

ODE/ UL / LER-PAC

Bouchoucha Marc
Fabri Marie-Claire

Déc-2015 - R.INT.DEP/UNIT/LABO/15-12

**Projet de rapport d'expertise de l'Ifremer
relative à l'état de contamination chimique
des produits de la mer en Méditerranée
en lien avec les activités de transformation
de minerai de bauxite de l'usine d'Alteo**

**Projet de rapport d'expertise de l'Ifremer
relative à l'état de contamination chimique
des produits de la mer en Méditerranée
en lien avec les activités de transformation
de minerai de bauxite de l'usine d'Alteo**

Table des matières

1. Rappel du contexte de la demande.....	7
1.1. Contexte et objet de la demande	7
1.2. Introduction.....	8
2. Expertise de l'Ifremer sur l'évaluation de la contamination chimique basée sur l'immersion de stations artificielles de moules.....	11
2.1. Immersion de poches de moules	11
2.2. Préparation des échantillons et analyses.....	13
2.3. Résultats.....	14
2.4. Conclusion intermédiaire du volet "stations artificielles de moules »	17
3. Expertise de l'Ifremer sur l'étude de la contamination chimique dans les gonades d'oursins violet (<i>Paracentrotus lividus</i>).....	21
3.1. Prélèvements.....	21
3.2. Résultats.....	22
3.3. Conclusion intermédiaire sur les oursins.....	25
4. Conclusion intermédiaire de l'expertise Ifremer.....	27
Annexe 1 : Cartographie de la contamination chimique dans les moules	29
Annexe 2 : Cartographie de la contamination dans les gonades d'oursins	35
Annexe 3 - Rappel du protocole de la campagne de pêche 2015	41

1. Rappel du contexte de la demande

L'Anses a été saisie le 15 mai 2015 par le Ministère de l'écologie, du développement durable et de l'énergie pour la réalisation d'un appui scientifique et technique visant à établir l'état de contamination chimique des produits de la mer en Méditerranée en lien avec les activités de transformation de minerai de bauxite de l'usine d'Alteo. L'Ifremer a été mandaté pour accompagner l'Anses dans cette expertise.

1.1. Contexte et objet de la demande

La demande fait suite aux recommandations de l'Anses dans son avis du 2 février 2015 (saisine 2014-SA-0223) relatif à l'impact potentiel sur la santé humaine du rejet en Méditerranée d'effluents issus des activités de transformation de minerai de bauxite de l'usine Alteo.

L'Anses avait été saisie le 15 octobre 2014 dans le cadre d'une demande d'autorisation au titre de la réglementation des installations classées pour la protection de l'environnement (ICPE) déposé en mai 2014 par la société Alteo pour la modification des conditions d'exploitation de son usine d'alumine de Gardanne. Cette modification consiste en l'arrêt, à la date du 31 décembre 2015, des rejets d'effluents qualifiés de «boues rouges» pour les remplacer par des rejets d'effluents liquides. Le point de rejet en mer restera inchangé et se situe au large de Cassis, dans le Parc national des Calanques créé en 2012.

Le Ministère de l'Environnement, du Développement Durable et de l'Énergie avait souhaité que soit menée une analyse critique indépendante des conclusions de l'interprétation de l'état des milieux et de l'évaluation des risques sanitaires réalisées par l'exploitant.

Concernant spécifiquement la question de la contamination potentielle des poissons, l'Anses avait constaté la faiblesse méthodologique du plan d'échantillonnage mis en œuvre par l'exploitant, du fait d'une part de lacunes potentielles dans la définition de la zone d'impact et, d'autre part, du fait du faible nombre de poissons prélevés pour chaque espèce dans les études fournies par l'exploitant. Selon la méthode d'interprétation de l'état des milieux (IEM), et pour les substances ne disposant pas de seuils réglementaires, l'exploitant aurait dû échantillonner et analyser des espèces de poissons prélevées dans une zone non impactée par ses rejets. Une démarche exhaustive d'IEM aurait alors consisté à comparer ces concentrations avec celles mesurées dans la zone d'influence du rejet de l'exploitant.

L'Anses recommandait que soit réalisée une nouvelle campagne de pêche afin de mieux objectiver le niveau de contamination du milieu.

En collaboration avec l'Ifremer, un protocole de pêche a été proposé au Ministère le 4 mai 2015 (présenté en annexe 3).

Par courrier du 15 mai 2015, il a été demandé à l'Ifremer de réaliser la campagne de pêche et à l'Anses de prendre en charge les analyses chimiques des échantillons.

1.2. Introduction

Dans le cadre de l'étude relative à l'état de contamination chimique des produits de la mer en Méditerranée en lien avec les activités de transformation de minerai de bauxite de l'usine Alteo, un total d'environ 1 800 échantillons, provenant des deux zones de pêches : zone dite « impactée » et zone dite de « référence » (Figure 1) a été analysé. Onze éléments chimiques (Al, As, Cd, Co, Cr, Hg, Mn, Ni, Pb, Ti et V) ont été recherchés pour l'ensemble des espèces d'organismes marins considérées. Les résultats obtenus ont été organisés dans une base de données incluant les résultats numériques et les commémoratifs spécifiques à chaque prélèvement (Figure 2).

Le traitement statistique des résultats a été réalisé en 2 parties :

1. Une première partie réalisée par l'**Anses** portant sur l'exploitation des résultats obtenus à partir des échantillons de **poissons**.
2. Une seconde partie réalisée par l'**Ifremer** portant sur les résultats obtenus sur les **moules et les oursins**.

Le présent document présente les résultats relatifs à la seconde partie.

A noter que l'interprétation des résultats en matière de sécurité sanitaire trouve actuellement sa place dans la première partie réalisée par l'Anses, organisme compétent dans le domaine. Les deux parties seront intégrées dans un rapport final.

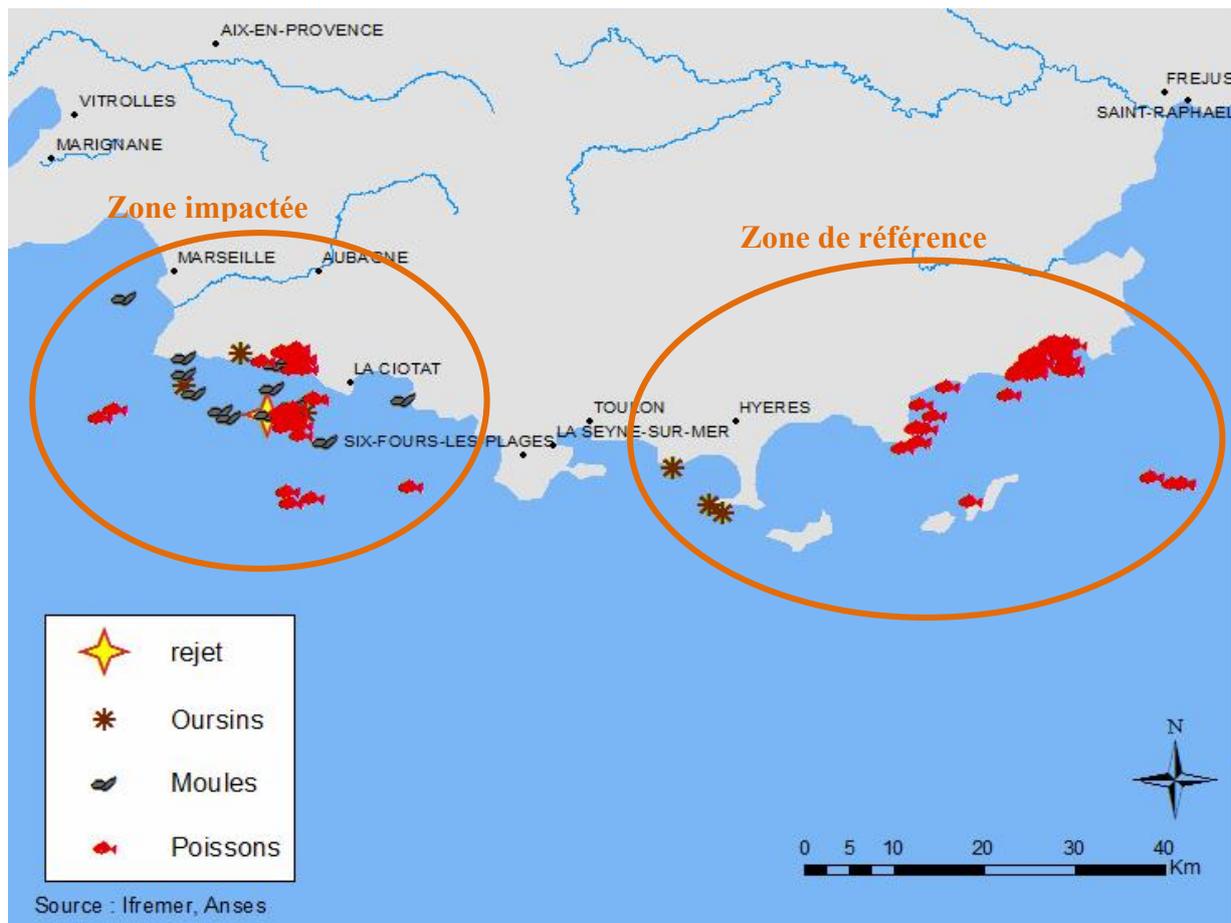


Figure 1 : Points de prélèvements des espèces étudiées

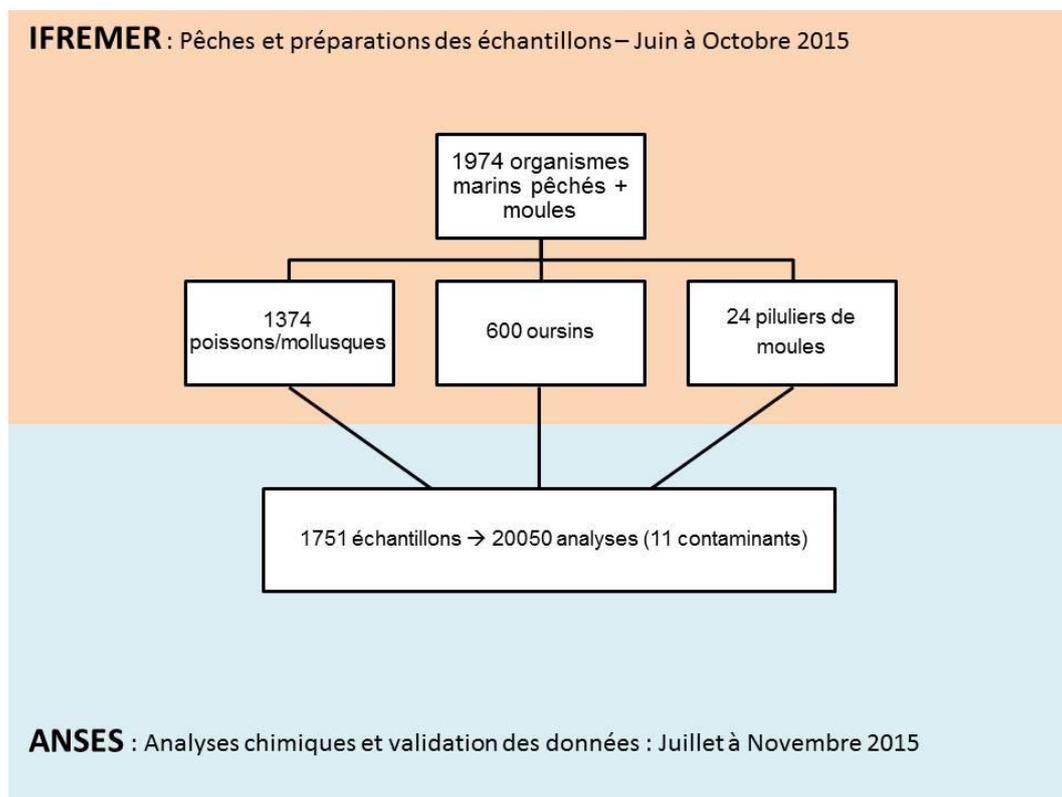


Figure 2 : Description des étapes de pêche et d'analyse

2. Expertise de l'Ifremer sur l'évaluation de la contamination chimique basée sur l'immersion de stations artificielles de moules

En parallèle des mesures de contaminants dans les produits de la pêche présentées dans la partie Anses et afin d'étudier la répartition spatiale de la contamination chimique dans la colonne d'eau au sein de la zone impactée, l'Ifremer a mis en place un suivi sur neuf stations de poches de moules placées à des distances variables du rejet. La description du protocole lié à cette étude est détaillée en annexe 3 de ce document.

2.1. Immersion de poches de moules

2.1.1. Période et durée d'immersion

Les poches de moules (*Mytilus galloprovincialis*) ont été immergées pendant 2,5 mois, de mi-juin à fin août 2015 (été 2015), conformément au protocole. L'ensemble des opérations a été réalisé par les équipes de l'Ifremer.

2.1.2. Positionnement et profondeur des stations

Les stations de moules ont été positionnées sur le plateau continental conformément au protocole, à savoir trois stations pour chacune des trois lignes de sonde 50 m, 100 m et 130 m réparties à l'Ouest, au Nord et à l'Est du rejet (Figure 3 et Figure 4).

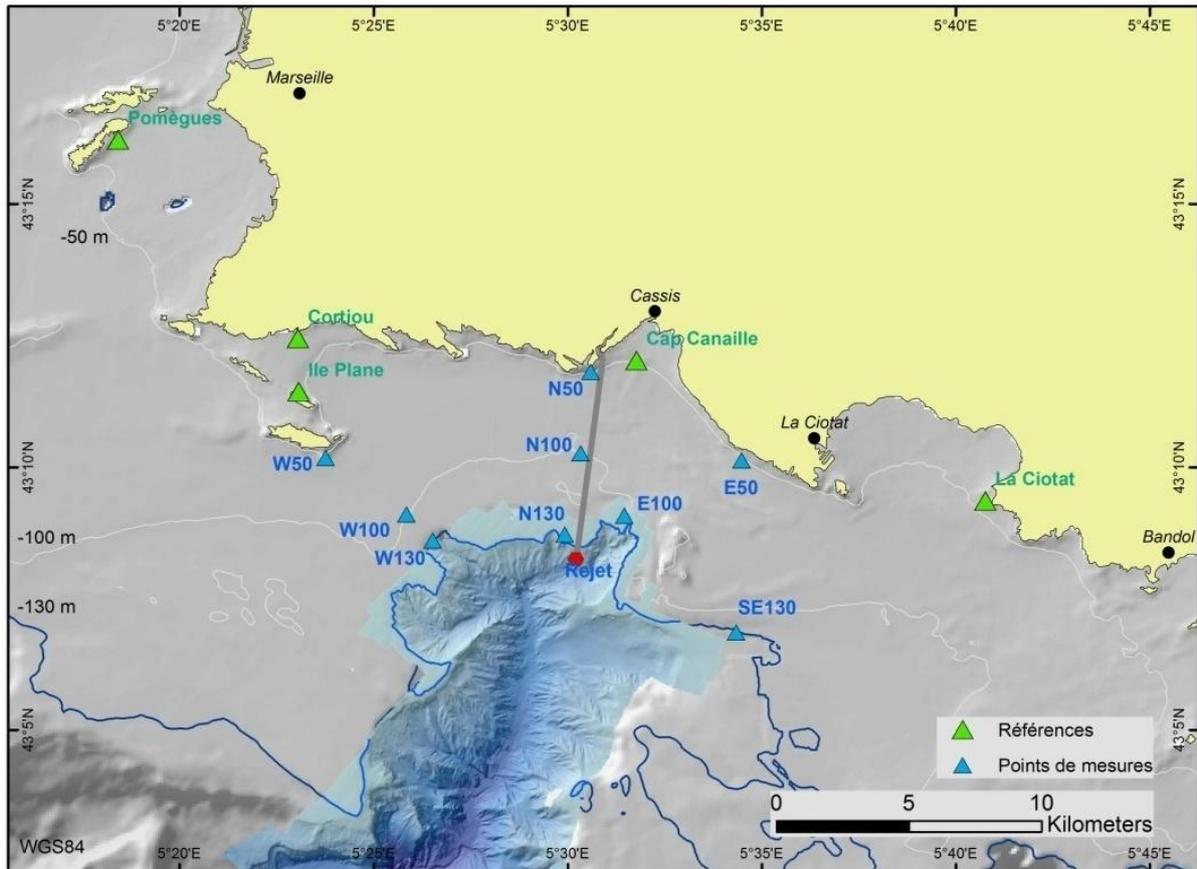


Figure 3 : Positionnement des stations de moules (points de mesure et référence).

Le nombre de cages et leur immersion ont été adaptés à la ligne de sonde :

- Sur chacune des trois stations de la ligne de sonde **130m** (W130, N130 et SE130), une ligne supportant **trois cages** immergées respectivement à -10m, -50m et -100m a été positionnée (Figure 4),
- Sur chacune des trois stations de la ligne de sonde **100m** (W100, N100 et E100), une ligne supportant **deux cages** immergées respectivement à -10m et -50m a été positionnée (Figure 4),
- Sur chacune des trois stations de la ligne de sonde **50m** (W500, N50 et E50), une ligne supportant **une cage** immergée à -10m a été positionnée (Figure 4).

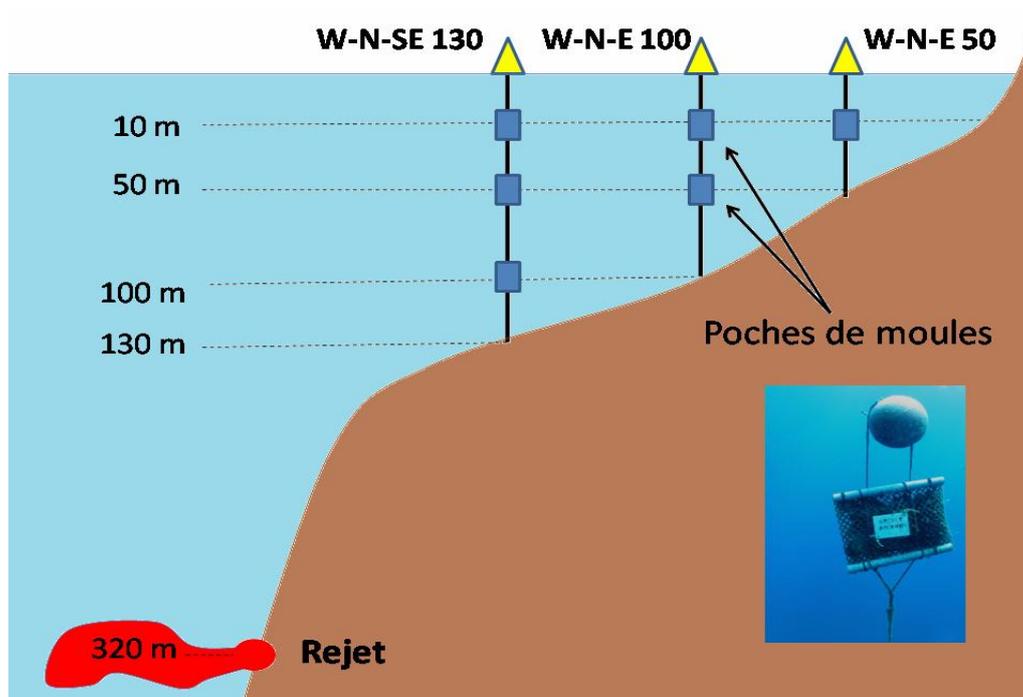


Figure 4 : Schéma représentant la composition des lignes de mouillage selon les isobathes (lignes de sonde 130, 100 et 50 m).

2.2. Préparation des échantillons et analyses

Les échantillons récupérés en mer fin août ont été immédiatement préparés au Laboratoire Ifremer Environnement Ressources Provence Azur Corse, situé à La Seyne-sur-Mer (Var), selon les méthodes préconisées par le consortium AQUAREF (Annexe 3). Les moules de chaque poche ont été réparties en deux lots homogènes et expédiées respectivement à l'Anses et au laboratoire Ifremer Biogéochimie des Contaminant Métalliques de Nantes (Ifremer-LBCM).

Par ailleurs, il a été proposé en cours d'étude de comparer les résultats obtenus avec ceux de la campagne annuelle RINBIO (Réseau Intégrateurs Biologiques) lancée dès avril 2015, avant l'élaboration de la présente étude. Ce réseau, conçu par l'Ifremer en partenariat avec l'Agence de l'Eau Rhône Méditerranée Corse en 1994, cherche à évaluer les niveaux de contamination chimique à l'échelle de la façade méditerranéenne en utilisant la même technique de stations artificielles de moules. Depuis 2006, il est utilisé pour rendre compte de la qualité chimique des eaux littorales méditerranéennes françaises au titre de la Directive Cadre Eau (DCE). Les données de ce réseau ont également servi de base à une partie de l'expertise remise par l'Ifremer au Ministère le 26 janvier 2015. Les concentrations en mercure et arsenic sur deux stations proches du rejet (non illustrées ici) n'avaient alors pas permis de mettre en évidence de contaminations particulières par rapport aux niveaux moyens de contamination rencontrés sur cette façade maritime. Au printemps 2015, 50 poches de moules ont été immergées tout le long de la façade méditerranéenne française dont cinq à proximité de la zone considérée comme impactée (stations nommées Pomègues, Ile Plane, Cortiou, Cap Canaille et La Ciotat) (Figure 3). Ces poches ont été immergées 10 m sous la surface de mi-avril à fin juin 2015 (soit 2,5 mois au printemps 2015). Les moules des poches de ces cinq stations ont également été réparties en deux lots homogènes expédiés respectivement à l'Anses et à l'Ifremer (LBCM). Bien qu'ayant été immergés à une saison différente, ces échantillons ont été considérés comme des témoins.

De plus, les données du réseau RINBIO fournies par l'Ifremer entre 2000 et 2012 dans des moules immergées le long du linéaire côtier Méditerranéen, entre Marseille et Menton, ont été utilisées pour calculer une "médiane historique" des concentrations pour les éléments métalliques disponibles (médiane calculée à partir de 157 valeurs par élément métallique).

Afin d'éviter la redondance dans les résultats et après avoir vérifié l'homogénéité des valeurs fournies par les deux laboratoires (Anses et Ifremer-LBCM), par souci d'homogénéité avec ce qui a été fait pour la partie "produits de la pêche" de cette étude, nous avons fait le choix de privilégier la présentation des résultats fournis par l'Anses. Les analyses complémentaires effectuées par Ifremer - LBCM ont permis d'obtenir des résultats pour deux métaux supplémentaires : le cuivre et le zinc.

Enfin, compte tenu de la faible puissance des tests statistiques appliqués à de très petits effectifs, nous avons fait le choix de comparer les écarts entre les valeurs mesurées et la médiane historique ou la moyenne des valeurs pour les témoins quand la médiane n'était pas disponible. Cette démarche est généralement utilisée pour présenter les résultats issus du réseau national d'observation des contaminants chimiques, le réseau ROCCH.

2.3. Résultats

2.3.1. Résultats biométriques

L'indice de condition des moules d'une poche est défini comme le poids moyen sec de chair des moules sur leur poids de coquille. Toutes les moules provenant d'un même lot initial et étant immergées sur zone pendant une même période, cet indice reflète les conditions trophiques du milieu et donc les capacités bioaccumulatrices de la moule. Les indices de conditions mesurés pour l'ensemble des poches de moules immergées pour cette étude mais également pour les stations témoins sont présentés sur la Figure 5. Les résultats sont homogènes entre les stations. Aucun effet de la profondeur d'immersion des poches sur l'indice de condition n'est par ailleurs observé (test de Kruskal Wallis, $K = 2,544$, $p = 0,467$). De même, les taux de mortalité des moules dans les poches, compris entre 7,8 et 18,9 %, sont homogènes entre les stations et indépendants de la profondeur (test de Kruskal Wallis, $K = 1,579$, $p = 0,454$). Cette absence de différence confirme que les conditions trophiques du milieu sont relativement homogènes à l'échelle de la zone d'étude et aux différentes profondeurs. Par conséquent, les concentrations en contaminants peuvent être comparées brutes, sans ajustement préalable des données.

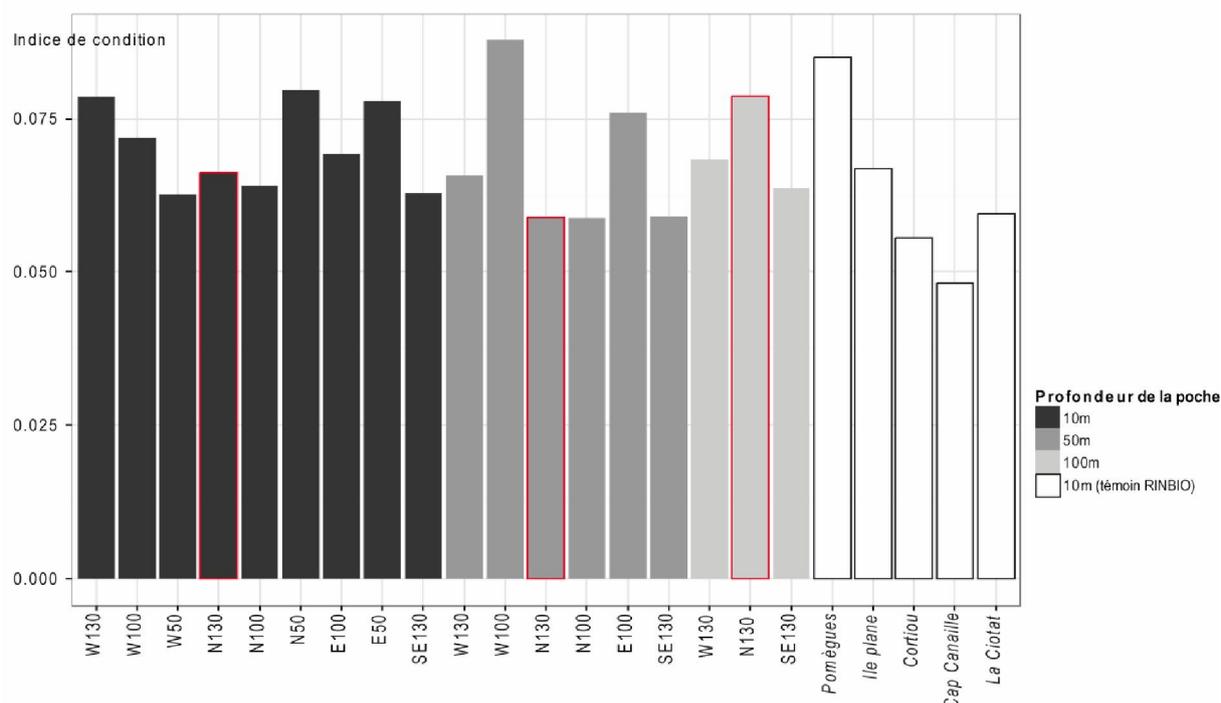


Figure 5 : Diagramme en bâtons des indices de conditions de moules par station et profondeur d'immersion. La station la plus proche du rejet est entourée en rouge. Les concentrations des stations témoins RINBIO sont représentées en blanc.

2.3.2. Résultats brutes de contamination chimique

Les données de concentrations en éléments métalliques dans les moules sont présentées sous deux formes. Premièrement, afin d'appréhender la répartition verticale des éléments métalliques et d'en comparer les concentrations dans les différentes poches à celles des témoins et/ou aux médianes historiques, les données ont été présentées sous forme de diagramme en bâtons représentant les poches de moules par profondeur (Figure 6 et Figure 7). Deuxièmement, les données ont été présentées sous forme cartographique pour étudier la distribution spatiale des concentrations en métaux dans les moules (Annexe 1).

Les résultats sont présentés en trois parties : les métaux réglementés, les métaux identifiés comme traceurs du rejet et enfin les autres métaux mesurés.

2.3.2.1. Métaux réglementés

Les concentrations des trois métaux réglementés (mercure, plomb et cadmium) mesurées sur l'ensemble des stations sont inférieures aux seuils sanitaires définis par le règlement européen N° 1881/2006. Pour le mercure, ces valeurs sont stables, comprises entre 0,9 et 1,2 fois la médiane historique (Figure 6). Pour le plomb, celles-ci sont plus importantes et peuvent atteindre 2,2 fois la médiane historique à la station W100, dans la poche immergée à 50m. Enfin, les valeurs mesurées en cadmium sur la zone sont systématiquement supérieures à la médiane historique (jusqu'à 2,3 fois) et aux valeurs des témoins. Pour ces trois métaux, les valeurs maximales sont observées à l'Ouest du canyon de Cassidaigne. Cette observation pourrait être expliquée par l'orientation Ouest des courants dominants sur le plateau continental.

2.3.2.2. Métaux traceurs du rejet

Les métaux considérés comme traceurs du rejet dans cette étude sont l'aluminium, le titane et le vanadium. Le chrome a été rajouté à cette liste. En effet, des études précédentes ont montré que les boues rouges échantillonnées dans le canyon présentent de très fortes concentrations en chrome (Fontanier *et al.*, 2012)¹ et que cet élément est susceptible de contaminer des moules immergées à grande profondeur dans le canyon de Cassidaigne (Galgani *et al.*, 2005)².

Pour l'aluminium et le titane, les valeurs mesurées en surface ne dépassent pas celles des témoins (Figure 6). Ces métaux n'étant pas dosés par le réseau RINBIO, nous ne possédons pas de valeur de référence à plus large échelle pour comparer ces valeurs. A 50 et 100 m de profondeur, des pics de contamination sont observés (3,7 fois et 5,2 fois la moyenne des sites témoins respectivement pour l'aluminium et le titane) (Figure 6). Les cartes montrent sans ambiguïté que pour ces deux contaminants, les concentrations les plus élevées sont observées aux abords du canyon (Annexe 1).

Les concentrations en vanadium dans les moules sont en moyenne supérieures à celles mesurées dans les témoins (0,54 mg.kg⁻¹ poids frais en moyenne dans les poches de cette étude contre 0,28 mg.kg⁻¹ poids frais en moyenne pour les témoins) (Figure 6). Les concentrations maximales sont observées à l'Ouest du canyon (à la station W130) et peuvent atteindre 4,3 fois la concentration moyenne dans les témoins RINBIO (Annexe 1 et Figure 6).

Les concentrations en chrome mesurées dans les poches de cette étude sont inférieures à celles observées dans les témoins (0,1 mg.kg⁻¹ poids frais en moyenne dans les poches de cette étude contre 0,14 mg.kg⁻¹ poids frais en moyenne pour les témoins). En outre, les concentrations les plus importantes sont observées aux stations W50 et E50 situées à proximité de la côte.

2.3.2.3. Autres métaux

Les concentrations en arsenic, cobalt, cuivre et nickel dans les moules de cette étude ne révèlent pas de contamination particulière par rapport à la médiane historique ou au témoin (Figure 6 et Figure 7). Pour le nickel, on note cependant deux pics de contamination : à la station E100 pour la poche immergée à 50m (1,9 fois la médiane) et la station E50 pour la poche à 10m (1,7 fois la médiane) (Figure 6).

Les concentrations en zinc sont globalement élevées (entre 1,2 et 1,8 fois la médiane historique) et légèrement supérieures à celles des témoins (231,8 mg.kg⁻¹ poids sec en moyenne dans les poches de cette étude contre 194,9 mg.kg⁻¹ poids sec en moyenne pour les témoins) (Figure 7). L'influence de la proximité du canyon sur les concentrations en zinc n'est cependant pas observée (Annexe 1).

Enfin, les concentrations en manganèse des stations situées aux abords du canyon sont jusqu'à 1,9 fois plus importantes que celles observées pour les témoins (Annexe 1).

¹ Fontanier C, Fabri MC, Buscaïl R, Biscara L, Koho K, Reichart GJ, Cossa D, Galaup S, Chabaud G, Pigot L (2012) Deep-sea foraminifera from the Cassidaigne Canyon (NW Mediterranean): Assessing the environmental impact of bauxite red mud disposal. Marine Pollution Bulletin 64:1895-1910

² Galgani F, Chiffolleau J, Gall PL, Pichot Y, Andral B, Martin C (2005) Deep-sea caging of the mussel *Mytilus galloprovincialis*: Potential application in ecotoxicological studies. Chemistry and ecology 21:133-141

2.4. Conclusion intermédiaire du volet "stations artificielles de moules »

Les résultats de cette expérience montrent que les rejets de boues rouges peuvent impacter des organismes marins situés sur le plateau continental, à proximité du canyon de Cassidaigne. Le phénomène de contamination observé sur des organismes filtreurs est local et de faible étendue géographique. Il est cependant à noter que la durée (2,5 mois) et la période (de juin à août) ne sont pas les plus favorables pour appréhender les conséquences des phénomènes d'upwelling sur les niveaux de contamination des organismes marins implantés temporairement sur le plateau continental. En effet, les upwellings sont induits par le mistral qui en chassant au large les eaux de surface génère un mouvement de masses d'eaux du fond vers la surface pouvant entraîner les sédiments les plus fluides (boues rouges) du fond du canyon vers le plateau continental. Ces upwellings ont lieu essentiellement en hiver et au printemps. Aussi, l'étude ici présentée mériterait-elle d'être poursuivie (à différentes périodes de l'année au cours des quatre saisons par exemple) pour renforcer ou au contraire réfuter cette dernière conclusion.

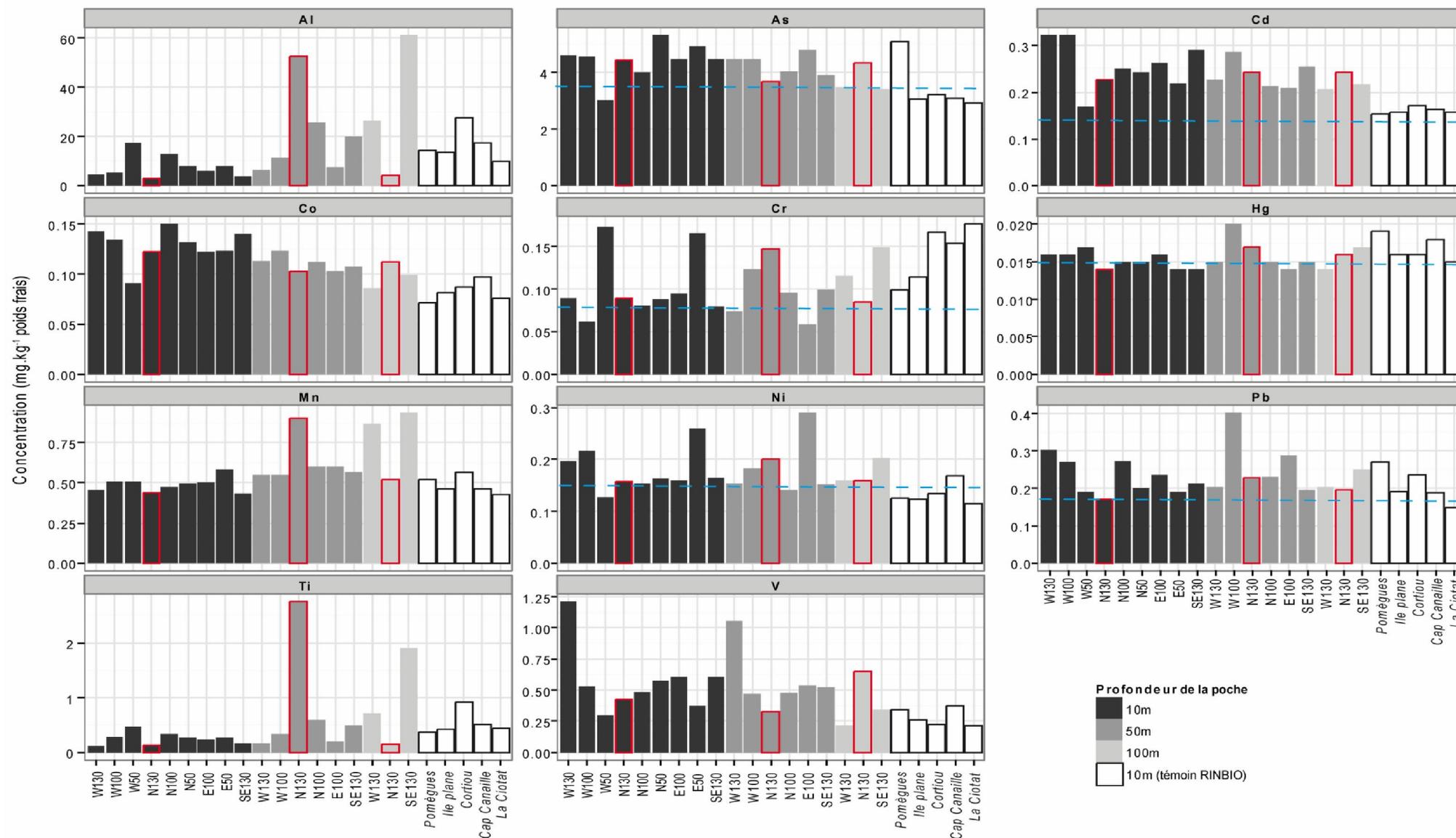


Figure 6 : Concentrations en contaminants exprimées en mg.kg⁻¹ de poids frais. Analyses réalisées par l'Anses. La station la plus proche du rejet est entourée en rouge. Les concentrations des stations témoins RINBIO sont représentées en blanc. La médiane historique est représentée par une ligne horizontale (pointillé bleu).

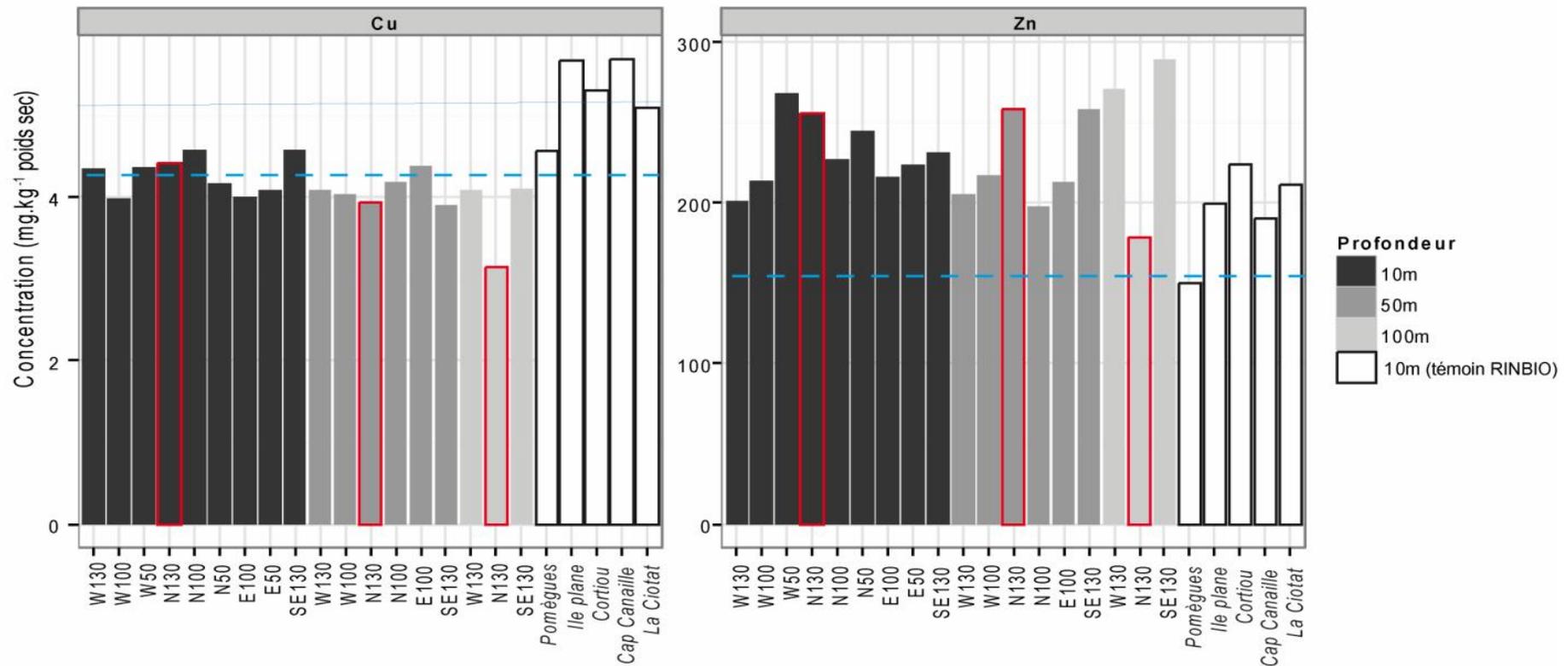


Figure 7 : Concentrations en contaminants exprimées en mg.kg⁻¹ de poids sec. Analyses réalisées par l'Ifremer (LBCM). La station la plus proche du rejet est entourée en rouge. Les concentrations des stations témoins RINBIO sont représentées en blanc. La médiane historique est représentée par une ligne horizontale (pointillé bleu).

3. Expertise de l'Ifremer sur l'étude de la contamination chimique dans les gonades d'oursins violet (*Paracentrotus lividus*)

3.1. Prélèvements

Les prélèvements d'oursins comestibles (*Paracentrotus lividus*) ont été réalisés début juillet 2015 dans deux zones. Pour des raisons météorologiques lors du prélèvement mais aussi de disponibilité de la ressource, il n'a pas été possible de réaliser les prélèvements de cette espèce dans la zone initialement choisie. La zone de référence « oursins » se trouve néanmoins à proximité de la zone de référence « poissons » décrite en introduction et dans l'annexe 3 et répond aux mêmes critères d'éloignement par rapport au rejet, de conditions environnementales et d'éloignement par rapport à des sources identifiées de contamination. Ce changement a donc peu de conséquences sur les conclusions pouvant être tirées de ce volet.

Afin de représenter au mieux la variabilité spatiale de la contamination dans les oursins, trois sites de prélèvements par zone ont été échantillonnés. Leur localisation est indiquée dans la Figure 8. Dans la zone "impactée", les sites de prélèvements ont été positionnés aussi près que possible à l'Ouest, au Nord et à l'Est du rejet. Dans la zone de référence, les trois sites ont été choisis aléatoirement.

Sur chaque site, entre 75 et 110 oursins de taille commerciale (diamètre supérieur à 5 cm sans les épines) ont été collectés en plongée, entre 5 et 10m de fond, maintenus au frais puis ramenés rapidement au laboratoire. Les oursins de chaque site de prélèvement ont été ouverts et leurs gonades prélevées selon les recommandations du consortium AQUAREF. Celles-ci ont été réparties aléatoirement dans 10 piluliers, chacun recevant donc les gonades de 7 à 12 individus, et envoyées pour analyse à l'Anses. Les gonades étant la partie généralement consommée de l'oursin, nous avons fait le choix de cibler cet organe dans ce volet.

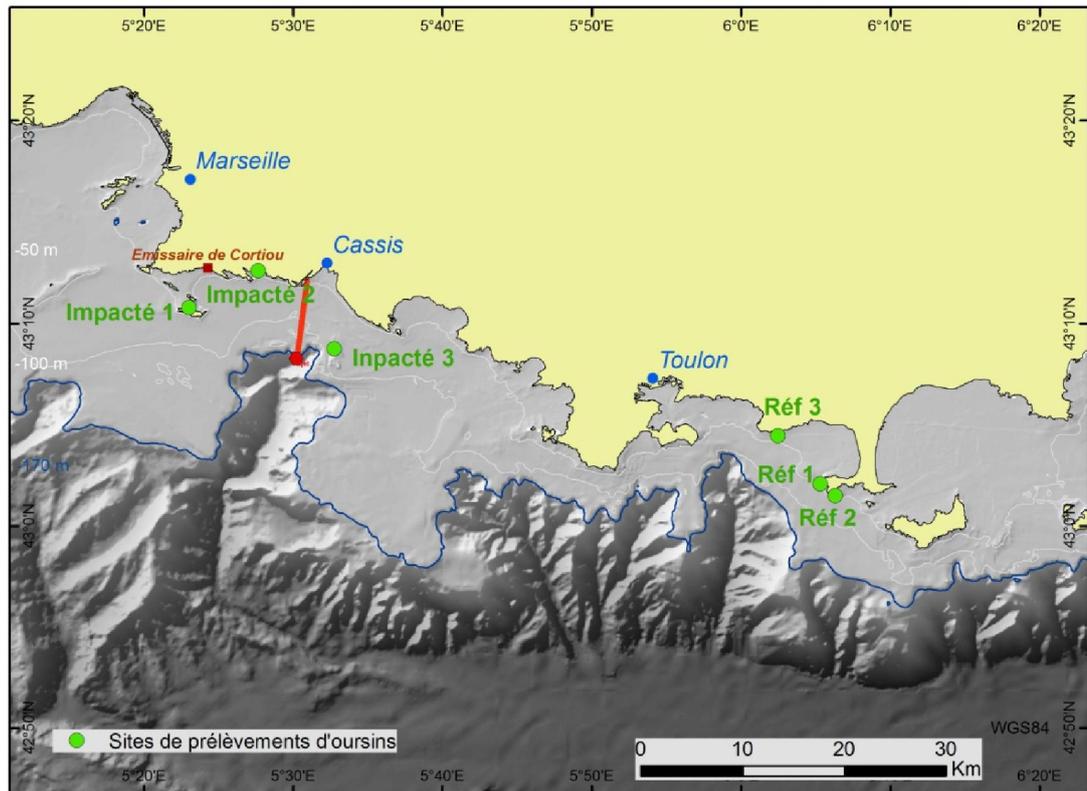


Figure 8 : Localisation des sites de prélèvements d'oursins autour du rejet de Cassidaigne (zone "Impactée") et dans une zone abritée vers la presqu'île de Giens (zone de "Référence").

3.2. Résultats

266 oursins (285 dans la zone de référence et 281 dans la zone impactée) ont été collectés. Pour chaque site de chaque zone et chaque métal, 10 concentrations correspondant aux 10 piluliers (exprimées en mg.kg^{-1} de poids frais) ont été mesurées. 30 mesures par zone ont donc été obtenues. Les résultats sont présentés par zone dans la Figure 9, par site dans la Figure 10 et de manière cartographique en annexe 3.

Les concentrations ont subi une transformation logarithmique avant analyse statistique (test de Student).

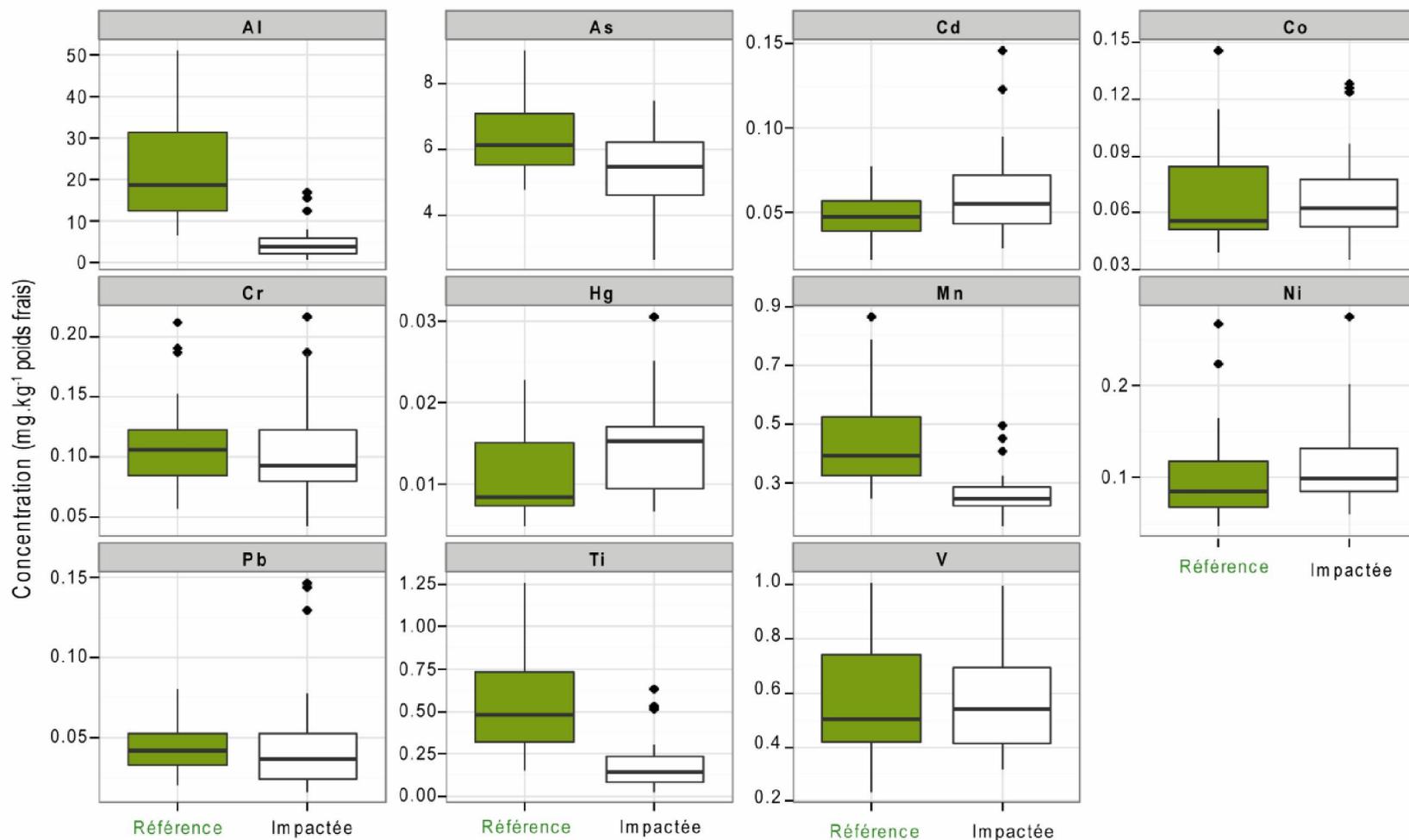


Figure 9 : Concentrations en contaminants dans des gonades d'oursins, regroupées par zone (Impactée ou de Référence), exprimées en mg.kg-1 de poids frais (analyses réalisées par l'ANSES). Les concentrations dans les sites de la zone de référence sont représentées en vert, celles dans les sites de la zone impactée en blanc.

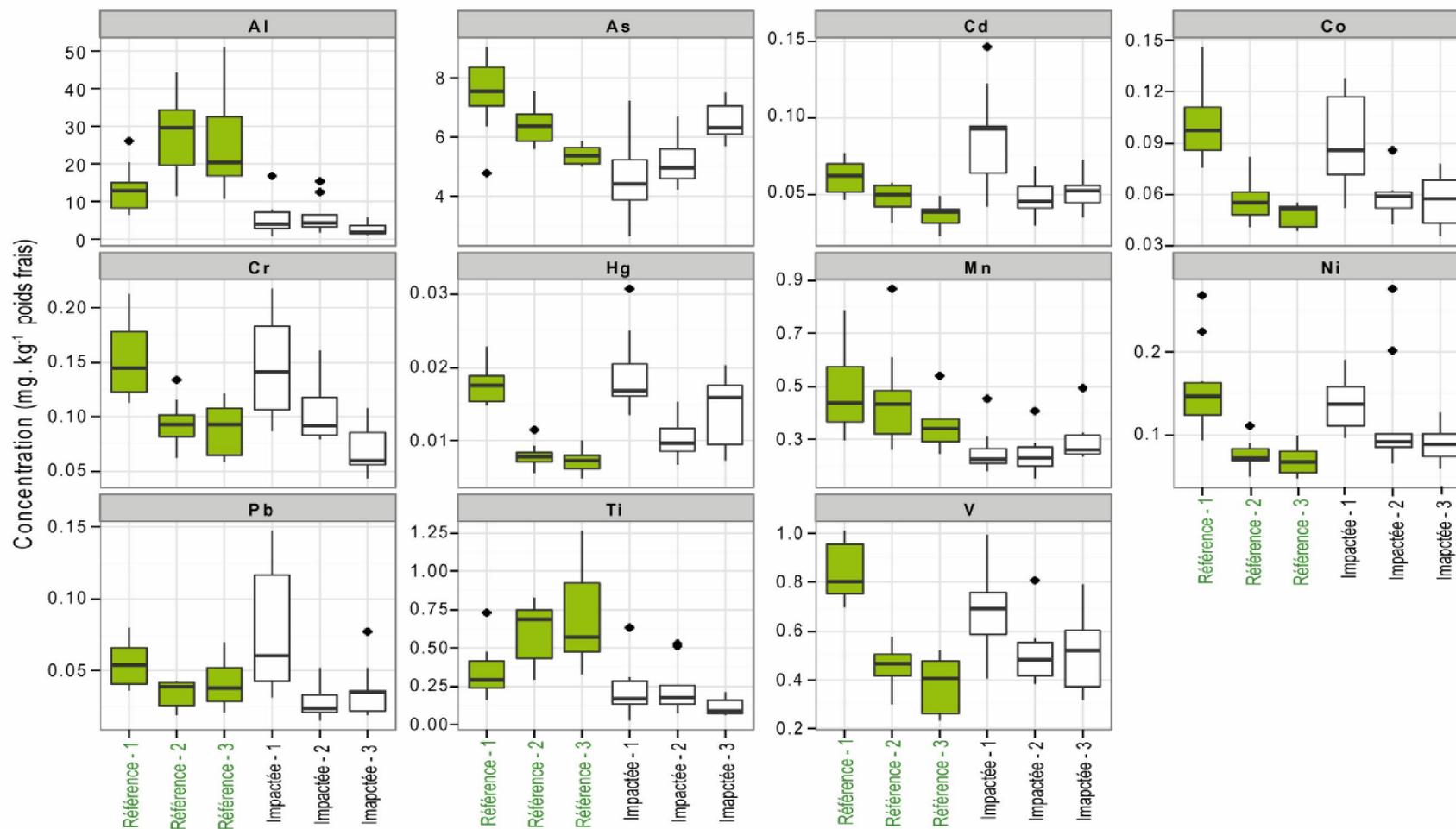


Figure 10 : Concentrations en contaminants dans des gonades d'oursins regroupées par site de prélèvements, exprimées en mg.kg-1 de poids frais (analyses réalisées par l'Anses). Les concentrations dans les sites de la zone de référence sont représentées en vert, celles dans les sites de la zone impactée en blanc.

3.2.1. Métaux réglementés

Les concentrations des trois métaux réglementés (mercure, plomb et cadmium) sont inférieures aux seuils de sécurité sanitaire.

Les concentrations en cadmium et en mercure dans la zone impactée sont significativement supérieures à celles de la zone de référence ($p = 0,013$ et $p = 0,020$ respectivement). Pour le plomb, malgré un pic de contamination sur le site 1 de la zone impactée, nous n'observons pas de différence significative entre les deux zones ($p = 0,628$) (Annexe 2). A noter que le site 1 de la zone impactée est le plus proche de la ville de Marseille et de l'émissaire de Cortiou (Figure 8).

3.2.2. Métaux traceurs du rejet

Les concentrations en vanadium et en chrome dans les deux zones ne sont pas significativement différentes ($p = 0,755$ et $p = 0,637$) (Annexe 3).

Les concentrations en aluminium et en titane sont significativement inférieures dans la zone impactée ($p < 0,0001$ dans les deux cas) (Annexe 2). A ce stade, ce résultat ne s'explique pas. Plusieurs hypothèses peuvent être apportées : des différences de fond géochimique, des sources de contamination non identifiées, des différences d'alimentation des oursins entre les deux zones liées à des différences dans les communautés algales présentes.

3.2.3. Autres métaux

Les concentrations en cobalt et nickel dans les gonades d'oursins ne sont pas différentes entre les deux zones ($p = 0,956$ et $p = 0,260$) (Annexe 2). On note ici aussi que les concentrations en manganèse et arsenic sont significativement supérieures dans la zone de référence ($p < 0,0001$ et $p = 0,002$) (Annexe 2).

3.3. Conclusion intermédiaire sur les oursins

Les résultats sur les oursins, organismes brouteurs benthiques et peu mobiles, sont inattendus. En effet, les concentrations en titane, aluminium mais aussi en manganèse et arsenic sont significativement supérieures dans la zone de référence. Même si plusieurs hypothèses peuvent être avancées, rien ne nous permet aujourd'hui d'expliquer avec certitude ces résultats. Par ailleurs, il est à noter que nous ne disposons pas de valeurs de référence pour les concentrations de ces éléments dans les gonades d'oursins en Méditerranée.

Cette étude ne permet donc pas de conclure à un impact du rejet sur la concentration en métaux dans les gonades d'oursins récoltés à la côte (site 1 et 2 de la zone impactée) ou autour de phare de la Cassidaigne (site 3 de la zone impactée) situé à l'Est du canyon.

4. Conclusion intermédiaire de l'expertise Ifremer

Ce document présente uniquement les résultats relatifs à l'évaluation de la contamination chimique basée sur l'immersion de stations artificielles de moules et aux mesures effectuées dans les gonades d'oursins. L'interprétation des résultats en matière de sécurité sanitaire étant en dehors du champs de compétence de l'Ifremer, elle trouve actuellement sa place dans la première partie réalisée par l'Anses et sera reprise dans le rapport final intégrant les deux parties.

Les résultats obtenus dans les moules et les gonades d'oursins ont permis de tirer deux conclusions quant à des organismes non mobiles :

- **A proximité du canyon, les concentrations en aluminium, en titane et en vanadium mesurées dans des organismes filtreurs artificiellement implantés pendant une courte période (2,5 mois) sont largement supérieures à celle des témoins. Cet effet est limité géographiquement et s'observe plutôt à l'Ouest du canyon, probablement en lien avec la courantologie générale de la zone.**
- **A la côte, que ce soit dans les moules ou les gonades d'oursins l'impact du rejet n'a pas pu être mis en évidence.**

Ces résultats rejoignent ceux d'autres études qui avaient montré un impact local du rejet sur des moules immergées dans le canyon de Cassidaigne³. Un suivi sur une période plus longue et plus propice à la remise en suspension des sédiments, notamment en hiver et au printemps, période durant laquelle sont généralement observés les phénomènes d'upwelling, serait cependant nécessaire pour valider cette conclusion.

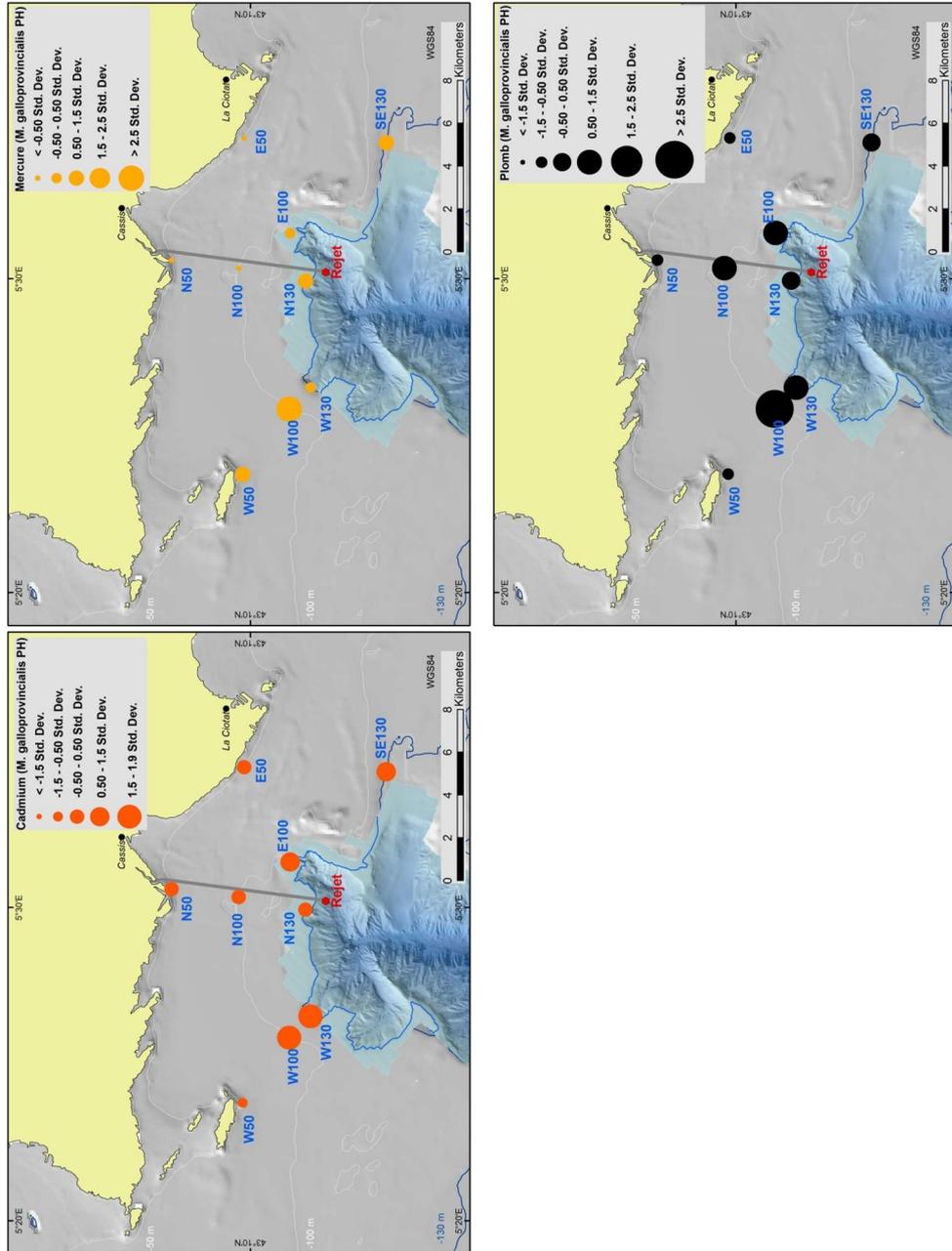
Il est à noter que le dosage de contaminants dans la chair des organismes vivants ne permet pas de préjuger de leur impact potentiel sur les organismes eux mêmes ni de définir un risque sanitaire. Si l'interprétation sanitaire des résultats est traitée par l'Anses, les effets écotoxicologiques de ces contaminants (en particulier du titane et de l'aluminium) sur les organismes marins n'ont pas été abordés et méritent d'être étudiés.

³ Galgani F, Chiffolleau J, Gall PL, Pichot Y, Andral B, Martin C (2005) Deep-sea caging of the mussel *Mytilus galloprovincialis*: Potential application in ecotoxicological studies. *Chemistry and ecology* 21:133-141

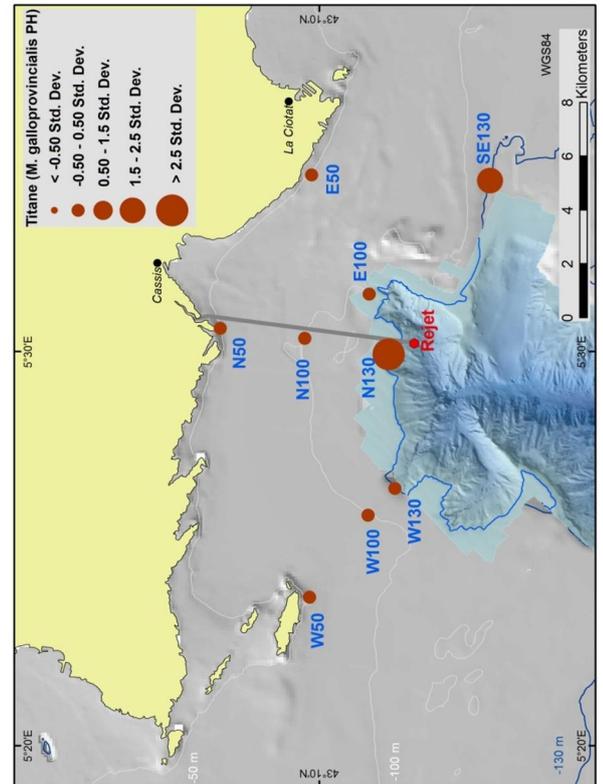
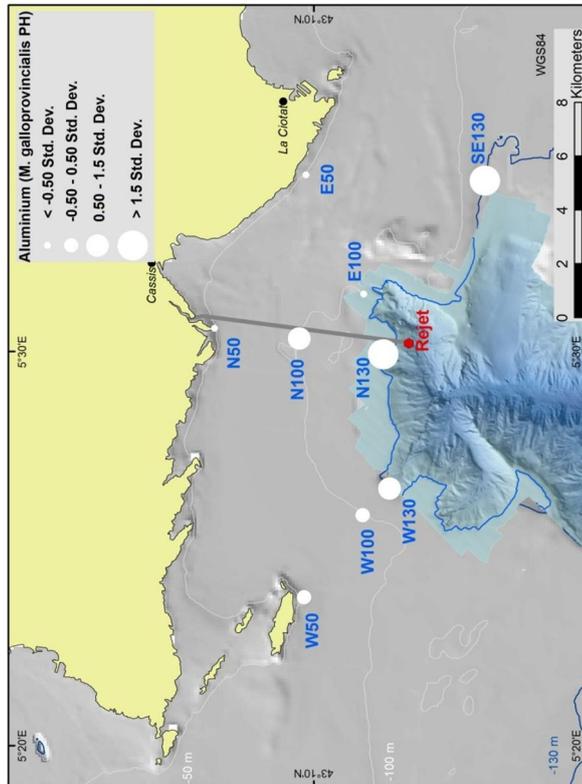
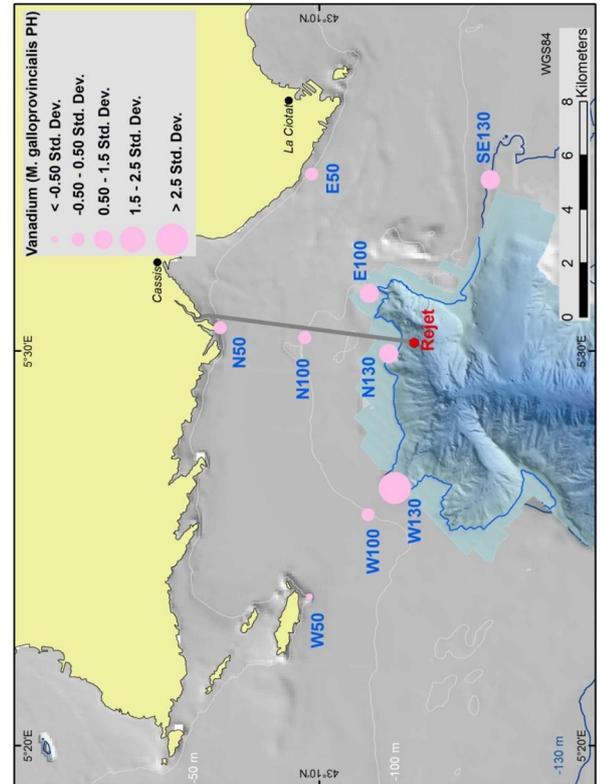
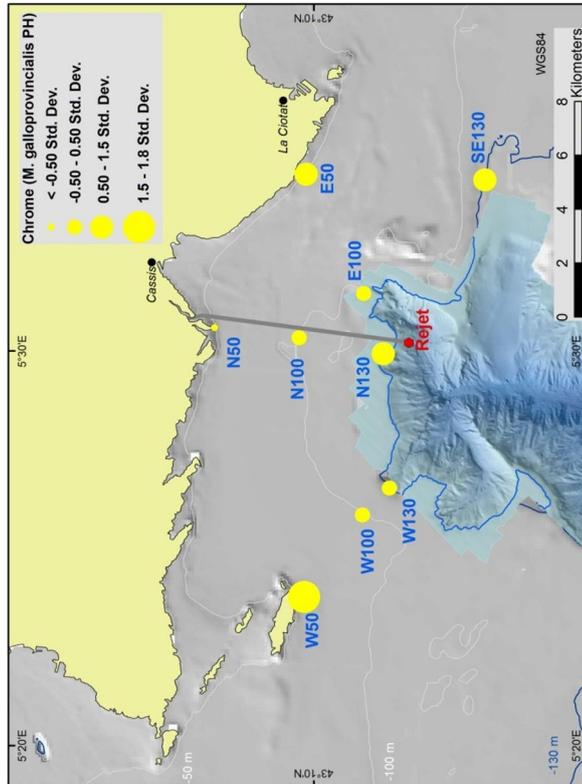
Annexe 1 : Cartographie de la contamination chimique dans les moules

La série de cartes suivante permet de visualiser la distribution spatiale de la variation de la concentration dans les poches de moules. Cette variation est représentée par un cercle de surface proportionnelle à la déviation par rapport à la moyenne des valeurs sur la zone (exprimée en nombre d'écart-types). Les valeurs des témoins n'ont pas été prises en compte. A chaque station, le cercle correspond à la variation maximale observée dans la colonne d'eau. Les données étant représentées en relatif, l'interprétation des cartes doit donc se faire en couplant avec les valeurs absolues indiquées sur les diagrammes en bâtons.

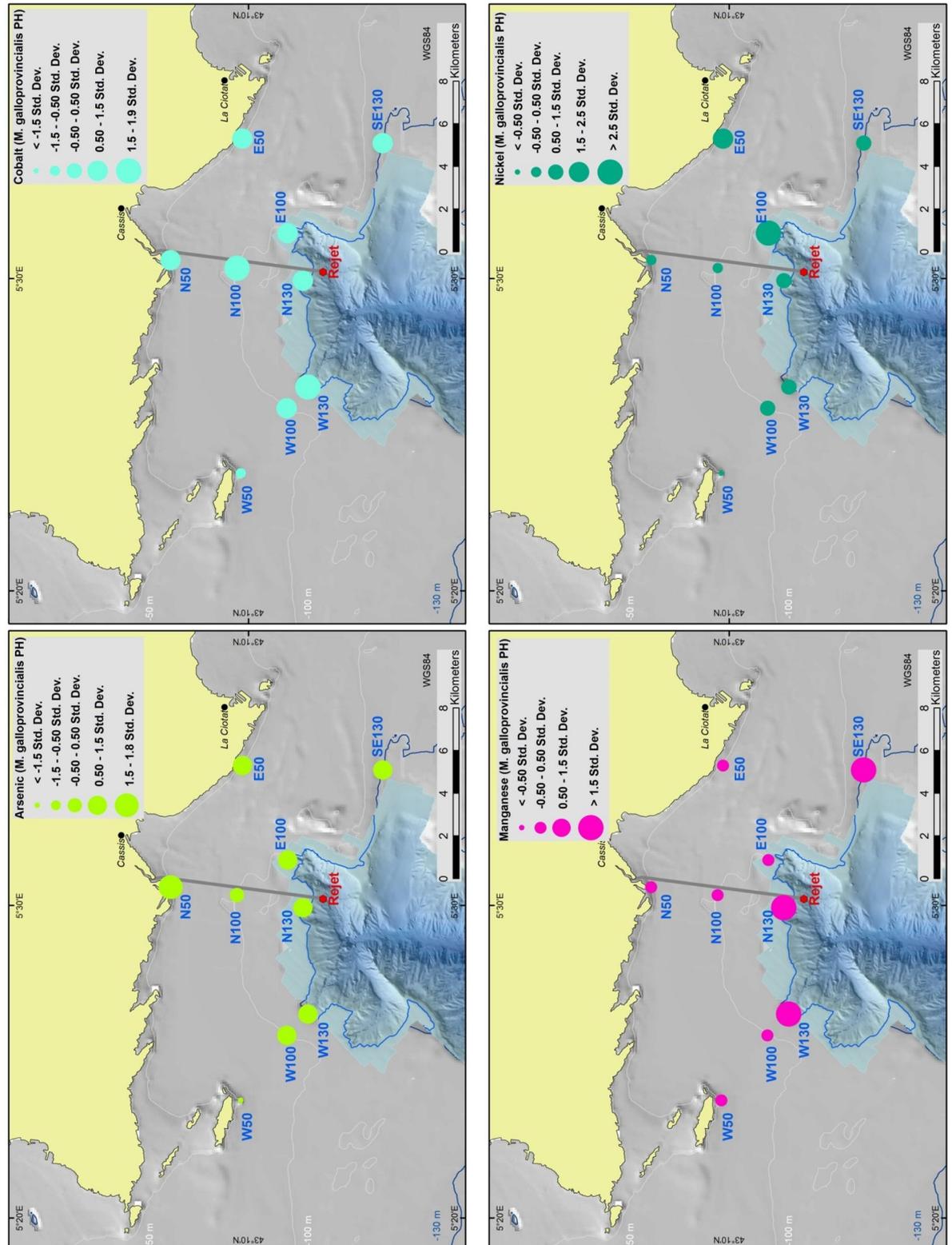
Les métaux règlementés (mg.kg^{-1} de poids frais, analysés par l'Anses) :



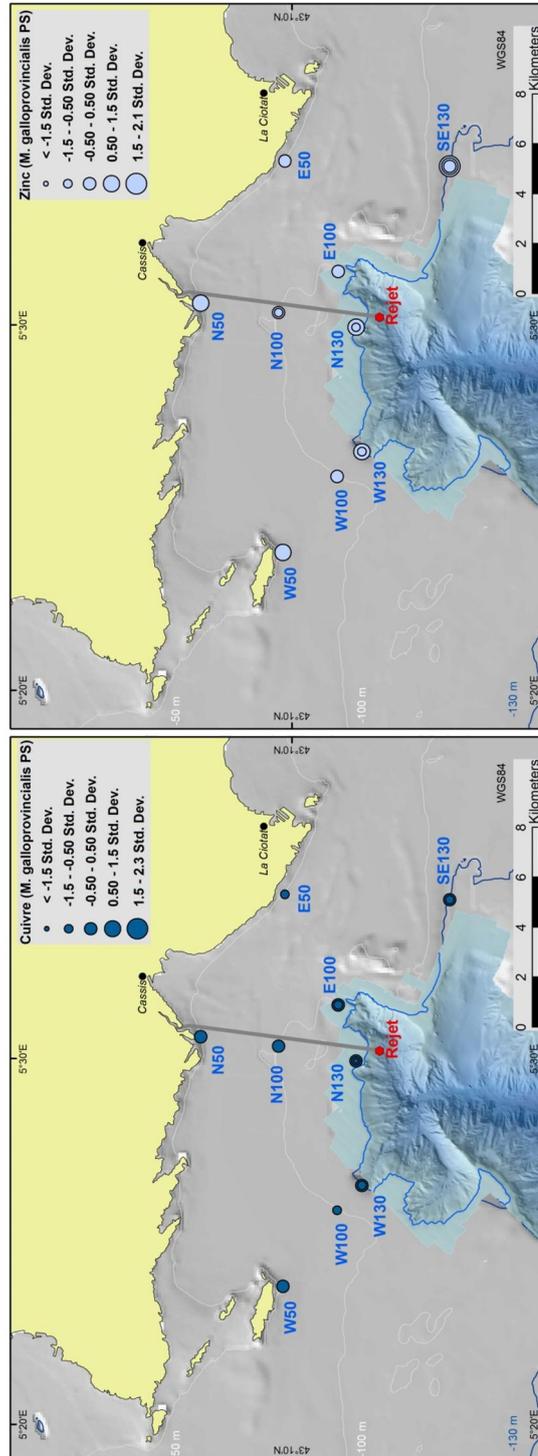
Les métaux traceurs du rejet (mg.kg^{-1} de poids frais, analysés par l'Anses) :



Autres métaux (mg.kg⁻¹ de poids frais, analysés par l'Anses) :



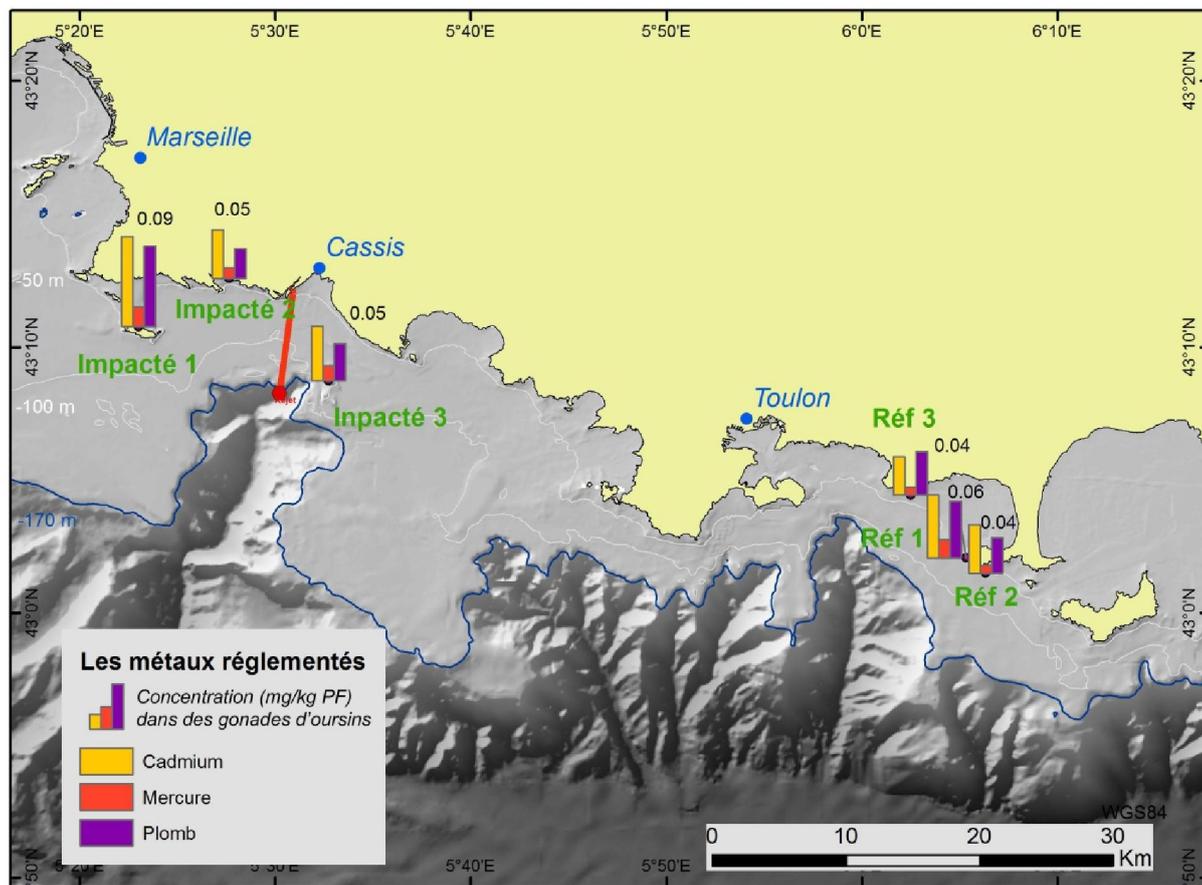
Autres métaux (mg.kg⁻¹ de poids sec en poids sec analysés par l'Ifremer-LBCM) :



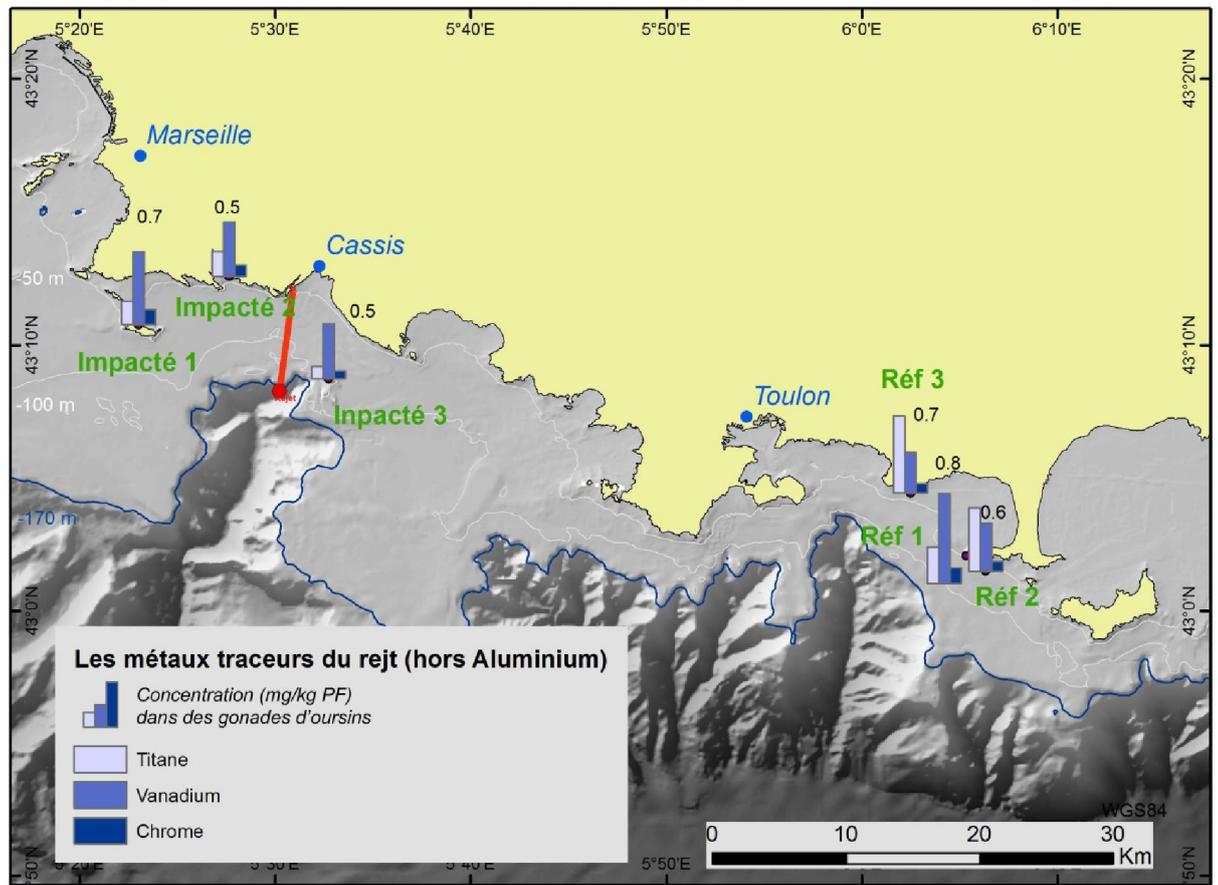
Annexe 2 : Cartographie de la contamination dans les gonades d'oursins

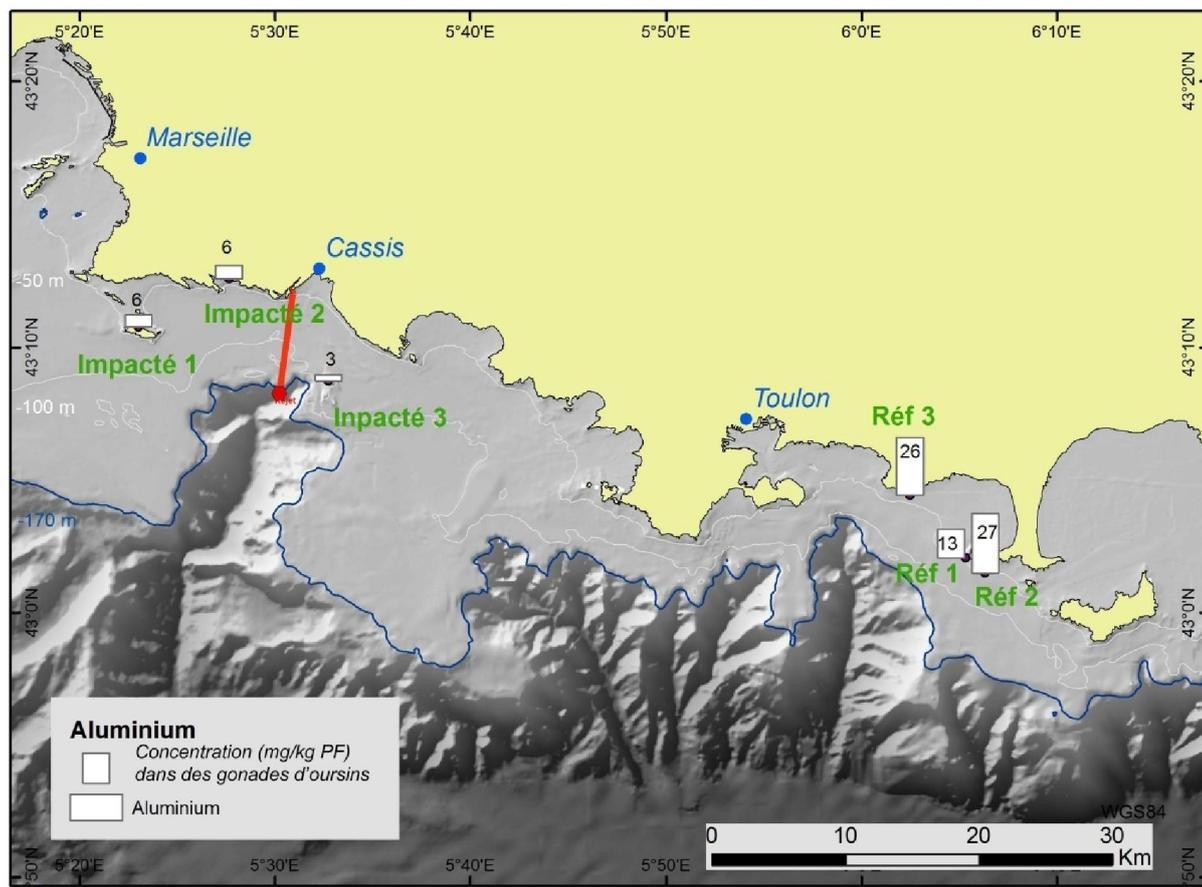
La série de cartes suivante permet de visualiser la distribution spatiale de la variation de la concentration en contaminants métalliques dans gonades d'oursins. Cette variation est représentée par un des barres dont la hauteur est proportionnelle à la concentration moyenne en contaminant pour le site. Les concentrations en aluminium et en arsenic étant très largement supérieures à celles des autres métaux, elles ont été représentées dans des graphiques à part.

Les métaux réglementés ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de poids frais, analysés par l'Anses) :

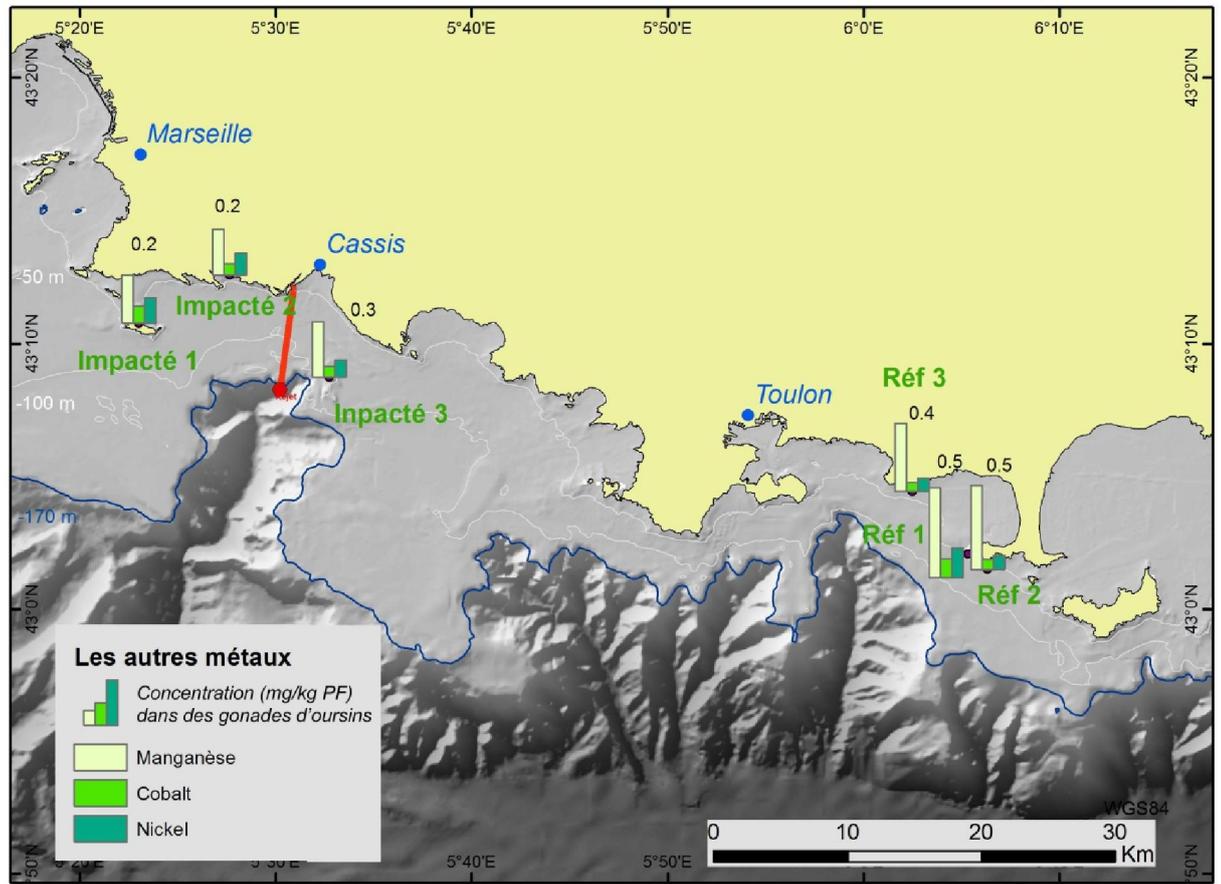


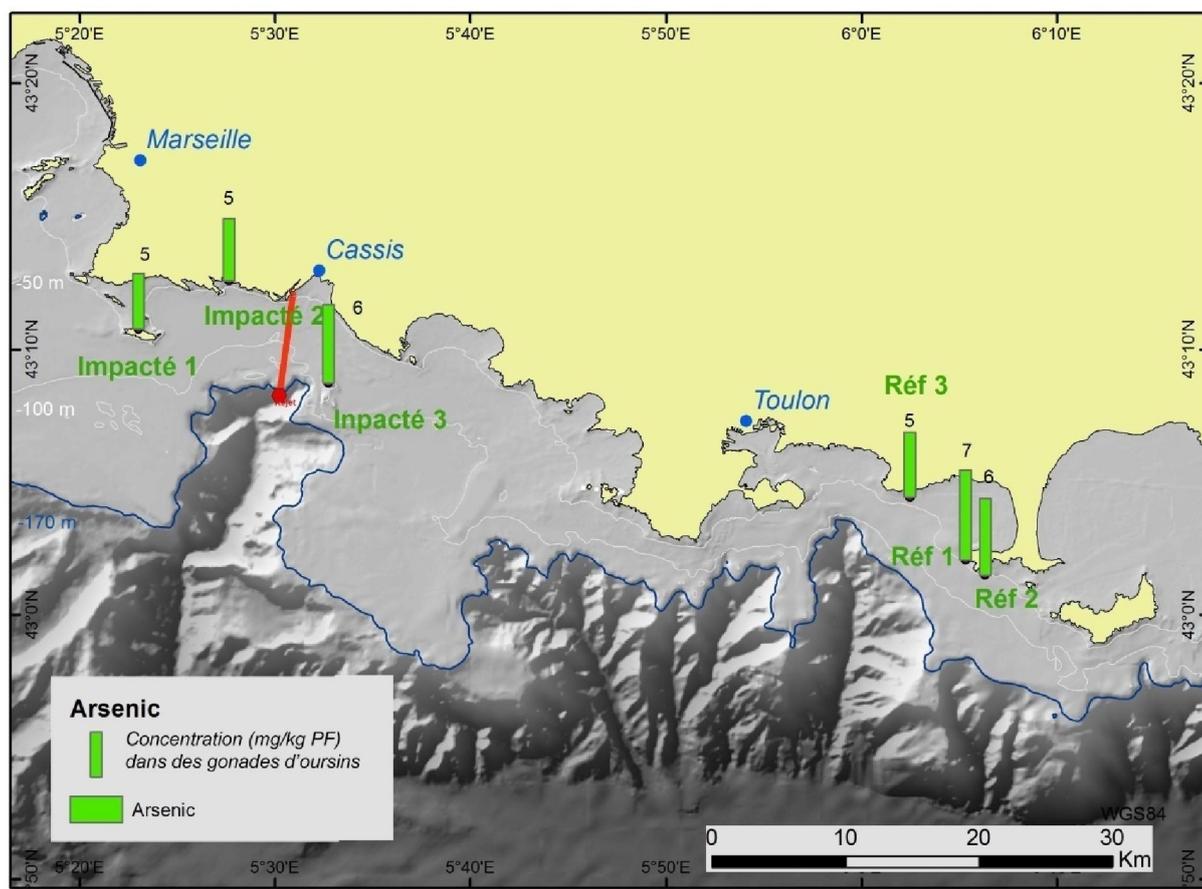
Les métaux traceurs du rejet (mg.kg^{-1} de poids frais, analysés par l'Anses) :





Autres métaux ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de poids frais, analysés par l'Anses) :





Annexe 3 - Rappel du protocole de la campagne de pêche 2015

PROTOCOLE POUR UNE NOUVELLE CAMPAGNE DE PECHE (4 MAI 2015). ANSES ET IFREMER.

1. Opérations de pêche

- Deux catégories d'espèces à échantillonner sont arrêtées afin de distinguer :
- les espèces commerciales locales, directement concernées par le risque sanitaire ;
 - les espèces sentinelles.

1.1 Espèces commerciales

L'approche est conditionnée par le risque sanitaire pour les consommateurs en lien avec certaines pratiques culinaires locales. Ainsi, certaines espèces proposées ne sont pas forcément mentionnées dans les bases de données de consommation alimentaire de la population générale française (Afssa INCA2, 2009 et Afssa Calipso, 2006), mais sont (i) toutes pêchées en Méditerranée française, (ii) très prisées des consommateurs locaux et régionaux, (iii) connues pour bien concentrer les métaux lourds.

Le but sera, pour chaque espèce retenue, d'avoir une connaissance de la contamination chimique de son muscle, de comparer celle-ci aux seuils sanitaires en vigueur pour les contaminants réglementés, et de réaliser une évaluation des risques sanitaires liés à la consommation de ces espèces et du bruit de fond alimentaire.

Le tableau ci-dessous précise, pour chaque espèce proposée, la catégorie de taille à échantillonner. La priorité est ici portée sur les adultes (tailles commerciales) du fait des risques liés à la consommation.

Nom vernaculaire	taxinomie	taille
Daurade royale	<i>Sparus aurata</i>	> 30 cm
Dorade rose	<i>Pagellus erythrinus</i>	> 20 cm
Merlu européen ou merlan	<i>Merluccius merluccius</i>	> 40 cm
Rascasse	<i>Scorpaena porcus</i>	> 15 cm
Girelle	<i>Coris julis</i>	indifférenciée
Sardine	<i>Sardina pilchardus</i>	> 12 cm
Sar commun	<i>Diplodus sargus</i>	> 20 cm
Sar à tête noire	<i>Diplodus vulgaris</i>	> 20 cm
Mulet - muges		> 25 cm
Chinchard	<i>Scomber scombrus</i>	> 30 cm
Loup	<i>Dicentrarchus labrax</i>	> 30 cm
Rouget de roche	<i>Mullus surmuletus</i>	> 18 cm

Rouget barbet de vase	<i>Mullus barbatus</i>	> 15 cm
Moule	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	
Oursin violet	<i>Paracentrotus lividus</i>	
Violet	<i>Microcosmus</i>	
Poulpe commun	<i>Octopus vulgaris</i>	

La distinction entre la daurade royale et la dorade rose (homonymie, mais deux poissons d'un genre différent) s'explique par leur répartition bathymétrique et leur écologie différentes, pouvant induire des contaminations notablement différentes. Il en est de même pour la distinction entre le rouget de roche et le rouget de vase (poissons du même genre).

Si l'effort d'échantillonnage découlant de cette liste s'avérait trop important, le sar commun et le sar à tête noire pourraient être regroupés dans le même échantillon. De même, l'échantillonnage du chinchard pourrait être abandonné.

1.2 Espèces sentinelles

Le but est ici, pour chaque espèce, de juger de l'impact du rejet sur la zone. A cette fin, il est nécessaire de disposer d'espèces pour lesquelles des données de contamination chimique sont déjà disponibles (*cf.* programmes MERLUMED et RETROMED). La présence de quelques espèces (également commerciales) déjà mentionnées dans le tableau précédent est donc volontaire (Merlu et Rouget).

Le but sera, pour chaque espèce retenue, d'avoir une connaissance de la contamination chimique de son muscle et son foie, et de comparer celle-ci aux données disponibles.

L'échantillonnage des espèces sentinelles concerne a priori tant les juvéniles que les adultes afin de mieux cerner la compréhension des phénomènes de contamination et leurs mécanismes.

Nom vernaculaire	taxinomie	taille		
		juvénile	adulte	indifférenciée
Merlu européen ou merlan	<i>Merluccius merluccius</i>	< 20 cm	> 40 cm	
Rouget de roche	<i>Mullus surmuletus</i>	< 15 cm	> 18 cm	
Rouget barbet de vase	<i>Mullus barbatus</i>	< 12 cm	> 15 cm	
Roussette	<i>Scyliorhinus canicula</i>	< 30 cm	> 40 cm	
Congre commun	<i>Conger conger</i>	< 50 cm	> 75 cm	
Raie bouclée	<i>Raja clavata</i>			X
Oursin violet	<i>Paracentrotus lividus</i>			X
Murex	<i>Bolinus brandaris</i>			X

Au regard de la charge analytique, la priorité pourra toutefois être portée sur les adultes. De même, si l'effort d'échantillonnage du murex s'avérait trop important du fait que sa présence et son abondance dans le périmètre géographique du rejet Alteo ne sont pas évidentes, il pourrait être abandonné.

Le protocole d'échantillonnage pourra être adapté et spécifique à une espèce.

Ainsi, pour les merlus, la proposition est d'échantillonner 10 individus pour chaque classe de 10 cm, jusqu'à 50 cm, permettant d'avoir un échantillonnage complet des juvéniles (plus sédentaires, avec une contamination à très forte variabilité) aux adultes (mobiles, avec de hauts niveaux de contamination).

Pour les rougets, 30 individus entre 15 et 20 cm

Pour les roussettes, 30 individus entre 30 et 50 cm

1.3 Période d'échantillonnage

En regard des résultats analytiques attendus pour la fin de l'été 2015, nécessitant des délais d'analyses incompressibles, tous les échantillons retenus devraient être prélevés entre mai et la fin juillet.

1.4 Zones d'échantillonnage

Il est proposé d'échantillonner, d'une part la zone sous impact direct du rejet de l'émissaire sous-marin, d'autre part une zone de "référence" hors impact de ce rejet.

*** Zone sous impact de l'émissaire**

La zone préconisée concerne le canyon de Cassidaigne au sens large, et s'étend de la côte à l'isobathe 300 mètres, permettant de couvrir le droit de l'émissaire, ses bords est et ouest, et de prendre en compte les phénomènes de remontée d'eaux profondes (upwelling) dans la zone côtière.

*** Zone de "référence"**

Afin de s'extraire de l'impact non seulement du rejet Alteo mais également d'autres rejets comme celui de l'émissaire de Cortiou, il est suggéré de chercher une telle zone de "référence" plus à l'Est, par exemple au voisinage de la rade de Hyères et de la tête de canyon des Stoechades.

L'obtention des différents échantillons correspondant aux listes ci-dessus impliquera des opérations de pêche en zones côtière et profonde, menées par des professionnels utilisant différents engins et stratégies de pêche (à savoir pêche à la senne, au filet, et en plongée). Les coordonnées géographiques des prélèvements devront également être relevées.

Pendant ces opérations de pêche, la présence d'un observateur assermenté est indispensable afin de certifier le respect des protocoles d'échantillonnage (zones de prélèvements, espèces pêchées, tailles, conditionnement à bord, ...).

1.5 Effectif

L'objectif du plan d'échantillonnage est d'obtenir 30 échantillons de muscle et/ou de foie par espèce et par zone d'échantillonnage, et ce, pour les espèces commerciales et les espèces sentinelles (sauf exception des merlus pour lesquels il est demandé 10 espèces par tranche de 10 cm jusqu'à 50 cm), Si un poisson s'avère trop petit pour constituer un échantillon (100 g), d'autres poissons de la même espèce (mêmes tailles et masses) devront être pêchés afin de pouvoir constituer un lot,

1.6 Laboratoires

Les analyses des échantillons pourront être réalisées par :

- Option 1 : le Laboratoire National de Référence (éléments traces métalliques dans les denrées alimentaires d'origine animale, laboratoire Anses), en collaboration avec 9 autres laboratoires de son réseau, Si cette option est choisie, le protocole est décrit dans le paragraphe 1.7
- Option 2 : un laboratoire privé, Si cette option est choisie, le protocole sera fourni par le laboratoire.

1.7 Conservation des échantillons et mesures (option 1)

Dès leur capture, les individus doivent être placés entiers dans des sacs plastiques propres fermés hermétiquement et congelés ou transportés immédiatement au laboratoire à une température inférieure à 12°C. L'enceinte dans laquelle s'effectue le conditionnement des individus doit être non contaminée.

Le prélèvement et la préparation des échantillons (broyage, homogénéisation et congélation dans les contenants appropriés) pour analyse de contaminants métalliques se feront dans un laboratoire sur site, proche des lieux de pêche.

* Biométrie

Chaque organisme doit être pesé (à 0,1 mg près) et mesuré (au mm près). Ces données permettront l'interprétation a posteriori des résultats.

* Dissections

Suite aux mesures bio-métriques, les organismes seront disséqués et les échantillons seront prélevés pour les analyses. Les tissus choisis sont ceux classiquement utilisés pour ces analyses, conformément à la littérature et aux habitudes alimentaires : le muscle pour les poissons et les mollusques, les gonades pour les oursins. Pour les poissons faisant partie de la liste des espèces sentinelles, le foie sera également analysé. C'est en effet dans cet organe que s'accumulent généralement les métaux.

* Analyse des concentrations en contaminants métalliques

L'analyse des concentrations en contaminants métalliques sera effectuée sur un échantillon de tissu d'environ 100 g (masse humide). Pour les plus petits individus, la quantité importante de matière nécessaire à l'analyse ne permet pas toujours de disposer d'un échantillon par individu. Il sera donc nécessaire de regrouper les échantillons issus de plusieurs petits individus pour atteindre la quantité de matière nécessaire à l'analyse. Les groupes doivent être formés à partir d'individus de taille et de masse comparables, afin de conserver un sens biologique aux résultats obtenus.

Les modalités de préparation des échantillons et de nettoyage des ustensiles sont précisées dans la procédure spécifique LNR de l'Anses (cf, documents Procédure LNR Anses nettoyage vaisselle-LSA-PS-0040,pdf et Procédure LNR Anses préparation échantillons-LSA-PS-0047,pdf). Chaque échantillon sera broyé selon la procédure et placé dans un flacon en polyéthylène de qualité laboratoire garanti sans source de contamination des éléments d'intérêt. Ils auront préalablement été tarés vides, pourvus de leur étiquette et sans couvercle, avec une précision de 0,1 g.

En ce qui concerne les analyses chimiques des éléments métalliques retenus, il est nécessaire de se référer à la méthode multiélémentaire par ICPMS validée et accréditée Cofrac décrite par Chevallier *et al.*, (2015)⁴.

1.7 Substances à analyser

La liste des substances à analyser ainsi que leurs limites analytiques (limite de détection (LOD) et limite de quantification (LOQ) en mg/kg de poids frais) figurent dans le tableau suivant :

Substance	mg/g de poids frais	
	LOD	LOQ
Aluminium	0,042	0,083
Arsenic total	0,0010	0,002
Cadmium	0,0003	0,0005
Cobalt	0,0007	0,001
Chrome	0,005	0,010
Manganèse	0,003	0,005
Mercure total	0,0005	0,008
Nickel	0,025	0,050
Plomb	0,0003-0,0005	0,0025
Vanadium	0,0005	0,001
Titane	0,03	0,050

Compte tenu de son intérêt en matière d'évaluation des risques, mais considérant néanmoins la complexité analytique de mise en œuvre, la réalisation de quelques mesures d'arsenic inorganique sur une palette d'espèces destinées à la consommation est fortement suggérée. Elle pourra être discutée en lien avec le laboratoire retenu (LOD : 0,003 mg/g, LOQ = 0,005 mg/g). S'agissant du méthylmercure, des hypothèses majorantes d'évaluation des risques pourront être posées, à défaut d'analyses spécifiques.

⁴ Chevallier E, Chekri R, Zinck J, Guérin T et Noel L, 2015. Simultaneous determination of 31 elements in foodstuffs by ICP-MS after closed-vessel microwave digestion: Method validation based on the accuracy profile. Journal of Food Composition and Analysis, 41, 35-41.

2. Evaluation de la contamination chimique basée sur l'utilisation de stations artificielles de moules - Protocole expérimental

2.1 Introduction

La mesure des contaminants chimiques directement dans la colonne d'eau est coûteuse, difficilement interprétable et peu applicable à de nombreux échantillons prélevés le long d'un important linéaire côtier. Pour surmonter ces difficultés, les contaminants peuvent être mesurés dans la chair de bioaccumulateurs naturels comme les moules. Depuis 1994, le Réseau Intégrateurs Biologiques (RINBIO), conçu par l'Ifremer en partenariat avec l'Agence de l'Eau Rhône Méditerranée Corse, cherche à évaluer les niveaux de contamination chimique à l'échelle de la façade méditerranéenne en utilisant une technique de caging de moules. Depuis 2006, ce réseau est utilisé pour rendre compte de la qualité chimique des eaux littorales au titre de la Directive Cadre Eau.

La biosurveillance repose dans la capacité de la moule à concentrer dans ses tissus les contaminants chimiques dans un facteur proportionnel à leur biodisponibilité. Les stratégies développées sont de deux types. Certaines utilisent les populations indigènes de moules sauvages ou cultivées (biosurveillance passive (cas du ROCCH matière vivante en France). D'autres ont recourt aux transplants d'individus provenant d'un site de référence (biosurveillance active). Les gisements naturels de moules n'étant pas disponibles sur tout le linéaire côtier du littoral méditerranéen français, le réseau RINBIO s'appuie sur cette dernière stratégie.

Plusieurs études ont mis en évidence que la quantité de contaminant bioaccumulée par la moule est à la fois dépendante, des caractéristiques du site de stabulation (salinité, température, capacité trophique, etc.) et de la quantité de contaminants biodisponibles. Ainsi, si les concentrations mesurées dans les tissus restent fonction des concentrations en contaminants biodisponibles, le facteur de bioaccumulation (rapport entre la concentration dans les tissus mous et celle dans le milieu) est en particulier très dépendant de la capacité trophique du milieu. La comparaison directe des concentrations en contaminants dans les tissus de moules ne peut se faire qu'à une échelle locale, dans des secteurs de potentiel trophique homogène.

Dans le cas présent, la mise en œuvre de caging de moules pour le suivi du rejet Alteo présente des avantages et des inconvénients.

*** Avantages :**

- La période d'exposition est connue,
- Les stations de surveillance peuvent être sélectionnées indépendamment de la présence de population naturelles et de leur distance à la côte, permettant ainsi un suivi précis de la zone d'influence du rejet,
- Les mesures sont optimisées par l'utilisation d'échantillons homogènes au regard de la population d'origine, de la taille, de l'âge et de leur environnement.

*** Inconvénients :**

- La tenue des mouillages face aux aléas climatiques et humains.

2.2 Protocole expérimental

2.2.1 Espèce

La moule *Mytilus galloprovincialis* est utilisée; elle répond à plusieurs exigences :

- physiologie et processus de bioaccumulation bien connus,
- large aire de répartition en Méditerranée,
- facilité d'approvisionnement,
- tolérance à de larges gammes de température et de salinité,
- résistance à la déshydratation (transport).

2.2.2 Caractéristiques du lot

Plusieurs critères doivent être respectés :

- Le lot est composé de moules ayant un patrimoine génétique homogène. Les moules de captage conviennent tout particulièrement car leur cycle de croissance s'est intégralement déroulé sur le site de production,
- Les moules doivent avoir le même âge, 18 à 24 mois (50 mm de longueur de coquille environ), période où le métabolisme est stable,
- Le site d'origine du lot **doit être impérativement peu ou pas contaminé par les contaminants recherchés**, car les cinétiques de décontamination sont beaucoup plus lentes que les cinétiques de contamination,

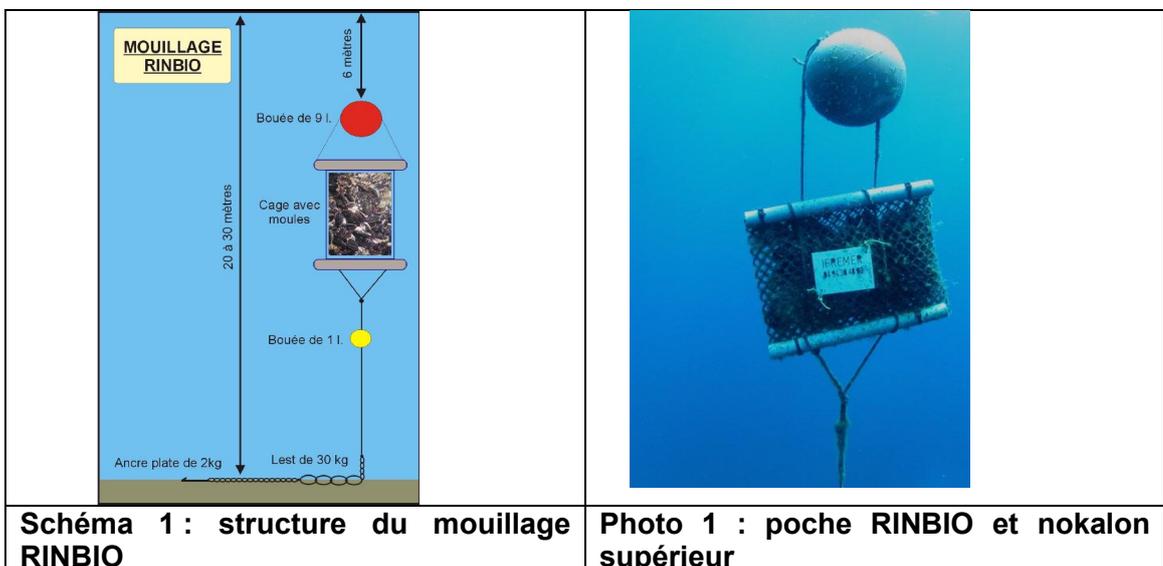
Pour sélectionner la cohorte désirée, le calibrage est réalisé sur la hauteur de coquille (calibreuse à grille de 19 mm). Un double calibrage est souhaitable et permet d'obtenir une cohorte homogène (cette opération engendre une mortalité évaluée entre 20 et 25).

Le lot obtenu est mis en poche ostréicole contenant au maximum 3 kg de moules, puis immergé sur le site d'origine pour favoriser le regrappage et éviter des accidents de mortalité lors de la pose.

2.2.3 Mouillages (schéma 1 et photo 1)

La structure de mouillage répond à plusieurs critères :

- Faible coût,
- Facilité de manutention (pose et relève rapide),
- Tenue adaptée aux conditions hydrodynamiques de la Méditerranée française jusqu'à la bathymétrie des 10 m,
- Flottabilité adaptée à l'alourdissement du système par envasement et biofouling.



Il s'agit d'un dispositif de subsurface immergé entre 10 et 6 mètres de la surface pour limiter fortement les forces de traînée. La discrétion de ce système permet de réduire les risques de disparition liée au vandalisme et d'éviter les collisions avec les embarcations. Dans une étude d'impact et en zone sécurisée il est par contre recommandé d'utiliser une marque en surface pour faciliter les opérations de récupération.

L'échantillon de 3 kg de moules est stocké dans une poche ostréicole de maille 18 mm de dimension limitée à 0,5 m X 0,35 m. La poche est rigidifiée par deux tubes PVC diamètre 40mm fendus dans leur longueur et enfilés sur la partie supérieure et inférieure de la poche. Un flotteur principal de 11 litres fixé au-dessus de la poche assure son maintien à 6 mètres de la surface quelles que soient les conditions d'envasement ou biofouling. La tenue du système au fond est assurée par un lest de 30 kg constitué de 4 maillons de chaîne. Afin d'entraver tout risque de déplacement du système, une ancre plate de 2 kg peut éventuellement être rajoutée au lest. La liaison entre le lest et ancre est assurée par une chaîne galvanisée de diamètre 8mm et d'une longueur de 4 mètres. La liaison entre le lest et la poche est réalisée par du cordage polypropylène flottant de diamètre 7 mm. La détection du mouillage après un positionnement précis est soit visuelle, soit acoustique avec une détection sonar et sondeur de pêche ou des pingurs,

Pour caractériser la présence et augmenter la distance de détection du mouillage au sonar et au sondeur, un ou deux flotteurs de type « nokalon » de 1 litre sont ajoutés sur la ligne de mouillage. Leur emploi permet :

- de repérer de plus loin le mouillage au sondeur à balayage et de suivre son signal tout au long de l'approche avec le bateau,
- d'obtenir un signal caractéristique au sondeur vertical et à balayage du mouillage,
- l'accrochage des mouillages avec un système traînant de récupération sans plongeurs.

Dans le cas d'un marquage en surface, le repérage est visuel.

2.2.4 Période et durée d'immersion

L'immersion doit être réalisée pendant la période de repos sexuel qui débute chez *Mytilus galloprovincialis* début avril et se termine fin août.

Pendant le repos sexuel les réserves énergétiques sont élevées (ce qui améliore la survie des lots) et la physiologie de la moule est plus stable. D'autre part, la perte de contaminant par ponte fausserait certains résultats, en particulier pour les contaminants organiques.

La durée d'immersion pour atteindre un pseudo équilibre avec le milieu est d'environ 3 mois, 2,5 mois étant le minimum recommandé.

2.2.5 Moyens nautiques

Pour pouvoir accéder aux stations en toute sécurité et y effectuer un positionnement précis et reproductible (position géographique + bathymétrie), il est préférable de disposer d'un bateau de petite taille, de faible inertie (maximum 20m) et de faible tirant d'eau (1 à 1,5m maximums). Il doit également être manœuvrable et puissant pour pouvoir travailler exposé au vent de côte.

2.2.6 Positionnement des stations

Les poches à moules sont maintenues à une profondeur de 10 mètres quelle que soit la bathymétrie de la zone.

Deux types d'informations ont été prises en compte pour leur positionnement : (1) les niveaux de contamination mesurés dans la moule dans le cadre de précédentes études dans la zone concernée, (2) la zone d'impact potentielle du rejet basée sur les connaissances hydrologiques de la zone. Il est à noter que les coordonnées fournies sont approximatives et pourront être légèrement adaptées par l'exploitant lors de la pose sur le terrain en fonction notamment de la bathymétrie réelle. Par ailleurs, la liste des points préconisés est une liste minimale qui pourra être bien évidemment être complétée par l'exploitant en fonction de données à sa disposition.

2.2.7 Récupération des stations

En mer la récupération des poches à moules a lieu en plongée ou par grapinage (photos 2). L'usage combiné du GPS différentiel, d'un sonar panoramique et d'un sondeur vertical permet de repérer les mouillages sans difficultés. Le signal composé de 2 ou 3 signaux lenticulaires à des profondeurs connues permet de le distinguer avec certitude parmi les échos parasites engendrés par des bancs de poissons, des déchets flottants ou des thermoclines fréquentes dans la zone côtière.



Photos 2 : récupération des mouillages en plongée

2.2.8 Traitement des échantillons

L'enceinte dans laquelle s'effectue le traitement doit être non contaminée et munie d'un plan de travail, d'un réfrigérateur et d'un congélateur. Après la relève des poches, les échantillons de moules sont transportés au laboratoire, des glacières et blocs de froid doivent être utilisés afin de maintenir les échantillons à une température inférieure à 15°C.

Des données, se rapportant à la biométrie de l'échantillon de moules, sont récoltées durant la relève :

- la mortalité est directement mesurée sur le bateau, Cette estimation intègre la mortalité due aux opérations de calibrage (20 %), C'est un indicateur de bonnes ou de mauvaises conditions du milieu pour la survie des moules,
- La mesure de la hauteur de coquille permet d'observer l'homogénéité du lot, Pour chaque lot, quinze moules sont prises au hasard puis mesurées dans le sens de la hauteur à l'aide d'un pied à coulisse au 1/10^{ème} de millimètre.

Mise en piluliers

Le décoquillage doit se faire au laboratoire. Un scalpel en acier inoxydable propre est utilisé. L'ouverture se fait en évitant d'endommager le mollusque avec la lame. Il est indispensable d'éliminer le byssus. La chair est mise à égoutter sur un entonnoir de Büchner en porcelaine. Le temps d'égouttage est de 30 minutes (photos 4 et 5).

Cette phase du traitement est la plus délicate car le mollusque n'est plus protégé par sa coquille et peut être contaminé par l'atmosphère du laboratoire ou des projections diverses. Il est donc nécessaire de procéder au décoquillage et à l'égouttage dans un laboratoire où n'est menée aucune activité contaminante. L'égouttage des coquillages sous une hotte à flux laminaire est à privilégier. Dans tous les cas, il est nécessaire de protéger le Büchner avec une feuille de papier aluminium préalablement calcinée.

Le port de gants en polyéthylène jetables est impératif lors du décoquillage et doivent être changés d'un lot à l'autre. Les entonnoirs et couteaux utilisés sont lavés puis rincés trois fois à l'eau distillée à chaque changement de lot.

Pour chaque échantillon, lorsque l'égouttage est terminé, deux piluliers de 90 ml sont remplis aux trois-quarts. Ceux-ci sont fermés en intercalant une feuille d'aluminium préalablement calcinée entre le verre et la capsule plastique. Les piluliers auront préalablement été lavés à l'acide nitrique 10 % puis rincés selon les protocoles recommandés par AQUAREF. Ils doivent être tarés vides, pourvus de leur étiquette et sans couvercle, avec une précision de 0,1 g.



Photos 4 et 5 : préparation des échantillons

2.2.9 Protocoles d'analyses et mesures

Poids sec moyen de coquille et poids sec moyen de chair.

Après la campagne, de retour au laboratoire, les coquilles des individus d'un même lot contenus dans les deux piluliers servant aux analyses chimiques sont séchées à 60°C à l'étuve, puis pesées. En divisant la masse obtenue par le nombre d'individus, on obtient le poids sec moyen d'une coquille de ce lot.

La chair des individus contenue dans les deux piluliers est lyophilisée puis pesée au laboratoire d'analyse chimique. En divisant la masse obtenue par le nombre d'individus, on obtient le poids sec moyen de chair de chaque lot.

Les poids sec de coquilles et de chair sont mesurés afin de déterminer un indice de condition. Le rapport du poids sec moyen de chair d'un lot sur le poids sec moyen de coquille (appelé indice de condition) permet d'ajuster les valeurs en tenant compte de la variabilité des sites de stabulation.

Cette précaution doit être prise même si l'échelle spatiale de la présente étude est réduite. En effet, la comparaison des résultats obtenus avec ceux issus de la littérature nécessitera une correction de la mesure basée sur l'indice de condition de la moule.

En ce qui concerne les analyses chimiques des éléments métalliques retenus, il est nécessaire de se référer aux méthodes préconisées pour la mesure des métaux dans le biote recommandées par AQUAREF, accessibles via les sites (déjà cités au premier point de cette note) :

* http://www.aquaref.fr/system/files/Aquaref_2013_D1b_Irstea_MA03-M%C3%A9taux-Methode_analyse_dans_biote_VF.pdf

* <http://www.aquaref.fr/system/files/Fiche+MA2+-+Mercure+-+S%C3%A9diments+boues+et+biote.pdf>

2.2.10 Substances à analyser

La liste des substances à analyser est la suivante :

- Aluminium,
- Arsenic total,
- Cadmium,
- Cobalt,
- Chrome,
- Manganèse,
- Mercure total,
- Nickel,
- Plomb,
- Vanadium,
- Titane.

Les limites analytiques (LOD/LOQ) devront, si possible, être identiques à celles présentées dans la première partie du plan d'échantillonnage relative aux espèces commerciales et sentinelles.