relatively low TBT concentrations of about  $30 \text{ ng Sn g}^{-1} \text{ dw}$  (Figure 3a). Accumulation factors (AFs) were close to 1 (annual means of  $1.0 \pm 0.4$ ), indicating that no butyltin accumulation occurred in mussels transplanted to these stations. However, AFs were consistently  $> 1$  in July and August, particularly at Banc d'Arguin where TBT levels exceeded by two fold this baseline value.

Conversely, an important accumulation of butyltins was observed in harbours (Arcachon and La Vigne), indicating the presence of TBT in water, with a significant increase from April to September (Figure 3b). TBT concentrations in mussel tissues ranged from 800 to  $2400 \text{ ng g}^{-1}$  in Arcachon and from 50 to  $230 \text{ ng g}^{-1}$  in La Vigne. In Arcachon, lower AFs of TBT ranged from 35 to 55 (October to March) and were as high as 95 in July and 80 in April. The upper TBT accumulation from April to September was related to the intense boating activity at that time. The two stations of the Arcachon harbour exhibited similar butyltin levels and seasonal patterns, indicating that mussels were exposed to the same concentrations in water, with the exception of the July month where butyltin concentrations at station C were surprisingly lower than those in mussels from station B. It must be

noted that only 2 or 3 individuals were recovered in both cages in July. In La Vigne, AFs were one order of magnitude lower than those recorded in Arcachon (with a maximum value of 8 in August). Triphenyltin was always detected in the Arcachon ( $5 - 23 \text{ ng g}^{-1}$ ) and to a lesser extent in the La Vigne ( $2.5 - 12 \text{ ng g}^{-1}$ , only detected from April to December only).

The bioconcentration factors of TBT (BCFs; concentration in dry mussel tissues divided by concentration in seawater) were evaluated from May to August. BCFs recorded in mussels transplanted to the Arcachon harbour ranged from  $2.8 \cdot 10^5$  to above  $1.3 \cdot 10^6$  (Table 3) and represented the highest BCF values ever reported in the literature for the blue mussel *Mytilus sp.*. BCFs for the oyster parks and La Vigne harbour could not have been estimated, as TBT was never detected in seawater. The available values for stations E and F (data of TBT concentrations in seawater obtained from IFREMER Arcachon, pers. comm. from Auby) in August were  $0.73 \cdot 10^5$  and  $1.3 \cdot 10^5$ , respectively (Table 3).

### 3.2.2. Sources/degradation of TBT

TBT was the major butyltin compound detected in mussel tissues, so much so that TBT concentrations were strongly correlated to total butyltin concentrations in the Arcachon Bay ( $r = 0.9853$ , all data). Relationship of the concentrations between TBT and its degradation products (MBT, DBT) was also examined. DBT and MBT concentrations were each strongly and positively correlated to TBT concentrations in tissues ( $r = 0.908$  and  $r = 0.895$ , respectively,  $p < 0.0001$ ; all data), indicating that most of DBT and MBT residues in mussel tissues have originated from TBT. When considering relationships between TBT and the sum of its degradation products (MBT+DBT), the gas stations (B and D) exhibited highest correlation ( $r = 0.80$ ;  $p = 0.003$ ;  $n = 11$ ). Low relationship was observed at the dockyard station of the Arcachon harbour and at the reference site ( $r = 0.65$ ;  $p = 0.03$ ), whereas no significant correlation was observed at the oyster parks. MBT and DBT represented 22-27% of total butyltins at the harbour sites and 28-31% at the oyster parks (Table 2). Higher percentages of MBT and DBT were detected in mussels from the reference station (34%).

Because degradation of organotin compounds takes place by a successive cleavage of the alkyl or aryl substituents (Maguire, Bengert, Hale, Wong, & Kramer, 1982), the ratio between homologs could be used as a first estimate of their stability in each aquatic compartment (Abd-Allah, 1995). Tri-organotin/di-organotin ratios are also studied in order to obtain insight in metabolic processes (Stäb, Frenay, Frericks, Brinckman, & Cofino, 1995). The mean annual ratio of TBT to DBT concentrations (TBT/DBT) in mussels was about 5 at the gas stations (B and D), 3.1-3.6 for the oyster parks and the dockyard station of the Arcachon harbour, and 2.5 at the reference site (Table 2). Only TBT/DBT ratios recorded at the gas stations were significantly different from all the others, except from the dockyard station in Arcachon. Seasonal patterns of TBT/DBT ratios exhibited maximum values in winter and minimum values in summer at the harbour stations, whereas ratios were relatively constant at the oyster parks and at the reference site, although higher ratios were observed in spring (Figure 4). This ratio also presented high seasonal variability, ranging from 1.4 to 5.8 times for stations A, C, E, F, and G and from 2.1 to 8.4 for stations B and D, but relatively similar seasonal patterns between stations. Only La Vigne harbour and the Banc d'Arguin oyster park showed increase in TBT/DBT ratios in summer time, possibly indicating fresh TBT inputs (Figure 4). TBT/DBT ratio expressed relatively to the TBT concentrations in tissues exhibited significant negative correlation only at the Arcachon harbour (stations B and C,  $r = -0.456$ ;  $p = 0.03$ ).

### 3.3. Trace metals

Annual mean concentrations of individual metals in mussel tissues (Table 4) were in the range  $0.8-1.7 \mu\text{g g}^{-1} \text{ dw}$  for Cd, Ni, Pb and Cr,  $6-23 \mu\text{g g}^{-1}$  for Cu, about  $10 \mu\text{g g}^{-1}$  for Se,  $15 \mu\text{g g}^{-1}$  for As and  $160-230 \mu\text{g g}^{-1}$  for Zn. With respect to metal uptake, no single accumulation pattern occurred for the eight metals monitored, with the exception of copper. AFs ranged from 0.8 to 2.5 in the oyster parks and from 0.5 to 1.8 in the harbour stations. The range of the annual mean concentrations among stations was also extremely small (1.1 – 1.5 times) for most trace metals, except for Cu (3.8 times) (Table 4).

Among all monitored metals, only copper concentrations exhibited significant differences between harbours (about  $20 \mu\text{g g}^{-1}$ ) and oyster parks (about  $7 \mu\text{g g}^{-1}$ ) (Figure 5a), indicating anthropogenic inputs in harbours. This trend was surprisingly more pronounced in La Vigne harbour (site D), exhibiting a strong increase in summer and autumn. Lead concentrations in mussels transplanted to harbour stations seemed to show a slight increase in summer (in opposition to the seasonal trend showing minimum levels of metals at this period) and could also be related to the intense boating

activity in this season (even though missing data for Arcachon in July and for La Vigne in August could turn away this observation) (Figure 5b).

All monitored metals, except copper, exhibited both similar levels and seasonal patterns (with the exception of punctual and local events) in all stations, indicating that variations of trace metal levels recorded in mussels could be mostly related to natural factors (e.g. physiological state of mussels and physicochemical parameters of water). For this reason, the seasonal patterns of trace metals were only represented for lead, as an example (Figure 5b). Seasonal trends in heavy metal contents in mussels presented minimum levels in summer (from June to October) and maximum values in winter (from December to March). Copper was the only metal exhibiting relatively constant levels in mussels transplanted to the oyster parks (seasonal variations between  $5 - 7 \mu\text{g g}^{-1}$  dw, in spite of slightly higher values in winter).

### 3.4. Organic contaminants (PAHs and PCBs)

Total PCB concentrations, as the sum of the six measured congeners (Table 5) are presented in Figure 6a for each station. Mean annual PCB concentrations in the Arcachon Bay were relatively low and ranged from  $12$  to  $54 \text{ ng g}^{-1}$  dw, with median mean of  $35 \text{ ng g}^{-1}$  dw. The range of the annual mean concentrations of PCBs among stations exhibited relatively small variation (1.3 times). No significant variation in PCB concentrations was observed between the oyster parks and the harbour sites, indicating that no PCB accumulation occurred in the harbours. In the same manner, seasonal variations of individual PCB were extremely low for all stations (with maximum variation lower than two fold) and similar seasonal patterns were observed for all sites, with the exception of the relatively highest PCB concentrations recorded in May at the reference station (site A) and at the gas station of the Arcachon harbour (site B), which were not relative to anthropogenic inputs (Figure 6a). The mean distributions of individual PCB congener in mussel tissues were in the following increasing order:  $0.5-1.5 \text{ ng g}^{-1}$  (PCB28, PCB180),  $3-6 \text{ ng g}^{-1}$  (PCB52),  $6-13 \text{ ng g}^{-1}$  (PCB118, PCB138) and  $10-16 \text{ ng g}^{-1}$  (PCB153). As for heavy metals, the range of the annual mean concentrations of individual PCB among stations was relatively small (1.4 – 2.1 times).

Conversely, as for organotin compounds, annual mean concentrations of PAHs (EPA PAHs) considerably varied among stations (Table 5). They were about  $110 \text{ ng g}^{-1}$  dw in mussels transplanted to the oyster parks, representing a low level of PAH contamination,  $570 \text{ ng g}^{-1}$  in gas stations of harbours (B and D), and as high as  $1450 \text{ ng g}^{-1}$  in the vicinity of the dockyard of the Arcachon harbour (site C) (Figure 6b). Surprisingly, the site C was more contaminated by the 6 other PAHs monitored (DiBT, MPs and BeP) than by the sum of EPA PAHs. Annual mean concentrations of Other PAHs were about  $1620 \text{ ng g}^{-1}$  in site C, whereas concentrations recorded in sites B and D ( $200-250 \text{ ng g}^{-1}$ ) and in oyster parks ( $30 \text{ ng g}^{-1}$ ) were lower than their respective mean concentrations of EPA PAHs (Figure 6c). Although La Vigne harbour (300 boats) was 10 fold smaller than the Arcachon harbour (2600 boats), mean concentration of PAHs were similar in the gas stations (B and D). Station D was the most contaminated station in terms of smallest PAHs (N, Ay, Ae, A) and station C for all the other studied PAHs, and particularly for methylphenanthrenes, characteristic compounds of petrogenic inputs. Furthermore, extremely low PAH levels were observed at the dockyard of the Arcachon harbour (site C) in April, particularly for the Other PAHs (dominated by methylphenanthrene compounds) (Figure 6c). The same phenomena was observed to a lesser extent at the gas station (site B), but only for the Other PAHs. These samples were reanalysed and similar concentrations were found. This punctual event remained unexplained, as it was not observed for the other contaminant classes.

The range of the annual mean concentrations among stations was relatively small (1.1 – 1.7 times) for the smallest PAHs (N, Ay, Ae, Fe, DBT, A) and lpyr, and was from 10 to 45 times for the majority of PAHs (Phe, F, Pyr, BaA, BeP, BaP, BbkjF, DahA, Bper and Chrys), and reached from 83 to 124 times for methylphenanthrene compounds. Maximum values of MP concentrations were detected in mussels transplanted to the dockyard of the Arcachon harbour (C) in May and June, each in an elevated range from  $500$  to  $750 \text{ ng g}^{-1}$ , corresponding to elevated AFs from 100 to 500 in transplanted mussels. Maximum total PAH concentrations in harbour sites were recorded in August for the gas stations and in May/June for the dockyard of the Arcachon harbour (exclusively dominated by MPs at this station).

Values of the ratio of specific PAH concentrations could be used to obtain information about their origin. Hence, the ratio of fluoranthene (F) concentration to pyrene (Pyr) concentration allows to discriminate a pyrolytic ( $F/Pyr > 1$ ) or petrogenic ( $F/Pyr < 1$ ) origin of a contamination by PAHs (Baumard et al., 1998). Moreover, the ratio of phenanthrene (Phe) concentration to phenanthrene derivatives (methylphenanthrenes, MPs) could also be used to indicate a petrogenic origin ( $Phe/MP <$

1), characterized by the preponderance of alkylated PAHs compared to parent compounds (Garrigues et al., 1995). Although these ratios of PAH concentrations were established for determining PAH origin in the sediment compartment, the Phe/MPs ratio expressed in function of the F/Pyr ratio have been used here in mussel tissues in order to eventually discriminate different PAH sources among stations and their seasonal changes (Figure 6d). PAH origin in the Arcachon Bay is generally characterized by a mixture of pyrolytic and petrogenic sources. Oyster parks were dominated by a pyrolytic origin of PAH contamination and harbours by a petrogenic origin. However, F/Pyr ratios found for the oyster parks decreased below 1 in summer (July and August), indicating an impact of the boating activity on these remote stations, corroborated by the appearance of MP compounds. This trend was more pronounced at Banc d'Arguin (site G), as this site is more confined than the other oyster parks (surrounded by numerous sandbanks) (Figure 6d). The petrogenic fingerprint of PAHs recorded in mussels from La Vigne harbour was less pronounced than in Arcachon harbour (although total PAH concentrations were similar for both B and D gas stations) and constituted an intermediate cluster between those representing the Arcachon harbour and the remote oyster parks.

### 3.5. Biomarkers

#### *Biomarker levels and seasonal variations*

Mean enzymatic activities and TBARS contents obtained in mussels during the transplant experiment are summarized in Table 6 and the seasonal biomarker responses of mussels transplanted to the harbour stations (B, C, D) and of mussels from the reference site (A) are represented in Figure 7. Enzymatic activities varied from 12 to 42 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteins for AChE, from 90 to 307 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteins for GST and from 40 to 206 μmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteins for catalase. TBARS contents were in the range 7 – 69 μM S9. Annual means of enzymatic activities and TBARS contents were relatively homogenous among sites and their variations presented similar seasonal patterns. Overall, the range of the mean values among sites was relatively small (1.2 – 1.4 times) for all biomarkers (Table 6). Furthermore, the four biomarkers showed seasonal profiles with two well-differentiated periods: (1) high variations during the spring/summer period (from March to July) and (2) relatively low variations the rest of the year (autumn/winter). Overall, levels of GST activity were opposite to those of both AChE and catalase activities during the period of great variability of responses (Figure 7). The maximum activities of both AChE and catalase were recorded in April and June, whereas GST reached the minimum activity. The opposite trend was observed in May and July. TBARS reached a maximum level in April and a minimum level in June.

No correlation was observed between biomarker responses and the different physiological parameters monitored in mussels (condition index, lipid content and dry weight). However, catalase activity exhibit a positive correlation with the dry weight of mussels ( $r = 0.65$ ;  $p < 0.0001$ ;  $n = 34$ ). In the same manner, no correlation was observed between biomarker responses and the physicochemical parameters of seawater of each station (temperature, salinity and contents in suspended matter, nitrate, nitrite and chlorophyll a; physicochemical data obtained from IFREMER Arcachon). However, the great variability period of the biomarker responses (March-July) corresponded to the great variability period of the salinity and to the maximum levels in nitrates and nitrites (March-June). The maximum levels in GST and TBARS and minimum level in AChE recorded in April coincided with the maximum level in suspended matter and with the main phytoplanktonic bloom (late April) in the Arcachon Bay. Furthermore, these extreme responses could also be linked to the main spawning activity in mussels in the Arcachon Bay (March/April, a second one could occur in September/October; Lubet, 1959). AChE activity seemed also to increase with the seawater temperature (from March to July), although no significant correlation was observed.

#### *Seasonal, spatial and intraspecies variabilities of biomarkers*

Seasonal variability of responses (evaluated as maximum level/minimum level at each site) was in the range 2 – 4 for enzymatic activities and 5 – 12 for TBARS contents. The spatial variability of responses was expressed as the ratio of biomarker levels obtained in the harbours to the level recorded at the reference site, for each site and each transplantation period. This between station variability was in the range 0.5-1.6 for AChE and GST activities, 0.6-1.3 for catalase activity and 0.4-1.4 for TBARS levels. Biochemical responses exhibited great variability between the 10 individuals used for the determination of the four biomarkers. The intraspecies (or methodological) variability of responses, assimilated to the variation coefficient of biomarker determinations ( $n=10$ ), was in the range 20-70% (minimum-maximum variation coefficient monthly recorded) for AChE activity and TBARS levels and 10-40% for GST and catalase activities.

#### *Relationship between contaminants and biomarkers*

Few correlations were observed between contaminants and biomarkers (ANOVA Tukey's test;  $p < 0.05$ ), but surprisingly with metals only. AChE exhibited some negative correlation with boron and iron ( $r = -0.69$  and  $r = -0.59$ , respectively;  $n = 27$ ) and, to a lesser extent, with chromium and manganese ( $r = -0.40$ ). TBARS was positively correlated with chromium, manganese and iron ( $r = 0.49$ ;  $n = 27$ ). Catalase and GST showed any correlation with contaminants, except a weak negative correlation observed between GST and Se and Cd ( $r = 0.44$ ;  $n = 27$ ). Relationship between contaminants and biomarkers was also checked at each station in order to (1) verify if correlations observed with the whole data (all sites) were also validated at each site and (2) if the significant intersite variations of biomarkers (not mentioned on Figure 7) could be related to the presence of a particular contaminant in mussel tissues. A negative relation was observed between AChE activity and iron levels at the two gas stations (B and D) ( $r = -0.75$ ;  $p = 0.03$ ;  $n = 7$ ). TBARS was positively correlated with Cr and Mn at the La Vigne harbour ( $r = 0.70$ ;  $p = 0.04$ ;  $n = 9$  and  $r = 0.77$ ;  $p = 0.02$ ;  $n = 9$ , respectively). Although numerous correlations between low molecular weight PAHs and the different biomarkers were observed, their significance seemed to be doubtful, since (1) a biomarker positively correlated with a particular PAH at one site was negatively correlated with the same compound at an other site exhibiting similar contaminant concentration, and (2) the low molecular weight PAHs exhibited very small variations, comparatively to the variation range of biomarker responses. No correlation was also observed when considering PAHs by classes of aromaticity.

## **4. DISCUSSION**

### *4.1. Physiological condition of mussels*

No correlation between lipid contents and organic contaminant levels in mussel tissues was observed. Organic pollutant data are usually expressed on a lipid-weight basis in some monitoring studies (California State Mussel Watch Program and Regional Monitoring Program for Trace Substances in the San Francisco Estuary, USA), because of correlation of contaminant concentrations with lipid contents and also because lipid normalization reduced the variance between long-term trend lines (Gunther, Davis, Hardin, Gold, Bell, Crick et al., 1999) and the variability of the distribution between species (Leblanc, 1995). However, Thompson et al. (1998) did not observe any relationship between lipid contents and concentrations of PCBs or DDTs in several bivalves species collected in the Arcachon Bay (*Mytilus sp.*, *Crassostrea gigas*, *Ruditapes philippinarum* and *Solen marginatus*).

Survival and condition factors tend to be worse in summer, and especially in July. Low viability of transplanted mussels was observed in summer on the oyster parks. This could be due to longer emersion period of mussels before their transplantation performed by a local oyster farmer at these stations (several hours), compared with the one-hour period of emersion between collection and deployment of mussels at the harbour stations. Condition indexes recorded in oyster parks and in the reference site were not significantly different (except those from Banc d'Arguin site) and exhibit similar seasonal patterns, indicating that caging technique does not seem to induce an important physiological stress in transplanted mussels. The observation of low condition indexes in mussels transplanted to the harbour stations suggests physiological stress, which could influence the rate and magnitude of contaminants uptake from the environment. This low physiological condition was not related to the pollutant contamination levels on these sites, but was rather attributed to the water exposure of mussels, maintained in subtidal conditions in harbours (different from the natural tidal conditions and submitted to a weaker hydrodynamic regime). These results document the influence of environmental conditions on the physiology of mussels, and highlight the importance of including such measurements when designing biomonitoring programs.

### *4.2. Pollutant levels in transplanted mussels*

Mean contamination levels of the different pollutant classes monitored in tissues of *Mytilus sp.* have been synthesized in Table 7 in order to bring a global view of the mussel chemical contamination in the Arcachon Bay.

#### *Organotin compounds*

Mussels transplanted to the oyster parks exhibited relatively low TBT concentrations of about 30 ng Sn g<sup>-1</sup> dw, similar to TBT levels recorded in mussels from the reference site, indicating that no

butyltins accumulation occurred in transplanted mussels. A  $30 \text{ ng g}^{-1}$  concentration of TBT in tissues is therefore representative of a baseline value for the bay. Similar levels were recorded in clams *Scrobicularia plana* ( $28 - 38 \text{ ng g}^{-1}$ ) in summer 1993 (Ruiz, Szpunar, & Donard, 1997) and in oysters *Crassostrea gigas* ( $20 - 30 \text{ ng g}^{-1}$ ) in winter 1994 (RNO, 1998), both collected in remote stations of the Arcachon Bay. Low TBT concentrations present in these stations are consistent with the important water exchange in the bay. Higher levels were recorded in August at the entrance of the bay (Banc d'Arguin, site G), exceeding by two fold the baseline value. It could be related to fresh TBT inputs due to the increased boating activity in summer at Banc d'Arguin and to the enclosed geometry of this site (surrounded by numerous sandbanks), comparatively to the more open oyster parks. This observation could evidence an illegal use of TBT-based antifouling paints in the bay, since extremely low TBT concentrations are expected to be trapped in the sandy sediments of this site. Conversely, an important accumulation of TBT was observed in the Arcachon harbour (annual mean level of  $1500 \text{ ng g}^{-1}$ ), indicating the presence of TBT in water (the TBT concentrations in subsurface seawater samples collected from May to August were in the range  $2 - 7 \text{ ng Sn L}^{-1}$ ). The superficial sediments of the Arcachon harbour contained an elevated TBT concentration of  $400 \text{ ng Sn g}^{-1} \text{ dw}$  (MBT:  $350 \text{ ng g}^{-1}$ , DBT:  $350 \text{ ng g}^{-1}$ ) and the resuspension of these sediments was responsible of the high TBT contamination recorded in mussels. A lower contamination level ( $100 \text{ ng g}^{-1}$ ) was reported for the La Vigne harbour (TBT was not detected in seawater samples). The upper TBT accumulation from April to September in the two harbours was related to the intense boating activity at that time, generating a strong stirring of the sediments. However, as regards with both the low TBT concentration in sediments of La Vigne ( $10 \text{ ng Sn g}^{-1} \text{ dw}$ ) and the values of the TBT/DBT ratios in summer (see below), some illegal use of TBT-based antifouling paints could also be suspected at this station.

The rapid bioaccumulation of TBT observed in this study has also been documented for mussels transplanted to organotin-polluted environments, showing a certain trend to the stabilization of TBT levels after 25 days (Zoulian & Jensen, 1989; Becker van Slooten & Tarradellas, 1994; Suzuki, Yamamoto, Yamada, Kaniwa, Kondo, & Murayama, 1998). Other field studies were performed using caged bivalves to monitor TBT-polluted areas. Clams (*Ruditapes decussata*) transplanted for 5 weeks in a polluted harbour (El Masnou, Spain) exhibited a maximal TBT concentration of  $1500 \text{ ng g}^{-1}$  within 3 weeks (Morcillo & Porte, 2000), corresponding to an accumulation factor (AF) of 60, similar to those recorded in the Arcachon harbour. Suzuki et al. (1998) recorded TBT and TPT concentrations of respectively  $4500 \text{ ng g}^{-1}$  and  $670 \text{ ng g}^{-1}$  in tissues of mussels *Mytilus graynus* transplanted for 70 days to a highly organotin-polluted area (Aburatsubo Bay, Japan). In freshwater ecosystems, zebra mussels *Dreissena polymorpha* transplanted for 100 days to harbours (Geneva Lake, Switzerland) exhibited a TBT concentration as high as  $13000 \text{ ng g}^{-1}$  (Becker van Slooten & Tarradellas, 1994). It is worth noting that, for the two former studies, harbours received boats greater than 25m in length, still allowed to use TBT-based antifouling paints, contrary to the Arcachon Bay. Therefore, the Arcachon harbour appears to be relatively highly contaminated by TBT ( $1000 - 2500 \text{ ng g}^{-1}$ ) and underlines the persistence of TBT in sediments (Sarradin, Astruc, Sabrier, & Astruc, 1994).

In summary, these results indicate that several years after regulation to reduce TBT inputs, the concentration of this compound in mussels in the Arcachon harbour is still elevated and underlines the role that this local polluted station could still play in the contamination of the whole of the bay. The consequences of these levels of exposure for the organism are unknown, although at TBT concentrations above  $1600 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$ , significant adverse biological effects were measured in adult mussels (uncoupling of oxidative phosphorylation and rapid decline in "scope for growth", an integrated physiological parameter that reflects the energy available for growth) (Page & Widdows, 1991; Widdows & Page, 1993).

The bioconcentration factors recorded in mussels transplanted to the Arcachon harbour (BCF =  $280\,000 - 1\,300\,000$ ) represented the highest BCF values ever reported in literature for the blue mussel *Mytilus sp.*, and for marine bivalves in a general manner. The BCFs detected for TBT in this study stand on the upper range of BCFs reported for bivalves in field situation:  $4\,700-105\,600$  for the mussel *Mytilus edulis* (Laughlin, French, & Guard, 1986; Salazar & Salazar, 1996; Suzuki et al., 1998),  $3\,700-55\,000$  for the mussel *Mytilus galloprovincialis* (Tolosa, Merlini, de Bertrand, Bayona, & Albaigés, 1992; Takahashi, Tanabe, Takeuchi, & Miyazaki, 1999; Rivaró, Pensiero, & Frache, 1999),  $18\,000-91\,000$  for the clams *Venerupis decussata* (Gomez-Ariza, Giraldez, & Morales, 2000) and  $6\,700-260\,000$  for the zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Becker van Slooten, Merlini, de Bertrand, de Alencastro, & Tarradellas, 1992). There is less data available concerning caging experiments, but the reported BCFs range from  $5\,000$  to  $60\,000$  for the mussel *Mytilus sp.* (Zoulian & Jensen, 1989; Suzuki et al., 1998), and were  $60\,000$  for clams *Ruditapes decussata* (Morcillo et al., 2000) and  $900\,000$  for zebra mussels *Dreissena polymorpha* transplanted to a TBT-polluted harbour (Becker van Slooten et al., 1994). This large range of BCF recorded in bivalves could be attributed to the fact that,

in addition to physicochemical properties of TBT, accumulation/depuration processes in biota are influenced by the exposure (level and time) and by environmental and biological factors having a strong species-specific component. The field BCFs found would be, therefore, snap-shots resulting from some very particular sets of circumstances which, however, do not undermine the feasibility and usefulness of careful biomonitoring campaigns (Ruiz et al., 1996).

The strong correlation between TBT and total butyltins in mussel tissues ( $r = 0.9853$ ,  $p < 0.0001$ ; all data) and between TBT and each of its degradation products (DBT:  $r = 0.908$  and MBT:  $r = 0.895$ ;  $p < 0.0001$ ; all data), indicating that most of DBT and MBT residues in mussel tissues have originated from TBT. TBT metabolism usually involves the cytochrome P-450 dependent mono-oxygenase system in vertebrates (Lee, 1991), and the limited activity of this enzymatic system in molluscs probably explains the large predominance of TBT in mussel tissues. Furthermore, higher percentage of TBT degradation products in the reference site compared to those recorded in the oyster park stations (where no butyltin accumulation was observed), could indicate a slight decrease in TBT metabolism in transplanted mussels possibly related to a physiological stress induced by the transplantation.

TBT/DBT ratio was also studied in order to obtain insight in the stability of TBT in each aquatic compartment and/or in metabolic processes. TBT/DBT ratios recorded at the gas stations (B and D) were significantly higher than those registered in the other sites (except from site C). Higher ratios in sites B and D were not related to fresh TBT inputs, because maximum values were recorded in winter and/or early spring for all stations (low boating activity in the bay), and because the dockyard station (site C), equally affected by butyltin contamination than the gas station (site B), did not exhibit significant higher ratios comparatively to the reference site. This observation could reveal an impact of gas stations in harbours in terms of physiological disturbance of TBT bioaccumulation and/or metabolization in transplanted mussels.

Seasonal patterns of TBT/DBT ratios exhibited maximum values in winter and minimum values in summer at the harbour stations. This trend was relatively less pronounced at the oyster farms. La Vigne harbour and the Banc d'Arguin oyster park showed increase in TBT/DBT ratios in summer, indicating fresh TBT inputs generated by an illegal use of TBT-based antifouling paints in the bay. The lower values of the TBT/DBT ratio recorded in harbours in summer are due higher range of variation in concentrations of DBT than TBT (both exhibiting upper levels in summer), with DBT and TBT being respectively 3 to 4.5 fold and 1.4 to 2 fold higher in July/August than in March (Figure 3b and d). This observation could indicate a greater metabolization rate of TBT in summer. The possibility of a higher bioaccumulation of DBT than TBT was rejected, since the latter exhibits higher lipophilicity. Similar seasonal variation have also been observed in levels of TBT/DBT in indigenous *Mytilus galloprovincialis* from the Genoa harbour (Italy), with DBT being three-fold higher in July than in March (Rivaro, Frache, Leardi, 1997). Both *Mytilus edulis* and *Nucella lapillus* sampled near Reykjavik harbour (Iceland) exhibited also lower TBT/DBT ratio in summer than in winter. This pattern is thought to be due to decrease feeding in winter in response to temperature-dependent low phytoplanktonic levels (Skarphédinsdóttir, Ólafsdóttir, Svavarson, & Johannesson, 1996). On the contrary, Page (1995) observed the opposite seasonal patterns for the percentage of DBT ( $\text{DBT}/[\text{DBT}+\text{TBT}] \times 100$ ) in tissues of mussels *Mytilus edulis* periodically collected from the Lyhner River (Tamar Estuary, England) from 1987 to 1992. In their 6-years survey, percentage of DBT clearly showed minimum values in summer and maximum values in winter. However, this author found that predominant factor governing the baseline seasonal variations in TBT and DBT concentrations in mussels was the seasonal variation in water flow within the Tamar Estuary (up to eight-fold higher in winter), which is totally different from the hydrodynamic conditions in the Arcachon Bay. Comparison of these studies shows how biological, climatic and geographical factors could modulate seasonal patterns of butyltin levels in organisms.

TBT/DBT ratio expressed relatively to the TBT concentrations in tissues negatively correlated to TBT, but only at the stations of the Arcachon harbour. This pattern was opposite to usual observations of a linear increase of this ratio with TBT concentrations in tissues (Stäb, Frenay, Frericks, Brinckman, & Cofino, 1995; Abd-Allah, 1995; Hong, Takahashi, Min, & Tanabe, 2002). However, these studies mentioned that polluted areas monitored were still exposed to fresh TBT inputs (harbours receiving boats greater than 25 m in length, still allowed to use TBT-based antifouling paints), which is not the case in the Arcachon Bay. In our study, the decrease in TBT/DBT ratios with increasing TBT concentrations in the Arcachon harbour could be due to enhanced metabolic rate of TBT in mussels in summer (see above).

## Trace metals

Contamination levels by trace metals were relatively low in the Arcachon Bay and overall similar or lower than those reported in other field experiments. Cd and Cr concentrations recorded in *Mytilus edulis* collected in numerous sites in South Chile were in the range  $1.4 - 3.1 \mu\text{g g}^{-1}$  and  $0.6 - 2.6 \mu\text{g g}^{-1}$ , respectively (Manly, Blundell, Field, & McCabe, 1996). Mussels *Mytilus galloprovincialis* transplanted for one month to the Nice Bay and Cannes Bay (Mediterranean Sea, France) exhibited similar levels of Cd ( $0.6 - 1 \mu\text{g g}^{-1}$  dw), Cu ( $3 - 8 \mu\text{g g}^{-1}$ , except  $27 - 202 \mu\text{g g}^{-1}$  for the Cannes harbour), and Zn ( $130 - 260 \mu\text{g g}^{-1}$  dw) (Roméo, Hoarau, Garello, Gnassia-Barelli, & Lafaurie, 2003). Mussels *Mytilus galloprovincialis* transplanted for 100 days (May – August 1998) to 38 stations on the Mediterranean Coast of France exhibited lower mean concentrations of Cr and Zn than those recorded in the whole of the Arcachon Bay (Andral, Stanisière, & Hervé, 1999). However, Cu levels recorded in mussels transplanted to harbours of the Arcachon Bay were also consistently higher than those registered in the Mediterranean survey ( $< 10 \mu\text{g g}^{-1}$ ).

The battery of the studied metals exhibited both similar levels and seasonal profiles (with the exception of Cu) indifferently of stations, indicating that heavy metal levels in mussels could be attributed to the only environmental factors (physiological state of mussels and physicochemical parameters of seawater). Among all monitored metals, only copper concentrations exhibited significant differences between harbours and oyster parks (Figure 5a), indicating anthropogenic inputs in summer and autumn in harbours, particularly in La Vigne. These high copper concentrations in harbours could be related to the increased use of Cu-containing antifouling paints (Stephenson & Leonard, 1994) since the TBT ban in the bay. Furthermore, Claisse & Alzieu (1993) have observed a significant tendency of increase in the contamination by copper of oysters *Crassostrea gigas* in the Arcachon Bay. Lead concentrations in mussels transplanted to harbour stations exhibited slightly higher levels in summer and could also be related to the high boating activity in this season. However, harbour stations did not reveal particular contamination by heavy metals (with the exception mentioned above for copper, and to a lesser and punctual extent for lead) in the Arcachon Bay.

The concentrations of trace metal recorded in autumn-winter were higher than in spring-summer. This seasonal trend has also been reported in other studies. Franco, Borja, Solaun, & Perez (2002) reported the same seasonal pattern in mussels in a biomonitoring study performed along the Basque Coast (Spain) - even though differences were only significant for Ni and Zn - and related to the seasonal cycle of reproduction and growth (Philips & Rainbow, 1993). Another explanation for this pattern might be found in climatological conditions, and particularly rainfalls that increased runoff and the concomitant introduction of suspended particulate material (Popham, Johnson, & D'Auria, 1980; Popham & D'Auria, 1983). A similar possibility was suggested by Fowler & Oregioni (1976), who previously found that the maximum content of trace metals in mussels living in the north western Mediterranean Sea occurred in late winter during a time of abundant rain. Dahlgaard (1986) suggested that the reduced metabolism associated with lower food availability, rather than low temperature, was responsible for the slow depuration of metals from bivalves during winter. Furthermore, copper levels in mussels transplanted to harbour stations decrease from November to March. This seasonal pattern was opposite both to those recorded for the other metals and for copper at the oyster parks in winter. This observation could indicate that the elevated concentrations of copper recorded in harbours in summer could have overwhelmed the physiological regulation of copper levels in mussels, following by decreasing exposition levels to copper in winter.

## Organic contaminants (PAHs and PCBs)

The Arcachon Bay has very low PCB concentrations. These results confirmed those previously obtained by Thompson et al. (1998) in 1997 in the Arcachon Bay. Mussels collected in remote stations of the bay exhibited low PCB levels ( $13 - 21 \text{ ng g}^{-1}$  dw). PCB levels in mussels presented relatively small variations in both levels and seasonal profiles between sites. The mean level of  $35 \text{ ng g}^{-1}$  in tissues represents therefore a baseline value of the contamination of the bay by PCBs.

On the contrary, PAHs exhibited a totally different behaviour in the Arcachon Bay, PAH levels exhibiting both high seasonal and spatial variations. If the remote stations of the bay (reference site and oyster parks) were characterized by a low or medium PAH contamination ( $100 \text{ ng g}^{-1}$  dw), harbour stations exhibited relatively medium levels at the gas stations (sites B and D:  $600 \text{ ng g}^{-1}$ ), whereas high PAH contamination was recorded near to the dockyard of the Arcachon harbour (site C:  $1500 \text{ ng g}^{-1}$ ). Similar PAH levels ( $280 - 480 \text{ ng g}^{-1}$  dw) were observed by Baumard et al. (1998) in mussels transplanted in winter to several locations in the Arcachon Bay (including the Arcachon harbour).

Contrary to the observation made on other contaminant classes (organotins, heavy metals and PCBs) that stations B and C of the Arcachon harbour were similarly affected by contamination levels, the two sites exhibited pronounced differences in PAH concentrations (Figure 6b and c). The strong difference of contamination level by PAHs in the two stations of the Arcachon harbour was not attributed to the sediment resuspension phenomena, since both stations exhibited relatively homogenous PAH concentrations in sediments. EPA PAH concentrations in sediments at stations B and C were respectively  $4600 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$  and  $4900 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$ , and MP concentrations were  $115$  and  $160 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$ , respectively (at the La Vigne harbour:  $3700 \text{ ng g}^{-1}$  for EPA PAHs and  $60 \text{ ng g}^{-1}$  for MPs). Direct inputs from the dockyard constitute therefore the main source of PAH contamination in the Arcachon harbour. The different period of occurrence of maximum PAH levels between the gas stations and the dockyard station corroborated this explanation, since the maximum levels recorded in August at the gas stations could be related to the apex of the boating activity and those registered in May/June at the dockyard station to the maximum activity period of the dockyard. Furthermore, the high differences in contamination levels between the two stations of the Arcachon harbour underline the usefulness of using as many cages as potential sources of contamination in the same location.

In harbours, high molecular weight PAHs (AFs ranging from 5 to 40) were accumulated to a greater extent than the smallest PAHs (AFs ranging from 1 to 10). The same pattern was already observed in the bay by Baumard et al. (1998) and these authors have suggested the following explanation. Because of the strong tide currents in the Arcachon Bay, the finest particles of the sediment are resuspended. A speciation of PAHs according to sediment grain size is generally observed, the finest particles being enriched in the highest molecular weight and less water soluble compounds (Raoux & Garrigues, 1991). Mussels which filter the finest particles are exposed to a greater extent to the smallest particles and thus to highest molecular weight PAHs.

The Phe/MP ratio expressed in function of the F/Pyr ratio was used in this study in order to characterize PAH origin among stations and their seasonal variations (Figure 6d). Oyster parks were characterized by a predominant pyrolytic origin of PAH contamination ( $F/Pyr > 1$ ), whereas harbours exhibited a pronounced petrogenic origin ( $F/Pyr < 1$ ). However, the use of these ratios allowed us to evidence slight overimpositions of petrogenic inputs in summer at the oyster parks; the more petrogenic fingerprint of the cluster formed by values recorded in July and August reveals the impact of the high boating activity in summer at these remote locations. Furthermore, Phe/MP ratios were always below 0.8 for all sites, although harbour stations exhibited the lowest values ( $Phe/MP < 0.3$ ). Thus, the value of 1 for the Phe/MP index for differentiating between pyrolytic and petrogenic origins established for sediments could be defined as 0.3 for mussels.

The methylphenanthrenes (MPs) were monitored in order to determine petrogenic origin of PAHs, characterized by the preponderance of alkylated PAHs compared to parent compounds. Extremely high levels of MP compounds were observed in May and June at the dockyard station of the Arcachon harbour (levels of each of the four MP ranging from  $500$  to  $750 \text{ ng g}^{-1}$ , corresponding to elevated accumulation factors in transplanted mussels from  $100$  to  $500$ ), revealing high petrogenic inputs from the dockyard. Furthermore, mean levels of the 6 Other PAHs ( $1620 \text{ ng g}^{-1}$ ), dominated by MP compounds, were surprisingly higher than levels of total EPA PAHs ( $1450 \text{ ng g}^{-1}$ ). This observation could be extremely important in biomonitoring studies, since only the 6 PAHs nominated in the Environmental Protection Agency priority list (that we called EPA PAHs) are usually monitored in these field studies. The lack of determination of MP compounds could turn away the interpretation of biomarker responses. Besides, the toxicity of these compounds should first be investigated in bivalves in order to validate their integration in biomonitoring studies in highly PAH-polluted locations, such as harbours.

#### 4.3. Biomarkers

##### *Enzymatic activities and TBARS contents*

The four biomarkers measured in blue mussels were characterized by a very similar pattern of variation between sites, indicating that the same disturbance occurred in all sites. Furthermore, the maximum/minimum ratio in the mean values of each biomarker (Table 6) was lower than that of most pollutant classes monitored at each site, notably for butyltins and PAHs. The seasonal profiles of all biomarkers showed two well-differentiated periods: (1) large variations during the spring/summer period (from March to July) and (2) relatively small variations the rest of the year (autumn/winter). Seasonal variations arise from a complex interaction between exogenous factors such as water temperature and food supply and endogenous factors such as spawning. Sheehan & Power (1999) suggested that reproductive activity and temperature-associated changes in patterns of food storage

and utilisation are likely to cause changes in hormonal and nutritional status which might also be expected to affect the levels of bioindicator molecules. Although it was difficult to draw unambiguous conclusions from such variations, it is clear from the data discussed in this work that high biochemical changes occur in mussels during the period March – July, and these probably reflect physiological changes relative to the reproductive cycle of mussels, the main spawning activity occurring in March-April in the Arcachon Bay (Lubet, 1959).

No evidence of correlation between biomarker responses and physiological indexes or physicochemical parameters of seawater was observed, although the period of great variability of biological responses (from March to July) was concomitant to numerous physicochemical changes in seawater during this period: maximum levels in nitrates, nitrites (March-June) and chlorophyll a (phytoplanktonic bloom in late April) and great variations of salinity.

The seasonal and intraspecies variabilities of biomarker responses were higher than the between station variability. Furthermore, TBARS exhibited both the highest seasonal and intraspecies variabilities among the biomarkers monitored. This factor complicates seriously the interpretation of biological responses in biomonitoring.

Overall, the correlations found between biomarker responses and pollutant levels in mussels when considering the whole data were no more observed when considering sites individually. Furthermore, the significant intersite variations of biomarkers observed in this study were unsuccessfully related to particular contaminant or contaminant classes and factors responsible of these variations were not identified. However, the presence of other pollutant classes in the Arcachon Bay may also affect biological responses, as, under realistic field conditions, there is likely to be a complex interaction among a suite of pollutants, and these interactions could be additive, synergic or antagonistic. Hence, Bocquené, Bellanger, Cadiou, & Galgani (1995) have evidenced the highly synergic effects of associated organophosphorous compounds, carbamates and metallic contaminants. Furthermore, exposition to contaminants could also being sufficiently elevated to induce a global deterioration of the physiological state of organisms which could lead to a decrease in the inductive response (Livingstone, 1993).

The use of an appropriated reference site in this study (low contaminant levels, and similar ecological and climatic conditions) allowed us to determine to what extent the response of the four biomarkers may have resulted from stress conditions owing to contaminant exposure or to natural environmental variability. Biomarker responses were not able to discriminate the different chemical contamination levels recorded in the Arcachon Bay, notably the harbour stations impacted by high levels of pollutants, possibly revealing a low discriminating power of these biomarkers of exposure in the Arcachon Bay. Hence, these results support the hypothesis that the observed seasonal profiles of biological responses reflect changes in natural factors (such as climatic and biological variation determining the physiological cycle of mussels) and are quite unrelated to exposure to chemical pollution.

## 5. CONCLUSION

The use of the blue mussel *Mytilus edulis* as a biomonitor to study variations in environmental contaminant concentrations has provided a comprehensive insight into the quality of water in the Arcachon Bay. The remote stations monitored (oyster parks) exhibited no accumulation pattern of pollutants. Their respective concentrations constitute therefore a background level of the contamination in the Bay. The elevated chemical contamination of the biggest harbour of the bay, the Arcachon harbour, can be interpreted in terms of persistence of organotin compounds and PAHs in sediments and, to a lesser extent, of direct inputs of copper and petrogenic PAHs, related to the use of copper-based antifouling paints and to the dockyard activity, respectively. However, the Arcachon Bay presents a low contamination level by PCBs and metals, including harbour stations. Furthermore, higher levels of Other PAHs (particularly methylphenanthrenes) than the 16 PAHs nominated in the EPA priority list (usually studied in biomonitoring programmes) in the Arcachon harbour underline the need to integrate these compounds in biomonitoring of highly PAH-polluted areas such as harbours in order to not turn away the interpretation of the biological responses observed. Methodological and natural variabilities of biomarker responses appeared to be more important than stress induced by exposure to high levels of pollutants in mussels in the Arcachon Bay, since the significant intersite variations of biomarkers observed were unsuccessfully related to particular contaminant or contaminant classes.

## Acknowledgments

The French Ministry of Research is acknowledged for the PhD grant of one of us (Dévier M.H.). The Conseil Régional d'Aquitaine is also acknowledged for partial funds of equipment (grant number 9804024). Financial support was also received from the European Union through the BEEP Project (contract number EVK3-CT-2000-00025). We wish to express our sincere gratitude to Mr Smalbeen for the deployment and the recovering of cages in the oyster parks. We want also thank people from the LPTC who have participated to this biomonitoring programme: Mazeas O. and Pelhuet L. for the PAH and PCB determinations, and Togola A., Tapie N., Labadie P. and others for generous help in sampling and tissue preparation.

## References

- Abd-Allah, A.M.A. (1995). Occurrence of organotin compounds in water and biota from Alexandria harbour. *Chemosphere*, 30(4), 707-715.
- Alzieu, C., Heral, M., Thibaud, Y., Dardignac, M.J., & Feuillet, M. (1982). Influence des peintures antisalissures à base d'organostanniques sur la calcification de la coquille de l'huître *Crassostrea gigas*. *Revue Trav Inst Pêches Maritimes*, 45, 101-116.
- Alzieu, C. (1991). Environmental problems caused by TBT in France. Assessment, regulation, prospects. *Marine Pollution Bulletin*, 32, 7-17.
- Andral, B., Stanisière, J.Y., & Hervé, G. (1999). Evaluation de la qualité des eaux basée sur l'utilisation de stations artificielles de moules en Méditerranée: résultats de la campagne 1998. *Rapport IFREMER DEL/TL/99-038*.
- Auby, I. (1993). Evolution de la richesse biologique du Bassin d'Arcachon. *Rapport IFREMER/SSA n° 91*, 5527019.
- Augagneur, S., Budzinski, H., Garrigues, P., & Narbonne, J.F. (1998). Trace metal profile in sediment and blue mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from western Mediterranean Sea. 8<sup>th</sup> Annual Meeting of SETAC-Europe, April 14-18, Bordeaux, France.
- Baumard, P., Budzinski, H., & Garrigues, P. (1998). PAHs in the Arcachon Bay: Origin and biomonitoring with caged organisms. *Marine Pollution Bulletin*, 36, 577-586.
- Becker van Slooten, K., Merlini, L., de Bertrand, N., de Alencastro, L.F., & Tarradelas, J. 1992. Elevated levels of organotins in Lake Geneva: bivalves as sentinel organism. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 48, 37-44.
- Becker van Slooten, K., & Tarradelas, J. (1994). Accumulation, depuration and growth effects of tributyltin in the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha* under field conditions. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13, 755-762.
- Bettin, C., Oehlmann, J., & Stroben, E. (1996). TBT-induced imposex in marine neogastropods is mediated by an increasing androgen level. *Helgol Meeresunters*, 50, 299-317.
- Bocquené, G., Bellanger, C., Cadiou, Y., & Galgani, F. (1995). Joint action of combinations of pollutants on the acetylcholinesterase activity of several marine species. *Ecotoxicology*, 4, 266-279.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive assay of protein utilizing the principle of dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-264.
- Budzinski, H., Baumard, P., Papineau, A., Wise, S., & Garrigues, P. (1996). Focused microwave assisted extraction of polycyclic aromatic compounds from standard reference materials, sediment and biological tissues. In: *Proceedings of the fifteenth international symposium on polycyclic aromatic compounds*, pp. 252-232. Belgirate, Italy.
- Buege, J.A., & Aust, S.D. (1978). Mitochondrial lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 50, 302-310.
- Carlier-Pinasseau, C., Astruc, A., Lespes, G., & Astruc, M. (1996). Determination of butyl- and phenyltin compounds in biological material by gas chromatography-flame photometric detection after ethylation with sodium tetraethylborate. *Journal of Chromatography A*, 750, 317-325.
- Cheung, C.C.C., Zheng, G.J., Lam, P.K.S., & Richardson, B.J. (2002). Relationships between tissue concentrations of chlorinated hydrocarbons, polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Marine Pollution Bulletin*, 45, 1-2, 181-191.
- Claiborne, A. (1985). Catalase activity. In R.A. Greenwald, *Handbook of methods for oxygen radical research* (pp 283-284). Boca Raton: CRC Press, FL, USA.
- Claisse, D., & Alzieu, C. (1993). Copper contamination as a result of antifouling paint regulation? *Marine Pollution Bulletin*, 26, 7, 395-397.
- Crosby, M.P., & Gale, L.D. (1990). A review and evaluation of bivalve condition index methodologies with a suggested standard method. *Journal of Shellfish Research*, 9(1), 233-237.

- Dahlgaard, H. (1986). Effects of season and temperature on long-term *in situ* loss rates of Pu, Am, Np, Eu, Ce, Ag, Tc, Zn, Co and Mn in a Baltic *Mytilus edulis* population. *Marine Ecology Progress Series*, 33, 157-165.
- Dévier, M.H., Augagneur, S., Budzinski, H., Mora P., Narbonne J. F., & Garrigues, P. (2003). Microcosm TBT bioaccumulation and multi-biomarker assessment in the blue mussel *Mytilus sp.* *Environmental Toxicology and Chemistry*, in press.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., & Featherstone, R. Jr. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemistry and Pharmacology*, 7, 88-95.
- Fent, K. (1996). Ecotoxicology of organotin compounds. *CRC Critical Reviews in Toxicology*, 26(1), 1.
- Fowler, S.W., & Oregioni, B. (1976). Trace metals in mussels from the N.W. Mediterranean. *Marine Pollution Bulletin*, 7, 26-29.
- Franco, J., Borja, A., Solaun, O., & Perez, V. (2002). Heavy metals in molluscs from the Basque Coast (Northern Spain): results from an 11-year monitoring programme. *Marine Pollution Bulletin*, 44, 973-976.
- Gomez-Ariza, J.L., Giraldez, I., & Morales, E. (2000). Temporal fluctuations of tributyltin in the bivalve *Venerupis decussata* at five stations in southwest Spain. *Environmental Pollution*, 108, 279-290.
- Gunther, A.J., Davis, J.A., Hardin, D.D., Gold, J., Bell, D., Crick, J.R., Scelfo, G.M., Sericano, J., & Stephenson, M. (1999). Long-term bioaccumulation monitoring with transplanted bivalves in the San Francisco Estuary. *Marine Pollution Bulletin*, 38(3), 170-181.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., & Jakoby, B. (1974). The enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249, 7130-7139.
- Hong, H.K., Takahashi, S., Min, B.Y., & Tanabe, S. 2002. Butyltin residues in blue mussels (*Mytilus edulis*) and arkshells (*Scapharca broughtonii*) collected from Korean coastal waters. *Environmental Pollution*, 117, 475-486.
- Laughlin, R.B., French, W. Jr., & Guard, H.E. (1986). Accumulation of bis(tributyltin) oxide by the marine mussel *Mytilus edulis*. *Environmental Science and Technology*, 20, 884-890.
- Leblanc, G.A. (1995). Trophic-level differences in the bioconcentration of chemicals: implications in assessing environmental biomagnification. *Environmental Science and Technology*, 29, 154-160.
- Livingstone, D.R. (1993). Biotechnology and biomonitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *Journal of Chemistry and Techniques in Biotechnology*, 57, 195-211.
- Lubet, P. (1959). Recherches sur le cycle sexuel et l'émission de gamètes chez les Mytilidés et les Pectinidés (Mollusques bivalves). *Rev Trav Instit Pêches Maritimes*, 23, 387-548.
- Maguire, R.J., Chau, Y.K., Bengert, G.A., Hale, E.J., Wong, P.T.S., & Kramer, O. (1982). Occurrence of organotin compounds in Ontario lakes and rivers. *Environmental Science Technology*, 16, 698-702.
- Manly, R., Blundell, S.P., Field, F.W., & McCabe, P.J. (1996). Trace metal concentrations in *Mytilus edulis* L. from the laguna San Rafael, southern Chile. *Marine Pollution Bulletin*, 32, 444-448.
- McCarthy, J.F., & Shugart, L.R. 1990. Biomarkers of environmental contamination (pp 3-14). Boca Raton: Lewis publishers, Florida, USA.
- Michel, P., & Averty, B. (1991). Tributyltin analysis in seawater by GC-FPD after direct aqueous-phase ethylation using sodium tetraethylborate. *Applied Organometallic Chemistry*, 5, 393-397.
- Mora, P., Michel, X., & Narbonne, J.F. (1999). Cholinesterase activity as potential biomarker in two bivalves. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 7, 253-260.
- Morcillo, Y., & Porte, C. (2000). Evidence of endocrine disruption in clams - *Ruditapes decussata* - transplanted to a tributyltin-polluted environment. *Environmental Pollution*, 107, 47-52.
- Narbonne, J.F., Daubèze M., Baumard P., Budzinski H., Clérandeau C., Akcha F., Mora P., & Garrigues P. (2001). Biochemical markers in mussels *Mytilus sp.* and pollution monitoring in European Coast: Data analysis. In: Garrigues P., Barth H., Walker C.H., & Narbonne J.F., *Biomarkers in marine organisms. A practical approach* (pp 215-234). Amsterdam: Elsevier Science.
- Page, D.S., Widdows, J. (1991). Temporal and spatial variation in levels of alkyltins in mussel tissues: a toxicological interpretation of field data. *Marine Environmental Research*, 32, 113-129.
- Page, D.S. (1995). A six-year monitoring study of TBT and DBT in mussel tissues from the Lynher River, Tamar Estuary, UK. *Marine Pollution Bulletin*, 30, 746-749.
- Piérard, C. (1995). Détermination des composés polychlorobiphényles dans l'environnement sédimentaire marin et estuarien. *Thèse de l'Université de Bordeaux I*, n° d'ordre 1346.
- Philips, D.J.H., & Rainbow, P.S. (1993). *Biomonitoring of trace aquatic contaminants*. Elsevier Science Publisher, 362 pp.
- Popham, J.D., Johnson, D.J., & D'Auria, J.M. 1980). Mussels (*Mytilus edulis*) as point source indicators of pollution. *Marine Pollution Bulletin*, 11, 261.

- Popham, J.D., & D'Auria, J.M. (1983). Combined effect of body size, season, and location on trace element levels in mussels (*Mytilus edulis*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 12, 1-14.
- Porte, C., Biosca, X., Sole, M., & Albaiges, J. (2001). The integrated use of chemical analysis, cytochrome P450 and stress proteins in mussels to assess pollution along the Galician coast (NW Spain). *Environmental pollution*, 112, 261-268.
- Raoux, C.Y., & Garrigues, P. (1991). Occurrence of polycyclic aromatic polycarbons (PAH) in muddy sediments from the Mediterranean Sea in relation to grain size distribution of sediments. In D.A. C. Manning, *Organic Geochemistry. Advances and applications in the natural environment* (pp. 552-556). Manchester: Manchester University Press.
- Rivaro, P., Frache, R., & Leardi, R. (1997). Seasonal variations in levels of butyltin compounds in mussel tissues sampled in an oil port. *Chemosphere*, 34, 99-106.
- Rivaro, P., Pensiero, G., & Frache, R. (1999). Occurrence of butyltin compounds in water and mussel samples collected in an oil port. *Applied Organometallic Chemistry*, 13, 727-732.
- R.N.O. (1998). Surveillance du milieu marin. IFREMER et Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement, 32p.
- Roméo, M., Hoarau, P., Garello, G., Gnassia-Barelli, M., & Lafaurie, M. (2003). Mussel transplantation and biomarkers as useful tools for assessing water quality in the NW Mediterranean. *Environmental Pollution*, 122, 369-378.
- Ruiz, J.M., Bachelet, G., Caumette, P., & Donard, O.F.X. (1996). Three decades of tributyltin in the coastal environment with emphasis on Arcachon Bay, France. *Environmental pollution*, 93(2), 195-203.
- Ruiz, J.M., Szpunar, J., & Donard, O.F.X. (1997). Butyltins in sediments and deposit-feeding bivalves *Scrobicularia plana* from Arcachon Bay, France. *The Science of the Total Environment*, 198, 225-231.
- Salazar, M.H., & Salazar, S.M. (1996). Mussels as bioindicators: Effects of TBT on survival, bioaccumulation and growth under natural conditions. In: M.A. Champ, & P.F. Seligman, *Organotin – Environmental fate and effects* (chapter 15). London: Chapman and Hall.
- Sarradin, P.M., Astruc, A., Sabrier, R., & Astruc, M. (1994). Survey of butyltin compounds in Arcachon Bay sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 28, 10, 621-628.
- Seed, R., & Suchanek, T.H. (1992). Population and community ecology of *Mytilus*. In E.R. Goslin, *The Mussel Mytilus: Ecology, Physiology, Genetics and Culture* (pp. 87-169). London: Elsevier.
- Sheehan, D., & Power, A. (1999). Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve mollusc. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 123, 193-199.
- Skarphédinsdóttir, H., Ólafsdóttir, K., Svavarsón, J., & Johannesson, T. (1996). Seasonal fluctuations of tributyltin (TBT) and dibutyltin (DBT) in the dogwhelk, *Nucella lapillus* (L.), and the blue mussel, *Mytilus edulis* (L.), in Icelandic waters. *Marine Pollution Bulletin*, 32(4), 358-361.
- Sole, M. (2000). Assessment of the results of chemical analyses combined with biological effects of organic pollution on mussels. *Trends in Analytical Chemistry*, 19, 1-9.
- Spooner, N., Gibbs, P.E., Bryan, G.W., & Goal, L.J. (1991). The effect of tributyltin upon steroid titres in the female dogwhelk, *Nucella lapillus*, and the development of imposex. *Marine Environmental Research*, 32, 37-49.
- Stäb, J.A., Frenay, M., Frericks, I.L., Brinckman, U.A.T., & Cofino, W.P. (1995). Survey of nine organotin compounds in the Netherlands using zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) as biomonitor. *Analitica Chimica Acta*, 286, 335.
- Stephenson, M.D., & Leonard, G.H. (1994). Evidence for the decline of silver and lead and the increase of copper from 1977 to 1990 in the coastal marine waters of California. *Marine Pollution Bulletin*, 28, 3, 148-153.
- Suzuki, T., Yamamoto, I., Yamada, H., Kaniwa, N., Kondo, K., & Murayama, M. (1998). Accumulation, metabolism and depuration of organotin compounds in the marine mussels *Mytilus graynus* and *Mytilus edulis* under natural conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 304-313.
- Takahashi, S., Tanabe, S., Takeuchi, I., & Miyazaki, N. (1999). Distribution and specific bioaccumulation of butyltin compounds in a marine ecosystem. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 37, 50-61.
- Thompson, S., Budzinski, H., & Garrigues, P. (1998). Comparison of PCB and DDT distribution between water-column and sediment-dwelling bivalves in Arcachon Bay, France. *Marine Pollution Bulletin*, 38, 8, 655-662.
- Thompson, S., & Budzinski, H. (1999). Determination of polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides in environmental biological samples using focused microwave-assisted extraction. *International Journal of environmental analytical chemistry*, 76, 1, 49-60.

- Tolosa, I., Merlini, L., de Bertrand, N., Bayona, J.M., & Albaigés, J. (1992). Occurrence and fate of tributyl- and triphenyltin compounds in Western Mediterranean coastal enclosures. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11, 145-155.
- Widdows, J., & Donkin, P. (1992). Mussels and environmental contaminants: Bioaccumulation and physiological aspects. In: E. Goslin, *The mussel Mytilus: Ecology, physiology, genetics and culture* (pp 383-424). Amsterdam: Elsevier Science.
- Widdows, J., & Page, D.S. (1993). Effects of tributyltin and dibutyltin on the physiological energetics of the mussel, *Mytilus edulis*. *Marine Environmental Research*, 35(3), 233-249.
- Zoulian, C., & Jensen, A. (1989). Accumulation of organic and inorganic tin in blue mussel, *Mytilus edulis* under natural conditions. *Marine Pollution Bulletin*, 20, 281-286.

Table 1: Abbreviations list of contaminants, biomarkers, physiological parameters and transplanted sites monitored.

Compounds	Abbrev.	Compounds	Abbrev.	Compounds	Abbrev.
<u>Contaminants</u>		<u>Contaminants</u>		<u>Biomarkers</u>	
Monobutyltin	MBT	Naphthalene	N	Acetylcholinesterase	AChE
Dibutyltin	DBT	Acenaphthylene	Ay	Glutathion S-transferase	GST
Tributyltin	TBT	Acenaphthene	Ae	Catalase	CAT
Monophenyltin	MPT	Fluorene	Fe	Thiobarbituric acid reactive species	TBARS
Diphenyltin	DPT	Dibenzothiophene	DiBT		
Triphenyltin	TPT	Phenanthrene	Phe	<u>Physiological parameters</u>	
Organotin sum	OTs	Anthracene	A	Condition index	CI
Chromium	Cr	3-Methylphenanthrene	3 MP	Condition factor	CF
Nickel	Ni	2-Methylphenanthrene	2 MP	Accumulation factor	AF
Copper	Cu	9-Methylphenanthrene	9 MP	Bioconcentration factor	BCF
Zinc	Zn	1-Methylphenanthrene	1 MP		
Arsenic	As	Fluoranthene	F	<u>Sites</u>	
Selenium	Se	Pyrene	Pyr	Moulléau (reference site)	A
Cadmium	Cd	Benzo(a)anthracene	BaA	Arcachon (harbour, gas station)	B
Lead	Pb	Chrysene	Chrys	Arcachon (harbour, dockyard)	C
2,4,4'-trichlorobiphenyl	PCB 28	Benzo(b,k,j)fluoranthene	BbkjF	La Vigne (harbour, gas station)	D
2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl	PCB 52	Benzo(e)pyrene	BeP	Grand Banc (oyster park)	E
2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl	PCB 118	Benzo(a)pyrene	BaP	Ferret (oyster park)	F
2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl	PCB 153	Indenopyrene	Ipyr	Banc d'Arguin (oyster park)	G
2,2',3,4,4',5'-hexachlorobiphenyl	PCB 138	Dibenzo(a,h)anthracene	DahA		
2,2',3,4,4',5,5'-heptachlorobiphenyl	PCB 180	Benzo(g,h,i)perylene	Bper		

Table 2: Annual mean values of individual butyltin compounds and sum of organotin compounds (ng Sn g<sup>-1</sup> dw), homolog ratio and mean percentage of TBT degradation products recorded at each site.

Sites	MBT	DBT	TBT	TBT/DBT	%(MBT, DBT) <sup>a</sup>	ΣOTs <sup>b</sup>
A : Moulleau (reference)	5 ± 5	12 ± 4	27 ± 3	2,5 ± 0,9	34 ± 6	43 ± 8 (32 - 148 <sup>c</sup> )
B : Arcachon (harbour, gas station)	79 ± 46	461 ± 294	1621 ± 455	4,8 ± 2,1	23 ± 8	2191 ± 759 (1172 - 3601)
C : Arcachon (harbour, dockyard)	78 ± 28	475 ± 243	1344 ± 354	3,6 ± 1,3	27 ± 7	2026 ± 566 (1032 - 2876)
D : La Vigne (harbour, gas station)	7 ± 5	23 ± 12	106 ± 53	5,0 ± 1,6	22 ± 6	142 ± 67 (62 - 289)
E : Grand Banc (oyster park)	3 ± 4	10 ± 3	27 ± 3	3,1 ± 1,2	31 ± 6	40 ± 9 (27 - 55)
F : Ferret (oyster park)	3 ± 4	10 ± 3	30 ± 7	3,2 ± 1,1	29 ± 7	43 ± 10 (30 - 58)
G : Banc d'Arguin (oyster park)	5 ± 9	10 ± 4	27 ± 15	3,2 ± 0,9	28 ± 7	40 ± 20 (23 - 516 <sup>c</sup> )
Max/min ratio <sup>d</sup>	26	48	50	2	1.5	55

<sup>a</sup> %(MBT, DBT) = (MBT + DBT)/(MBT + DBT + TBT).

<sup>b</sup> ΣOTs = butyltin + phenyltin compounds. Minimum - maximum levels are mentioned in parentheses.

<sup>c</sup> Maxima values (relative to the appearance of an unidentified organotin compound in May) not taken into account in the annual means.

<sup>d</sup> Max/min ratio is the ratio of the maximum to minimum mean site values and corresponds to the amplitude of variation between sites.

Table 3: Bioconcentration factors (BCFs) of TBT recorded from May to August in transplanted mussels (when TBT was detected in seawater samples).

BCFs	23-May	20-June	12-July *	23-August *
B : Arcachon (harbour, gas station)	604 100	1 350 900	332 600	819 700
C : Arcachon (harbour, dockyard)	465 500	1 322 000	283 900	586 600
E : Grand Banc (oyster park)				73 100
F : Ferret (oyster park)				132 200

\* Determination of TBT in seawater used to determine BCF values were obtained from IFREMER Arcachon (pers. comm. from Auby I.).

Table 4: Annual mean concentrations of trace metals ( $\mu\text{g g}^{-1}$  dw) in mussel tissues at each site.

Sites	Cr	Ni	Cu	Zn	As	Se	Cd	Pb
A : Moulleau (reference)	1.8 ± 0.5	1.4 ± 0.8	6.0 ± 1.7	204 ± 54	14 ± 4	9 ± 7	0.8 ± 0.4	1.4 ± 0.6
B : Arcachon (harbour, gas station)	1.7 ± 0.4	1.1 ± 0.8	19.0 ± 11.2	235 ± 63	15 ± 3	10 ± 6	0.9 ± 0.4	1.7 ± 0.6
C : Arcachon (harbour, dockyard)	1.5 ± 0.6	1.3 ± 0.5	16.8 ± 6.1	230 ± 79	16 ± 4	12 ± 7	1.0 ± 0.4	1.5 ± 0.6
D : La Vigne (harbour, gas station)	1.9 ± 0.9	1.5 ± 0.9	22.7 ± 12.1	201 ± 92	15 ± 4	10 ± 6	0.8 ± 0.4	1.6 ± 0.4
E : Grand Banc (oyster park)	1.7 ± 0.5	1.5 ± 0.9	8.4 ± 5.4	211 ± 59	15 ± 6	12 ± 8	0.8 ± 0.4	1.6 ± 0.6
F : Ferret (oyster park)	1.6 ± 0.8	1.4 ± 0.8	7.3 ± 1.7	171 ± 73	15 ± 5	11 ± 7	0.9 ± 0.4	1.5 ± 0.5
G : Banc d'Arguin (oyster park)	1.3 ± 0.6	1.3 ± 0.8	6.6 ± 1.2	158 ± 64	16 ± 5	11 ± 8	0.8 ± 0.3	1.5 ± 0.5
Max/min ratio *	1.2	1.4	3.8	1.5	1.1	1.3	1.3	1.2

\* Max/min ratio is the ratio of the maximum to minimum mean site values and corresponds to the amplitude of variation between sites.

Table 5: Annual mean concentrations of PAHs and PCBs in mussel tissues ( $\text{ng g}^{-1}$  dw) from February 2001 to August 2001 at each site. Contaminant levels are expressed as annual mean  $\pm$  S.D. and minimum - maximum levels (in parentheses).

Sites	EPA PAHs		Other PAHs		PCBs	
A :Moulleau (reference)	124 $\pm$ 59	(57 - 258)	38 $\pm$ 18	(10 - 68)	39 $\pm$ 8	(25 - 45)
B : Arcachon (harbour, gas station)	582 $\pm$ 130	(432 - 811)	256 $\pm$ 101	(89 - 404)	38 $\pm$ 7	(27 - 47)
C : Arcachon (harbour, dockyard)	1454 $\pm$ 320	(981 - 1923)	1620 $\pm$ 887	(168 - 2698)	35 $\pm$ 7	(25 - 47)
D : La Vigne (harbour, gas station)	559 $\pm$ 152	(321 - 745)	185 $\pm$ 46	(111 - 254)	36 $\pm$ 10	(25 - 54)
E : Grand Banc (oyster park)	116 $\pm$ 13	(97 - 131)	30 $\pm$ 5	(23 - 35)	33 $\pm$ 4	(29 - 39)
F : Ferret (oyster park)	113 $\pm$ 22	(90 - 154)	36 $\pm$ 9	(22 - 48)	30 $\pm$ 9	(17 - 43)
G : Banc d'Arguin (oyster park)	74 $\pm$ 25	(37 - 109)	23 $\pm$ 11	(11 - 45)	30 $\pm$ 13	(12 - 53)

Table 6: Annual mean values of biomarkers in tissues of mussels transplanted to harbours (B, C, D) and of mussels inhabiting the reference site (A). Biomarker values are expressed as annual mean  $\pm$  S.D. and minimum - maximum levels (in parentheses).

Sites	AChE (B <sup>a</sup> ) nmol/min/mg protein	GST (DG <sup>b</sup> ) nmol/min/mg protein	CAT (DG) $\mu$ mol/min/mg protein	TBARS (DG) nmol/ml S9 <sup>c</sup>
A : Moulleau (reference)	27 $\pm$ 8 (12 - 42)	144 $\pm$ 65 (90 - 304)	101 $\pm$ 33 (50 - 159)	32 $\pm$ 14 (7 - 57)
B : Arcachon (harbour, gas station)	27 $\pm$ 7 (15 - 37)	169 $\pm$ 66 (114 - 301)	87 $\pm$ 31 (39 - 136)	23 $\pm$ 10 (7 - 40)
C : Arcachon (harbour, dockyard)	23 $\pm$ 5 (13 - 27)	180 $\pm$ 73 (120 - 307)	87 $\pm$ 33 (43 - 134)	27 $\pm$ 17 (6 - 69)
D : La Vigne (harbour, gas station)	27 $\pm$ 8 (14 - 38)	146 $\pm$ 40 (96 - 230)	105 $\pm$ 42 (51 - 206)	29 $\pm$ 11 (10 - 53)
Max/min ratio <sup>d</sup>	1.2	1.3	1.2	1.4

<sup>a</sup> G, gills; <sup>b</sup> DG, digestive gland; <sup>c</sup> S9, post-mitochondrial fraction.

<sup>d</sup> Max/min ratio is the ratio of the maximum to minimum mean site values and corresponds to the amplitude of variation between sites.

Table 7: Contamination levels (in ng g<sup>-1</sup> dw) of the different pollutant classes monitored in tissues of *Mytilus sp.* in the Arcachon Bay. Contaminant levels are expressed as lowest concentration – highest concentration (annual mean) for the corresponding site(s).

Sites	TBT	OTs	Metals *		EPA PAHs	Other PAHs	PCBs
A : Moulleau, (reference site)	20 - 40 (30)	25 - 60 (40)	Cr, Cd Ni, As Zn, Se Pb	Cu (7)	50 - 150 (100)	10 - 50 (30)	20 – 50 (35)
E, F, G : Oyster parks				Cu (20)			
D : La Vigne harbour (gas station)	50 - 230 (100)	60 - 290 (140)	100 - 400 (250)				
B : Arcachon harbour, (gas station)	900 - 2400 (1500)	1000 - 3600 (2100)	900 - 2000 (1500)		200 - 2700 (1600)		
C : Arcachon harbour, (dockyard)							

\* in µg g<sup>-1</sup> dw.

Pollutant classes (see Table 1): OTs: MBT, DBT, TBT, MPT, DPT, TPT; Metals: Cr, Ni, Cu, Zn, Cd, As, Se, Pb; EPA PAHs: N, Ay, Ae, Fe, Phe, A, F, Pyr, BaA, Chrys, BbkjF, BaP, Ipyr, DahA, Bper; Other PAHs: DBT, 3-MP, 2-MP, 9-MP, 1-MP, BeP; PCBs: congeners 28, 52, 118, 153, 138, 180.

List of figures:

Figure 1: Sampling station (A) and transplantation sites (B, C, D, E, F, G) in the Arcachon Bay (France).

Figure 2: Condition factors (see text for description) of mussels transplanted to each station (■ harbours, ● oyster parks).

Figure 3: Seasonal trends in TBT concentrations (a and b) and in MBT and DBT concentrations (c and d) in mussels transplanted to oyster parks (a and c) and to harbours (b and d). On graphics b and d, butyltin concentrations in La Vigne harbour (station D) are expressed relatively to the secondary axis. \* and \*\*: relative to the occurrence of two distinct unidentified organotin compounds in mussels in May at stations A and G, respectively.

Figure 4: Seasonal variations of TBT/DBT ratio in mussel tissues at each site.

Figure 5: (a) Concentrations of copper in mussels in oyster parks and harbours, and (b) seasonal variations of trace metal levels in mussels: the example of lead.

Figure 6: Seasonal variations of (a) total PCB levels, (b) EPA PAH levels, and (c) Other PAH levels, and (d) PAH ratios used to determine the PAH origins in mussel tissues.

Figure 7: Seasonal variations of enzymatic activities (a) AChE, (b) GST, (c) CAT, and of (d) TBARS contents in tissues of mussels transplanted to the harbour stations and of mussels from the reference site.

Figure 1

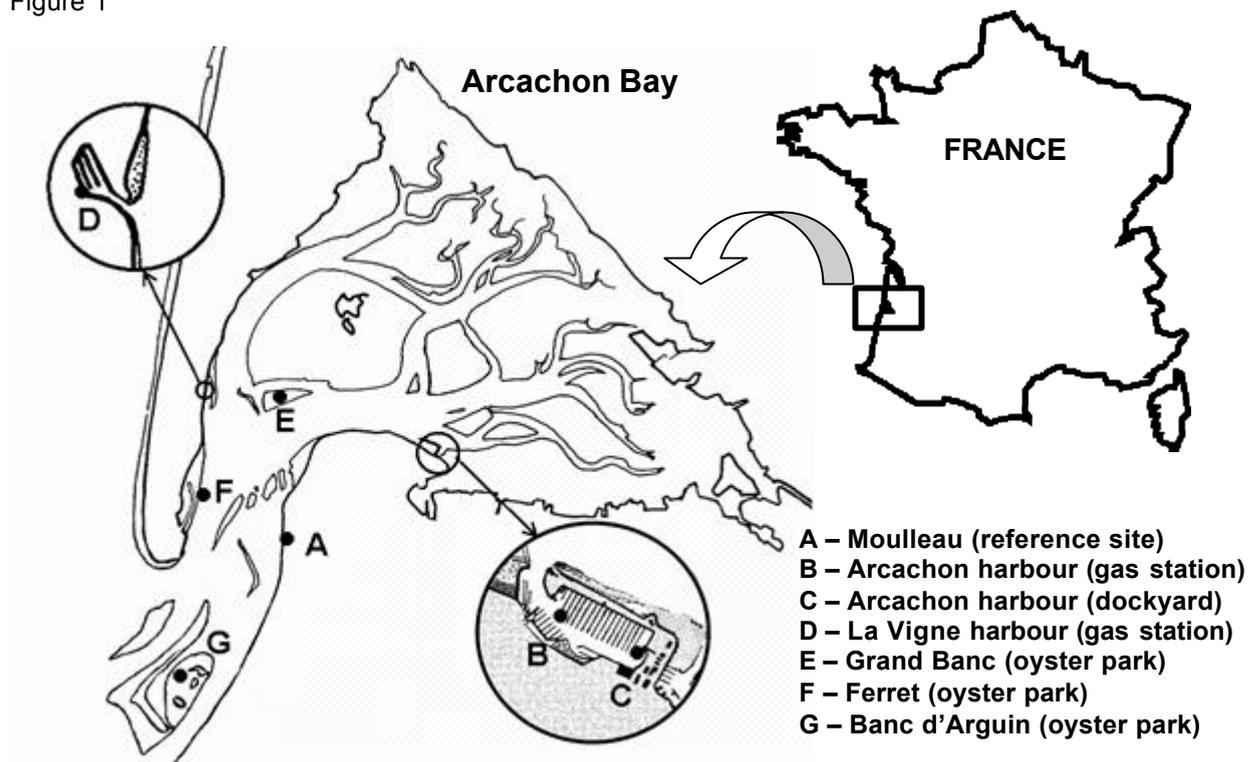


Figure 2

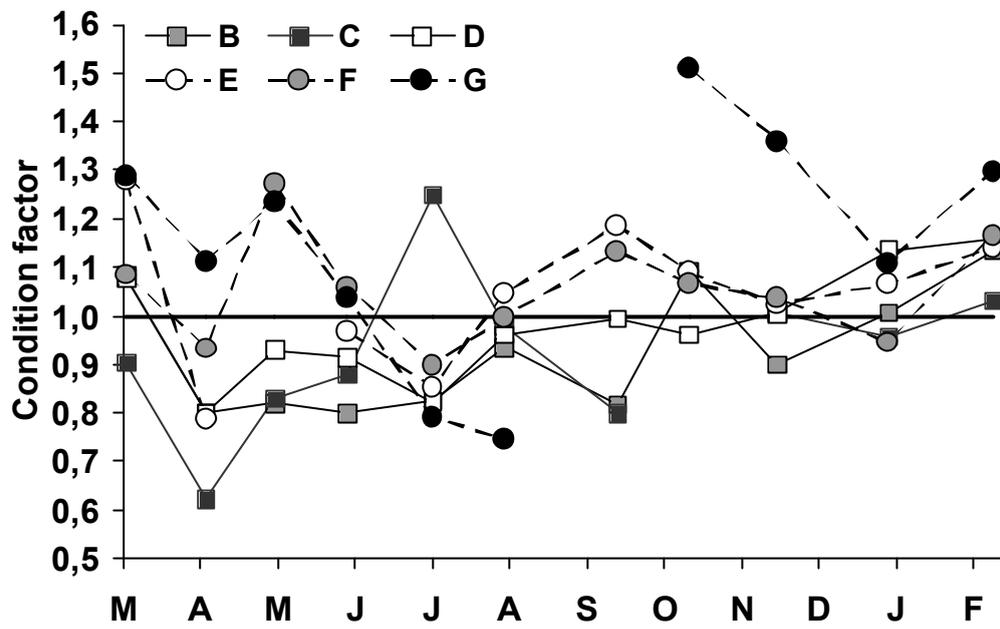


Figure 3

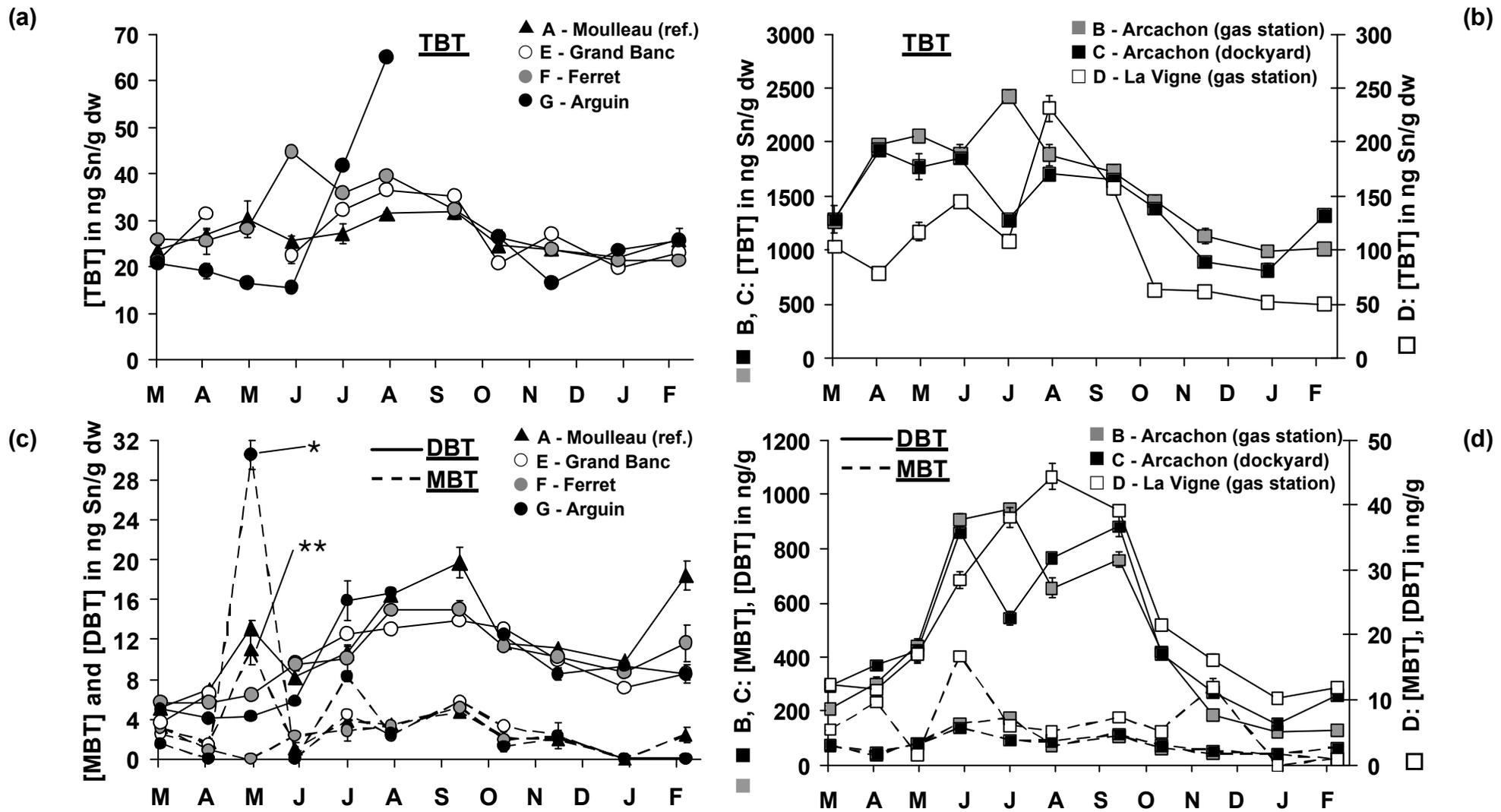




Figure 4

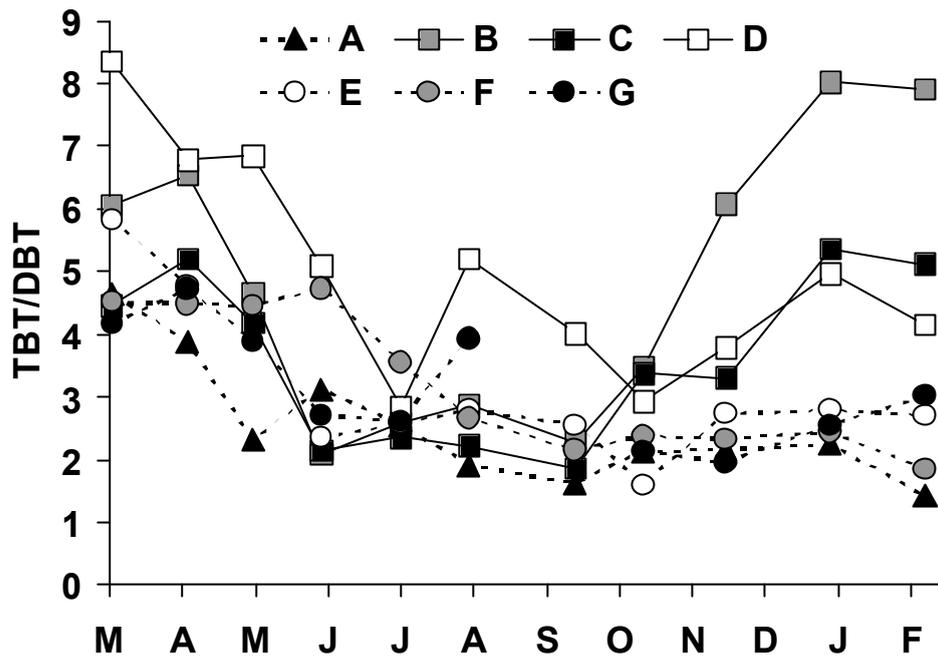


Figure 5

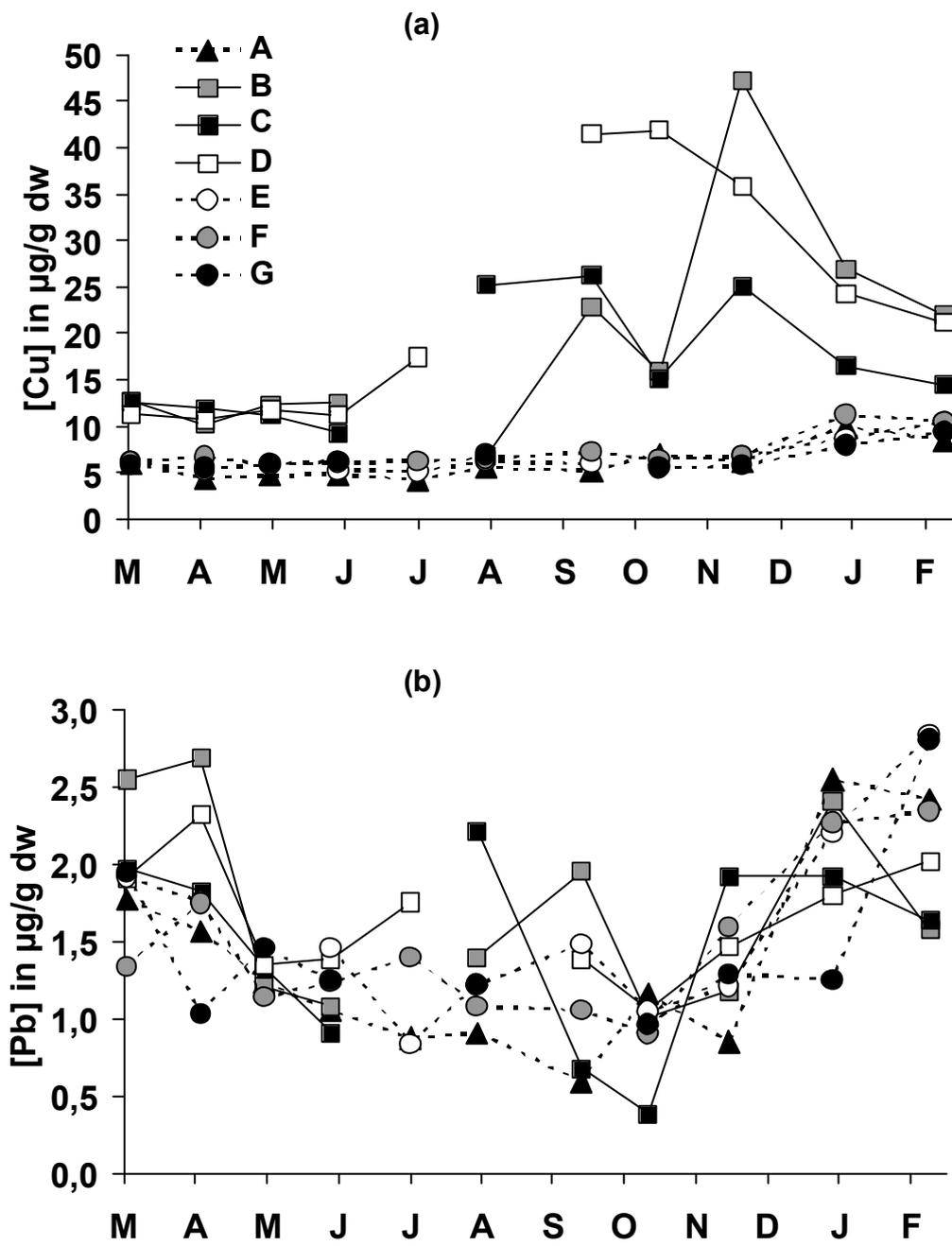


Figure 6

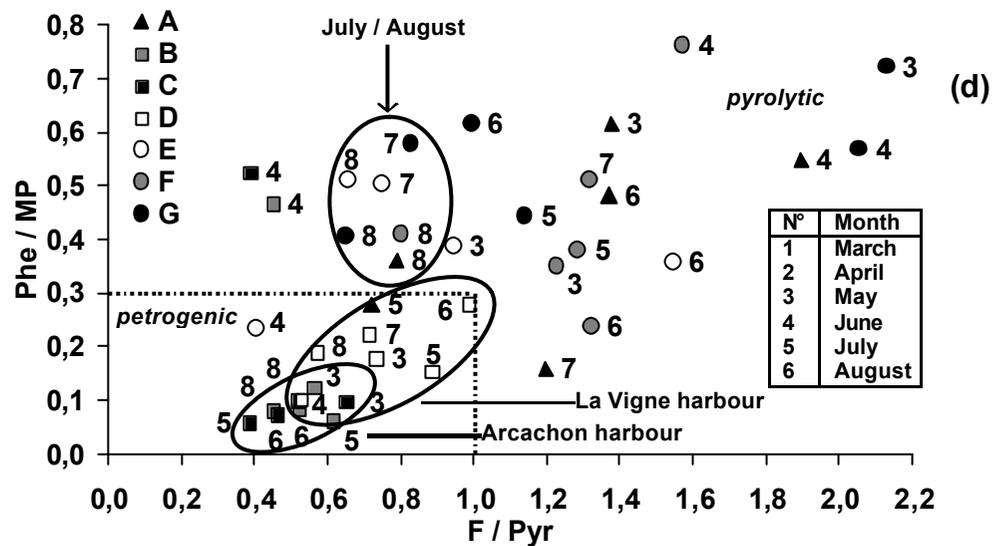
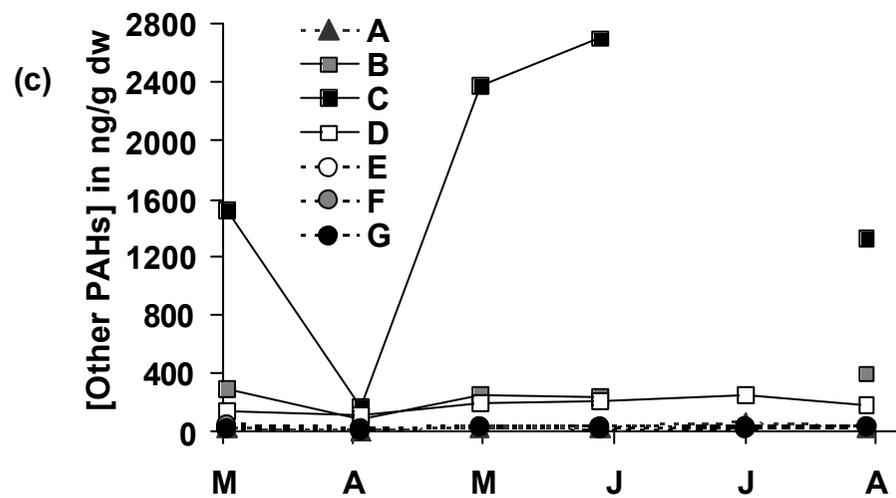
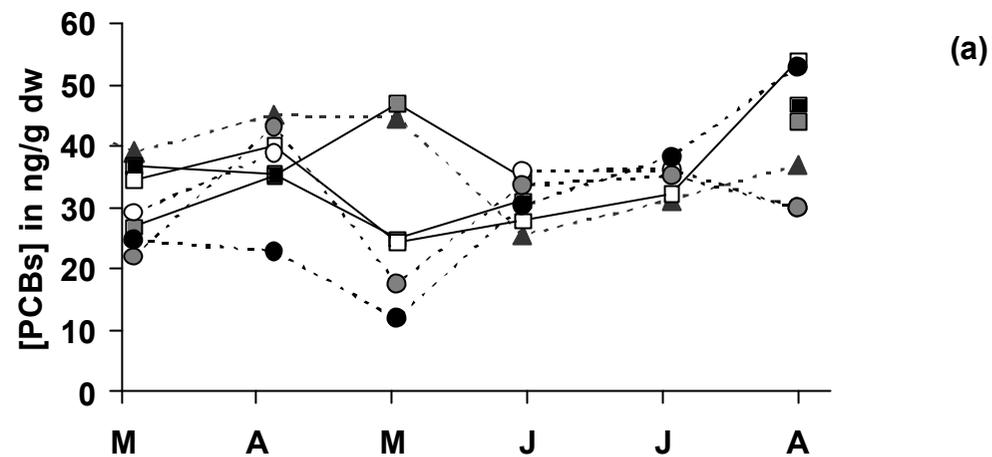
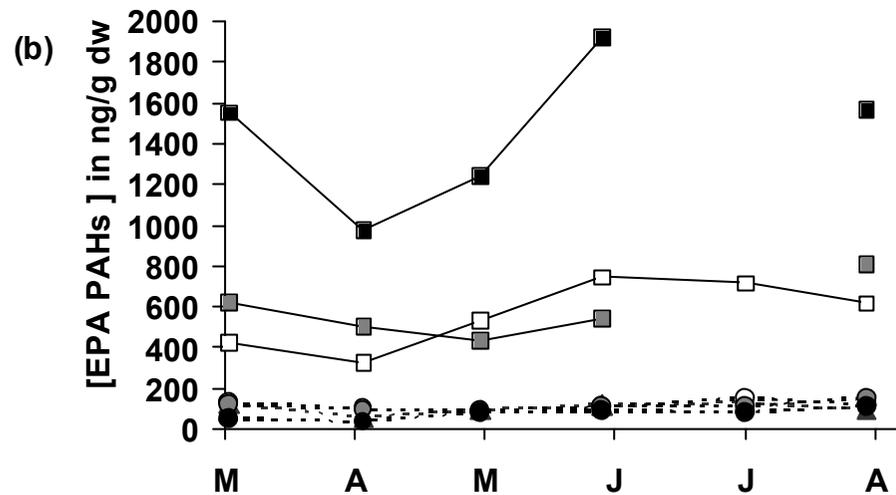
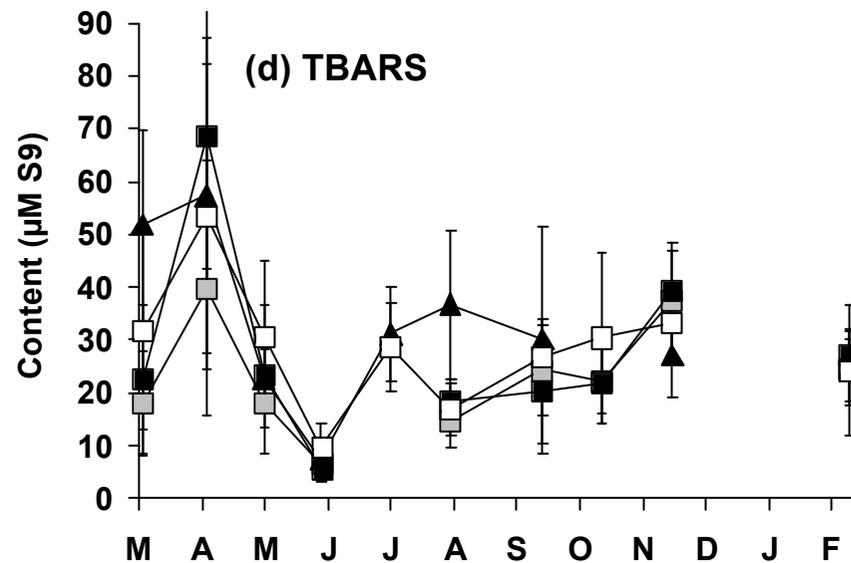
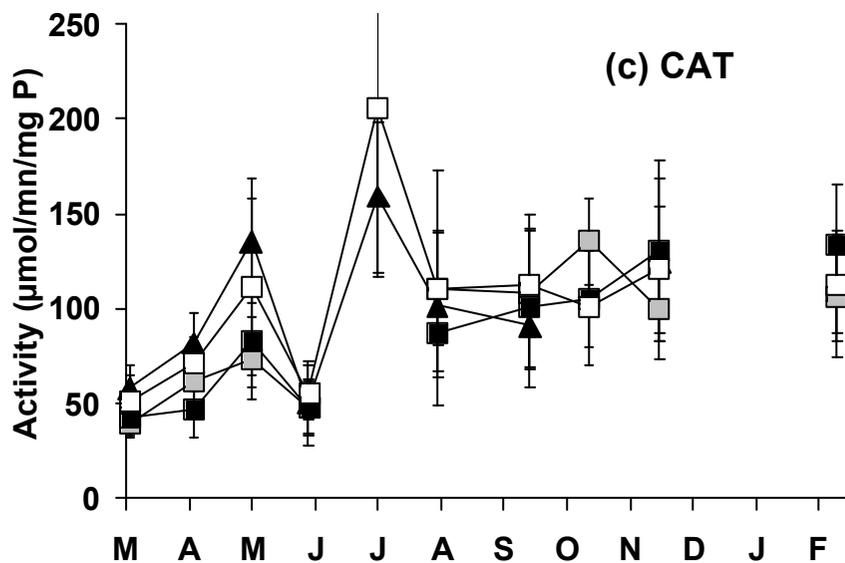
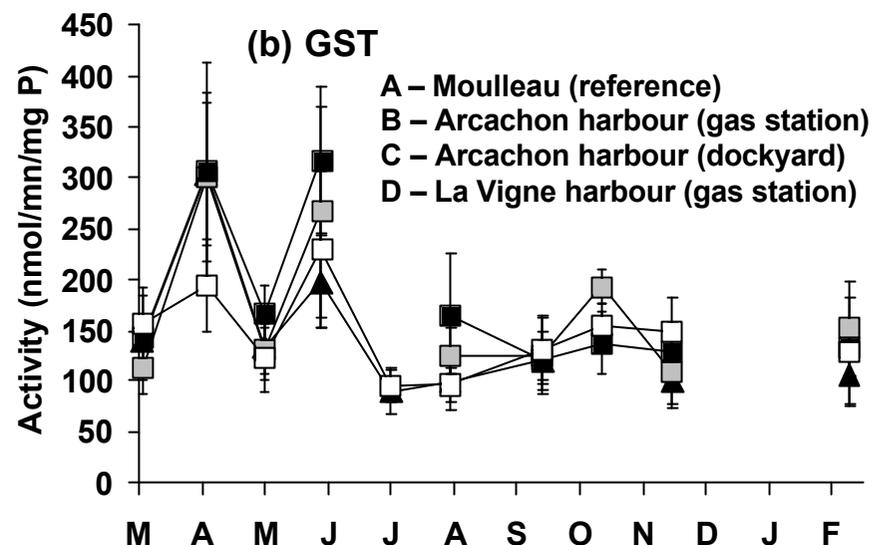
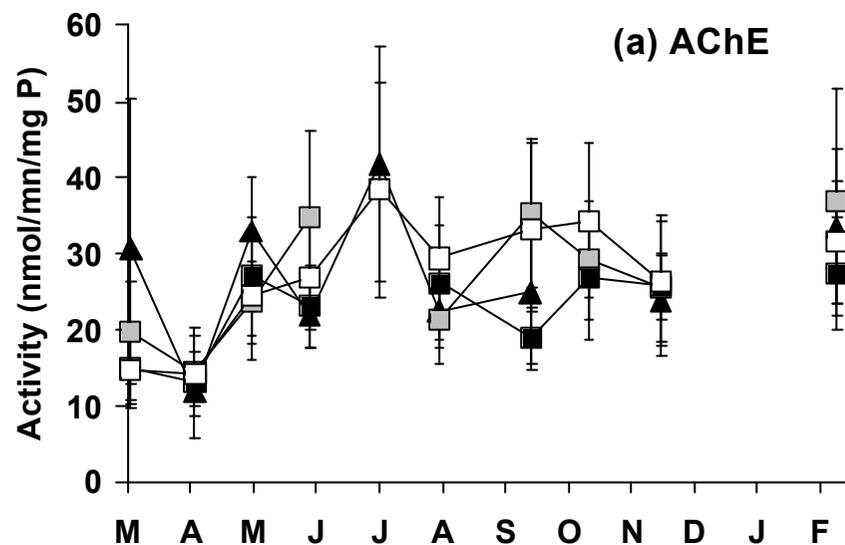


Figure 7



**Résumé:** Le tributylétain (TBT) a été largement utilisé comme biocide dans les peintures antisalissures des bateaux. Le TBT présent dans l'environnement marin induit chez les invertébrés des modifications hormonales et des perturbations biochimiques de certaines enzymes. Ces travaux de thèse ont porté, d'une part, sur la caractérisation de la bioaccumulation du TBT chez la moule *Mytilus sp.* en microcosme et sur le terrain, et d'autre part, sur l'utilisation des stéroïdes endogènes comme indicateurs d'une perturbation hormonale induite par le TBT et de différents marqueurs biochimiques. Une étude de biosurveillance utilisant la transplantation de moules en cages a été réalisée dans le Bassin d'Arcachon pendant une année afin de dresser un bilan de la contamination du Bassin par les principales classes de polluants (composés organostanniques, métaux, HAP, PCB) et d'étudier les réponses biologiques associées (taux de stéroïdes endogènes, biomarqueurs d'exposition: GST, AChE, catalase, TBARS).

---

**Integrative study on the impact of different contaminant classes (organotins, heavy metals, PAHs, PCBs) on marine mussels. Bioaccumulation and biochemical responses.**

**Abstract:** Tributyltin (TBT) was widely used as biocide in antifouling paints. TBT present in the marine environment induces hormonal imbalance and biochemical disturbances of some enzymes in invertebrates. The bioaccumulation of TBT by the blue mussel *Mytilus sp.* has been studied in both microcosm and field studies and levels of endogenous steroids, used as indicators of a hormonal disturbance induced by TBT, and of various biomarkers have been also determined according to contaminant exposures. A one-year monitoring study using transplanted mussels was performed in the Arcachon Bay in order to obtain a global evaluation of the contamination (organotin compounds, heavy metals, PAHs, PCBs) of the bay and to study the associated biological responses (endogenous steroid levels and biomarkers of exposure: GST, AChE, catalase and TBARS).

---

**Mots-clés:** Organostanniques, *Mytilus sp.*, biomarqueurs, stéroïdes, HAP, PCB, métaux, microcosme, biosurveillance, Bassin d'Arcachon.