

I.3 - Méthodes d'évaluation de l'épifaune benthique intertidale de substrats durs

Considérations générales - difficultés

En règle générale on rappellera que l'ampleur de la **variabilité naturelle** des peuplements macrobenthiques peut **s'avérer relativement élevée en milieu rocheux**, temporellement mais aussi spatialement en lien avec la variabilité de la complexité structurelle de l'habitat, et ainsi rendre difficile l'assignation nette des réponses observées à la pollution accidentelle. Cette contrainte peut être partiellement réduite par :

- la sélection d'organismes dont **l'écologie et la biologie sont préalablement connues** et/ou de populations pour lesquelles des séries de **données de référence antérieures à l'accident** sont disponibles ;
- un suivi de **sites « témoins »** (non pollués) comparables, s'il en est, aux sites pollués.

N.B. La **collecte d'informations qualitatives dans l'urgence** (*via* des reconnaissances de terrain dans les premiers jours/semaines après l'accident) est recommandable dans la mesure où elles peuvent guider les processus de choix des suivis figurant dans les recommandations formulées ci-après (Cf. § 1.3.1 à 1.3.3) et d'en préciser les stratégies. Si possible, on encouragera la collecte de données visant :

- à caractériser les espèces benthiques *visiblement* affectées ;
- à estimer, grossièrement et en première instance, l'ampleur et la localisation/extension des phénomènes.

I.3.1 Approche écologique, au niveau de populations d'espèces ciblées

Le choix des espèces :

L'approche consiste à réaliser un suivi de la **dynamique de populations d'espèces macrobenthiques ciblées** en fonction :

- de leur **sensibilité** aux pollutions par hydrocarbures :
 - o connue à partir de l'expérience (ex : Crustacés amphipodes) ou ;
 - o potentiellement significative du fait de leur exposition et cycles de vie, s'agissant d'organismes à **cycle long, sessiles et épigés** au premier rang desquels figurent les **mollusques gastéropodes** (ex : patelles en milieu rocheux) de grande taille ;
 - o à noter qu'une **sensibilité intermédiaire** aux hydrocarbures est *a priori* plus adaptée à la réalisation de suivis écologiques, par rapport à une tolérance (pas d'effet sur les populations) ou une sensibilité très élevées (cas –extrême- de quasi disparition, temporaire et localisée, de la population) ;
- de leur **représentativité** des substrats durs médiolittoraux potentiellement affectés (ex : blocs, enrochements, etc.), laquelle est en outre plus propice à la collecte répétée d'un nombre satisfaisant d'individus.

Dans les estuaires ici visés (nord-est atlantique), quelques espèces communes d'invertébrés de la macrofaune sont **a priori** des **candidats potentiels** pour ce type de suivis ; répandus et aisément identifiables, on citera notamment :

- le gastéropode *Patella vulgata*, éventuellement *Littorina littorea* (plus mobile), espèces brouteuses, sensibles aux hydrocarbures (toxicité aigüe) et potentiellement présentes sur une large gamme de substrats durs médiolittoraux (naturels ou artificiels), bien que probablement limitées au domaine polyhalin ;
- les bivalves *Mytilus edulis*, et *Crassostrea gigas*, espèces suspensivores, sessiles et potentiellement présentes sur une large gamme de substrats durs médiolittoraux

(naturels ou artificiels) en estuaires, bien que probablement limitées au domaine polyhalin malgré une certaine tolérance à la dessalure.

Localement, il va de soi que l'identification et la sélection des espèces-candidates pour un éventuel suivi de populations s'appuiera sur les **connaissances existantes** (ex : inventaires, suivis en cours...) quant aux espèces de l'épifaune benthique de substrats durs (représentativité, abondances/distribution, biologie, etc.) au sein de l'aire affectée.

Les paramètres à mesurer :

A l'instar des suivis de populations de sédiments meubles, les mesures à effectuer au sein de ces populations sont essentiellement l'**abondance** (comptage des individus, ou taux de recouvrement pour les espèces macrobenthiques sessiles¹), permettant d'identifier les fluctuations des densités et, le cas échéant, leur rétablissement (processus de restauration). Dans le cas des patelles, la mesure de la **taille** des individus a également permis (ex : cas du *Sea Empress* et du *Braer*) d'identifier la survenance d'effets *via* l'évolution de la structure démographique (distribution des fréquences de taille/classes d'âge, taux de croissance entre les divers événements d'échantillonnage, phénomènes de recrutement).

Notons qu'il convient de **s'assurer de l'acquisition et de la disponibilité de données pertinentes relatives au niveau de souillure** des substrats durs suivis ou à **la contamination** à leur voisinage immédiat –soit en intégrant ce volet dans l'étude écologique, soit en bénéficiant de résultats produits dans le cadre d'une étude distincte mais **coordonnée**² et faisant partie du programme d'évaluation.

La stratégie :

- on comparera les paramètres mesurés en des stations polluées :
 - o avec des données analogues/comparables (i) antérieures à la pollution (références) ou (ii) issues, s'il est possible d'en établir, de sites « contrôle » (non pollués, Cf. plus bas), ou ;
 - o entre stations présentant des niveaux de contamination différents (examen des relations avec les teneurs en HAPs, par exemple) et ;
 - o entre les dates successives d'échantillonnages, réalisés **tous les 2 à 3 mois durant au moins 1 année** (intégration d'un cycle reproductif), de manière à identifier à moyen terme d'éventuels impacts, ou la survenance de processus de restauration (ex : comparaison des données à t_{+1an}).
- naturellement élevée en milieu rocheux, on rappellera la nécessité de **limiter les biais liés à la variabilité spatiale**, en échantillonnant préférentiellement des stations aussi similaires que possible d'un point de vue de facteurs environnementaux : pente, exposition³/orientation, complexité structurelle du substrat (anfractuosités, blocs, etc.) ;
- la poursuite de ce type de suivi au-delà d'1 année est à envisager en fonction des résultats obtenus, moyennant d'éventuelles adaptations (réduction de la fréquence d'échantillonnage, sélection d'un certain nombre de sites, etc.) à considérer au cas par cas.

Les protocoles d'échantillonnage :

- on recommandera l'adoption, autant que possible, des méthodologies proposées dans le cadre des **suivis existants en la matière**, par exemple celle proposée dans le cadre du REBENT (suivi stationnel de la faune des estrans rocheux)⁴ ;

¹ Ex : Moules, huîtres, balanes

² (Cohérence des sites et des fréquences d'échantillonnage).

³ Mode abrité en estuaire, essentiellement.

⁴ http://ftp.ifremer.fr/ifremer/delao.snapshot/nightly.1/gt_benthos_dce/FT05-2003-01.pdf

- classiquement, l'estimation quantitative/semi-quantitative des abondances (comptages, taux de recouvrement) de la macrofaune épibenthique de substrats rocheux est réalisée au sein de quadrats d'une surface unitaire de 0.1 m², à raison idéalement d'une dizaine de réplicats par point au sein desquels sont mesurés les paramètres mentionnés précédemment ;
- pour l'évaluation des abondances, on recommandera ici la réalisation d'échantillonnages non destructifs au sein de quadrats permanents définis sur des substrats aussi similaires que possible, afin de minimiser l'introduction de biais liés à la variabilité spatiale de l'habitat. Dans l'hypothèse de mesures de la taille des individus d'une population, un prélèvement destructif peut être réalisé au sein de quadrats aléatoires dont le nombre de réplicats est à évaluer et adapter (Cf. point suivant) ;
- Le choix des outils et du plan d'échantillonnage (nombre de stations et réplicats satisfaisant à la collecte d'un nombre significatif d'individus et à réalisation d'épreuves statistiques, etc.), reste à **adapter/préciser au cas par cas en lien étroit avec les caractéristiques des populations sélectionnées**. La prise en compte de ces éléments (ex : dimension, distribution, abondances des individus)⁵ dans **la définition des modalités d'échantillonnage** est un aspect connu des experts en écologie benthique ;
- Le cas échéant et si besoin, les échantillonnages (*n* quadrats) peuvent être réalisés, en chaque station, le long d'une radiale hypsométrique, notamment en échantillonnant les niveaux médiolittoral supérieur et moyen (isolignes correspondant respectivement aux ceintures à *Pelvetia canaliculata* et à *Fucus vesiculosus/Ascophyllum nodosum*).

Les avantages :

Dès lors qu'elle est ciblée sur des espèces relativement abondantes, de grande taille et peu mobiles (ex : patelles), cette approche présente l'avantage d'une **mise en œuvre relativement aisée** (logistique réduite), qui ne réclame pas de mesures ou d'analyses complexes des données, ni d'un niveau d'expertise (taxonomie) rédhibitoire (tri et détermination d'un cortège d'espèces, par exemple). De ce fait, elle peut permettre d'obtenir des résultats à relativement court terme (quelques mois après son lancement).

Les spécificités en estuaires de la Seine, de la Loire et de la Gironde (à développer ultérieurement)

❖ **I.3.2 Approche écotoxicologique, au niveau d'espèces ciblées**

Il est possible de mettre en œuvre des approches semblables à celles utilisées pour les invertébrés de la macrofaune de substrat meuble (Cf. **I.2.2**), visant à rechercher l'apparition d'effets sub-létaux chez les individus d'une espèce épibenthique de substrats durs donnée. Ces effets peuvent se manifester à différentes échelles (ex : du niveau moléculaire à l'individu) et sont plus ou moins spécifiques du polluant incriminé.

Par conséquent, les techniques (ex : biomarqueurs d'effet génotoxique, histopathologie, etc.) potentiellement employables sont nombreuses, et leur pertinence peut varier selon les spécificités de la pollution (caractéristiques du déversement, composition et devenir de l'hydrocarbure, etc.).

Ainsi, les recommandations formulées dans ce paragraphe :

- portent sur **les grands traits d'une approche générale a minima** ;
- sont en partie fondées sur l'expérience identifiée à ce jour en termes de pollutions pétrolière, elles ne se veulent par conséquent **ni exhaustives ni restrictives**.

Le choix des espèces :

⁵ (Ex : de l'ordre de plusieurs mm, de l'ordre du cm ; etc. ; de quelques spécimens à plusieurs dizaines -voire centaines- au m² ; distribution régulière ou agrégative ; etc.)

En dehors des recommandations générales à observer (Cf. plus haut **Considérations générales - difficultés**), les critères de sélection des organismes sont similaires à ceux évoqués dans la section précédente (Cf. **I.2.1**) à savoir :

- leur **sensibilité** connue aux pollutions par hydrocarbures (induction probable d'une réponse) ;
- l'**exposition potentielle** de l'espèce au polluant ;
- leur **représentativité** de l'aire affectée ;
- éventuellement leur **statut** d'espèce consommée/commerciale et/ou patrimoniale.

Sur les substrats durs des estuaires du nord-est atlantique, quelques espèces d'invertébrés de la macrofaune présentent ces caractéristiques et sont *a priori* des **candidats potentiels** pour les suivis écotoxicologiques, par exemple :

- les bivalves *Mytilus edulis* et *Crassostrea gigas* communs sur les substrats durs estuariens, communément présentes en estuaire, au moins en domaine polyhalin ;
- les gastéropodes *Patella vulgata* et *Littorina littorea*, au moins en domaine polyhalin ;

A l'évidence, d'autres espèces-candidates peuvent être sélectionnées sur la base des **connaissances existantes** (ex : inventaires, suivis en cours...) quant au macro benthos de l'aire affectée (représentativité, biologie, etc.).

Dans le cas des substrats durs, le suivi d'**espèces sentinelles** peut être recommandé, s'agissant notamment chez les invertébrés benthiques du bivalve filtreur *Mytilus* sp., ou d'**espèces exploitées/consommées** (*C. gigas*) par ailleurs souvent ciblées dans le cadre de suivis sanitaires (potentiellement pourvoyeurs de données de contamination)

Les paramètres à mesurer :

En premier lieu, si des **séries de données** collectées dans le cadre d'un suivi en routine de la qualité du milieu estuarien, concernant un biomarqueur et une espèce particuliers, sont disponibles dans l'aire affectée, il est recommandé d'examiner rapidement après l'accident la survenance éventuelle d'**anomalies dans les fluctuations de base** dudit biomarqueur, même si ce dernier n'est *a priori* pas spécifique d'une pollution accidentelle par hydrocarbures.

L'évaluation de l'effet biologique d'un polluant sur des mollusques bivalves sentinelles (moules, *Mytilus* sp.) ou d'autres espèces potentiellement candidates (citées précédemment) peut être appréhendée *via* l'**étude croisée d'une batterie de biomarqueurs**, spécifiques ou non de l'impact lié aux HAPs.

Si possible, et en fonction du contexte de l'accident (ex : applicabilité aux espèces présentes), on sélectionnera préférentiellement ces biomarqueurs sur la base des **recommandations** formulées par des groupes d'experts internationaux (ex : *Joint Assessment Monitoring Programme*, de la Convention OSPAR ; *Conseil international pour l'exploration de la mer* (CIEM/ICES), etc.).

Dans cet esprit, on suggèrera l'application en priorité d'une batterie de biomarqueurs (consignés dans le tableau ci-dessous) :

- d'**exposition** reconnus comme témoins d'un contact avec les contaminants majeurs des systèmes aquatiques, dont les hydrocarbures ;
- de **génotoxicité** ;
- d'**effets** (non spécifiques, néanmoins, d'un type de contaminant). ;
- et associant l'investigation d'effets à **court-terme** (heures, jours), et à **moyen/long-terme** (semaines, mois).

	Biomarqueurs	Signification biologique	Recommandations (JAMP ou CIEM)	Application sur les groupes taxonomiques		
				Bivalves	Gastéropodes	Crustacés
Exposition	Acétyl Choline Estérase (réponse à court terme)	Effet neurotoxique : marqueur de stress général indiquant le statut physiologique de l'organisme	Oui	X	X	X
	Métallothionéine (réponse à court terme)	Détoxication des métaux et de composés organiques aromatiques inducteurs de stress oxydatif cellulaire	Oui (méthode additionnelle)	X	X	X
Génotoxicité	Micronoyaux (réponse à long terme)	Formation suite à la cassure de brins d'ADN par exposition à des substances clastogéniques et aneugéniques	Oui	X	X	X
	Test comètes (réponse à long terme)	Cassures de brins d'ADN	Oui (méthode additionnelle)	X	X	X
Effets	Stabilité lysosomale (réponse à court et long terme)	Domages subcellulaires. Bon prédicteur de pathologies : propose un lien entre exposition et effets pathologiques	Oui	X	X	X
	Histopathologie (réponse à long terme)	Réponses générales témoins d'un effet pathologique (ex : glandes digestives, gonades)	Oui	X	X	X

Récapitulatif des recommandations des biomarqueurs principaux pour les invertébrés benthiques (N.B. : indications établies sur la base de l'expérience, suggérant leur adaptation à la problématique présente. Cette liste est moins restrictive qu'indicative).

La stratégie

- on comparera les réponses biologiques obtenues :
 - o avec des données analogues et comparables : (i) antérieures à la pollution (références) ou ; (ii) issues, s'il est possible d'en établir, de sites « contrôle » (non pollués), et/ou ;
 - o entre des stations présentant des niveaux de contamination différents (examen des relations avec les teneurs en HAPs, par exemple) et ;
 - o entre les dates d'échantillonnages successifs, réalisés à une fréquence adaptée à l'échelle temporelle du processus biologique examiné (i.e. élevée pour des biomarqueurs de réponses initiales à court-terme, plus faible pour des réponses à long terme)
- on rappellera l'intérêt de s'assurer de l'acquisition et de la disponibilité de données pertinentes relatives à la **contamination des sédiments adjacents, de la masse d'eau** et également du **biote** sur les stations suivies –soit en intégrant ce volet dans l'étude

écotoxicologique, soit en bénéficiant de résultats produits dans le cadre d'une étude distincte mais coordonnée et faisant partie du programme d'évaluation. Pour les invertébrés des substrats durs, on soulignera l'existence du réseau d'observation de la contamination chimique du littoral (ROCCH, ex-RNO) coordonné par l'Ifremer, qui permet d'obtenir des données de contamination sur les trois matrices (eau, sédiment, biote) dans les masses d'eaux de transition et côtières.

- de même, on rappellera également l'intérêt de combiner les réponses des biomarqueurs aux données environnementales acquises sur les stations suivies (température, salinité, oxygène dissous...);
- la poursuite au-delà d'un premier cycle annuel du suivi écotoxicologique est à envisager selon les résultats (ex : réponse effective et persistante), moyennant d'éventuelles adaptations (réduction de la fréquence d'échantillonnage, suivi de certains biomarqueurs 'chroniques', sélection d'un certain nombre de sites, etc.).

Remarques additionnelles :

- **Les biotests**

De la même manière que souligné précédemment (Cf. **I.2.2**), les bioessais peuvent apporter rapidement des éléments d'évaluation du risque ainsi que des éléments d'interprétation des résultats des études d'impacts.

Cette méthode additionnelle à celle de recherche *in situ* d'impacts sur les organismes, populations ou communautés est à recommander via la mise en œuvre d'une batterie de bioessais, comparable à celle déjà proposée.

On pourra ainsi se reporter à la liste indicative présentée dans la section précédente (Cf. **I.2.2**), moyennant une adaptation à la problématique présente si besoin.

Les spécificités en estuaires de la Seine, de la Loire et de la Gironde (à développer ultérieurement)

❖ **I.3.3 Approche écologique, au niveau des communautés**

Comme pour les études en substrats meubles, le suivi d'un certain nombre de paramètres descripteurs de base des communautés macro benthiques de substrats rocheux (richesse spécifique, abondances, etc.) peut permettre d'évaluer des évolutions en termes de qualité de l'environnement benthique ; Cependant, l'expérience établie en la matière est largement relative au **milieu marin, et l'approche décrite ci-après est a priori d'une application restreinte limitée aux domaines polyhalin, voire éventuellement mésohalin.**

Les protocoles d'échantillonnage

Dans la mesure du possible, il est recommandé de veiller à une cohérence méthodologique avec les protocoles adoptés dans le cadre des suivis existants au niveau national, en l'occurrence celui du ReBent notamment⁶ -voire communautaires (ex : DCE).

Concernant les substrats rocheux intertidaux, on recommandera les grandes lignes suivantes :

- en chaque station de suivi, un échantillonnage effectué si possible aux niveaux **médiolittoral** supérieur et moyen (isolignes correspondant respectivement aux ceintures à *Pelvetia canaliculata* et à *Fucus vesiculosus/Ascophyllum nodosum*) ;
- un échantillonnage **non destructif** (*i.e.* sans prélèvement), en chaque niveau, de 3 à 10 **quadrats permanents** (*i.e.* fixes, soigneusement marqués et localisables –par exemple géoréférencés par GPS) d'une surface unitaire de 0.1 m² et définis sur des surfaces aussi

⁶ Hily C., Grall J., 2006. Suivi stationnel des estrans rocheux (faune). FT-05-2006-01.

http://www.rebent.org//medias/documents/www/contenu/documents/FT05_Hily_Rebent_Rocheux_2006.pdf

homogènes que possible (exposition, anfractuosités, surplombs, etc), ceci pour **minimiser les biais liés à la variabilité spatiale de l'habitat** ;

- concernant le suivi des espèces éventuellement abondantes et de petite taille (ex : balanes, petites espèces de gastéropodes), un sous-échantillonnage aléatoire est à envisager au sein de sous-quadrats définis par un maillage des quadrats de 0.1 m².

Les paramètres

Il existe relativement peu d'indicateurs fiables et établis d'un impact en milieu benthique rocheux, et l'expérience en matière d'études suite à des pollutions par hydrocarbures a montré la difficulté de distinguer les variations naturelles de celles imputables à un effet de l'accident –particulièrement en l'absence de données de référence.

Cependant, l'évaluation des effets d'une pollution accidentelle sur la composition l'épifaune benthique peut être tentée *via* le suivi des fluctuations, au sein de chaque échantillon/quadrat :

- de la **liste/nombre des taxons présents**, identifiés si possible au niveau de l'espèce, notamment de ceux **caractéristiques** (les plus fréquents/abondants) des sites étudiés ;
- des **abondances** des espèces présentes, établies :
 - o par l'évaluation des **taux de recouvrement** des espèces de la faune et de la flore fixée (indice semi-quantitatif), en cohérence avec les programmes préexistants le cas échéant (ex : Rebent ; Cf. tableau ci-dessous) ;
 - o par **comptage** des individus d'espèces fixées ou mobiles, au sein des quadrats de 0.1 m² pour la faune de grande taille (ex : patelles), ou au sein de sous-quadrats pour la faune de petite taille.

Indice de recouvrement	Pourcentage de recouvrement
0	0 (absence)
1	0-5 %
2	5-25 %
3	25-50 %
4	50-75 %
5	75-100 %

Correspondances entre pourcentages et indices de recouvrements, telles que définies dans le cadre du Rebent (Source : Hily C., Grall J., 2006. *Suivi stationnel des estrans rocheux (faune)*. FT-05-2006-01.

http://www.rebent.org//medias/documents/www/contenu/documents/FT05_Hily_Rebent_Rocheux_2006.pdf

La stratégie

- on comparera les données obtenues et regroupées par station :
 - o avec des données analogues/comparables (i) antérieures à la pollution (références) ou (ii) issues, s'il est possible d'en établir, de sites « contrôle » (non pollués), et/ou ;
 - o entre des stations présentant des niveaux de souillure ou de contamination différents et ;
 - o entre les dates d'échantillonnages successifs, réalisés saisonnièrement durant au moins 1 année (intégration d'un cycle reproductif), de manière à identifier à moyen terme d'éventuels impacts, ou la survenance de processus de restauration (ex : comparaison des données à t_{+1an}).
- les comparaisons et le suivi peuvent porter sur divers critères, notamment :
 - o la liste des taxons les plus abondants (caractérisant les fonds) ;
 - o les abondances relatives des principales espèces (ex : patelles, balanes, littorines) ;
- il convient de s'assurer de l'acquisition et de la disponibilité de données relatives à la souillure des substrats durs suivis, ou à la contamination au voisinage immédiat –soit en intégrant ce volet dans l'étude écologique, soit en bénéficiant de résultats produits dans

- le cadre d'une étude distincte mais coordonnée et faisant partie du programme d'évaluation ;
- la poursuite de ce type de suivi au-delà d'1 année est à envisager en fonction des résultats obtenus à t_{+1an} , moyennant d'éventuelles adaptations (réduction de la fréquence d'échantillonnage, sélection d'un certain nombre de sites, etc.) à considérer au cas par cas. Une fréquence minimum de 2 échantillonnages par an est recommandée (au début de printemps (mars-avril) et la fin de l'été (septembre-octobre)).

Les avantages et inconvénients

Si l'approche vise à produire une vue globale quant à l'état des communautés épibenthiques de substrats durs intertidaux, elle présente le désavantage de requérir un niveau d'expertise éventuellement élevé (ex : taxonomie) et nécessite un certain délai pour le traitement des résultats (détermination, comptages, etc.). On rappellera également les réserves formulées plus haut (Cf. « Considérations générales – difficultés » en début de § 1.3) quant à la difficulté d'identification nette d'impacts, en lien avec la variabilité naturelle élevée au sein de ce compartiment.

Les spécificités en estuaires de la Seine, de la Loire et de la Gironde (à développer ultérieurement)