

Julien MARTICORENA
L3 Biologie des Organismes



Étude de l'impact de la désinfection tertiaire par Désinfix® sur le milieu naturel au niveau de la STEP Marbella de Biarritz

Stage effectué du 09/03/15 au 29/05/15 à l'UFR Sciences et Techniques de la Côte Basque 1 allée Montaury
64600 Anglet sous la direction scientifique de M. Thierry Pigot

« Le présent rapport constitue un exercice pédagogique qui ne peut en aucun cas engager la responsabilité de
l'Entreprise ou du Laboratoire d'accueil »

kemira

lfremer

rivages
PRO TECH



BIARRITZ



suez
environnement



Lyonnaise
des Eaux

Résumé

L'étude présentée dans ce présent rapport a pour but de mettre en évidence l'impact d'un nouveau procédé de désinfection tertiaire sur le milieu récepteur. Le produit utilisé, nommé DEX135, est un oxydant puissant qui a pour but de diminuer la charge bactérienne des eaux usées de la station d'épuration de Biarritz avant un relargage en mer. Pour mener à bien cette étude, nous avons utilisé les individus présents sur site, à savoir les moules de l'espèce *Mytilus edulis*. Elles représentent un bio-indicateur très utilisé en écotoxicologie marine. Des analyses *in situ* ont été menées, au cours desquelles, deux lots d'individus ont été comparés. Le premier représente le lot témoin. Le second lot est constitué d'individus provenant de l'émissaire de sortie des eaux usées, ils sont donc en contact permanent avec l'oxydant. La mesure de paramètres morphométriques, notamment un indice de condition préconisé par IFREMER et la quantification d'expression de différents gènes impliqués dans la réponse au stress oxydant nous a permis de donner un premier élément de réponse à la problématique. Une étude expérimentale en laboratoire a aussi pu être mise en place afin d'isoler un maximum de facteurs abiotiques, tout en faisant varier uniquement la quantité de produit à tester. Tous les résultats de l'étude ont été testés statistiquement pour assurer leur fiabilité. Il en découle que les individus en contact avec le DEX135 ne sont pas impactés, cela est incontestablement dû à l'important facteur de dilution du produit dans l'eau de mer à la sortie de l'émissaire. Afin d'assurer la validité des résultats obtenus d'autres expériences sont envisagées en milieu naturel dans le but de répondre au mieux à la problématique de travail.

Mots clés : Écotoxicologie, désinfection tertiaire, stress oxydant, bio-indicateur, indice de condition.

Remerciements

Au cours de mon stage, j'ai eu la chance de mettre en application les acquis emmagasinés tout au long de ma scolarité, au sein d'une équipe de professionnels.

Mes premiers remerciements, et sans doute les plus vifs, sont adressés à Monsieur Thierry Pigot, professeur de l'UFR Sciences et Techniques de la Côte Basque. Je lui suis reconnaissant de m'avoir accueilli en tant que stagiaire au sein de son équipe et des laboratoires de l'UPPA. Je le remercie aussi de la confiance qu'il m'a accordée en me greffant à une étude en cours tout en me laissant une grande liberté de manœuvre quant au déroulement et à l'organisation de ma propre démarche scientifique.

Je remercie aussi Thomas Paulin, chargé de l'étude avec qui j'ai évolué tout au long de mon stage. Il m'a permis de découvrir le travail de terrain et l'analyse primaire des données en laboratoire.

J'exprime toute ma gratitude à Agnès Dassie-Chabault, directrice du bureau d'études de la Mairie de Biarritz d'avoir confié ma candidature aux scientifiques responsables du projet Désinfix®, et de m'avoir suivi au cours de mon stage.

L'occasion m'est donnée ici d'exprimer ma plus grande reconnaissance à l'équipe de l'IFREMER d'Anglet qui s'est tenue à ma disposition pour répondre à mes interrogations. C'est toujours avec le sourire qu'ils m'ont aidé et aiguillé dans ma démarche et celle de mes encadrants.

Je suis très reconnaissant envers Iker Castege et tous les employés du musée de la mer de Biarritz qui nous ont accueilli dans leurs locaux afin de mener à bien la dernière expérience de mon stage.

J'aimerais aussi remercier, Etienne Carrere ainsi que toute l'équipe de la station d'épuration de Marbella.

Finalement, j'aimerais prendre le temps de remercier l'ensemble du corps enseignant de l'UPPA pour l'expérience qu'ils m'ont permis d'acquérir essentielle à la réalisation de mes différentes missions.

Avant propos

Dans le cadre de ma dernière année de Licence de Biologie des Organismes, j'ai réalisé un stage au laboratoire de l'Équipe Chimie Physique (ECP), qui est une composante de l'IPREM.

L'IPREM (Institut Pluridisciplinaire de Recherche sur l'Environnement et les Matériaux), fondé en 2012, est une unité de recherche dépendant de l'UPPA et du CNRS. Il mêle des chercheurs aux compétences étendues et complémentaires qui s'intéressent essentiellement au développement de connaissances fondamentales en physico-chimie, chimie analytique et microbiologie, en relation avec des applications concernant la structure du vivant, la gestion de l'environnement et les propriétés fonctionnelles de différentes classes de matériaux. [\[A\]](#)

Plusieurs équipes de recherche sont impliquées dans ce projet, l'une d'entre elles est l'Équipe Chimie Physique, au sein de laquelle j'ai pu évoluer au cours de mon stage.

Mon maître de stage, Thierry Pigot est professeur à l'UFR Sciences et Techniques de la Côte Basque qui dépend de l'UPPA. M. Pigot est aussi membre de l'équipe ECP, il est accompagné dans ses recherches par l'assistant ingénieur Thomas Paulin.

Le sujet qui m'a été proposé fait partie d'une étude menée en union avec la ville de Biarritz, la Lyonnaise des Eaux et l'ACBA (Agglomération Côte Basque Adour) concernant la mise en place d'un procédé de désinfection tertiaire au niveau de la station d'épuration de Biarritz.

L'étude s'étend sur une durée de 20 mois à compter de janvier 2014, elle est en grande partie financée par l'ACBA, la Mairie de Biarritz et le laboratoire créateur du traitement Kemira.

Le procédé de désinfection mis en place fait l'objet d'une étude poussée en vue d'une installation définitive pour le traitement des eaux usées de la STEP Marbella de Biarritz.

Table des matières

Introduction	5
Matériels et Méthodes	8
1. Étude <i>in situ</i>	8
1.1 Espèce étudiée.....	8
1.2 Effort d'échantillonnage.....	8
1.3 Campagnes d'échantillonnage.....	8
1.4 Traitement des individus.....	9
1.5 Paramètres mesurés.....	10
1.5.1 Morphométrie	10
1.5.2. Analyses transcriptomiques.....	17
1.5.2.1. Les gènes étudiés.....	10
1.5.2.2. Méthodologie.....	11
2. Expérimentation en laboratoire	12
2.1 Protocole expérimental (Figure 27)	12
2.2 Traitement des individus (cf. Tableau 2).....	13
2.3 Paramètres mesurés.....	13
2.3.1 Analyses transcriptomiques.....	13
2.3.2. Indice de condition.....	13
3. Traitement statistique des données	13
Résultats.....	14
1. Paramètres morphologiques.....	14
1.1 Les Classes de tailles.....	14
1.2 Les gonades	15
1.4. Indice de condition	16
2. Analyse transcriptomique.....	17
2.1. Comparaison en fonction du type de tissu.....	17
2.2. Comparaison inter-sites.....	18
Discussion	20
Résumé.....	23
Bibliographie	24
Articles	24
Sources internet.....	25
ANNEXES.....	26

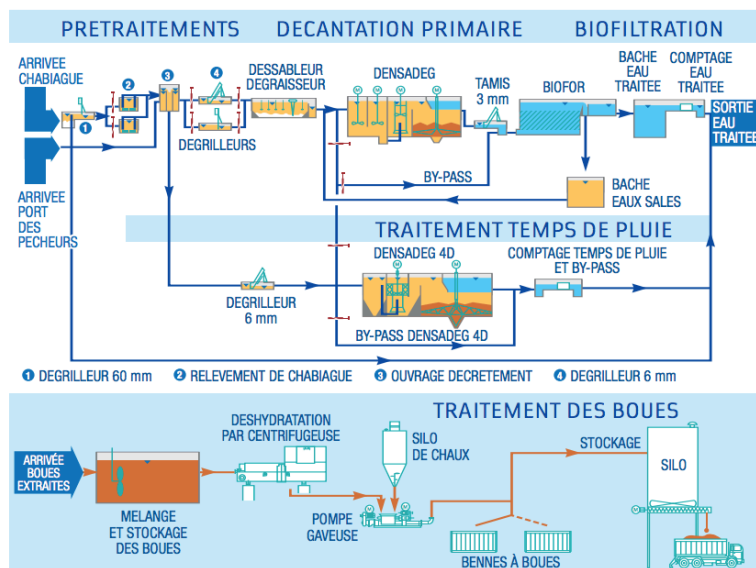


Figure 1. Schéma de la filière de traitement des effluents de la STEP Marbella à Biarritz. Suez-environnement®



Figure 2. Emplacement de la STEP Marbella et son l'émissaire

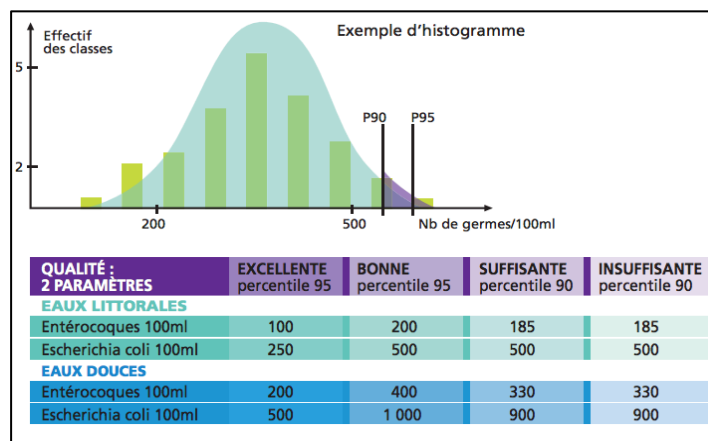


Figure 3. Tableau du classement des plages en fonction de l'abondance des bactéries d'après la nouvelle directive

Nom des plages	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
Miramar	EXC	EXC	EXC	EXC	EXC	EXC	EXC	EXC	EXC	EXC	EXC	EXC
Grande plage Nord	BON	EXC	EXC	EXC	BON	EXC	EXC	EXC	EXC	EXC	EXC	EXC
Grande plage Sud	EXC	EXC	EXC	EXC	EXC	EXC	EXC	EXC	EXC	EXC	EXC	BON
Port Vieux	EXC	EXC	EXC	EXC	BON	EXC	EXC	EXC	EXC	EXC	BON	EXC
Cote des Basques	EXC	EXC	BON	EXC	BON	BON	BON	EXC	EXC	EXC	EXC	EXC
Marbella	INS	INS	SUF	BON	BON	BON	BON	BON	BON	BON	BON	BON
Milady	SUF	SUF	BON	BON	BON	BON	BON	BON	BON	BON	BON	BON

Tableau 1. Classement des plages de Biarritz en fonction de la qualité des eaux de baignade. Dassie-Chaboult A.®

Introduction

La ville de Biarritz est une station balnéaire, très prisée des estivants et sa renommée ne cesse de s'accroître. Biarritz est un pôle tourné vers l'océan ; en effet la nouvelle municipalité souhaite accentuer cette ouverture en faisant du littoral un lieu privilégié et un modèle en terme de préservation du milieu marin. Cela passe nécessairement par un contrôle minutieux de la qualité des eaux de baignade.

Il faut savoir que le réseau d'assainissement de Biarritz est unitaire, il permet de collecter, dans une seule canalisation, les eaux usées, issues de l'utilisation domestique de l'eau potable et les eaux pluviales. Le réseau de collecte des eaux usées est très abouti, il comprend notamment des réservoirs permettant un stockage des eaux en cas de surcharge de celui-ci, des déversoirs d'orages, ainsi que des postes de relèvement qui conduisent les eaux usées à la station d'épuration de Marbella [\[B\]](#).

La station d'épuration de Marbella a été conçue pour pouvoir traiter les eaux usées de la population de Biarritz en tenant compte de la variabilité saisonnière. Elle dispose d'une capacité de 92 000 Équivalents-Habitants. Les filières de prétraitement, traitement primaire et secondaire sont relativement complexes et permettent une élimination efficace des déchets solides, produits toxiques et d'une grande partie des micro-organismes (cf. [Figure 1](#)). Les effluents, une fois traités, sont rejetés en mer par le biais d'un émissaire présent à 800 mètres au large de la plage de la Milady (cf. [Figure 2](#)).

La directive 2006/7/CE du Parlement Européen et du Conseil concernant la gestion de la qualité des eaux de baignade, éditée en 2007, applicable en 2015, est une révision de la parution de 1976. Cette nouvelle directive assigne une qualité d'eau de baignade à chaque plage en fonction de la quantité de bactéries relevées. Le classement se fait en fonction de la qualité de l'eau sur les 4 années qui précèdent la saison en cours. Les 4 classes de qualité de plage sont les mêmes qu'avant la révision de 2007. En revanche les taux d'assignation ont été revus à la baisse (cf. [Figure 3](#)). Le mauvais classement d'une plage peut entraîner une fermeture immédiate et pour une durée d'un an. Il est donc primordial de garantir des eaux de baignade de qualité suffisante pour éviter toute fermeture de plage qui pourrait nuire à la réputation de Biarritz. Les plages du Sud de Biarritz, à savoir Milady et Marbella, sont les plus impactées par les rejets de la station d'épuration. En effet, les courants et les vents dominants ont tendance à plaquer le panache d'eaux usées sur les côtes. Un suivi rigoureux des plages de Biarritz est mis en place chaque année. De cette manière, les professionnels et les utilisateurs de la mer sont informés de l'état de l'eau dans laquelle ils évoluent (cf. [Tableau 1](#)). La bactériologie est donc un facteur essentiel à traiter en amont pour permettre une meilleure gestion de la qualité de l'eau de sortie à l'émissaire.

Dès lors, la municipalité a souhaité investir dans un traitement tertiaire, qui n'était pas impératif jusqu'à présent. Il a pour but de permettre le maintien du bon classement des plages de Biarritz. Il permet un abattement des bactéries potentiellement pathogènes avant le relargage en milieu naturel. En France, peu de stations d'épuration sont équipées d'un procédé de traitement tertiaire, il est principalement installé dans l'optique de maintenir une bonne qualité des eaux de baignade. Le procédé le plus couramment utilisé expose l'eau de sortie à un rayonnement UV. Cependant l'investissement initial ainsi que la maintenance d'une telle infrastructure sont considérables.



Figure 4. Photo des cuves de stockage des réactifs à la STEP de Marbella



Figure 5. Photo de la cuve d'acide formique (21 000 L)

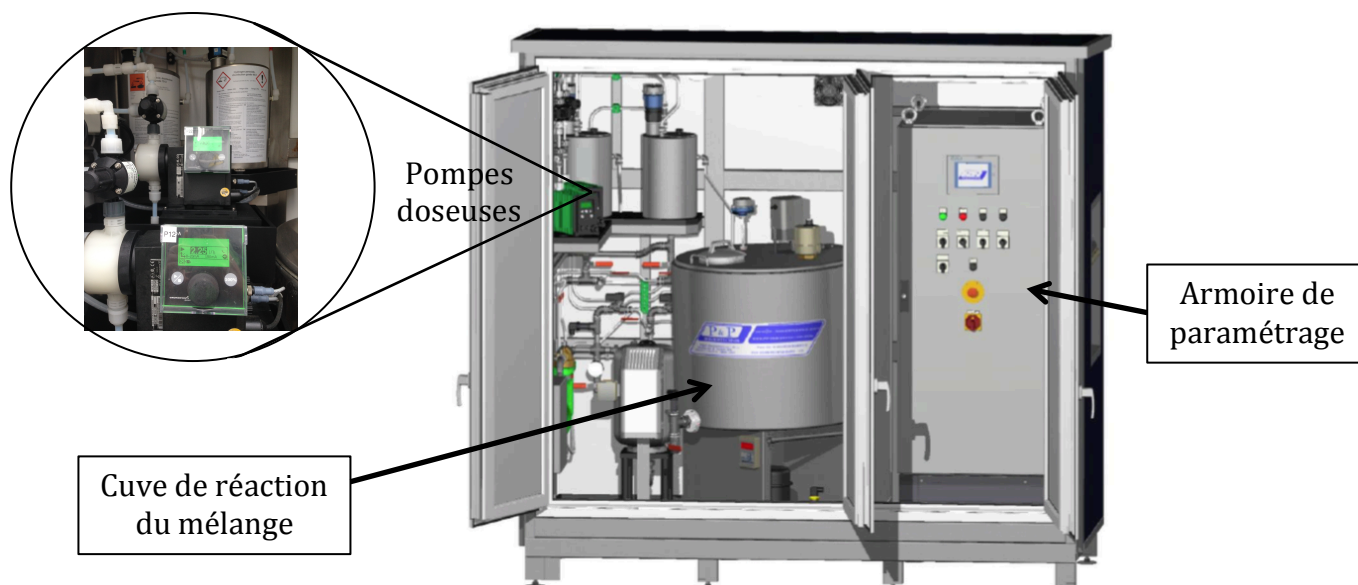
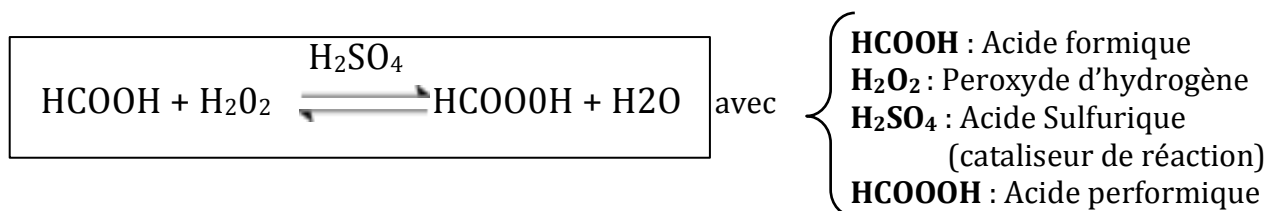


Figure 6. Représentation de l'Unité de production et de mélange produisant le DesinFix®



Figure 7. Injection du DEX135 dans la canalisation de sortie de station

Au niveau de la STEP Marbella, une méthode novatrice est en période d'essai, avant une potentielle installation définitive. C'est un procédé chimique, produit par l'industrie finlandaise Kemira. Le principe de la désinfection repose sur l'utilisation d'un oxydant chimique puissant, l'acide performique, couplé avec l'action du peroxyde d'hydrogène, tous deux synthétisés sur place avant l'injection dans le tampon de sortie de la STEP. L'obtention d'acide performique résulte de l'équation suivante :



L'acide performique dispose d'un excellent potentiel bactéricide, il est connu par les biologistes en tant qu'agent dénaturant. Il permet la rupture des ponts disulfures. En revanche sa durée de demi-vie est relativement faible. La réaction qui entraîne sa formation n'est pas complète, le produit final injecté dans la canalisation a pour nom DEX135 et sa composition est décrite avec précision dans la fiche de données de sécurité (FDS) fournie par le laboratoire en vue de la commercialisation. Les proportions sont les suivantes (en % massique) [C]:

- ❖ Acide performique : 10-14%
- ❖ Eau oxygénée : 10-20%
- ❖ Acide formique : 20-30%
- ❖ Acide sulfurique : 3-10%

Le mécanisme installé à la station d'épuration comprend deux cuves de stockage (cf. Figure 4), une contenant le peroxyde d'hydrogène (Figure 5) et l'autre l'acide formique. Une unité de mélange est aussi présente, c'est elle qui gère la réaction de formation de l'acide performique (cf. Figure 6). Elle adapte aussi la quantité de DEX135 déversée dans le tampon de sortie en fonction du débit afin que sa concentration reste optimale. Le produit est rejeté instantanément à la sortie de la station d'épuration via un regard de canalisation présent sur site (cf. Figure 7). Le temps moyen de contact du produit avec les eaux usées avant relargage en mer est estimé à 15 minutes. L'installation du procédé a été réalisée en janvier 2014 dans le but de mettre en place une étude approfondie pour tester l'efficacité et les retombées écologiques du Desinfix®. L'ACBA souhaitait proposer l'étude à un laboratoire indépendant qui n'avait aucun profit à tirer du résultat final, c'est dans cette optique que les recherches ont été confiées à l'Université de Pau et des Pays de l'Adour, et plus précisément aux membres de l'Équipe Physique Chimie de l'IPREM, sous l'égide de Mr PIGOT.

C'est la première étude d'envergure mise en place pour tester tous les aspects du produit commercialisé. Trois principaux axes de travail sont établis :

- La vérification de l'efficacité bactéricide du procédé avec la configuration de la STEP de Biarritz.
- L'analyse de l'état des infrastructures en béton des canalisations sur le long terme lorsqu'elles sont soumises à ce réactif.
- L'impact des sous produits potentiellement créés sur le milieu récepteur au niveau de l'émissaire.

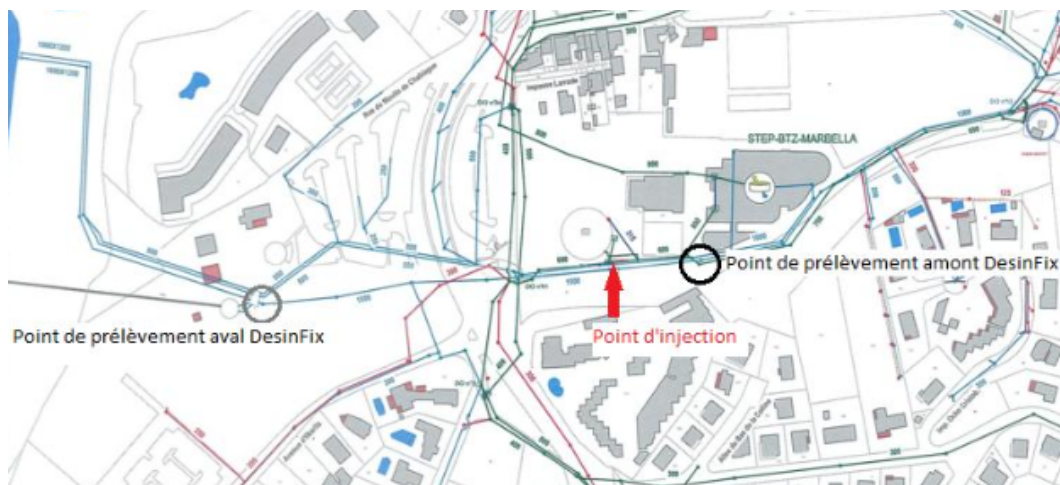


Figure 8. Position géographique des points de prélèvements pour les analyses bactériologiques et du point d'injection Désinfix®. Lyonnaise des eaux Biarritz®

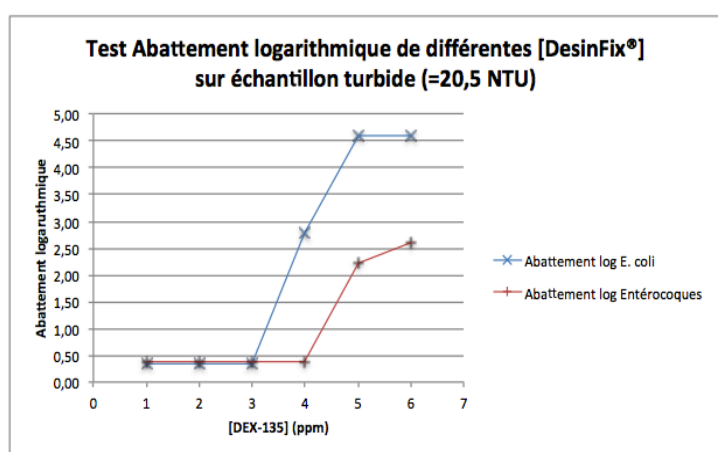


Figure 9. Abattement logarithmique des E. coli et Entérocoques en fonction de différentes concentrations de traitement sur un échantillon turbide. Paulin T.®

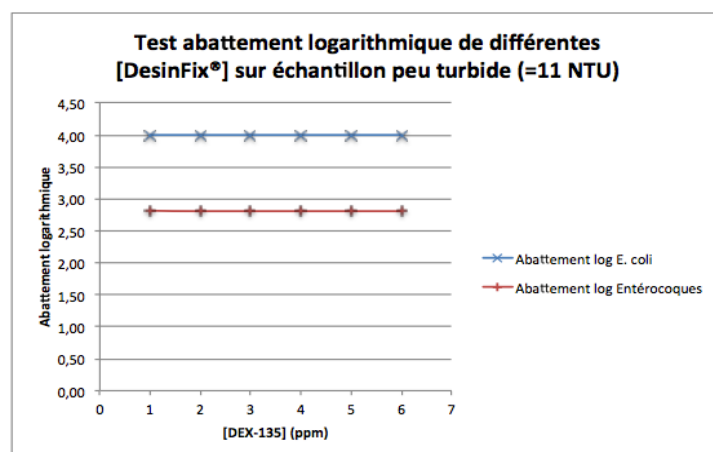


Figure 10. Abattement logarithmique des E. coli et Entérocoques en fonction de différentes concentrations de traitement sur un échantillon peu turbide. Paulin T.®



Figure 11. Photo des moules présentes au niveau de l'émissaire



Figure 12. Photo du diffuseur de l'émissaire colonisé par des moules (*Mytilus edulis*)

Le contrat de recherche a démarré en février 2014 juste après la mise en place du procédé sur site.

Le premier axe de travail abordé vise à calculer l'abattement bactériologique imputable au Désinfix®. Pour cela des campagnes de prélèvements ont été menées et un suivi hebdomadaire permet de s'assurer de l'efficacité du procédé. Pour mener à bien cette expérience, deux points de prélèvement sont nécessaires, en amont puis en aval de l'injection (cf. [Figure 8](#)). Ce compartiment de l'étude a été réalisé par M. Pigot, Thomas Paulin avec la contribution d'un stagiaire de M1 de Bordeaux, Alexandre Coquil. Les paramètres physico-chimiques relevés lors de l'étude sont la turbidité, la quantité de matière en suspension (MES), la concentration en azote organique et inorganique, la conductimétrie ainsi que la demande chimique en oxygène (DCO). Ces données ont été corrélées avec des informations météorologiques informées par la STEP afin d'étudier la relation entre le flux de bactéries et le débit de rejet. Les principaux résultats de cette étude montrent que l'abattement bactéricide est effectivement probant pour les 2 espèces de bactéries concernées par la directive CE. Cependant, il est important de retenir que l'abattement bactériologique dépend essentiellement de la concentration en DEX135, ainsi que de la turbidité de l'eau de sortie (cf. [Figure 9](#) [Figure 10](#)) [10]. Il est donc primordial de coupler les informations de débit et de turbidité en temps réel avec les pompes doseuses pour permettre l'injection d'une concentration optimale de DEX135 dans l'eau de sortie.

Une étude de la charge polluante transportée par le ruisseau Chardinérou a aussi été menée. Un rapport présentant les principaux résultats de ces enquêtes a été rédigé. [10]

Le sujet de mon stage est l'étude de l'impact du procédé Désinfix® sur le milieu naturel. Pour cela il fallait trouver une espèce pouvant servir de bio-indicateur de la qualité de l'eau au niveau de l'émissaire. Des études ont été conduites par LAPHY sur des organismes planctoniques au niveau de l'émissaire [5]. Cependant, aucun impact du procédé n'est réellement démontrable par le biais de ces recherches, car la variabilité saisonnière est très importante. De plus, il s'agit d'organismes mobiles, on ne peut donc pas attester de leur contact permanent avec les eaux de sortie. Une plongée a donc été réalisée par Laurent Soulier de l'IMA. Il a constaté que de nombreuses moules colonisaient l'émissaire (cf. [Figure 11](#) [Figure 12](#)). Il se trouve que la moule est un bivalve filtreur fixé très utilisé en tant qu'espèce sentinelle. Les moules *Mytilus edulis* observées sur l'émissaire colonisent aussi les rochers présents au niveau de la digue entre Marbella et Milady. Une étude comparative des individus des deux milieux pourrait donc nous permettre d'établir l'effet du Désinfix® sur le milieu naturel.

Ma première mission en tant que stagiaire est d'exploiter les prélèvements réalisés en février 2015. Par la suite, je dois planifier avec Thomas Paulin, une troisième campagne de prélèvement qu'il faudra comparer avec celles effectuées préalablement. Je suis chargé de mener des recherches bibliographiques permettant d'estimer les travaux déjà réalisés sur la résistance des organismes présents sur l'émissaire. Enfin une étude expérimentale en laboratoire est envisagée. Je suis chargé de mettre en place un protocole pour réaliser cette expérience et de déterminer les paramètres qui seront mesurés sur les individus utilisés.

Ce stage a permis de mettre en application mes connaissances pluridisciplinaires (Génétique des populations, Statistiques, écologie, physiologie animale et Génétique). Dans ce rapport je vais vous présenter de quelle manière j'ai mené à bien mes différentes missions en essayant d'apporter ma pierre à l'édifice.



Figure 13. Photo d'une Blennie pilicorne entourée d'Anémones marguerites

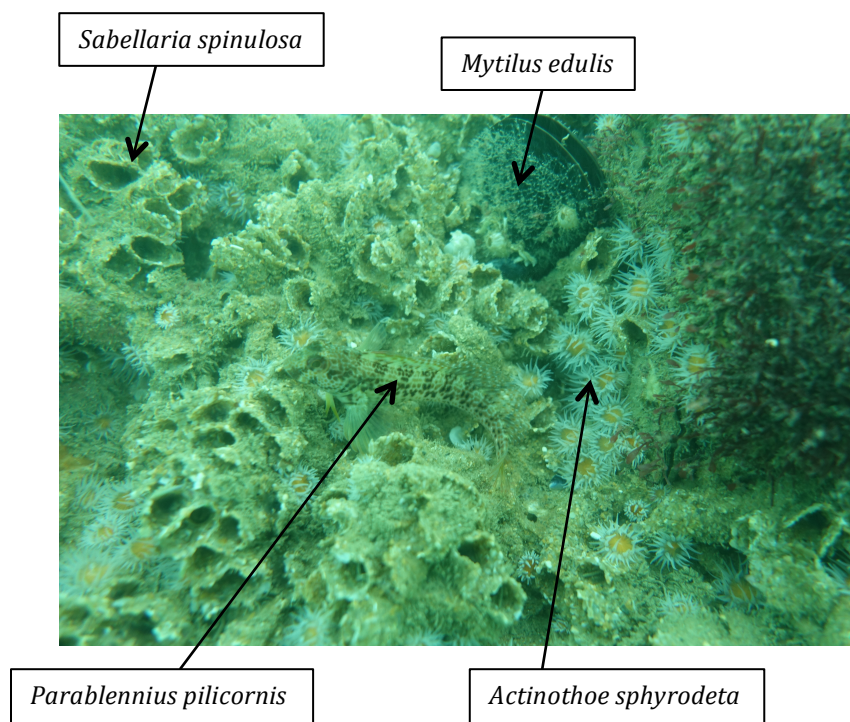


Figure 14. Photo prise sur l'émissaire lors de la plongée de prélèvement du 12/02 des espèces présentes sur place.

Matériels et Méthodes

1. Étude *in situ*

1.1 Espèce étudiée

Plusieurs espèces colonisent la partie externe de la canalisation de l'émissaire, elles représentent autant de modèles potentiels pour la réalisation de l'étude. En effet, sur le diffuseur on trouve des Anémones marguerites (*Actinothoe sphyrodeta*), des Blennies (*Parablennius sp.*), des massifs d'hermelles (*Sabellaria spinulosa*) ainsi que des moules communes (*Mytilus edulis*) (cf. Figure 13 Figure 14).

Le modèle biologique choisi pour l'expérimentation est un mollusque du genre *Mytilus* et de l'espèce *edulis*, ce sont des bivalves marins à vie sédimentaire. Sur site, cette espèce est omniprésente. De ce fait il est possible de prélever des individus non-exposés au produit que l'on utilisera comme lot témoin. Les moules de ce genre disposent d'un cycle de reproduction annuel entrecoupé par des périodes de repos sexuel. La présence de gonades matures est facilement identifiable à la dissection des individus. La maturation des gonades commence aux alentours du mois de mars, la libération des œufs s'effectue généralement durant les mois de juin et juillet. *Mytilus edulis* demeure facile à prélever. De plus ces individus sont connus pour leur robustesse et leur grande capacité d'adaptation aux variations environnementales. Cette espèce est très documentée et représente un excellent indicateur de qualité de l'eau.

1.2 Effort d'échantillonnage

Afin que les résultats puissent être exploités statistiquement avec un maximum de robustesse, il est primordial de définir l'effort d'échantillonnage des campagnes de prélèvement. Il doit être standardisé pour l'intégralité des prélèvements de l'étude. Un quadrat de 0,1 m² est alors utilisé, tous les individus présents dans ce quadrat seront prélevés. Cela permet d'aborder par la suite des notions d'abondance et de densité d'individus. Pour chaque date d'échantillonnage, le prélèvement est organisé en triplicat, cela permet d'assurer la reproductibilité des travaux d'échantillonnage. Ainsi des moyennes et des écarts types peuvent être calculés dans l'optique de traiter statistiquement les données.

Les points d'échantillonnage sont établis en fonction de la présence et de l'accessibilité aux individus. On cherche aussi à relever les individus de taille standard, que l'on est susceptible de trouver dans tous les points d'échantillonnage.

1.3 Campagnes d'échantillonnage

Pour effectuer les analyses nécessaires, un prélèvement au niveau de l'émissaire a été réalisé. En outre, au moins un lot de moules témoin devait par la suite être échantillonné. L'étude menée cherche à montrer l'effet de l'injection de DEX135 sur les moules. Pour cela, le milieu de vie du lot témoin doit être le plus proche possible de celui des moules présentes sur l'émissaire. La particularité de l'émissaire est qu'il se trouve à une dizaine de mètres de profondeur (les individus qui s'y trouvent ont un mode de vie subtidal) et que l'apport en matière organique est relativement important du fait de la sortie des eaux usées. De telles conditions sont délicates à retrouver sur le terrain ; néanmoins, les moules de l'espèce *edulis* colonisent aussi la digue présente entre les plages de Marbella et Milady.

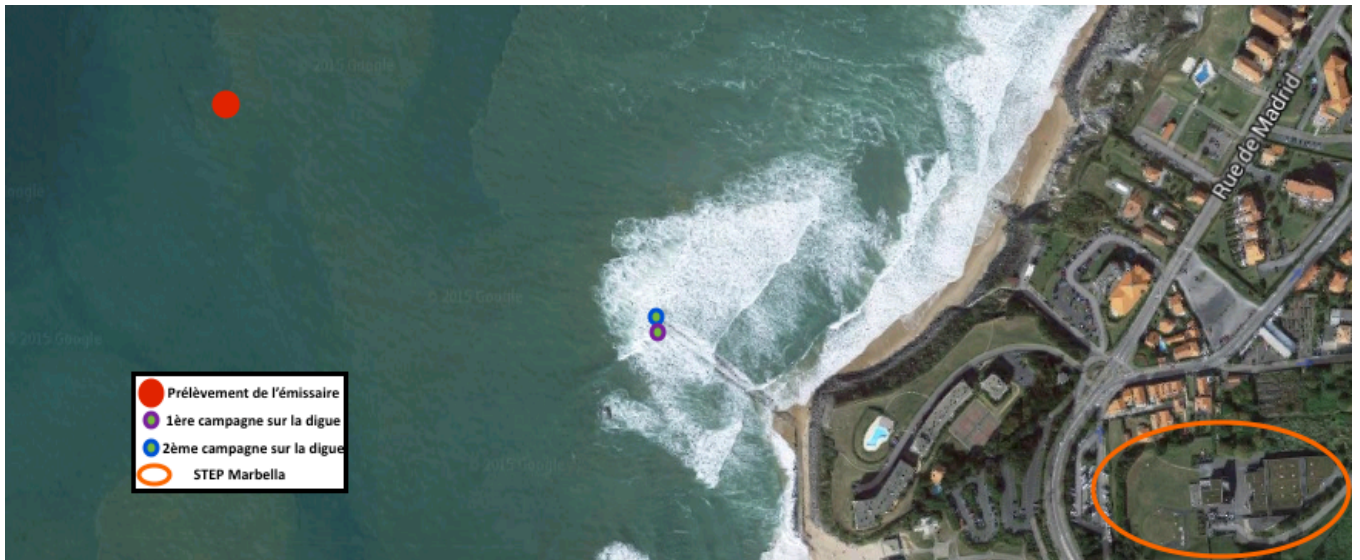


Figure 15. Vue aérienne des différents points de prélèvements utilisés durant les 3 campagnes d'échantillonnage.

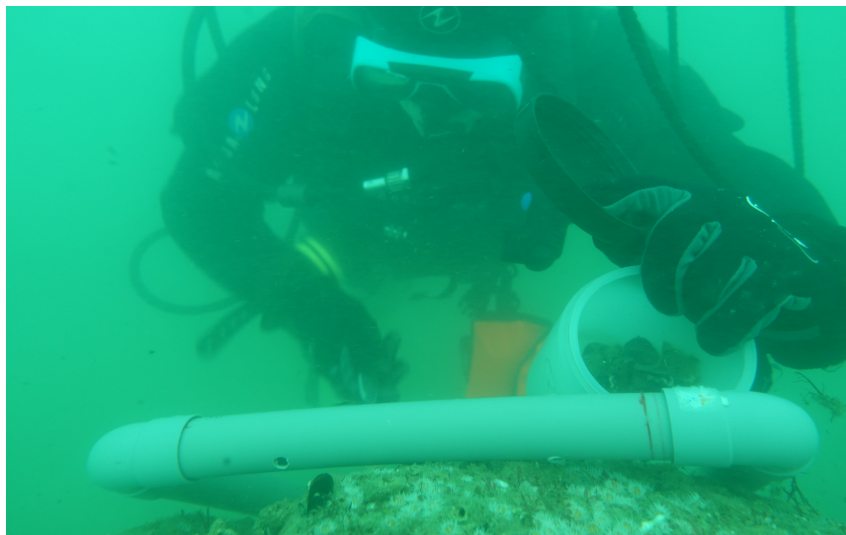


Figure 16. Photographie de l'échantillonnage sous marin au niveau de l'émissaire le 12/02/15



Figure 17. Photo de la zone de prélèvement du quadrat 1



Figure 18. Matériel nécessaire à l'échantillonnage sur la digue

L'ancien émissaire de la station d'épuration se trouve au bout de cette digue. Par temps de fortes précipitations, ce dernier sert de by-pass pour évacuer le surplus d'eaux usées de la station. Durant ces périodes, l'apport en matière organique est abondant pour les individus présents à proximité. La digue subit l'alternance des émergences et des immersions consécutives aux marées. Il est très difficile cependant de collecter des individus strictement subtidaux à proximité de l'ancien émissaire. Néanmoins, les prélèvements au niveau de la digue sont réalisés à marée basse lorsque les coefficients sont très importants pour garantir la collecte d'individus les moins soumis possible au balancement des marées. (cf. [Figure 15](#))

Avant le début de mon stage, la campagne d'échantillonnage au niveau de l'émissaire a été réalisée par des plongeurs professionnels de l'Institut des Milieux Aquatiques. Pour un échantillonnage en plongée, il est essentiel que les conditions météorologiques soient les meilleures possibles. Le prélèvement a donc eu lieu le 12 février 2015 par un jour de beau temps et de faible houle (cf. [Figure 16](#)). Au cours de cet échantillonnage, 103 individus ont été prélevés en trois quadrats de la manière suivante $n_{Q1}=49$; $n_{Q2}=35$ et $n_{Q3}=19$.

La deuxième campagne d'échantillonnage a été réalisée par Thomas Paulin le 20/02/15. Ce jour-là, la marée était basse à 11 h 23 pour un coefficient de 116. Lors de cet échantillonnage, au total 412 individus ont été prélevés en trois quadrats de la manière suivante : $n_{Q1}= 92$; $n_{Q2}= 216$; $n_{Q3}=104$.

J'ai participé à la troisième campagne d'échantillonnage avec l'aide de Thomas Paulin et Maud Ezan (technicienne de laboratoire de biologie). Le prélèvement a eu lieu le 23/03/15 à marée basse, avec un coefficient de 111 (cf. [Figure 18](#)). Pour cet échantillonnage nous avons également récupéré 12 litres d'eau de mer issue du milieu de vie des bivalves, afin de les conserver quelques jours en laboratoire. Le matériel nécessaire à l'échantillonnage est constitué de plusieurs flacons de 2 litres pour stocker les individus et les maintenir à température idéale. Le transport jusqu'au laboratoire s'est fait dans une glacière. Nous avons utilisé un quadrat en cordelette de 30 cm de côté (cf. [Figure 17](#)). Lors de ce prélèvement, au total 655 individus ont été collectés en trois quadrats de la manière suivante : $n_{Q1} = 290$; $n_{Q2} = 149$; $n_{Q3} = 216$.

1.4 Traitement des individus

Une fois les individus prélevés et avant toute analyse, il est nécessaire de les conserver quelques jours en vie pour permettre une évacuation naturelle des pseudofèces. Pour cela, les moules sont placées dans un aquarium avec de l'eau de leur milieu naturel. L'aquarium est placé dans un endroit aéré pour que la température ambiante reste proche de celle de l'extérieur. De plus, un bulleur est placé dans l'eau pour faciliter l'oxygénation des individus. Cette phase de prétraitement dure environ 3 jours.

Les analyses que nous effectuons par la suite nécessitent deux lots d'individus. Un lot dédié aux analyses génétiques et un lot dédié aux analyses morphométriques.

Pour les analyses génétiques qui sont réalisées par un laboratoire du CNRS à Arcachon, il faut prélever aléatoirement 5 individus parmi la somme de moules récupérées au cours de la campagne. Ensuite, une dissection est réalisée pour récupérer les branchies et les glandes digestives facilement identifiables. Ces échantillons sont conservés à - 80°C avant d'être envoyés par carboglace au laboratoire d'analyse d'Arcachon.

Les analyses morphométriques sont réalisées sur 50 individus pour chaque quadrat, cela donne une analyse de 150 individus par campagne d'échantillonnage. Le nombre d'individus est assez important pour pouvoir étudier statistiquement les résultats



Figure 19. Tirage aléatoire pour conserver les 50 individus qui seront analysés



Figure 20. Constitution des pools avec les moules lyophilisées broyées à l'aide d'un mortier en agate

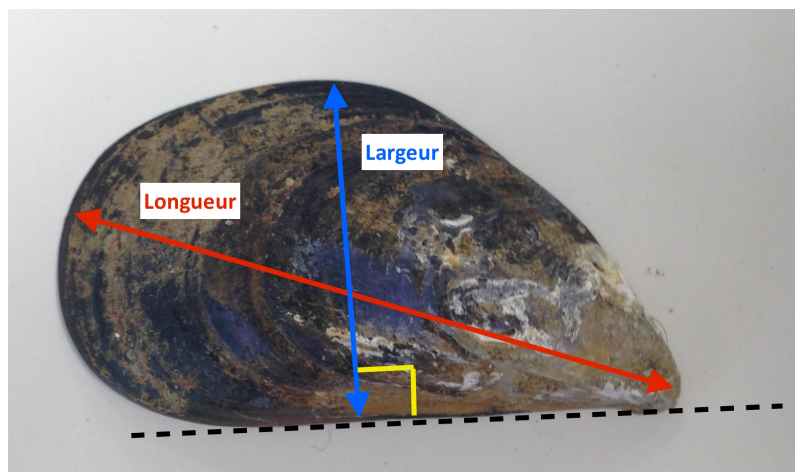


Figure 21. Méthode de mesure des coquilles de moules

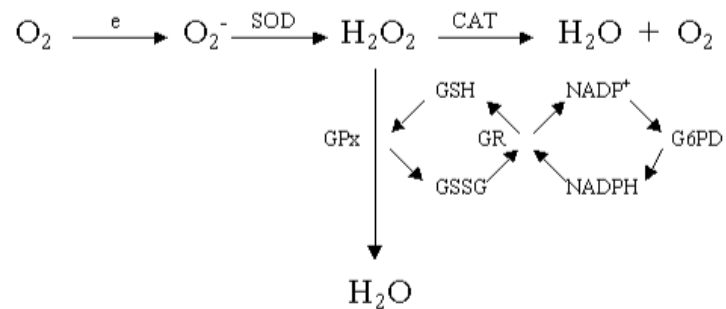


Figure 22. Schéma du fonctionnement des protéines impliquées dans la réponse au stress oxydant cytoplasmique. Gonzalez P.®

obtenus. Pour un tirage aléatoire des individus, deux bacs identiques sont placés l'un contre l'autre, puis on verse l'ensemble des moules du quadrat sur la tranche de manière à diviser leur nombre par deux aléatoirement jusqu'à obtenir 50 individus (cf. [Figure 19](#)). Ils seront ensuite disséqués, de manière à séparer le corps mou des coquilles. Les corps mous passent ensuite au lyophilisateur et les coquilles à l'étuve durant 3 jours. Les analyses réalisées sur les échantillons sont décrites dans la partie suivante. Enfin, tous les individus d'un même quadrat seront broyés au mortier en agate avec l'aide d'azote liquide afin de constituer des pools qui serviront pour des analyses complémentaires (cf. [Figure 20](#)). L'azote liquide permet une congélation instantanée qui facilite le broyage.

1.5 Paramètres mesurés

1.5.1 Morphométrie

Pour chaque échantillon, la longueur et la largeur des coquilles sont mesurées (comme spécifié sur la [Figure 21](#)) à l'aide d'un pied à coulisse digital précis à 0,01 mm. Il est possible d'estimer la qualité marchande d'une moule à partir d'un indice de condition, cet indice retranscrit également un état de santé général du bivalve. L'indice de condition représente la place que la chair de la moule occupe dans la coquille. Il existe plusieurs indices, ils sont décrits dans une publication d'IFREMER [1]. Pour notre étude, nous utiliserons l'indice de Walne et Mann en suivant rigoureusement le protocole défini par IFREMER. L'indice de Walne et Mann (IC W&M) se calcule de la manière suivante :

$$\text{IC W\&M} = \frac{\text{Poids sec de chair}}{\text{Poids sec coquille}} \times 1000$$

Nous avons utilisé cet indice de condition, car grâce à celui-ci, on s'affranchit totalement de la perte d'eau intervalvaire, car les échantillons utilisés pour la mesure sont entièrement dépourvus d'eau. Le poids sec de chair est établi après un passage de quelques jours au lyophilisateur, le poids de coquille est mesuré après 2 jours à l'étuve à 60° C. Les pesées sont réalisées avec une balance de laboratoire précise à 0,1 mg. Plus l'indice de condition est élevé et plus les individus sont en bonne santé. Une fois toutes les données récoltées, des classes de tailles ont été réalisées pour faciliter l'exploitation statistique. En outre, pour chaque individu nous avons spécifié s'il y avait présence ou non de gonades matures.

1.5.2. Analyses transcriptomiques

1.5.2.1. Les gènes étudiés

Des échantillons de moules ont été préparés pour des analyse génétiques afin de vérifier si une réponse particulière apparaît au contact avec l'oxydant. Ces analyses concernent des individus collectés sur la digue et l'émissaire en février.

Sept gènes d'intérêt ont été ciblés pour l'étude génétique à partir des séquences disponibles dans la banque de données pour *Mytilus edulis*.

Pour chaque gène testé, une comparaison sera faite entre l'expression dans le milieu témoin (digue) et le milieu soumis au DEX135 (émissaire).

Tout d'abord, deux gènes impliqués dans la réponse au stress oxydant cytoplasmique sont étudiés, il s'agit de la superoxyde dismutase cytoplasmique (*sodCu/Zn*) et de la catalase (*cat*). Le fonctionnement des protéines produites est présenté dans les schémas (cf. [Figure 22](#)).

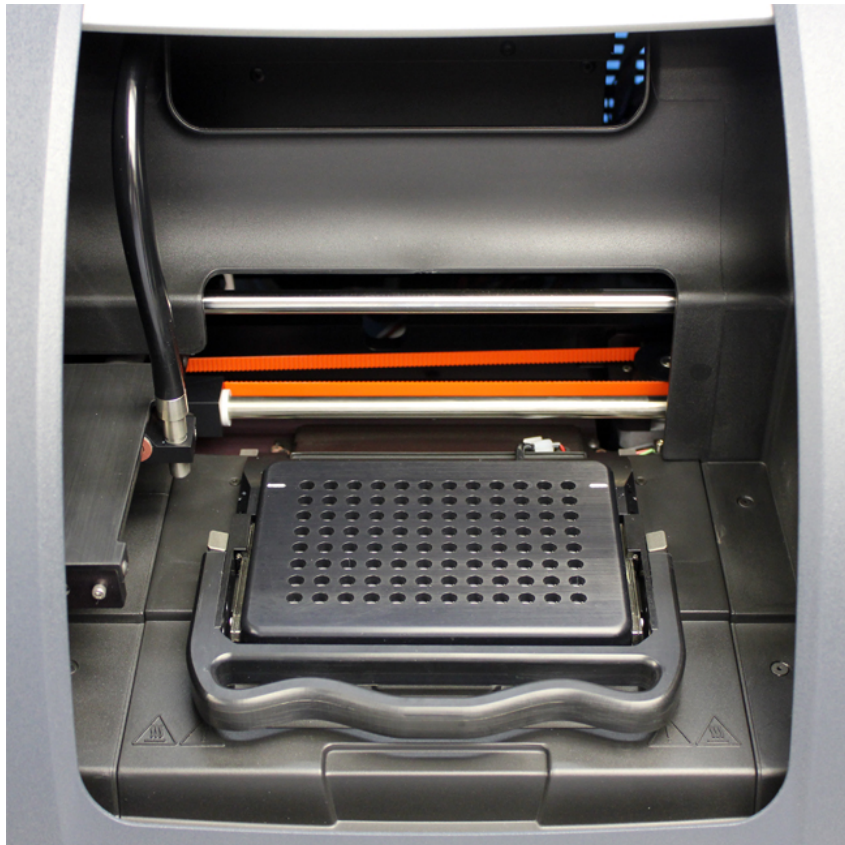


Figure 23. Photographie des plaques utilisées pour la PCR dans le thermocycleur MX3000P. Promega®

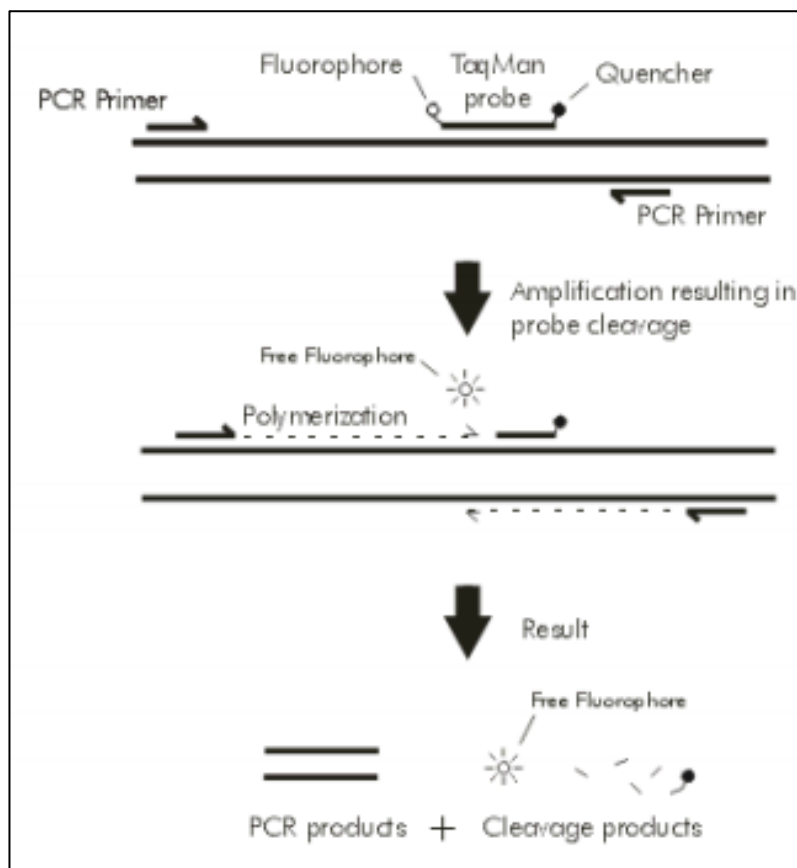


Figure 24. Schémas illustrant le principe de la PCR quantitative en temps réel. Promega®

Par la suite, des gènes impliqués dans le métabolisme mitochondrial sont analysés. En effet, les espèces réactives de l'oxygène ainsi que les xénobiotiques agissent dans les mitochondries, principalement en perturbant le transfert d'électrons de la chaîne respiratoire [12]. Pour étudier cet impact, le laboratoire s'est intéressé à l'expression de la sous-unité 1 de la cytochrome-c-oxydase (*cox1*). Le nombre de mitochondrie est aussi estimable par le biais d'une quantification de l'ARN ribosomique 12S (*12S*). Enfin l'expression d'un dernier gène a été étudiée. Il s'agit d'un gène de métallothionéine (*mt*) qui produit des protéines qui sont classiquement impliquées dans l'homéostasie des métaux essentiels et la détoxification des métaux toxiques. Des gènes de référence, dont l'expression est constante dans la cellule sont utilisés pour normaliser la quantité d'ARN entre échantillons. Il s'agit du gène de la protéine ribosomique L7 (*rpl7*) ainsi que le gène codant pour un facteur d'élongation (*ef1a*).

1.5.2.2. Méthodologie

La méthodologie est tirée du rapport envoyé par Patrice Gonzalez, membre du laboratoire du CNRS, Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux (EPOC).

- **Extraction des ARN totaux** : Utilisation du kit « SV Total RNA Isolation System » (Promega) à partir de 20 à 40 mg de tissu biologique en suivant les recommandations du fournisseur
- **Rétro-transcription** : Réalisée à l'aide du kit : « GoScript Reverse Transcription System » (Promega) à partir de 10 µL d'ARN totaux (environ 3 µg). 1 µL d'une solution d'oligo dT [1 µM], 1 µL d'une solution d'hexanucléotides [1 µM], 1 µL d'une solution de dNTP [10 mM], et 4 µL de tampon d'activité 5X sont ajoutés aux ARNs. L'échantillon est placé dans un thermocycleur (eppendorf mastercycler) pendant 5 min à 65°C pour linéariser les ARNs et permettre aux amorces de se fixer. Puis 1 µL de reverse-transcriptase [1U/µL], 1,5 µL de MgCl₂ [25 mM] et 0,5 µL de RNase-block [0,5 U] sont ajoutés. L'échantillon est alors placé au thermocycleur pendant 1 heure à 42°C. Les ADNc ainsi obtenus sont utilisés comme matrice lors des réactions de PCR quantitative en temps réel, ils sont conservés à -20°C en attente d'analyse.
- **PCR quantitative en temps réel** : Permet d'analyser l'expression différentielle des gènes dans un MX3000P (Stratagène). Elle a été réalisée grâce au kit « GoTaq® QPCR Master Mix » (Promega). Des amorces, spécifiques à chaque gène étudié, ont été préalablement déterminées à l'aide du logiciel Lightcycler probe design et synthétisées à façon par Sigma Oligo. Chaque réaction de PCR, réalisée dans des plaques de 96 puits (cf. Figure 23) comprend : 17 µL de mix réactif (10 µL de Tp 2x (Syber green, Taq polymérase, dNTP, MgCl₂), et 7 µL H₂O), 2 µL d'un mélange d'amorces sens et anti-sens spécifiques de chaque gène (2 µM final chacune) et 1 µL d'ADNc de l'échantillon correspondant (cf. Figure 24). La qualité des produits d'amplification est vérifiée en fin de réaction par l'analyse des courbes de fusion thermique. Le niveau d'expression de chaque gène est déterminé par rapport à celui de la moyenne des deux gènes de référence (*rpl7* et *ef1a*-actine). L'expression différentielle (ΔCt) entre les gènes de référence et le gène d'intérêt est calculée selon la méthode décrite par Livak et al. [8]

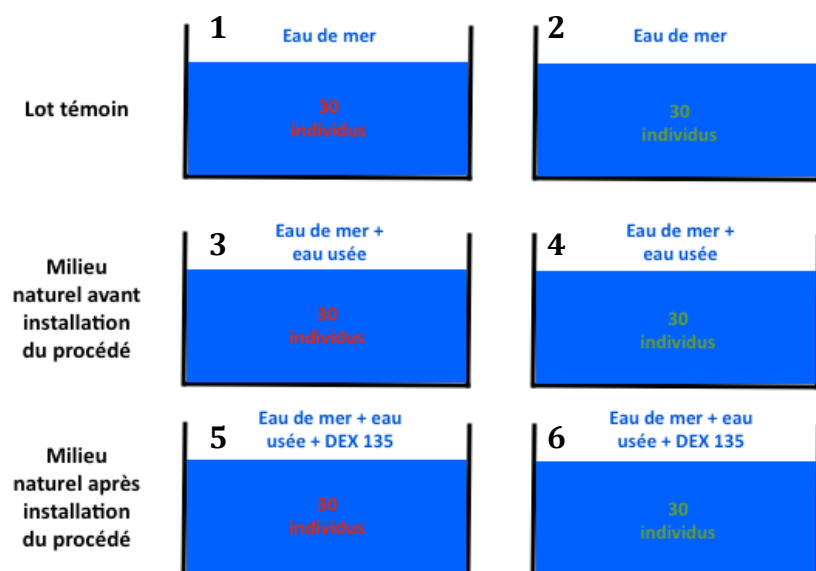


Figure 25. Schéma récapitulatif des milieux utilisés pour l'expérience



Figure 26. Photographie d'une cage à moule utilisée pour l'étude expérimentale

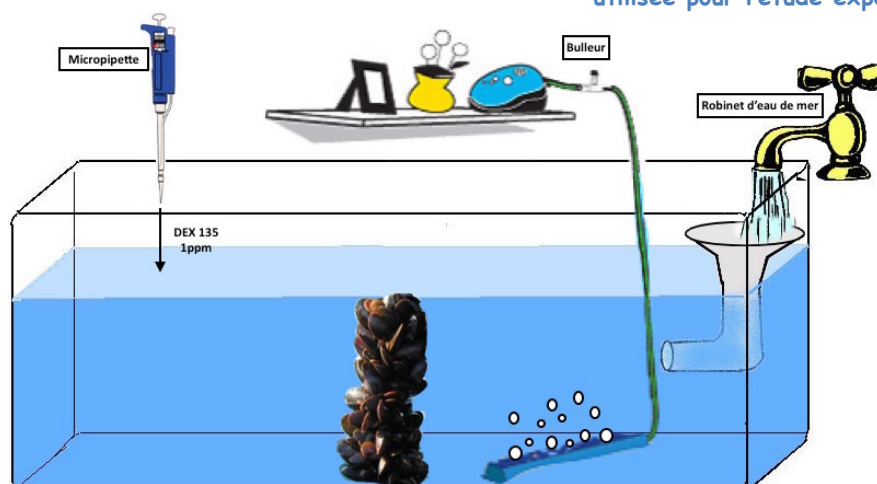


Figure 27. Schéma du montage réalisé pour l'expérimentation en laboratoire

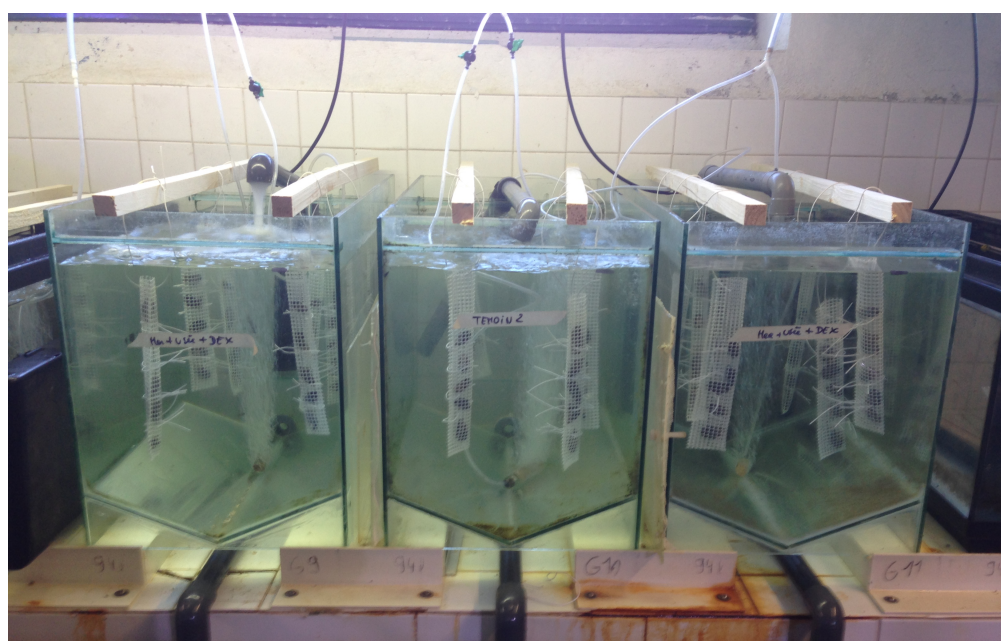


Figure 28. Photographie du montage de 3 des 6 aquariums utilisés pour l'étude expérimentale au musée de la mer de Biarritz.

2. Expérimentation en laboratoire

L'un des objectifs de mon stage est d'établir le protocole d'une manipulation qui sera réalisée en laboratoire. Le but de cette expérimentation est d'étudier l'impact du DEX135 sur les individus. Plusieurs facteurs environnementaux diffèrent entre les deux lots testés par l'intermédiaire de l'étude *in situ*. La mise en place de l'expérience en laboratoire permet de fixer toutes les constantes environnementales et de faire varier uniquement l'exposition des individus au DEX135.

Mon principal outil pour cette réalisation est la bibliographie, je me suis basé sur de nombreuses publications pour mener à bien mon objectif. De plus, un compromis doit être trouvé en tenant compte de l'aspect financier du projet.

2.1 Protocole expérimental (Figure 28)

Pour cette expérimentation, nous avons eu accès aux locaux du musée de la mer de Biarritz, car ils disposent de robinets d'eau de mer, cela nous a permis de renouveler l'eau régulièrement.

Durant l'étude, 3 milieux de vie ont été testés, le premier milieu est le « Témoin », il est composé à 100% d'eau de mer. Le second milieu représente l'habitat de la sortie de station d'épuration avant l'installation du procédé (90% eau de mer et 10% eau usée)¹. Enfin le dernier milieu correspond à l'habitat des individus prélevés sur l'émissaire lors des campagnes d'échantillonnage, il est composé d'eau de mer (90%) et d'eau usée (10%). Cependant des injections de DEX135 ont été versées dans le milieu de culture. Pour chaque milieu, des répliquats ont été mis en place pour assurer la fiabilité des résultats obtenus. Au total, la manipulation comprend donc 6 aquariums de 50 Litres.

Les individus utilisés pour l'expérience sont prélevés dans leur milieu naturel, ils sont échantillonnés au niveau du port des pêcheurs, ainsi on s'assure qu'ils n'ont jamais été impactés par le produit à tester. Les moules prélevées sont calibrées, de taille standard 3 cm, on en place 30 par aquarium (cf. Figure 25).

Les organismes sont placés de façon verticale dans la colonne d'eau, de cette manière, l'accès aux ressources disponibles est identique pour tous les individus. J'ai moi-même confectionné un habitacle permettant de stocker les individus par rangées de 5 pour les disposer dans les aquariums (cf. Figure 26). Cela permet une bonne évacuation des fèces et le prélèvement des individus à analyser se fait en soutirant une rangée à chaque fois. L'eau de mer utilisée est prélevée au pied du musée de la mer dans l'océan, elle est renouvelée quotidiennement permettant ainsi un apport régulier en microalgues, nourriture essentielle des bivalves. L'eau usée utilisée est récupérée dans un regard de sortie de STEP en amont du point d'injection du DEX. Un bulleur est placé dans chaque aquarium pour garantir une bonne oxygénation de l'eau. (cf. Figure 27)

L'expérience comprend une période d'acclimatation de 3 jours pour chaque lot de moules testées. Durant cette période, le produit n'est pas encore injecté dans le lot 3. Les injections de DEX135 débutent à partir du 4^{ème} jour de l'étude au niveau du lot 3. L'idéal pour représenter les conditions réelles d'utilisation du DEX135 dans l'effluent, serait d'injecter le produit à la concentration voulue de manière continue. Or, le produit est impossible à synthétiser en petite quantité en continu, les injections sont donc réalisées de manière ponctuelle, quotidiennement, pendant 7 jours. Les concentrations utilisées sont sensiblement les mêmes que celles utilisées dans la conduite de sortie de STEP (1 ppm). Les injections sont effectuées avec du produit brut prélevé au niveau de la station d'épuration, car il est plus stable que celui synthétisé en laboratoire à partir du protocole Kemira [C].

¹ Ce pourcentage résulte d'un calcul effectué sur de l'eau prélevé à la sortie de l'émissaire.

Jour d'expérience	Lot 1		Lot 2		Lot 3	
	Aquarium 1	Aquarium 2	Aquarium 3	Aquarium 4	Aquarium 5	Aquarium 6
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3 (T0)	5+5	5+5	5+5	5+5	5+5	5+5
4 (T1)	5	5	5	5	5	5
5 (T2)	-	-	-	-	-	-
6 (T3)	-	-	-	-	-	-
7 (T4)	5	5	5	5	5	5
8 (T5)	-	-	-	-	-	-
9 (T6)	-	-	-	-	-	-
10 (T7)	5+5	5+5	5+5	5+5	5+5	5+5

Légende :

Tableau 2. Tableau récapitulatif des individus prélevés pour les analyses

	Période d'acclimatation
	Injection de DEX135
5	Nombre d'individus prélevés pour la génétique
5	Nombre d'individus prélevés pour l'indice de condition

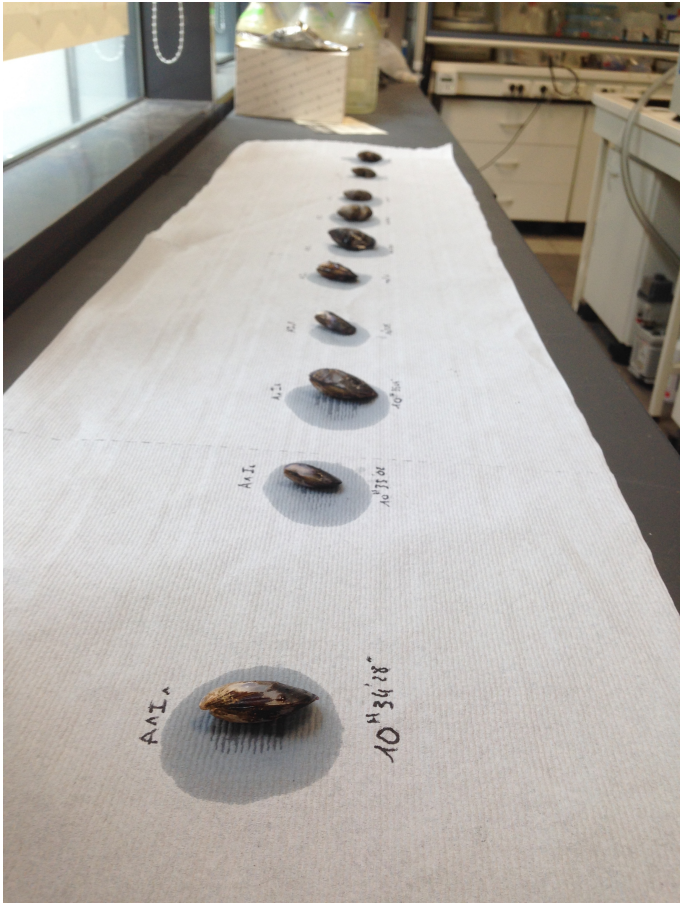


Figure 29. Photo de la manipulation permettant de mesurer l'indice de condition suivie à l'air libre

2.2 Traitement des individus (cf. Tableau 2)

Deux types d'étude ont été menés sur les échantillons, une analyse transcriptomique ainsi qu'une étude d'un indice de condition.

La préparation à l'analyse génétique est la même que décrite précédemment (cf. 1.4 Traitement des individus) à part que dans cette manipulation seule les glandes digestives seront conservées.

Dans chaque aquarium 5 individus sont prélevés [4]:

- Après la période d'acclimatation à T0
- Après le 1^{er} jour d'injection à T1
- Après 4 jours d'injection à T4
- Après 7 jours d'injection (à la fin de la manipulation) T7

Tous les échantillons ont été conservés à -80°C avant d'être envoyés en toute fin d'expérimentation à Patrice Gonzalez. Pour l'étude de l'indice de condition, 5 individus ont été prélevés à T0 et 5 autres à T7 dans chaque aquarium.

L'étude de l'indice de condition nécessite d'avoir des organismes vivants, les expériences ont donc été réalisées instantanément après la sortie de l'eau.

2.3 Paramètres mesurés

2.3.1 Analyses transcriptomiques

Les gènes analysés sont les mêmes que dans l'expérience *in situ* (cf. 1.5.2.1 Les gènes étudiés).

2.3.2. Indice de condition

L'étude de l'indice de condition permet de connaître l'état de santé général des bivalves et permet de mettre en exergue l'évolution de la « forme » des individus.

L'expérience dure 10 jours, dans un laps de temps aussi court, il est impossible de déceler une modification de l'indice de Walne & Mann décrit précédemment. Nous avons donc étudié le temps de survie à l'air libre de chaque individu [2]. Pour la mesure de celui-ci, il faut placer tous les individus à tester à plat sur une table dans les mêmes conditions (cf. Figure 29). On note l'heure précise de sortie de l'eau. Tant qu'ils sont en vie, les bivalves restent fermés. Il est possible qu'ils relâchent leurs muscles et s'ouvrent, dans ce cas il faut tapoter sur la coquille. Si après tapotage la moule se referme c'est qu'elle est toujours vivante. Si elle reste ouverte, on considère qu'elle est morte. On note ainsi pour chaque organisme l'heure de la mort et on compare le temps de survie à l'air libre des individus en fonction du milieu dans lequel ils ont été testés entre T0 et T7.

3. Traitement statistique des données

Le traitement des données a pris une part importante de mon stage, je me suis en effet occupé de toute la modélisation des données récoltées. J'ai rédigé un rapport conciliant l'intégralité des informations de l'étude morphométrique pour permettre à M. Pigot de présenter les premiers résultats de l'étude aux réunions avec la municipalité (Annexe 2). Pour les illustrations à l'aide de diagrammes en barres et en secteurs, je me suis servi de l'extension du pack Office, EXCEL. Toutes les analyses univariées et multivariées ont, quant à elles, été réalisées grâce au logiciel R et du package Rcommander.

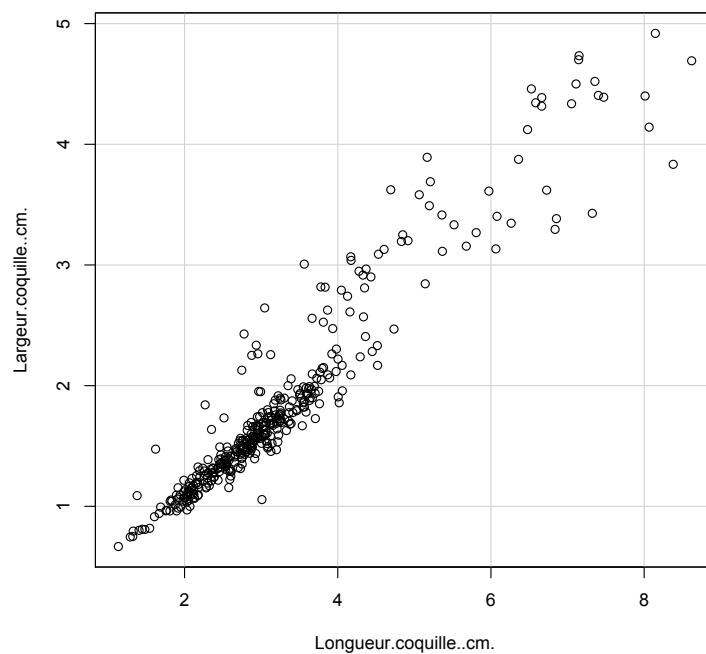


Figure 30. Nuage de point représentant la largeur en fonction de la longueur des individus collectés.

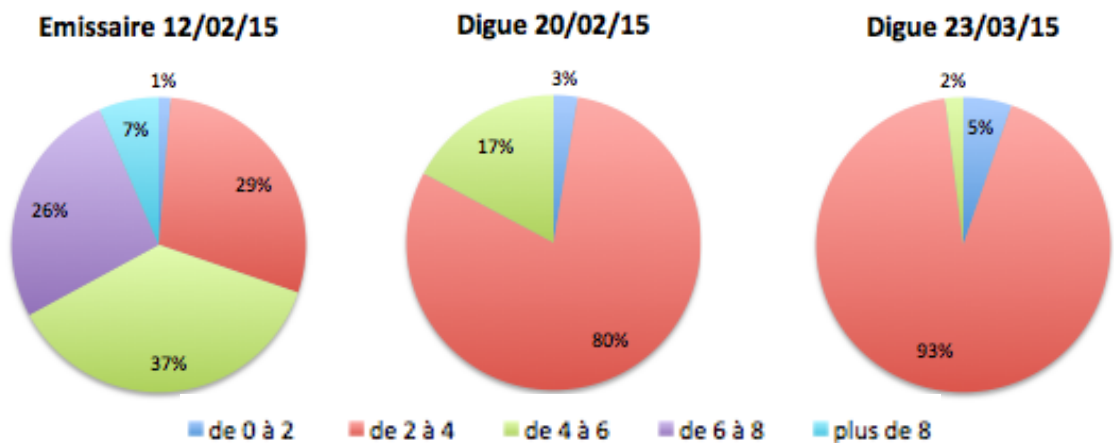


Figure 31. Diagrammes en secteurs illustrant la proportion des classes de tailles mesurées pour chaque campagne d'échantillonnage.

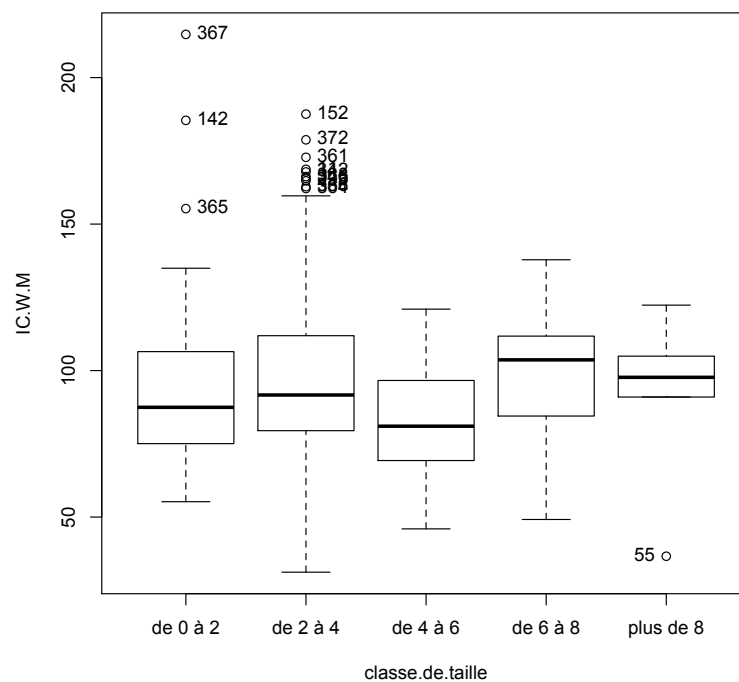


Figure 32. Boxplot illustrant la dispersion de l'indice de condition en fonction de la classe de taille des individus étudiés.

Résultats

J'ai eu la chance de pouvoir mettre en pratique l'expérimentation en laboratoire durant la dernière semaine de mon stage. Je n'ai cependant pas pu exploiter les résultats des différentes mesures relevées car je ne dispose pas encore de ces derniers.

Dans cette partie, les résultats de l'étude *in situ* sont présentés ainsi que leur modélisation.

1. Paramètres morphologiques

Toutes les mesures des paramètres morphologiques sont présentées dans l'Annexe 1

Plusieurs aspects peuvent être abordés au vu des résultats de l'analyse morphométrique. L'objectif principal est de vérifier si les individus en contact permanent avec le DEX135 sont impactés au point de modifier leur indice de condition.

En relevant les mesures de longueur et largeur de coquille, nous nous sommes aperçus que les individus étaient de longueur variable entre 1 et 8 cm. La longueur des individus est en corrélation directe avec la largeur (ρ de Pearson = 0,94) (cf. Figure 30), c'est pourquoi nous nous sommes permis de classer les individus par classe de taille en tenant compte de la longueur des coquilles. Il est aussi démontré que les classes de taille peuvent donner une indication sur les classes d'âge [6].

1.1 Les Classes de tailles

Dans un premier temps, nous allons nous intéresser à la répartition des classes de tailles à chaque date de prélèvement. En regardant les diagrammes en secteurs (cf. Figure 31), on s'aperçoit que la répartition des classes de taille diffère d'un échantillonnage à l'autre. Une différence notable apparaît entre les individus de l'émissaire et de la digue. En effet, au niveau du diffuseur, la longueur moyenne des individus est de 5,1 cm alors que sur la digue celle-ci est de 2,6 cm pour le prélèvement de février et de 2,9 cm pour le prélèvement de mars. Par surcroît, les deux classes de taille regroupant les individus les plus grands sont exclusivement représentées du côté de l'émissaire.

Plusieurs facteurs environnementaux sont susceptibles d'expliquer cette différence fondamentale. D'une part, les moules sont des organismes filtreurs microphages, elles se nourrissent de particules en suspension. Il se trouve que l'eau de sortie de STEP est riche en matière organique en suspension, l'apport nutritionnel est supérieur sur l'émissaire cela pourrait être la raison pour laquelle les individus sont plus gros. D'autre part, les moules présentes sur la digue subissent le balancement des marées et sont régulièrement exposées à la violence des vagues qui déferlent sur les rochers où elles se fixent. Les plus gros individus sont plus exposés à l'afflux des vagues, ils sont donc probablement arrachés lors des tempêtes.

La répartition dans les classes de taille des individus prélevés sur la digue en février et en mars est relativement semblable.

Pour fournir une réponse la plus complète possible dans l'étude de l'indice de condition, nous avons cherché à vérifier s'il y avait un lien entre la valeur de l'indice de condition et la taille des individus. A l'appréciation du boxplot (cf. Figure 32), on remarque que la répartition semble différente en ce qui concerne l'indice de condition entre certaines classes de tailles. Ceci est vérifiable grâce à l'utilisation de tests statistiques.

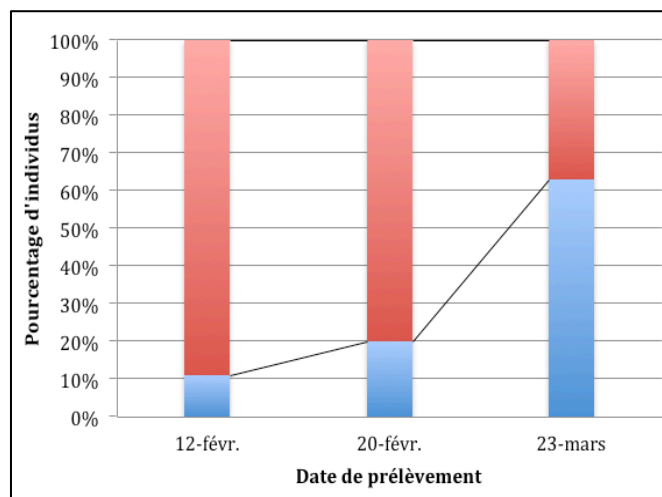


Figure 33. Proportion d'individus capturés avec des gonades immatures (rouge) et avec des gonades matures (bleu) en fonction de la date d'échantillonnage

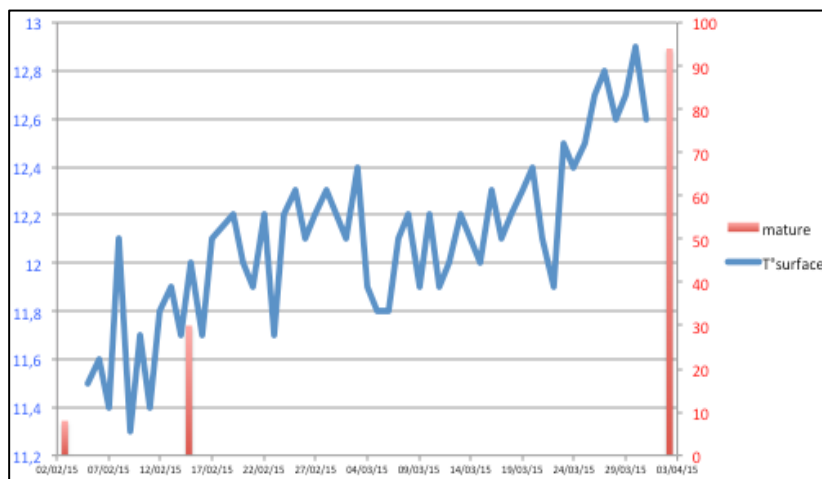


Figure 34. Graphique illustrant le pourcentage d'individus matures échantillonné mis en relation avec la température de surface

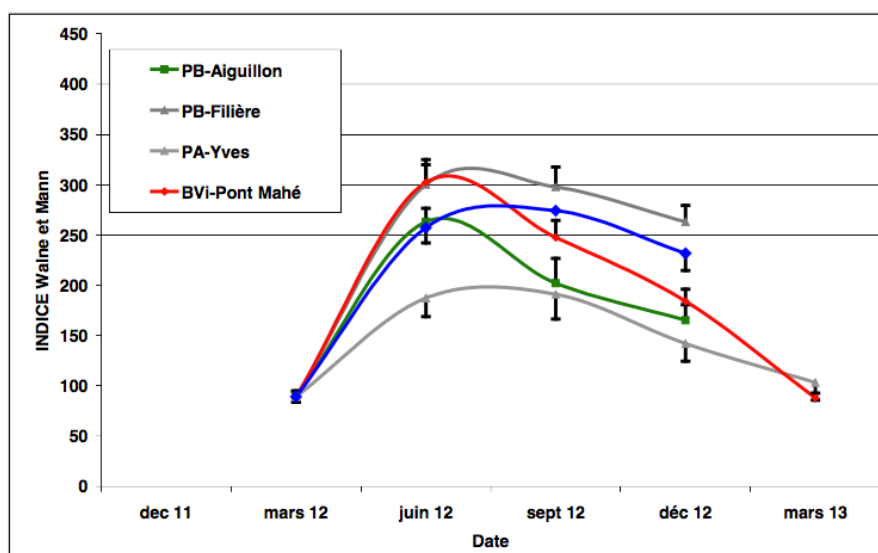


Figure 35. Évolution de l'indice de Walne et Mann de la moule bleue (*Mytilus edulis*) sur quatre régions du littoral atlantique. Mytilobs®

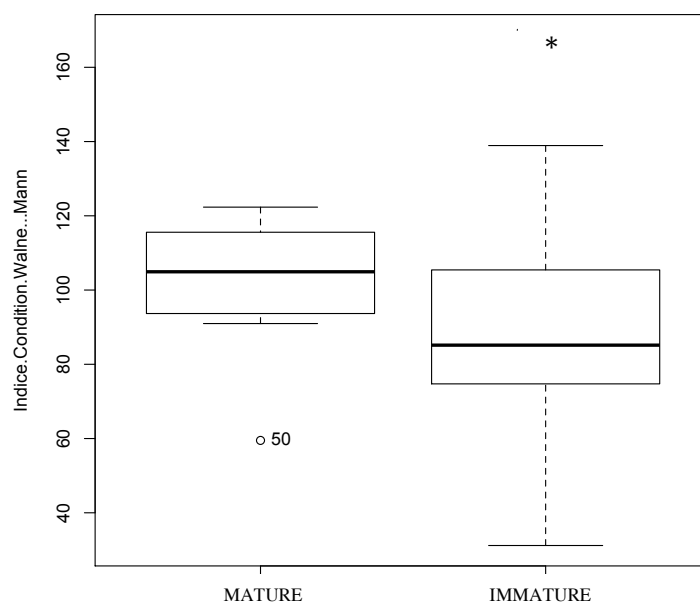


Figure 36. Boite de dispersion de l'indice de Walne & Mann en fonction de la présence ou non de gonades matures pour tous les individus collectés. * indique la significativité pour $\alpha = 0,05$

Pour l'analyse de la variable ID W&M par rapport aux 5 sous-ensembles de la variable qualitative « classe de taille » on utilise le test de comparaison de moyenne de Kruskal et Walis. Pour ce faire on commence par établir 2 hypothèses de travail :

H0 : Les moyennes d'indice de condition sont égales entre les individus de classe de taille différente.

H1 : Les moyennes d'indice de condition sont égales entre les individus de classe de taille différente.

On obtient un p-value de $2.678e-16 < 0,05$. P-valeur $< \alpha$. On ne peut donc pas accepter H0 au seuil 5 %. Les moyennes d'indice de condition sur l'ensemble des échantillons sont différentes entre les différentes classes de taille.

En revanche, aucune corrélation n'est observée entre la valeur de l'IC W&M et la longueur des individus ($\rho = -0,35$ avec test de Spearman).

Il n'y a donc pas de lien net entre la valeur de l'indice de condition et la taille des individus.

Les classes de tailles ont de fortes chances de regrouper des individus du même âge. Donc, tous les individus d'une même classe de taille ont en théorie un temps d'exposition au produit équivalent. La classe de taille la plus représentée sur l'ensemble des échantillons est celle de 2 à 4. Pour l'analyse finale nous utiliserons donc tous les individus appartenant à la classe de taille 2 à 4.

1.2 Les gonades

Lors de la dissection des individus, nous avons prêté attention à la présence de gonades. Lorsque celles-ci sont matures, elles ont un aspect granuleux facilement identifiable. Il y a possibilité d'établir le stade de développement des gonades sur une échelle de 1 à 5. Nous ne disposons cependant pas du matériel nécessaire à cette analyse, nous avons donc uniquement spécifié de manière qualitative la présence ou non de gonades matures.

Les échantillonnages ont eu lieu à quelques semaines d'intervalle. Ainsi la proportion d'individus matures a augmenté en avançant dans la saison (cf. [Figure 33](#)). J'ai mis en relation cette maturation progressive des individus avec l'augmentation de la température de l'eau (cf. [Figure 34](#)), les données utilisées proviennent d'une bouée placée au large de Bayonne. Il est prouvé que la saisonnalité influe sur l'indice de condition de Walne et Mann [11] (cf. [Figure 35](#)), principalement à cause de la maturation des gonades qui prennent de plus en plus de place dans la coquille [11]. Avant toute analyse subsidiaire, on a voulu vérifier si la présence de gonades matures influe réellement sur la valeur de l'ID W&M.

Comme le boxplot (cf. [Figure 36](#)) le laisse suggérer et avec l'appui des tests de comparaison de variances (Fisher) et de moyennes (Student) on déduit que les moyennes de l'indice de condition sont significativement différentes avec une p-valeur de $2.2e-16$ entre les individus pourvus de gonades matures et les immatures.

Pour la comparaison finale de l'indice de condition entre le milieu de référence et l'émissaire, il est indispensable de s'intéresser à des individus semblables en terme de maturation des gonades.

L'étude sera donc ciblée sur les moules immatures qui sont les plus représentées au niveau de l'émissaire (le milieu à tester).

En conservant uniquement les organismes immatures on s'affranchit de l'existence de différents stades de développement des gonades chez les individus matures.

Moyenne sur IC W&M	Lieu d'échantillonnage			
Classe de taille	digue 02	digue 03	émissaire	Total
de 0 à 2	89,0	158,8	80,9	95,7
de 2 à 4	85,0	109,6	88,5	97,5
de 4 à 6	67,7	72,8	89,8	84,1
de 6 à 8			97,2	97,2
plus de 8			90,5	90,5
Total	85,2	108,6	91,3	95,8

Tableau 3. Tableau des moyennes d'indice de condition en fonction du lieu de prélèvement et de la classe de taille.

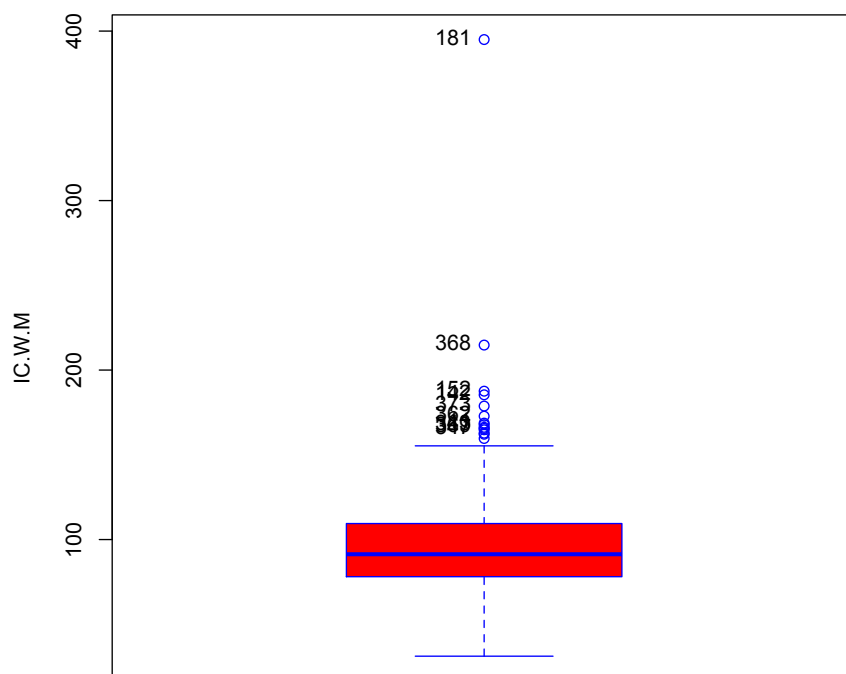


Figure 37. Boite de dispersion de l'indice de condition de Walne et Mann sur l'ensemble des individus échantillonnés

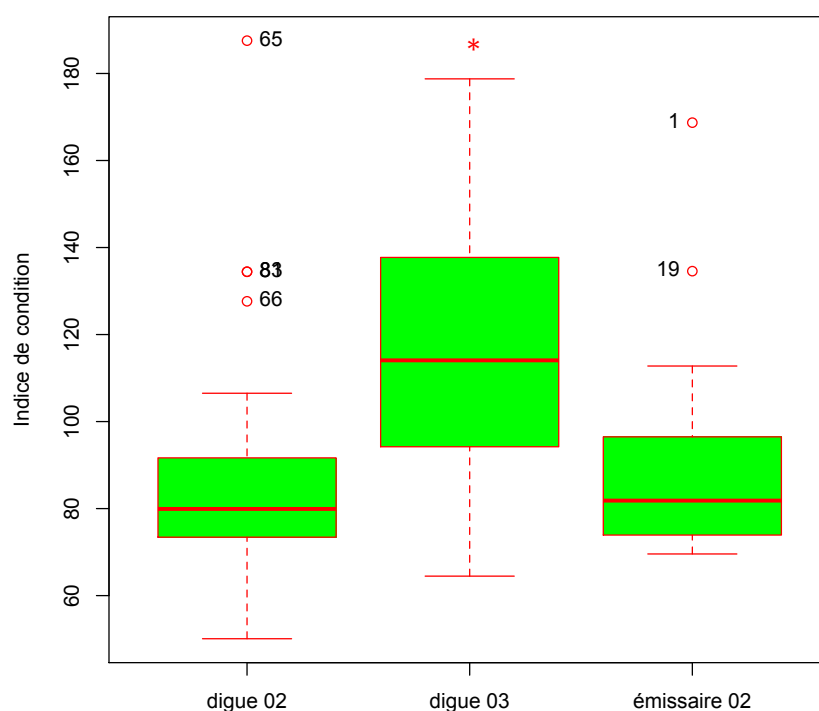


Figure 38. Répartition de l'indice de condition en fonction du lieu d'échantillonnage pour les individus immatures appartenant à la classe de taille 2 à 4. * indique la significativité pour $\alpha = 0,05$

1.4. Indice de condition

En premier lieu, dans la publication de l'IFREMER [1], il est indiqué que la valeur moyenne de l'indice de condition du littoral français est de 182. Dans notre étude, les indices mesurés sont nettement inférieurs. Cela s'explique du fait que cet indice est usuellement utilisé comme gage de bonne qualité pour commercialiser les moules d'élevage. Ces moules disposent de conditions optimales à leur développement alors que dans le cas de notre étude l'environnement exerce une forte pression sur les individus.

Le [Tableau 3](#) illustre les moyennes de l'indice de condition de tous les individus étudiés en fonction du lieu de prélèvement ainsi que de la classe de taille. En Annexe 3, un tableau résume les effectifs de chaque case du tableau 3. Les moyennes de 158,8 et 67,7 ne sont pas représentatives, elles ont été réalisées sur un panel d'individus inférieur à 5. Si on s'intéresse à la moyenne de l'indice de condition de la colonne totale des classes de tailles, on remarque que les moyennes sont comparables, seule la classe 4 à 6 a une moyenne inférieure aux autres.

En revanche, lorsque l'on regarde les moyennes de l'indice de condition en fonction du lieu de prélèvement, on remarque une légère différence entre l'échantillon de la digue de février et l'émissaire. Néanmoins ils restent comparables. Les individus prélevés sur la digue en mars ont une moyenne d'indice de condition nettement supérieure. La proportion d'individus matures est nettement plus importante dans ce dernier prélèvement, c'est essentiellement ce qui explique cette différence remarquable.

En observant la boîte de dispersion de l'indice de condition dans tous les échantillons (cf. [Figure 37](#)), on remarque de nombreuses valeurs atypiques représentées par des points présents au-dessus du boxplot. Certaines de ces valeurs correspondent à la réalité, elles illustrent les individus ayant un indice de condition extrême. En revanche, d'autres sont appelées valeurs aberrantes. Dans notre cas, l'individu 181 dispose d'un indice de condition de 395. Cette valeur est erronée, elle ne représente pas la réalité. Cette valeur aberrante a probablement été obtenue à cause d'une erreur de mesures sur la balance ou bien une erreur de retranscription dans le logiciel de calcul. Il est important de remarquer ce type de valeur pour les écarter au moment des analyses, car elles sont susceptibles de biaiser l'intégralité des résultats.

Toutes les analyses effectuées précédemment nous permettent de définir les individus que l'on peut comparer, sans crainte d'induire une mauvaise interprétation.

On va maintenant s'intéresser à la dispersion des valeurs de l'indice de condition en fonction du point d'échantillonnage pour les individus immatures appartenant à la classe de taille 2 à 4 cm. On remarque aisément que les valeurs de l'indice de condition des individus prélevées en mars sont significativement supérieures aux échantillons de février (cf. [Figure 38](#)). En mars, la prolifération du phytoplancton est fulgurante. Or, les moules se nourrissent essentiellement de ces micro-organismes. Au mois de mars, les individus sont mieux nourris donc leur indice de condition augmente.

Afin que l'analyse de l'indice de condition reste représentative, elle doit être effectuée en comparant les moyennes des individus d'une même classe de taille (2 à 4), prélevés au même moment (février) et ayant un stade de développement gamétique similaire (immature).

Dès lors, en observant les boîtes à moustaches il semble que les moyennes d'indice de condition du prélèvement de la digue et de celui de l'émissaire sont égales.

ID	Cat	SodCu	Coxl	12S	Mt	Localisation
T1B1	0,00105029	0,0152505	108,75968	11,274566	0,02673734	Emissaire
T1B2	0,00123319	0,01407436	97,2515927	5,24367585	0,01015712	Emissaire
T1B3	0,00063984	0,02005353	92,4114685	2,29739671	0,00491021	Emissaire
T1B4	0,00114932	0,01163811	49,694008	1,93857963	0,00400218	Emissaire
T1B5	0,00209331	0,0093553	138,141214	5,46416103	0,00497875	Emissaire
T2B1	0,00417213	0,0157883	52,8928204	3,06311599	0,0119653	Digue
T2B2	0,00197327	0,01097223	63,5579197	4,28709385	0,03039547	Digue
T2B3	0,00176637	0,01493665	45,0982642	1,83400809	0,0042598	Digue
T2B4	0,00087102	0,01764007	31,0172741	1,25266444	0,00155918	Digue
T2B5	0,00108356	0,01832555	9,18958684	1,8790455	0,01937043	Digue

Tableau 4. Résultats des analyses d'expression différentielle des gènes étudiés sur 5 échantillons de tissus branchiaux

ID	Cat	SodCu	Coxl	12S	Mt	Localisation
T1B1	0,00071489	0,00797666	179,768944	36,2522843	0,09214183	Emissaire
T1B2	0,00109395	0,01257593	336,468841	17,6457703	0,02987196	Emissaire
T1B3	0,00071489	0,01225913	526,394279	18,7653592	0,01757904	Emissaire
T1B4	0,00059906	0,00789415	122,361001	2,70382167	0,00229865	Emissaire
T1B5	0,00234695	0,0221738	517,351141	12,8616159	0,00746832	Emissaire
T2B1	0,00275258	0,01984611	108,008422	3,64267933	0,00711461	Digue
T2B2	0,00106789	0,00978644	25,3690924	1,18509277	0,02966694	Digue
T2B3	0,00032103	0,00619363	114,16685	2,66659735	0,00164808	Digue
T2B4	0,0002644	0,00668434	60,3382103	1,30585979	0,0012577	Digue
T2B5	0,00093354	0,01006158	7,43843954	4,64281566	0,14711334	Digue

Tableau 5. Résultats des analyses d'expression différentielle des gènes étudiés sur 5 échantillons de tissus viscéraux

	Moyenne émissaire	Moyenne digue	Organe étudié
Cat	0,0012	0,002	Branchies
SodCu	0,014	0,016	Branchies
Coxl	97,25	40,35	Branchies
12S	5,24	2,46	Branchies
Mt	0,01	0,014	Branchies
Cat	0,0011	0,0011	Viscères
SodCu	0,013	0,011	Viscères
Cox1	336,47	63,06	Viscères
12S	17,65	2,69	Viscères
Mt	0,03	0,037	Viscères

Tableau 6. Moyenne de l'expression différentielle des gènes étudiés en fonction du lieu de vie et des tissus étudiés pour les 10 individus analysés

	Facteur Viscère/Branchies Émissaire	Facteur Viscères/Branchies Digue
Cat	0,92	0,55
SodCu	0,93	0,69
Coxl	3,46	1,56
12S	3,37	1,09
Mt	3,00	2,64

Tableau 7. Présentation des facteurs entre l'expression mesurée dans les branchies et dans les glandes digestives.

Pour confirmer cette analyse nous avons utilisé le test de comparaison de moyenne non paramétrique de Wilcoxon Mann & Witney. On obtient une p-value de 0,2876 ; elle est supérieure à 0,05, donc on ne peut pas rejeter l'hypothèse nulle au risque 5 %.

La moyenne de l'indice de condition est égale entre les individus de la digue et de l'émissaire.

Ce qui ressort de cette étude détaillée est que l'analyse de l'indice de condition entre les individus exposés et non-exposés à l'oxydant bactéricide ne permet pas de mettre en évidence un impact quelconque du produit sur les bivalves.

2. Analyse transcriptomique

Les analyses génétiques ont été réalisées pour des échantillons de tissus branchiaux et viscéraux.

Ainsi, pour chaque individu, il est possible de comparer l'expression des gènes concernés entre ces deux types de tissus. Il est aussi possible de réaliser une comparaison intra-groupe qui rend compte de la variabilité entre les individus au sein d'un même espace de vie.

Le réel intérêt de cette étude est de comparer l'expression des gènes cytoplasmiques et mitochondriaux des individus résidant sur la digue et sur l'émissaire de la STEP.

En ce qui concerne ces analyses, nous ne disposons pas d'assez de données pour les comparer à l'aide de logiciels statistiques. La significativité des résultats a donc été évaluée en établissant des facteurs entre les moyennes de l'expression différentielle des individus provenant des deux milieux.

Il faut savoir qu'un facteur minimum de 2 pour une induction ou inférieur à 0,5 pour une répression doit être atteint pour ne pas prendre en compte les variations physiologiques des niveaux d'expression.

Les résultats de l'expression différentielle dans les branchies sont présentés dans le [tableau 4](#). L'expression des gènes dans les glandes digestives est quant à elle présentée dans le [tableau 5](#).

Le [tableau 6](#) expose les moyennes d'expression de chaque gène analysé sur les individus de la digue et de l'émissaire.

2.1. Comparaison en fonction du type de tissu

En s'intéressant tout d'abord à l'expression des gènes dans les différents tissus, on remarque qu'elle est sensiblement la même pour les gènes *Cat* et *SodCu* dans les branchies et les glandes digestives quel que soit le lieu de vie des individus (cf. [Tableau 7](#)). Les gènes impliqués dans le métabolisme mitochondrial sont significativement exprimés en plus grande quantité au niveau des glandes digestives des individus de l'émissaire.

L'ARN 12S est un des deux ARN ribosomiques codés par le génome mitochondrial, il entre dans la constitution des mitoribosomes. [13]

La surexpression de l'ARN 12S peut être le résultat de deux processus différents :

Entre deux tissus distincts, le niveau d'expression par mitochondrie peut être le même. En revanche, il est possible que dans l'un des tissus le nombre de mitochondries soit plus élevé. Cela aboutit donc à une expression plus importante d'ARN ribosomique 12S.

	Facteur Émissaire/Digue Branchies	Facteur Émissaire/Digue Glandes digestives
Cat	0,6	1
SodCu	0,9	1,2
CoxI	2,4	5,3
12S	2,1	6,6
Mt	0,7	0,8

Tableau 8. Présentation des ratios d'expression des gènes entre la digue et l'émissaire pour des cellules de deux tissus différents.

OXIDATIVE PHOSPHORYLATION

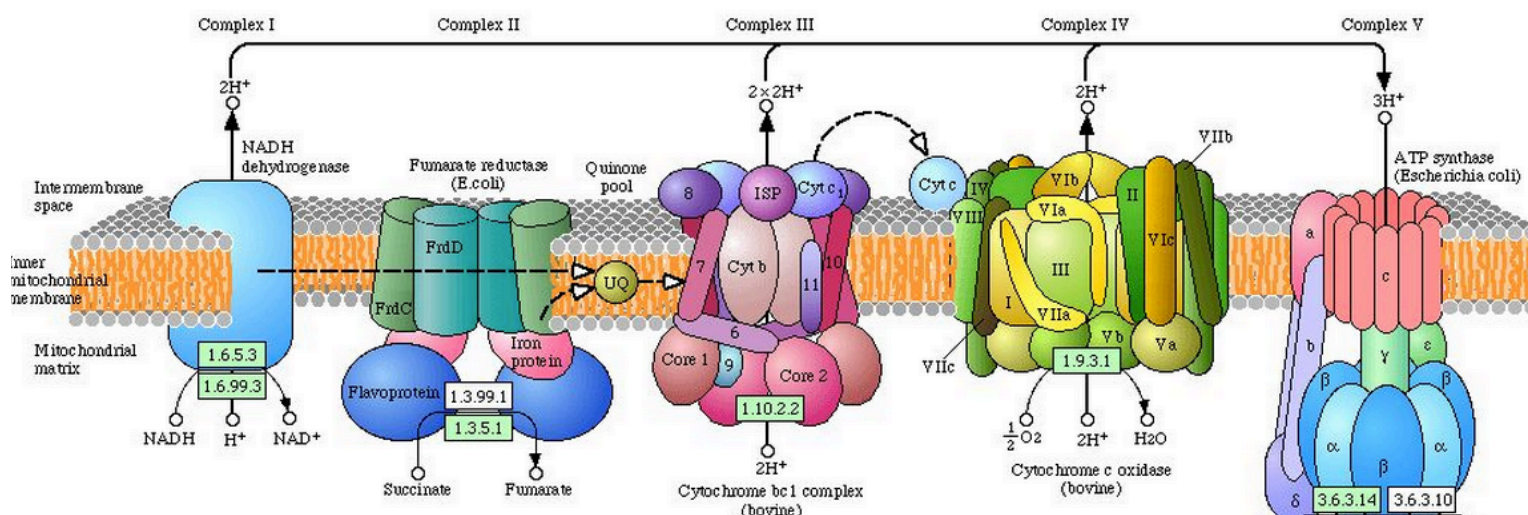


Figure 39. Schéma représentant la chaîne respiratoire de transport d'électron située sur la membrane interne des mitochondries. Chateigner A.®

Dans un autre cas de figure, si le nombre de mitochondries entre les deux types de cellules est identique, il est possible que, dans un des compartiments, la vitesse et la quantité d'expression soient plus élevées.

Ces deux phénomènes sont observés en cas d'augmentation des besoins énergétiques ou à partir du moment où l'organisme subit un stress quelconque.

La surexpression de l'ARN 12S traduit donc une augmentation du nombre de ribosomes mitochondriaux. De cette manière, la quantité de protéines ribosomales produite par traduction d'ARN augmente. La plupart de ces protéines ont un rôle détoxifiant. Elles agissent notamment en favorisant l'élimination des xénobiotiques et des espèces réactives de l'oxygène (ERO).

Le gène *Cox1* fait partie de l'ADN mitochondrial et code pour une sous-unité de la cytochrome-c-oxydase. La cytochrome-c-oxydase est une protéine transmembranaire de la mitochondrie qui constitue le dernier complexe (complexe IV) de la chaîne de transport d'électrons (cf. [Figure 39](#)). Elle joue un rôle capital dans la chaîne respiratoire et la production d'énergie pour la cellule. La surexpression de cette protéine témoigne d'une augmentation des besoins énergétiques d'une cellule ou l'apparition d'un stress quelconque.

Les polluants tels que les xénobiotiques ou les ERO sont emmagasinés dans les glandes digestives après absorption. Ainsi le rôle de détoxification est assuré par la surexpression de l'ARN 12S ainsi que du gène *cox1* dans ces tissus viscéraux comparativement à l'expression dans les branchies.

Que ce soit dans les échantillons originaires de la digue ou de l'émissaire, on remarque une forte induction de l'expression de gènes de métallothionéine au niveau des glandes digestives comparativement aux tissus branchiaux. En effet, l'accumulation des métaux toxiques a lieu principalement dans l'organe de digestion. Ceci explique la nécessité de produire des protéines facilitant leur élimination.

2.2. [Comparaison inter-sites](#)

La comparaison inter-sites permet de constater si les gènes analysés sont plus ou moins exprimés en fonction de la localisation géographique des individus (cf. [Tableau 8](#)). Cette comparaison montre que les gènes *cat*, *sodCu* et *mt* sont exprimés de façon identique sur les deux sites au niveau des branchies et des glandes digestives.

Ceci nous indique que les organismes présents sur l'émissaire ne présentent pas une augmentation de leur défense contre le stress oxydant au niveau cytoplasmique, que ce soit dans les branchies ou dans les glandes digestives. La quantité d'espèces réactives de l'oxygène, susceptibles d'être produites par le DEX135, semble donc identique entre les deux milieux de vie. Il ne semble pas y avoir de réel stress oxydant induit par la désinfection tertiaire.

L'étude comparative des gènes de métallothionéine ne démontre pas de réelle différence entre les deux milieux. Il ne semble donc pas non plus y avoir de besoin spécifique d'élimination des métaux dans les cellules étudiées.

Cette analyse ne permet pas de mettre en évidence une accumulation de métaux toxiques dans les cellules de branchies et de glandes digestives imputable à la mise en place du Désinfix®.

Par contre une surexpression d'un facteur supérieur à 2 des gènes *cox1* et *12S* est observée sur le site émissaire au niveau des branchies. Une surexpression d'un facteur de 5 est même dépassée pour l'expression des gènes mitochondriaux dans les glandes digestives au niveau de l'émissaire. Ces résultats mettent en évidence une augmentation de l'activité mitochondriale pour les individus exposés aux eaux de sortie de STEP, et ceci de manière accrue dans les tissus viscéraux. Cette augmentation est sûrement induite par la présence d'un stress causé par l'accumulation de certaines molécules présentes en sortie de STEP (composés organiques, musks ou produits pharmaceutiques). Elle traduit une augmentation des demandes énergétiques et le besoin de produire plus de protéines mitochondriales pour assurer le rôle de détoxification de ces organismes.

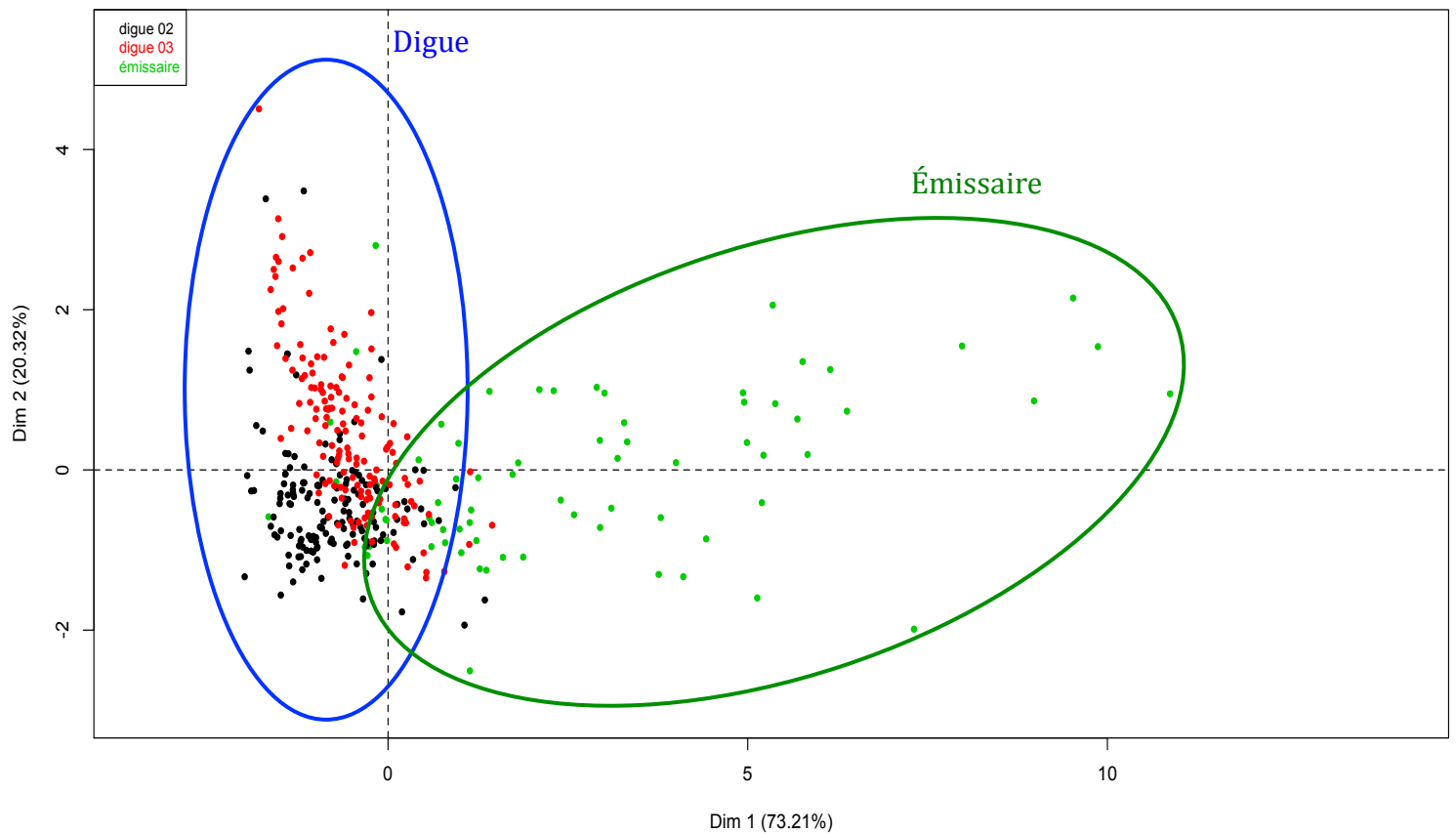


Figure 40. Analyse en Composantes Principales des variables morphométriques de l'étude réalisée sur les individus en fonction de leur lieu d'échantillonnage

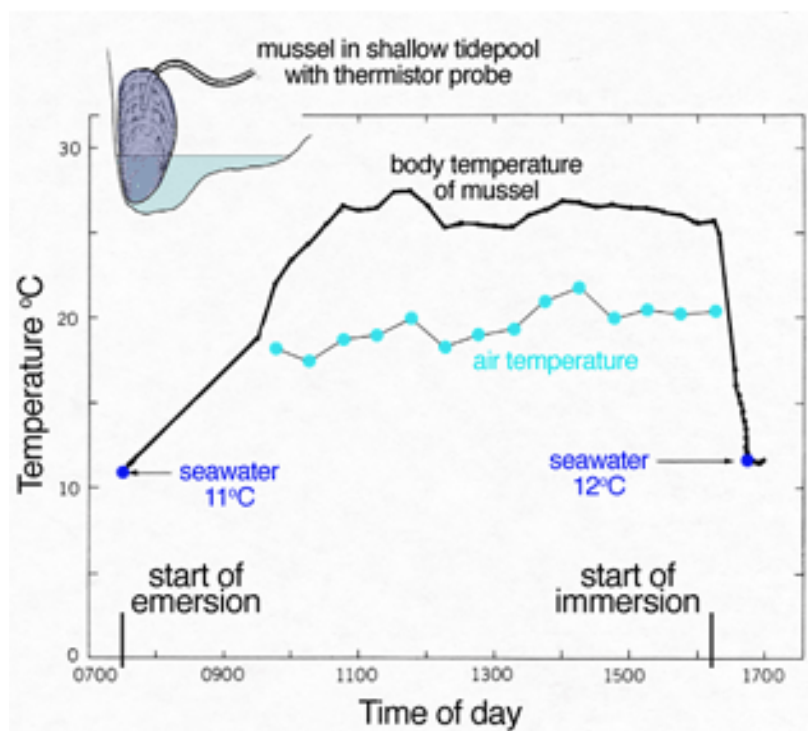


Figure 41. Évolution de la température du corps d'une moule en milieu intertidal en fonction de l'heure de la journée. Carefoot®

Discussion

Les résultats présentés dans ce précédent rapport apportent quelques éléments de réponse à la problématique générale et à l'un des objectifs de l'étude en cours. Grâce aux données recueillies et aux mesures effectuées lors des différentes campagnes d'échantillonnage, nous avons échafaudé une étude comparative entre deux milieux de vie différents.

Au cours de l'étude *in situ*, au total 3 campagnes de prélèvement ont été réalisées, une au niveau de l'émissaire de rejet des eaux traitées par Désinfix® et deux autres, non-impactées au niveau de la digue entre Milady et Marbella représentant le milieu témoin.

En ce qui concerne les analyses morphométriques, nous avons remarqué qu'à cette période de l'année, la variabilité saisonnière est très importante. Ainsi, d'un point de vue morphologique, les échantillons en provenance de la digue sont différents sur les 2 prélèvements entre février et mars.

Cependant, au regard de l'analyse multivariée des caractères morphologiques, il est flagrant que deux groupes d'individus se détachent (cf. [Figure 40](#)). Les moules de l'émissaire forment une entité bien distincte des individus de la digue sur l'axe horizontal (qui représente 73,21 % des variables). Cela indique que la nature du site influe majoritairement sur la variabilité des caractéristiques morpho, tandis que la variabilité saisonnière est moins notable. En effet, les deux présentent des caractéristiques spécifiques. L'émissaire de la STEP se trouve à plus de 10 mètres de profondeur, c'est un milieu subtidal et les apports en matière organique sont assurés par le flux permanent d'eau usée. A contrario, l'extrémité de la digue est un site intertidal, il subit le fracas de la houle et les individus connaissent une pression environnementale importante avec notamment des longues périodes d'exposition au soleil et au dessèchement. Les répercussions de la vie en zone intertidale sont multiples [7]. Les individus sont exposés à la cuisson dans leur propre coquille l'été, au gel l'hiver et à un apport conséquent d'eau douce lors d'intempéries. De nombreuses études ont été menées sur l'augmentation de la température corporelle en période d'émersion et de l'impact négatif de ce phénomène sur le développement et la reproduction des individus (cf. [Figure 41](#)) [3]. Le déferlement des vagues sélectionne les individus les plus petits aux dépens des gros spécimens. C'est l'une des raisons qui explique la différence de taille entre les individus de la digue (zone intertidale) et l'émissaire (zone subtidale).

Nous nous sommes servi de l'indice de condition comme d'un indicateur de santé des bivalves pour les deux milieux de vie. Aucune différence significative n'a été observée entre les moules exposées et témoins au regard de cet indice de condition. Pour obtenir ce résultat, il a fallu déterminer quels individus pouvaient être comparés entre eux en terme de taille et de maturité sexuelle. Ces derniers doivent appartenir à la même gamme de paramètres afin que les indices de conditions puissent être réellement comparables (cf. [Figure 32](#)). Après sélection, seule une petite partie de l'échantillon total a été retenue : les moules immatures mesurant entre 2 et 4 cm. À la suite de ces analyses, bien que les différences ne soient pas significatives, nous pouvons émettre quelques réserves sur le fait que l'effectif des échantillons prélevés soit trop faible pour être représentatif de la réalité. Il est donc nécessaire d'effectuer des analyses complémentaires afin de confirmer ou non ces premiers résultats.

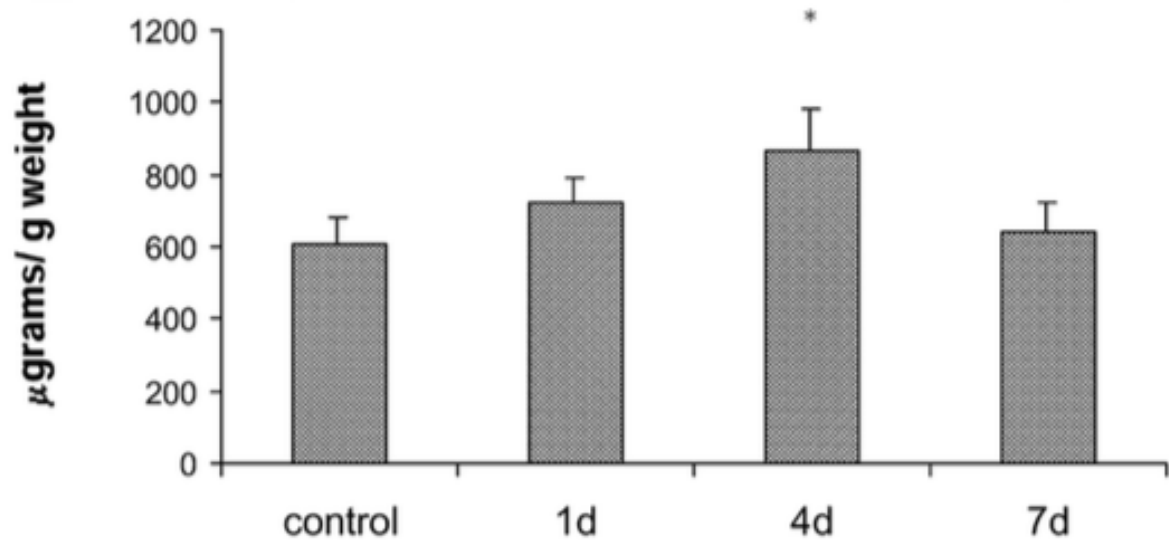


Figure 42. Teneur en métallothionéine dans les glandes digestives d'une moule après 0, 1, 4 et 7 jours de traitement au peroxyde d'hydrogène. Cavaletto®

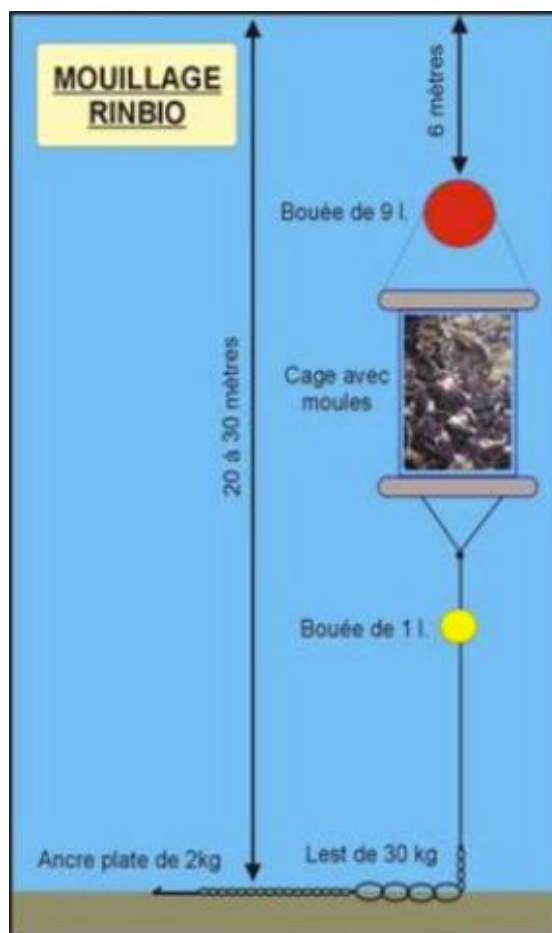


Figure 43. Schéma du montage utilisé pour le caging de moules en milieu naturel. IFREMER®

L'analyse transcriptomique réalisée sur les échantillons *in situ* nous indique une modification de l'activité mitochondriale entre les deux milieux. Cependant, aucun stress oxydant cytoplasmique n'est enregistré. Il semblerait donc que la dilution du DEX135 dans l'eau de mer à la sortie est suffisante pour ne pas impacter significativement les organismes résidents. En outre des compléments d'analyse sont préconisés, ils s'intéresseront notamment à la réponse au stress oxydant mitochondrial pour mieux comprendre l'augmentation de l'activité de cet organite. Des gènes impliqués dans la métabolisation des xénobiotiques peuvent aussi faire l'objet d'analyses subsidiaires.

A la rédaction de ce rapport, je ne dispose pas des résultats de l'expérimentation en laboratoire que j'ai mise en place. Cette expérience est très intéressante, car elle permet de fixer toutes les variables environnementales et de faire varier uniquement l'exposition au produit à tester.

En l'absence de résultats, plusieurs hypothèses sont envisageables. Dans un premier temps, il est possible qu'aucune variation de l'expression de gènes ne soit observée entre les compartiments testés. Dans ce cas, on pourrait conclure que, soit les individus ne sont pas stressés outre mesure par la présence d'un oxydant. Ou alors que la réponse de l'organisme est un processus long à mettre en place et n'est donc pas identifiable dans une étude de 7 jours.

Dans la bibliographie, de nombreuses expérimentations ont été menées, essentiellement sur des organismes de l'espèce *Mytilus galloprovincialis* avec l'injection de peroxyde d'hydrogène. Dans une étude menée en aquarium avec le même protocole que le nôtre, une adaptation des individus a été observée en seulement 7 jours (cf. [Figure 42](#)). L'équipe de Cavaletto en 2002 a étudié l'expression d'un gène de métallothionéine qui est un indicateur général de stress chez la moule. On remarque une augmentation de la quantité d'enzymes détoxifiantes au bout de 4 jours d'exposition. Dans ce cas, la réponse de l'organisme est très rapide. Cependant, le niveau revient à la normale après 7 jours d'injection. Cela montre une adaptation des individus à ce stress et une élimination en amont devenue plus efficace.

Il sera donc intéressant d'apporter une attention particulière aux résultats des analyses transcriptomiques réalisées à l'issue de notre expérimentation en aquarium. La comparaison de ces derniers avec les résultats de l'étude *in situ* permettront aussi de vérifier nos la validité de nos déductions.

Au cours de cette étude en laboratoire, les injections de DEX135 sont ponctuelles et de concentration légèrement supérieure à celle utilisé au niveau du regard de la STEP. *A contrario*, l'injection à la station se fait en continu dans les eaux de sortie. Dans notre cas, les individus sont susceptibles de subir une intoxication aigüe alors qu'au niveau de l'émissaire, les moules sont plutôt sujettes à une intoxication chronique.

Cependant la production de DEX135 en continu pour une petite quantité demeure impossible.

Le seul moyen de tester les effets du Désinfix® serait de mettre en place une expérience de caging au niveau de l'émissaire. Des poches d'individus pourraient être placées à différentes distances du flux d'eau usée, puis des analyses régulières permettraient de suivre la santé des individus en fonction de la proximité des eaux chargées en DEX135 (cf. [Figure 43](#)). Cette expérience pourrait être menée sur le long terme car elle ne nécessite pas de manutention et les organismes évoluent dans leur environnement naturel.

En conclusion, l'étude de la colonisation réalisée grâce à une caméra immergée par l'IMA a permis d'identifier les espèces résidentes. Les individus qui s'y trouvent sont connus pour leur faible sensibilité aux modifications environnementales (dessalure, variation du pH et apport en composés organiques divers). Les résultats obtenus durant l'analyse de l'indice de condition nous indiquent que les individus exposés au DEX135 ne sont pas impactés. Les résultats de l'expression de gène de réponse au stress oxydant permettent d'identifier une surexpression de gènes mitochondriaux. En revanche aucune réponse au stress oxydant n'est observée. Ceci tend à confirmer le fait que l'impact du DEX135 est négligeable sur ce bio-indicateur qu'est la moule. D'autres études ont été menées sur différents organismes à proximité de l'émissaire. Une étude sur le zooplancton (par LAPHY) puis une autre sur le phytoplancton (par l'IMA) menées avant et après la mise en place du procédé Désinfix® ont été réalisées. Aucun résultat sur l'effet négatif du procédé n'a été évoqué. Aucune étude n'a été réalisée avant la mise en place du procédé, il est donc impossible de connaître l'état écologique du milieu initialement. L'étude qui est actuellement menée par les membres de l'IPREM, à savoir, M. Pigot et M. Paulin afin de vérifier l'impact du DEX135. Cependant, cette étude doit être poursuivie sur le long terme si nous voulons mettre en évidence l'effet de l'oxydant sur le milieu après plusieurs années d'utilisation.

Bibliographie

Articles

- [1] Besse T. Mazurié J. (2003) Mise au point d'un protocole standard utilisant la cuisson au four à micro-ondes pour la mesure d'un indice de condition de moules
- [2] Bodgy A. Prou J. Berthomeh JP. Etude comparative de différents indices de condition chez l'huître creuse (*crassostrea gigas*)
- [3] Carefoot, Thomas, 1997. Pacific seashores : a Guide to intertidal. University of Washington Press 280 pp.
- [4] Cavaletto M. Ghezzi A. Burlando B. (2002) Effect of hydrogen peroxide on antioxidant enzymes and metallothionein level in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*. Comparative Biochemistry and Physiology. 131 : 447-457
- [5] Foulquier C., D'Elbee J., Bogun F. (Mars 2014) Analyses hydrobiologiques sur le diffuseur de la STEP de Marbella
- [6] Kagley AN. Kardong KE. (2014) Effects of Chemical Contaminants on Growth, Age-Structure, and Reproduction of *Mytilus edulis* Complex from Puget Sound, Washington Bull Environ Contam Toxicol (2014) 93:7–12
- [7] Letendre J. (2009) Effets combinés de l'intertidalité et de la contamination chimique chez *Mytilus edulis* : Mécanismes enzymatiques anti-oxydants et approche protéomique
- [8] Livak et al. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. METHODS 25 : 402–408
- [9] Nagarajan R. Stephen E.G. Goss-Custard J., (2006) Seasonal variations in mussel, *Mytilus edulis* L. shell thickness and strength and their ecological implications. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 339 : 241–250
- [10] Pigot T., Paulin T. (2015) Rapport intermédiaire n°1 : « Désinfection tertiaire par DesinFix® sur les eaux usées traitées par la station d'épuration de la ville de Biarritz »
- [11] Robert S., J-F. Bouget, E. Fleury, J. Mazurié (2013) Réseau national d'observation de la moule bleue *Mytilus edulis*. Département Ressource Biologique et Environnement Laboratoire Environnement.
- [12] Stohs S et al. (1995) Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. Free Radic Biol Med. 18 : 321-36.
- [13] Yang L., Tan Z., Daren Wang, Ling Xue (2014) Species identification through mitochondrial rRNA genetic analysis. Scientific Reports 4. 4089

Sources internet

- [A] <http://iprem.univ-pau.fr>
- [B] <http://www.suez-environnement.fr>
- [C] <http://www.kemira.com>
- [D] <http://www.ifremer.fr>
- [E] <http://azti.tecnalia.es>
- [F] <http://meteoconsult.fr>
- [G] <http://www.asnailsodyssey.com>
- [H] <http://jeb.biologists.org>
- [I] <http://www.sciencedirect.com>
- [J] <http://citeseerx.ist.psu.edu>
- [K] <http://pubmed.com>
- [L] <http://www.migrosmagazine.ch>
- [M] <http://www.agglo-cotabasque.net>
- [N] <http://assainissement.developpement-durable.gouv.fr>

ANNEXES

Annexe 1

Date	Individu	Longueur coquille (cm)	Largeur coquille (cm)	Poids sec coquille (g)	Poids alu (g)	Poids sec corps mou + alu (g)	Poids sec corps mou (g)	Observations	IC W&M	Localisation	quadrat	classe de taille
12/02/15	A	6,584	4,344	11,3892	0,5506	1,6175	1,0669	GONADE	94	émissaire	1	de 6 à 8
12/02/15	B	7,145	4,701	10,9775	0,4326	1,5899	1,1573		105	émissaire	1	de 6 à 8
12/02/15	C	8,012	4,4	22,3937	0,4879	3,2274	2,7395	GONADE	122	émissaire	1	plus de 8
12/02/15	D	5,209	3,69	7,2221	0,4933	1,0815	0,5882		81	émissaire	1	de 4 à 6
12/02/15	E	5,142	2,844	3,9261	0,475	0,861	0,386		98	émissaire	1	de 4 à 6
12/02/15	F	6,663	4,387	9,2678	0,4107	1,4749	1,0642		115	émissaire	1	de 6 à 8
12/02/15	G	4,35	2,81	3,4674	0,4186	0,8378	0,4192		121	émissaire	1	de 4 à 6
12/02/15	H	4,692	3,623	4,3822	0,4603	0,9904	0,5301		121	émissaire	1	de 4 à 6
12/02/15	I	7,052	4,336	12,9295	0,5318	2,0337	1,5019		116	émissaire	1	de 6 à 8
12/02/15	J	4,37	2,966	3,4131	0,3404	0,5621	0,2217		65	émissaire	1	de 4 à 6
12/02/15	K	2,993	1,95	1,6888	0,4243	0,7092	0,2849		169	émissaire	1	de 2 à 4
12/02/15	L	3,894	2,064	2,3185	0,3655	0,5965	0,231		100	émissaire	1	de 2 à 4
12/02/15	M	6,478	4,122	10,5195	0,4421	1,8919	1,4498		138	émissaire	1	de 6 à 8
12/02/15	N	8,146	4,919	21,6288	0,4374	2,5504	2,113		98	émissaire	1	plus de 8
12/02/15	O	7,15	4,734	18,2597	0,375	2,4853	2,1103	GONADE	116	émissaire	1	de 6 à 8
12/02/15	P	7,111	4,5	12,4868	0,4362	1,9788	1,5426	BRISEE	124	émissaire	1	de 6 à 8
12/02/15	Q	7,402	4,405	10,7771	0,3945	1,7094	1,3149		122	émissaire	1	de 6 à 8
12/02/15	R	6,528	4,459	10,1035	0,3623	1,3638	1,0015		99	émissaire	1	de 6 à 8
12/02/15	S	6,36	3,875	8,1285	0,3913	1,1626	0,7713		95	émissaire	1	de 6 à 8
12/02/15	T	5,167	3,892	6,716	0,4255	1,0795	0,654		97	émissaire	1	de 4 à 6
12/02/15	U	6,662	4,316	11,2181	0,4342	1,6536	1,2194		109	émissaire	1	de 6 à 8
12/02/15	V	7,472	4,39	13,7517	0,3429	1,7684	1,4255		104	émissaire	1	de 6 à 8
12/02/15	W	7,357	4,521	10,2796	0,3633	1,2064	0,8431		82	émissaire	1	de 6 à 8
12/02/15	X	4,917	3,201	5,9455	0,4316	0,9343	0,5027		85	émissaire	1	de 4 à 6
12/02/15	Y	4,831	3,195	3,3317	0,4407	0,7601	0,3194		96	émissaire	1	de 4 à 6
12/02/15	Z	5,196	3,491	5,6362	0,4087	0,8653	0,4566		81	émissaire	1	de 4 à 6
12/02/15	AA	4,159	2,611	2,6892	0,3783	0,631	0,2527		94	émissaire	1	de 4 à 6
12/02/15	AB	4,605	3,129	4,8263	0,4229	1,001	0,5781		120	émissaire	1	de 4 à 6
12/02/15	AC	5,366	3,113	1,6794	0,41	1,1409	0,7309		435	émissaire	1	de 4 à 6
12/02/15	AD	4,362	2,407	3,7144	0,4142	0,7067	0,2925		79	émissaire	1	de 4 à 6
12/02/15	AE	4,336	2,57	2,7788	0,4335	0,6503	0,2168		78	émissaire	1	de 4 à 6
12/02/15	AF	3,779	2,818	2,1203	0,3605	0,5273	0,1668		79	émissaire	1	de 2 à 4
12/02/15	AG	3,812	2,526	5,2491	0,3744	0,5381	0,1637		31	émissaire	1	de 2 à 4
12/02/15	AH	4,329	2,916	2,928	0,378	0,5968	0,2188		75	émissaire	1	de 4 à 6
12/02/15	AI	2,957	2,264	1,3014	0,251	0,3615	0,1105		85	émissaire	1	de 2 à 4
12/02/15	AJ	1,381	1,089	0,2336	0,289	0,3079	0,0189		81	émissaire	1	de 0 à 2
12/02/15	AK	2,936	2,335	1,4348	0,332	0,4391	0,1071		75	émissaire	1	de 2 à 4
12/02/15	AL	3,563	3,007	1,7174	0,252	0,4031	0,1511		88	émissaire	1	de 2 à 4
12/02/15	AM	4,17	3,068	2,4567	0,307	0,5162	0,2092		85	émissaire	1	de 4 à 6
12/02/15	AN	3,934	2,473	2,8681	0,272	0,4819	0,2099		73	émissaire	1	de 2 à 4
12/02/15	AO	3,923	2,263	1,9928	0,233	0,4673	0,2343	BRISEE	118	émissaire	1	de 2 à 4
12/02/15	AP	3,665	2,558	2,1439	0,236	0,4116	0,1756		82	émissaire	1	de 2 à 4
12/02/15	AQ	3,391	2,057	1,367	0,226	0,3371	0,1111		81	émissaire	1	de 2 à 4
12/02/15	AR	3,124	2,257	1,2585	0,25	0,3529	0,1029		82	émissaire	1	de 2 à 4
12/02/15	AS	2,968	1,952	1,1858	0,248	0,3305	0,0825		70	émissaire	1	de 2 à 4
12/02/15	AT	3,184	1,88	1,1243	0,266	0,3476	0,0816		73	émissaire	1	de 2 à 4
12/02/15	AU	2,352	1,637	0,994	0,258	0,3695	0,1115		112	émissaire	1	de 2 à 4
12/02/15	AV	2,747	2,128	0,9645	0,263	0,3331	0,0701		73	émissaire	1	de 2 à 4
12/02/15	AW	2,515	1,733	0,7746	0,259	0,3313	0,0723		93	émissaire	1	de 2 à 4
12/02/15	A	3,867	2,626	1,8035	0,5115	0,6577	0,1462		81	émissaire	2	de 2 à 4
12/02/15	B	4,848	3,25	4,0502	0,4451	0,7251	0,28		69	émissaire	2	de 4 à 6
12/02/15	C	5,973	3,612	9,8682	0,525	1,1121	0,5871	GONADE	59	émissaire	2	de 4 à 6
12/02/15	D	6,064	3,133	10,3118	0,3518	1,1249	0,7731		75	émissaire	2	de 6 à 8
12/02/15	E	6,079	3,403	6,5514	0,4345	1,1437	0,7092		108	émissaire	2	de 6 à 8
12/02/15	F	8,379	3,834	26,0927	0,4855	3,2232	2,7377	GONADE	105	émissaire	2	plus de 8
12/02/15	G	6,855	3,384	10,5419	0,3775	0,9937	0,6162		58	émissaire	2	de 6 à 8
12/02/15	H	5,518	3,333	6,3099	0,361	1,1003	0,7393		117	émissaire	2	de 4 à 6
12/02/15	I	8,065	4,142	24,2884	0,4906	1,3803	0,8897		37	émissaire	2	plus de 8
12/02/15	J	7,323	3,428	15,1412	0,4753	1,2199	0,7446		49	émissaire	2	de 6 à 8
12/02/15	K	5,678	3,156	6,5717	0,362	1,034	0,672		102	émissaire	2	de 4 à 6
12/02/15	L	6,264	3,346	12,4182	0,3951	1,7104	1,3153		106	émissaire	2	de 6 à 8
12/02/15	M	6,727	3,62	10,9653	0,3906	1,1496	0,759		69	émissaire	2	de 6 à 8
12/02/15	A	3,982	2,303	2,4142	0,3155	0,4899	0,1744		72	émissaire	3	de 2 à 4
12/02/15	B	5,36	3,414	7,2055	0,3534	0,8964	0,543		75	émissaire	3	de 4 à 6
12/02/15	C	5,807	3,268	7,5701	0,3575	1,1194	0,7619	GONADE	101	émissaire	3	de 4 à 6
12/02/15	D	6,837	3,295	16,2179	0,3598	1,7699	1,4101		87	émissaire	3	de 6 à 8
12/02/15	E	5,064	3,582	5,9953	0,3651	1,0816	0,7165	GONADE	120	émissaire	3	de 4 à 6
12/02/15	F	3,835	2,816	1,9066	0,3999	0,6149	0,215		113	émissaire	3	de 2 à 4
12/02/15	G	4,531	3,089	3,7823	0,3735	0,6341	0,2606		69	émissaire	3	de 4 à 6
12/02/15	H	4,278	2,948	2,9093	0,4114	0,6868	0,2754		95	émissaire	3	de 4 à 6
12/02/15	I	4,128	2,741	2,5109	0,398	0,6636	0,2656	GONADE	106	émissaire	3	de 4 à 6
12/02/15	J	4,047	2,791	2,8449	0,3606	0,5615	0,2009		71	émissaire	3	de 4 à 6
12/02/15	K	4,433	2,901	3,0647	0,3751	0,5764	0,2013		66	émissaire	3	de 4 à 6
12/02/15	L	2,87	1,695	1,4565	0,3788	0,5748	0,196		135	émissaire	3	de 2 à 4
12/02/15	M	2,877	2,251	1,2054	0,3666	0,4783	0,1117		93	émissaire	3	de 2 à 4
12/02/15	N	8,62	4,692	29,418	0,4616	3,1379	2,6763	GONADE	91	émissaire	3	plus de 8

20/02/15	A	2,555	1,492	0,7623	0,1905	0,2526	0,0621		81	digue	2
20/02/15	B	2,037	1,079	0,4255	0,2323	0,2642	0,0319		75	digue	2
20/02/15	C	3,07	1,692	1,3729	0,1694	0,2751	0,1057		77	digue	2
20/02/15	D	2,8	1,469	0,9368	0,1649	0,2393	0,0744		79	digue	2
20/02/15	E	2,37	1,318	0,7467	0,1153	0,1698	0,0545		73	digue	2
20/02/15	F	2,91	1,574	1,0555	0,177	0,2744	0,0974	GONADE	92	digue	2
20/02/15	G	2,948	1,633	1,1841	0,232	0,3219	0,0899		76	digue	2
20/02/15	H	2,054	1,049	0,383	0,1393	0,1783	0,039		102	digue	2
20/02/15	I	2,273	1,263	0,7431	0,1781	0,2301	0,052		70	digue	2
20/02/15	J	2,9564	1,582	1,1043	0,1464	0,2381	0,0917	GONADE	83	digue	2
20/02/15	K	2,725	1,473	0,9331	0,1861	0,2672	0,0811		87	digue	2
20/02/15	L	2,813	1,547	1,2206	0,255	0,343	0,088		72	digue	2
20/02/15	M	2,176	1,326	0,5353	0,1689	0,2212	0,0523		98	digue	2
20/02/15	N	2,7324	1,502	1,1744	0,3867	0,498	0,1113		95	digue	2
20/02/15	O	2,456	1,288	0,7158	0,2103	0,2585	0,0482		67	digue	2
20/02/15	P	2,951	1,565	1,101	0,2473	0,1742	-0,0731		-66	digue	2
20/02/15	Q	2,387	1,287	0,8757	0,1949	0,2573	0,0624		71	digue	2
20/02/15	R	2,591	1,223	0,8838	0,146	0,2	0,054		61	digue	2
20/02/15	S	2,777	2,428	0,9849	0,2039	0,2939	0,09	GONADE	91	digue	2
20/02/15	T	2,873	1,505	1,0217	0,1672	0,2487	0,0815		80	digue	2
20/02/15	U	2,1745	1,089	0,589	0,1957	0,2357	0,04		68	digue	2
20/02/15	V	2,473	1,357	0,7518	0,2645	0,3232	0,0587		78	digue	2
20/02/15	W	1,482	0,808	0,1258	0,109	0,1252	0,0162		129	digue	2
20/02/15	X	2,009	1,137	0,4165	0,165	0,2005	0,0355		85	digue	2
20/02/15	Y	1,991	1,216	0,445	0,1539	0,193	0,0391		88	digue	2
20/02/15	Z	1,136	0,667	0,1073	0,1381	0,1446	0,0065		61	digue	2
20/02/15	BA	3,005	1,522	1,6102	0,1609	0,289	0,1281	GONADE	80	digue	2
20/02/15	BB	1,98	1,043	0,4413	0,1621	0,1923	0,0302		68	digue	2
20/02/15	BC	2,26	1,293	0,5951	0,1557	0,2078	0,0521		88	digue	2
20/02/15	BD	2,057	1,12	0,5234	0,1995	0,2465	0,047		90	digue	2
20/02/15	BE	2,474	1,426	0,9049	0,1529	0,2216	0,0687		76	digue	2
20/02/15	BF	2,598	1,418	0,9817	0,1688	0,2406	0,0718	GONADE	73	digue	2
20/02/15	BG	1,448	0,81	0,1586	0,1657	0,1871	0,0214	GONADE	135	digue	2
20/02/15	BH	1,688	0,994	0,2622	0,1711	0,1923	0,0212		81	digue	2
20/02/15	BI	1,757	0,963	0,2358	0,1613	0,179	0,0177		75	digue	2
20/02/15	BJ	1,33	0,795	0,1258	0,1543	0,1655	0,0112		89	digue	2
20/02/15	BK	2,177	1,181	0,5106	0,1769	0,2143	0,0374		73	digue	2
20/02/15	BL	1,669	0,941	0,2392	0,1249	0,1435	0,0186		78	digue	2
20/02/15	BM	3,127	1,455	1,5501	0,1671	0,2691	0,102	GONADE	66	digue	2
20/02/15	BN	2,169	1,199	0,5226	0,1973	0,2359	0,0386		74	digue	2
20/02/15	BO	1,809	0,962	0,3566	0,2077	0,2274	0,0197		55	digue	2
20/02/15	BP	2,283	1,159	0,5071	0,2498	0,286	0,0362		71	digue	2
20/02/15	BQ	2,89	1,661	1,3085	0,2397	0,3575	0,1178		90	digue	2
20/02/15	BR	1,291	0,746	0,1245	0,1952	0,2069	0,0117		94	digue	2
20/02/15	BS	2,186	1,157	0,592	0,2437	0,2815	0,0378		64	digue	2
20/02/15	BT	2,281	1,153	0,6104	0,2344	0,2892	0,0548		90	digue	2
20/02/15	BU	3,228	1,59	1,6053	0,3155	0,4165	0,101		63	digue	2
20/02/15	BV	1,896	0,962	0,3893	0,2111	0,2408	0,0297		76	digue	2
20/02/15	BW	2,655	1,41	1,0814	0,2733	0,3517	0,0784		72	digue	2
20/02/15	BX	3,208	1,642	1,416	0,334	0,4395	0,1055		75	digue	2
20/02/15	BY	2,545	1,355	0,85	0,232	0,2998	0,0678		80	digue	2
20/02/15	BZ	1,894	1,093	0,4636	0,229	0,2591	0,0301		65	digue	2
20/02/15	CA	2,753	1,542	1,207	0,2362	0,3297	0,0935		77	digue	2
20/02/15	CB	2,917	1,55	1,039	0,2358	0,3266	0,0908		87	digue	2
20/02/15	CC	1,812	1,042	0,3294	0,1881	0,2162	0,0281		85	digue	2
20/02/15	CD	2,145	1,187	0,5046	0,1584	0,1973	0,0389		77	digue	2
20/02/15	CE	1,944	1,096	0,4711	0,2047	0,2462	0,0415	GONADE	88	digue	2
20/02/15	CF	2,121	1,099	0,4987	0,2132	0,2588	0,0456	GONADE	91	digue	2
20/02/15	CG	1,406	0,801	0,1435	0,2238	0,2366	0,0128		89	digue	2
20/02/15	CH	2,579	1,293	0,9043	0,2553	0,3304	0,0751		83	digue	2
20/02/15	CI	2,116	1,172	0,5303	0,259	0,297	0,038		72	digue	2
20/02/15	CJ	1,915	1,154	0,4533	0,2687	0,3074	0,0387	GONADE	85	digue	2
20/02/15	CK	1,989	1,12	0,4295	0,2206	0,2463	0,0257		60	digue	2
20/02/15	CL	2,353	1,213	0,6303	0,2198	0,2671	0,0473		75	digue	2
20/02/15	CM	2,815	1,457	0,9807	0,265	0,3618	0,0968	GONADE	99	digue	2
20/02/15	CN	1,545	0,818	0,199	0,2513	0,2733	0,022		111	digue	2
20/02/15	CO	1,768	0,967	0,3614	0,2839	0,3107	0,0268		74	digue	2
20/02/15	CP	1,607	0,914	0,2176	0,173	0,1967	0,0237		109	digue	2
20/02/15	CQ	2,046	1,126	0,3801	0,1997	0,2384	0,0387		102	digue	2
20/02/15	CR	1,324	0,75	0,1241	0,2121	0,226	0,0139	BRISSE	112	digue	2
20/02/15	CS	1,906	1,06	0,2206	0,2364	0,2773	0,0409	GONADE	185	digue	2
20/02/15	CT	2,683	1,454	0,8233	0,218	0,2792	0,0612	GONADE	74	digue	2
20/02/15	CU	2,534	1,306	0,9912	0,2298	0,322	0,0922		93	digue	2
20/02/15	CV	1,928	1,072	0,3712	0,1976	0,2317	0,0341		92	digue	2
20/02/15	CW	2,373	1,313	0,772	0,1763	0,2338	0,0575		74	digue	2
20/02/15	CX	2,069	1,097	0,456	0,1866	0,2309	0,0443		97	digue	2
20/02/15	CY	2,195	1,295	0,486	0,212	0,257	0,045		93	digue	2
20/02/15	CZ	2,46	1,492	0,8843	0,2459	0,3388	0,0929	GONADE	105	digue	2
20/02/15	DA	1,824	1,052	0,3589	0,2611	0,2929	0,0318		89	digue	2
20/02/15	DB	2,098	1,231	0,4876	0,2348	0,2681	0,0333		68	digue	2
20/02/15	DC	2,306	1,387	0,6841	0,1986	0,3269	0,1283		188	digue	2
20/02/15	DD	2,156	1,254	0,5022	0,1812	0,2453	0,0641		128	digue	2
20/02/15	DE	2,383	1,24	0,6506	0,2273	0,2851	0,0578		89	digue	2
20/02/15	DF	2,904	1,552	1,1572	0,218	0,2975	0,0795		69	digue	2
20/02/15	DG	2,447	1,387	0,6572	0,198	0,2583	0,0603		92	digue	2
20/02/15	DH	2,439	1,315	0,7985	0,2127	0,2813	0,0686		86	digue	2
20/02/15	DI	2,502	1,348	0,8394	0,2831	0,3482	0,0651		78	digue	2
20/02/15	DJ	2,315	1,273	0,8055	0,1894	0,2496	0,0602	GONADE	75	digue	2
20/02/15	DK	2,301	1,193	0,6186	0,2097	0,2668	0,0571		92	digue	2

20/02/15	DL	2,482	1,354	0,7734	0,2557	0,3265	0,0708		92	digue	2	de 2 à 4
20/02/15	DM	2,064	1,195	0,5057	0,1719	0,2229	0,051		101	digue	2	de 2 à 4
20/02/15	DN	2,458	1,348	0,7459	0,1658	0,2341	0,0683		92	digue	2	de 2 à 4
20/02/15	DO	2,339	1,305	0,8799	0,1942	0,2566	0,0624		71	digue	2	de 2 à 4
20/02/15	DP	2,238	1,316	0,6879	0,2117	0,2625	0,0508		74	digue	2	de 2 à 4
20/02/15	DQ	2,059	1,164	0,4264	0,1681	0,206	0,0379		89	digue	2	de 2 à 4
20/02/15	DR	2,199	1,244	0,6436	0,1672	0,2124	0,0452		70	digue	2	de 2 à 4
20/02/15	DS	1,835	1,042	0,3423	0,1542	0,184	0,0298		87	digue	2	de 0 à 2
20/02/15	DT	2,438	1,217	0,7074	0,1909	0,2402	0,0493		70	digue	2	de 2 à 4
20/02/15	DU	2,093	1,152	0,424	0,1954	0,2524	0,057		134	digue	2	de 2 à 4
20/02/15	DV	2	1,071	0,3596	0,2169	0,2511	0,0342		95	digue	2	de 2 à 4
20/02/15	DU	2,093	1,152	0,424	0,1954	0,2524	0,057		134	digue	2	de 2 à 4
20/02/15	DV	2	1,071	0,3596	0,2169	0,2511	0,0342		95	digue	2	de 2 à 4
20/02/15	A	3,769	2,111	2,1702	0,2425	0,39	0,1475		68	digue	3	de 2 à 4
20/02/15	B	3,659	1,969	2,1652	0,2548	0,4414	0,1866	GONADE	86	digue	3	de 2 à 4
20/02/15	C	3,796	2,143	2,6538	0,2305	0,4398	0,2093	GONADE	79	digue	3	de 2 à 4
20/02/15	D	3,978	2,117	2,2455	0,2434	0,4325	0,1891		84	digue	3	de 2 à 4
20/02/15	E	3,63	1,992	1,7515	0,3019	0,4438	0,1419		81	digue	3	de 2 à 4
20/02/15	F	3,506	1,934	1,8928	0,2314	0,3762	0,1448		77	digue	3	de 2 à 4
20/02/15	G	4,293	2,239	3,325	0,2401	0,5391	0,299	GONADE	90	digue	3	de 4 à 6
20/02/15	H	3,238	1,76	1,6126	0,1703	0,2873	0,117		73	digue	3	de 2 à 4
20/02/15	I	3,046	2,644	1,679	0,224	0,3669	0,1429		85	digue	3	de 2 à 4
20/02/15	J	4,174	3,038	3,5716	0,2159	0,4139	0,198		55	digue	3	de 4 à 6
20/02/15	K	3,405	1,874	1,5974	0,2094	0,3307	0,1213		76	digue	3	de 2 à 4
20/02/15	L	4,057	2,168	3,0128	0,2394	0,4794	0,24	GONADE	80	digue	3	de 4 à 6
20/02/15	M	3,501	1,922	1,4922	0,2362	0,3721	0,1359		91	digue	3	de 2 à 4
20/02/15	N	3,105	1,743	1,8308	0,2033	0,3542	0,1509	GONADE	82	digue	3	de 2 à 4
20/02/15	O	3,704	1,937	2,7165	0,1741	0,4337	0,2596		96	digue	3	de 2 à 4
20/02/15	P	3,176	1,791	1,6682	0,2253	0,3481	0,1228		74	digue	3	de 2 à 4
20/02/15	Q	3,043	1,666	1,3986	0,2446	0,3539	0,1093		78	digue	3	de 2 à 4
20/02/15	R	3,017	1,776	1,5266	0,2347	0,3449	0,1102		72	digue	3	de 2 à 4
20/02/15	S	3,165	1,85	1,5061	0,2046	0,3252	0,1206		80	digue	3	de 2 à 4
20/02/15	T	3,094	1,777	1,3917	0,2085	0,3365	0,128	GONADE	92	digue	3	de 2 à 4
20/02/15	U	2,269	1,841	1,5823	0,2142	0,3416	0,1274		81	digue	3	de 2 à 4
20/02/15	V	3,479	1,967	2,0559	0,2183	0,3938	0,1755	GONADE	85	digue	3	de 2 à 4
20/02/15	W	3,249	1,796	1,6304	0,2418	0,3903	0,1485	GONADE	91	digue	3	de 2 à 4
20/02/15	X	3,117	1,688	1,309	0,2001	0,2722	0,0721		55	digue	3	de 2 à 4
20/02/15	Y	3,586	1,781	2,785	0,2077	0,3472	0,1395		50	digue	3	de 2 à 4
20/02/15	Z	2,859	1,5	1,0234	0,215	0,324	0,109		107	digue	3	de 2 à 4
20/02/15	BA	3,037	1,593	1,1752	0,1772	0,2907	0,1135		97	digue	3	de 2 à 4
20/02/15	BB	3,302	1,897	1,5751	0,207	0,3237	0,1167		74	digue	3	de 2 à 4
20/02/15	BC	3,201	1,688	1,4387	0,1962	0,3021	0,1059		74	digue	3	de 2 à 4
20/02/15	BD	4,52	2,168	4,1941	0,2176	0,4104	0,1928		46	digue	3	de 4 à 6
20/02/15	BE	3,244	1,765	1,7156	0,1844	0,3181	0,1337		78	digue	3	de 2 à 4
20/02/15	BF	3,186	1,757	1,6322	0,1784	0,2864	0,108	GONADE	66	digue	3	de 2 à 4
20/02/15	BG	2,931	1,573	1,074	0,1983	0,2989	0,1006		94	digue	3	de 2 à 4
20/02/15	BH	3,08	1,606	1,2366	0,2006	0,3395	0,1389	GONADE	112	digue	3	de 2 à 4
20/02/15	BI	3,156	1,671	1,1681	0,2286	0,3399	0,1113		95	digue	3	de 2 à 4
20/02/15	BJ	3,414	1,777	1,7358	0,2054	0,4345	0,2291	GONADE	132	digue	3	de 2 à 4
20/02/15	BK	3,048	1,596	1,3121	0,187	0,3128	0,1258		96	digue	3	de 2 à 4
20/02/15	BL	3,027	1,695	1,4615	0,246	0,3821	0,1361		93	digue	3	de 2 à 4
20/02/15	BM	2,999	1,683	1,0088	0,2331	0,313	0,0799		79	digue	3	de 2 à 4
20/02/15	BN	2,825	1,67	0,9699	0,2461	0,3169	0,0708		73	digue	3	de 2 à 4
20/02/15	BO	2,963	1,607	1,0022	0,1956	0,2832	0,0876		87	digue	3	de 2 à 4
20/02/15	BP	3,869	2,09	2,5664	0,1781	0,4243	0,2462	GONADE	96	digue	3	de 2 à 4
20/02/15	BQ	3,123	1,677	1,3961	0,2265	0,3459	0,1194	GONADE	86	digue	3	de 2 à 4
20/02/15	BR	2,668	1,478	0,9136	0,1855	0,2769	0,0914		100	digue	3	de 2 à 4
20/02/15	BS	1,622	1,474	0,9894	0,1971	0,2618	0,0647		65	digue	3	de 0 à 2
20/02/15	BT	2,87	1,599	0,9042	0,1847	0,2604	0,0757		84	digue	3	de 2 à 4
20/02/15	BU	2,858	1,52	1,2098	0,2372	0,3408	0,1036		86	digue	3	de 2 à 4
20/02/15	BV	2,765	1,549	1,0663	0,2578	0,3734	0,1156	GONADE	108	digue	3	de 2 à 4
20/02/15	BW	2,948	1,668	1,4381	0,2385	0,3659	0,1274	GONADE	89	digue	3	de 2 à 4
20/02/15	BX	2,915	1,394	0,9748	0,1615	0,25	0,0885		91	digue	3	de 2 à 4
23/03/15	A	2,677	1,469	0,7364	0,1999	0,2839	0,084		114	digue	1	de 2 à 4
23/03/15	B	3,078	1,52	1,3338	0,1994	0,2968	0,0974		73	digue	1	de 2 à 4
23/03/15	C	2,388	1,243	0,5464	0,1484	0,2212	0,0728	GONADE	133	digue	1	de 2 à 4
23/03/15	D	3,465	1,792	1,544	0,19	0,325	0,135	GONADE	87	digue	1	de 2 à 4
23/03/15	E	3,224	1,724	1,2309	0,1887	0,3116	0,1229	GONADE	100	digue	1	de 2 à 4
23/03/15	F	2,31	1,279	0,4981	0,1727	0,2413	0,0686		138	digue	1	de 2 à 4
23/03/15	G	2,894	1,566	1,0252	0,1522	0,2668	0,1146	GONADE	112	digue	1	de 2 à 4
23/03/15	H	2,044	1,101	0,3756	0,1216	0,1758	0,0542	GONADE	144	digue	1	de 2 à 4
23/03/15	I	3,03	1,67	1,3046	0,1987	0,3028	0,1041	GONADE	80	digue	1	de 2 à 4
23/03/15	J	2,129	1,066	0,3405	0,1412	0,1973	0,0561	GONADE	165	digue	1	de 2 à 4
23/03/15	K	3,245	1,702	1,4519	0,2208	0,3395	0,1187		82	digue	1	de 2 à 4
23/03/15	L	3,815	2,15	1,8704	0,2455	0,4082	0,1627	GONADE	87	digue	1	de 2 à 4
23/03/15	M	3,132	1,742	1,4335	0,1659	0,2907	0,1248		87	digue	1	de 2 à 4
23/03/15	N	3,258	1,882	1,3502	0,1456	0,2728	0,1272		94	digue	1	de 2 à 4
23/03/15	O	4,517	2,332	3,6988	0,2326	0,4986	0,266	GONADE	72	digue	1	de 4 à 6
23/03/15	P	3,565	1,823	2,157	0,1999	0,375	0,1751	GONADE	81	digue	1	de 2 à 4
23/03/15	Q	3,667	2,097	1,9383	0,2647	0,4195	0,1548	GONADE	80	digue	1	de 2 à 4
23/03/15	R	3,088	1,495	1,341	0,1908	0,3168	0,126	GONADE	94	digue	1	de 2 à 4
23/03/15	S	2,681	1,452	0,8152	0,1662	0,2423	0,0761	GONADE	93	digue	1	de 2 à 4
23/03/15	T	3,62	1,975	2,2151	0,1944	0,4016	0,2072	GONADE	94	digue	1	de 2 à 4
23/03/15	U	3,256	1,774	1,356	0,1727	0,3014	0,1287	GONADE	95	digue	1	de 2 à 4
23/03/15	V	3,2	1,469	1,1533	0,1764	0,3271	0,1507	GONADE	131	digue	1	de 2 à 4
23/03/15	W	3,59	1,981	1,4793	0,1884	0,345	0,1566	GONADE	106	digue	1	de 2 à 4
23/03/15	X	2,929	1,438	0,8836	0,2075	0,32969	0,12219	GONADE	138	digue	1	de 2 à 4
23/03/15	Y	3,233	1,749	1,5378	0,2065	0,3195	0,113	GONADE	73	digue	1	de 2 à 4
23/03/15	Z	2,861	1,513	0,964	0,1937	0,293	0,0993		103	digue	1	de 2 à 4

23/03/15	BA	3,252	1,726	1,3577	0,1881	0,3007	0,1126	GONADE	83	digue	1	de 2 à 4
23/03/15	BB	2,799	1,45	0,8434	0,1785	0,2832	0,1047		124	digue	1	de 2 à 4
23/03/15	BC	3,008	1,58	1,0661	0,1875	0,2964	0,1089	GONADE	102	digue	1	de 2 à 4
23/03/15	BD	2,752	1,47	1,0703	0,2162	0,3004	0,0842	GONADE	79	digue	1	de 2 à 4
23/03/15	BE	2,885	1,49	0,914	0,1893	0,2896	0,1003	GONADE	110	digue	1	de 2 à 4
23/03/15	BF	2,704	1,523	0,832	0,195	0,2953	0,1003	GONADE	121	digue	1	de 2 à 4
23/03/15	BG	2,93	1,665	0,9476	0,1972	0,296	0,0988	GONADE	104	digue	1	de 2 à 4
23/03/15	BH	3,391	1,686	1,3613	0,2458	0,3653	0,1195	GONADE	88	digue	1	de 2 à 4
23/03/15	BI	2,543	1,333	0,5511	0,1692	0,2417	0,0725	GONADE	132	digue	1	de 2 à 4
23/03/15	BJ	2,73	1,431	0,7369	0,2326	0,3187	0,0861	GONADE	117	digue	1	de 2 à 4
23/03/15	BK	2,752	1,35	0,6703	0,2223	0,3059	0,0836	GONADE	125	digue	1	de 2 à 4
23/03/15	BL	2,983	1,562	0,8935	0,203	0,3068	0,1038	GONADE	116	digue	1	de 2 à 4
23/03/15	BM	2,887	1,523	0,8879	0,1818	0,2722	0,0904	GONADE	102	digue	1	de 2 à 4
23/03/15	BN	3,048	1,587	0,7851	0,2474	0,3476	0,1002	GONADE	128	digue	1	de 2 à 4
23/03/15	BO	2,523	1,381	0,7371	0,1999	0,2777	0,0778		106	digue	1	de 2 à 4
23/03/15	BP	2,474	1,394	0,5768	0,2006	0,2556	0,055	GONADE	95	digue	1	de 2 à 4
23/03/15	BQ	2,585	1,386	0,804	0,1947	0,276	0,0813	GONADE	101	digue	1	de 2 à 4
23/03/15	BR	2,568	1,459	0,6788	0,188	0,2716	0,0836	GONADE	123	digue	1	de 2 à 4
23/03/15	BS	2,377	1,275	0,5884	0,2171	0,2815	0,0644	GONADE	109	digue	1	de 2 à 4
23/03/15	BT	2,589	1,305	0,5947	0,2098	0,2862	0,0764	GONADE	128	digue	1	de 2 à 4
23/03/15	BU	2,481	1,326	0,5354	0,1812	0,2449	0,0637	GONADE	119	digue	1	de 2 à 4
23/03/15	BV	2,121	1,132	0,3319	0,152	0,2016	0,0496	GONADE	149	digue	1	de 2 à 4
23/03/15	BW	2,539	1,34	0,6571	0,171	0,2456	0,0746	GONADE	114	digue	1	de 2 à 4
23/03/15	BX	2,521	1,356	0,672	0,1825	0,2425	0,06	GONADE	89	digue	1	de 2 à 4
23/03/15	A	3,376	1,68	1,7444	0,2058	0,3738	0,168		96	digue	2	de 2 à 4
23/03/15	B	4,019	1,858	3,2692	0,2107	0,4152	0,2045	GONADE	63	digue	2	de 4 à 6
23/03/15	C	4,734	2,469	4,2628	0,1885	0,5193	0,3308	GONADE	78	digue	2	de 4 à 6
23/03/15	D	2,096	1,158	0,4322	0,2135	0,2611	0,0476		110	digue	2	de 2 à 4
23/03/15	E	4,171	2,089	3,5037	0,2298	0,4506	0,2208	GONADE	63	digue	2	de 4 à 6
23/03/15	F	2,895	1,58	1,031	0,1784	0,2716	0,0932		90	digue	2	de 2 à 4
23/03/15	G	3,562	1,865	1,9973	0,2141	0,3592	0,1451	GONADE	73	digue	2	de 2 à 4
23/03/15	H	3,157	1,689	1,2881	0,2095	0,3538	0,1443		112	digue	2	de 2 à 4
23/03/15	I	3,364	1,776	1,339	0,1574	0,3189	0,1615	GONADE	121	digue	2	de 2 à 4
23/03/15	J	2,534	1,412	0,8955	0,1838	0,2663	0,0825	GONADE	92	digue	2	de 2 à 4
23/03/15	K	2,947	1,601	1,3128	0,2185	0,3208	0,1023	GONADE	78	digue	2	de 2 à 4
23/03/15	L	2,6	1,41	0,947	0,2028	0,2799	0,0771		81	digue	2	de 2 à 4
23/03/15	M	4,006	1,907	3,1509	0,242	0,4341	0,1921	GONADE	61	digue	2	de 4 à 6
23/03/15	N	4,45	2,283	3,7269	0,2584	0,6107	0,3523	GONADE	95	digue	2	de 4 à 6
23/03/15	O	3,785	2,049	1,9598	0,2277	0,4083	0,1806	GONADE	92	digue	2	de 2 à 4
23/03/15	P	3,631	1,877	1,9283	0,2007	0,3652	0,1645	GONADE	85	digue	2	de 2 à 4
23/03/15	Q	2,905	1,546	1,0211	0,227	0,3251	0,0981	GONADE	96	digue	2	de 2 à 4
23/03/15	R	3,669	1,898	1,7264	0,2012	0,3941	0,1929	GONADE	112	digue	2	de 2 à 4
23/03/15	S	3,369	1,824	1,5517	0,2058	0,3395	0,1337		86	digue	2	de 2 à 4
23/03/15	T	4,004	2,22	2,395	0,2851	0,4825	0,1974	GONADE	82	digue	2	de 4 à 6
23/03/15	U	2,375	1,281	0,5598	0,1852	0,2566	0,0714	GONADE	128	digue	2	de 2 à 4
23/03/15	V	3,272	1,696	1,5109	0,169	0,3078	0,1388	GONADE	92	digue	2	de 2 à 4
23/03/15	W	3,351	2	2,8724	0,191	0,3762	0,1852		64	digue	2	de 2 à 4
23/03/15	X	2,298	1,235	0,608	0,1959	0,2727	0,0768	GONADE	126	digue	2	de 2 à 4
23/03/15	Y	3,551	1,99	1,646	0,1837	0,3527	0,169	GONADE	103	digue	2	de 2 à 4
23/03/15	Z	3,138	1,714	1,3781	0,2154	0,3273	0,1119	GONADE	81	digue	2	de 2 à 4
23/03/15	BA	3,082	1,8	1,4638	0,2107	0,3416	0,1309	GONADE	89	digue	2	de 2 à 4
23/03/15	BB	2,432	1,315	0,6933	0,2288	0,3144	0,0856	GONADE	123	digue	2	de 2 à 4
23/03/15	BC	2,664	1,425	0,9296	0,214	0,3221	0,1081	GONADE	116	digue	2	de 2 à 4
23/03/15	BD	3,521	1,897	1,7307	0,2237	0,3829	0,1592	GONADE	92	digue	2	de 2 à 4
23/03/15	BE	3,551	1,858	2,1615	0,2397	0,3939	0,1542		71	digue	2	de 2 à 4
23/03/15	BF	2,845	1,555	0,9557	0,2172	0,3339	0,1167	GONADE	122	digue	2	de 2 à 4
23/03/15	BG	2,799	1,56	1,4918	0,1701	0,2889	0,1188	GONADE	80	digue	2	de 2 à 4
23/03/15	BH	2,727	1,443	1,0065	0,2176	0,3096	0,092	GONADE	91	digue	2	de 2 à 4
23/03/15	BI	2,821	1,483	1,1118	0,2505	0,3516	0,1011		91	digue	2	de 2 à 4
23/03/15	BJ	2,97	1,664	1,3769	0,2366	0,3627	0,1261		92	digue	2	de 2 à 4
23/03/15	BK	3,255	1,712	1,5906	0,2576	0,3871	0,1295	GONADE	81	digue	2	de 2 à 4
23/03/15	BL	2,959	1,65	1,0015	0,2189	0,3197	0,1008	GONADE	101	digue	2	de 2 à 4
23/03/15	BM	3,613	1,933	2,3159	0,2323	0,4158	0,1835	GONADE	79	digue	2	de 2 à 4
23/03/15	BN	2,818	1,63	1,1081	0,2347	0,3559	0,1212	GONADE	109	digue	2	de 2 à 4
23/03/15	BO	3,641	1,898	2,3612	0,246	0,4357	0,1897	GONADE	80	digue	2	de 2 à 4
23/03/15	BP	3,726	2,062	2,3896	0,2218	0,4243	0,2025	GONADE	85	digue	2	de 2 à 4
23/03/15	BQ	2,784	1,431	0,8882	0,1643	0,2573	0,093	GONADE	105	digue	2	de 2 à 4
23/03/15	BR	3,223	1,916	1,2821	0,2379	0,4127	0,1748	GONADE	136	digue	2	de 2 à 4
23/03/15	BS	2,951	1,742	1,1917	0,1853	0,303	0,1177	GONADE	99	digue	2	de 2 à 4
23/03/15	BT	3,059	1,599	1,3641	0,2119	0,3488	0,1369		100	digue	2	de 2 à 4
23/03/15	BU	2,98	1,744	1,3571	0,1943	0,3138	0,1195	GONADE	88	digue	2	de 2 à 4
23/03/15	BV	3,122	1,581	1,5225	0,2036	0,3398	0,1362	GONADE	89	digue	2	de 2 à 4
23/03/15	BW	3,09	1,732	1,5248	0,2095	0,3294	0,1199	GONADE	79	digue	2	de 2 à 4
23/03/15	BX	2,729	1,563	0,9725	0,1994	0,2973	0,0979		101	digue	2	de 2 à 4

23/03/15	A	2,85	1,44	1,0095	0,1965	0,2965	0,1	GONADE	99	digue	3	de 2 à 4
23/03/15	B	3,75	1,954	2,0797	0,1854	0,3525	0,1671	GONADE	80	digue	3	de 2 à 4
23/03/15	C	3,696	1,994	2,1553	0,1946	0,4252	0,2306	GONADE	107	digue	3	de 2 à 4
23/03/15	D	3,363	1,705	1,6132	0,1724	0,3224	0,15		93	digue	3	de 2 à 4
23/03/15	E	2,744	1,398	0,9415	0,1644	0,2742	0,1098	GONADE	117	digue	3	de 2 à 4
23/03/15	F	3,33	1,628	1,5091	0,1885	0,3632	0,1747	GONADE	116	digue	3	de 2 à 4
23/03/15	G	3,537	1,668	1,3716	0,2313	0,4339	0,2026		148	digue	3	de 2 à 4
23/03/15	H	3,547	1,822	1,7458	0,1605	0,342	0,1815		104	digue	3	de 2 à 4
23/03/15	I	3,06	1,633	1,3082	0,2143	0,3625	0,1482		113	digue	3	de 2 à 4
23/03/15	J	3,762	1,85	1,8309	0,2033	0,3842	0,1809		99	digue	3	de 2 à 4
23/03/15	K	2,864	1,54	1,1412	0,2007	0,3451	0,1444		127	digue	3	de 2 à 4
23/03/15	L	4,06	1,957	2,7138	0,2429	0,4314	0,1885	GONADE	69	digue	3	de 4 à 6
23/03/15	M	3,249	1,896	1,7725	0,192	0,3567	0,1647	GONADE	93	digue	3	de 2 à 4
23/03/15	N	3,142	1,521	1,3522	0,1976	0,3565	0,1589	GONADE	118	digue	3	de 2 à 4
23/03/15	O	2,852	1,493	1,0883	0,1807	0,2759	0,0952		87	digue	3	de 2 à 4
23/03/15	P	2,862	1,52	0,8858	0,1984	0,308	0,1096	GONADE	124	digue	3	de 2 à 4
23/03/15	Q	2,751	1,399	0,7487	0,1456	0,2456	0,1	GONADE	134	digue	3	de 2 à 4
23/03/15	R	3,01	1,056	1,0667	0,1851	0,3029	0,1178	GONADE	110	digue	3	de 2 à 4
23/03/15	S	2,539	1,384	0,6055	0,1875	0,2891	0,1016		168	digue	3	de 2 à 4
23/03/15	T	3,708	1,727	1,665	0,1698	0,3419	0,1721		103	digue	3	de 2 à 4
23/03/15	U	3,461	1,802	1,637	0,1746	0,3609	0,1863	GONADE	114	digue	3	de 2 à 4
23/03/15	V	3,594	1,93	3,1583	0,1684	0,4567	0,2883	GONADE	91	digue	3	de 2 à 4
23/03/15	W	2,577	1,155	0,6378	0,166	0,2716	0,1056		166	digue	3	de 2 à 4
23/03/15	X	3,218	1,534	1,5572	0,199	0,3659	0,1669		107	digue	3	de 2 à 4
23/03/15	Y	2,608	1,289	0,6781	0,2955	0,3792	0,0837	GONADE	123	digue	3	de 2 à 4
23/03/15	Z	3,306	1,721	1,4429	0,2895	0,472	0,1825		126	digue	3	de 2 à 4
23/03/15	BA	2,73	1,313	0,8351	0,2764	0,3781	0,1017		122	digue	3	de 2 à 4
23/03/15	BB	3,066	1,54	1,0126	0,1989	0,3416	0,1427		141	digue	3	de 2 à 4
23/03/15	BC	2,7	1,321	0,6632	0,2802	0,3689	0,0887	GONADE	134	digue	3	de 2 à 4
23/03/15	BD	2,722	1,544	1,2748	0,2087	0,2922	0,0835		66	digue	3	de 2 à 4
23/03/15	BE	2,604	1,251	0,7983	0,1981	0,2909	0,0928		116	digue	3	de 2 à 4
23/03/15	BF	2,875	1,482	0,7758	0,1541	0,265	0,1109		143	digue	3	de 2 à 4
23/03/15	BG	2,257	1,25	0,4368	0,2251	0,2962	0,0711		163	digue	3	de 2 à 4
23/03/15	BH	2,603	1,29	0,5917	0,1823	0,2737	0,0914		154	digue	3	de 2 à 4
23/03/15	BI	2,865	1,461	0,7761	0,1351	0,226	0,0909		117	digue	3	de 2 à 4
23/03/15	BJ	2,652	1,366	0,9092	0,182	0,2901	0,1081		119	digue	3	de 2 à 4
23/03/15	BK	2,031	1,057	0,3689	0,1602	0,2149	0,0547		148	digue	3	de 2 à 4
23/03/15	BL	2,179	1,095	0,419	0,1953	0,2677	0,0724		173	digue	3	de 2 à 4
23/03/15	BM	3,085	1,483	1,1259	0,1584	0,2934	0,135		120	digue	3	de 2 à 4
23/03/15	BN	2,151	1,192	0,4675	0,1218	0,1822	0,0604		129	digue	3	de 2 à 4
23/03/15	BO	2,03	1,036	0,2979	0,1738	0,2221	0,0483		162	digue	3	de 2 à 4
23/03/15	BP	1,918	0,985	0,3471	0,1907	0,2446	0,0539		155	digue	3	de 0 à 2
23/03/15	BQ	2,032	0,97	0,4033	0,1597	0,2149	0,0552		137	digue	3	de 2 à 4
23/03/15	BR	1,88	1,014	0,2319	0,1757	0,2255	0,0498		215	digue	3	de 0 à 2
23/03/15	BS	2,042	1,093	0,3002	0,145	0,1949	0,0499		166	digue	3	de 2 à 4
23/03/15	BT	2,323	1,171	0,5369	0,1882	0,2517	0,0635		118	digue	3	de 2 à 4
23/03/15	BU	2,07	1	0,3677	0,2255	0,2842	0,0587		160	digue	3	de 2 à 4
23/03/15	BV	2,125	1,073	0,4404	0,2072	0,2657	0,0585		133	digue	3	de 2 à 4
23/03/15	BW	2,112	1,109	0,3513	0,1936	0,2564	0,0628		179	digue	3	de 2 à 4
23/03/15	BX	1,949	0,994	0,4452	0,2011	0,2485	0,0474		106	digue	3	de 0 à 2

Annexe 2

Étude de la morphologie des Moules

Application à Mytilus edulis à Marbella

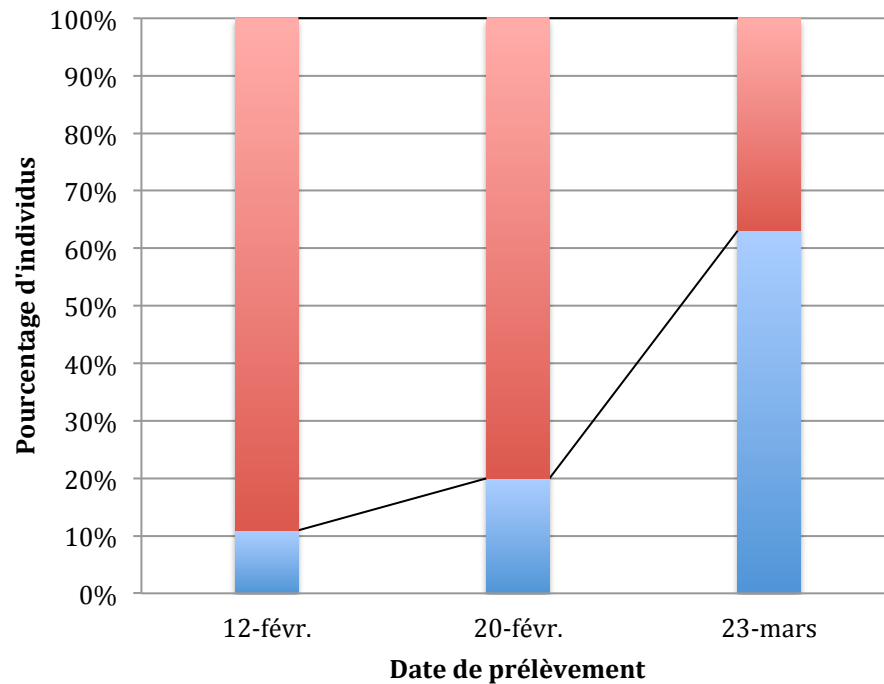
Julien Marticorena



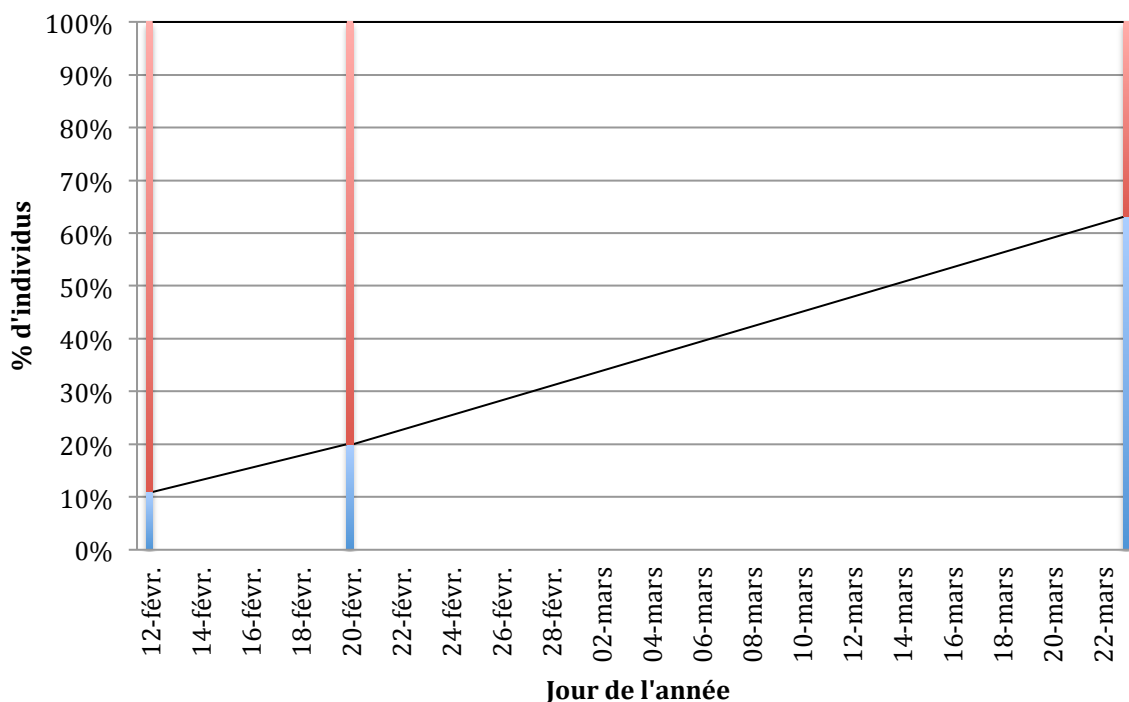
Table des matières

1- Étude de l'apparition des gonades	3
2- Prélèvement Émissaire 12/02/2015	4
2-1. Étude de l'indice de condition.....	4
2-2. Lien entre classe de taille et indice de condition	5
2-3. Lien entre présence de gonades et indice de condition	6
2-4. Comparaison indice de condition sur le diffuseur G avec diffuseur D	7
3- Comparaison des 2 prélèvements de la digue.....	7
3-1. Comparaison des indices de condition en fonction de la date de prélèvement.....	8
3-2. Comparaison de l'indice de condition en fonction de la présence ou non de gonades	9
4- Comparaison des prélèvements de la digue et de l'émissaire	9

1- Étude de l'apparition des gonades



La période de ponte des moules intervient généralement entre mai et juillet, on observe qu'une augmentation importante de la proportion d'individus possédants des gonades est remarquable aux différentes dates d'échantillonnage, **ceci est l'une des principales explications de l'augmentation progressive de l'indice de condition au fil de la saison.**



Lorsque l'on place une échelle de temps chronologique, en regardant les pourcentages de moules disposant de gonades, on remarque aisément que l'augmentation du nombre de moules pourvues de gonades matures est linéaire. On pourrait donc estimer à la louche la proportion d'individus en ponte en fonction de la date de prélèvement.

2- Prélèvement Émissaire 12/02/2015

$$\left. \begin{array}{l} Q1 = 50 \\ Q2 = 50 \\ Q3 = 50 \end{array} \right\} N \text{ total} = 150$$

Répartition taille émissaire

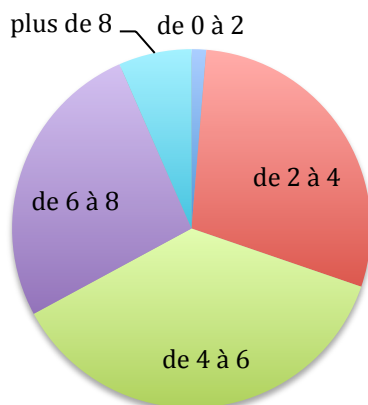


Figure 1. Répartition des différentes classes de taille sur l'émissaire

2-1. Étude de l'indice de condition

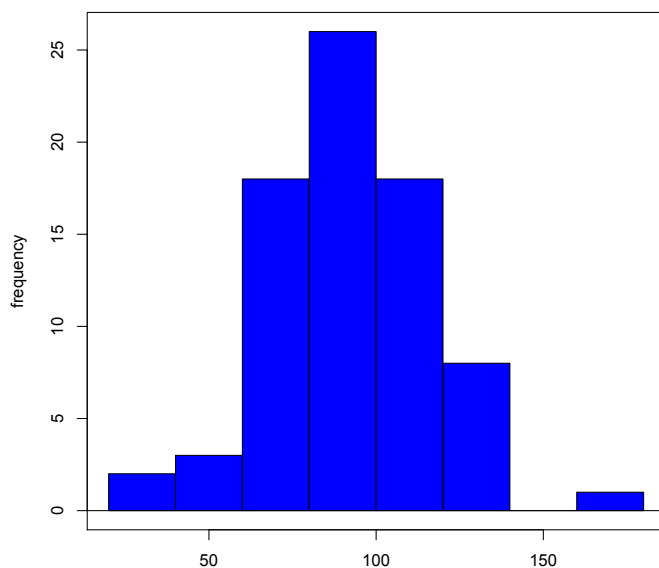


Figure 2. Histogramme de l'indice de Walne & Mann

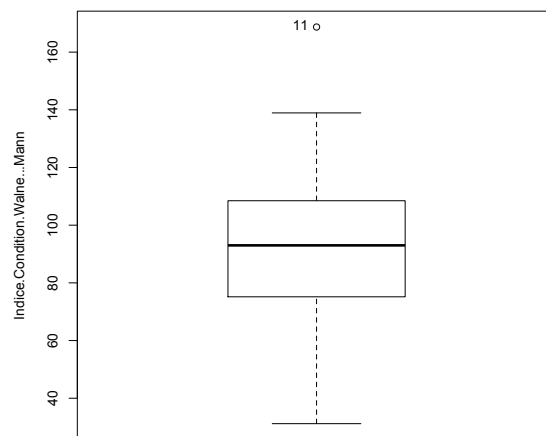


Figure 3. Boîte de dispersion de l'indice de Walne et Mann

Moyenne	Ecart type	Ecart interquartile	Min	25%	50%	75%	Max	n
92,67	23,85	33,10	31,19	75,26	93	108,36	168,70	150
IC 95% (moyennne) = [87,21948 ; 98,11749]		95% des individus de l'échantillon ont un indice de condition compris entre 87,22 et 98,12						

Tableau 1. Tableau des indicateurs statistiques de l'indice de condition

2-2. Lien entre classe de taille et indice de condition

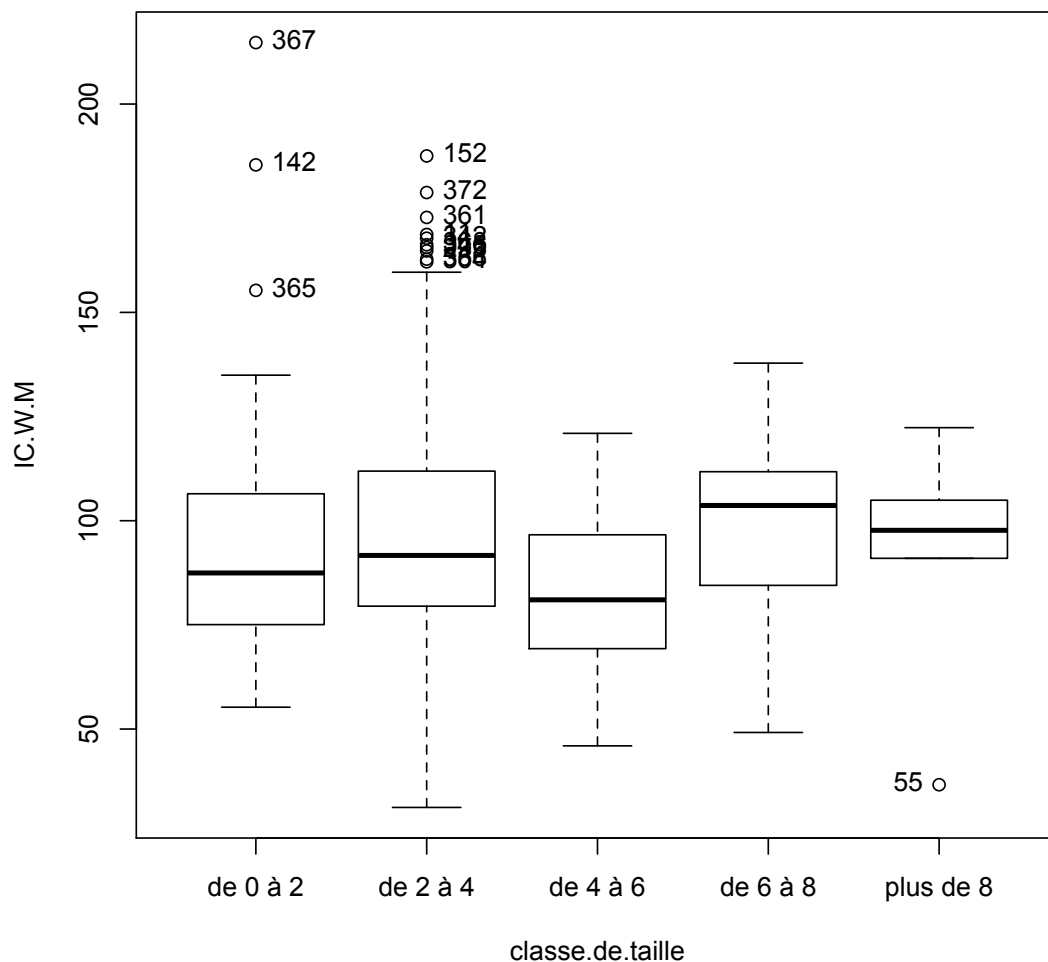


Figure 2. Boîtes de dispersion des indices de condition en fonction des classes de tailles sur l'émissaire

Il semble y avoir un lien entre la classe de taille et l'indice de condition, mais cela reste à démontrer grâce à un test stat.

On peut voir cependant qu'il y a quelques valeurs atypiques, l'individu 55 semble afficher un indice relativement bas, alors que l'individu 367 dispose d'un indice de condition très élevé. Il peut s'agir de valeurs aberrantes, ces valeurs résultent probablement d'une erreur de mesure.

Étant donné qu'il y a 5 modalités dans la variable qualitative, le test utilisé est le test de Kruskal et Wallis.

On considère deux hypothèses de travail :

H0 : Les moyennes sont égales

H1 : les moyennes sont différentes

$\alpha = 0,05$

Le p-value est de $2.678e-16 < 0,05$ on ne peut donc pas accepter l'hypothèse H0 on considère que les moyennes sont différentes et que la classe de taille influe sur l'indice de condition des individus.

2-3. Lien entre présence de gonades et indice de condition

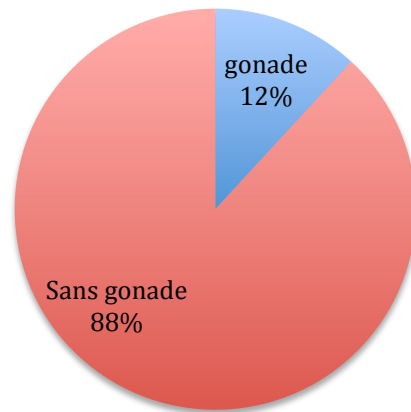


Figure 3. Diagramme en camembert de la présence ou non de gonades

	Moyenne	Ecart-type	Ecart interquartile	Min	25%	50%	75%	Max	Effectif
Sans gonade	90,6	24,1	30,7	31,1	74,7	85,1	105,4	168,7	132
Gonade	101,4	19,1	21,8	59,4	93,68	104,9	115,5	122,3	18

Tableau 5. Indicateurs statistiques de l'indice de condition en fonction de la présence ou non de gonades

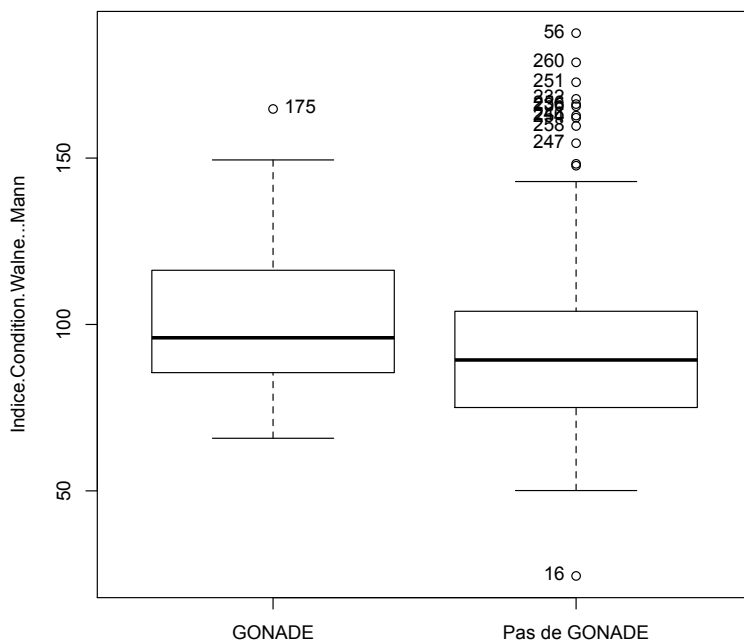


Figure 4. Boîte de dispersion de l'indice de Walne&Mann en fonction de la présence ou non de gonades

Il ne semble pas y avoir de lien entre la présence de gonades et l'indice de condition, nous pouvons le vérifier par l'intermédiaire d'un test statistique.

Les deux sous ensembles suivent une loi normale (test Shapiro Wilk), le test de Fisher nous indique que les variances sont égales (p-value=0,50)

On peut donc utiliser le test de comparaison de moyenne de Student.

On définit 2 hypothèses de travail :

H0 : les moyennes sont égales

H1 : les moyennes sont différentes

$\alpha = 0,05$

p-value = 0.2008 > α

On ne peut donc pas rejeter H0 au risque 5%, on considère donc que les moyennes sont égales.

La présence ou non de gonades n'influe pas sur l'indice de condition des individus de l'émissaire prélevés le 12/02/2015. Cela peut s'expliquer par le fait que les gonades sont très peu développées en cette période de l'année, elle ne prennent pas énormément de place et ne contribuent donc pas forcément à une augmentation du remplissage de la coquille. Il pourrait être bon de réussir à établir différents stades de développement des gonades dans les moules prélevées.

2-4. Comparaison indice de condition sur le diffuseur G avec diffuseur D

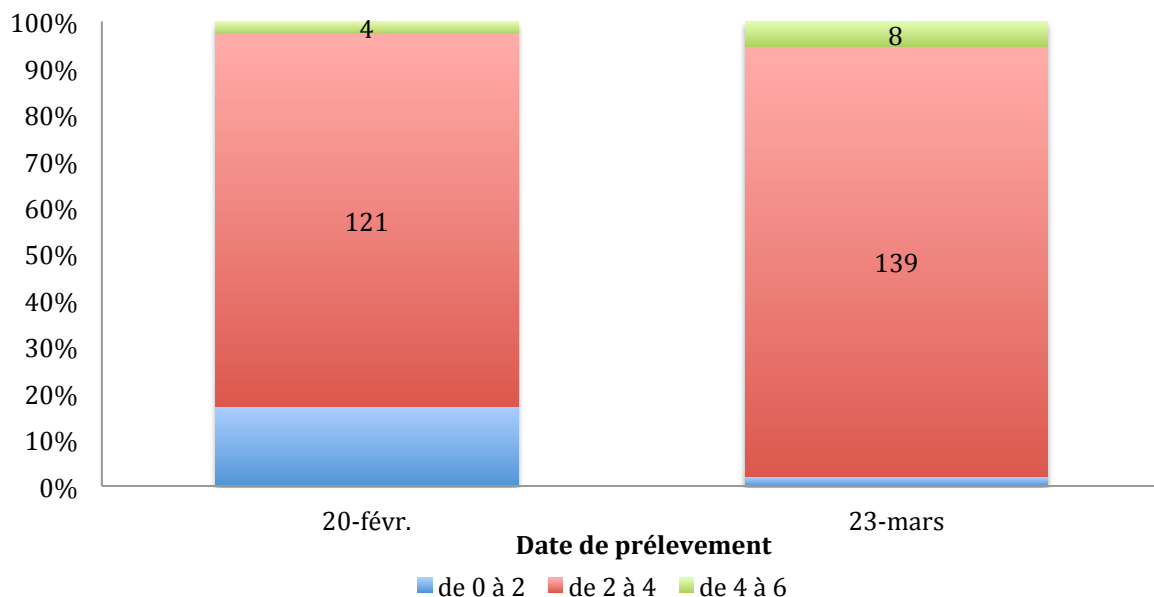
Les quadrats 1 et 2 ont été prélevés au niveau du même diffuseur de gauche que l'on nommera G et le quadrat 3 a été prélevé sur le diffuseur de droite codé D. On peut donc vérifier s'il y a une réelle différence entre les individus présents sur le diffuseur de droite et de gauche.

Il n'y a aucune différence significative entre les moyennes d'indice de condition du diffuseur de droite et de gauche. Le seul élément à relever est une nette différence de densité entre les moules. Celles présentes sur le diffuseur de gauche présentent une densité relativement plus importante. Ceci peut être dû à un échantillonnage inégal et ne constitue pas une donnée exploitable.

3- Comparaison des 2 prélèvements de la digue

$$20/02 : \left[\begin{array}{l} Q2 : 101 \\ Q3 : 50 \end{array} \right] \text{ Ntot} = 151 \qquad 23/03 : \left[\begin{array}{l} Q1 : 50 \\ Q2 : 50 \\ Q3 : 50 \end{array} \right] \text{ Ntot} = 150$$

Comparaison des proportions de classe de taille entre les 2 prélèvements



Le prélèvement de mars est plus minutieux, le plan d'échantillonnage est précis et ciblé sur la classe de taille 2 à 4 cm. Nous comparerons donc les classes de tailles qui se recoupent le plus.

3-1. Comparaison des indices de condition en fonction de la date de prélèvement.

Nous allons comparer les indices de condition de la classe 2 à 4 entre les 2 prélèvements de la digue.

	Moyenne	Ecart-Type	Ecart inter-quartile	Min	25%	50%	75%	Max	Effectif
20-févr	84,8	20,2	18,1	24,4	73,7	83,0	91,8	187,5	151
23-mars	108,6	27,2	34,3	61,0	89,3	104,5	123,7	214,7	150

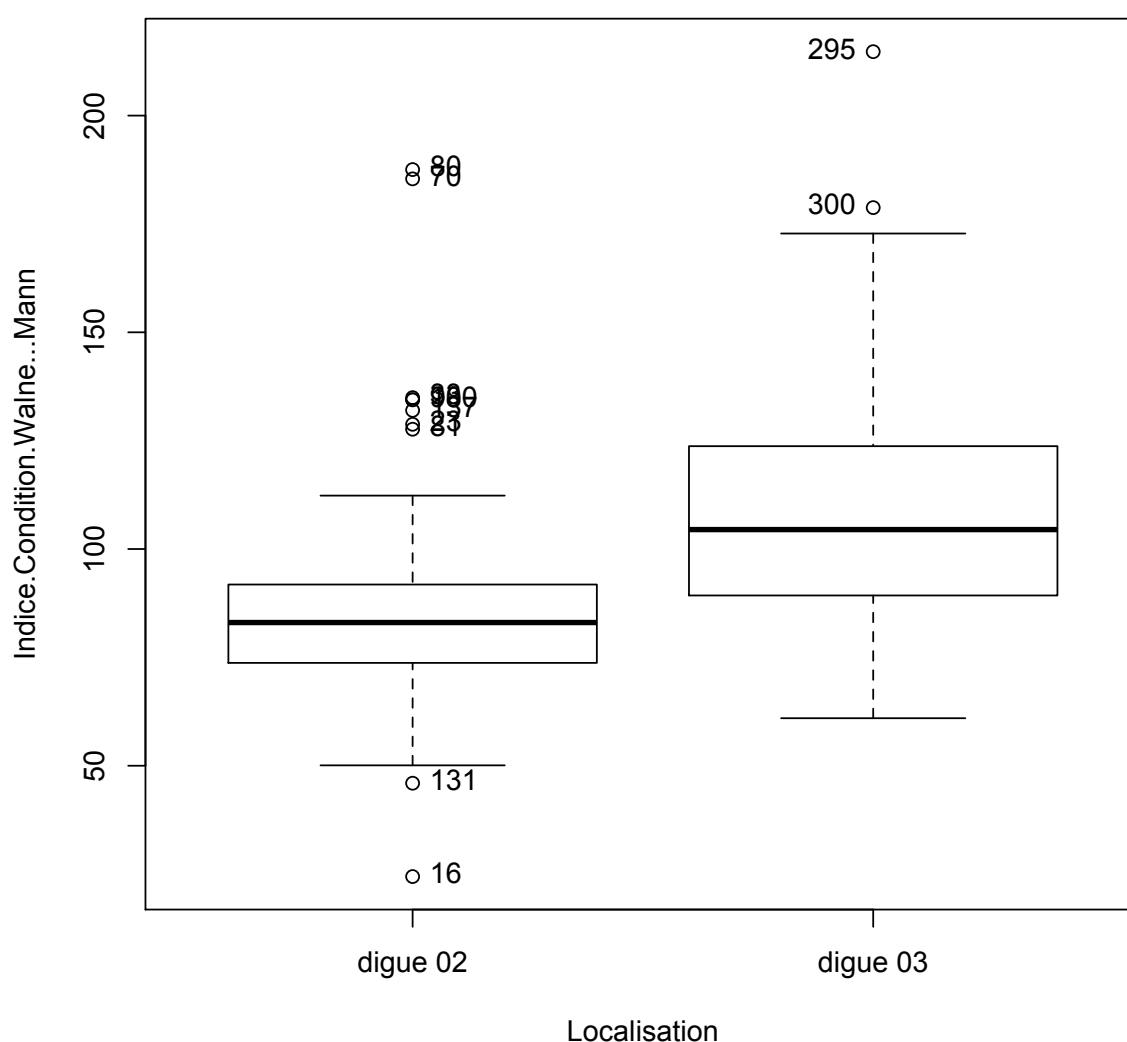


Figure 5. Boite de dispersion de l'indice de Walne et Mann en fonction de la date de prélèvement

L'application du test de Wilcoxon Mann&Witney (sans utiliser l'individu 295 qui semble représenter une valeur aberrante) nous confirme que la moyenne des indices de condition est différente et que les indices de condition sont plus importants sur le prélèvement de mars que de février ($p\text{-value} < 2.2e-16$)

3-2. Comparaison de l'indice de condition en fonction de la présence ou non de gonades

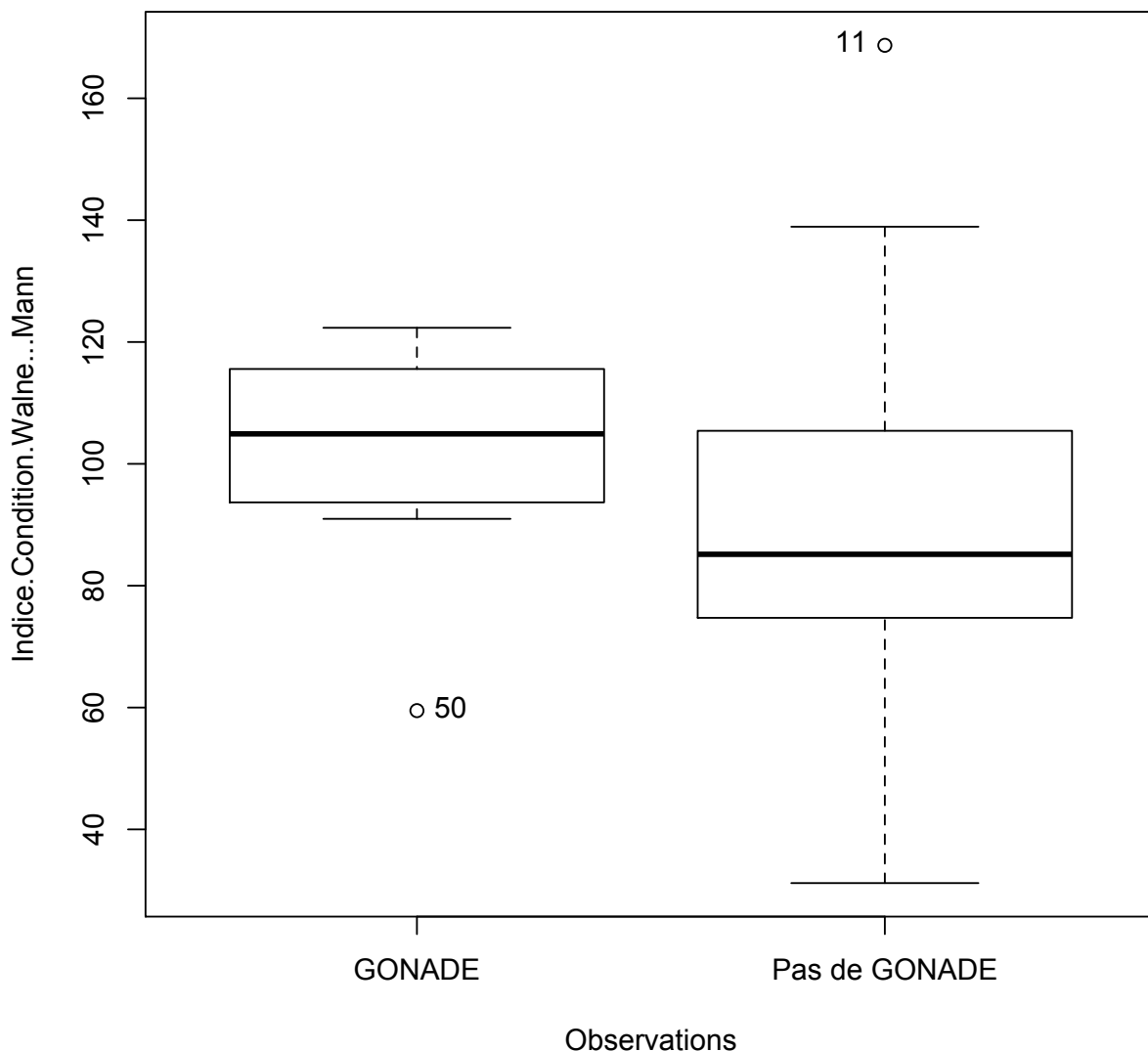


Figure 6. Boite de dispersion de l'indice de Walne&Mann en fonction de la présence ou non de gonade

D'après le test de Wilcoxon Mann & Witney, on remarque que la moyenne de l'indice de condition est plus importante pour les individus prélevés en mars qu'en février. Cela confirme donc que le développement des gonades s'intensifie et qu'elles prennent suffisamment de place dans la coquille pour modifier significativement l'indice de condition.

L'indice de condition dépend du poids sec de la coquille et du poids sec du corps mou, grâce au test statistique, on remarque qu'il n'y a pas de différence significative entre les moyennes du poids des coquilles pour les individus de la classe 2-4. **Donc la variation d'indice de condition réside uniquement dans la variation du poids du corps mou, qui lui-même est modifié par la présence ou non de gonades matures.**

4- Comparaison des prélèvements de la digue et de l'émissaire

Pour que l'analyse soit le moins biaisée possible il est important de s'intéresser à des classes de tailles comparable, pour cela nous conserverons dans l'analyse les individus de classe de taille 2 à 4.

D'autre part, étant donnée que les individus de l'émissaire sont en majorité dépourvus de gonade, les analyses statistiques doivent être réalisées sur les individus de la digue qui n'ont pas de gonades.

	Moyenne	Ecart type	Ecart inter-quartile	Min	25%	50%	75%	Max	n
Emissaire	88,5	27,4	20,2	31,2	73,2	81,8	93,3	168,7	21
Digue	95,4	28,3	28,6	24,4	75,3	89,3	103,8	187,5	150

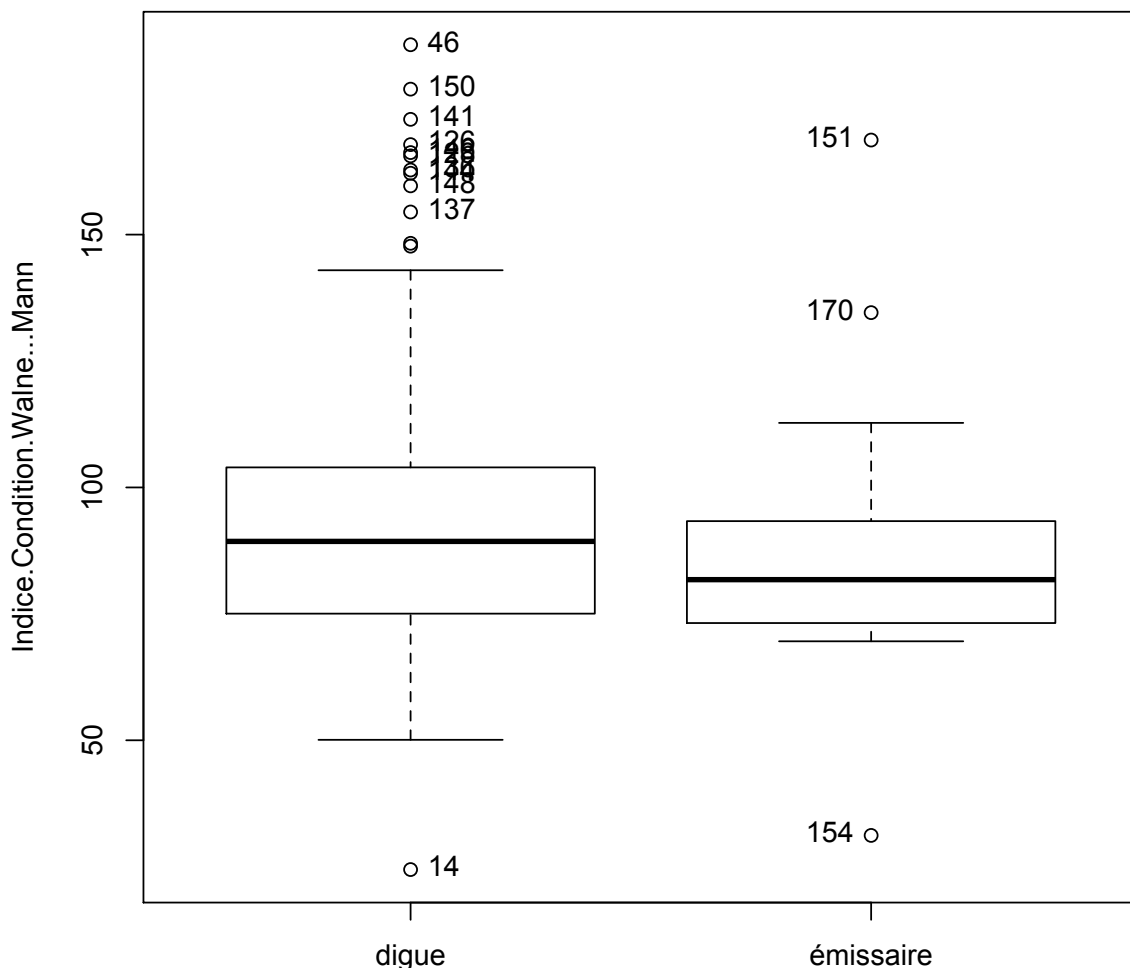


Figure 7. Boîte de dispersion de l'indice de walne et mann en fonction de la localisation

Grâce à l'observation de la boîte de distribution et à l'analyse statistique par le biais du test non-paramétrique de Wilcoxon mann&witney, on en déduit que les moyennes de la digue et de l'émissaire pour une classe de taille donnée et sur les individus sans gonades ne sont pas différentes au seuil d'acceptation 95% (p-value = 0.3242)

Annexe 3

Nombre d'individus	Lieu de prélèvement			
Classe de taille	digue 02	digue 03	émissaire	Total
de 0 à 2	26	3	2	31
de 2 à 4	121	139	42	302
de 4 à 6	4	8	54	66
de 6 à 8			41	40
plus de 8			11	10
Total	151	150	150	449