HAL
open science

La bioremédiation in situ des parcs conchylicoles par les éponges marines est-elle envisageable ?

Charline Gentric

To cite this version:

Charline Gentric. La bioremédiation in situ des parcs conchylicoles par les éponges marines est-elle envisageable ?. Biotechnologie. Université de Bretagne Sud, 2016. Français. NNT : 2016LORIS399 . tel-01533991

HAL Id: tel-01533991

https://theses.hal.science/tel-01533991v1

Submitted on 7 Jun 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

THESE / UNIVERSITE DE BRETAGNE SUD
Sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BRETAGNE SUD

Mention : biotechnologie
Ecole doctorale des Sciences de la Mer

Présentée par

Charline Gentric

Préparée à l'EA 3884
Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines

La bioremédiation *in situ* des parcs conchylicoles par les éponges marines est-elle envisageable ?

Thèse soutenue le 6 juin 2016, devant le jury composé de :

Nathalie COCHENNEC-LAUREAU
Cadre de recherche, Ifremer, rapporteur

Thierry CHOPIN
Professeur, Université de New-Brunswick, rapporteur

Christelle CAPLAT
Maître de conférences, Université de Caen, examinateur

Philippe HESS
Cadre de recherche, Ifremer, examinateur

Gaël LE PENNEC
Maître de conférences, Université de Bretagne Sud, examinateur

Karine REHEL
Professeur, Université de Bretagne Sud, directrice de thèse

Pierre SAULEAU
Maître de conférences, Université de Bretagne Sud, directeur de thèse

Sonia GACHELIN
Comité Régional Conchylicole de Bretagne Sud, invitée

Doctorat UBL - ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA MER

THESE pour obtenir le grade de docteur délivré par :

L'Université de Bretagne Sud

Spécialité doctorale « Biotechnologies »

La bioremédiation *in situ* des parcs conchylicoles par les éponges marines est-elle envisageable ?

Par Charline GENTRIC

Préparée à l'EA 3884 Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines (LBCM)
Université Bretagne-Sud, LBCM, IUEM, F-56100 Lorient, France

[La mer est salée parce qu'il y a des morues dedans.

Et si elle ne déborde pas, c'est parce que la Providence,

dans sa sagesse, y a placé aussi des éponges.]

Alphonse Allais

Remerciements

Quatre années de travail qui se terminent.

Quatre années qui n'auraient pas été possibles sans la présence de toutes ces personnes.

Pour leur soutien et leurs encouragements, je remercie avant tout mes parents et mon frère. Merci d'avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Vous avez toujours été là pour moi et je vous en serai à jamais reconnaissante.

Merci à toi Christophe pour ta présence à mes côtés. Les soirées passées à essayer de t'expliquer ce que sont les milieux de culture bactériens ou la PCR vont me manquer ! Ou pas ! Et merci aussi pour ce magnifique rayon de soleil entré dans notre vie le 23 juin 2015. Nous sommes passés par des moments difficiles. Aujourd'hui, Sarah et moi allons bien toutes les deux mais si j'ai pu terminer cette thèse c'est en partie grâce à toi, à ton sang-froid mais aussi à ta tête de mule grâce à laquelle tu as su faire face aux médecins.

Merci Sarah pour ton aide lors de la rédaction. Tes conseils m'ont été très précieux même si je ne comprends pas encore tout ton charabia et même si rédiger avec un petit bébé dans les bras n'est pas toujours évident ! Ta présence est une réelle motivation.

Mes sincères remerciements à mon directeur de thèse Pierre Sauleau qui a su me donner le gout de la recherche. Travailler à tes côtés fut un plaisir. Ta disponibilité et ton humour font de toi un excellent encadrant ! Merci également à Karine Réhel, sans toi cette thèse n'aurait pas été possible.

Merci à Alain Dufour de m'avoir accueillie au sein de LBCM. Merci également à tous les membres du laboratoire, titulaires, doctorants et ingénieurs pour votre aide. Merci à Florence le Sann pour avoir géré mes déplacements en congrès. Merci aussi à Léa qui m'a aidée pendant ses 2 mois de stage. Et bonne chance à vous, Sterenn et Tiffany, hi hi hi !!

Je souhaiterai exprimer ma gratitude à Gwenola Horel et Florence Habasque pour tout le matériel qu'elles m'ont prêté (donné ?) lorsque j'oubliais de passer commande et que je devais urgemment faire une manip ! Merci également de m'avoir aidée dans la préparation des TP. Merci à Anthony Magueresse pour les images MEB.

Ma clauclau, merci à toi pour ton dynamisme et ta joie de vivre. Une belle amitié est née de cette aventure. Ensemble, nous en avons vécu des péripéties ! Le bruit de tes talons dans le couloir va me manquer ! Merci aussi de ton aide pour l'écriture de ce manuscrit.

J'adresse mes sincères remerciements à l'équipe de l'IFREMER de La Tremblade. Merci à Tristan Renault de s'être intéressé à ces travaux et de m'avoir permis de travailler sur le virus OsHV-1, à Nicole Faury pour m'avoir formée à la PCR en temps réel et à Agnès Travers pour m'avoir fourni la souche de *Vibrio aestuarianus*. Merci également à Philippe-Jacques Hatt de m'avoir accueillie sur le site de Bouin ainsi qu'à toute son équipe : Christophe, Mathias, Max, Béatrice, Karen, Vincent, Hubert et Christian. J'ai apprécié le temps passé parmi vous.

Toute ma gratitude vont à Christelle Caplat, Philippe Hess et Gaël Le Pennec qui ont accepté de juger mes travaux et à Nathalie Cochennec-Laureau et Thierry Chopin d'avoir accepté de faire partie de mon jury et pour le temps consacré à la lecture de ce manuscrit.

Merci également à la région Bretagne et au conseil général du Morbihan pour avoir financé cette thèse. Merci également au Fond Européen de la Pêche (Pays d'Auray, axe 4) pour avoir financé une partie des travaux. Merci à Jean-François Taugé, Denis Le Baron et Dominique Perraud pour nous avoir donné accès à leur parc pour réaliser les expérimentations mais aussi pour nous avoir approvisionnés en éponge et en huître. Merci à Sonia Gachelin pour ses précieux conseils sur l'ostréiculture et à la capitainerie du port d'Etel pour avoir accepté nos cultures d'éponges sous leurs pontons.

Pour finir un grand merci à tous mes amis qui ont fait semblant de lire ce manuscrit pour obtenir en échange un coup à boire !

Table des matières

Liste des figures **1**

Liste des tables **4**

Liste des abréviations **5**

Préambule **6**

I. Introduction **9**

1.1. La qualité du milieu marin et du littoral 12

1.2. La filière économique ostréicole française 17

1.3. Les éponges marines, de la bioindication à la bioremédiation 30

1.4. La spongiculture 37

1.5. Hypothèses de travail 42

1.6. Objectifs du travail 52

II. Matériels et méthodes **53**

2.1. Matériel biologique 57

2.2. Matériel d'aquariophilie 60

2.3. Spongiculture 61

2.4. Expérience de rétention *d'E.* coli et de *V. aestuarianus* 65

2.5. Expérience de rétention du plomb 69

2.6. Expérience de rétention du virus OsHV-1 72

2.7. Microscopie Electronique à Balayage (MEB) 75

2.8. Analyses statistiques 75

III. Résultats **77**

3.1. Culture de l'éponge *H. perlevis* en milieu ostréicole 78

3.1.1. Introduction 80

3.1.2. Identification de l'éponge 81

3.1.3. Sites de culture 82

3.1.4. Transplantation et suivi de croissance 84

3.1.5. Etude de la colonisation du PLA par les acteurs du biofouling 86
3.1.6. Discussion 93
3.1.7. Conclusion du chapitre 96
3.2. Evaluation *in vitro* des propriétés de filtration et de rétention d'*H. perlevis* 97
3.2.1. Introduction 98
3.2.2. Les bactéries *E. coli* et *V. aestuarianus* 99
3.2.3. Le plomb 116
3.2.4. Le virus OsHV-1 128
3.2.5. Conclusion du chapitre 132

IV. Valorisation des travaux : projet de création d'entreprise 133
4.1. Introduction 136
4.2. Le service proposé 137
4.3. Le marché visé 142
4.4. La mise en œuvre opérationnelle 147
4.5. L'état d'avancement du projet 149
4.6. Conclusion du chapitre 152

Conclusion générale et perspectives 153
Bibliographie 159
Annexes 183

Liste des figures

Partie I.

1.1. Cycle biologique de l'huître associé à son cycle d'élevage 18
1.2. Bassin ostréicole 21
1.3. Qualité microbiologique pour les coquillages non fouisseurs 22
1.4. Les différentes espèces d'huîtres produites en France au cours du XXème siècle 24
1.5. Production extensive d'épinards d'eau en Chine associée à la culture de poissons et crevettes d'eau douce 28
1.6. Schématisation de l'AMTI pratiquée au Canada 29
1.7. Schéma général d'une éponge marine et de ses différentes couches cellulaires 32
1.8. Différentes techniques de culture 40
1.9. Le département du Morbihan, Bretagne Sud 42
1.10. Coquille de *Nassarius reticulatus* perforée d'une multitude de trous à cause de *C. celata* 43
1.11. *H. panicea* accrochée aux bouchots (rivière de Penerf) et aux tables conchylicoles (rivière d'Etel) 44
1.12. L'éponge marine invasive *C. ciocalyptoides* (rivière d'Etel) observée durant le printemps 2011 45
1.13. Les spécimens *d'H. perlevis* mesurent environ une 20aine de cm de diamètre sur 10 cm d'hauteur 47
1.14. Schéma des spicules trouvés chez *H. perlevis* 48
1.15. Structure chimique de l'hymenialdisine et de la debromohymenialdisine 49
1.16. Structure chimique de l'hymenidin et de l'hymenin 50
1.17. Structure chimique de l'hymenistatin et de la monamphilectine 51

Partie II.

2.1. Photographies des aquariums dans lesquels les éponges *H. perlevis* sont maintenues en vie et ceux dans lesquels sont réalisées les expérimentations 60
2.2. Localisation des cultures à Locoal-Mendon et Locmariaquer - Morbihan 61
2.3. Les éponges sont cultivées selon la méthode de culture en poche 62
2.4. Photographie d'une plaque de PLA 63

Partie III.

3.1. Photographies de spicules mégasclères d'*H. perlevis* prises au microscope optique 80
3.2. Photographies satellite de la concession de Mr Taugé à Locmariaquer et de la concession de Mme Perraud à Locoal-Mendon 82
3.3. *H. perlevis* en sortie d'un bassin ostréicole 83
3.4. Photographies des éponges présentes sur le site de Locoal-Mendon 84
3.5. Taux de survie à 6 mois (m+6) et 12 mois (m+12) des éponges transplantées à Locmariaquer (A) ou à Locoal-Mendon (B) 84

3.6. Culture en poche 85
3.7. Etat de la culture d'*H. perlevis* à Locmariaquer, 1 an après la mise en place 85
3.8. Croissance des fragments d'*H. perlevis* sur les 2 sites de culture 86
3.9. Photographies des plaques en PLA et du macrofouling après une immersion en mer de 90 jours, 6 mois et 3,5 ans 87
3.10. Pourcentage de recouvrement des plaques de PLA immergées en mer par les macroorganismes marins 88
3.11. Observation des plaques en PLA par MEB après une immersion en mer de 30 jours, 60 jours et 365 jours 89
3.12. Identification macroscopique de la souche *Pseudoalteromonas* sp. sur milieu gélosé LBS 90
3.13. Cinétique de croissance de *Pseudoalteromonas* sp. en erleynmeyer à 18 °C dans le milieu LBS 91
3.14. Surface du PLA après 2 h en EDMA stérile (A) et adhérence de la bactérie *Pseudoalteromonas* sp. sur la surface du PLA, après 2 h d'adhérence en milieu EDMA à 18 °C en condition statique (B) observées au MEB 92
3.15. Surface du PLA après 6 mois en EDMA stérile (A) et biofilm formé par *Pseudoalteromonas* sp. après 6 mois en milieu EDMA à 18 °C sous agitation (B) observés au MEB 92
3.16. Cinétiques de croissance d'*E. coli* (milieu LB) et de *V. aestuarianus* (milieu LBS) en erleynmeyer à 18 °C 99
3.17. Concentration en *E. coli* et de *V. aestuarianus* dans l'EDMA sur une semaine après ensemencement initial des aquariums avec 2.10^8 bactéries/ml 100
3.18. Cinétique de croissance d'*E. coli* (LB) et de *V.* aestuarianus (LBS) en microplaque à 18 °C en fonction des différentes concentrations de l'extrait brut d'*H. perlevis* 102
3.19. Concentration en *E. coli* dans les aquariums (5 l) en fonction du temps en présence de l'éponge *H. perlevis* (25 g) 103
3.20. Efficacité de rétention d'*E. coli* par l'éponge *H. perlevis* en fonction du temps 103
3.21. Taux de clairance *d'E. coli* par l'éponge *H. perlevis* en fonction du temps 104
3.22. Concentration en *V. aestuarianus* dans les aquariums (5 l) en fonction du temps en présence de l'éponge *H. perlevis* (25 g) 105
3.23. Efficacité de rétention de *V. aestuarianus* par l'éponge *H. perlevis* en fonction du temps 105
3.24. Taux de clairance de *V. aestuarianus* par l'éponge *H. perlevis* en fonction du temps. 106
3.25. Concentrations en *E. coli* dans les huîtres (75 g) en présence ou non de l'éponge *H. perlevis* (75 g) 107
3.26. Concentration en *V. aestuarianus* dans les huîtres (75 g) en présence ou non de l'éponge *H. perlevis* (75 g) 108
3.27. Concentration en *E. coli* et en *V. aestuarianus* dans les éponges lors des tests de décontamination bactérienne vis-à-vis des huîtres 110
3.28. Observation au MEB de la surface des éponges lors des expériences de décontamination 111

3.29. Concentration en a) *E. coli* et en b) *V. aestuarianus* retenus par l'éponge et libérés dans l'eau des aquariums après 3 jours de filtration d'une eau contaminée 112

3.30. Effet du plomb sur la mortalité de l'éponge *H. perlevis* exposée durant 7 jours à une gamme de concentration en plomb dissous 117

3.31. Photographies, après dépôt de la fluorescéine, des aquariums 118

3.32. Fluorescence mesurée au-dessus des ramifications d'*H. perlevis* après 2 h d'exposition au plomb aux concentrations de 15 et 30 mg/l 119

3.33. Comparaison des capacités d'*H. perlevis* à filtrer l'eau après une contamination de 2 h en plomb (avant rinçage) et après une contamination de 2 h en plomb suivi d'un passage de 2 h en EDMA exempte de plomb (après rinçage) 119

3.34. Concentration en plomb dans des aquariums d'eaux contaminées en fonction du temps en présence de l'éponge *H. perlevis* (25 g) 120

3.35. Efficacité de rétention du plomb par l'éponge *H. perlevis* en fonction 121

3.36. Taux de clairance du plomb par l'éponge *H. perlevis* en fonction du temps 122

3.37. Concentration en plomb dans les éponges (75 g) après une exposition au plomb lors d'une contamination aigue (15 mg Pb/l) ou d'une contamination aigue cumulée (15 mg Pb/l/j) 123

3.38. Concentration en plomb dans l'eau des aquariums (5 l) après transfert d'éponges contaminées (75 g) a) de façon aigue par 15 mg Pb/l et b) de aigue sur trois jours par 15 mg Pb/l/j pendant 3 jours 124

3.39. Concentration en plomb dans les huîtres fraîches en présence ou non de l'éponge *H. perlevis* (75 g) 125

3.40. Concentration en plomb dans les éponges lors des tests de décontamination du plomb vis-à-vis des huîtres 126

3.41. Suivi dans le temps de la quantité d'ADN viral dans les éponges en présence d'huîtres saines 130

3.42. Suivi dans le temps de la quantité d'ADN viral dans les éponges en présence d'huîtres moribondes 131

Partie IV.

4.1. Schéma du bassin en béton avec chicane centrale servant à la culture des greffons d'éponges 137

4.2. Schéma des supports de culture utilisés pour la culture d'éponges marines. 139

4.3. Description du procédé d'épuration biologique et écologique des eaux marines 141

4.4. L'accès au marché : les clients potentiels 144

4.5. Répartition du marché mondial de l'environnement 148

4.6. Schéma du modèle économique 151

Liste des tables

Partie I.

1.1. Classement des zones ostréicoles selon leur niveau de salubrité par rapport au dénombrement d'*E. coli* (E.C.), bactérie indicatrice d'une contamination fécale 20

1.2. Concentrations maximales en éléments traces métalliques admises dans les coquillages destinés à la consommation humaine 20

1.3. Présentation des éponges collectées en Bretagne Sud 46

1.4. Molécules isolées d'*H. aldis* 50

Partie III.

3.1. Caractéristiques de la croissance de *Pseudoalteromonas* sp. 91

3.2. Caractéristiques de la croissance d'*E. coli* et de *V. aestuarianus* 99

3.3. Résultats des tests effectués sur *E. coli* et *V. aestuarianus* 106

3.4. Concentrations bactériennes dans les huîtres après 72 h de filtration en fonction de la présence ou non d'éponge 109

Partie IV.

4.1. Quantités de matériaux nécessaires à la construction du bassin 138

4.2. Etapes du développement du projet de création d'entreprise 152

Liste des abréviations

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AMTI	Aquaculture Multi-Trophique Intégrée
CNC	Comité National de la Conchyliculture
CR	Taux de Clairance (Clearance Rate)
CRC	Comité Régional de la Conchyliculture
DCE	Directive Cadre sur l'Eau
DCSMM	Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin
DO	Densité Optique
E. C.	*Escherichia coli*
EDMA	Eau De Mer Artificiel
ETM	Eléments Traces Métalliques
GIZC	Gestion Intégrée des Zones Côtières
GPS	Global Positioning System
IFREMER	Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer
LB	Lysogeny Broth
LBCM	Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines
LBS	Lysogeny Broth Salt
NPP	Nombre le Plus Probable
OMI	Organisation Maritime Internationale
OsHV-1	Ostreid Herpes Virus type 1
PCR	Réaction en Chain par Polymérase
PE	Polyéthylène
PLA	Poly (Lactic Acid)
PP	Polypropylène
PVC	Polychlorure de Vinyle
Q-PCR	Réaction en Chaîne par Polymérase Quantitative
R	Efficacité de rétention
REBENT	REseau de surveillance BENthique
REMI	REseau de contrôle MIcrobiologique
REPHY	REseau d'observation et de surveillance du PHYtoplancton et des phycotoxines
ROCCH	REseau d'Observation de la Contamination CHimique
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SAA	Spectrométrie d'Absorption Atomique
TBX	Tryptone sels Biliaires X-Glucuronide
TCBS	Thiosulfate-Citrate-Bile-Saccharose
TS	Tryptone Sel
UFC	Unité Formant des Colonies

Préambule

La conchyliculture concerne l'élevage des huîtres (ostréiculture), des moules (mytiliculture) et dans une moindre mesure des palourdes (vénériculture), des coques (cérastoculture), des coquilles Saint-Jacques (pectiniculture) et des ormeaux (halioticulture). Cette activité est la principale branche de l'aquaculture française. Avec près de 49 716 concessions, la France se classe première au niveau européen avec 90 % de la production conchylicole (CNC, 2014). En 2009, la production européenne s'élevait à près de 200 000 tonnes de mollusques et le secteur générait 17 200 emplois, pour un chiffre d'affaire de 774 millions d'euros. En particulier, l'ostréiculture, avec plus de 2 900 entreprises, produit 85 000 tonnes par an. Trente-cinq pour cent de la production ostréicole est d'origine bretonne (CRC de Bretagne Sud, 2012).

La filière ostréicole est dépendante de la qualité de l'eau tant au niveau de la productivité que du risque sanitaire pour le consommateur. Il arrive que les mollusques soient contaminés par des déversements dans les eaux côtières de rejets agricoles, industriels ou domestiques insuffisamment traités (Le Saux & Pommepuy, 2003 ; Gifford *et al.*, 2004). Ainsi, de nombreux polluants minéraux (éléments traces métalliques), organiques (pesticides, médicaments, hydrocarbures aromatiques polycycliques, polychlorobiphényles, toxines de dinoflagellés) et biologiques (bactéries, virus) s'accumulent dans la colonne d'eau, dans les huîtres et par conséquent dans la chaîne alimentaire. Principalement, les bactéries fécales présentent dans les mollusques inquiètent les professionnels car ces pathogènes opportunistes représentent un danger pour la santé humaine à travers leur consommation. De ce fait, les ostréiculteurs doivent faire face à une réglementation de plus en plus stricte. En effet, conformément au règlement européen applicable en France (règlement (CE) n° 854/2004), l'estimation de la qualité des zones de productions de mollusques doit être suivie. La présence éventuelle de ces polluants dans les mollusques à des seuils supérieurs aux normes entraîne une interdiction de pêche et de commercialisation ainsi qu'un risque de déclassement de la zone ostréicole.

De plus, les ostréiculteurs se retrouvent aujourd'hui face à une crise sans précédent. En effet, ils sont régulièrement confrontés à des surmortalités d'huîtres (Soletchnik *et al.*, 2007). Depuis 2008, le taux de mortalité chez le naissain a atteint parfois plus de 80 % ; en

cause, le virus de l'huître herpès de type 1 OsHV-1 (Renault *et al.*, 1995) associé à la présence d'une bactérie pathogène de l'espèce *Vibrio aestuarianus* (Le Roux *et al.,* 2002). Ces infections sont le plus souvent mises en évidence durant les périodes estivales lorsque la température de l'eau dépasse 18 °C (Renault *et al.*, 1995).
L'accumulation de ces différents problèmes réduit les quantités disponibles de mollusques commercialisables et affecte durablement la filière. Il devient alors urgent de trouver une solution écologique et économique pour améliorer la qualité de l'eau tout en respectant l'écosystème marin et l'activité des professionnels.

Les éponges font parties du règne animal et constituent l'embranchement des Porifera. Ce sont des organismes d'organisation simple qui filtrent l'eau pour se nourrir grâce à un système de canaux aquifères et des cellules particulières, les choanocytes (Osinga *et al*., 1999a). En 24 h, une éponge est capable de filtrer jusqu'à 10 000 fois son volume en eau et de retenir 80 % des particules en suspension comme la matière organique, les minéraux, les bactéries, les virus et le phytoplancton (Beaumont & Cassier, 1983 ; Larsen & Riisgård, 1994 ; Riisgård & Larsen, 1995). Par la même occasion, elles accumulent des polluants organiques et minéraux en quantités non négligeables. Par exemple, des teneurs en zinc de 234 µg/g d'éponge sèche sont retrouvées chez *Suberites domuncula* (De Mestre *et al*., 2012) et 100 µg/g de matière sèche chez *Halichondria panicea* (Hansen *et al.,* 1995). La place des bactéries dans l'alimentation des éponges et leur capacité à retenir certains polluants chimiques suggèrent de les utiliser pour améliorer la qualité de l'eau dans l'environnement marin (Gifford *et al.,* 2007). Ainsi, Milanese a réalisé des expériences sur le taux de rétention de la bactérie *Escherichia coli* par l'éponge *Chondrilla nucula* (Milanese *et al*., 2003). Stabili *et al*. (2006, 2008) et Longo *et al*. (2010) ont démontré la capacité d'accumulation et de digestion microbiologique des éponges *Spongia officinalis* et *Hymeniacidon perlevis*. Cultiver les éponges en des points stratégiques de concentration de polluants (en sortie de station d'épuration, près des campings situés en bord de mer, dans les ports ou autours des parcs conchylicoles) pourrait alors être une solution pour améliorer la qualité des eaux.

Par ailleurs, les éponges sont une source extraordinaire de molécules à activité biologique ayant naturellement un rôle de défense vis-à-vis de prédateurs, compétiteurs et microorganismes pathogènes (Belarbi *et al*., 2003a). En effet, ce sont des animaux sessiles,

c'est-à-dire fixés sur des substrats rocheux ou autres et sont, par la même occasion, en permanence confrontés aux bactéries ou virus ainsi qu'au risque de prédation par les poissons, les oursins, etc. Pour se protéger des infections et n'ayant pas de carapace ou de possibilité de fuir face aux prédateurs, les éponges ont développé un arsenal de molécules actives notamment antibactériennes (McCaffrey & Endean, 1985 ; Page *et al.,* 2005) et antivirales (Bergmann & Burke, 1955 ; Perry *et al.,* 1988). Ces molécules intéressent aujourd'hui la communauté scientifique notamment pour leurs propriétés thérapeutiques.
Ces molécules, une fois isolées et caractérisées, peuvent servir de principes actifs, d'intermédiaire de synthèse ou de source d'inspiration pour la conception de nouveaux composés actifs. Cependant, ces molécules sont présentes en très petites quantités dans les éponges (de l'ordre du mg/kg d'éponge sèche) (Schmitz *et al.,* 1993). Afin d'obtenir une quantité de matière suffisante, une récolte intensive de spécimens sauvages est inenvisageable car elle risquerait d'entrainer un déséquilibre de l'écosystème et provoquer la disparition de certains d'entre eux. De plus, la synthèse chimique de ces métabolites peut s'avérer difficile ou peu rentable industriellement (Duckworth & Wolff, 2007). La spongiculture ou culture d'éponges marines reste une voie originale pour l'obtention de principes actifs en quantité et, comme la culture d'algues, participerait à la diversification des activités aquacoles. La spongiculture est démarrée au XIXème siècle en Méditerranée et aux Etats-Unis avec la culture de *S. officinalis* pour la production d'éponges de toilette (Corriero *et al*., 2004 ; Louden *et al*., 2007). Elle s'est ensuite accrue pour la production de composés bioactifs (Duckworth & Battershill, 2003a, 2003b). Par exemple, l'éponge *Crambe crambe* est une éponge méditerranéenne connue pour produire des substances naturelles présentant des activités cytotoxiques et antivirales (Belarbi *et al.*, 2003a ; Pérez-Lopez *et al.*, 2014). Cette éponge peut être cultivée soit en bassin (Belarbi *et al.*, 2003b), soit *in situ* (Pérez-Lopez *et al.*, 2014) avant d'être prélevée pour en extraire les métabolites.

A la fois milieu et ressource, l'eau est une denrée précieuse. Aujourd'hui, la pollution marine est devenue un enjeu mondial. Il s'agit d'un phénomène récurrent, silencieux c'est-à-dire qui passe souvent inaperçu et complexe faisant intervenir une synergie de contaminants. Il n'y a donc pas de traitement immédiat et spécifique possible. Seule une stratégie à long terme, permanente, non-spécifique et de préférence peu coûteuse et respectueuse de l'environnement permettra de limiter l'impact de cette pollution.

I. Introduction

I. Introduction

Sommaire du chapitre

1.1. La qualité du milieu marin et du littoral **12**

A) L'eau, une ressource fragile nécessitant une bonne gestion 12

B) La pollution marine 13

1.2. La filière économique ostréicole française **17**

A) Les méthodes d'élevage 18

B) Ostréiculture et qualité de l'eau 19

C) Une filière fragile 23

D) La gestion des maladies chez les huîtres : analyse des risques 25

E) La bioremédiation dans un système AMTI 27

1.3. Les éponges marines, de la bioindication à la bioremédiation **30**

A) Généralités 31

B) Mode de vie 32

C) Le rôle des éponges dans la bioremédiation 33

D) Une riche source de métabolites 35

1.4. La spongiculture **37**

A) Procédés de culture 38

B) Les techniques de culture 39

1.5. Hypothèses de travail **42**

A) Travaux préliminaires 42

B) Modèle d'étude : *Hymeniacidon perlevis* 46

C) Son rôle dans la bioremédiation 48

D) Valorisation du genre *Hymeniacidon* 49

1.6. Objectifs du travail **52**

1.1. La qualité du milieu marin et du littoral

Les mers et les océans recouvrent plus de 70 % de la surface de la planète et leur protection est au cœur des préoccupations gouvernementales et citoyennes.

A) L'eau, une ressource fragile nécessitant une bonne gestion

L'eau constitue la base de la vie. En effet, les premières formes de vie sont apparues dans les océans avec les bactéries et les virus et, encore aujourd'hui, plus de la moitié des espèces animales et végétales vit dans l'eau (Hébert & Légaré, 2000). Que ce soit pour des raisons environnementales ou économiques, la préservation de la ressource en eau est aujourd'hui un enjeu majeur mobilisant un nombre important d'acteurs.

La Directive Cadre sur l'Eau (DCE) du 23 octobre 2000 adoptée par le Parlement européen et du Conseil (directive 2000/60/CE) définit un cadre pour la gestion et la protection des eaux. L'objectif était d'atteindre en 2015 un bon état général (état quantitatif et état chimique) tant pour les eaux souterraines que pour les eaux superficielles, y compris les eaux estuariennes et côtières. En complémentarité, afin de réaliser, de maintenir ou de restaurer un bon état écologique du milieu marin au plus tard en 2020, les Etats membres de l'Union européenne se doivent d'appliquer la directive 2008/56/CE du Parlement européen et du Conseil du 17 juin 2008. Cette directive appelée Directive Cadre-Stratégie pour le Milieu Marin (DCSMM) vise à mettre en place une bonne gestion de l'eau et à prendre les mesures nécessaires pour réduire les impacts des activités anthropiques sur ce milieu y compris le littoral (Directive 2008/56/CE du Parlement européen et du Conseil, 2008).
L'arrêté interministériel précisant les critères et méthodes pour l'élaboration et la mise en œuvre des programmes de surveillance a été signé le 28 avril 2015 par les ministres en charge de l'environnement, de la pêche, de la mer et de la santé. Chaque programme de surveillance est structuré en 13 programmes thématiques : oiseaux, mammifères marins et tortues, poissons et céphalopodes, habitats benthiques et intégrité des fonds marins, habitats pélagiques, espèces non indigènes, espèces commerciale, eutrophisation, changements hydrographiques, contaminants, questions sanitaires, déchets marins et bruit.

Les espaces marins et côtiers abritent de très nombreuses activités humaines comme la plaisance, la pêche, l'aquaculture, le transport maritime, la production d'énergie ou encore le tourisme. A la fois fragiles et convoités, ces espaces sont protégés en Europe par la Gestion Intégrée des Zones Côtières (GIZC) (Recommandation du Parlement européen et du Conseil du 30 mai 2002) qui est une démarche et un outil de gouvernance des territoires littoraux dans un objectif de développement durable (site internet du Ministère de l'écologie, du développement durable et de l'énergie). La GIZC est un processus qui a pour but de réunir autour d'un même projet des acteurs aux intérêts souvent divergents (états, collectivités, associations, citoyens, acteurs économiques...). Par ailleurs, la France met en place des outils de protection des eaux côtières de plusieurs ordres : conventions nationales et internationales, réglementation (parcs nationaux et réserves naturelles), protection foncière (statut du domaine public maritime), protection contractuelle (zones Natura 2000) et enfin protection spécifique (dispositif de surveillance de la qualité de l'eau) (site internet du Ministère de l'écologie, du développement durable et de l'énergie). L'Institut Français de REcherche pour l'exploitation de la MER (IFREMER) est chargé de plusieurs dispositifs d'observation et de surveillance de la qualité du milieu marin : le réseau de contrôle microbiologique (REMI), le réseau d'observation et de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines (REPHY), le réseau d'observation de la contamination chimique (ROCCH), le réseau des performances conchylicoles (RESCO), le réseau national d'observation de la moule bleue (MYTILOBS), le réseau des pathologies des mollusques (REPAMO) et le réseau de surveillance benthique (REBENT) (Belin *et al*., 2015). Chaque année, l'IFREMER édite dix bulletins de surveillance à une échelle régionale pour communiquer les résultats de ces surveillances.

Afin de mettre en place et de maintenir une bonne gestion de l'eau, la connaissance de la qualité de nos eaux littorales est indispensable aux scientifiques, aux professionnels et aux administrations.

B) La pollution marine

La pollution marine est définie par l'Organisation Maritime Internationale (OMI) comme « l'introduction dans l'environnement marin par l'homme, directement ou non, de

substance ou d'énergie générant des effets néfastes sur l'environnement ou susceptibles d'affecter la santé humaine, les activités halieutiques, les sites, les aménagements et l'utilisation de l'eau de mer » (OMI, 2009). En application de la DCE, une liste de 45 substances est adoptée comprenant des métaux, des pesticides, des hydrocarbures afin de fixer des normes de qualité environnementale (Directive 2013/39/UE du Parlement européen et du Conseil, 2013). Quatre-vingt pour cent des pollutions marines sont représentés par les macro-déchets d'origine terrestre comme les équipements de pêche, les sacs et les bouteilles en plastique, les mégots de cigarette (site internet du Ministère de l'écologie, du développement durable et de l'énergie). Transportés par les courants marins, certains s'échouent sur les plages, d'autres sont emportés au large. Au fil du temps, les macro-déchets se dégradent en mer (trois mois pour un mouchoir en papier mais jusqu'à mille ans pour une bouteille en plastique). Cette dégradation peut être à l'origine d'une libération de produits nocifs (bisphénols, phtalates, solvants...). Les 20 % restants représentent les substances polluantes véhiculées par les eaux sous forme de traces aux origines agricole, urbaine ou industrielle décrites ci-dessous.

- La pollution d'origine agricole

Les activités agricoles sont responsables de la présence de pesticides et de résidus d'engrais chimiques dans l'eau (Munaron *et al.,* 2006, 2012) mais aussi de bactéries fécales provenant des fèces d'animaux d'élevage dans les pâtures (Munaron *et al.,* 2012). Ces polluants ne peuvent pas être recueillis et traités ultérieurement dans une station d'épuration. Ils sont donc emportés par ruissellement de surface lors de fortes pluies ou par écoulement souterrain et peuvent ainsi se déverser en mer.

En effet, les zones agricoles sont sujettes aux activités de fertilisation du sol afin d'optimiser la production des cultures et d'augmenter ainsi les rendements (Hébert & Légaré, 2000). L'épandage d'engrais, qu'il soit d'origine organique (lisier, fumier ou composte) ou minéral entraine une augmentation dans le sol des concentrations en azote, phosphore et potassium. Ces éléments nutritifs ne sont pas toujours entièrement utilisés par les plantes cultivées et sont alors emportés vers les rivières et la mer. La pollution organique est le type de pollution le plus répandu dans le monde. Elle est à l'origine des phénomènes d'eutrophisation des cours

d'eau et entraine une diminution de la quantité d'oxygène dissous dans le milieu ainsi qu'une augmentation de la production primaire pour les organismes autotrophes (Hébert & Légaré, 2000 ; Munaron *et al.,* 2006). L'eutrophisation peut-être à l'origine de l'efflorescence de phytoplancton dont certaines espèces sont toxiques. Capables de produire des phycotoxines (toxines diarrhéiques, paralysantes, amnésiantes), la contamination des mollusques est très pénalisante pour la filière conchylicole. En effet, les toxines peuvent représenter un risque pour la santé humaine à travers la consommation de mollusques contaminés. Le REPHY a été créé par l'IFREMER en 1984, suite à l'observation de nombreuses intoxications de type diarrhéique chez les consommateurs de coquillages en 1983 et 1984, sur les côtes bretonnes.
De plus, l'utilisation des pesticides est très répandue en agriculture. Les pesticides peuvent affecter la flore et la faune marine en causant des effets neurotoxiques et hormonaux chez les poissons et les invertébrés marins (Kasiotis *et al*., 2015 ; Silva *et al*., 2015).
Enfin, les activités agricoles et particulièrement d'élevage peuvent être responsables de contaminations bactériologiques. Ces bactéries, les coliformes fécaux, proviennent des intestins des mammifères et peuvent causer des problèmes de santé chez l'homme (gastro-entérites, dermatites...). C'est pourquoi des concentrations élevées en coliformes fécaux dans l'eau entrainent généralement une interdiction de baignade et de pêche à pied (suivi réalisé par l'Agence Régionale de la Santé). De plus, les résultats participent à l'évaluation de la qualité des zones conchylicoles (réseau REMI) et donnent sur 10 ans les tendances en termes de contamination bactériologique et chimique des zones exploitées (site internet du Ministère des affaires sociales, de la santé et des droits des femmes).

- La pollution d'origine urbaine

Il arrive que le littoral soit contaminé par des rejets d'eaux usées comme celles de campings et d'habitations situés près de la mer (n'étant pas raccordés au réseau collectif), de stations d'épuration ou de pompes de relevage. Ces eaux sales sont chargées en bactéries (McLellan & Eren, 2014) et virus (Gantzer, 1998) mais aussi en matières chimiques ou organiques comme l'ammoniac des détergents, les composés organophosphorés des lessives ou les médicaments (Guillaud, 1992). Antibiotiques, antidépresseurs, bêtabloquants,

contraceptifs oraux, autant de substances qui sont rejetées de façon continue dans les milieux aquatiques car non traitées par les stations d'épuration.

En France, plusieurs milliers de stations d'épurations rejettent leurs eaux traitées en mer. Malgré des systèmes d'épuration de plus en plus performants et des contrôles réguliers en sortie de station, les eaux traitées ne sont pas indemnes de contaminants qui ont à terme un impact sur le milieu marin même si ces derniers ont longtemps été minimisés. Des études scientifiques permettent heureusement de mieux cerner l'impact des rejets urbains sur le milieu marin (Pasqualini *et al*., 1999 ; Pergent-Martini & Pergent, 2000 ; Vazquez-Roig *et al*., 2012). Malgré cela, la directive 91/271/CEE du 21 mai 1991, relative au traitement des eaux urbaines résiduaires et des obligations de collecte et de traitement des eaux usées en France, n'a pas été modifiée depuis 1992 (site internet du Ministère de l'écologie, du développement durable et de l'énergie).

- La pollution d'origine industrielle

De par des productions très diverses (aliments, vêtements, produits chimiques...), les effluents industriels sont multiples et complexes. Cela va de la présence d'hydrocarbures, aux huiles et polychlorobiphényles en passant par les solutions acides ou alcalines et des éléments traces métalliques (ETM) (James, 2002 ; Marchand, 2008). Présents naturellement dans l'environnement, les ETM se trouvent dans le sol et dans l'eau. Les activités humaines renforcent cette présence dans les milieux côtiers et estuariens du monde (Oaten *et al*., 2015). Les métaux se retrouvent dans l'eau via le ruissellement, les retombées atmosphériques et les rejets industriels directement en mer (Amman *et al*., 2002). Ces substances potentiellement toxiques peuvent être absorbées par les organismes marins. Aussi, dans un milieu contaminé, les différents niveaux trophiques sont potentiellement affectés via le phénomène de bioamplification. La bioamplification est le processus par lequel la concentration d'un xénobiotique augmente dans les organismes à la suite de l'ingestion d'espèces du niveau trophique précédent (Gray, 2002). Les individus au sommet de la chaine alimentaire que sont les supers prédateurs et l'Homme, peuvent contenir des concentrations de mille à un million de fois supérieures à celles relevées au sein des premiers organismes contaminés. C'est pourquoi certains ETM font l'objet d'un suivi réglementaire. Sept d'entre

eux sont considérés comme polluants par un amendement de la DCE. Il s'agit du cadmium, du plomb, du mercure, du nickel, du chrome, du cuivre et du zinc (Directive 2000/60/CE du Parlement européen et du Conseil, 2000). Certains de ces métaux sont essentiels au bon fonctionnement de notre organisme tandis que d'autres n'ont aucune fonction biologique. Mais en excès, tous peuvent présenter des risques pour la santé humaine.

Le plomb en particulier est toxique pour l'homme. Lorsqu'il est ingéré en trop grande quantité, il a un effet toxique sur les cellules souches du système nerveux central (Li *et al*., 2007). Depuis les années 1970, la plupart des pays industrialisés ont restreint l'emploi du plomb notamment dans les peintures et dans l'essence, en raison des effets nocifs sur la santé. Cependant, le mal est fait car le plomb ne se dégrade pas dans l'environnement. De plus, certains secteurs industriels emploient encore du plomb. Par exemple, il est utilisé dans la production de l'acier et du laiton ainsi que dans la fabrication des batteries et des produits électroniques.

Une pollution marine peut générer de nombreuses perturbations qui, à plus ou moins long terme, auront des effets négatifs sur l'économie. Ces atteintes peuvent toucher les organismes vivants et leur écosystème ainsi que l'Homme et ses activités. Parmi elles, l'ostréiculture est une filière fragile dépendante de la qualité de l'eau.

1.2. La filière économique ostréicole française

Au vu de son volume de production (85 000 tonnes d'huîtres/an), du nombre d'acteurs et de consommateurs (65 % des français consomment régulièrement ou occasionnellement des huîtres), l'ostréiculture française occupe une place de premier ordre dans la filière ostréicole européenne (CNC, 2009). Activité emblématique des régions de la façade atlantique, l'ostréiculture fait également partie du patrimoine et de la culture française.

A) Les méthodes d'élevage

L'élevage des huîtres se déroule en plusieurs étapes (figure 1.1). La première phase du cycle est le captage des larves dans leur environnement naturel qui doivent se fixer sur un substrat avant de se métamorphoser (CNC, 2009). Des collecteurs artificiels sont disposés au cours de l'été à proximité des zones de reproduction afin de capturer le naissain. La production de naissains peut aussi être réalisée dans des infrastructures terrestres comme des bassins de production à partir de géniteurs. Aujourd'hui, les techniques modernes d'écloserie et de nurserie assurent aux ostréiculteurs une disponibilité en naissains. Six à 12 mois après le captage, le naissain est décollé des structures de collecte. Les huîtres sont alors transférées soit dans des poches grillagées posées sur des tables métalliques (élevage surélevé), soit directement sur le sol pour l'élevage à plat, en eau profonde ou sur l'estran, soit suspendues à des cordes ou des filins (élevage en suspension). Les huîtres vont ainsi grandir pendant deux à trois ans selon la technique et le lieu d'élevage. Vient ensuite la phase d'affinage en eau claire qui dure entre deux jours et quelques semaines. Les huîtres sont transférées dans un dégorgeoir ou bassin d'affinage afin de leur donner une saveur particulière ou simplement leur permettre de se débarrasser des bactéries, des impuretés ou du sable. Après cette période, elles sont prêtes pour la commercialisation.

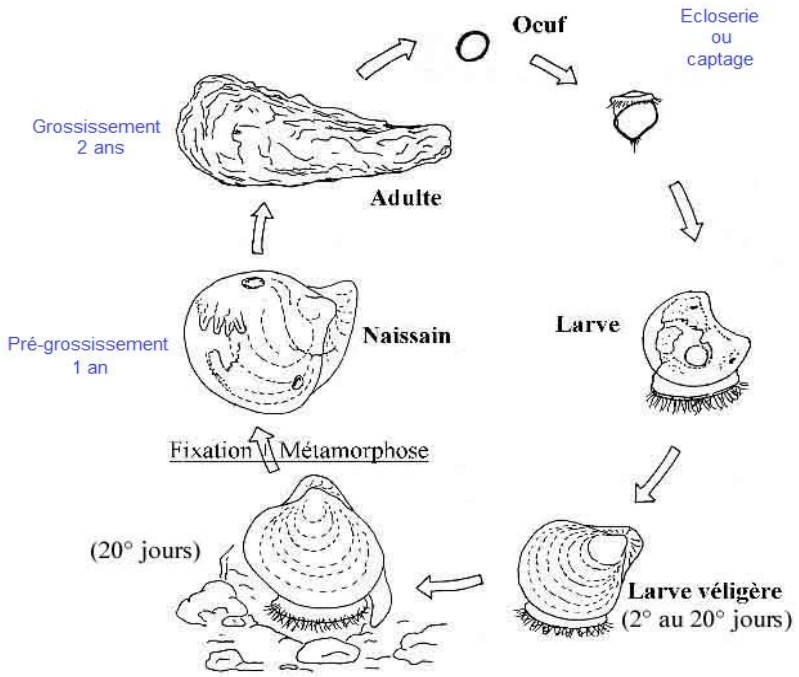


Figure 1.1. Cycle biologique de l'huître associé à son cycle d'élevage.

B) Ostréiculture et qualité de l'eau

L'ostréiculture dépend beaucoup de la qualité de l'eau. Malheureusement, les zones côtières sont enclines à des phénomènes de pollution dus aux activités anthropiques, qu'ils soient accidentels, liés à l'activité maritime ou aux rejets d'eaux usées insuffisamment traités (Le Saux & Pommepuy, 2003).

Les huîtres contaminées par des polluants biologiques ou minéraux sont plus sensibles aux maladies et représentent aussi un risque pour la santé humaine. Pour garantir la qualité des mollusques et ainsi limiter tout risque sanitaire pour l'homme, les parcs ostréicoles sont classés selon le règlement de la Communauté européenne n° 854/2004 (Règlement (CE) n° 854/2004). Créé en 1989 par l'IFREMER, le REMI (351 points de prélèvements répartis sur les côtes françaises) permet de surveiller les zones de production de coquillages exploitées par les professionnels, classées A, B et C par l'Administration (Morel, 1999 ; Belin *et al.,* 2013). Les mollusques sont classés en trois catégories : les échinodermes, les gastéropodes et les tuniciers (groupe 1), les bivalves fouisseurs comme la coque dont l'habitat permanent est constitué par les sédiments (groupe 2) et les bivalves non fouisseurs comme la moule ou l'huître (groupe 3). Une zone est classée pour un groupe de coquillages donnés.

Comme le montrent les tableaux 1.1 et 1.2, l'estimation de la qualité des zones de production des mollusques se fait sur la base du dénombrement de la bactérie *E. coli*, indicatrice d'une contamination fécale, humaine ou animale. La contamination est exprimée par le nombre d'*E. coli* dénombré dans 100 g de chair de coquillage et de liquide intervalvaire. L'estimation de la qualité est déterminée sur la base des résultats acquis sur les trois dernières années et interprétés par rapport aux seuils réglementaires en vigueur pour chaque groupe de coquillages. La concentration en certains polluants chimiques présentant un risque sanitaire pour l'Homme (plomb, cadmium et mercure) est aussi évaluée.

Tableau 1.1. Classement des zones ostréicoles selon leur niveau de salubrité par rapport au dénombrement d'*Escherichia coli*, bactérie indicatrice d'une contamination fécale. Règlement (CE) n° 854/2004 (Journal Officiel de l'Union Européenne, 2006)

***E. coli* / 100 g de chair et de liquide intervalvaire**	**Zone**	**Elevage**
100 % des résultats < 230 *E. coli*	A	Autorisé (consommation directe)
Au moins 90 % des résultats < 4 600 *E. coli* Aucun > 46 000 *E. coli*	B	Autorisé (reparcage ou purification)
100 % des résultats ≤ 46 000 *E. coli*	C	Autorisé (reparcage longue durée ou traitement thermique)

Tableau 1.2. Concentrations maximales en éléments traces métalliques admises dans les coquillages destinés à la consommation humaine. Règlement (CE) 466/2001 (Journal officiel de l'Union Européenne, 2006).

Seuil de contamination chimique (mg/kg masse sèche)			**Elevage**
Plomb	**Cadmium**	**Mercure**	
≤ 7,5	≤ 5	≤ 2,5	Autorisé
> 7,5	> 5	> 2,5	Interdit

Trois niveaux de salubrité sont ainsi décrits (Morel, 1999). La zone A correspond à des eaux de bonne qualité microbiologique. La zone B correspond à des eaux de qualité moyenne. Les huîtres peuvent être élevées dans les zones A et B mais seulement expédiées pour la vente directement à partir d'une zone A. Dans une zone B, les huîtres devront passer par une phase de purification de 48 h en bassin insubmersible avant la vente (figure 1.2). Cela peut entrainer une perte de temps pour les producteurs notamment en période de fête de fin d'année alors qu'ils réalisent 80 % de leur chiffre d'affaire.

Figure 1.2. Bassin ostréicole (http://www.lhuitrier.fr/). Les plus couramment utilisés sont en béton avec une légère pente pour permettre l'évacuation des eaux. Avant d'arriver dans le bassin, l'eau de mer est désinfectée soit par des procédés chimiques (ozone, chlore), soit par des procédés physiques (rayons ultra-violets).

La zone C correspond à des eaux de mauvaise qualité. Le site doit faire l'objet de mesures immédiates ou à moyen terme qui permettront d'améliorer la qualité de l'eau (comme la création d'un tout à l'égout ou l'arrêt des déversements des eaux des stations d'épuration en pleine mer). La présence de ces contaminants dans les mollusques à des niveaux supérieurs aux normes entraîne un risque de déclassement de la zone tant que la qualité de l'eau ne s'améliore pas.

En 2013, la qualité de l'eau, sur la base du dénombrement d'*E. coli*, est estimée par l'IFREMER comme en majorité de qualité moyenne (figure 1.3 – I) (Belin *et al*., 2013). La plupart des points de prélèvement présentant une bonne qualité microbiologique sont situés en Charente-Maritime et dans le bassin d'Arcachon (figure 1.3 – II). Les points de mauvaise qualité sont répartis sur les littoraux Manche, Mer du Nord et Atlantique.

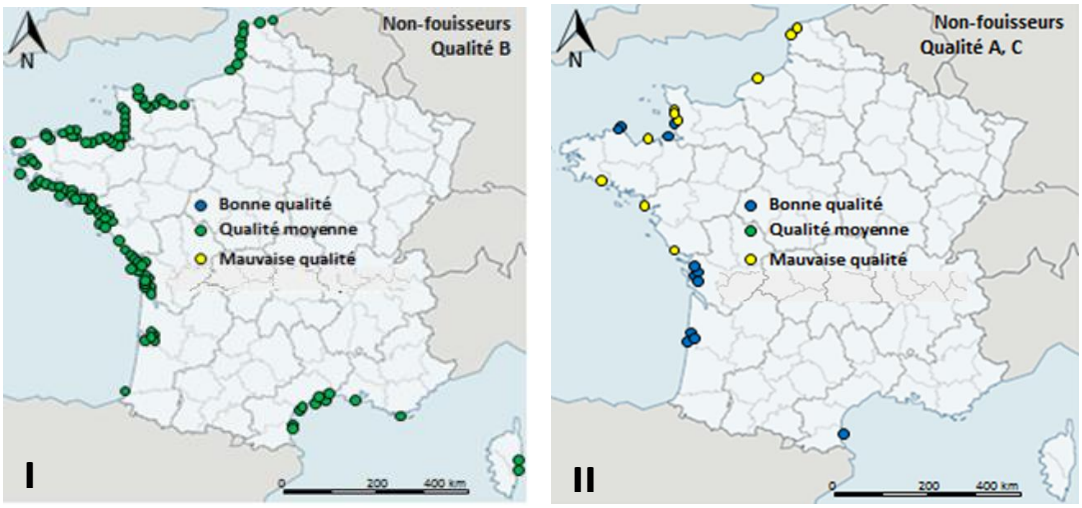


Figure 1.3. Qualité microbiologique pour les mollusques non fouisseurs (dont huîtres), données 2013 (Belin *et al*., 2013). I - zones de qualité moyenne ; II - zones de bonne qualité et de mauvaise qualité.

Les activités anthropiques exportent une quantité significative d'éléments traces métalliques (l'utilisation du cuivre dans les peintures antifouling et du mercure comme conducteur électrique...) dans les eaux côtières (Cebrian & Uriz, 2007). Dans la plupart des régions françaises, les concentrations en éléments traces métalliques sont en dessous des seuils sanitaires. Toutefois, dans certaines zones, les teneurs les dépassent. C'est le cas par exemple dans le Finistère et la Gironde où les teneurs en cadmium nécessitent une vigilance particulière ainsi que dans la région Provence-Alpes-Côte d'Azur et l'embouchure de l'Aulne (Finistère) touchées par des pollutions au plomb (Belin *et al*., 2013).

En plus du risque pour la santé humaine, les polluants ont aussi un impact sur la santé des huîtres et peuvent devenir une menace pour la productivité ostréicole. Ainsi, de nombreuses études montrent les effets néfastes de ces polluants sur les animaux, incluant les pesticides (Gagnaire *et al.*, 2007 ; Mottier *et al.,* 2015), les polluants organiques persistants (Bayen *et al*., 2007), les éléments traces métalliques (Strady *et al.,* 2011 ; Mottin *et al.,* 2012), les hydrocarbures (Boutet *et al.,* 2004) et les microorganismes pathogènes des huîtres comme les virus (Aboubaker *et al.,* 2013 ; Normand *et al.,* 2014). Par exemple, Gagnaire *et al*. (2007) ont étudié l'impact des pesticides sur *Crassostrea gigas*. Les huîtres ont été exposées à un mélange de huit pesticides pendant 7 jours. L'expression de dix-neuf gènes impliqués dans les fonctions hémocytaires des huîtres a été caractérisée par PCR (Polymerase Chain Reaction) en

temps réel. Après 7 jours d'exposition, les résultats ont montré une diminution de la régulation de l'expression des dix-neuf gènes sélectionnés. Par ailleurs, Mottin *et al.* (2012) ont étudié les effets du zinc sur les huîtres. Après une exposition aigue de 10 mg/l, une mortalité de 81,8 % ainsi qu'une diminution de 16 % de l'activité phagocytaire ont été observées.

C) Une filière fragile

Historiquement, l'ostréiculture française a connu une succession de phases de développement, de pleine exploitation et de crises engendrées par une surexploitation et l'apparition de maladies (Grizel *et al.*, 1987).

La façade atlantique française était une source naturelle de l'huître plate *Ostrea edulis*. Au XIXème siècle, la surexploitation par la pêche à pied en plus du dragage des gisements naturels ont entrainé une forte régression de l'espèce (Lambert, 1938). Par la suite, l'introduction de parasites par voie maritime (commerces, fouling, eaux de ballast) (Howard, 1994 ; Lupo *et al.*, 2012) et les conditions d'élevages (transfert d'animaux, exploitation intensive favorisant la propagation des maladies) ont conduit à plusieurs épizooties provoquées par *Marteilia refringens* dès 1970 et par *Bonamia ostreae* dès 1978, entrainant sa disparition sur la majeure partie du littoral français notamment (Robert *et al.,* 1991 ; Naciri-Graven *et al.,* 1998 ; Flannery *et al.,* 2014). Aujourd'hui, l'élevage d'huîtres plates se fait essentiellement en Bretagne dans les baies de Quiberon (1er bassin naisseur et d'élevage des côtes françaises) et de Cancale. Il existe également un gisement sauvage en rade de Brest (Cochennec-Laureau, 2014).

Jusqu'au début des années 1970, la production ostréicole reposait essentiellement sur l'élevage de l'huître portugaise ou *Crassostrea angulata* accidentellement introduite en France en 1870 depuis le Portugal (Boudry *et al*., 1998). Son exploitation s'étendait alors le long des côtes atlantiques jusqu'en 1967, année où les huîtres ont été touchées par une infection virale due à un *Iridovirus* (Comps *et al*. 1976 ; Comps, 1988). Les premiers symptômes de la maladie ont laissé place à des mortalités massives qui ont entrainé la disparition de l'espèce en tant qu'huître commerciale en France en 1973, perturbant ainsi

gravement la filière. Cette épizootie a fortement motivé l'introduction intense de l'huître creuse japonaise *C. gigas* comme espèce de remplacement (Grizel & Héral, 1991). Son implantation fut un succès et a permis la remontée économique de la filière ostréicole française grâce à une production qui atteignit rapidement les 80 000 tonnes en 1976 jusqu'à 139 000 tonnes en 1996 (CNC). Cependant, au cours des étés suivants, les ostréiculteurs ont régulièrement été confrontés à des épisodes de mortalités de *C. gigas* entrainant généralement une perte supérieure à 30 % du cheptel (Goulletquer *et al*., 1998 ; Fleury *et al*., 2001).

La figure 1.4 résume la présence des différentes espèces d'huîtres en France ainsi que celle des agents pathogènes spécifiques.

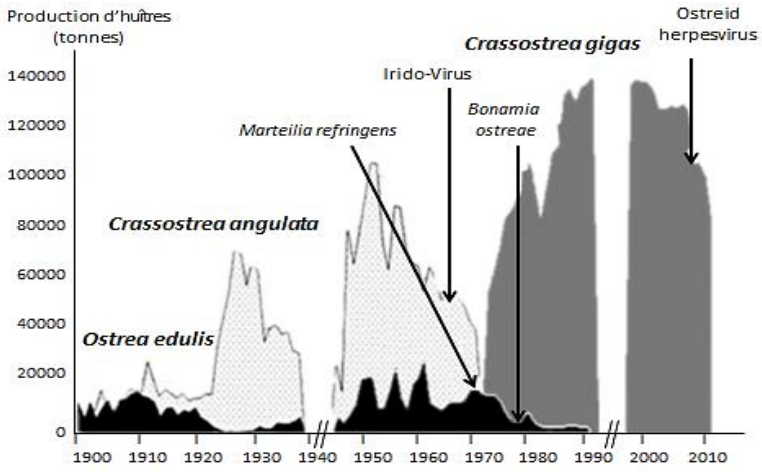


Figure 1.4. Les différentes espèces d'huîtres produites en France au cours du XX et XXIème siècle (d'après Grizel *et al.,* 1987).

Des analyses d'huîtres moribondes dans les années 2000 ont montré la présence d'un virus apparenté à la famille des *Malacoherpesviridae* appartenant à l'ordre des *Herpesviridae* (OsHV-1) (Renault *et al.*, 1995) et de bactéries appartenant au genre *Vibrio* principalement *Vibrio splendidus* et *Vibrio aestuarianus* (Le Roux *et al.,* 2002, 2004). En 2008, ces mortalités ont pris des proportions catastrophiques en France tuant entre 40 et 100 % des naissains (Renault, 2011). De nouvelles analyses plus poussées ont alors été réalisées notamment grâce à des techniques plus précises comme la PCR. Les résultats ont montré une corrélation entre

le niveau de mortalité des huîtres et la concentration en virus associés (Renault & Novoa, 2004). De plus, les analyses ont mis en évidence la présence d'un génotype viral particulier appelé OsHV-1 µvar (Segarra *et al*., 2010).

Afin de prévenir au mieux ces différentes mortalités, la gestion de la qualité du milieu marin est devenue une priorité pour les professionnels de l'ostréiculture. Pour limiter les risques de propagation des maladies, les actions possibles se jouent au niveau de l'amélioration des techniques de culture, d'une meilleure connaissance des pathogènes, de la mise en place d'une surveillance épidémiologique, du choix des variétés et de la limitation des déplacements des animaux.

D) La gestion des maladies chez les huîtres : analyse des risques

En ostréiculture, une majorité des huîtres est élevée dans le milieu naturel en conditions non contrôlables, les exposant ainsi aux agents infectieux et empêchant une distribution d'antibiotiques. Les conditions environnementales ont directement une influence sur leur état de santé et leur développement. La gestion des maladies chez les huîtres est donc limitée. De plus, les huîtres ne possèdent pas de système immunitaire dit adaptatif ni de mémoire immunitaire permettant une vaccination massive des cheptels (Renault, 2011). Enfin, les individus malades présentent rarement des symptômes pouvant alerter l'ostréiculteur. Par ailleurs, les chairs des animaux morts sont rapidement éliminées par les courants ce qui empêche les analyses. Les pratiques d'élevage sont susceptibles de favoriser l'expansion d'une maladie. Les transports d'animaux constituent le risque majeur d'introduction de maladies (Grizel, 1997). L'élevage peut ainsi se dérouler dans plusieurs zones (Lupo *et al.,* 2012). Par exemple, le Bassin d'Arcachon est un milieu particulièrement propice à la reproduction de l'huître creuse. Soixante à 70 % des huîtres creuses commercialisées en France sont natives du Bassin d'Arcachon (Auby & Maurer, 2004). Les naissains sont ensuite vendus et dispersés dans des concessions en divers endroits du littoral français comme la Bretagne ou la Normandie. De plus, certaines régions sont spécialisées dans d'autres étapes du cycle. Par exemple, l'affinage peut se dérouler dans certaines zones comme les marais littoraux qui, du fait de leurs caractéristiques environnementales,

permettent d'obtenir une chair de meilleur goût (Grizel, 1989). Les maladies sont alors déplacées en même temps que les animaux, ce qui facilite leur expansion. Le nombre d'huîtres dans les zones d'élevages est également très important. Une forte densité d'animaux favorise la propagation d'agents pathogènes qui peuvent entrainer des pertes de cheptel (Grizel & Héral, 1991 ; Lupo *et al.,* 2012). Par ailleurs, trop d'animaux par rapport à la ressource disponible dans le milieu peuvent ralentir la croissance des huîtres et entrainer un stress chez l'animal. Or, une maladie est l'aboutissement d'un déséquilibre entre le potentiel de résistance des hôtes et le pouvoir pathogène des microorganismes (Grizel, 1997). C'est pourquoi, il peut être envisagé de mettre en place une meilleure gestion des cheptels en limitant les transferts des coquillages vivants destinés à être ré-immergés et en mettant en place des plans d'aménagement des zones conchylicoles destinés à réduire la densité d'huîtres.

Les moyens de lutte étant limités, les travaux se portent davantage sur la connaissance des pathogènes et la compréhension des épizooties. A ce jour, malgré le développement d'outils analytiques de plus en plus performants (sondes ADN, anticorps, amplification génique), les analyses diagnostiques de laboratoire doivent encore être améliorées. En effet, le manque de maitrise de l'approvisionnement en agents pathogènes est un frein à l'étude en laboratoire des maladies des invertébrés marins ; les agents pathogènes disparaissent avec leur hôte sans que la recherche n'ait pu se doter de moyens techniques indispensables à leur culture *in vitro* (Grizel, 1989). Il y a une vingtaine d'années, d'importants progrès ont été réalisés avec la mise au point de techniques de purification d'agents pathogènes à partir de broyats de tissus contaminés (Le Deuff & Renault, 1999 ; Mialhe *et al.*, 1988) mais aujourd'hui, l'absence de lignées cellulaires d'invertébrés marins pénalise l'étude des agents infectieux comme les virus.

Ainsi, l'ostréiculture est une filière fragile se pratiquant principalement en milieu ouvert où la gestion et la prévention des maladies sont aléatoires. La surveillance épidémiologique intervient pour limiter la diffusion des maladies via le transfert d'animaux malades mais peu de solutions sont envisageables une fois que la maladie est installée. Les stratégies de lutte préventive comme la bioremédiation dans le cadre d'une polyculture sont donc préférables aux stratégies curatives.

E) La bioremédiation dans un système d'Aquaculture Multi-Trophique Intégrée (AMTI)

La mise en place de nouveaux moyens et procédés pour augmenter la productivité et développer durablement l'aquaculture marine est au cœur des initiatives proposées par les scientifiques et les aquaculteurs. Depuis une dizaine d'année, les professionnels se sont donc intéressés à un nouveau concept de cultures simultanées de plusieurs espèces animales et algales. Ainsi, s'est développée l'AMTI.

Décrite pour la première fois en 1997 par Thierry Chopin (Chopin, 1997) puis officiellement créée en 2004 par Thierry Chopin et Jacq Taylor (Chopin *et al.,* 2004), l'AMTI était à la base une pratique fondée sur l'idée du recyclage dans laquelle les déchets organiques et inorganiques provenant d'élevages aquacoles pouvaient être convertis en aliments et engrais naturels assimilés par d'autres espèces (appelées « espèces d'extraction ») pour croître (par exemple algues, bivalves ou invertébrés marins), limitant l'impact de l'aquaculture intensive sur l'environnement. L'AMTI prenait ainsi exemple sur un écosystème naturel en agençant l'élevage de diverses espèces complémentaires qui savaient transformer les déchets en ressources tout en améliorant la production (Hussenot, 2004). Par la suite, l'AMTI s'est développée pour faire face à d'autres problèmes comme le transfert de pathogènes entre espèces sauvages et espèces d'élevage, la prolifération d'algues nuisibles, la dégradation de l'écosystème ou encore la pollution (Neori *et al.,* 2004). Les espèces d'extraction jouent alors aussi un rôle dans la bioremédiation du milieu via la maintenance et la durabilité des écosystèmes. L'objectif de la bioremédiation est de protéger les écosystèmes d'une part mais aussi de les biorestaurer et de dépolluer des sites contaminés en mettant l'accent sur la détoxication biologique et la dégradation des contaminants à l'aide des capacités naturelles d'organismes vivants (Zouboulis & Moussas, 2011). Le concept de l'AMTI est flexible. De manière générale, l'AMTI peut être pratiquée en milieu côtier mais aussi à terre et dans des eaux salées ou dans des eaux douces.

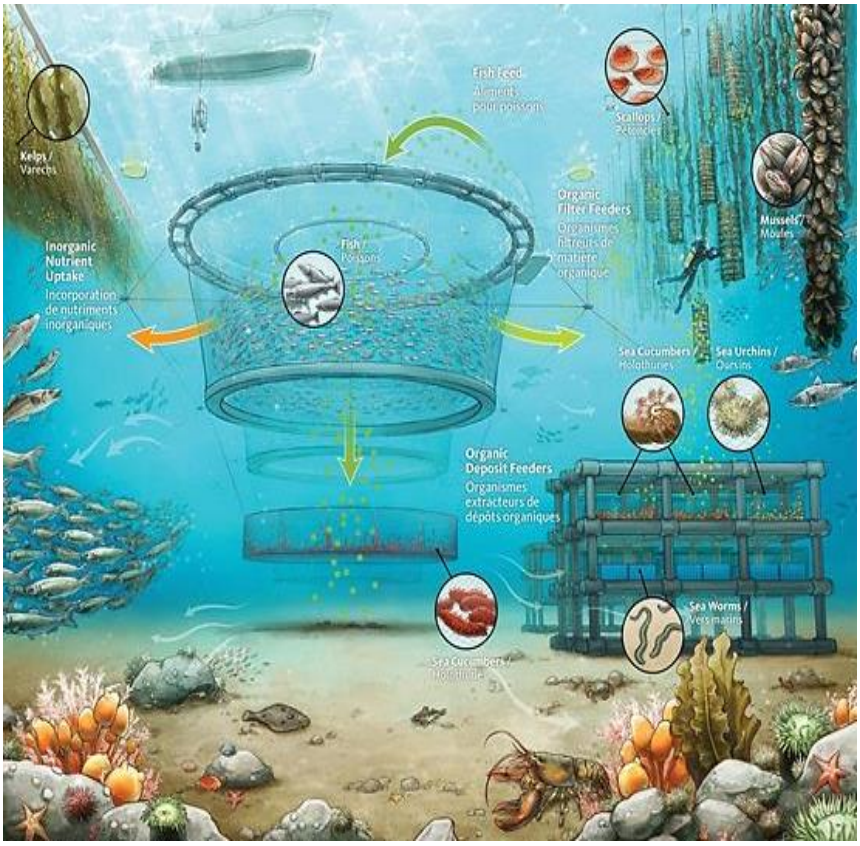
L'aquaculture intégrée est traditionnellement pratiquée dans plusieurs pays asiatiques notamment en Chine où la polyculture poissons/riz est pratiquée depuis des millénaires (Ren *et al.,* 2012). L'aquaculture à terre associée à des plantes naturelles ou agricoles (comme les épinards d'eau) est utilisée à grande échelle pour la production extensive de la crevette et d'escargot en Chine (figure 1.5), Indonésie, Equateur, Inde, Philippines, Thaïlande, Japon et

Vietnam. Dans le nord de l'Europe, canards, poissons et écrevisses sont élevés ensemble. Les canards mangent les petits poissons invasifs et leurs excrétions. Les écrevisses, quant à elles, mangent les algues et les plantes aquatiques empêchant ainsi leur prolifération. Une fois leur cycle d'élevage terminé, les animaux sont capturés et utilisés pour la consommation humaine (Neori *et al*., 2004). De telles techniques de culture peuvent être incorporées dans les programmes scientifiques de pays où l'aquaculture intensive est pratiquée.

Figure 1.5. Production extensive d'épinards d'eau en Chine associée à la culture de poissons et crevettes d'eau douce (d'après FAO).

Plusieurs études sur les systèmes intégrés ont été réalisées ces dernières années. Ainsi, au Japon et au Canada, respectivement, Yokoyama (2013) et Nelson *et al*., (2013) ont étudié la survie et la croissance des concombres de mer *Cucumaria frondosa*. Ils ont montré la possibilité d'élever cette espèce d'extraction en dessous des cages à poissons. Les concombres de mer étaient capables d'assimiler la matière organique issue des fèces de poissons et des résidus d'aliments aquacoles. Handå et ses collaborateurs (2012) ont étudié *in vitro* les moules *Mytilus edulis* et leur croissance lorsqu'elles étaient nourries avec des résidus d'aliments et des fèces poissons pendant 28 jours. Les animaux étaient en bonne santé après les expériences. En 1991, Jones et Iwama ont étudié la culture *in situ* de l'huître *C. gigas* avec le saumon *Oncorhynchus tshawytscha*. Ils ont constaté que les huîtres avaient un taux de croissance 3 fois plus élevé lorsqu'elles étaient intégrées à un élevage de saumon. Cette

optimisation de croissance était un effet secondaire positif de l'AMTI et un avantage économique pour les aquaculteurs. En Chine, les algues *Sargassum hemiphyllum* et *Sargassum henslowianum* sont utilisées pour améliorer la qualité de l'eau dans les zones côtières. Les algues sont ensuite récupérées pour servir de fourrage aux poissons d'élevage (Yu *et al.,* 2014). Aujourd'hui, l'AMTI est pratiquée au Canada à grande échelle (figure 1.6). A proximité des cages de poissons d'élevage sont disposés des invertébrés marins filtreurs (moules ou huîtres, espèce d'extraction des petites molécules organiques de 5 à 150 µm) puis des algues (espèces d'extraction des molécules inorganiques dissous) et des invertébrés marins de fond (concombre de mer, oursin et homard, espèces d'extraction des grosses molécules organiques supérieures à 150 µm) (Troell *et al.,* 2009).



Nutriments inorganiques dissoutes

Nutriments organiques à particules fines

Nutriments organiques à particules grossières

Figure 1.6. Schématisation de l'AMTI pratiquée au Canada (d'après http://www.dfo-mpo.gc.ca/aquaculture/sci-res/imta-amti/index-fra.htm).

Aujourd'hui, l'AMTI apporte aux aquaculteurs des possibilités de diversification de leur profession. Non seulement cette activité contribue à limiter les pollutions et les risques de contamination mais, en plus, elle permet aux professionnels de générer un revenu complémentaire en vendant les espèces d'extraction. Par exemple, aujourd'hui, la production d'algues alimentaire (*Saccharina latissima* et *Alaria esculenta*) s'élève à 23,8 millions de tonnes par an (96,3 % produits en Asie) ce qui représente un marché d'une valeur de 6,4 milliards d'euros. Toutefois, la polyculture nécessite de la part des aquaculteurs un effort d'apprentissage des techniques de culture propres aux espèces d'extraction.
Les espèces d'extraction sont sélectionnées pour faire partie d'un site d'AMTI en raison de leur élevage maitrisé et de leur capacité de bioremédiation. L'important est que les organismes soient choisis à plusieurs niveaux trophiques basé sur leurs fonctions complémentaires dans l'écosystème. Les espèces d'extraction choisies sont également sélectionnées en fonction de leur valeur en tant que produit commercialisable, procurant ainsi des avantages économiques supplémentaires aux producteurs.

Parmi les différentes espèces d'extraction, il en est une qui n'a été que peu voire pas étudiée. Il s'agit des éponges marines. Les éponges sont des animaux filtreurs dont la capacité de filtration et le taux de rétention des particules en suspension efficaces en font des candidates idéales pour la bioremédiation (Milanese *et al.,* 2003).

1.3. Les éponges marines, de la bioindication à la bioremédiation

Les océans sont un immense réservoir biologique. Parmi elles, les éponges (phylum Porifera) sont des invertébrés marins pluricellulaires apparus il y a près de 700 millions d'années (Bergquist, 1978) et qui constituent l'embranchement le moins évolué des métazoaires. Elles ont colonisé les eaux de faibles profondeurs jusqu'à plus de 5 000 m de fond, sous tous les climats (Beaumont & Cassier, 1983). Plus de 8 000 espèces d'éponges marines existent aujourd'hui (Duckworth, 2009). Ce sont des animaux aquatiques dont la plupart sont marins mais il existe aussi environ 500 espèces d'eau douce.

A) Généralités

Les éponges sont des organismes simples constitués de couches cellulaires distinctes mais ne formant pas d'organes différenciés (pas de bouche, pas de cœur, pas de poumons, etc.) (De Vos *et al*., 1991). Certaines cellules d'éponge sont différenciées, d'autres, les archéocytes sont pluripotentes et peuvent se différencier en n'importe quelle autre cellule. Toutes les cellules spécialisées au sein de l'éponge sont originaires des archéocytes. Il existe trois types d'organisation chez les éponges : ascon, sycon et leucon.

Les éponges de type leucon sont composées de deux couches cellulaires appelées choanoderme (couche interne) et pinacoderme (couche externe). Entre les deux se trouve le mésophyle. Les cellules formant la couche externe sont appelées pinacocytes. Par endroits, elles laissent place à un pore inhalant permettant l'entrée de l'eau dans l'éponge (figure 1.7 - 1). La couche cellulaire interne est formée de cellules à collerette et à flagelle appelées choanocytes (figure 1.7 - 2). Les choanocytes jouent un rôle dans la filtration de l'eau par l'éponge en permettant sa circulation à travers le réseau aquifère. Grâce aux mouvements des flagelles, ces cellules assurent ainsi l'apport en nourriture et en oxygène par les ostia. L'expulsion des déchets par se fait par l'oscule ou pore exhalant (figure 1.7 - 3). Les éponges sont capables de réguler dans une certaine mesure le débit d'eau pompée grâce à la contraction des pores inhalants. Grâce à ce système de pompage performant, les éponges peuvent filtrer une grande quantité d'eau par jour pour se nourrir. En 24 h, une éponge peut filtrer jusqu'à 10 000 fois leur volume en eau et retenir 80 % des particules en suspension dont la taille varie entre 0,1 et 50 µm (bactéries, virus, phytoplancton ou divers minéraux).

Pour la plupart des espèces de spongiaires, les cellules sont soutenues par un squelette fait d'éléments de silice ou de calcaire, appelées spicules (figure 1.7 - 4). Les spicules sont, en plus, entourés de fibres organiques de collagène (spongine) qui renforcent et rigidifient la structure. Certaines espèces ne possèdent pas de spicules mais seulement de la spongine disposée en fibres épaisses.

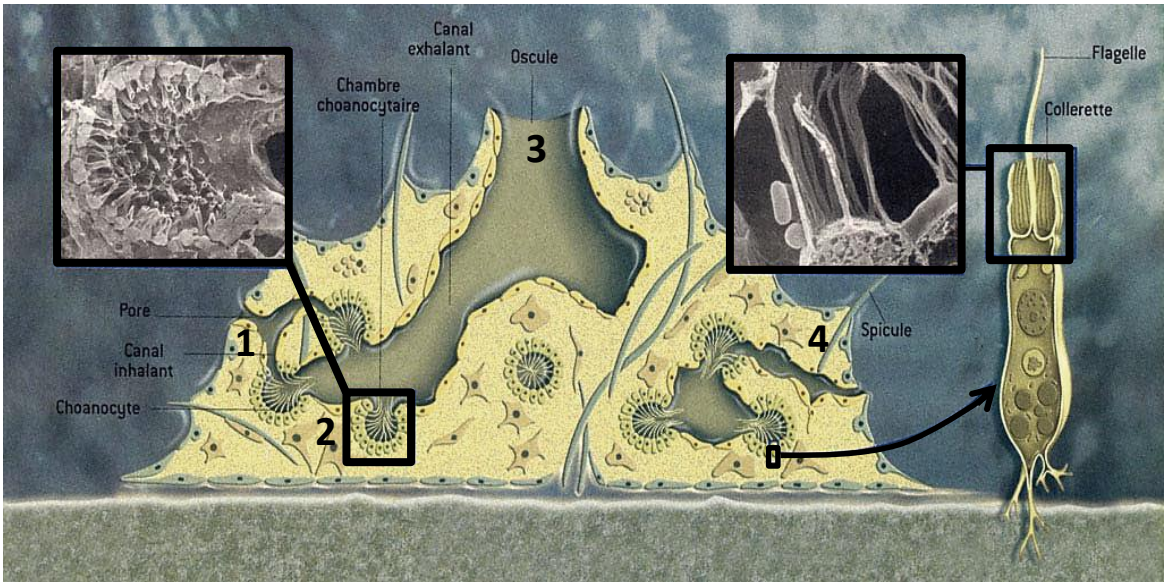


Figure 1.7. Schéma de l'organisation générale d'une éponge marine de type leucon et des différentes couches cellulaires (Manuel *et al.*, 2003).

B) Mode de vie

Ces animaux marins vivent fixés sur différents substrats comme les rochers, les algues, les carapaces de crabes et les coquilles de mollusques ou enfouis dans la vase et le sable (Beaumont et Cassier, 1983). Leurs formes et leurs couleurs sont très variées. En milieu calme, les éponges peuvent être plutôt ramifiées et massives alors qu'en milieu agité, elles sont souvent aplaties et encroûtantes. Leur taille varie selon l'espèce et les conditions du milieu. Celle-ci peut aller de quelques millimètres au mètre. Elles abritent souvent d'autres organismes tels que des ophiures, des crabes, des cnidaires ou des oursins qu'elles protègent des courants et des prédateurs mais surtout de nombreux microorganismes (Beaumont et Cassier, 1983).

Elles se nourrissent principalement de microalgues, bactéries, virus et débris organiques (Stuart et Klumpp, 1984 ; Duckworth *et al.,* 2006). Pour cela, elles « pompent » l'eau qui rentre par les pores inhalants, les ostia et qui circule jusqu'aux chambres choanocytaires. Seules les particules de diamètre inférieur à 50 µm seront aspirées. Les petites particules (de 0,1 à 50 µm) sont phagocytées par les choanocytes à la base de la collerette puis englobées dans une vacuole digestive (Reiswig, 1971 ; Wilkinson *et al*, 1984).

Les particules non assimilées sont rejetées par les oscules ou bioaccumulées par les éponges comme divers polluants organiques ou minéraux tels que les pesticides ou les métaux. Les bactéries de type alimentaire représentent 70 % de l'apport de nutriments nécessaires pour la croissance et le métabolisme des éponges (Duckworth & Pomponi, 2005).
Les éponges marines ont également la particularité d'abriter des bactéries symbiotiques qui résistent à la phagocytose et au système immunitaire de leur hôte leur permettant ainsi de vivre dans l'éponge (Vacelet et Donadey, 1977 ; Friedrich *et al*., 2001). Les bactéries symbiotiques représentent entre 30 et 60 % de la biomasse totale de l'éponge suggérant ainsi une importance physiologique et écologique considérable pour l'hôte (Vacelet et Donadey, 1977). Elles joueraient plusieurs rôles bénéfiques pour l'hôte, par exemple en augmentant la rigidité du squelette de l'éponge et en fixant le carbone et l'azote, source de nutriments pour l'hôte (Thacker et Freeman, 2012). Toutefois, leur principal rôle serait de contribuer à la défense chimique de leur hôte en produisant des métabolites secondaires (Vacelet et Donadey, 1977).

Ainsi, plusieurs chercheurs se sont intéressés aux interactions existant entre l'éponge et les bactéries. Dans une de leurs expériences, Wehrl et son équipe (2007) ont voulu vérifier si l'éponge *Aplysina aerophoba* était capable de différencier des bactéries de type alimentaire (isolées d'eau de mer) de bactéries symbiotiques de l'éponge (isolées à partir de broyat d'éponge). Après plusieurs observations au microscope à épifluorescence de bactéries marquées, ils ont montré que cette éponge faisait bien la distinction. En effet, ils visualisaient les bactéries dites alimentaires au niveau des chambres choanocytaires alors que les bactéries symbiotiques se retrouvaient dans le mésophyle (Wehrl *et al.,* 2007). Les mécanismes chimiques ou mécaniques qui permettent à l'éponge de réagir différemment vis-à-vis de sa communauté bactérienne symbiotique par rapport aux bactéries utilisées pour la nourriture ne sont pas encore clairement définis (Gardères *et al*., 2012).

C) Le rôle des éponges dans la bioremédiation

Les éponges marines sont capables de retenir et/ou de métaboliser des polluants tels que les éléments traces métalliques, les hydrocarbures, les bactéries, etc. Elles pourraient

donc être utilisées pour la bioindication qui désigne l'évaluation de la qualité d'un milieu à l'aide de bioindicateurs (espèce animale ou végétale permettant d'indiquer la présence ou les effets de polluants) mais aussi pour la bioremédiation comme filtres écologiques.

Dès 1975, Goldberg suggérait d'utiliser les organismes marins (essentiellement les bivalves) comme sentinelles de la contamination métallique et mettait en place un programme de bioindication en Amérique du Nord nommé « Mussel Watch Program » (Goldberg *et al*., 1983). Quelques années plus tard, plusieurs études mettaient en avant les quantités impressionnantes de métaux retrouvées dans les éponges suggérant l'existence d'un système de détoxification (Patel *et al*., 1985 ; Hansen *et al*., 1995 ; Cebrian *et al*., 2003). Cela avait permis le lancement du « Sponge Watch Program ». Ainsi, l'éponge marine *Halichondria panicea* était utilisée au Danemark dans les programmes de bioindication (Hansen *et al.*, 1995). Cette éponge accumulait le cuivre, le zinc et le cadmium à des concentrations de l'ordre de la centaine de mg/kg d'éponge sèche.

De plus, les éponges pourraient apporter une solution à la pollution marine par le contrôle de la dispersion des polluants qui seraient alors bioaccumulés par l'animal. De Mestre et son équipe (2012) ont étudié la variation de la concentration métallique chez plusieurs espèces d'éponges vivant dans des milieux différents. Ils ont démontré que la concentration métallique au sein des éponges dépendait bien de l'environnement dans lequel elles vivaient. Ils en ont ainsi conclu que les éponges transplantées d'un milieu non pollué vers un milieu pollué pouvaient servir de bioremédiateurs lors de contamination par les métaux. Enfin, créée aux Pays-Bas en 2005, la société Porifarma dirigée par le docteur de Goeij utilise les éponges comme bioremédiateurs pour améliorer la qualité de l'eau du port de Singapour (projet Singapore Delft Water Alliance) ; l'objectif étant de diminuer la quantité d'ETM dans l'eau (Porifarma). De plus, la sélection des bactéries par les éponges a été étudiée sur plusieurs espèces et l'adhésion bactérienne pourrait jouer un rôle sur le taux de rétention des métaux. Par exemple, l'éponge *Chondrilla nucula* est utilisée en Italie par les aquaculteurs pour dépolluer l'eau de mer. En effet, l'élevage du bar et de la dorade entraînait une contamination de l'eau par des bactéries fécales dont se nourrirait l'éponge (jusqu'à 7.10^{10} bactéries/h/m² d'éponge) (Milanese *et al*., 2003). Stabili *et al.,* (2006) ont montré que l'éponge *Spongia officinalis* var *adriatica* était très efficace pour éliminer les bactéries ;

l'efficacité de rétention de l'éponge atteignant la valeur de 61 % des bactéries en 2 heures. En 2007, Wehrl *et al.,* ont démontré que l'éponge *Aplysina aerophoba* était capable de filtrer les bactéries de son environnement et d'atteindre un taux d'absorption de 2,76 bactéries/h/g d'éponge.

L'exploitation des éponges comme bioremédiateur d'un environnement pollué est attrayante car elles possèdent en plus une valeur commerciale qui réside dans l'extraction des métabolites secondaires. Après avoir joué leur rôle d'épurateur, les éponges pourraient être valorisées à des fins biotechnologiques.

D) Une riche source de métabolites

En plus de leur capacité de filtration, les éponges et leurs bactéries symbiotiques biosynthétisent une grande quantité de métabolites secondaires biologiquement actifs et aux structures inhabituelles tels que des dérivés d'acides aminés, des acides gras, des alcaloïdes, des porphyrines, des terpénoïdes, des stérols, des polycétides (Mayer & Gustafson, 2008 ; Mayer & Hamann, 2002). Bien que non essentiels à la vie, les métabolites secondaires jouent un rôle primordial dans la communication entre espèces et dans la défense chimique.

L'engouement pour la chimie des invertébrés marins et en particuliers les éponges remonte aux années 1950 avec l'isolement des premières substances actives par Bergmann et son équipe (Bergmann & Feeney, 1950, 1951). Il s'agissait de trois nucléosides (la spongouridine, la spongothymidine et la spongosine) obtenus à partir de *Cryptotethya crypta,* une éponge des Caraïbes, ayant des activités antivirales et anticancéreuses. Cette découverte a permis dès les années 1960, la commercialisation en Europe de l'antiviral Ara-A et l'anticancéreux Ara-C (Bergmann & Burke, 1955). A partir de là, les recherches de substances actives produites par les éponges se sont multipliées notamment grâce aux méthodes d'analyse structurale (résonance magnétique nucléaire, spectrométrie de masse, cristallographie, etc). A ce jour, deux médicaments inspirés de molécules naturelles isolées d'éponges marines sont commercialisés : le Depocyte®, dont le principe actif est l'Ara-C, indiqué dans le traitement des patients atteints d'un cancer du sein et le Halaven®, indiqué dans le traitement de la méningite lymphomateuse (Sipkema *et al.*, 2005). Une dizaine

d'autres molécules est actuellement en phase d'essai clinique chez l'homme. Ainsi, l'halichondrine B, extraite en 1985 de l'éponge *Halichondria okadai,* possède des propriétés anticancéreuses (Uemura *et al*., 1985 ; Bai *et al.*, 1991), tout comme le discodermolide (Gunasekera *et al*., 1990 ; Ter Haar *et al.,* 1996) trouvé dans l'éponge des Caraïbes *Discodermia dissoluta*. Plus récemment, trois composés biologiquement actifs avec un potentiel pharmaceutique ont été isolés de l'éponge *Mycale hentscheli*. Le mycalamide A est un puissant inhibiteur de la synthèse protéique et provoque l'apoptose en empêchant la division cellulaire des cellules cancéreuses (Burres & Clement, 1989). La pateamine est une cytotoxine (Northcote *et al*., 1991) qui présente des propriétés immunosuppressive et apoptotique (Romo *et al*., 1998). Le peloruside A a été testé comme médicament anti-tumoral (Hood *et al.,* 2002).

La grande diversité de métabolites secondaires découverte dans les éponges marines et la complexité de leur voie de biosynthèse montrent leur importance dans la survie des éponges. Par exemple, la production de composés antifouling limite l'adhérence des micro-organismes et l'attachement de macroorganismes (algues, bernacles, moules...) à la surface des éponges empêchant ainsi leur « étouffement » (Proksch, 1994). Ainsi, le pseudoceratidine 2 et la ceratinamide A isolés de *Pseudoceratina purpurea* inhibent la colonisation par les larves de balanes (Tsukamoto *et al.*, 1996a, 1996b) alors que le C22 céramide inhibe le fouling par les macroalgues (Hattori *et al.,* 1998). La sécrétion d'un mucus contenant des toxines permet à certaines espèces d'éponges de conquérir l'espace et entrave le développement d'organismes à la croissance plus rapide (Thompson, 1985 ; Becerro *et al*., 1997). Les molécules produites par les éponges peuvent également repousser ou dissuader les prédateurs même si relativement peu d'animaux se nourrissent d'éponges (hormis certains poissons, tortues ou oursins) (Meylan, 1990).

Enfin, les éponges doivent se protéger contre les infections bactériennes, fongiques ou virales. Les bactéries représentent une part importante de la biomasse totale de l'éponge. Il est donc suggéré que l'éponge est capable d'accepter mais aussi de contrôler la croissance de certaines bactéries symbiotes et au contraire d'inhiber la croissance de bactéries pathogènes par la production de métabolites secondaires (Müller *et al*., 1981). Plusieurs composés antibactériens ont été découverts dans les éponges. Par exemple, les arenosclerines A, B et C ont montré un effet inhibiteur sur la croissance de douze souches bactériennes résistantes aux antibiotiques et sources d'infections nosocomiales (Torres *et al.,* 2002).

Toutefois, ces molécules sont présentes en très petites quantités dans les éponges. Pour avoir une quantité suffisante de matière première, plusieurs solutions sont donc envisageables :

- **Collecter les éponges** dans leur milieu naturel. Il s'agit d'une solution rapide et envisageable pour les espèces abondantes et accessibles à pied ou par plongée sous-marine. Seulement, cette technique n'est pas sans conséquence sur l'environnement et peut aboutir à une surexploitation de la ressource (Munro *et al.,* 1999 ; Osinga *et al.,* 1999b).

- **Réaliser la culture *in vitro*** des cellules d'éponges pour la production de métabolites. L'avantage est le contrôle total des conditions de culture (Duckworth, 2001). Cependant, obtenir une lignée cellulaire qui prolifère après dissociation ou qui continue à produire des métabolites semble être laborieux (Osinga *et al.*, 1999a, 1999b ; Duckworth, 2001).

- **Synthétiser la molécule d'intérêt** ou les parties actives de la molécule. Cela peut s'avérer compliqué et très cher industriellement car les molécules issues des éponges sont bien souvent complexes et leur synthèse requiert une multitude d'étapes difficilement réalisables (Munro *et al.,* 1999). De plus, le rendement de la synthèse chimique est souvent pauvre. Par exemple, le rendement maximal de la synthèse totale de la molécule latrunculin, composé cytotoxique isolé de l'éponge *Latrunculia magnifica* est seulement de 2 % (White & Kawasaki, 1992).

- **Avoir recours à la culture d'éponge marine** ou spongiculture. La spongiculture permet d'exploiter des quantités importantes d'éponges sans nuire à l'écosystème, une solution attractive pour avoir accès à une quantité de matière première suffisante.

1.4. La spongiculture

La spongiculture est la culture d'éponges. Elle peut se réaliser soit *in situ* dans leur milieu naturel soit *ex situ* en milieu fermé où les conditions de culture peuvent être contrôlées.

A) Procédés de culture

Spongia officinalis est une éponge à haute valeur commerciale utilisée comme éponge de toilette naturelle depuis l'Antiquité. Cependant, la surpêche a entrainé une diminution des spécimens sauvages. L'aquaculture restait alors la solution qui pouvait fournir assez de quantités pour répondre à la demande des consommateurs. La spongiculture s'est donc développée en Méditerranée et en Floride au XIXème siècle (Bergquist & Tizard, 1969 ; Storr, 1964) même si les seuils de rentabilité étaient difficilement atteints du fait de la croissance lente des explants. En 1938, une épidémie fongique anéantit les pêcheries américaines et déclencha une baisse drastique du nombre de spécimens. Au même moment, apparaissaient les éponges synthétiques. Toutefois, la culture des éponges marines connait un regain d'intérêt depuis quelques décennies notamment pour l'obtention de principes actifs.

Les éponges peuvent être cultivées selon quatre procédés :

- **La réagrégation** (Pomponi, 2006) : les cellules dissociées d'une éponge par agitation ou par frottement sont capables de se réagréger et de se réorganiser en plusieurs individus fonctionnels appelés primmorphs. Cette méthode, surtout utilisée en laboratoire, n'est pas réalisable pour la production de grandes quantités de biomasse. De plus, il n'existe pas pour l'instant de méthode de multiplication des cellules d'éponges.

- **La culture en aquarium** (Osinga *et al*., 1999a ; Le Pennec *et al.,* 2003) : les éponges sont récoltées dans leur milieu naturel puis ramenées au laboratoire où elles sont placées dans des aquariums.

- **L'essaimage** (De Caralt *et al*., 2007 ; Duckworth, 2009) : il se base sur le mode de reproduction naturelle par voie sexuée. Dans le cas d'une reproduction sexuée, les gamètes (spermatozoïdes et ovules) proviennent de la différenciation des archéocytes. Après la fécondation, l'œuf se développe dans l'éponge puis devient une larve nageuse expulsée vers le milieu extérieur. Cette technique s'inspire donc du mode de captage des huîtres. Cependant, les éponges n'ont pas les mêmes capacités de colonisation que les mollusques. Après plusieurs semaines en nurserie où les larves sont régulièrement nourries, les éponges sont transplantées dans des fermes où elles continueront leur croissance.

- **La régénération** (Van Treek *et al.*, 2003 ; Duckworth & Wolff, 2007) : les éponges sont aussi capables de se reproduire de façon asexuée. Ainsi, des cellules peuvent se détacher de l'individu principal et se réassocier spontanément pour reformer une nouvelle éponge. La régénération consiste donc à découper des fragments d'éponge pour obtenir un nombre suffisant de spécimens à cultiver *in situ*. Les éponges sont alors capables de se réorganiser et de croître.

B) Les techniques de culture

In situ, les conditions environnementales doivent être prises en compte dans la croissance des éponges. En effet, la culture peut être influencée par divers facteurs abiotiques et biotiques. Les saisons, le mouvement de l'eau (marée, courants), la température, l'apport en nutriments et le biofouling sont des facteurs importants pour l'augmentation de la biomasse (Duckworth *et al.,* 1997, 2004). La prédation, la luminosité, la profondeur et les ultraviolets vont jouer sur la survie (Wilkinson & Vacelet, 1979 ; Jokiel, 1980 ; Shick *et al.,* 1996). Les méthodes de cultures doivent également être adaptées selon l'espèce d'éponge cultivée et selon son utilisation. Chaque espèce possède finalement ses propres conditions de culture. C'est pourquoi, la recherche de techniques toujours plus fiables est une longue histoire.

La taille et la forme des éponges de toilette déterminant leur valeur commerciale, les méthodes de culture de *S. officinalis* sont limitées. Crawshay *et al.,* (1939) fixaient les éponges sur des disques en béton suspendus dans l'eau par un câble en inox souple. Plus tard, la méthode était modernisée et les disques en béton remplacés par des disques en Polychlorure de Vinyle (PVC) plus pratiques d'utilisation (Vacelet, 1985 ; Verdenal & Vacelet, 1990 ; Pronzato, 1999). Aujourd'hui, les éponges sont préalablement découpées en fragments sphériques et suspendues dans la colonne d'eau via un support vertical fabriqué à partir de PVC et de câbles de fils métalliques (Corriero *et al.,* 2004).

Au contraire, la forme des éponges n'a pas d'importance pour la production de métabolites secondaire d'où le développement de nouvelles techniques de culture. Battershill & Page (1996) puis Kelly *et al.* (2004) ont testé la culture en lanterne à coquillages (cadre en fil d'acier

avec revêtement PVC et filet en polyéthylène) divisée en plusieurs compartiments. Par la suite, Duckworth *et al.,* (1997) cultivaient les éponges dans des poches à mailles métalliques suspendues dans la colonne d'eau. Cette technique est régulièrement utilisée depuis (Van Treeck *et al.*, 2003 ; Duckworth & Wolff, 2007). D'autres méthodes consistent à enfermer les éponges dans des petits containers en PVC qui laissent passer l'eau et les nutriments mais empêchent les prédateurs de s'attaquer aux éponges (Pronzato, 2004) ou dans des filets suspendus fabriqués en fibres synthétiques (polypropylène PP ou polyéthylène PE) (Page *et al*., 2005) (figure 1.8).

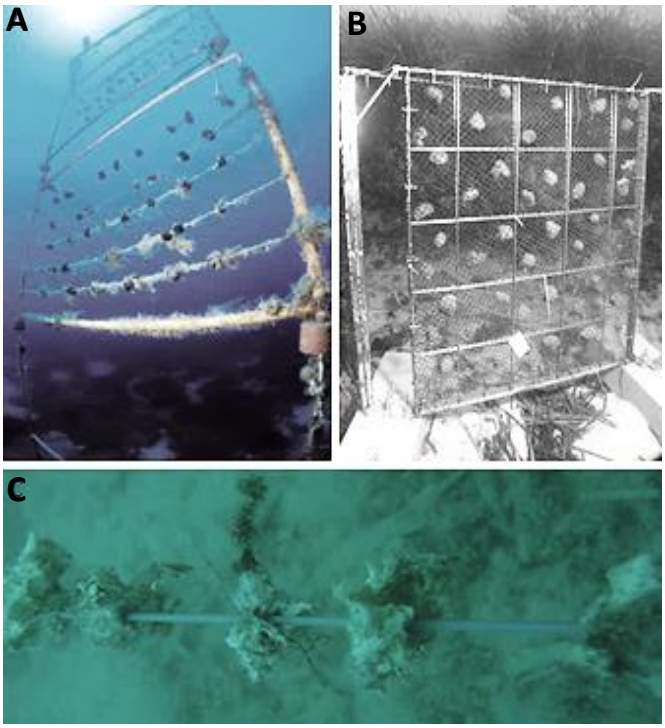


Figure 1.8. Différentes techniques de culture de spongiaires. (A) Culture de *Spongia officinalis* en Méditerranée (Corriero *et al*., 2004). L'éponge est suspendue verticalement dans la colonne d'eau. (B) Culture en poche métallique de l'éponge *Ircinia variabilis* en mer Méditerranée (Van Treeck *et al*., 2003). (C) Culture de *Dysidea avara* suspendue horizontalement par un câble métallique (Page *et al.,* 2011).

Aujourd'hui, la plupart des matériaux utilisés en spongiculture sont issus de l'industrie pétrolière. Les plastiques PVC, PE ou PP se dégradent au fil du temps en microplastiques (taille entre 0,5 à 5 mm) impactant la chaine alimentaire (Kwon *et al*., 2015). Dans certaines zones

d'accumulation, la concentration en microplastiques est comparable à la concentration en zooplancton. Par exemple, en mer Méditerranée, des ratios microplastiques/zooplancton de 1/10 à 1/2 ont été trouvés (Dussud & Ghiglione, 2014). Or, le devenir des déchets en mer et leurs impacts sur les écosystèmes marins font partie des enjeux définis par la DCSMM.
Depuis peu, de nouveaux matériaux sont apparus sur le marché. Il s'agit des écomatériaux (ou matériaux biosourcés) qui répondent à des critères techniques habituellement exigés de tout matériau (faisabilité technique, durabilité, stabilité...) mais aussi à des critères environnementaux (faible répercussion sur l'environnement, recyclable...). Parmi eux, le Poly (Acide Lactique) (PLA) est un matériau biodégradable à terre aux propriétés similaires aux plastiques conventionnels mais dont la matière première, l'acide lactique, est produite par fermentation bactérienne à partir de ressources renouvelables comme l'amidon de maïs ou la canne à sucre (Södergard & Stolt, 2002). La norme européenne NF EN 13432 de 2007 définit un plastique biodégradable comme un plastique ayant au moins 90 % de dégradation en 6 mois maximum dans des conditions de compostage. De nombreuses études ont été menées pour étudier sa biodégradation en milieu terrestre (Torres *et al*., 1996 ; Akutsu-Shigeno *et al*., 2003 ; Walczak *et al.*, 2015). Cependant, peu d'étude sur la dégradation du PLA en milieu marin ont été publiées jusqu'à présent (Deroiné *et al.,* 2014) et à notre connaissance, aucune sur sa biodégradation par des microorganismes. Toutefois, si la spongiculture était amenée à se développer, il serait pertinent de s'intéresser à de nouveaux matériaux plus respectueux pour l'environnement marin.

La culture *ex situ* permet quant à elle de contrôler les conditions de culture mais demande de l'espace à terre. Une fois les éponges placées en bassin, plusieurs paramètres physico-chimiques doivent être régulièrement mesurés comme la salinité, le pH, la température, l'oxygène dissous, le taux de nitrate ou encore la quantité de silice nécessaire à la formation des spicules (Belarbi *et al.,* 2003). Beaucoup d'éponge ne survivent pas si elles sont exposées à l'air libre, c'est pourquoi les manipulations doivent se faire au maximum sous l'eau (Osinga *et al*., 1999a). En effet, lorsque l'air rentre dans les canaux, il entraine des dommages au niveau des choanocytes et bloque le système de pompage de l'eau. En bassin, il est possible d'induire la production de larves en augmentant la température de l'eau, les quantités de nourriture disponible et l'exposition à la lumière (Osinga *et al*., 1999b).

1.5. Hypothèses de travail

A) Travaux préliminaires

La première phase de ce travail de thèse a été de sélectionner parmi les espèces de spongiaires communes en Bretagne, l'espèce la plus intéressante pour la bioremédiation. En effet, il fallait s'assurer que l'espèce choisie soit connue pour accumuler des teneurs importantes en polluants, qu'elle ait une cinétique de croissance *in situ* intéressante pour envisager la spongiculture à grande échelle, qu'elle survive suffisamment longtemps en aquarium afin de pouvoir réaliser toutes les expérimentations *in vitro* soit au minimum 7 jours, qu'elle soit facilement accessible, naturellement présente et abondante sur les concessions ostréicoles pour éviter d'introduire une espèce non endémique et enfin qu'elle soit originale d'un point de vue chimique dans un objectif de valorisation.

Différentes espèces d'éponges aux formes et aux couleurs variées sont présentes en Bretagne, en particulier en Ria d'Etel (figure 1.9 - A) et pourtant il y a peu de bibliographie sur ces espèces. Parmi les plus abondantes en eau profonde, citons *Suberites domuncula*, *Cliona celata*, *Tethya aurantium, Haliclona oculata*, *Polymastia mamillaris, Raspailia ramosa* et *Celtodoryx ciocalyptoides*. D'autres espèces sont présentes sur l'estran, en Rivières de Penerf (figure 1.9 - B) comme *Halichondria panicea* ou en Ria d'Etel comme *Hymeniacidon perlevis* (figure 1.9 - C).

Figure 1.9. Le département du Morbihan, Bretagne Sud. Localisation des éponges collectées, (A) en ria d'Etel, (B) en rivière de Penerf et (C) sur l'estran à Locoal-Mendon.

Dans l'objectif de faire une première sélection entre ces éponges, l'accumulation d'éléments traces métalliques et de polluants organiques chez ces espèces a été comparée avec l'huître *C. gigas* généralement utilisée comme espèce bioindicatrice (surveillance ROCCH). Les éponges ont été collectées par plongée sous-marine en Ria d'Etel à différentes périodes en 2012 et 2015. Les huîtres de l'espèce *C.* gigas, âgée de trois ans ont été fournies par Le Baron Denis, ostréiculteur en Ria d'Etel. Les animaux ont été ramenés au laboratoire puis lyophilisés avant d'être envoyés au laboratoire BioMea de l'Université de Caen à Christelle Caplat pour analyse. La teneur de 12 ETM a été mesurée par spectrométrie d'absorption atomique. Les résultats ont montré que les huîtres accumulaient en plus grande quantité certains métaux comme le cuivre et le zinc. En revanche, les éponges, toutes espèces confondues, accumulaient certains métaux à des niveaux supérieurs à ceux présents chez l'huître comme l'aluminium, le chrome, le fer, le titane ou encore le plomb. Parmi les espèces étudiées, *H. perlevis* a montré une capacité de bioaccumulation supérieur aux autres espèces spongiaires notamment le plomb (Gentric *et al.,* 2016 – Annexe 2).

C. celata est une espèce extrêmement abondante notamment en ria d'Etel. C'est une éponge facile à identifier et à prélever dans le milieu marin. Elle est présente entre 0 et 20 m de profondeur. Ses propriétés de bioaccumulation sont modestes (Gentric *et al.,* 2016) mais le principal inconvénient est qu'elle est connue comme étant une éponge parasite des huîtres, capable de perforer leur coquille entrainant leur mort (figure 1.10) (Wesche *et al*., 1997 ; Carver *et al*., 2010). Sa culture en milieu ostréicole ou à proximité immédiate des concessions est donc inenvisageable.

Figure 1.10. Coquille de *Nassarius reticulatus* perforée d'une multitude de trous à cause de *C. celata* (d'après http://www.gulfspecimen.org/specimen/porifera/).

Halichondria panicea est abondante et naturellement présente sur les sites conchylicoles. Elle se retrouve accrochée aux tables ou aux bouchots (figure 1.11). En revanche, malgré les nombreux essais que nous avons réalisés au laboratoire, *H. panicea* ne survit pas en aquarium ce qui est un frein à son étude. De plus, *H. panicea* est une éponge plutôt encroûtante et très friable. La détacher de son substrat sans l'endommager est délicat.

Figure 1.11. *Halichondria panicea* accrochée aux bouchots (rivière de Penerf) et aux tables conchylicoles (rivière d'Etel).

Celtodoryx ciocalyptoides (figure 1.12) est une éponge originaire de la mer de Chine et du Japon (Henkel & Janussen, 2011). Probablement introduite en Bretagne par le biais de l'huître japonaise *C. gigas*, elle se retrouve aujourd'hui dans des zones ostréicoles du Golfe du Morbihan et en Ria d'Etel (figure 1.9 - A).

La particularité de *C. ciocalyptoides* est qu'une fois hors de l'eau, elle produit un abondant mucus composé essentiellement de polysaccharides possédant des propriétés antivirales vis-à-vis de l'herpès humain (Rashid *et al*., 2009). Bien que le génome du OsHV-1 présente peu d'homologies avec celui de l'herpès virus humain, il nous semblait intéressant d'étudier ce modèle potentiellement bioaccumulateur de polluant et source de molécules antivirales. Toutefois, nos travaux menés sur ces polysaccharides ont conduit à la découverte de propriétés favorisant le biofilm d'*E. coli* et de *Vibrio splendidus*. Ces résultats ont été

communiqués lors d'un congrès international (Ghent, Belgique) par la présentation d'un poster (annexe 3). Des analyses structurales de ce polysaccharide sont actuellement en cours.

De plus, depuis sa première observation en 1996, *C. ciocalyptoides* est devenue très abondante. Sa distribution en Ria d'Etel, une zone Natura 2000 de la façade atlantique française, a été évaluée (Gentric *et al*., 2016 – Annexe 4). Les résultats obtenus suggèrent que *C. ciocalyptoïdes* est présente de façon abondante le long de la ria d'Etel et qu'elle possède une capacité d'adaptation à un milieu pollué. Mais cette éponge est aussi considérée comme invasive (Williamson & Fitter, 1996). Là où elle s'implante, elle entre en compétition avec les espèces locales pour l'occupation de l'espace. Par exemple, dans le golfe du Morbihan, elle englobe progressivement la base de la gorgone *Eunicella verrucosa* et s'étend sur d'autres éponges comme *Haliclona simulans* ou *Amphilectus fucorum* (Perez *et al*., 2006). Sa présence nécessite une surveillance particulière afin de mettre en place une éventuelle gestion. Il est important de suivre la colonisation des fonds marins par l'éponge via des observations *in situ* (espèces et habitats impactés, augmentation de la superficie de colonisation) et par la mise en place d'un protocole adapté permettant un suivi de *C. ciocalyptoides*. En tout état de cause, la culture de *C. ciocalyptoides* n'est donc pas envisageable.

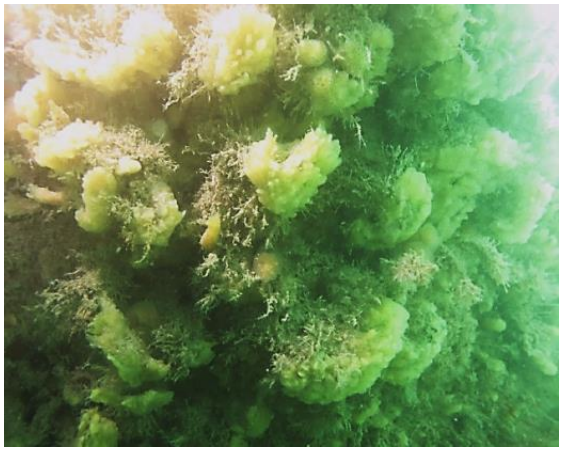


Figure 1.12. L'éponge marine invasive *Celtodoryx ciocalyptoides* (rivière d'Etel) observée durant le printemps 2011.

Le choix du modèle spongiaire est donc très limité. Toutes les données récoltées sont réunies afin d'établir un classement des éponges collectées (tableau 1.3).

Tableau 1.3. Présentation des éponges collectées en Bretagne Sud. La sélection se fait selon des critères d'abondance, de présence en milieu ostréicole, de survie en aquarium et si la culture de l'espèce est réalisable en milieu ostréicole.

Espèce	Abondante en Bretagne Sud	Présente sur les concessions ostréicoles	Survie en aquarium plus 7 jours	Culture envisageable sur les concessions ostréicoles
T. aurantium	+	- - -	-	+
H. oculata	-	- - -	- - -	+
R. ramosa	- - -	- - -	- - -	+
P. mamillaris	- - -	- - -	- - -	+
H. panicea	+ +	+	- -	+
C. ciocalyptoides	+ + +	+ +	- - -	- - -
C. celata	+ +	+	+	- - -
S. domuncula	+ + +	- -	+ + +	+ +
H. perlevis	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +

Deux espèces ressortent du lot : *S. domuncula* et *H. perlevis*. Cependant, même si *S. domuncula* est très abondante en Baie de Quiberon où elle est parfois récoltée par dragage par les ostréiculteurs, elle est rarement présente sur les concessions ostréicoles. De plus, peu de travaux ont été réalisés sur l'utilisation de cette éponge comme bioremédiateur (Créquer, thèse en cours 2015/2018). En revanche, l'espèce *H. perlevis* est déjà connue pour cette propriété. Nous avons donc choisi de concentrer nos recherches sur l'éponge *H. perlevis*, une espèce endémique et présente dans les zones ostréicoles.

B) Modèle d'étude : *Hymeniacidon perlevis*

Décrite pour la première fois par Montagu (1814), *H. perlevis* appartient à la classe des Demospongiae et à l'ordre des Suberitida. Elle se retrouve sur les côtes de l'Océan Atlantique, en Mer du Nord, en Manche et en Mer Adriatique (WoRMS). Elle est relativement commune et abondante en Bretagne sud. De plus, elle est facilement accessible à marée basse (coefficient de 80-85 et supérieur). De couleur jaune à orange vif, cette espèce vit dans des zones vaseuses, entre l'étage médiolittoral inférieur et 40 m de profondeur sur les fonds

rocheux exposés aux courants modérés. Ses ramifications peuvent mesurer plusieurs centimètres de haut. Sa consistance est très molle. C'est une éponge qui est assez fragile et s'arrache donc facilement. Elle est fréquemment retrouvée sur les concessions ostréicoles, à même le sol, fixées aux cailloux ou aux débris de coquillages et accrochée aux tables (figure 1.13).

Figure 1.13. Les spécimens *d'Hymeniacidon perlevis* mesurent environ une 20aine de cm de diamètre sur 10 cm de hauteur. Ils s'accrochent fréquemment aux pieds des tables ostréicoles.

L'identification des éponges est basée sur la composition, la forme, la taille et l'arrangement de leurs spicules (Vacelet & Boury-Esnault, 1987). Les éponges ne conservant pas leur intégrité dans le temps, les spicules, éléments durs et résistants sont indispensables aux systématiciens. *H. perlevis* est facilement identifiable grâce à ses spicules appelés mégasclères. Deux catégories de spicules sont retrouvées dans cette éponge : des spicules longs avec une extrémité pointue et une autre arrondie de longueur comprise entre 300 et 475 µm et des spicules longs, entre 500 et 600 µm présentant des gonflements à l'une des extrémités (figure 1.14).

Figure 1.14. Schéma des spicules trouvés chez *Hymeniacidon perlevis* (WoRMS).

C) Son rôle dans la bioremédiation

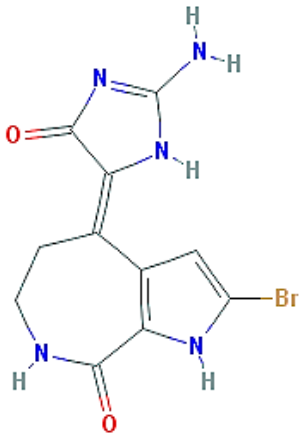
H. perlevis a déjà fait l'objet de publications antérieures. Elle est connue pour filtrer et digérer en laboratoire des bactéries d'origine fécale telle qu'*E. coli* mais aussi certaines bactéries du genre *Vibrio* (Fu *et al.,* 2006, 2007). De plus, elle est actuellement étudiée en Italie à proximité des fermes aquacoles comme bioremédiateur de la pollution bactériologique. En laboratoire, Longo *et al.,* (2010) ont mesuré l'accumulation des bactéries dans l'éponge sur plusieurs heures. D'après leurs résultats, ils en ont déduit que cette éponge peut accumuler et métaboliser les bactéries et donc être utilisée comme bioremédiateur. En Chine, *H. perlevis* est étudiée dans des fermes aquacoles, en culture intégrée, pour contrôler la multiplication de bactéries pathogènes vis-à-vis du turbot (Zhang *et al*., 2008). Des études en laboratoire ont été menées et ont montré une grande efficacité de rétention par l'éponge des coliformes fécaux et des *Vibrio* pathogènes du turbot.

En revanche, peu d'études ont estimé les capacités *d'H. perlevis à* bioaccumuler les ETM. Mahaut et son équipe (2013) ont évalué les capacités de bioaccumulation du cuivre et du zinc chez différentes espèces spongiaires. Les auteurs ont comparé les résultats obtenus avec ceux publiés par le réseau ROCCH sur la moule bleue *M. edulis*. L'éponge *H. perlevis* était, parmi les espèces étudiées, celle qui bioaccumulait le plus. Les concentrations en cuivre et en zinc mesurées en milieu portuaires contaminé étaient au maximum respectivement jusqu'à 44 et 20 fois plus élevées chez l'éponge que chez la moule (Mahaut *et al*., 2013). Les analyses que nous avons réalisées sur une dizaine d'espèces spongiaires de la Ria d'Etel confirmaient que l'espèce *H. perlevis* semblait bioaccumuler des teneurs en polluants plus importantes que

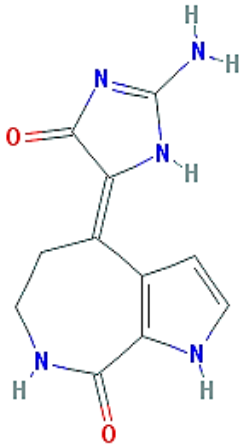
d'autres espèces de spongiaires et que *C. gigas* (Gentric *et al.,* 2016). Aujourd'hui, on ne connait toujours pas en détail les mécanismes de rétention des métaux mis en place par l'éponge.

D) Valorisation du genre *Hymeniacidon*

Le genre *Hymeniacidon* est un genre potentiellement intéressant d'un point de vue chimique. En 1983, deux produits naturels de la famille des pyrrole-2-amino-imidazoles ont été isolés d'une éponge d'Okinawa (Japon) appartenant à l'espèce *Hymeniacidon aldis* par une équipe de chercheurs japonais qui les ont nommés hymenialdisine **(1)** et debromohymenialdisine **(2)** (figure 1.15) (Kitagawa *et al*., 1983). Les recherches pharmacologiques sur ces deux molécules ont rapporté un effet inhibiteur des protéines kinases et ont montré leur potentiel prometteur dans le traitement de certaines maladies comme l'arthrose, la maladie d'Alzheimer ou encore certains cancers (Annoura & Tatsuoka, 1995 ; Song *et al*., 2008). Feng *et al*. (2013) ont également étudié ces deux molécules et trouvé une activité antifouling vis-à-vis des moules et les bryozoaires.



(1)



(2)

Figure 1.15. Structure chimique de l'hymenialdisine (1) et de la debromohymenialdisine (2).

Cependant, l'hymenialdisine et la debromohymenialdisine auraient déjà été isolées un an plus tôt par Cimino *et al.* (1982) à partir de l'éponge méditerranéenne *Axinella verrucosa*.

D'autres auteurs ont également retrouvé l'hymenialdisine et la debromohymenialdisine dans des éponges du genre *Axinella* (Zhang *et al*., 2006 ; Song *et al*., 2008 ; Feng *et al*., 2013). Par la suite, deux nouvelles molécules sont isolées d'*H. aldis* par une autre équipe japonaise : l'hymenidin **(3)** (Kobayashi *et al.,* 1986a) et l'hymenin **(4)** (figure 1.16) (Kobayashi *et al*., 1986b). L'hymenidin est un antagoniste des récepteurs sérotoninergiques et a une activité antiprotozoaire. Aujourd'hui, l'hymenidin se vend 258 $/mg (Pubchem) comme outil standard des tests *in vitro* pour la recherche académique. S'en suit la découverte d'une série de molécules, toutes isolées d'éponges de l'espèce *H. aldis* (Laubenfels, 1954) prélevées au large d'Okinawa (tableau 1.4).

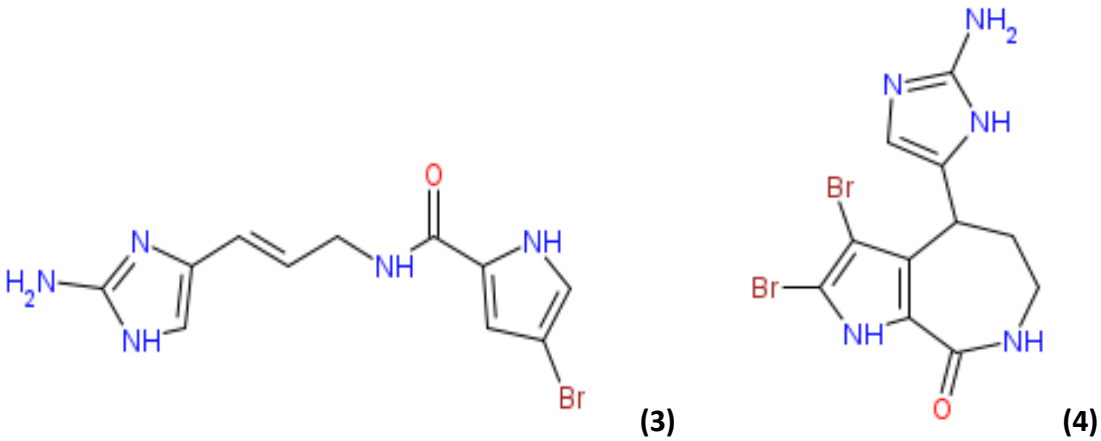


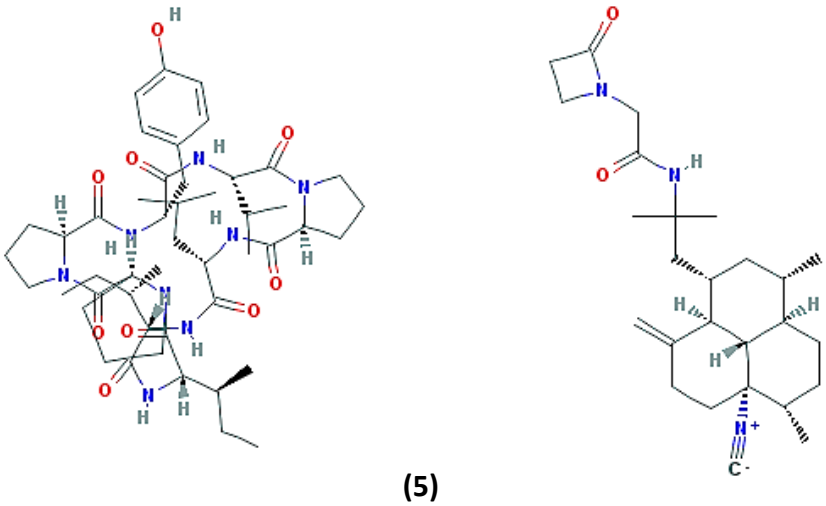
Figure 1.16. Structure chimique de l'hymenidin (3) et de l'hymenin (4).

Tableau 1.4. Molécules isolées d'éponges d'*H. aldis*.

Composés	Références
Hymenialdisine **(1)**	Kitagawa *et al*., 1983
Debromohymenialdisine **(2)**	Kitagawa *et al*., 1983
Hymenidin **(3)**	Kobayashi *et al.,* 1986a
Hymenin **(4)**	Kobayashi *et al.,* 1986b
Manzacidins A-C	Kobayashi *et al*., 1991
Kondu'acidin A	Kobayashi *et al.,* 1997
Spongiacidins A-D	Inaba *et al.,* 1998
Hymenamides A-K	Kobayashi *et al*., 1993, 1996 ; Tsuda *et al.,* 1993, 1994
Tauroacidins A et B	Kobayashi *et al.,* 1997

En 1992, l'équipe de Braekman a étudié les métabolites secondaires des éponges du genre *Agelas* (Braekman *et al*., 1992). Les composés isolés appartiennent à deux classes différentes : les terpenoïdes et les dérivés d'acide pyrrole-2-carboxylique. A la différence des terpenoïdes, des dérivés d'acide pyrrole-2-carboxylique ont été signalés dans certaines espèces de la famille des Axinellidae (genres *Acanthella* (Cimino *et al.*, 1982), *Axinella* (Cimino *et al.,* 1982), *Phakellia* (Shimizu *et al.,* 1984), *Pseudaxinella* (Schmitz *et al.,* 1985) et *Pseudaxinyssa* (De Nanteuil *et al.,* 1985)) et des Halichondriidae (genre *Hymeniacidon* (Kitagawa *et al*., 1983 ; Kobayashi *et al.,* 1986a et b, Tsuda *et al.,* 1993, 1994)).
D'après Braekman (1992), il est possible que les éponges du genre *Hymeniacidon* analysées par les équipes japonaises puissent avoir été incorrectement identifiées et il les soupçonne d'appartenir plutôt à la famille des Axinellidae. Van Soest (1992), taxonomiste des éponges, a réexaminé un spécimen d'*H. aldis.* Ce spécimen s'est avéré être *Pseudoaxinella massa* introduisant donc un doute sur la véritable origine de tous les métabolites secondaires isolés des *Hymeniacidon* d'Okinawa.

D'autres équipes de chercheurs ont également travaillé sur le genre *Hymeniacidon.* Ainsi, deux autres molécules ont été isolées : l'hymenistatin **(5)** présentant une activité contre certaines cellules cancéreuses (Petit *et al,* 1990) et la monamphilectine **(6)** présentant une activité antimalariale (Avilès et Rodriguez, 2010) (figure 1.17).



(5) **(6)**

Figure 1.17. Structure chimique de l'hymenistatin et de la monamphilectine.

1.6. Objectifs du travail

En conclusion, les éponges marines constituent une ressource naturelle qu'il serait possible d'exploiter. Leurs capacités de filtration et d'accumulation de polluants en font d'excellents candidats pour la bioremédiation et leur richesse en métabolites secondaires biologiquement actifs représente une ressource valorisable. Les travaux préliminaires réalisés sur plusieurs éponges communes en Bretagne et l'évaluation de leur capacité de bioaccumulation ont permis le choix d'un modèle d'étude : *H. perlevis*.

En collaboration avec le CRC de Bretagne Sud et le Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines, le projet REMEDBIO a défini pour objectif d'étudier le modèle spongiaire pour améliorer la qualité de l'eau en milieu conchylicole et réduire l'impact des contaminants chimiques et biologiques sur les coquillages.

- Le premier chapitre de cette thèse est consacré à la culture *d'H. perlevis.* Dans un premier temps, nous avons estimé la faisabilité de la culture d'éponges marines sur notre littoral, ce qui n'avait jamais été réalisé jusqu'à présent, via la détermination des taux de survie et de croissance d'individus transplantés. Le type de support utilisé pour soutenir les éponges est également discuté.

- Par la suite, notre travail a consisté à réaliser des expériences d'épuration en aquarium pour mettre en évidence l'intérêt d'une co-culture huîtres-éponges. Des huîtres et des éponges ont été mises en contact avec divers contaminants comme les bactéries *E. coli*, *V. aestuarianus*, du plomb ou le virus OsHV-1. Nous avons alors examiné plusieurs paramètres comme le taux de clairance et l'accumulation des polluants dans les huîtres et les éponges.

- Ce manuscrit se termine par une idée de valorisation du travail mené c'est-à-dire la création d'une entreprise innovante proposant un service de dépollution écoresponsable pour les ports, les collectivités et les aquaculteurs désireux d'améliorer la qualité de l'eau.

II. Matériels et méthodes

II. Matériels et méthodes

Sommaire du chapitre

2.1. Matériel biologique **57**
- A) Matériel animal 57
- B) Matériel microbiologique 58

2.2. Matériel d'aquariophilie **60**

2.3. Spongiculture **61**
- A) Localisation 61
- B) Dispositifs expérimentaux 61
- C) Suivi de croissance 62
- D) Support de culture à base de PLA 63

2.4. Expérience de rétention d'*E. coli* et de *V. aestuarianus* **65**
- A) Protocole expérimental 65
- B) Caractérisation bactérienne 65
- C) Efficacité de rétention et taux de clairance 66
- D) Expérience de décontamination 67
- E) Tests de libération des bactéries par les éponges 67
- F) Dénombrement des *E. coli* dans les huîtres et les éponges 67
- G) Dénombrement des *E. coli* dans l'eau des aquariums 68
- H) Dénombrement des *V. aestuarianus* dans les animaux et dans l'eau 68

2.5. Expérience de rétention du plomb **69**
- A) Protocole expérimental 69
- B) Analyse du plomb dans les éponges et dans l'eau 69
- C) Toxicité du plomb vis-à-vis de l'éponge *H. perlevis* 69
- D) Capacité des éponges à filtrer l'eau en présence de plomb 70
- E) Efficacité de rétention et taux de clairance 70
- F) Accumulation du plomb par les éponges : contamination aigüe 71
- G) Accumulation du plomb par les éponges : contamination chronique 71
- H) Libération du plomb après accumulation par l'éponge 72
- I) Expérience de décontamination 72

2.6. Expérience de rétention du virus OsHV-1 **72**
A) Protocole expérimental 72
B) Injection des huîtres 73
C) Infection virale 73
D) Extraction d'ADN 74
E) Quantification d'ADN viral par PCR en temps réel 74

2.7. Microscopie Electronique à Balayage **75**

2.8. Analyses statistiques **75**

2.1. Matériel biologique

A) Matériel animal

- L'éponge *H. perlevis*

L'éponge *H. perlevis* (Montagu, 1814) est collectée à la main à marée basse lors des coefficients de marée de 95. Une première récolte a eu lieu en janvier 2012 (eau à 11-12 °C) sur la concession de Monsieur Taugé Jean-François, ostréiculteur à Locmariaquer (GPS : 47,57/- 2,95 - Morbihan - France) puis, une seconde fois, en juin 2014 (eau à 14-15 °C) sur la concession de Madame Perraud, ostréicultrice à Locoal-Mendon (GPS : 47,72/- 3,10 - Morbihan - France). Les spécimens mesurent environ 1 dm^3 et pèsent 150 g. *Hymeniacidon perlevis* est délicatement détachée de son substrat et transportée au laboratoire dans des bacs contenant de l'eau de mer.

L'identification de l'espèce *H. perlevis* est basée sur une observation au laboratoire des spicules par microscopie optique (grossissement x 100) (IX71, Olympus). Les éponges sont découpées en morceaux d'environ 0,1 cm^3 qui sont ensuite lavés à l'eau distillée et mis dans l'eau de Javel non diluée pendant 24 h sous agitation. L'eau de Javel permet la dissolution des matrices organiques et ainsi, la libération des spicules. Après montage sous lame et lamelle, les spicules sont observés. Un appareil photo (IIBX51, Colorview) connecté au microscope, associé à un logiciel de traitement d'image (Cell-D) permet de réaliser des photos numériques.

- L'huître japonaise *C. gigas*

Les huîtres creuses adultes utilisées pour les expérimentations de décontamination appartiennent à l'espèce *C. gigas*. Elles sont âgées de 3 ans environ, de calibre 3 c'est-à-dire pesant entre 66 et 85 g et mesurant en moyenne 10 cm de long sur 5 cm de large. Elles sont achetées chez Le Baron Denis, producteur ostréicole à Etel (GPS : 47,66/-3,19 - Morbihan - France).

Pour les expérimentations vis-à-vis du virus OsHV-1, les huîtres âgées de 1 an sont achetées en janvier 2013 à l'écloserie d'Argenton (Finistère - France) et pèsent environ 5 g pour environ 40 mm de long sur 30 mm de large. Les huîtres sont emmenées au laboratoire IFREMER de la station de Bouin (Laboratoire Sécurisation des Productions en Conchyliculture - Vendée - France) et placées dans un bac d'eau de mer naturelle filtrée (1 µm) de 20 l acclimatée à 23 °C. Durant cette période, les huîtres sont nourries tous les jours avec 1 % (v/v) de microalgues de l'espèce *Skeletonema costatum* ($1,5.10^3$ cellules/ml).

B) Matériel microbiologique

o Souches de référence

Les souches bactériennes utilisées pour les expérimentations avec *H. perlevis* sont les souches *E. coli* DH5-α (pochothèque LBCM) et *V. aestuarianus* 02/41 (IFREMER de La Tremblade). La souche *Pseudoalteromonas* sp. provient de l'Océan Atlantique. Elle fut isolée par notre équipe en 2012 sur une plaque en PLA immergée 60 jours au port d'Etel à 7 m de profondeur (coefficient de marée de 48) près d'un pilier de ponton.

o Suivi de la croissance

La croissance des bactéries est étudiée en erlenmeyer dans 20 ml de milieu sous agitation de 120 rpm à 18 °C. La Densité Optique (DO) initiale à 600 nm d'une préculture est ramenée à 0,05 par dilution dans le milieu. La croissance est suivie au cours du temps en mesurant la DO_{600nm} toutes les 30 minutes. Lorsque la DO est égale à 0,5, un dénombrement est réalisé par étalement sur une gélose nutritive de 100 µl de solution bactérienne préalablement diluée jusqu'à 10^{-9}. Les boites sont incubées 48 h à 18 °C.

L'expression des résultats se fait grâce à la formule suivante :

$$N = \sum C / (V \times (n1 + 0,1n2) \times d1)$$

avec :

N, nombre de microorganismes présents dans l'échantillon en tant que moyenne pondérée à partir de deux dilutions successives
C, nombre de colonies
V, volume de l'inoculum
n1, nombre de boites retenues à la première dilution
n2, nombre de boites retenues à la seconde dilution
d1, première dilution retenue

Le taux de croissance µ (h^{-1}) est calculé d'après l'équation :

$$N_t = N_0 \times e^{\mu t}$$

avec :

N_t, nombre de bactéries au temps t
N_0, nombre de bactéries en début d'expérience
µ, taux de croissance
t, temps de croissance

- Conditions de culture bactérienne

Les manipulations microbiologiques sont effectuées en condition stérile sous hotte à flux laminaire. Toutes les solutions et milieux de culture sont stérilisés par autoclavage (Getinge, Avor) (121 °C, 1,2 bar, 20 minutes). Le milieu pour la croissance et la conservation d'*E. coli* est le Lysogeny Broth (LB), composé de 10 g/l de NaCl (Sigma), 5 g/l d'extrait de levure (Sigma) et 10 g/l de tryptone (Sigma) dans de l'eau distillée. Le milieu pour la croissance et la conservation des *V. aestuarianus* et de *Pseudoalteromonas* sp. est le Lysogeny Broth Salt (LBS), composé de 24 g/l de NaCl, 5 g/l d'extrait de levure et 10 g/l de tryptone dans de l'eau distillée. Pour le stockage à long terme, les bactéries en phase stationnaire sont cryopréservées à - 80 °C dans du glycérol (Sigma) 50 % plus le milieu correspondant à la souche bactérienne.

- Le virus de l'herpès de l'huître (OsHV-1)

Le virus OsHV-1 est fourni par l'IFREMER de La Tremblade. La suspension virale (génotype µVar, Segarra *et al*., 2010) est préparée à partir d'huîtres naturellement infectées durant l'été 2008 et conservant le potentiel infectieux (Schikorski *et al.*, 2011).

2.2. Matériel d'aquariophilie

Une semaine avant le début des expérimentations, les éponges sont découpées en fragments de 130 cm^3 soit 25 g +/- 2 g puis placées dans un aquarium de 50 l d'eau de mer naturelle acclimatée à 18 °C et constamment aéré grâce à une pompe à air (EHEIM air pump) (figure 2.1). Toutes les semaines, 1/3 de l'eau de l'aquarium est remplacé. Un tube fluorescent de 15 W fournie une intensité lumineuse de 50 µmol/m^2/s, 8 h par jour. Les éponges sont nourries quotidiennement avec 0,1 ml de nourriture pour invertébrés marins (Korall Fluid). Durant cette phase, la pompe est coupée une demi-heure. Douze aquaria de 10 l sont également à disposition pour les expérimentations.

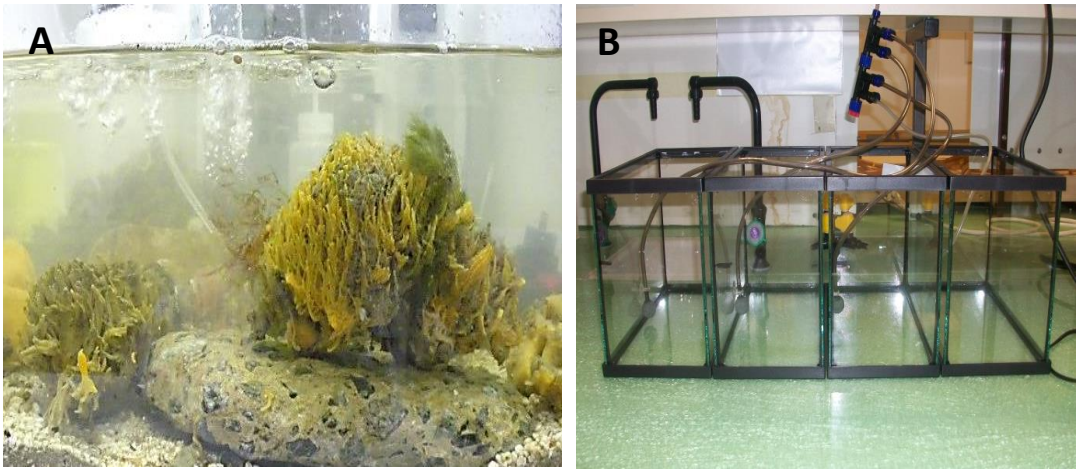


Figure 2.1. Photographies des aquaria dans lesquels les éponges *Hymeniacidon perlevis* sont maintenues en vie (A) et ceux dans lesquels sont réalisées les expérimentations (B).

2.3. Spongiculture

A) Localisation

Deux sites de culture sont choisis pour l'étude. *H. perlevis* est d'abord cultivée à Locmariaquer (Morbihan - France) (Société François Cadoret) chez Jean-François Taugé puis Locoal-Mendon (Morbihan - France) au centre de la concession ostréicole de Dominique Perraud (figure 2.2). Tous les deux pratiquent la culture d'huîtres en poche sur table. A Locmariaquer, la concession est ouverte sur la Baie de Quiberon. Les courants marins sont modérés. A Locoal-Mendon, la concession est en amont de la Ria d'Etel. Les courants marins sont plutôt forts. Les deux sites sont sablonneux/vaseux.

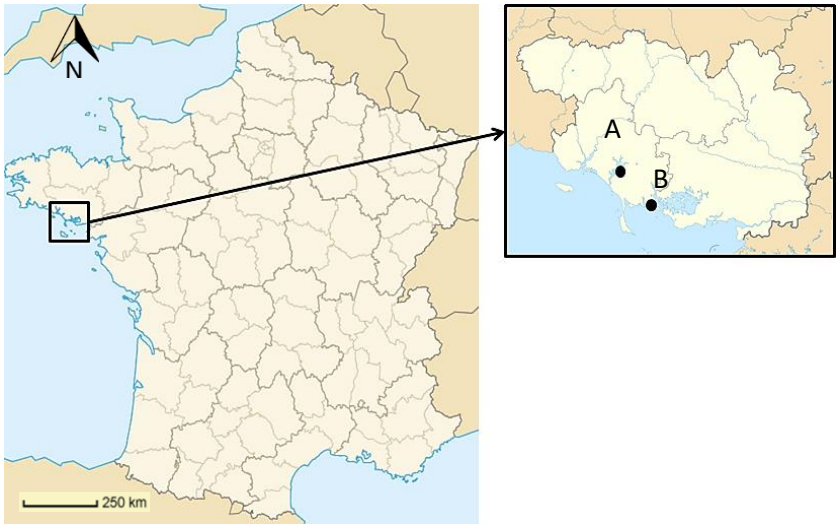


Figure 2.2. Localisation des cultures à Locoal-Mendon (A) et Locmariaquer (B) situés dans le Morbihan (56).

B) Dispositifs expérimentaux

En juin 2012, à Locmariaquer (température de l'eau à 14 °C, coefficient de marée à 95) et en septembre 2014, à Locoal-Mendon (température de l'eau à 16 °C, coefficient de marée à 95), plusieurs éponges de l'espèce *H. perlevis* sont transplantées dans des poches à huitres (n = 12) sous les tables conchylicoles posées à même le sol à Locmariaquer (figure

2.3) et à 10 cm du sol à Locoal-Mendon afin d'éviter que la vase ne recouvre la poche. La poche en PVC est à mailles losanges (23 mm) renforcées de filaments longitudinaux, fermées à une extrémité par une soudure d'une bande de renfort.

Figures 2.3. Les éponges sont cultivées selon la méthode de culture en poche.

C) Suivi de croissance

Tous les 6 mois, le suivi de croissance est réalisé par mesure de la longueur, largeur et hauteur des greffons. Cette méthode de mesure est simple et n'abime pas les éponges, c'est pourquoi elle est généralement utilisée (Duckworth *et al*., 2004). Le volume de chaque morceau est alors calculé. La poche est remise à sa place le plus rapidement possible.
Le pourcentage de croissance est calculé selon la formule suivante (Duckworth *et al*., 2004) :

$$\% \text{ croissance} = (\text{volume}_m - \text{volume}_{m-6}) / \text{volume}_{m-6} \times 100$$

où volume_m et volume_{m-6} sont respectivement le volume des greffons d'éponge au mois « m » et celui calculé 6 mois avant « m-6).

D) Support de culture à base de PLA

- Fabrication et immersion des plaques en PLA

Les plaques (20 cm x 10 cm) sont fabriquées par le lycée Technique Marcellin Berthelot de Questembert, partenaire de l'Université de Bretagne Sud, à partir d'une matrice de fibre de PLA renforcée par des fibres de lin (figure 2.4). Elles sont immergées en avril 2011 au port d'Etel vers 7 m de profondeur autour d'un pilier de soutènement (coefficient de marée : 48). Le PLA est un matériau éco-conçu, biodégradable et compostable issu de la biomasse végétale et engendrant peu d'impact sur l'environnement.

Figure 2.4. Photographie d'une plaque de PLA.

- Collecte et conditionnement des plaques

Tous les mois pendant 1 an, une plaque est récupérée en plongée sous-marine. Les plaques sont gardées dans l'eau de mer jusqu'au laboratoire. Une fois au laboratoire, le pourcentage de recouvrement par le macrofouling est déterminé par le logiciel Cell^D (Olympus). Des morceaux sont ensuite découpés. Certains sont fixés dans du glutaraldéhyde 2,5 % dans l'eau de mer pour l'observation du microfouling au microscope électronique à balayage (MEB) et d'autres sont utilisés immédiatement au laboratoire pour l'étude bactériologique.

- Isolement des bactéries cultivables à partir des plaques en PLA

Après une immersion de 60 jours en mer, trois morceaux de PLA sont mis dans des erlenmeyers contenant de l'Eau De Mer Artificielle (EDMA) puis incubés à 18 °C pendant 48 h. Le surnageant est ensuite éliminé et le milieu EDMA est renouvelé. L'opération est répétée trois fois puis le milieu EDMA est remplacé par du milieu liquide LBS. Après 48 h à 18 °C, un isolement est ensuite réalisé sur milieu solide LBS. Les boites sont incubées à 18 °C pendant 48 h. Un type de bactéries se distingue des autres de par son nombre et sa capacité à dégrader l'agar.

La bactérie isolée est identifiée par analyse des séquences d'ADNr 16s. L'extraction et la purification d'ADN est réalisée grâce au kit d'extraction d'ADN PureLink® Genomic (Thermo Fisher Scientific) suivant les instructions du fournisseur. La concentration en ADN est mesurée grâce à un spectrophotomètre (Infinite M200 Pro, Tecan). L'ADNr 16s est amplifié par PCR en utilisant le couple d'amorces 8F/1492R. L'amplicon non purifié, c'est-à-dire le mélange réactionnel post-PCR, est expédié pour séquençage chez Beckman Coulter Genomics.

- Formation du biofilm à la surface du PLA

L'adhérence des bactéries est observée à partir de morceaux de PLA colonisés. Pour cela, des morceaux de PLA stérilisés sont déposés dans une boite de Petri contenant des bactéries *Pseudoalteromonas* sp à une DO_{600nm} de 0,25 dans 10 ml d'EDMA à 18 °C. Après 2 h d'adhérence, les morceaux de PLA sont rincés avec de l'EDMA et observés au MEB.

Pour l'observation du biofilm, les morceaux de PLA sont récupérés après la phase d'adhérence des bactéries et transférés dans un milieu EDMA stérile sans renouvellement d'eau. Après 6 mois à 18 °C, le PLA est observé au MEB.

2.4. Expérience de rétention d'*E. coli* et de *V. aestuarianus*

A) Protocole expérimental

Les expériences sont réalisées dans des aquaria en verre de 5 l (bacs de 10 l nominal remplis à moitié) sans renouvellement d'eau mais avec une aération pour assurer la bonne oxygénation et l'homogénéité du milieu. L'EDMA se prépare à partir d'une solution de 30 g/l de Seasalt (Sigma) dans de l'eau distillée. La température de l'eau est maintenue à 18 °C.
Un bac témoin d'EDMA est utilisé pour vérification de la température et de la salinité, ces deux mesures sont relevées chaque matin. Trois jours avant les expérimentations, les éponges ne sont plus nourries. Un tube fluorescent fourni de la luminosité (50 µmol/m²/s) 8 h par jour. Les tests sont réalisés en triplicat.

B) Caractérisation bactérienne

- Cinétique de survie des bactéries dans l'EDMA

Les aquaria sont ensemencés avec 5 ml d'*E. coli* ou de *V. aestuarianus* à DO_{600nm} égale à 0,5 (environ 2.10^8 bactéries/ml) soit l'équivalent de la concentration bactérienne dans des eaux usées. Un dénombrement dans l'eau est réalisé à intervalles réguliers (0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 92 h et 116 h) afin de s'assurer de la survie des bactéries dans l'EDMA.

- Effet bactéricide

La première étape consiste à réaliser une extraction de l'éponge. Pour cela, l'éponge fraîche est mise au congélateur à - 80 °C puis lyophilisée (m = 2,044 kg). L'éponge est ensuite broyée puis mise à macérer trois fois 48 h dans un mélange méthanol/acétate d'éthyle (50 : 50 v/v) à température ambiante. Après macération, l'échantillon est filtré et les solvants évaporés à l'évaporateur rotatif (Water Bath, Buchi) pour obtenir un extrait brut (m = 69,42 g).

Pour évaluer l'effet bactéricide de l'extrait brut d'*H. perlevis*, un test de croissance bactérienne est réalisé en présence de l'extrait brut dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) à trois concentrations différentes (0,5 mg/l, 1 mg/l et 2 mg/l). La croissance est réalisée en microplaque 24 puits (Greiner) sur une période de 24 h par estimation de la population bactérienne par lecture de la DO_{600nm} toutes les 30 min grâce au lecteur microplaque (Infinite M200 Pro, Tecan).

C) Efficacité de rétention et taux de clairance

Des tests de rétention bactérienne par *H. perlevis* sont effectués en utilisant *E. coli* et *V. aestuarianus*. Les aquaria sont ensemencés à hauteur de 2.10^8 bactéries/ml. Avant le placement de l'éponge (25 g masse fraiche) dans les bacs, le nombre de cellules bactériennes inoculées est vérifié. Des échantillons d'eau (10 ml) sont prélevés toutes les heures (Milanese *et al*., 2003). Les essais sont réalisés sur 6 h.

L'efficacité de rétention (R) du plomb par *H. perlevis* est calculée selon la formule proposée par Stabili *et al*. (2006) :

$$R\ (\%) = 100 \times [(C_0 - C_t) / C_0]$$

Le taux de clairance (CR) est calculé selon la formule de Coughlan (1969) (dans Fu *et al.,* 2005 et 2007) :

$$CR = ([\ln (C_0 / C_t)]V) / TW$$

où C_0 et C_t représentent, respectivement, la concentration initiale en bactéries dans l'eau (mg/l) et au temps t, V représente le volume d'eau dans les bacs (l), T correspond au temps (heure) et W est la masse des éponges fraiches (g).

D) Expérience de décontamination

Deux groupes constitués, d'un côté, de quinze éponges et de quinze huîtres adultes et, de l'autre, de quinze huîtres adultes seules (contrôle) contaminées par *E. coli* ou *V. aestuarianus* à la concentration de 2.10^8 bactéries/ml (Schmitt *et al*., 2012). Afin de réaliser une cinétique de filtration, trois fragments d'éponges (75 g masse fraiche) et trois huîtres (75 g masse fraiche) sont prélevés à 0 h, 2 h, 24 h, 48 h et 72 h pour la réalisation d'un dénombrement bactérien.

E) Tests de libération des bactéries par les éponges

Après 72 h de filtration d'une eau contaminée, trois fragments d'éponges sont transférés dans des aquariums d'EDMA stérile. Afin de réaliser la cinétique de relargage, des fragments d'éponges (75 g masse fraiche) et des échantillons d'eau (10 ml) sont prélevés à 0 h, 2 h, 24 h, 48 h et 72 h.

F) Dénombrement des *E. coli* dans les huîtres et les éponges

Selon la norme française V 08-600, 100 g de chair d'huîtres sont mélangés puis dilués au tiers dans du tryptone sel (TS) (1 g/l de tryptone, Sigma et 8,5 g/l de NaCl, Sigma). Le TS est un milieu d'enrichissement permettant la revivification des bactéries. La solution ainsi obtenue est laissée au repos durant 20 min. Sont ensuite réalisées une dilution au 10ème puis une dilution au 100ème. Pour chaque dilution, sont ensemencés trois tubes de bouillon au glutamate, incubés à 44 °C pendant 24 h. Le bouillon au glutamate est obtenu après dissolution de 40,4 g/l de milieu déshydraté dans de l'eau distillée (Biokar diagnostics). Les tubes dont l'indicateur coloré passe du violet au jaune sont considérés comme positifs à la présence d'*E. coli*. Une confirmation est alors réalisée par repiquage des tubes positifs sur gélose TBX, milieu sélectif destiné au dénombrement des *E. coli*. Le milieu TBX agar est obtenu après dissolution de 30,6 g/l de milieu déshydraté dans de l'eau distillée (Biokar

diagnostics). Les boites sont incubées 24 h à 44 °C. Les colonies d'*E. coli* apparaissent bleues. Ce protocole est adapté au dénombrement des *E. coli* dans les éponges.

L'expression des résultats se fait par la détermination du Nombre le Plus Probable (NPP) dans un intervalle de confiance de 95 % à partir du nombre de tubes positifs à la présence d'*E. coli*.

G) Dénombrement des *E. coli* dans l'eau des aquariums

Le dénombrement des *E. coli* dans l'eau se fait selon la méthode NF EN ISO 9308-3 qui est basée sur la détection d'une enzyme spécifique des *E. coli*, la Bêta-glucuronidase dont le substrat fluorogénique est contenu dans des microplaques MUG opaques (AES Chemunex, France). Les microplaques sont ensemencées avec l'échantillon d'eau et ses dilutions (de 1/2 jusqu'à 1/200000), recouvertes d'un film adhésif transparent puis mises à incuber à 44 °C entre 36 et 72 h. La lecture se fait sous lampe UV à 366 nm. Les puits présentant une fluorescence bleue sont considérés comme positifs à *E. coli*.

L'expression des résultats se fait par la détermination du nombre le plus probable (NPP) dans un intervalle de confiance de 95 % à partir du nombre de puits positifs à la présence des *E. coli*.

H) Dénombrement des *V. aestuarianus* dans les animaux et dans l'eau

Pour le dénombrement des *V. aestuarianus*, 75 g d'éponges fraiches ou de chair d'huîtres mélangés à l'aide d'un mixeur et 1 ml d'échantillon d'eau sont prélevés et ensemencés en triplicat sur une gélose Thiosulfate-Citrate-Bile-Saccharose (TCBS, Biokar diagnostics), après une série de dilutions en cascade allant de 10^{-1} à 10^{-9}. Les boîtes de Petri sont incubées à 20 °C pendant 48 h. Après incubation, un dénombrement est réalisé par comptage des Unités Formant des Colonies (UFC).

2.5. Expérience de rétention du plomb

A) Protocole expérimental

Les expériences sont réalisées dans des aquaria en verre de 5 l (bacs de 10 l nominal remplis à moitié) sans renouvellement d'eau mais avec une aération pour assurer la bonne oxygénation et l'homogénéité du milieu. La température de l'eau est maintenue à 18 °C. Un bac témoin d'EDMA est utilisé pour vérification de la température et de la salinité. Ces deux mesures sont relevées chaque matin. Les éponges (25 g masse fraiche) ne sont pas nourries durant toute la phase d'expérimentation. Un tube fluorescent fourni de la luminosité (50 µmol/m²/s) 8 h par jour. Trois éponges n'ayant pas été mises en contact avec du nitrate de plomb sont utilisées comme témoin. Le plomb soluble dans de l'EDMA provient d'un stock standard de nitrate de plomb (Sigma). Les tests sont réalisés en triplicat.

B) Analyse du plomb dans les éponges et dans l'eau

Après l'exposition au plomb, les fragments d'éponges prélevés sont rincés à l'EDMA et congelés individuellement à - 80 °C. Par la suite, les éponges sont lyophilisées, broyées et digérées dans de l'acide nitrique à 65 % (3 % V/m) pendant 12 h sous agitation. Le digestat est filtré sous Büchner pour enlever les résidus de spicules et de collagène restant. Les prélèvements d'eau sont filtrés sous Büchner. Les échantillons sont ensuite analysés par spectrométrie d'absorption atomique (SAA) à flamme à 283,31 nm (Varian 240FS). La limite de détection de l'appareil est de 0,01 mg/l pour le plomb dans les matrices biologiques. Un étalonnage externe est réalisé avant analyse des échantillons à partir de solutions de plomb ($Pb(NO_3)_2$) dans l'EDMA aux concentrations allant de 0,1 mg/l à 50 mg/l. Trois réplicats de chaque échantillon sont analysés.

C) Toxicité du plomb vis-à-vis de l'éponge *H. perlevis*

Trois groupes d'éponges contenant chacun dix individus sont exposés à quatre concentrations différentes en plomb (15 mg/l, 30 mg/l, 50 mg/l et 70 mg/l) durant 7 j. La

santé des éponges est contrôlée quotidiennement (odeur et couleur) et les individus morts sont comptés puis retirés des aquaria. Un groupe d'éponges est placé dans un aquarium exempt de plomb afin de servir de témoin.

D) Capacité des éponges à filtrer l'eau en présence de plomb

Dans un premier temps, deux groupes d'éponges contenant chacun trois individus sont exposés à une concentration en plomb de 15 mg/l et 30 mg/l pendant 2 h. Les éponges sont ensuite transférées dans des aquaria d'EDMA exempte de plomb. Un demi-millilitre d'une solution de fluorescéine solubilisée dans l'EDMA (1 mg/ml) est alors déposé goutte à goutte à la base des éponges dans le but d'évaluer la filtration de l'eau par les éponges. Toutes les 5 min pendant 1/2 h, un prélèvement d'eau (1 ml) est réalisé au-dessus de trois ramifications (Gaël Le Pennec, communication personnelle).

Dans un deuxième temps, les éponges sont récupérées puis rincées 2 h dans de l'EDMA exempte de plomb. L'eau des aquaria est ensuite renouvelée et un second test à la fluorescéine est réalisé. Un demi-millilitre d'une solution de fluorescéine solubilisée dans l'EDMA (1 mg/ml) est déposé goutte à goutte à la base des éponges. Un prélèvement d'eau (1 ml) est réalisé au-dessus de 3 ramifications.

La fluorescence des échantillons d'eau est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (zuzi 4251/50) à 514 nm.

E) Efficacité de rétention et taux de clairance

Pour cette expérience, l'eau des aquaria est contaminée avec une concentration C_0 en plomb dissous de 15 mg/l soit une concentration 100 fois supérieures à la concentration en plomb dans les éponges afin de se placer dans une situation de pollution. Des échantillons d'eau (10 ml) sont prélevés toutes les heures. Les essais sont réalisés sur 5 h. La concentration en plomb C_t dans l'eau est déterminée par SAA.

L'efficacité de rétention (R) du plomb par *H. perlevis* est calculée selon la formule proposée par Stabili *et al*. (2006).

$$R\ (\%) = 100 \times [(C_0 - C_t) / C_0]$$

Le taux de clairance (CR) est calculé selon la formule de Coughlan (1969) (dans Fu *et al.,* 2005 et 2007).

$$CR = ([\ln (C_0 / C_t)]V\ ) / TW$$

où C_0 et C_t représentent, respectivement, la concentration initiale en plomb (mg/l) et au temps t, V représente le volume d'eau dans les bacs (l), T correspond au temps (heure) et W est la masse des éponges fraiches (g).

F) Accumulation du plomb par les éponges : contamination aigüe

Un groupe d'éponges de quinze individus est mis en contact avec une concentration en plomb dissous de 15 mg/l. Afin de réaliser une cinétique d'accumulation, trois fragments d'éponges (75 g masse fraiche) et des échantillons d'eau (10 ml) sont prélevés à 0 h, 2 h, 24 h, 48 h et 72 h et analysés par SAA.

G) Accumulation du plomb par les éponges : contamination aigue cumulée

Tous les jours pendant 3 jours, un groupe d'éponges de quinze individus est mis en contact avec une concentration en plomb dissous de 15 mg/l. Afin de réaliser une cinétique d'accumulation, trois fragments d'éponges (75 g masse fraiche) et des échantillons d'eau (10 ml) sont prélevés à 0 h, 2 h, 24 h, 48 h et 72 h puis analysés par SAA.

H) Expérience de décontamination

Deux groupes constitués, d'un côté, de quinze éponges et de quinze huîtres adultes et, de l'autre, de quinze huîtres adultes seules (contrôle) sont exposés à une contamination au plomb (15 mg Pb/l). Afin de réaliser une cinétique de filtration, trois fragments d'éponges (75 g masse fraiche) et trois huîtres (75 g masse fraiche) sont prélevés à 0 h, 2 h, 24 h, 48 h et 72 h puis analysés par SAA.

I) Tests de libération du plomb par les éponges

Après 72 h d'exposition à une contamination en plomb de façon aigüe (15 mg Pb/l) ou de façon aigue sur 3 jours (15 mg Pb/l pendant trois jours), trois fragments d'éponges sont transférés dans des aquaria d'EDMA exempte de plomb. Pour déterminer la quantité de plomb libérée dans l'eau par l'éponge, des fragments d'éponges (75 g masse fraiche) et des échantillons d'eau (10 ml) sont prélevés à 0 h, 2 h, 24 h, 48 h et 72 h puis analysés par SAA.

2.6. Expériences de rétention du virus OsHV-1

A) Protocole expérimental

Les expériences vis-à-vis d'OsHV-1 sont réalisées à la station IFREMER de Bouin. Une semaine avant le début des expérimentations, les huîtres juvéniles sont placées dans un bac en plastique d'eau de mer naturelle filtrée (1 µm) de 10 l acclimaté à 23 °C. Durant cette période, les huîtres sont nourries chaque jour avec 1 % (v/v) de microalgues de l'espèce *Skeletonema costatum* ($1,5.10^3$ cellules/ml). Les éponges sont placées dans un bac en plastique rempli d'eau de mer naturelle filtrée (1 µm) de 50 l acclimaté à 23 °C. L'eau est renouvelée tous les jours. Un tube fluorescent fourni de la luminosité (17 W) 8 h par jour. Les éponges sont nourries quotidiennement avec 0,1 ml de nourriture pour invertébrés marins. Les expérimentations sont réalisées dans des bacs plastiques de 2,5 l (bacs de 5 l nominal remplis à moitié) d'eau de mer naturelle filtrée (1 µm) sans renouvellement d'eau

mais avec une aération pour assurer la bonne oxygénation et l'homogénéité du milieu (Tristan Renault, communication personnelle). La température de l'eau est maintenue à 23 °C. Un bac témoin d'EDMA est utilisé pour vérification de la température et de la salinité, ces deux mesures sont relevées chaque matin. Les tests sont réalisés en triplicat.

B) Injection des huîtres

Dix-huit huîtres juvéniles sont placées hors de l'eau pendant 4 h à 23 °C pour les obliger à s'ouvrir. Les huîtres sont ensuite anesthésiées en les plongeant dans une solution d'eau de mer naturelle filtrée/eau distillée (1/4) (v/v) contenant 30 % de chlorure de magnésium (Schikorski *et al.*, 2011). Après 5 h d'anesthésie, 100 µl de solution virale OsHV-1 ($1,5.10^5$ copies d'ADN viral/µl) sont injectés dans le muscle adducteur de chaque huître. Les huîtres infectées sont placées dans 1 bac de 10 l d'eau de mer filtrée (1 µm) pendant 48 h à 23 °C sans nourriture et sans renouvellement d'eau. Après 48 h, ces huîtres moribondes (sont considérées comme moribondes des huîtres incapables de se fermer), sont utilisées comme source de virus pour infecter les éponges par transmission horizontale.

C) Infection virale

Neuf bacs de 5 l remplis à moitié d'eau de mer filtrée avec bullage sont préparés pour les expérimentations avec les éponges. Dans trois bacs sont placées trois huîtres moribondes. Dans trois autres bacs sont placées trois huîtres moribondes avec huit fragments d'éponges (5 g chacun). Dans les trois derniers bacs sont placées trois huîtres « contrôle » dans lesquelles 100 µl d'EDMA stérile sont injectés. Afin d'évaluer une cinétique de détection d'ADN viral, des échantillons d'éponge sont prélevés à 15 min, 2 h, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h et 96 h. Avant de placer les échantillons au congélateur, les éponges sont rincées avec 5 ml d'EDMA. A 96 h, l'ensemble des huîtres est prélevé puis congelé en attendant l'extraction d'ADN.

D) Extraction d'ADN

Vingt-cinq milligrammes de tissus broyés au mixeur sont prélevés pour l'extraction d'ADN qui est réalisée grâce au kit d'extraction d'ADN PureLink® Genomic (Thermo Fisher Scientific). Les tissus sont lysés pendant 4 h sous agitation à 56 ° C avec 200 µL de tampon de lyse auxquels sont ajoutés 20 µl de protéinase K. Lorsque les tissus sont complétement lysés, un volume de 200 µl de tampon de fixation et 20 µl de RNase sont ajoutés aux échantillons. Ceux-ci sont alors chauffés pendant 10 min à 56 °C. Après ajout de 200 µl d'éthanol absolu à froid et centrifugation, les échantillons sont prêts à être purifiés. La purification est réalisée sur des colonnes PureLink avec du tampon de lavage. L'ADN extrait est finalement élué avec 100 µL de tampon d'élution. La concentration d'ADN est mesurée grâce à un spectrophotomètre (Infinite M200 Pro, Tecan) puis les échantillons sont placés à 4 °C en attendant la quantification par PCR en temps réel.

E) Quantification d'ADN viral par PCR en temps réel

La détection d'ADN bactérien est réalisée par PCR en temps réel (Schikorski *et al.*, 2011). Après dilution des échantillons à 5 ng d'ADN/µl, 5 µl d'échantillon sont ajoutés au mélange composé de 10 µl de réactif Brillant® SYBR Green Master Mix (Stratagene), 2 µl d'amorce forward (OsHVDPFor : ATT GAT GTG GAT AAT CTG TG), 2 µl d'amorce reverse (OsHvDPRev : GGT AAA TAC CAT TGG TCT TGT TCC) diluées à la concentration de 5 µM et 1 µl d'eau ultra pure. Les amplifications d'ADN sont réalisées à l'aide de l'appareil Applied Biosystems 7300 dans des microplaques 96 puits selon les conditions suivantes : 1 cycle de pré-incubation de 3 min à 95 °C puis 40 cycles d'amplification de 5 sec à 95 °C et de 12 secs à 60 °C. L'amplification est systématiquement vérifiée grâce aux courbes de dissociation qui permettent de vérifier qu'il n'y a qu'un seul produit de PCR amplifié.. La quantification est définie par comparaison des valeurs de cycles correspondant au signal seuil (Ct) obtenues pour les échantillons avec les valeurs obtenues pour la courbe standard réalisée à partir d'une solution mère des bactéries étudiée (1.10^8 UFC/ml). Tous les échantillons sont analysés en triplicat. Les résultats sont exprimés en nombre de copies par mg de tissus.

2.7. Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

Pour l'observation au MEB (JSM-6460LV, Jeol), les échantillons sont fixés dans du glutaraldéhyde 2,5 % dilué avec de l'eau de mer à pH 7,3. Après 24 h de contact, trois lavages successifs de 10 min sont faits avec du tampon phosphate salin (28,6 g/l NaCl, 0,2 g/l KH_2PO_4, 1,15 g/l Na_2HPO_4, 0,86 g/l KCL) 0,1 M à pH 7,2. Ensuite, un gradient d'éthanol permet de déshydrater les échantillons (50 %, 70 %, 95 % et 100 %, trois bains de 10 min). Ceux-ci sont desséchés au point critique (Critical point dryer, Bal-Tec) et métallisés à l'or pendant 180 secondes (Scancoat, Edwards).

2.8. Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés sous la forme moyenne ± écart-type de trois réplicats et sont soumis au test non paramétrique de Kruskal-Wallis. Toutes les analyses sont réalisées grâce au logiciel R (version 3.1.2). Les différences significatives sont désignées par une valeur de p-value < 0,05 ou p-value < 0,01.

III. Résultats

3.1. Culture de l'éponge *H. perlevis* en milieu ostréicole

Sommaire du chapitre

3.1.1. Introduction **80**

3.1.2. Identification de l'éponge **81**

3.1.3. Sites de culture **82**
- A) Locmariaquer 82
- B) Locoal-Mendon 83

3.1.4. Transplantation et suivi de croissance **84**
- A) Taux de survie 84
- B) Taux de croissance 86

3.1.5. Etude de la colonisation du PLA par les acteurs du biofouling **86**
- A) Observation du macrofouling à la surface des plaques de PLA 87
- B) Etude du microfouling 88
- C) Etude de la formation du biofilm à la surface du PLA 90

3.1.6. Discussion **93**

3.1.7. Conclusion du chapitre **96**

3.1.1. Introduction

Afin de garantir une quantité suffisante d'éponges pour une application en bioremédiation, la spongiculture *in situ* est nécessaire. Elle consiste à découper délicatement des fragments à partir d'une éponge dite « parent » et à fixer ces boutures sur un support de culture afin de maintenir les animaux dans leur milieu naturel. Les éponges vont alors se régénérer et commencer leur croissance en filtrant les matières organiques présentes dans la colonne d'eau. En raison de la diversité morphologique des éponges propre à chaque espèce et dépendante des variations environnementales, plusieurs essais sont nécessaires afin de trouver le meilleur protocole adapté à la culture des éponges pour une application donnée (Louden *et al*., 2007).

Même si la culture d'éponges parait relativement simple à mettre en place, il est toutefois judicieux d'examiner l'influence de la forme et du matériau du support utilisé, celui-ci pouvant jouer un rôle sur l'adhérence des éponges au support mais aussi sur la survie et la croissance de celles-ci (Duckworth *et al*., 1997, 2007). Toutefois, la nature du support ne doit pas influencer les résultats des expériences, par exemple, en libérant des particules toxiques pour les éponges. L'emplacement du support est également à prendre en compte, les principaux inconvénients d'une culture *in situ* étant la prédation, l'encrassement biologique, les maladies mais aussi les conditions météorologiques défavorables (Pérez-Lopez *et al*., 2014).

L'objectif de ce chapitre est tout d'abord de présenter les résultats de survie et de croissance des éponges suivant la localisation de la culture d'*H. perlevis* et de présenter les différents protocoles mis au point pour les optimiser. L'utilisation du PLA, un matériau nouvellement utilisé comme support de culture d'éponge, sera également présentée dans ce chapitre. Il fait actuellement l'objet d'un dépôt de brevet.

3.1.2. Identification de l'éponge

L'identification des éponges est basée sur la reconnaissance de leurs spicules par observation au microscope optique (figure 3.1).

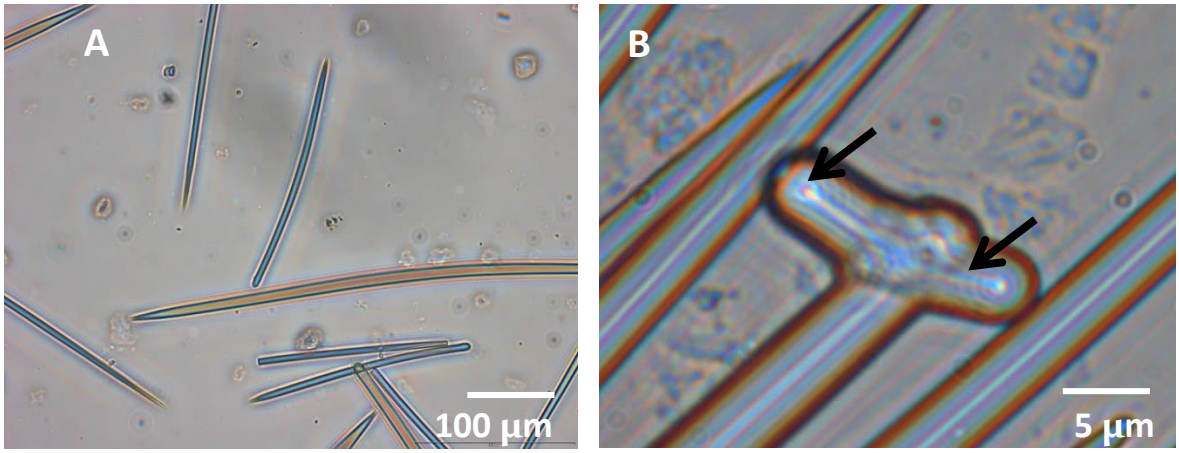


Figure 3.1. (A) et (B) photographies de spicules mégasclères d'*Hymeniacidon perlevis* prises au microscope optique (grossissement x 150 ou 400) (IX71, Olympus). Les flèches montrent les gonflements typiques des spicules d'*H. perlevis* (B).

Les observations montrent deux catégories de spicules. Une première catégorie comprenant des spicules ayant une longueur moyenne de 340 µm et une deuxième catégorie de spicules ayant une longueur moyenne de 550 µm. Ensuite, les spicules d'*H. perlevis* sont facilement reconnaissables grâce aux gonflements, spécifiques du genre *Hymeniacidon*, retrouvés sur certains d'entre eux (figure 3.1 - B).

Les observations des spicules des éponges collectées sur ces deux sites, comparées avec les données bibliographiques (Erpenbeck et Van Soest, 1867) attestent qu'il s'agit bien de spicules appartenant au genre *Hymeniacidon*. De plus, la localisation et la morphologie (présence de ramification de plusieurs centimètres de haut) des éponges ramassées sont très caractéristiques de l'espèce *H. perlevis*. Nous pouvons donc conclure que les éponges collectées en Bretagne Sud sont bien des éponges de l'espèce *H. perlevis*.

3.1.3. Sites de culture

Deux zones ostréicoles classées zone A sont choisis pour étudier la culture d'*H. perlevis* : une concession à Locmariaquer et une autre à Locoal-Mendon (Morbihan - France) (figure 3.2).

Figure 3.2. Photographies satellites de la concession de Mr Taugé à Locmariaquer (A) et de la concession de Mme Perraud à Locoal-Mendon (B) (Mappy®). Les croix représentent la localisation des cultures d'*Hymeniacidon perlevis*.

A) <u>Locmariaquer</u>

Locmariaquer est une commune du Morbihan (56) située entre le Golfe du Morbihan et la Baie de Quiberon (figure 2.2). C'est une zone constituée de vasières découvertes à marée basse. La concession de Jean-François Taugé est ouverte sur la Baie de Quiberon (salinité à 35,7 g/l). *Hymeniacidon perlevis* est naturellement présente sur le site et se retrouve accrochée aux tables ostréicoles ou à même le sol près des tables (densité > 5 individus/m²). Elle est également présente accrochée aux murs des tunnels d'évacuation d'eau des bassins ostréicoles sous une forme beaucoup moins ramifiée (figure 3.3).

Figure 3.3. *H. perlevis* en sortie d'un bassin ostréicole. *Hymeniacidon perlevis* se retrouve à découvert lors des marées basses. Toutefois, contrairement à beaucoup d'autres espèces spongiaires, elle est capable de survivre plusieurs heures hors de l'eau.

Jean-François Taugé pratique la culture d'huîtres en poches sur table et la culture à même le sol en pleine mer (ramassage des coquillages par dragage). Des zones agricoles (élevage bovin dominant), des campings ainsi qu'une sortie de station d'épuration se trouvent à proximité de la concession (figure 3.2).

B) Locoal-Mendon

Locoal-Mendon est une commune du Morbihan (56) située sur les bords de la ria d'Etel. Cette dernière est une rivière qui coule dans une ria, c'est-à-dire que sa vallée profonde est envahie par la mer à marée haute. Ce phénomène entraine un mélange d'eau salée et d'eau douce à marée montante (salinité moyenne à 33,2 g/l). Du fait des volumes d'eau particulièrement importants qui sont déplacés par les marées et de la configuration de la ria, celle-ci est le siège de courants très forts (jusqu'à 9 nœuds).

Dominique Perraud pratique la culture d'huîtres en poches sur table. Le parc est recouvert d'éponges qui forment par endroit un tapis orange (densité moyenne > 20 individus/m²) et qui se développent sur les poches à huîtres et les tables ostréicoles (figure 3.4).

Figure 3.4. Photographies des éponges présentes sur le site de Locoal-Mendon. *Hymeniacidon perlevis* se retrouve sur le sol formant un tapis orange (A) et sur les pieds des tables ostréicoles (B). Contrairement à d'autres ostréiculteurs, lors des nettoyages de ses tables, madame Perraud n'arrache pas les éponges qui y sont accrochées.

3.1.4. Transplantation et suivi de croissance

A) Taux de survie

Après 6 mois de culture (m+6), le taux de survie des éponges *H. perlevis* cultivées sur le site de Locmariaquer est de 80 % et de 100 % à Locoal-Mendon (figure 3.5). Après 1 an de culture (m+12), le taux de survie n'est plus que de 30 % à Locmariaquer et de 50 % à Locoal-Mendon.

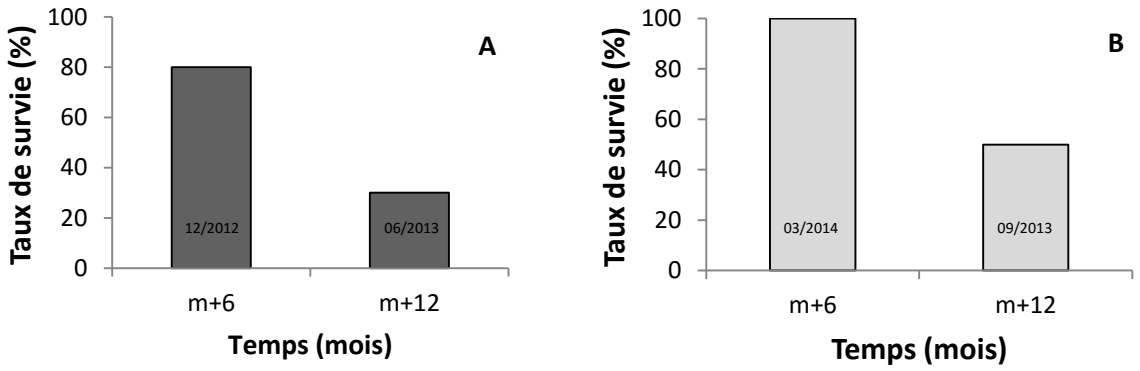


Figure 3.5. Taux de survie à 6 mois (m+6) et 12 mois (m+12) des éponges transplantées à Locmariaquer (A) ou à Locoal-Mendon (B).

Dès les premières semaines de culture, les fragments d'éponges se sont accrochés à la poche puis déployés le long des mailles (figure 3.6). Ils développent alors de nombreuses ramifications.

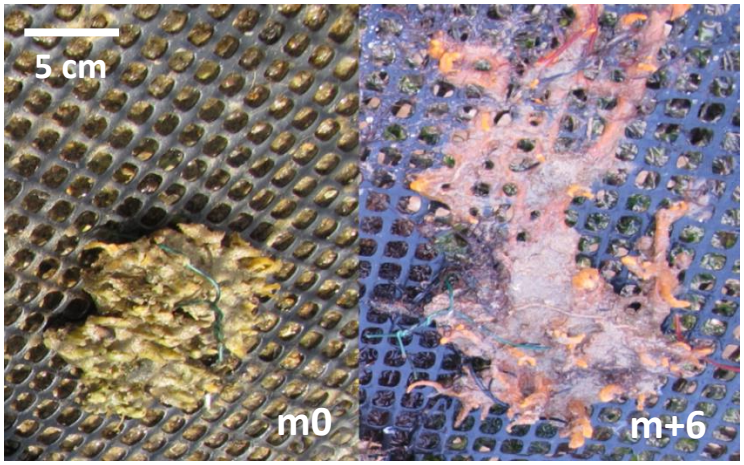


Figure 3.6. Culture en poche. A gauche, un fragment d'éponge fixé à la poche en juin 2012 (m0) à Locmariaquer. A droite, le même fragment 6 mois plus tard (m+6).

Après 1 an de culture (m+12), la poche à Locmariaquer s'est entièrement recouverte de vase (figure 3.7).

Figure 3.7. Etat de la culture d'*Hymeniacidon perlevis* à Locmariaquer, 1 an après la mise en place (m+12). La plupart des éponges sont mortes. Les éponges restantes sont envasées.

Suite aux résultats obtenus à Locmariaquer, la culture à Locoal-Mendon commence en automne 2014. Nous décidons cette fois-ci de surélever la poche de culture de 10 cm afin d'empêcher son envasement. Après 6 mois, le taux de survie des éponges cultivées est de 100 % (figure 3.5). Un an après, le taux de survie dans la poche n'est plus que de 50 %. Les éponges développent alors de nouvelles ramifications à l'extérieur de la poche en direction du sol.

B) Taux de croissance

La figure 3.8. montre la taille des fragments d'éponges après transplantation sur les deux sites de culture. Après 12 mois de culture à Locmariaquer (m+12) un taux de croissance de 21 % est observé. A Locoal-Mendon, le taux de croissance après 12 mois de culture est de 41 %. Aucune différence significative n'est observée entre les 2 sites (p-value > 0,05).

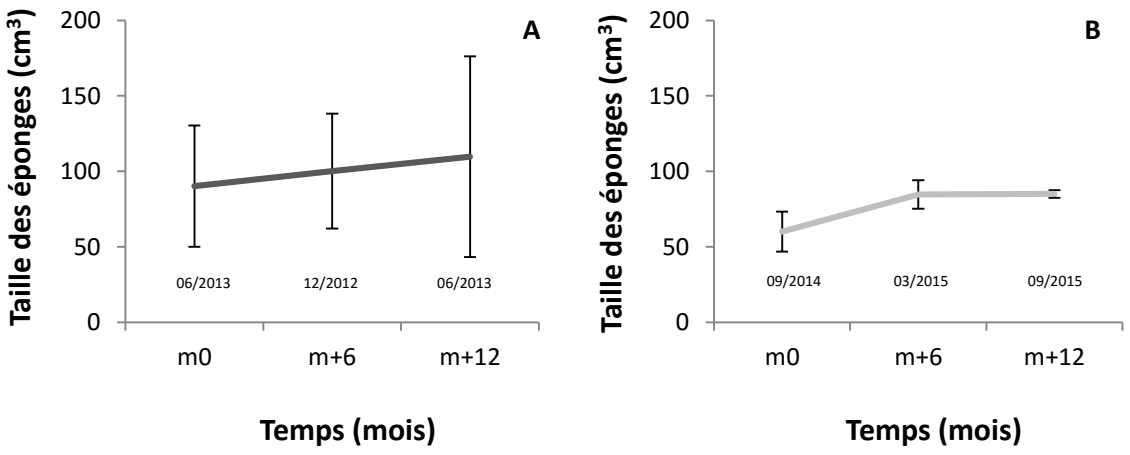


Figure 3.8. Croissance des fragments d'*Hymeniacidon perlevis* sur les deux sites de culture, Locmariaquer (A) et Locoal-Mendon (B).

3.1.5. Etude de la colonisation du PLA par les acteurs du biofouling

Actuellement, la culture des éponges marines repose sur l'utilisation de matériaux de synthèse tels que le PVC ou le PE. Dans la perspective d'une stratégie de bioremédiation

du milieu marin, il nous a paru indispensable d'étudier un nouveau support pour la culture d'éponges qui ait le moins possible d'impact sur l'environnement en ne libérant pas de contaminant chimique et avec pas ou peu de fouling à sa surface.

A) Observation du macrofouling à la surface des plaques de PLA

Le macrofouling marin survient avec l'adhérence d'organismes pluricellulaires eucaryotes (algues, cnidaires, balanes, mollusques, polychètes) sur une surface immergée (Madin *et al*., 2009). Le macrofouling adhérant sur les plaques de PLA est montré ci-dessous (figure 3.9) :

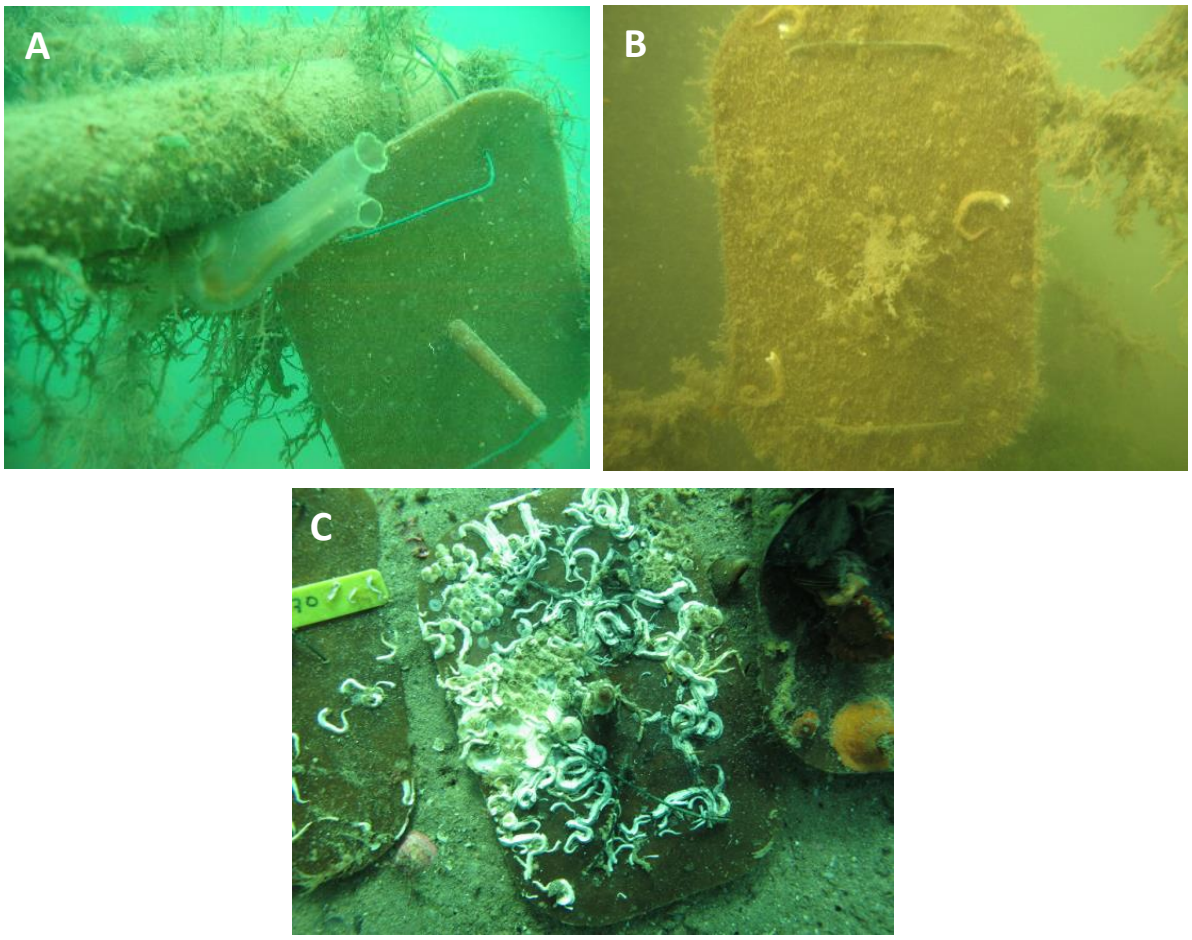


Figure 3.9. Photographies des plaques en PLA et du macrofouling après une immersion en mer de 90 jours (A), 6 mois (B) et 3,5 ans (C).

Au laboratoire, le pourcentage de recouvrement des plaques par le fouling est calculé (figure 3.10) :

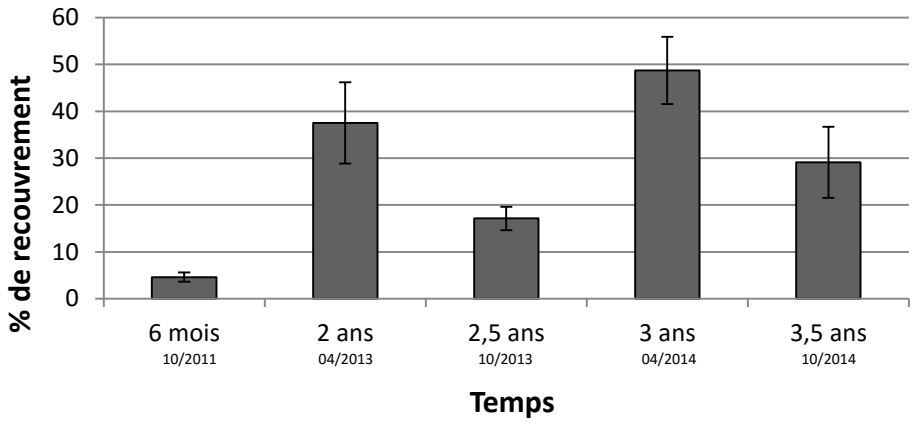


Figure 3.10. Pourcentage de recouvrement des plaques de PLA immergées en mer en avril 2011 par les macroorganismes marins.

Après 90 jours d'immersion en mer, aucun macroorganisme marin n'est observé à la surface des plaques de PLA. A 6 mois d'immersion, quelques macroorganismes sont observés comme des bernacles *Balanus* sp. et des vers *Pomatoceros* sp. couvrant 4,6 % des plaques. Après 2 ans d'immersion, les plaques sont partiellement recouvertes (37,5 %) par des anomies *Anomia* sp., des moules, des vers *Pomatoceros* sp. et quelques anémones et tuniciers. Après 3 ans d'immersion, les plaques sont principalement recouvertes (48,72 %) par des bernacles *Balanus* sp., des anomies *Anomia* sp., des moules et des huîtres *C. gigas*. Durant cette étude, le pourcentage de recouvrement diminue chaque automne, les résultats indiquent donc une variation saisonnière. Après 3,5 ans d'immersion, le pourcentage de recouvrement est de 29,1 %.

B) <u>Etude du microfouling</u>

Le microfouling marin correspond à l'adhérence de bactéries et d'organismes unicellulaires eucaryotes (levures, champignons, protozoaires, diatomées...) sur une surface immergée en milieu marin (Madin *et al*., 2009).

Après récupération des plaques de PLA immergées en mer, la surface est observée au MEB (figure 3.11).

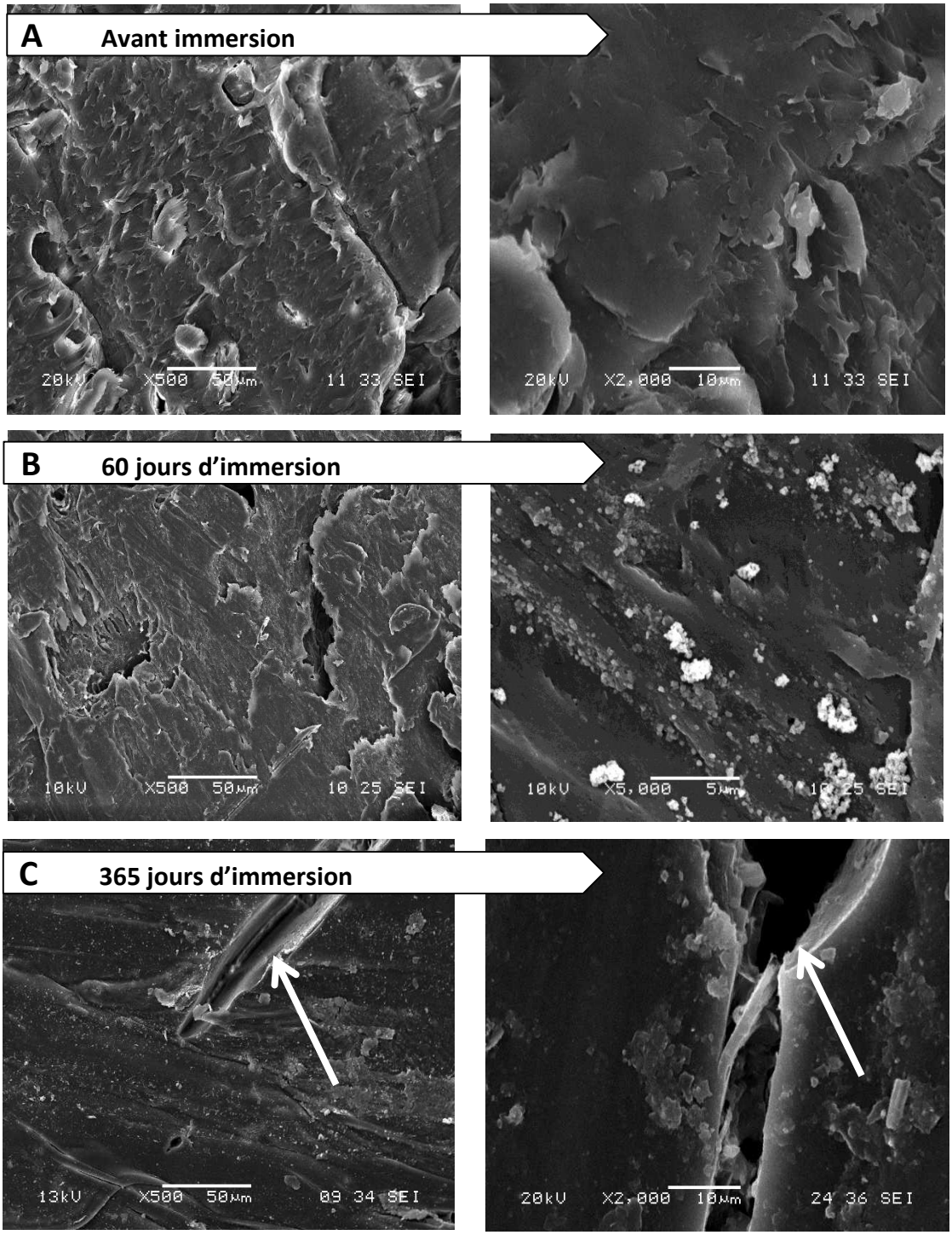


Figure 3.11. Observation des plaques en PLA par MEB après une immersion en mer de 30 jours (A), 60 jours (B) et 365 jours (C) (agrandissement x 500 à gauche et x 2000 à droite). Les flèches montrent des craquelures du support observées après 1 an d'immersion.

Les observations au MEB ne montrent pas la présence d'un microfouling abondant sur les plaques de PLA, très peu d'organismes adhèrent au matériau. Toutefois, un changement de la surface du matériau est observé au fur et à mesure du temps. En effet, à 60 jours la surface du PLA n'est plus aussi lisse qu'à 30 jours. Après 365 jours d'immersion, le PLA présente des craquelures à sa surface (figure 3.11).

C) Etude de la formation du biofilm à la surface du PLA

- Isolement et caractérisation bactérienne

Après 1 an d'immersion en mer, une souche bactérienne est isolée du PLA. Elle appartient au genre *Pseudoalteromonas*. C'est une bactérie marine Gram-négatif de forme bacille et de 1 µm de longueur. En 24 h à 18 °C, cette souche *Pseudoalteromonas* sp. montre une croissance sur milieu gélosé LBS et forme des colonies de couleur crème (figure 3.12). Elle supporte une large gamme de concentrations en sels (entre 15 g/l jusqu'à 40 g/l). La souche *Pseudoalteromonas* sp. est aérobie stricte et elle est capable de dégrader l'agar des milieux.

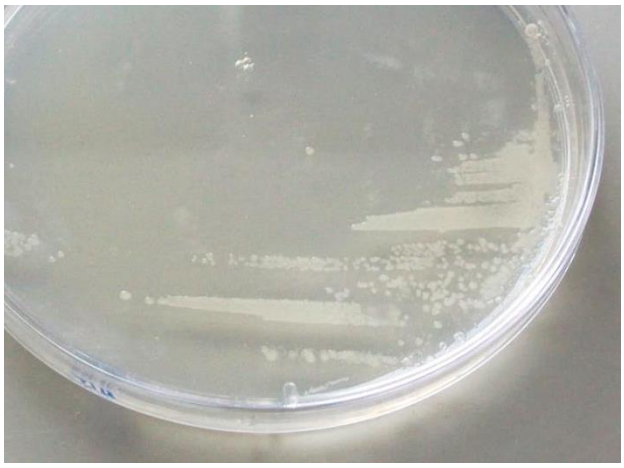


Figure 3.12. Identification macroscopique de la souche *Pseudoalteromonas* sp. sur milieu gélosé LBS.

La dynamique de croissance d'une bactérie peut se visualiser grâce à une courbe illustrée dans la figure 3.13. Les paramètres de croissance comme le taux de croissance et le début de la phase exponentielle sont données dans le tableau 3.1.

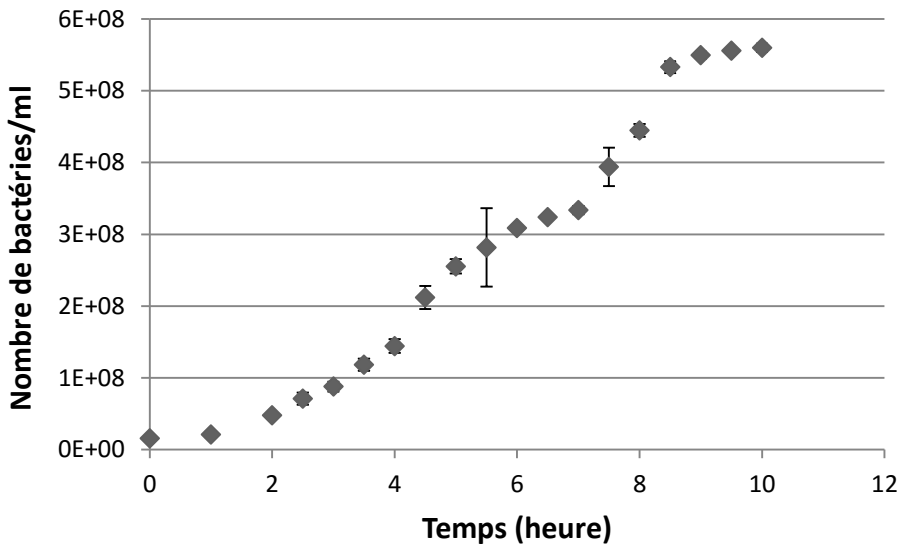


Figure 3.13. Cinétique de croissance de *Pseudoalteromonas* sp. en erleynmeyer à 18 °C dans le milieu LBS sous agitation (120 rpm).

Un dénombrement est réalisé à DO_{600} égale à 0,5 après 48 h d'incubation à 18 °C. Ainsi, une concentration bactérienne égale à $2{,}82.10^8$ bactéries/ml est obtenue.

Tableau 3.1. Caractéristiques de la croissance de *Pseudoalteromonas* sp.

Bactérie	Taux de croissance µ (h^{-1})	Début de la phase exponentielle (h)	Fin de la phase exponentielle (h)
PLAA	0,29	2	9

La bactérie étudiée a un taux de croissance de 0,29 h^{-1}. Elle commence sa phase exponentielle à 2 h puis atteint la phase stationnaire après 9 h de croissance.

- Observation *in vitro* du biofilm de *Pseudoalteromonas* sp. à la surface du PLA

La figure 3.14 – B présente l'adhérence de la bactérie *Pseudoalteromonas* sp. observée au MEB après une phase d'adhérence de 2 h en EDMA sur une plaque de PLA.

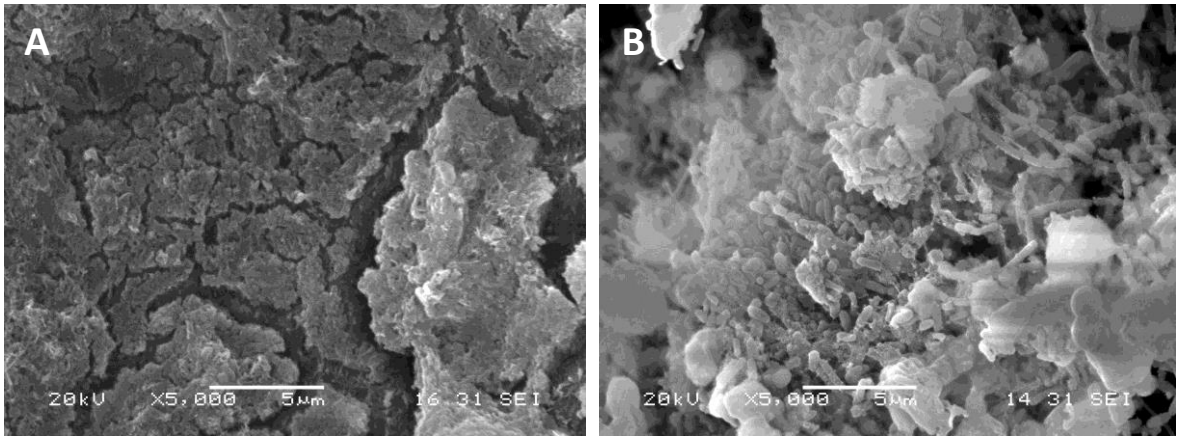


Figure 3.14. Surface du PLA après 2 h en EDMA stérile (A) et adhérence de la bactérie *Pseudoalteromonas* sp. sur la surface du PLA, après 2 h en milieu EDMA à 18 °C en condition statique (B), observées au MEB.

Après une phase d'adhérence de 2 h en EDMA, les plaques de PLA sont transférées dans un nouveau milieu EDMA et incubées pendant 6 mois à 18 °C sans renouvellement. Après ce temps, les plaques sont récupérées pour être observées au MEB (figure 3.15).

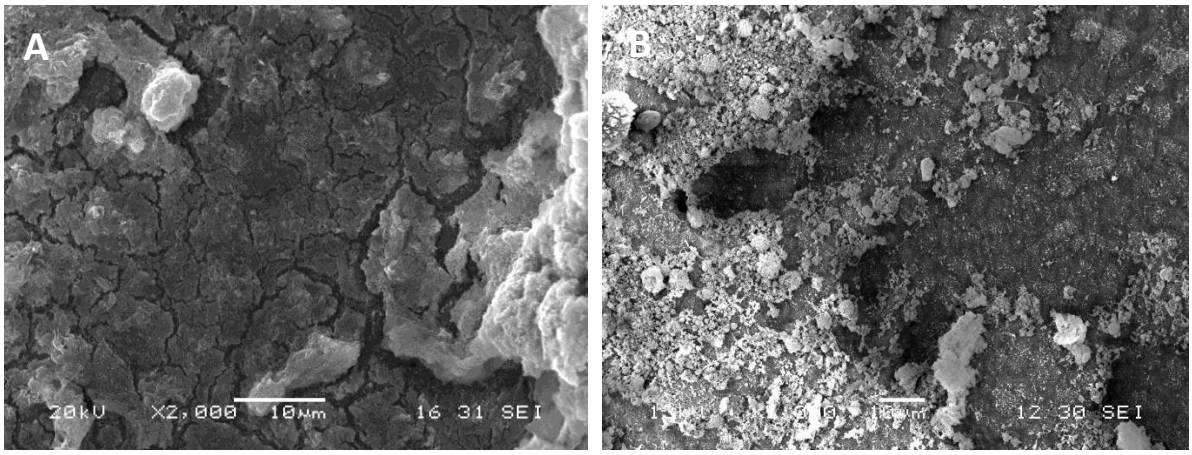


Figure 3.15. Surface du PLA après 6 mois en EDMA stérile (A) et biofilm formé par *Pseudoalteromonas* sp. après 6 mois en milieu EDMA à 18 °C sous agitation (120 rpm) (B), observés au MEB.

Les observations au MEB montrent la colonisation du PLA par *Pseudoalteromonas* sp. La bactérie est capable d'adhérer au matériau et de former un biofilm en milieu EDMA.

3.1.6. Discussion

Deux sites de culture différents ont été choisis pour cette première phase de l'étude. La concession de Mr Taugé se situe dans une zone abritée à courants modérés favorisant un dépôt sédimentaire naturel. Les éponges étaient présentes en quantité sur le site (densité > 5 individus/m²). L'été 2013, cette concession a subi un fort envasement qui a été accentué cette même année suite à plusieurs tempêtes. Les éponges ont ensuite presque entièrement disparu. Il ne reste alors plus que quelques spécimens de petites tailles, éloignés les uns des autres et dépassant à peine la couche de vase (densité < 1 individu/m²). Il faut attendre le printemps 2015 pour observer une recrudescence du nombre de spécimens sur le parc.
Au contraire, sur le site de Locoal-Mendon, la densité des éponges est restée stable durant toute la durée de l'étude. Le site de Locoal-Mendon semble donc plus propice à la culture d'éponge.

La saison de transplantation ou de culture peut grandement influencer le taux de survie. Généralement, les éponges de milieu tempéré ont plus de chance de survivre si elles sont transplantées quand la température de l'eau est relativement basse (automne) (Duckworth, 2009). Dans le cas des éponges transplantées en octobre à Locoal-Mendon, le taux de survie est de 100 %, contre 80 % pour la culture débutée en juin à Locmariaquer, ce qui confirme les travaux de Duckworth (Duckworth, 2009). Une température plus faible favorise la survie en ralentissant son métabolisme (Cheshire *et al.*, 1995 ; Duckworth, 2009), en encourageant la régénération du pinacoderme (Duckworth *et al.,* 1997 ; Duckworth, 2009) et en diminuant le développement bactérien donc le risque d'infection. Tout cela diminue le stress des éponges durant la transplantation (Hummel *et al*., 1988 ; Duckworth, 2009).

Les taux de croissance annuels trouvés pour *H. perlevis* sont de 21 % à Locmariaquer et 41 % à Locoal-Mendon. De plus, la figure 3.8 montre une grande variabilité de taille entre les greffons d'éponges.

Plusieurs études prouvent que les taux de croissance peuvent varier considérablement suivant l'espèce cultivée, suivant le lieu de culture mais aussi entre des fragments d'éponges de la même espèce, cultivés ensemble et dans les mêmes conditions environnementales (Page *et al*, 2005 ; Duckworth, 2009 ; Webster *et al*., 2012) et cela même si les fragments d'éponges proviennent d'un même individu « parent » (Verdenal & Vacelet, 1990). Ces variations peuvent résulter de plusieurs facteurs tels que les réserves d'énergie et la santé de l'éponge « parent » ou encore la taille des fragments et le nombre de chambres choanocytaires par greffon. De plus, le taux de croissance est généralement plus élevé lorsque la température de l'eau est en hausse (printemps et été) grâce à l'abondance de la nourriture durant cette période (Verdenal & Vacelet, 1990; Page *et al*, 2005 ; Duckworth, 2009). De mauvaises conditions météorologiques peuvent entrainer un stress chez l'animal qui va alors ralentir voire stopper sa croissance (Webster *et al*., 2012).

Comparer les taux de croissance d'*H. perlevis* avec une autre étude est impossible puisqu'à notre connaissance aucune autre culture *in situ* de cette espèce n'a été réalisée jusqu'à présent. De plus, une comparaison avec d'autres espèces est difficile puisque les méthodes d'évaluation, les systèmes de culture et les intervalles de temps sont différents. Par exemple, pour les éponges de toilette *S. officinalis* cultivées en Méditerranée, des taux de croissance annuels allant de 60 % à 500 % ont été décrits (Corriero *et al.,* 2004 ; Storr, 1964 ; Verdenal & Vacelet, 1990). Pour *Dysidea avera,* également cultivée en Méditerranée, des taux de croissance allant de 20 % à 100 % ont été trouvés (Osinga *et al.,* 2010). En Nouvelle-Zélande, des taux de croissance annuels de *Mycale hentscheli* allant de 1355 % à 2437 % ont été rapportés. En outre, la pratique courante d'extrapolation des valeurs obtenues à une année entière n'est pas toujours recevable en raison des variations saisonnières des taux de croissance (Van Treeck *et al.*, 2003).

Dans un premier temps, nous avons choisi d'utiliser les poches à huîtres pour tester la culture d'éponge. L'utilisation de ces poches par les ostréiculteurs est largement répandue, il était donc logique pour nous de démarrer les essais avec ce matériau. Les poches sont très pratiques pour la culture d'éponge. Elles sont faciles à manipuler, légères et

leur prix est abordable. Elles conviennent à une culture sur l'estran car peu encombrantes. Toutefois, la technique de culture en poche n'est peut-être pas la plus fiable. Les mailles étant assez petites, les poches peuvent vite être recouvertes de salissures biologiques et de vase « asphyxiant » les éponges ou du moins diminuant l'apport en eau et donc en nourriture ce qui va entrainer une stagnation de la croissance des éponges (Duckworth, 2009). Surélever la poche pour éviter ce genre de désagrément, comme à Locoal-Mendon, ne donne pas de meilleurs résultats puisque les éponges recherchent le contact du sol et de l'eau en traversant les mailles de la poche. Un nettoyage tous les 6 mois peut limiter le dépôt de salissures ou encore mieux, utiliser un matériau ayant des propriétés antisalissures serait plus pratique.

Les observations microscopiques après immersion des plaques de PLA montrent que très peu de microorganismes adhèrent à leur surface. Les observations macroscopiques montrent que seuls quelques macroorganismes comme des bernacles, des anomies, des bivalves, adhèrent aux PLA suggérant que celui-ci possède des propriétés antisalissures.
Le deuxième intérêt de ce matériau est qu'il pourrait être biodégradable en mer. La biodégradation est ici définie comme la décomposition de matières organiques par l'action de microorganismes tels que les bactéries conduisant à la formation de dioxyde de carbone et/ou de méthane et d'eau. La croissance bactérienne et la formation d'un biofilm participent à la décomposition d'un polymère en provoquant des fissures (Bonhomme *et al*., 2003). Après un an d'immersion en mer, le PLA présente des craquelures caractéristiques à sa surface. Une bactérie est alors isolée du matériau. Cette bactérie est capable d'adhérer et de former un biofilm à la surface du PLA. Les études initiées lors du projet EPAVART (http://www.univ-ubs.fr/projet-transversal-epavart-295344.kjsp?RH=ACTU) et poursuivies par Deroiné *et al*. (2014) ont montré que la dégradation du PLA dans de l'eau de mer *in vitro* était très lente et qu'en plus, il y avait un délai de 1 an entre l'immersion du matériau et le début de sa dégradation. Cette propriété fait que ce matériau à une durée de vie suffisamment longue pour être utilisé en spongiculture mais sa biodégradabilité n'a pas clairement été établie. Des études approfondies seraient nécessaires pour affirmer que la souche *Pseudoalteromonas* sp. que nous avons isolée est capable de biodégrader le PLA. A ce jour, aucun microorganisme dégradant le PLA en mer n'a été décrit. Toutefois, la

formation de biofilms semble être une étape nécessaire à la biodégradation (Walczak *et al.*, 2015).

3.1.7. Conclusion du chapitre

Les résultats montrent que la culture d'*H. perlevis* est faisable sur le littoral Atlantique. Toutefois, les taux de survie et de croissance relativement faibles après une année de culture démontrent l'utilité d'essais supplémentaires pour le développement de la spongiculture à plus grande échelle. Les poches à huîtres sont des supports intéressants qui, toutefois, sont vite recouverts de salissures marines. Le PLA est un matériau qui possède des propriétés antisalissures et en plus, qui dure dans le temps. Ces qualités en font un matériau intéressant pour la culture des éponges marines et pourquoi pas des huîtres.

3.2. Evaluation *in vitro* des propriétés de filtration et de rétention d'*H. perlevis*

Sommaire du chapitre

3.2.1. Introduction **98**

3.2.2. Les bactéries *E. coli* et *V. aestuarianus* **99**

A) Caractérisation bactérienne 99
B) Capacité de filtration et de rétention des bactéries 102
C) Expérience de décontamination en présence d'huîtres 107
D) Libération des bactéries après filtration 112
E) Discussion 113

3.2.3. Le plomb **116**

A) Toxicité du plomb vis-à-vis de l'éponge *H. perlevis* 116
B) Filtration de l'eau après une contamination au plomb 117
C) Capacité de rétention du plomb 120
D) Bioaccumulation du plomb par les éponges 122
E) Libération du plomb dans l'eau 123
F) Expérience de décontamination en présence d'huîtres 125
G) Discussion 126

3.2.4. Le virus OsHV-1 **128**

A) Introduction aux expérimentations 129
B) huîtres infectées sans éponge 129
C) huîtres saines plus éponges 129
D) huîtres infectées plus éponges 130
E) Discussion 131

3.2.5. Conclusion du chapitre **132**

3.2.1. Introduction

La qualité de l'eau est un enjeu majeur. Son amélioration et/ou son maintien sont indispensables à la préservation de la biodiversité marine et à la production des ressources aquacoles. Les huîtres, par exemple, sont des animaux filtreurs sensibles aux pollutions, qu'elles soient chimiques ou microbiologiques, fragilisant la filière ostréicole. Les professionnels sont donc à la recherche de solutions pour améliorer la qualité de l'eau. La bioremédiation fait partie des nouvelles stratégies à la fois durables et respectueuses de l'environnement, mises en œuvre pour améliorer la qualité de l'eau grâce aux propriétés naturelles de dépollution de certains organismes vivants.

Dans ce contexte, ce chapitre vise à montrer les capacités de l'éponge *H. perlevis* à filtrer et à retenir et/ou métaboliser certains contaminants dans un but d'épuration du milieu dans lequel elle vit. Deux bactéries *E. coli* et *V. aestuarianus*, un élément trace métallique, le plomb et un virus, OsHV-1 sont choisis comme contaminants modèles.

En effet, *E. coli* et le plomb sont deux indicateurs de la qualité des parcs ostréicoles. Leur concentration dans les huîtres est régulièrement mesurée dans le cadre du classement sanitaire des parcs défini par arrêté préfectoral.

Entre 2009 et 2011, la production ostréicole française est passée de 140 000 huîtres vendues par an à 80 000. Cette baisse de production est directement liée aux épisodes estivaux de surmortalité des naissains qui surviennent depuis 2008 et dans lesquelles le virus OsHV-1 et la bactérie *V. aestuarianus* sont impliqués (Paillard *et al*., 2004 ; Renault, 2006).

Les capacités de filtration et d'accumulation de ces contaminants par *H. perlevis* sont évaluées et comparées avec celles des huîtres ceci dans le but de réduire la prolifération de contaminants biologiques dans la colonne d'eau et par conséquent dans les huîtres.

3.2.2. Les bactéries *E. coli* et *V. aestuarianus*

A) Caractérisation bactérienne

- Courbes de croissance d'*E. coli* et de *V. aestuarianus*

Les cinétiques de croissances d'*E. coli* et de *V. aestuarianus* sont représentées dans la figure 3.16. Les paramètres de croissance (taux de croissance et début de la phase exponentielle) sont indiqués dans le tableau 3.2.

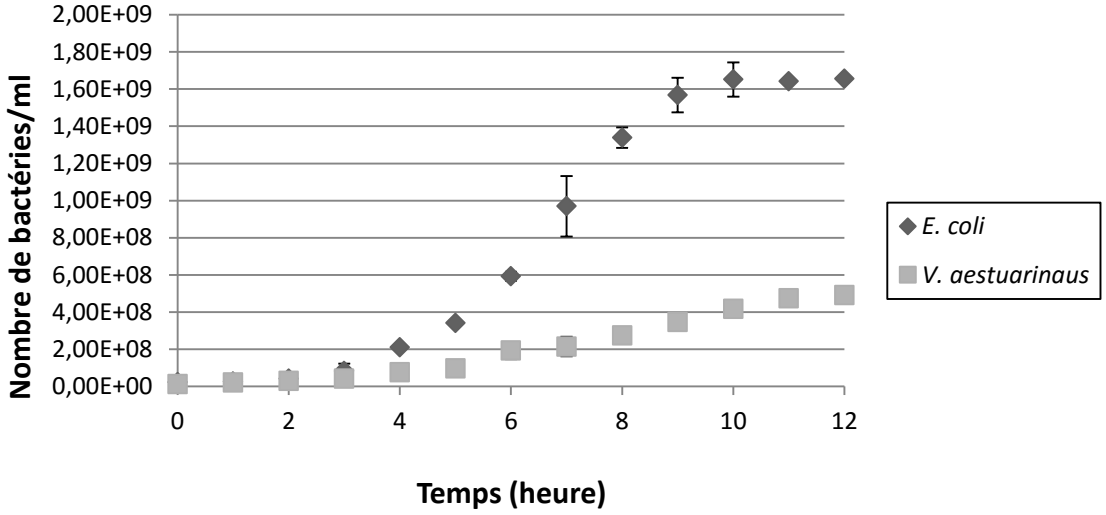


Figure 3.16. Cinétiques de croissance d'*Escherichia coli* (milieu LB) et de *Vibrio aestuarianus* (milieu LBS) en erleynmeyer à 18 ° C (moyenne ± écart-type).

Tableau 3.2. Caractéristiques de la croissance d'*Escherichia coli* et de *Vibrio aestuarianus*

Bactérie	Taux de croissance μ (h^{-1})	Début de la phase exponentielle (h)	Fin de la phase exponentielle (h)
E. coli	0,3429	4	10
V. aestuarianus	0,2816	6	12

E. coli et *V. aestuarianus* ont respectivement des taux de croissance de 0,3429 h^{-1} et 0,2816 h^{-1}. *E. coli* atteint plus rapidement le début de la phase exponentielle (4 h) que *V. aestuarianus* (6 h). La connaissance de ce paramètre permet d'inoculer les bactéries dans un même état physiologique. Au début de la phase exponentielle, il se produit une augmentation de la vitesse de croissance et le taux de mortalité est proche de 0. Il est judicieux d'inoculer des bactéries en début de phase exponentielle lors des expérimentations afin de s'assurer que la diminution de la concentration bactérienne dans les aquariums est due aux éponges et non à un début d'autolyse des bactéries.

Un dénombrement est réalisé en triplicat à DO_{600nm} égale à 0,5. Ainsi, des concentrations bactériennes moyennes (p-value < 0,05) égales à $2,11.10^8$ bactéries/ml pour *E. coli* et $1,95.10^8$ bactérie/ml pour *V. aestuarianus* sont obtenues. Le calcul de ce paramètre permet de connaitre le nombre de bactéries initialement inoculé dans les aquariums.

- Contrôle de la survie des bactéries en EDMA

Les expérimentations sont réalisées sur plusieurs jours en EDMA. Il est donc indispensable que les bactéries choisies survivent pendant toute la durée des expérimentations. Afin de mesurer la durée de vie des bactéries en EDMA, les concentrations bactériennes mesurées sont présentées dans la figure 3.17.

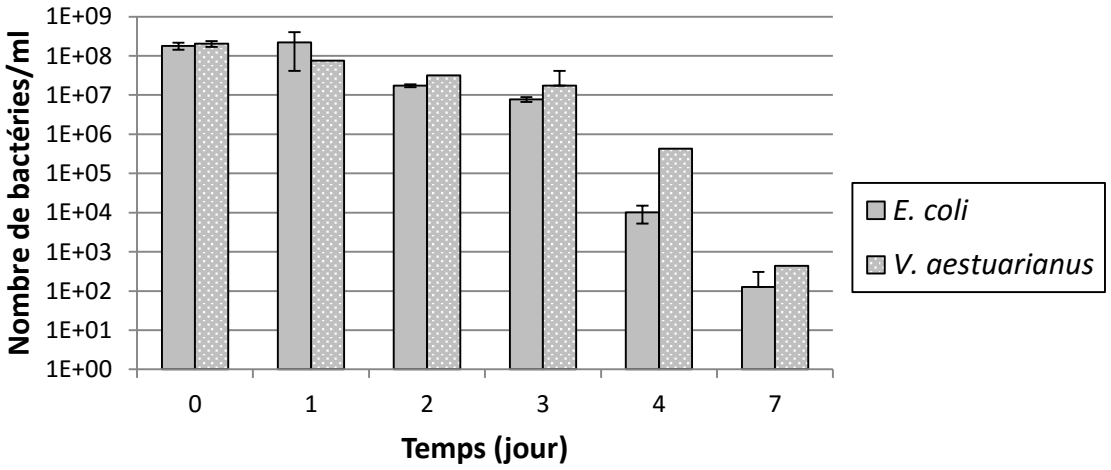


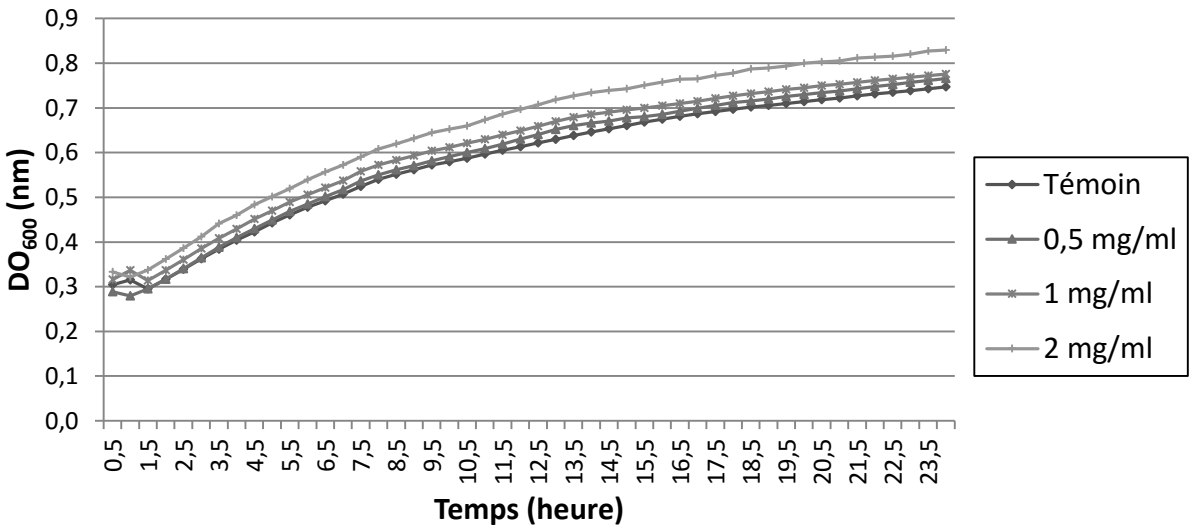
Figure 3.17. Concentrations en *Escherichia coli* et en *Vibrio aestuarianus* dans l'EDMA mesurées durant une semaine après ensemencement initial des aquariums à 2.10^8 bactéries/ml.

La concentration en *E. coli* diminue significativement entre 1 et 2 jours (p-value < 0,05) puis reste stable jusqu'au troisième jour (p-value > 0,05). Entre 3 et 7 jours, la concentration en *E. coli* diminue fortement (- 99,98 % de bactéries, p-value < 0,01).
Le même profil est obtenu pour *V. aestuarianus* avec une diminution bactérienne de 99,99 % entre 3 et 7 jours (p-value < 0,01). Au vu des résultats, une grande majorité des bactéries survit au maximum 3 jours en EDMA. Les expériences de décontamination seront donc réalisées sur 72 h maximum.

- Activité antibactérienne de l'extrait brut d'*H. perlevis*

Pour s'assurer que ce sont bien les actions physiologiques de l'éponge qui entrainent une diminution de la concentration bactérienne et non une activité bactéricide liée à la présence de substances naturelles de l'éponge, des tests d'activité antibactérienne sur *E. coli* et *V. aestuarianus* sont réalisés à partir de l'extrait brut d'*H. perlevis* (figure 3.18). Ainsi, un suivi de la densité bactérienne (DO_{600nm}) est réalisé en présence d'extraits organiques à des concentrations variables.

a)



b)

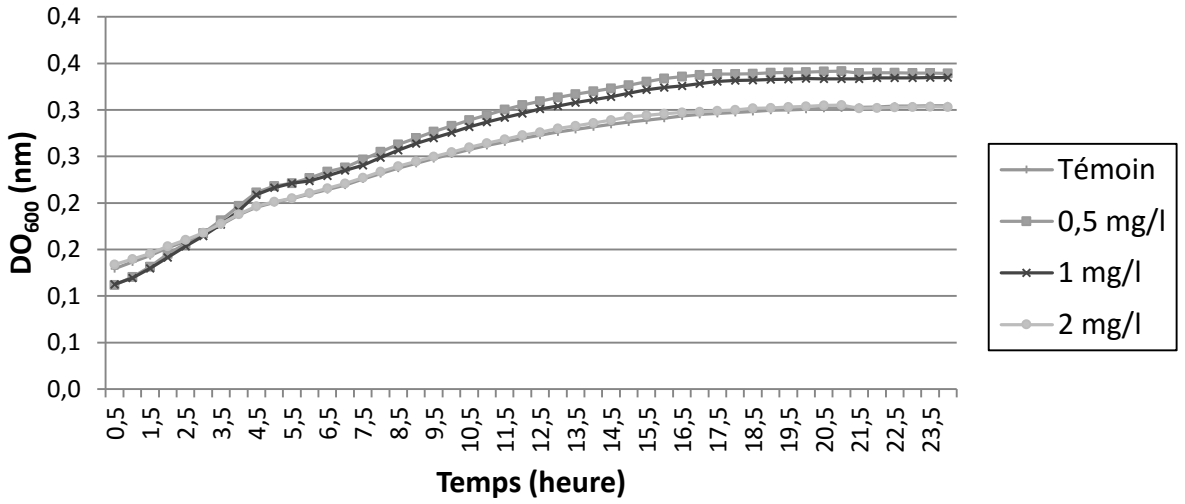


Figure 3.18. Cinétique de croissance de a) *Escherichia coli* (LB) et de b) *Vibrio* aestuarianus (LBS) en microplaque à 18 ° C sous agitation (120 rpm) en fonction des différentes concentrations (0,5 mg/l, 1 mg/l et 2 mg/l) de l'extrait brut d'*Hymeniacidon perlevis*. Le témoin négatif est préparé à partir de DMSO.

Quelle que soit la concentration de l'extrait brut testée, aucun effet bactéricide n'est observé vis-à-vis d'*E. coli* et vis-à-vis de *V. aestuarianus*.

B) <u>Capacités de filtration et de rétention des bactéries</u>

Une méthode couramment utilisée pour estimer la capacité de filtration et de rétention d'une particule en suspension par les éponges marines est de réaliser un test de clairance. Ce test consiste à mesurer la rétention des particules en suspension par un animal filtreur dans un volume d'eau donné.

- Eau contaminée par *E. coli*

Pour évaluer *in vitro* le volume d'eau filtré par les éponges en fonction du temps, la concentration des bactéries en suspension dans l'eau est mesurée (figure 3.19).

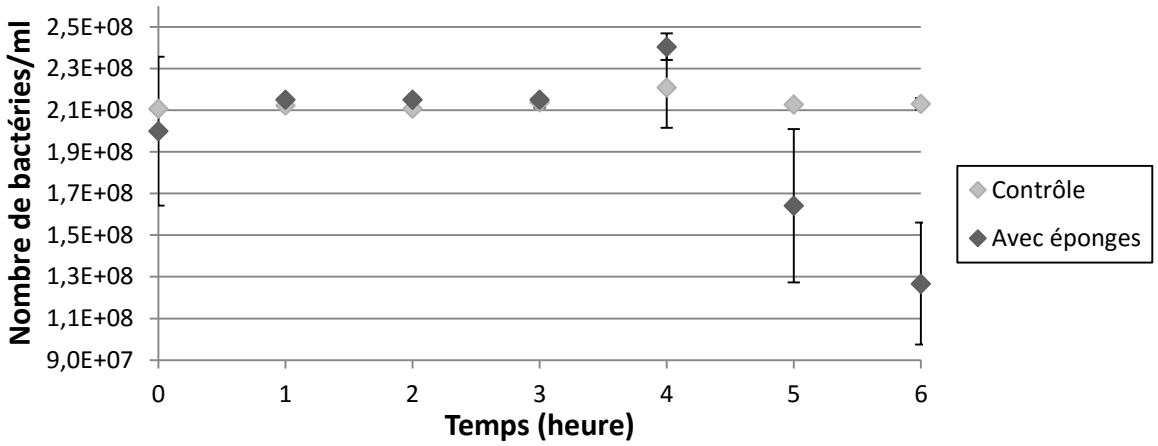


Figure 3.19. Concentration en *Escherichia coli* dans les aquariums (5 l) en fonction du temps en présence ou non de l'éponge *Hymeniacidon perlevis* (25 g) (moyenne ± écart-type).

La figure 3.19 présente une diminution de la concentration en *E. coli* en fonction du temps. Ainsi, après un temps de latence de 4 h, une réduction moyenne de $5{,}69.10^7$ *E. coli*/ml/h est observée entre 4 et 6 h ce qui correspond à un taux de filtration de $5{,}89.10^9$ *E. coli*/h/g d'éponge, en supposant que 100 % des bactéries en moins dans l'eau sont retenues par l'éponge.

Ces données permettent ensuite de calculer l'efficacité de rétention d'*E. coli* par *H. perlevis* (figure 3.20). L'efficacité de rétention est ici définie comme la capacité d'*H. perlevis* à retenir les bactéries ensemencées.

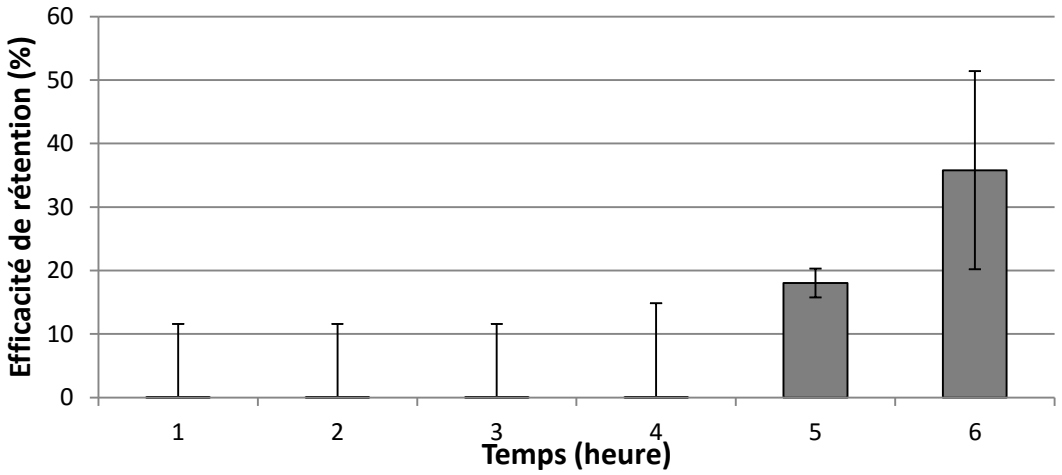


Figure 3.20. Efficacité de rétention d'*Escherichia coli* par l'éponge *Hymeniacidon perlevis* en fonction du temps.

Entre 4 et 6 h, l'efficacité de rétention de la bactérie *E. coli* par *H. perlevis* est donc en moyenne de 17,95 %. Enfin, le taux de clairance est déduit des résultats précédents (figure 3.21). Le taux de clairance est souvent utilisé pour caractériser indirectement l'activité de filtration des invertébrés marins et des éponges en particulier. Il reflète la variabilité de la filtration des bactéries par l'éponge en fonction du temps. Certains taux de clairance sont négatifs du fait de concentrations bactériennes supérieures aux valeurs de t0. Celles-ci sont dépendantes de la variabilité calculée autour de chaque estimation moyenne.

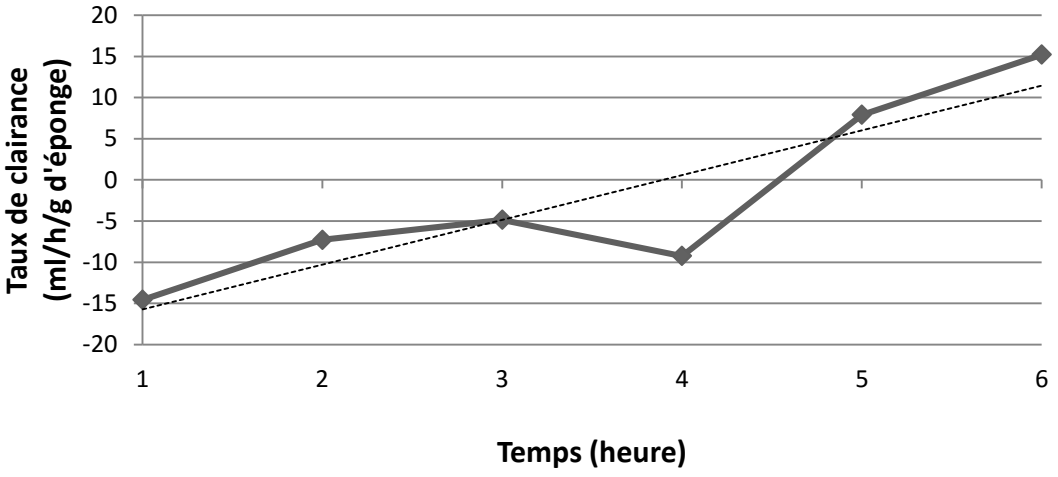


Figure 3.21. Taux de clairance d'*Escherichia coli* par l'éponge *Hymeniacidon perlevis* en fonction du temps.

La régression linéaire de la figure 3.21 présente une pente positive (a = 5,43) ce qui suggère une augmentation de l'activité de filtration en fonction du temps. Ces résultats correspondent à un taux de clairance moyen de 4,62 ml/h/g d'éponge entre 4 et 6 h.

- Eau contaminée par *V. aestuarianus*

Le même cheminement que pour *E. coli* est opéré. La concentration moyenne en bactéries dans l'eau des aquariums est indiquée par la figure 3.22.

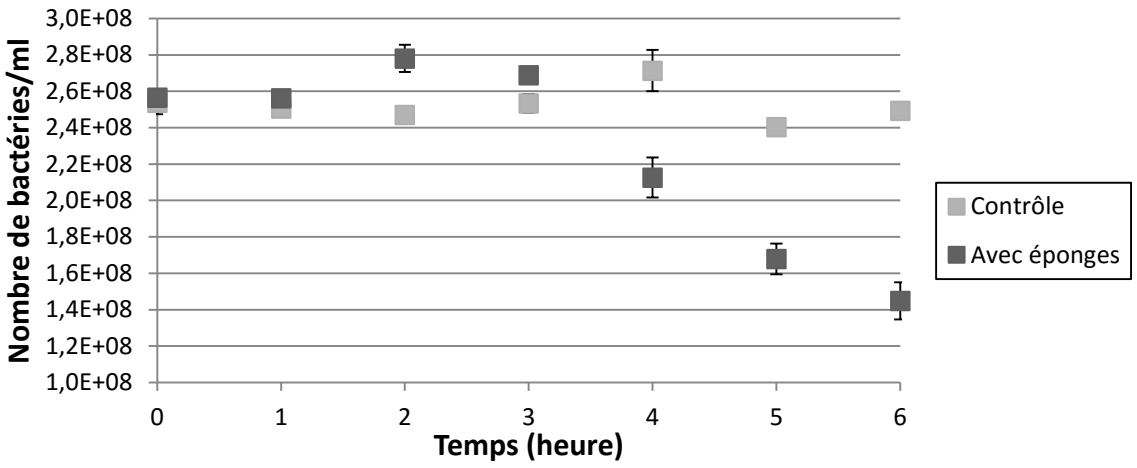


Figure 3.22. Concentration en *Vibrio aestuarianus* dans les aquariums (5 l) en fonction du temps en présence ou non de l'éponge *Hymeniacidon perlevis* (25 g) (moyenne ± écart-type).

La figure 3.22 montre une diminution de la concentration en *V. aestuarianus* en fonction du temps. Ainsi, après un temps de latence de 3 h, une réduction moyenne de $3{,}33.10^7$ *V. aestuarianus*/ml/h est observée entre 3 et 6 h (p-value < 0,01) ce qui correspond à une filtration de $6{,}66.10^9$ *V. aestuarianus*/h/g d'éponge, en supposant que 100 % des bactéries en moins dans l'eau sont retenus par l'éponge.

Ces données permettent ensuite de calculer l'efficacité de rétention de *V. aestuarianus* par *H. perlevis* (figure 3.23).

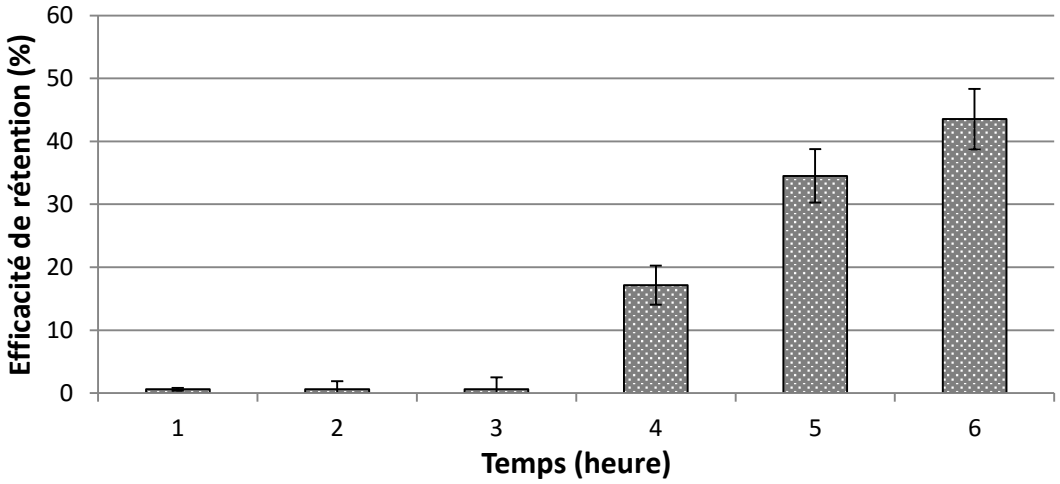


Figure 3.23. Efficacité de rétention de *Vibrio aestuarianus* par l'éponge *Hymeniacidon perlevis* en fonction du temps.

Entre 3 et 6 h, l'efficacité de rétention de la bactérie *V. aestuarianus* par *H. perlevis* est en moyenne de 23,83 %. Enfin, le taux de clairance est déduit des résultats précédents et présenté dans la figure 3.24.

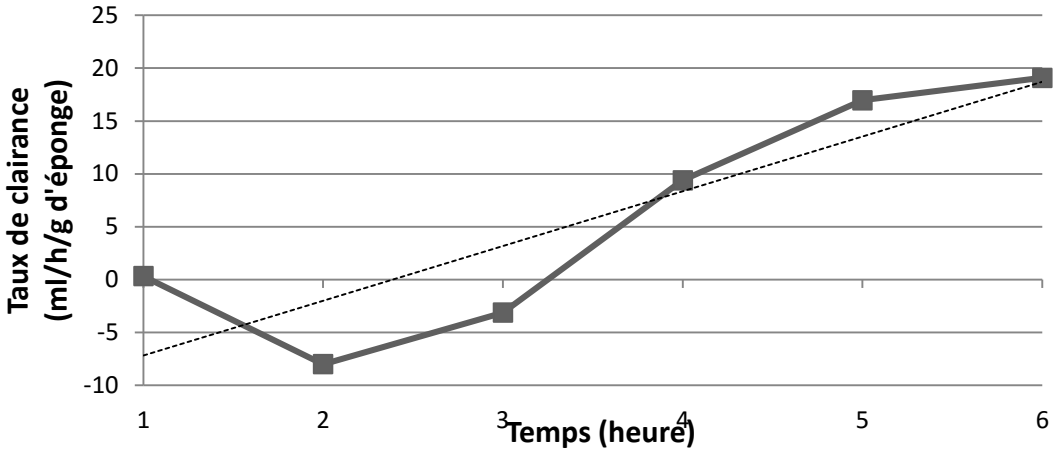


Figure 3.24. Taux de clairance de *Vibrio aestuarianus* par l'éponge *Hymeniacidon perlevis* en fonction du temps.

La régression linéaire de la figure 3.24 présente une pente positive (a = 5,18) ce qui suggère une augmentation de l'activité de filtration en fonction du temps. Ces résultats correspondent à un taux de clairance moyen de 10,60 ml/h/g d'éponge entre 3 et 6 h.

- Comparaison entre *E. coli* et *V. aestuarianus*

Les résultats obtenus précédemment sont résumés dans le tableau 3.3 suivant :

Tableau 3.3. Résultats des tests effectués sur *Escherichia coli* et *Vibrio aestuarianus.*

	E. coli	***V. aestuarianus***
Début de la filtration bactérienne par l'éponge (h)	4	3
Taux de filtration (bactéries/h/g d'éponge)	$5,89.10^9$	$6,66.10^9$
Efficacité de rétention (%)	17,95	23,83
Taux de clairance (ml/h/g d'éponge)	4,62	10,60

Les résultats montrent que *H. perlevis* filtre plus rapidement les bactéries *V. aestuarianus* (au bout de 3 h) par rapport à *E. coli* (au bout de 4 h) (p-value < 0,05). L'efficacité de rétention et le taux de clairance varient selon l'espèce bactérienne filtrée. Ils sont plus importants par rapport à *V. aestuarianus* que par rapport à *E. coli* (p-value > 0,05). Au vu des résultats, *E. coli* semble moins efficacement filtrée et retenue par *H. perlevis* par rapport à *V. aestuarianus*.

C) Expérience de décontamination en présence d'huîtres

La mesure des efficacités de rétention montre qu'*H. perlevis* possède la capacité de filtration d'une eau contaminée par *E.* coli ou *V. aestuarianus*. Ces résultats ont amené à mesurer l'efficacité d'*H. perlevis* pour éliminer les bactéries d'une eau contaminée (à hauteur de 2.10^8 bactéries/ml) afin d'empêcher une contamination des huîtres.

- Décontamination vis-à-vis d'*E. coli*

Pour évaluer une décontamination vis-à-vis d'*E. coli*, la concentration bactérienne est quantifiée dans les huîtres seules (contrôle) ou en présence d'*H. perlevis* (figure 3.25).

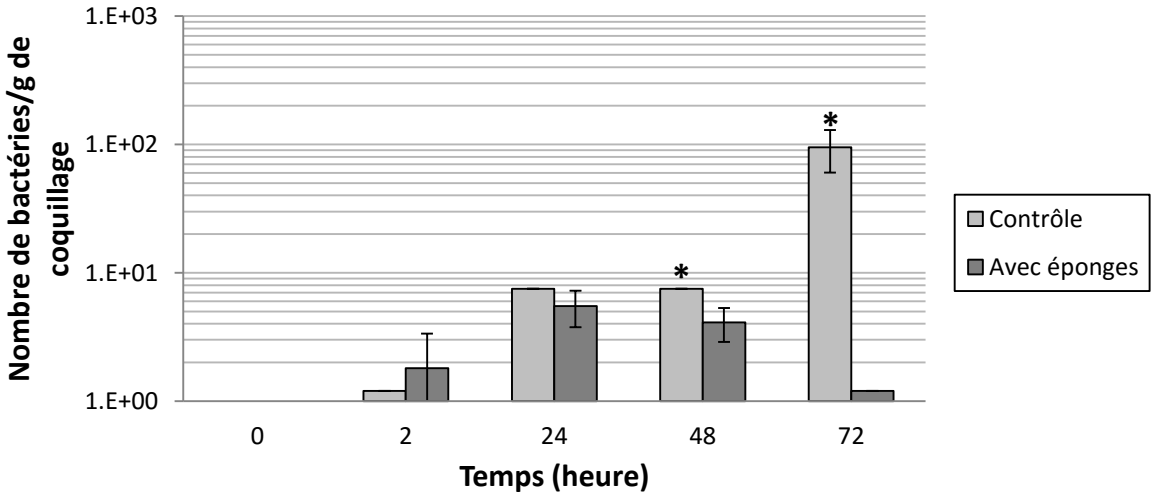


Figure 3.25. Concentration en *Escherichia coli* dans les huîtres (75 g) en présence ou non de l'éponge *Hymeniacidon perlevis* (75 g). *, p < 0,05.

La figure 3.25 montre une augmentation de la concentration en *E. coli* dans les huîtres « contrôle » avec un maximum de 95 *E. coli*/g d'huîtres (p-value < 0,05). En présence d'éponge, après 72 h de contamination, la concentration bactérienne dans les huîtres n'est que de 1,2 *E. coli*/g d'huîtres (soit une diminution de 98,5 % du nombre de bactéries par rapport au contrôle) (p-value < 0,01).

- Décontamination vis-à-vis de *V. aestuarianus*

Pour évaluer une décontamination vis-à-vis de *V. aestuarianus*, la concentration bactérienne est quantifiée dans les huîtres seules (contrôle) ou en présence d'*H. perlevis* (figure 3.26).

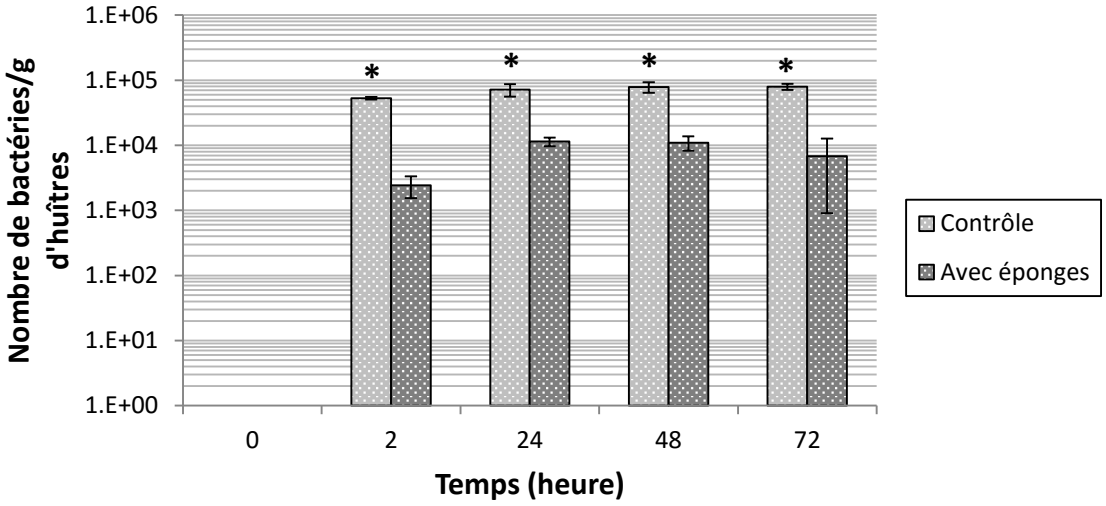


Figure 3.26. Concentration en *Vibrio aestuarianus* dans les huîtres (75 g) en présence ou non de l'éponge *Hymeniacidon perlevis* (75 g). *, p < 0,05.

A 2 h, la figure 3.26 montre une nette augmentation de la concentration en *V. aestuarianus* dans les huîtres contrôle et avec éponges (p-value < 0,01). Dans les huîtres « contrôle », une concentration moyenne de $7{,}06.10^4$ *V. aestuarianus*/g d'huîtres est dénombrée entre 2 et 72 h. En présence d'éponge, la concentration bactérienne dans les

huîtres augmente jusqu'à atteindre un maximum de $1{,}14.10^4$ *V. aestuarianus*/g d'huîtres à 24 h (différence significative entre 0 et 2 h, p-value < 0,05) puis diminue jusqu'à $6{,}78.10^3$ *V. aestuarianus*/g d'huîtres (différence significative entre 48 et 72 h, p-value < 0,05) (soit une diminution de 89,43 % du nombre de bactéries par rapport au contrôle).

- Comparaison entre *E. coli* et *V. aestuarianus*

L'accumulation des bactéries par les huîtres en présence ou non des éponges varie selon l'espèce bactérienne (tableau 3.4).

Tableau 3.4. Concentrations bactériennes dans les huîtres après 72 h de filtration en fonction de la présence ou non d'éponges.

	E. coli	***V. aestuarianus***
Concentration bactérienne à 72 h dans les huîtres « contrôle »	95 *E. coli*/g d'huîtres	$7{,}95.10^4$ *V. aestuarianus*/g d'huîtres
Concentration bactérienne à 72 h dans les huîtres en présence d'éponges	1,2 *E. coli*/g d'huîtres	$6{,}77.10^3$ *V. aestuarianus*/g d'huîtres
% de réduction	98,5 %	89,43 %

Les résultats montrent que les huîtres accumulent davantage les bactéries de l'espèce *V. aestuarianus* par rapport à *E. coli* (p-value < 0,01). Au bout de 72 heures, les huîtres « contrôle » ont filtré $7{,}95.10^4$ *V. aesturianus*/g d'huîtres contre 95 *E. coli*/g d'huîtres. De plus, le tableau 3.4 montre une différence significative à 72 h entre les huîtres « contrôle » et les huîtres mises en présence d'éponge. L'éponge a donc permis une réduction de la concentration bactérienne dans l'eau et par conséquence dans les huîtres pour les deux espèces bactériennes étudiées. Pour observer une différence significative du nombre de bactéries dans les huîtres contrôles comparées aux huîtres mises en présence d'éponges, il faut attendre 2 h pour *V. aestuarianus* contre 48 h pour *E. coli*.

En parallèle des dénombrements bactériens réalisés dans les huîtres, des dénombrements sont également réalisés dans les éponges (figure 3.27).

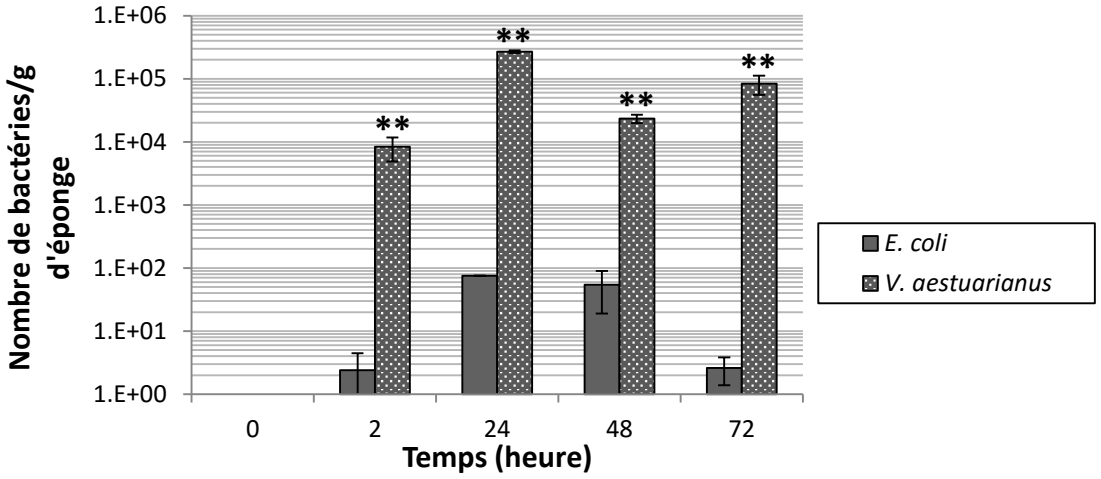


Figure 3.27. Concentration en *Escherichia coli* et en *Vibrio aestuarianus* dans les éponges lors des tests de décontamination bactérienne vis-à-vis des huîtres. **, p < 0,01.

Une nette augmentation de la concentration bactérienne dans l'éponge est observée les 24 premières heures, jusqu'à atteindre un maximum de 7,5 *E. coli*/g d'éponge et $2,7.10^5$ *V. aestuarianus*/g d'éponge. Par la suite, la concentration en *V. aestuarianus* est en moyenne de $2,81.10^4$ *V. aestuarianus*/g d'éponge. Celle en *E. coli* en revanche, diminue jusqu'à 1,21 *E. coli*/g d'éponge (p-value < 0,05). La figure 3.27 montre une différence significative (p-value < 0,01) entre le nombre d'*E. coli* et de *V. aestuarianus* dans les éponges à 2 h, 24 h, 48 h et 72 h. Cette différence peut-être due à une moindre filtration des bactéries de l'espèce *E. coli* par l'éponge et/ou à une digestion des bactéries.

L'utilisation du MEB permet d'observer la surface des éponges pendant les expériences de décontamination (figure 3.28).

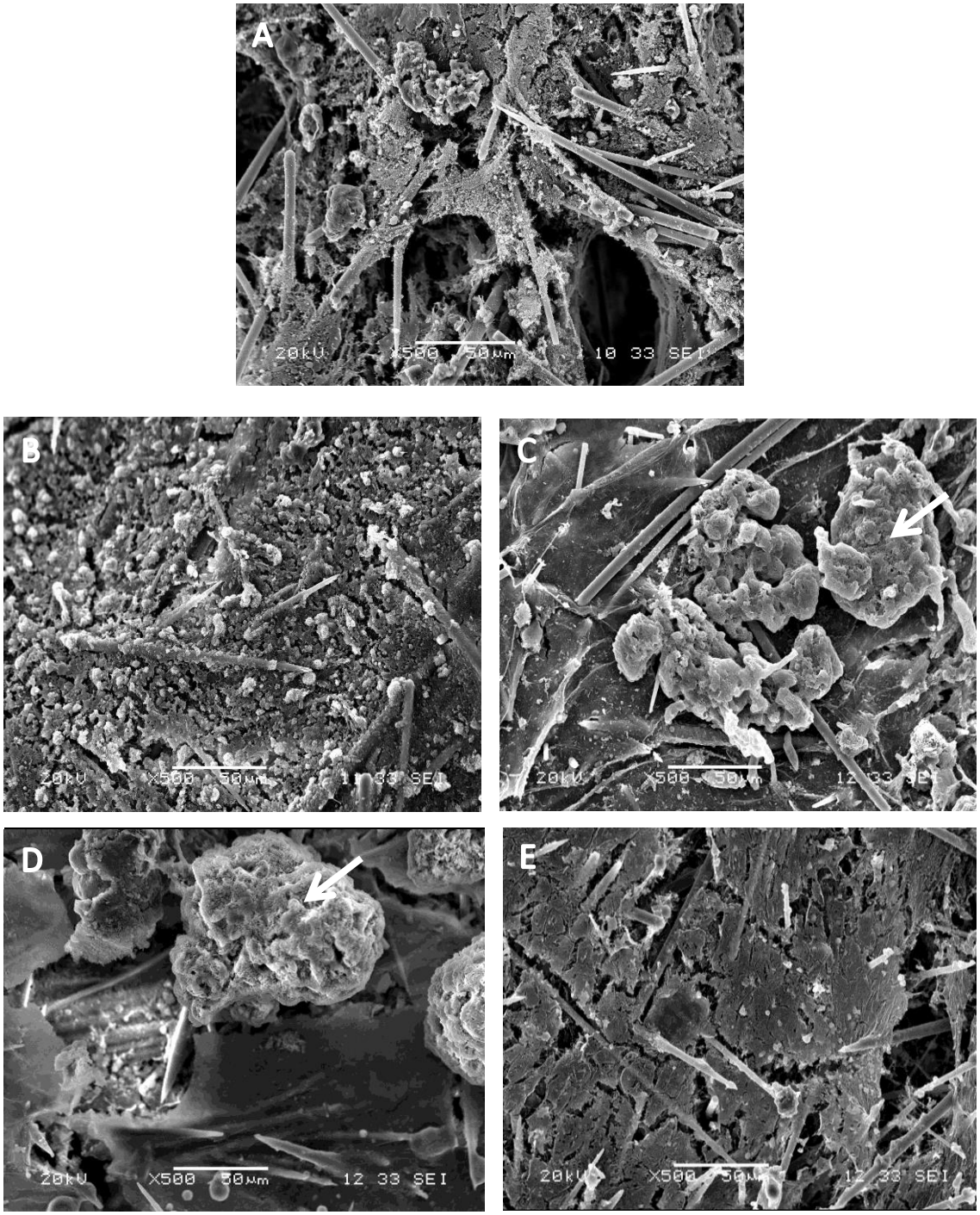


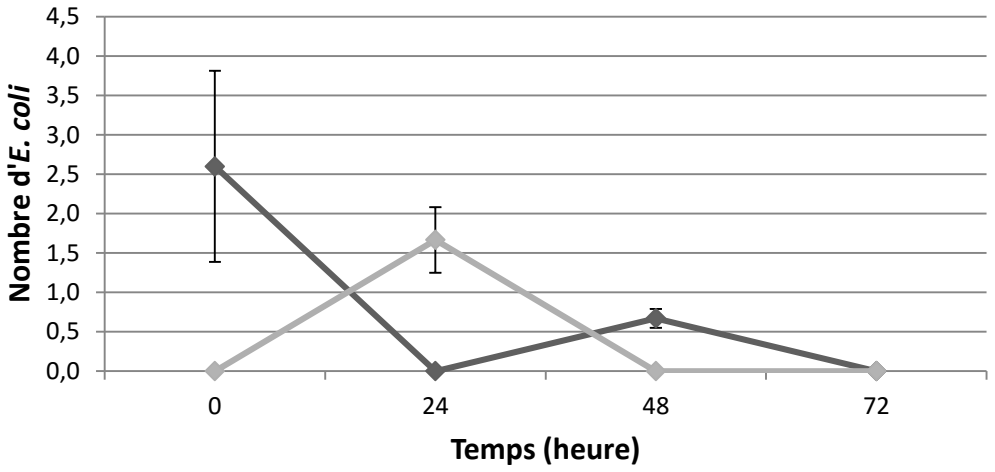
Figure 3.28. Observation au MEB de la surface des éponges lors des expériences de décontamination avec *Escherichia coli* à T0 (A) et après 2 h (B), 24 h (C), 48 h (D) et 72 h (E) de filtration. Les flèches montrent la présence d'agrégats.

L'observation au MEB montre la formation d'agrégats au fur et à mesure du temps qui disparaissent finalement à 72 h. Ces résultats sont difficilement exploitables puisqu'il n'existe pas d'observations comparables dans la bibliographie.

D) Libération des bactéries après filtration

Les résultats précédents montrent que les éponges sont capables de retenir les bactéries présentes dans leur milieu. Par la suite, nous avons voulu vérifier si les bactéries ne font que traverser l'animal avec l'eau dans le réseau aquifère de l'éponge puis sont ensuite rejetées dans le milieu ou si elles sont phagocytées par l'éponge. Les éponges précédemment contaminées pendant 72 h sont placées dans des aquariums d'eau stérile et un dénombrement est réalisé dans les éponges et dans l'eau (figure 3.29).

a)



b)

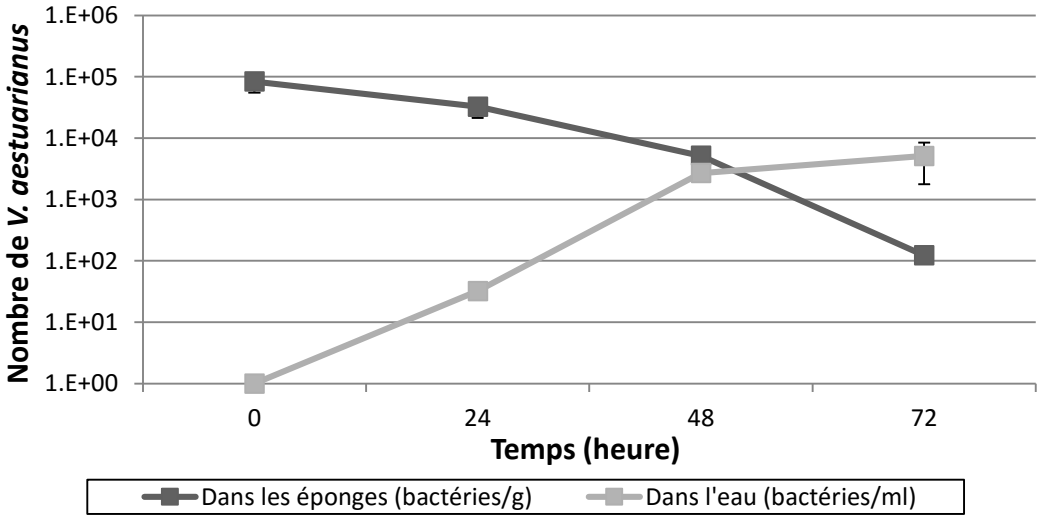


Figure 3.29. Concentration en a) *Escherichia coli* et en b) *Vibrio aestuarianus* retenus par l'éponge et libérés dans l'eau des aquariums après 3 jours de filtration d'une eau contaminée.

Les résultats montrent une libération d'*E. coli* et de *V. aestuarianus* dans l'eau au bout de 24 heures. Ensuite, deux profils différents sont obtenus selon l'espèce bactérienne. L'éponge a refiltré les bactéries de l'espèce *E. coli* quelques temps après jusqu'à leur disparition totale du milieu et de l'éponge au bout de 72 h. Concernant *V. aestuarianus*, la figure 3.29 - b montre une augmentation de la concentration bactérienne dans l'eau jusqu'à 72 heures et en parallèle une diminution de la concentration bactérienne dans l'éponge. L'éponge libère une partie des *V. aestuarianus* mais ne semble pas les refiltrer durant les heures qui suivent.

E) Discussion

Les éponges sont des animaux filtreurs pour qui les bactéries constituent une source majeure de nourriture (Milanese *et al*., 2003 ; Fu *et al*., 2006; Wehrl *et al*., 2007 ; Stabili *et al*., 2008). Milanese et son équipe (2003) ont rapporté que l'éponge marine *Chondrilla nucula* filtrait efficacement la bactérie *E. coli* à un taux de rétention de 7.10^6 *E. coli*/h/cm^3 d'éponges (en supposant que 1 cm^3 = 1 g d'éponge (Longo *et al.,* 2010)). Wehrl *et al.* (2007) ont démontré que l'éponge *Aplysina aerophoba* possédait une grande capacité de filtration des bactéries de l'environnement avec un taux de filtration de $2,76.10^6$ bactéries/h/g d'éponges. Nos résultats ont également démontré l'efficacité d'*H. perlevis* à retenir les bactéries *E. coli* et *V. aestuarianus*. En effet, des taux de rétention élevés de $5,89.10^9$ *E. coli*/h/g d'éponges et $6,66.10^9$ *V. aestuarianus*/h/g d'éponges ont été trouvés soit ici, deux ordres de grandeurs supérieurs.

Stabili *et al.* (2006) ont observé une diminution significative de la concentration bactérienne dans l'eau dès 40 min de filtration par l'éponge marine *Spongia officinalis* var *adriatica*. Milanese *et al.* (2003) ont observé une diminution de la concentration bactérienne dans l'eau à partir de 3 h de filtration par l'éponge *C. nucula*. Dans notre cas, l'efficacité de rétention bactérienne est restée nulle les premières heures et n'a augmenté seulement qu'à partir de la 4ème h, pour atteindre au final, après 6 h de filtration, un maximum de 36 % de rétention pour *E. coli* et 44 % de rétention pour *V. aestuarianus*. Ceci suggère qu'*H. perlevis* serait capable de réguler son activité de filtration entre une période de sevrage alimentaire

(3 jours dans notre cas contre 1 jour pour Stabili *et al*., 2006 et 2 jours pour Milanese *et al.*, 2003) et une phase d'apport excessif en bactérie, le temps de s'adapter à son nouvel environnement et même, de stopper la filtration en fonction des besoins physiologiques et comportementaux (Milanese *et al*., 2003 ; Stabili *et al.,* 2008). D'ailleurs, Fu *et al.* (2006) ont trouvé que l'éponge *H. perlevis* retenait et digérait les bactéries *E. coli* et *Vibrio anguillarum* mais que des taux élevés de pollution bactérienne (supérieurs à 10^{10} bactéries/ml) limitaient l'activité de bioremédiation.

Le taux de clairance conduit à une estimation du volume d'eau filtré par les éponges (Milanese *et al*., 2003). Dans notre étude, les taux de clairance calculés après 6 h de filtration (15,2 ml/h/g pour *E. coli* et 19,1 ml/h/g d'éponges pour *V. aestuarianus*) sont inférieurs à ceux trouvés par Fu *et al*. (2006) pour la même espèce, qui varient entre 30 et 70 ml/h/g d'éponges. Par contre, ils sont 10 fois plus élevés que ceux rapportés par Milanese *et al.*, (2003) pour l'éponge *C. nucula*, compris entre 0,2 et 1,3 ml/h/cm^3 d'éponges et nettement plus faibles que ceux calculés pour l'espèce *S. officinalis* soit 210 ml/h/g d'éponges sèches après 1 heure de filtration (Stabili *et al.,* 2006) ou pour l'espèce *Haliclona anonyma* soit 5660 ml/h/g d'éponges après 6 h de filtration (Stuart & Klumpp, 1984).
La comparaison des taux de clairance peut être difficile car ils varient suivant l'espèce et la taille des éponges, la taille des bactéries filtrées et la charge bactérienne et du temps de filtration. Les taux de clairance peuvent varier suivant la taille de l'animal utilisé lors des expérimentations (2 g pour Fu *et al*. (2006), 25 g pour Milanese *et al.* (2003)). Il a été suggéré que le taux de clairance diminue avec l'augmentation de la taille de l'animal avec comme hypothèse qu'une éponge de grande taille possède moins de chambres choanocytaires par unité de masse (Stabili *et al*., 2006). Le taux de clairance peut également varier suivant la taille des particules filtrées. Selon Stabili *et al.* (2006), les particules les plus grosses sont filtrées en premier suivi des particules les plus petites. Enfin, Fu *et al*. (2006) ont remarqué que le taux de clairance variait selon la charge bactérienne initiale. Lors de leurs expérimentations avec *H. perlevis*, *V. anguillarum* se divisait dans l'eau plus rapidement qu'il n'était filtré par l'éponge.

Les résultats obtenus lors des expériences de décontamination ont montré que les huîtres « contrôle » filtraient en plus grande quantité les bactéries de l'espèce *V.*

aestuarianus (9,9.10^4 *V. aestuarianus*/g de coquillage contre 1.10^2 *E. coli*/g de coquillage après 72 h de filtration). Les interactions bivalves-bactéries et les réponses immunitaires associées sont encore peu connues. Etant des filtreurs, les bivalves sont très exposés aux bactéries pathogènes ou opportunistes présentes dans le milieu marin. Ne possédant pas de système immunitaire adaptatif, les huîtres ont développé un système immunitaire cellulaire reposant sur des cellules de défense appelées hémocytes (Labreuche *et al.,* 2006b). Ces cellules sont responsables de réponses telles que l'inflammation, la cicatrisation et la phagocytose. Certaines bactéries appartenant principalement au genre *Vibrio* sont capables de persister dans les tissus et les fluides des huîtres (Labreuche *et al.,* 2006b). Particulièrement, *V. aestuarianus* est associé aux mortalités estivales chez *C. gigas* (Le Roux *et al*., 2002 ; Garnier *et al*,. 2008 ; Saulnier *et al*., 2009). Cette bactérie a développé des stratégies de pathogénicité pour contourner les mécanismes de défenses des huîtres. Des études ont montré que *V. aestuarianus* sécrétait des produits extracellulaires inhibant la phagocytose et favorisant leur adhérence aux tissus des huîtres (Labreuche *et al.,* 2006a et b).

Les expériences de décontamination que nous avons menées ont également montré une grande efficacité de l'éponge à diminuer la concentration bactérienne dans le milieu et à préserver les huîtres d'une contamination bactérienne. La décontamination semblait plus rapide pour *V. aestuarianus* puisqu'en à peine 2 heures, une différence significative a été observée entre les aquariums de contrôle et ceux contenant les éponges (figure 3.25 et figure 3.26). En revanche, les éponges semblaient retenir les bactéries *E. coli* en plus grande proportion puisqu'une diminution dans les huîtres de 98,5 % pour *E. coli* contre 89,43 % pour *V. aestuarianus* a été obtenue.

Dans toutes les études précédentes mettant en avant les propriétés de filtration des éponges (Milanese *et al*., 2003 ; Fu *et al*., 2006; Stabili *et al.,* 2008 ; Longo *et al*., 2010), le risque d'une libération de bactéries et d'une recontamination du milieu n'avait jamais été évalué. Après un transfert de l'éponge en eau stérile, des bactéries *E. coli* et *V. aestuarianus* ont été libérées dans le milieu. Cette libération peut être liée à un affaissement de l'éponge sur elle-même lors de la sortie de l'eau et/ou à la capacité de régulation de l'activité de filtration de l'éponge qui lors du transfert va se retrouver hors de l'eau et donc arrêter son

activité de filtration. Lorsqu'elle se retrouve dans l'eau, elle pourrait dans un premier temps expulser l'eau gardée dans ses canaux aquifères et dans les chambres choanocytaires avant de reprendre une activité de filtration.

Nos résultats ont montré qu'après 48 h dans l'eau stérile, les bactéries *E. coli* libérées dans l'eau disparaissent du milieu. Cette disparition peut être due soit à une filtration des bactéries puis à une phagocytose par l'éponge elle-même, soit à une mortalité naturelle des bactéries. Au contraire pour *V. aestuarianus*, l'éponge n'a pas refiltré les bactéries libérées. Elle semble avoir mis en place un processus de « rinçage » pour se débarrasser d'une partie des *V. aestuarianus*.

3.2.3. Le plomb

La présence du plomb dans l'eau est un élément déterminant pour la qualité de l'eau de mer et la classification des parcs conchylicoles. Lors de travaux précédents, nous avons démontré la présence de teneurs en plomb de 6,8 mg/kg poids sec dans les éponges de l'espèce *H. perlevis* prélevées sur le littoral (Gentric *et al.,* 2016). Dans l'objectif d'étudier les capacités de bioaccumulation du plomb par *H. perlevis*, dans le cadre d'une stratégie de bioremédiation, différentes expérimentations dans des aquariums contaminés au plomb sont réalisées.

A) <u>Toxicité du plomb vis-à-vis de l'éponge *H. perlevis*</u>

Afin de travailler avec des concentrations en plomb non létales pour l'éponge *H. perlevis*, des tests de toxicités sont réalisés ; notre objectif étant d'identifier les effets du plomb sur les capacités de filtration des éponges sans pour autant tuer les animaux. La figure 3.30 montre donc l'effet d'une exposition aigüe à différentes concentrations en plomb sur la viabilité des éponges pendant 7 jours.

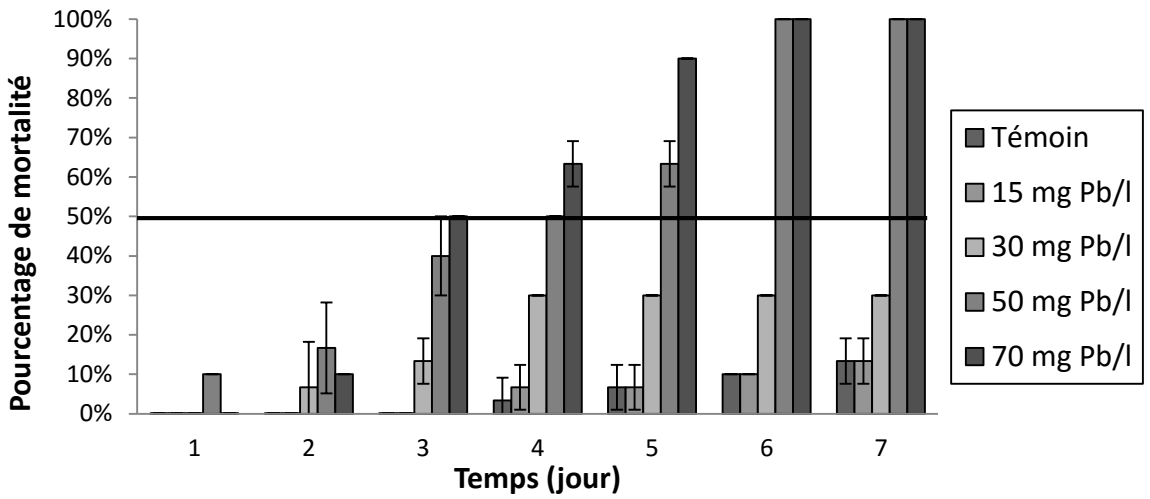


Figure 3.30. Effet du plomb sur la mortalité de l'éponge *Hymeniacidon perlevis* exposée durant 7 jours à une gamme de concentrations en plomb dissous.

Deux concentrations en plomb montrent une forte toxicité sur *H. perlevis*. En effet, après 4 jours d'exposition de l'éponge à des concentrations de 50 et 70 mg Pb/l, 50 % des individus sont morts. De plus, pour une concentration de 30 mg/l, 30 % de mortalité est observée. En revanche, pour une concentration de 15 mg/l, il n'y a aucune toxicité significative par rapport au témoin (p-value > 0,05).

B) <u>Filtration de l'eau après une contamination au plomb</u>

Enfin d'étudier l'influence du plomb sur l'activité flagellaire des éponges, ces dernières sont placées dans des aquariums contaminés au plomb pendant 2 heures avant d'être remises dans des aquariums d'EDMA exempte de plomb.

De la fluorescéine est alors déposée goutte à goutte à la base des éponges. Visuellement, une différence nette est observée au bout de 30 minutes entre l'aquarium contenant l'éponge témoin n'ayant pas été mise en contact avec du plomb (figure 3.31 - A) et les éponges ayant été mises en contact avec du plomb (figure 3.31 - B et C), respectivement à 15 et 30 mg/l.

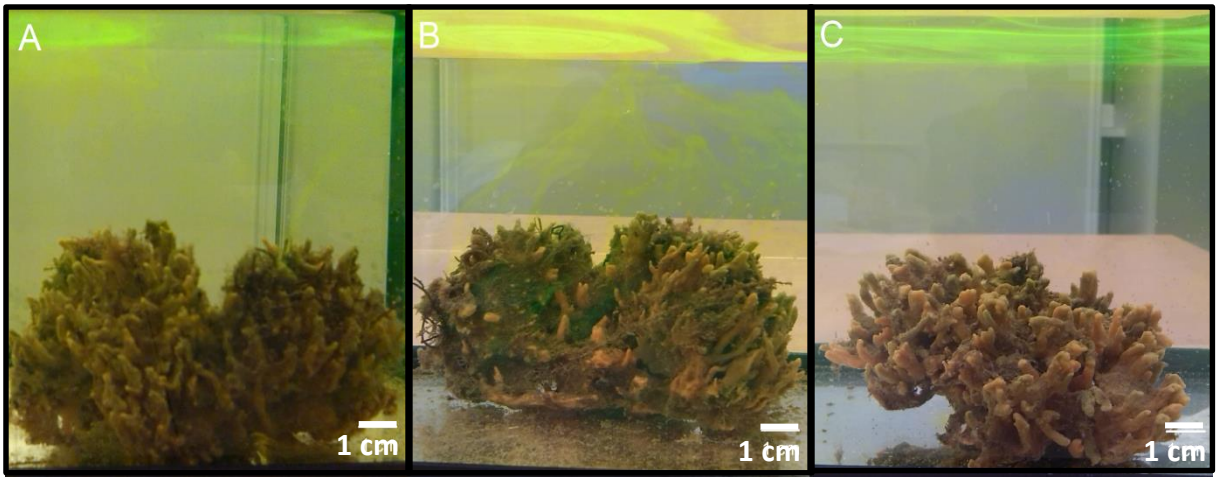


Figure 3.31. Photographies, après dépôt de la fluorescéine, des aquariums contenant une éponge n'ayant pas été en contact avec le plomb (A) une éponge ayant été en contact avec une concentration en plomb de 15 mg/l (B) et une éponge ayant été en contact avec une concentration en plomb de 30 mg/l (C).

Dans le premier cas (témoin - 3.31 - A), la fluorescéine est bien mélangée à l'eau de l'aquarium possiblement grâce à la filtration et au brassage de l'eau par l'éponge. Dans le second cas (15 mg Pb/l - 3.31 - B), la fluorescéine est moins bien mélangée à l'eau. Une grande quantité est remontée à la surface de l'aquarium. Et enfin, dans le troisième cas (30 mg Pb/l - 3.31 - C), l'éponge ne semble plus filtrer l'eau, cela entraine une stagnation de toute la fluorescéine à la surface de l'eau.

Pendant cette première expérimentation, plusieurs échantillons d'eau sont prélevés au-dessus des ramifications des éponges toutes les 5 minutes pendant 30 min. La figure 3.32 montre une différence significative d'intensité de fluorescence entre le témoin et les éponges mises en contact avec le plomb (p-value < 0,05) mais également entre les éponges mises en contact avec une concentration de 15 mg Pb/l et celles mises en contact avec une concentration de 30 mg Pb/l (p-value < 0,05).

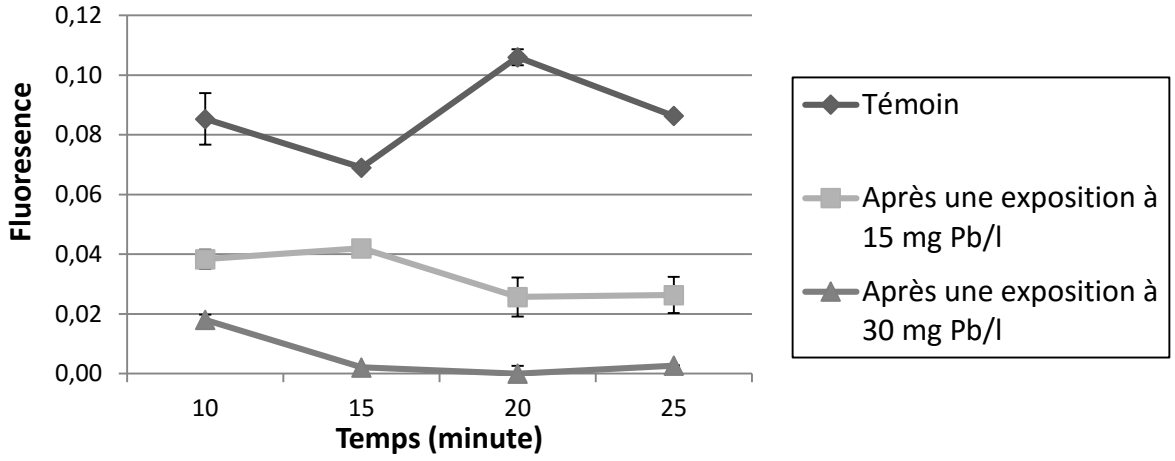


Figure 3.32. Fluorescence mesurée au-dessus des ramifications d'*Hymeniacidon perlevis* après 2 h d'exposition au plomb aux concentrations de 15 et 30 mg/l.

Les résultats obtenus suggèrent que le plomb peut influencer l'activité flagellaire de l'éponge. La fluorescence au-dessus des ramifications est plus faible (- 55 % en moyenne) lorsque les éponges sont exposées à une contamination de 15 mg Pb/l (p-value < 0,05), ce qui suggère une diminution de l'activité de filtration de l'eau par les éponges. En revanche, la fluorescence est quasi nulle au-dessus de l'éponge pour une concentration de 30 mg Pb/l. Par la suite, les éponges sont récupérées puis immergées 2 heures dans de l'EDMA ne contenant pas de plomb afin de l'éliminer de l'éponge. Une nouvelle expérimentation à la fluorescéine est alors menée et la fluorescence est à nouveau mesurée (figure 3.33).

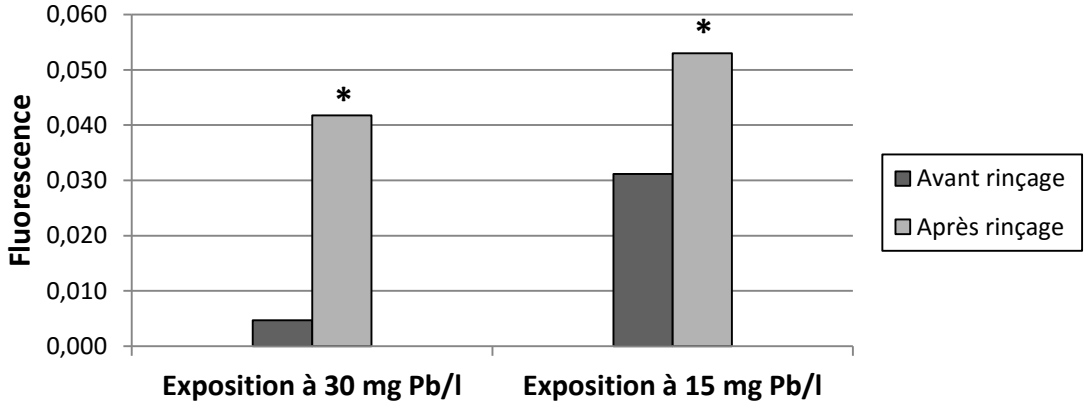


Figure 3.33. Comparaison des capacités d'*Hymeniacidon perlevis* à filtrer l'eau après une contamination de 2 h au plomb (avant rinçage) et après une contamination de 2 h au plomb suivi d'une passage de 2 h en EDMA exempte de plomb (après rinçage). *, p-value < 0,05.

Les résultats montrent qu'après 2 heures en EDMA exempte de plomb, l'éponge récupère une activité flagellaire. En effet, la fluorescence augmente jusqu'à 0,04 pour une concentration de 30 mg Pb/l et jusqu'à 0,05 pour une concentration de 15 mg/l. Toutefois, elle reste tout de même significativement inférieure (p-value < 0,05) à celle du témoin qui est en moyenne de 0,08 (2 fois moindre environ) (figure 3.33).

C) Capacité de rétention du plomb

Les capacités de filtration de l'eau et de rétention du plomb dissous par *H. perlevis* sont déterminées grâce à un test de clairance. Pour évaluer *in vitro* le volume d'eau filtré par les éponges en présence de plomb, en fonction du temps, la concentration en plomb dissous dans l'eau est mesurée (figure 3.34).

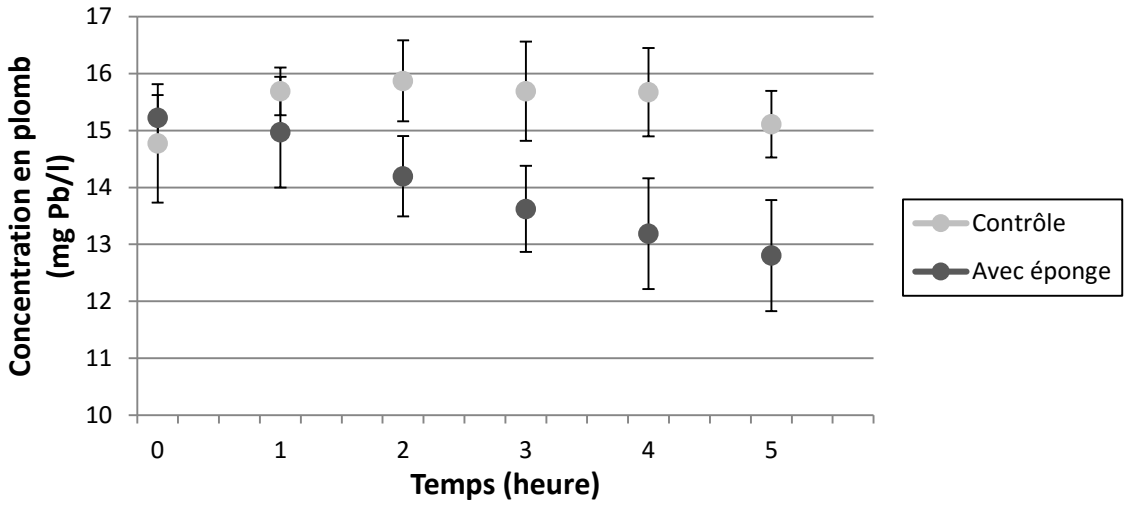


Figure 3.34. Concentration en plomb dans des aquariums d'eaux contaminées en fonction du temps en présence de l'éponge *Hymeniacidon perlevis* (25 g) (moyenne ± écart-type).

La concentration moyenne en plomb dans le contrôle est de 15,47 mg/l. En présence d'éponge, la concentration en plomb diminue avec le temps jusqu'à atteindre une valeur moyenne de 12,8 mg/l, en 5 h, significativement différente du contrôle (p-value < 0,05), ce

qui correspond à une réduction moyenne mesurée de 0,53 mg Pb/l/h soit à une rétention de 0,08 mg Pb/h/g d'éponge.

Ces données permettent ensuite de calculer l'efficacité de rétention du plomb par *H. perlevis* (figure 3.35). L'efficacité de rétention est ici définie comme la capacité d'*H. perlevis* à retenir le plomb dissous dans l'eau circulant à travers l'éponge.

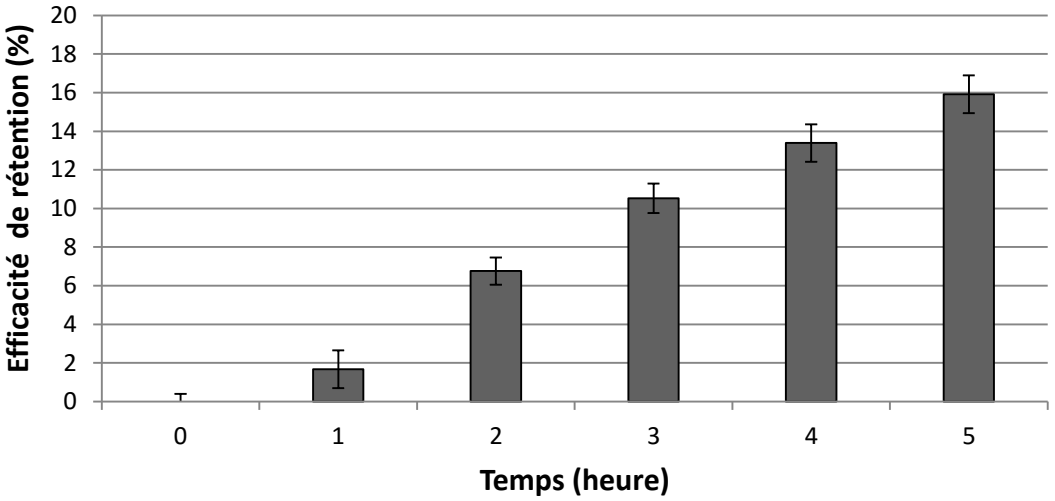


Figure 3.35. Efficacité de rétention du plomb par l'éponge *Hymeniacidon perlevis* en fonction du temps.

L'efficacité de rétention du plomb par l'éponge exprimée en pourcentage (figure 3.35) augmente en fonction du temps et est en moyenne de 8,04 %.

Enfin, selon Milanese *et al*., 2003, le taux de clairance est la variation du taux de filtration du plomb dissous dans l'eau par l'éponge en fonction du temps. Le taux de clairance est déduit des résultats précédents et présenté dans la figure 3.36 ci-dessous.

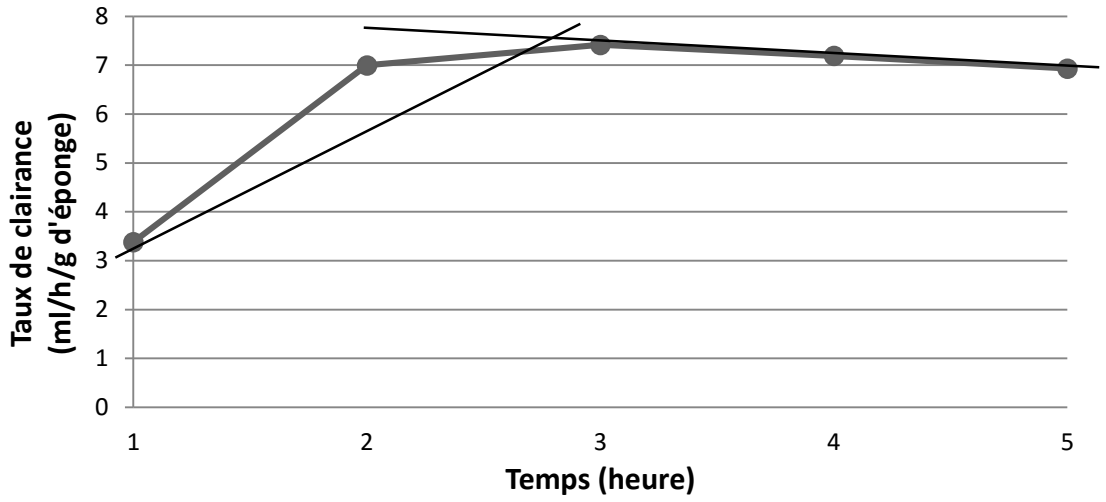


Figure 3.36. Taux de clairance du plomb par l'éponge *Hymeniacidon perlevis* en fonction du temps.

Le taux de clairance augmente jusqu'à un maximum de 7,41 ml/h/g d'éponge à 3 h (figure 3.36). La régression linéaire présente une pente positive (a = 2,02) ce qui suggère une augmentation de l'activité de filtration en fonction du temps les 3 premières heures. Par la suite, le taux de clairance atteint un plateau ce qui suggère une stabilisation du débit de filtration de l'éponge. Ces résultats correspondent à un taux de clairance moyen de 6,38 ml/h/g d'éponge.

D) <u>Bioaccumulation du plomb par les éponges</u>

La figure 3.37 montre les concentrations en plomb dans les éponges lorsqu'elles sont confrontées, d'une part à une contamination aigue (1 dose de plomb au début de l'expérience) et d'autre part à une contamination aigue cumulée (1 dose de plomb par jour tout au long de l'expérience). Aucune mortalité n'est observée durant les expérimentations.

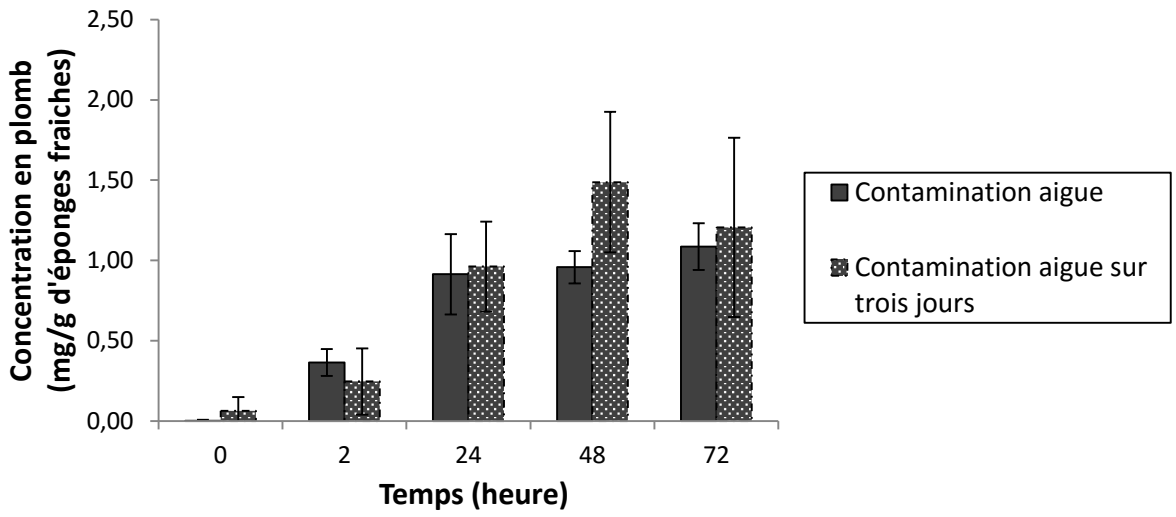


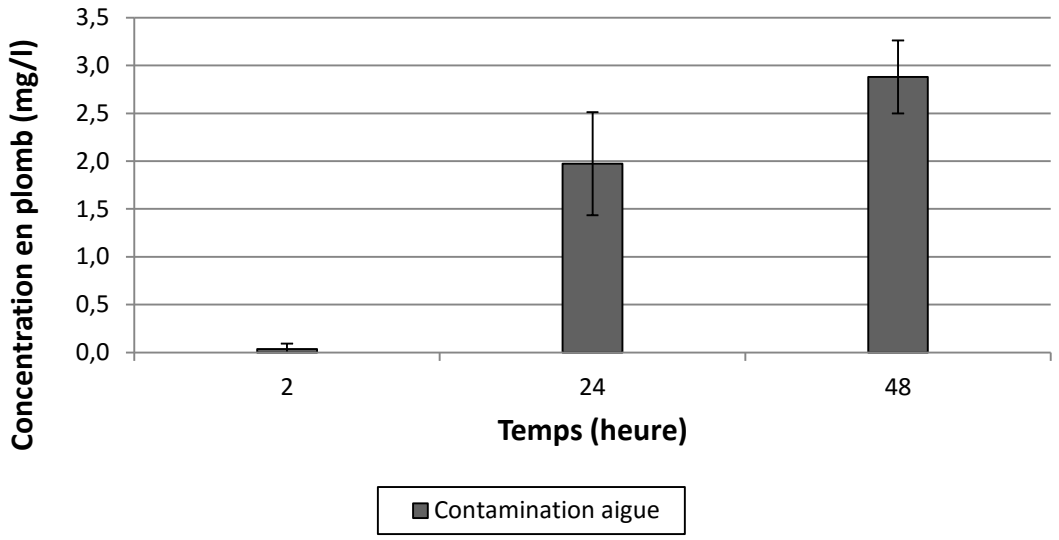
Figure 3.37. Concentration en plomb dans les éponges (75 g) après une exposition au plomb lors d'une contamination aigue (15 mg Pb/l) ou d'une contamination aigue cumulée (15 mg Pb/l/jour pendant 3 jours).

La figure 3.37 montre une augmentation de la concentration en plomb dans l'éponge en fonction du temps. A 72 h, 1,09 mg Pb/g d'éponges soit 99 % du plomb inoculé dans les aquariums sont retrouvés dans les éponges dans le cas d'une contamination aigue et 1,21 mg Pb/g d'éponges soit 40 % du plomb inoculé pour une contamination aigue cumulée. Toutefois, les résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre les quantités en plomb retrouvées dans les éponges quelle que soit la fréquence de contamination (p-value > 0,05). Dans les deux cas, la concentration en plomb dans les éponges augmente fortement les premières 24 h puis se stabilise par la suite autour de 1 mg Pb/g d'éponges en moyenne. Cela suggère, qu'à partir de 24 h, il y aurait une atteinte physiologique ou une saturation de l'éponge qui se trouve dans l'incapacité de retenir une plus grande quantité de plomb.

E) <u>Libération du plomb dans l'eau</u>

Après 72 heures passées dans une eau contaminée au plomb, les éponges sont transférées dans un bac d'EDMA exempte de plomb. Des prélèvements d'eau sont alors effectués à 2, 24 et 48 h afin de voir si les éponges libèrent du plomb dans l'eau (figure 3.38).

a)



b)

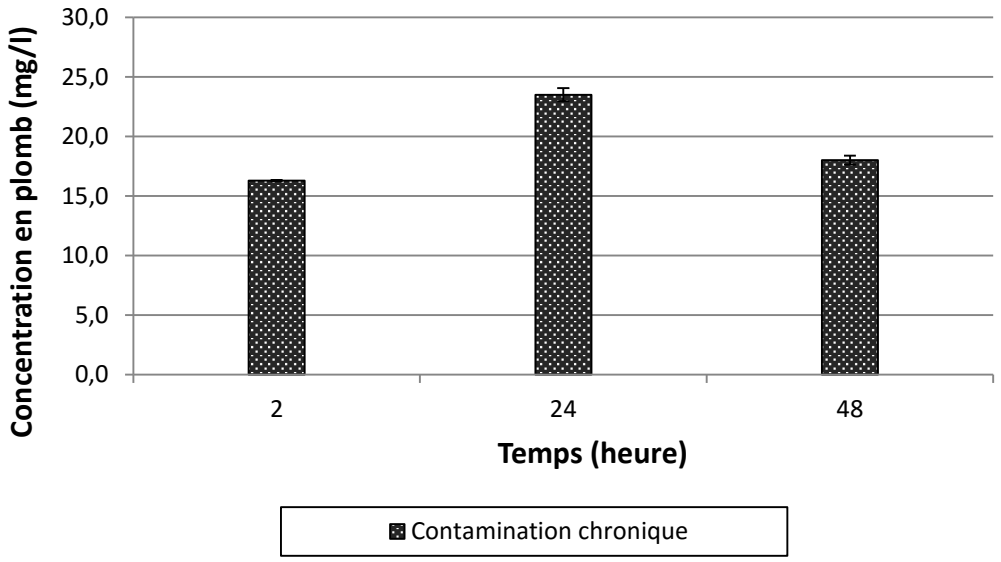


Figure 3.38. Concentration en plomb dans l'EDMA des aquariums (5 l) après transfert d'éponges contaminées (75 g) a) de façon aigue par 15 mg Pb/l et b) de façon aigue sur trois jours par 15 mg Pb/l/j.

Les analyses montrent qu'une partie du plomb retenue par l'éponge est libérée lorsque celle-ci est transférée dans des aquariums d'EDMA exempte de plomb. Après une contamination aigue, l'éponge va libérer du plomb chaque jour jusqu'à atteindre un maximum de 2,88 mg de plomb/l au bout de 48 h soit 19,2 % du plomb retenu initialement par l'éponge (en moyenne 1 mg/g d'éponge à 72 h, figure 4.21). Après une contamination aigue cumulée, 2 heures seulement après le transfert en eau exempte de plomb, 18,05 mg/l de plomb sont retrouvés dans l'eau soit la totalité du plomb retenu par les éponges.

F) Expérience de décontamination en présence d'huîtres

La mesure des efficacités de rétention montre qu'*H. perlevis* possède la capacité de retenir le plomb dissous dans une eau contaminée. Ces résultats amènent à démontrer l'efficacité d'*H. perlevis* pour éliminer le plomb afin d'empêcher une contamination des huîtres.

Pour évaluer une décontamination vis-à-vis du plomb, la concentration en plomb est quantifiée dans les huîtres seules (contrôle) ou dans les huîtres en présence d'*H. perlevis* (figure 3.39).

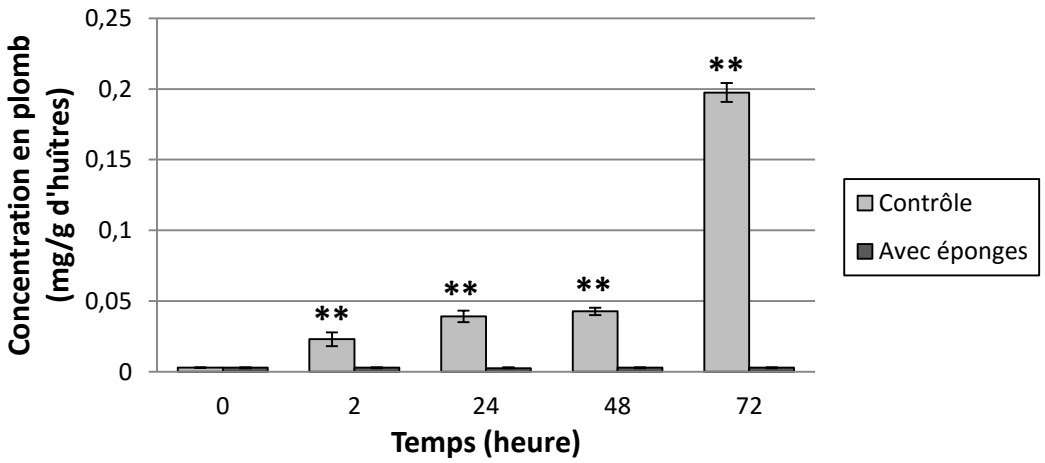


Figure 3.39. Concentration en plomb dans les huîtres en présence ou non de l'éponge *Hymeniacidon perlevis* (75 g). **, p < 0,01.

La figure 3.39 montre une augmentation de la concentration en plomb dans les huîtres « contrôle » avec un maximum de 0,20 mg Pb/g d'huîtres. En présence d'éponge, la concentration en plomb dans les huîtres reste négligeable. Durant les expérimentations, les huîtres étaient régulièrement ouvertes ce qui suggèrent qu'elles ont bien filtré l'eau des aquariums.

En parallèle, la concentration en plomb est également déterminée dans les éponges en présence d'huîtres (figure 3.40).

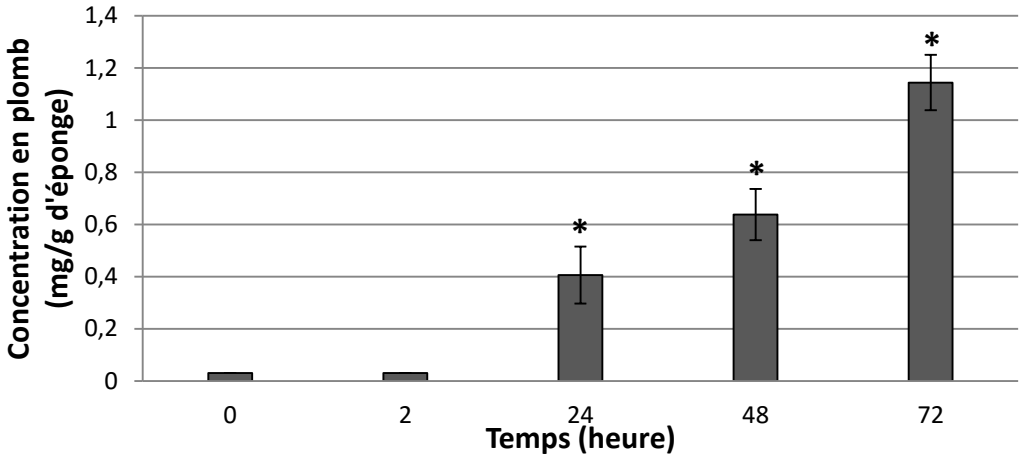


Figure 3.40. Concentration en plomb dans les éponges lors des tests de décontamination du plomb vis-à-vis des huîtres. *, p < 0,05.

Une nette augmentation de la concentration en plomb dans l'éponge est observée en fonction du temps, jusqu'à atteindre un maximum de 1,14 mg Pb/g d'éponge. Durant les expérimentations, les éponges ont donc retenu le plomb dissous dans l'eau mais à des valeurs plus faibles que celles obenues sans les huîtres (figure 3.37) à 24 et 48 h.

G) Discussion

Les éponges filtrent de grands volumes d'eau et il est communément admis qu'elles sont aussi capables d'accumuler les éléments traces métalliques (Genta-Jouve *et al.,* 2012).

In situ, les quantités d'éléments traces métalliques trouvés dans les éponges dépendent des concentrations environnementales. Des concentrations en métaux allant jusqu'à 0,015 mg Pb/g d'éponge (masse sèche), 0,001 mg Cu/g d'éponge et 1.10^{-4} mg Cd/g d'éponge ont été retrouvées dans des éponges de l'espèce *S. officinalis* collectées en Mer Méditerranée (Perez *et al.,* 2006). Dans d'autres éponges de l'espèce *S. officinalis* collectées cette fois-ci en Australie, des concentrations en métaux de 0,002 mg Pb/g d'éponge (masse sèche), 1.10^{-4} mg Cu/g d'éponge et 0,007 mg Cd/g d'éponge ont été retrouvés (De Mestre *et al*., 2012).
Les niveaux étonnamment élevés d'éléments traces métalliques dans les éponges en font des sujets d'études particulièrement intéressants pour la bioremédiation. Notamment, *H. perlevis* est connue pour bioaccumuler les éléments traces métalliques environnementaux comme le plomb à des taux plus importants que ceux d'autres spongiaires (Gentric *et al*., 2016). *In* vitro, plusieurs publications ont montré que les capacités de filtration et d'accumulation variaient fortement suivant les espèces d'éponge et les métaux étudiés (Genta-Jouve *et al.,* 2012 ; Hansen *et al.*, 1995).

Les travaux réalisés *in vitro* au cours de ce travail ont confirmé qu'*H. perlevis* était capable de retenir le plomb dissous dans l'eau avec un taux de filtration de 0,081 mg Pb/h/g d'éponge à des teneurs de l'ordre de 1,25 mg Pb/g d'éponge. Cette valeur est 180 fois plus élevée que celle retrouvée dans *H. perlevis* en rivière d'Etel (Gentric *et al*., 2016) mais s'explique par les valeurs élevées de plomb dissous inoculés *in vitro*. De plus, le plomb semble avoir un effet sur l'activité flagellaire de l'éponge. En effet, les résultats des expériences à la fluorescéine ont montré une diminution de l'activité flagellaire des éponges en présence de plomb (15 mg/l). Cette diminution était tout de même réversible. Les éponges ont partiellement récupéré leur capacité de filtration après un passage en eau exempte de plomb. On peut alors se poser la question si ces résultats reflètent une réponse au stress de l'éponge qui va alors, semble-t-il, diminuer son débit de filtration pour se préserver de la toxicité du plomb ou alors si le plomb à un effet toxique sur les flagelles empêchant alors la filtration de l'eau par l'éponge. Certains auteurs ont suggéré que les éponges étaient capables de réguler leur débit de filtration et même de stopper la filtration selon des besoins physiologiques ou comportementaux (Hansen *et al.*, 1995 ; Simpson, 1984). Ceux-ci suggéraient qu'*H. perlevis* était capable de réguler son activité de filtration lorsqu'elle se retrouvait dans un environnement pollué. Toutefois, Olesen et Weeks (1994)

ont découvert qu'une exposition de quelques heures à de faibles concentrations en cadmium provoquait une diminution du débit de filtration d'*Halichondria panicea* mais que cette diminution était temporaire et que les éponges récupéraient leur capacité après un transfert en eau dépourvue de cadmium. En revanche, après une exposition à de fortes concentrations en cadmium, les éponges étaient incapables de récupérer leur capacité de filtration et finissaient par mourir. Les auteurs en ont conclu que le cadmium avait un effet toxique sur les choanocytes entrainant une altération de l'activité flagellaire (Olesen & Weeks, 1994). En cas de pollution importante, l'éponge ne semble donc pas mettre en place un mécanisme de régulation de l'activité flagellaire mais plutôt de subir les conséquences de la présence du plomb.

Nos résultats ont également montré qu'*H. perlevis* libérait dans l'eau 19,2 % du plomb préalablement retenu dans le cadre d'une contamination aigüe et 100 % du plomb retenu dans le cadre d'une contamination chronique après transfert en eau exempte de plomb. Hansen *et al*. (1995) ont montré, chez *H. panicea*, une baisse de la concentration des métaux bioaccumulés (cuivre, zinc, cadmium et chrome) dans l'éponge après un transfert en eau propre. Ils en ont déduit que l'éponge libérait dans l'eau les métaux non liés de manière intracellulaire via un processus simple de rinçage. L'eau exempte de plomb remplaçait alors l'eau contaminée qui était restée piégée dans les canaux aquifères et dans les chambres choanocytaires lorsque l'éponge renouvelle son eau.

Les expériences de décontaminations en présence des huîtres ont montré une réelle efficacité de l'éponge à diminuer la teneur en plomb dans les huîtres lorsque celles-ci se trouvaient à proximité d'éponges. En effet, après 72 h de filtration, la teneur en plomb dans les huîtres « contrôle » était de 0,19 mg Pb/g d'huîtres contre 0,015 mg Pb/g d'huîtres en présence d'éponges.

3.2.4. Le virus OsHV-1

Les expérimentations suivantes sont réalisées dans le cadre d'une collaboration entre l'IFREMER et le LBCM et visent à prévenir la contamination des huîtres par le virus OsHV-1

grâce aux propriétés de filtration des éponges. A notre connaissance, aucune expérience de ce type n'avait été réalisée jusqu'à présent.

A) Introduction aux expérimentations

Avant les expérimentations, une quantification de l'ADN viral est réalisée sur un lot de douze huitres ainsi que dans des éponges fraichement collectées. Aucun ADN viral n'est détecté.

Afin de vérifier la virulence de la solution virale, un test est réalisé sur un lot d'une douzaine d'huîtres. Après 48 h d'infection, une mortalité de 60 % est observée dans le lot expérimentalement infecté par OsHV-1. Après 60 h d'infection, 100 % de mortalité pour les huîtres infectées.

B) huîtres infectées sans éponge

Dans des bacs d'EDMA sont placées des huîtres expérimentalement infectées sans éponges. Les huîtres sont moribondes c'est-à-dire qu'elles n'ont plus la capacité de se refermer. A 96 h, $1,47.10^6$ copies d'ADN viral pour 5 ng d'ADN sont retrouvées dans les huîtres.

C) huîtres saines plus éponges

Dans des bacs d'EDMA sont placées des huîtres saines avec des éponges *H. perlevis*. L'ADN viral est alors quantifié chez les animaux. Les huîtres et les éponges doivent normalement être exemptes d'ADN viral. Toutefois, les résultats donnés par la figure 3.41 montrent qu'une quantité d'ADN viral est retrouvée dans les éponges soit en moyenne, sur 96 h, 0,598 copies d'ADN viral pour 5 ng d'ADN.

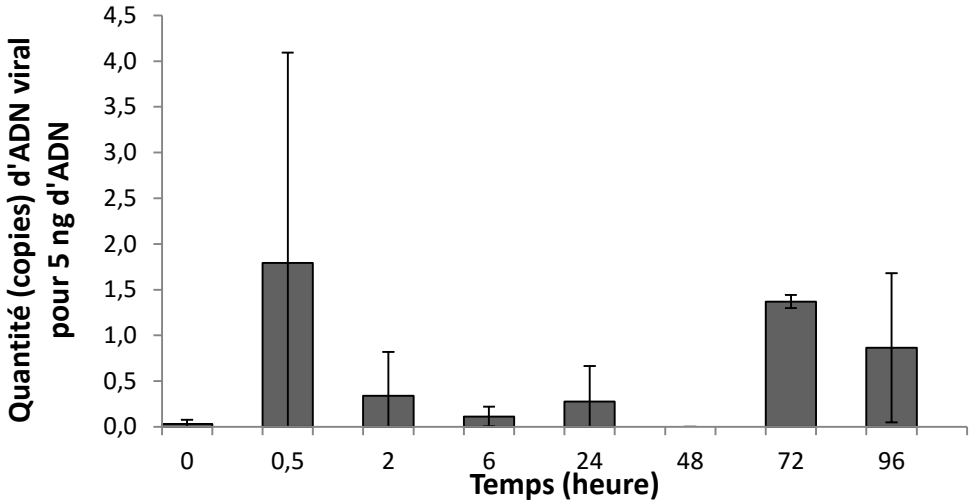


Figure 3.41. Suivi dans le temps de la quantité d'ADN viral dans les éponges en présence d'huîtres saines.

Les résultats obtenus après Q-PCR ont montré la présence d'ADN viral dans les tissus d'huîtres à 96 h (en moyenne 17,15 copies d'ADN viral). Cependant, les huîtres n'ont pas montré de mortalité durant les expérimentations, la quantité de virus dans les éponges et les huîtres étant très faible.

D) <u>huîtres infectées plus éponges</u>

Dans des bacs d'EDMA sont placées des huîtres expérimentalement infectées et considérées comme moribondes, avec des éponges de l'espèce *H. perlevis*. Les premières quantifications d'ADN viral sont réalisées sur les huîtres à 96 h. La Q-PCR a donné une quantité moyenne de 1.10^6 copies d'ADN viral dans 5 ng d'ADN. Par la suite, l'ADN viral est quantifié dans les éponges (figure 3.42).

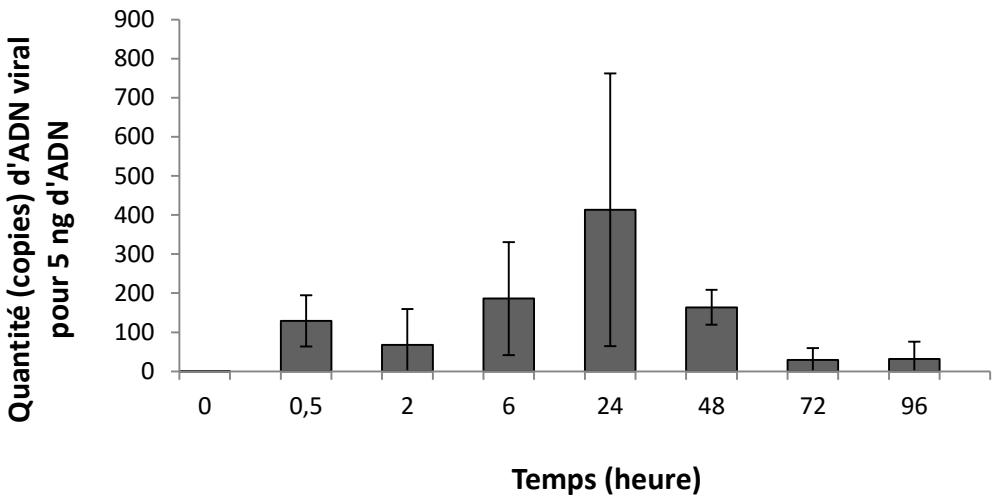


Figure 3.42. Suivi dans le temps de la quantité d'ADN viral dans les éponges en présence d'huîtres moribondes.

D'après la figure 3.42, de l'ADN viral est retrouvé dans les tissus des éponges mises en contact avec des huîtres moribondes. Les éponges sont donc capables de retenir le virus.

E) Discussion

Ces résultats préliminaires montrent que les éponges sont capables de retenir les particules virales. En revanche, ils ne permettent pas de montrer si l'éponge est capable ou non de dégrader le virus. En effet, la technique PCR utilisée ici ne permet pas de différencier l'ADN d'un virus entier avec sa capside ou l'ADN d'un virus dégradé. Le protocole de PCR pourrait être amélioré en utilisant des amorces spécifiques des gènes de la capside virale d'OsHV-1. Cette diminution serait due à la disparition du virus soit parce qu'il serait digéré par l'éponge soit parce que l'ADN viral se serait dégradé dans l'eau de mer avec le temps.

D'autres analyses peuvent également être réalisées pour vérifier si l'ADN viral détecté provient de virus phagocytés et digérés par l'éponge et ne passe pas seulement dans les oscules avec l'eau de mer. La microscopie électronique à transmission permettrait d'observer et de localiser le virus à l'intérieur de l'éponge. Régulièrement utilisée avant le développement de la PCR, cette technique a permis de révéler la présence de particules

virales chez les huîtres moribondes après fixation du manteau des huîtres dans le glutaraldéhyde (Renault *et al*, 1994).

De l'ADN viral est détecté dans les éponges n'ayant pas été en contact avec des huîtres infectées. Cette contamination peut être due soit à une contamination naturelle des éponges non détectée avant les expérimentations soit à une erreur de manipulation ayant entrainé un transfert de virus par projections d'eau contaminées d'un bac à un autre à cause d'un bullage trop fort ou d'une distance insuffisante entre les bacs. Le protocole doit être réajusté. Les éponges pourraient par exemple être placées dans une autre pièce que les huîtres infectées ce qui n'a pas été le cas au cours de nos expérimentations en raison de l'indisponibilité d'une autre pièce.

Dans une prochaine étude, des expériences de décontaminations vis-à-vis des huîtres par les éponges pourront être menées. Ainsi, des huîtres moribondes seront mises en contact avec des huîtres saines en présence d'éponges. Le taux de mortalité des huîtres sera déterminé et la quantité d'ADN virale dans les huîtres et dans les éponges pourra être quantifiée.

3.2.5. Conclusion du chapitre

Dans ce chapitre, nous avons montré qu'*H. perlevis* tolérait des niveaux élevés de contaminants et possédait la capacité de retenir et d'accumuler divers polluants (bactéries, virus, éléments traces métalliques). L'idée d'utiliser *H. perlevis* pour améliorer la qualité de l'eau des parcs conchylicoles serait attrayante puisque les résultats des expériences de décontamination montrent qu'*H. perlevis* a un bon potentiel pour servir de bioremédiateur dans un système d'aquaculture intégrée. La co-culture permet une relation symbiotique entre les éponges et les coquillages et engendre des avantages mutuels. De plus, la valeur commerciale de cette éponge réside dans l'extraction des métabolites secondaires à des fins pharmaceutique ou biotechnologique. Toutefois avant de transférer *in situ* les résultats obtenus en laboratoire, il faut s'assurer de plusieurs points notamment l'efficacité d'un tel système dans le temps ainsi que de sa faisabilité économique.

IV. Valorisation des travaux : projet de création d'entreprise

4. Valorisation des travaux : projet de création d'entreprise

Sommaire du chapitre

4.1. Introduction **136**

4.2. Le service proposé **137**
A) Les éponges marines et leur culture 137
B) Epuration de l'eau 138
C) Recyclage des éponges 140
D) Description du procédé 140

4.3. Le marché visé **142**
A) Identification du marché 142
B) Les clients potentiels 143
C) Les moyens de lutte anti-pollution déjà existants 145
D) Les partenaires financiers potentiels 146
E) La concurrence directe 146

4.4. La mise en œuvre opérationnelle **147**
A) Le positionnement de LECOMER par rapport au marché international 147
B) La stratégie commerciale 149
C) Mes besoins au démarrage 149

4.5. L'état d'avancement du projet **149**
A) Les démarches administratives 149
B) Les démarches de recherche de financement 150
C) Les étapes du développement 150

4.6. Conclusion du chapitre **152**

4.1. Introduction

L'objectif de ce chapitre vise à présenter le projet de création de l'entreprise LECOMER issu des résultats des travaux menés durant cette thèse. Le transfert de technologie a consisté à formaliser les travaux sous forme de brevet et à transformer la recherche en innovation industrielle en tenant compte des aspects techniques, humains, économiques et juridiques qu'impose le développement d'une entreprise.

La valorisation a débuté par une participation au concours Start-UBS 2014 proposé par l'Université de Bretagne Sud à l'issu duquel le projet LECOMER a terminé lauréat. Ce programme est une initiative en trois phases sélectives. Une première phase avec un séminaire de 2 jours permettant de maîtriser les différentes étapes de la création. Une seconde phase de 2 journées chez PEGASUS LEADERSHIP basé à l'ancienne base des sous-marins de Lorient. Cette entreprise propose des conseils qui s'appuient sur une expertise dans l'accompagnement d'équipes issue d'une longue pratique opérationnelle dans les Forces Spéciales de la Marine. L'objectif est de développer le potentiel entrepreneurial en anticipant les situations délicates, en s'adaptant aux imprévus et en cultivant l'esprit d'audace (descente en rappel, course d'orientation, nage en mer...). Et enfin, un coaching personnalisé sur 9 mois avec des spécialistes de la création d'entreprises et une formation en protection intellectuelle, en marketing et en management d'équipes. Par la suite, LECOMER a été sélectionné pour Les Trophées de l'Innovation du Morbihan 2014 où il a été élu lauréat « coup de cœur du jury » et pour le prix AEF 2015 « Quand les docteurs créent de la valeur » où le projet fut finaliste.

Dans ce chapitre est décrit le Business Plan (BP) présenté lors des différents concours. Le BP est un dossier détaillant les composants clé du projet et est un outil de communication qui sert à convaincre les potentiels partenaires (financeurs, associés...) de la viabilité du projet.

4.2. Le service proposé

Les zones Natura 2000 mais aussi les territoires de pêche, les parcs conchylicoles et les eaux de baignades sont autant d'espaces vulnérables qui suscitent l'attention de tous pour le bien de tous.

A) <u>Les éponges marines et leur culture</u>

L'invention consiste à développer la culture d'éponges marines sur le littoral afin de les utiliser pour épurer l'eau de mer et ainsi améliorer la qualité de l'eau. Techniquement, la culture d'éponges demande un savoir-faire car maintenir les animaux en vie nécessite des compétences en biologie, chimie des eaux et biotechnologie marines. Une culture de départ de 1 an sera réalisée en bassin fermé (figure 4.1) sur le littoral pour démarrer une production d'éponges. Une agitation régulière grâce à une roue à aube permettra un brassage de l'eau (vitesse : 20 cm/sec). Quotidiennement, les paramètres physico-chimiques de l'eau seront vérifiés (température, salinité). Naturellement, ces animaux marins vivent fixés sur des supports comme les rochers, les algues, les carapaces de crabes et les coquillages ou enfouis dans la vase et le sable. En captivité, les cultures seront réalisées sur des supports en biomatériaux renforcés par des fibres naturelles permettant une bonne adhérence des animaux et ainsi leur développement. L'eau des bassins sera renouvelée toutes les semaines avec de l'eau de mer.

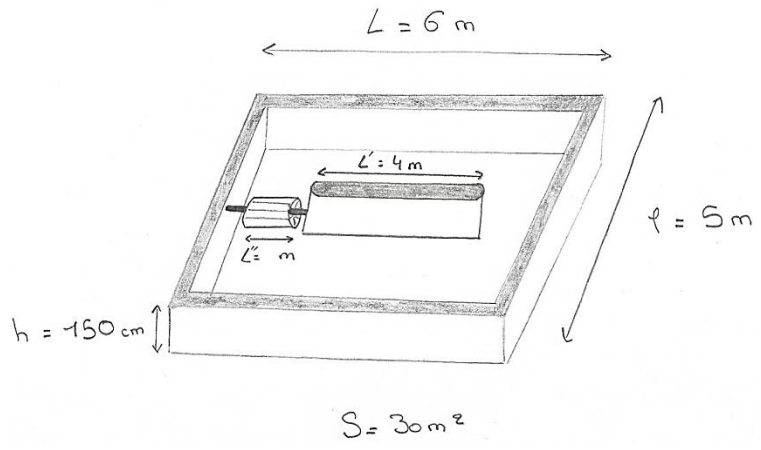


Figure 4.1. Schéma du bassin en béton avec chicane centrale servant à la culture des greffons d'éponges. Une roue à aubes permet une agitation de l'eau (20 cm/sec).

Le bassin sera composé :

- d'une dalle en béton d'une surface de 30 m² pour une épaisseur de 0,10 m soit un volume de à 3 m^3
- d'un contour de 1,5 m de hauteur et 0,30 m de largeur pour un périmètre de 22 m soit un volume de 10 m^3
- d'une chicane centrale de 4 m de longueur, de 0,3 m de largeur et de 1,5 m de hauteur soit un volume de 1,8 m^3

Tableau 5.1. Quantités de matériaux nécessaires à la construction du bassin. Le prix donné est un prix indicatif obtenu auprès d'un maitre d'œuvre en bâtiment.

	Semelle acier (6m x 0,35m) 20 euros/unité	**Cailloux (20mm x 40mm) 17 euros/tonne**	**Béton antiacide 150 euros/m^3**
Dalle	14 U	6 tonnes	3 m^3
Contour	4 U	/	10 m^3
Chicane	/	/	1,8 m^3
Quantité total	18 U	6 tonnes	14,8 m^3
Prix TTC en euros	360	102	2220
Prix total TTC en euros	2682 + 200 euros le terrassement		

Une pompe de relevage « eaux chargées » (300 euros TTC) permettra de vider et remplir le bassin.

B) Epuration de l'eau

Les éponges sont des animaux marins qui filtrent l'eau pour se nourrir. L'eau rentre par des pores inhalants, circule dans l'animal via un système de canaux aquifères puis ressort par un pore d'évacuation. La nourriture assimilable par l'éponge (bactéries, virus, phytoplancton) est retenue puis phagocytée. Les composants non assimilables peuvent être bioaccumulés par l'animal (éléments traces métalliques, hydrocarbures aromatiques polycycliques, polychlorobiphényles). En 24 h, une éponge peut filtrer jusqu'à 10 000 fois

son volume d'eau et retenir 80 % des particules en suspension dans l'eau. Cultiver les éponges en milieu portuaire, aquacole et à proximité de sources de pollution telles que près des sites d'immersion des boues de dragage peut alors être une solution pour améliorer la qualité des eaux.

Lorsqu'elles auront atteint la taille de 500 cm^3, les éponges seront collectées puis transportées sur le lieu à dépolluer (port, concession aquacole, sortie de station d'épuration...) où elles seront découpées en greffons de 125 cm^3 puis fixées sur un support de culture immergé en mer (figure 4.2). Le support de culture utilisé sera fabriqué dans un matériau éco-conçu permettant une croissance optimale des animaux (un des supports utilisés et la technique de culture associée ont fait l'objet d'une demande de dépôt de brevet en partenariat avec l'UBS et la Société d'Accélération de Transfert de Technologie (SATT)).

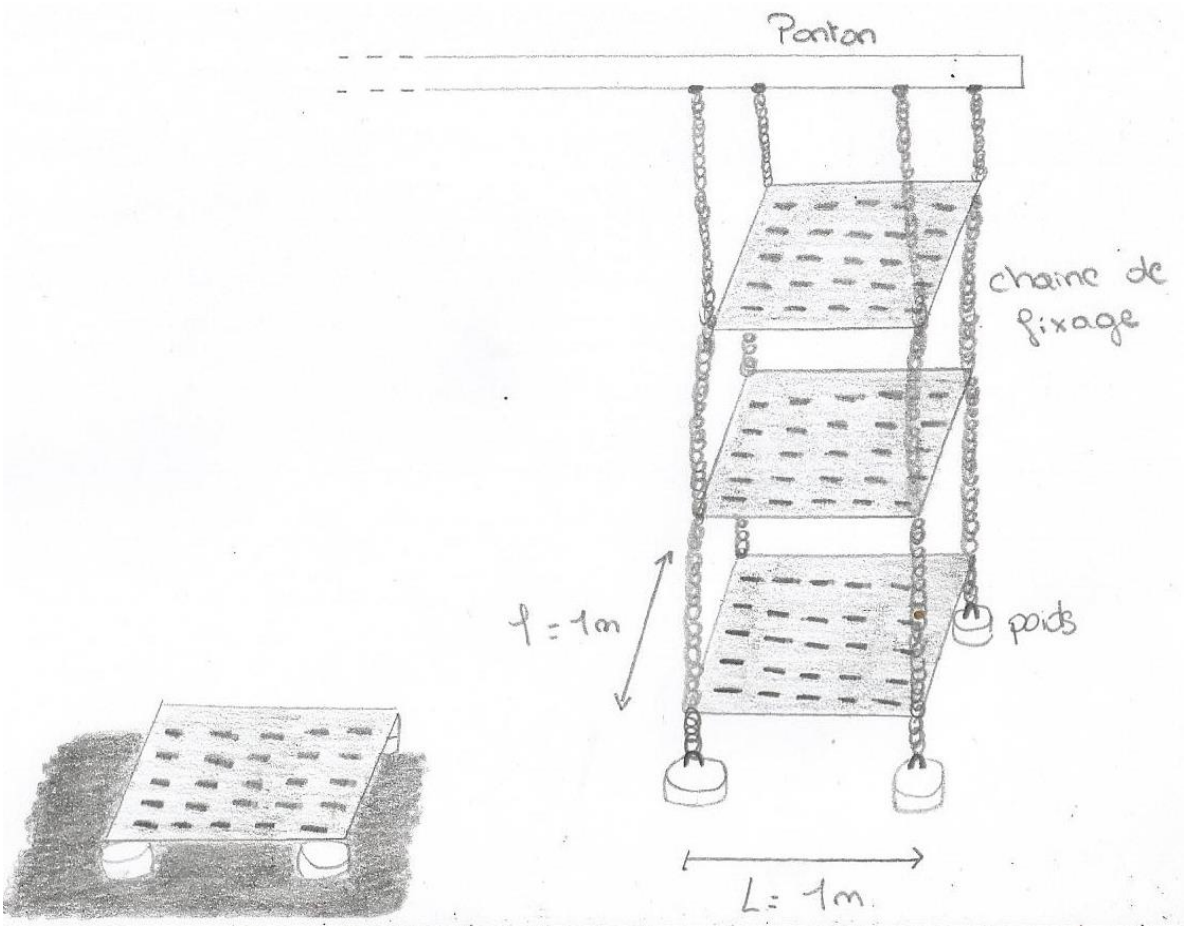


Figure 4.2. Schéma des supports de culture utilisés pour la culture d'éponges marines. La culture peut se faire à plat sur le sol ou en suspension sous un ponton du port.

La prestation de service sera louée pour 3 ans renouvelables comprenant l'installation, le suivi régulier de la culture, la mise en place d'un suivi régulier de la qualité de l'eau via des analyses courantes chimiques et bactériologiques ainsi que l'accès à une base de données informant les licenciés de la qualité de l'eau à un temps donné. L'accès à cette base de données pourra en plus être vendu aux particuliers ou aux collectivités. Un label sera créé et proposé pour les ports ou les conchyliculteurs ayant recours au système.

C) Recyclage des éponges

Après avoir joué leur rôle de filtre biologique naturel, les éponges seront récupérées. Les éponges sont une source extraordinaire de molécules ayant des propriétés antibactérienne, antivirale et antifouling. Une fois leur travail de filtre naturel terminé, les éponges seront traitées à terre puis valorisées pour leurs propriétés biologiques via un partenaire de recherche. Afin d'obtenir une quantité de matière suffisante, une récolte intensive de spécimens sauvages est inenvisageable car risquerait d'entrainer un impact négatif sur l'environnement et un déséquilibre de l'écosystème. De plus, la synthèse chimique de ces métabolites peut s'avérer difficile ou peu rentable industriellement. La culture d'éponges marines reste une voie originale pour la production biotechnologique de principes actifs.

Une fois leur extraction réalisée, il restera des éponges un déchet solide contenant les éléments traces métalliques. Ces éléments seront alors extraits par voie biologique (Babel *et al.,* 2006) et ainsi récupérés. La matière organique restante pourra être soit méthanisée soit compostée.

D) Description du procédé

Le procédé se déroule en 3 étapes : culture, épuration et valorisation (figure 4.3). La première étape consiste à obtenir un stock d'éponges suffisant.

Cette étape se fera en bassin insubmersible sur le littoral et durera en moyenne une année. La seconde étape du procédé est la plus importante. Les éponges seront placées sur les sites pollués pour 3 ans. Enfin, après avoir filtrées et stockées un maximum de polluants, les éponges seront recyclées et valorisées.

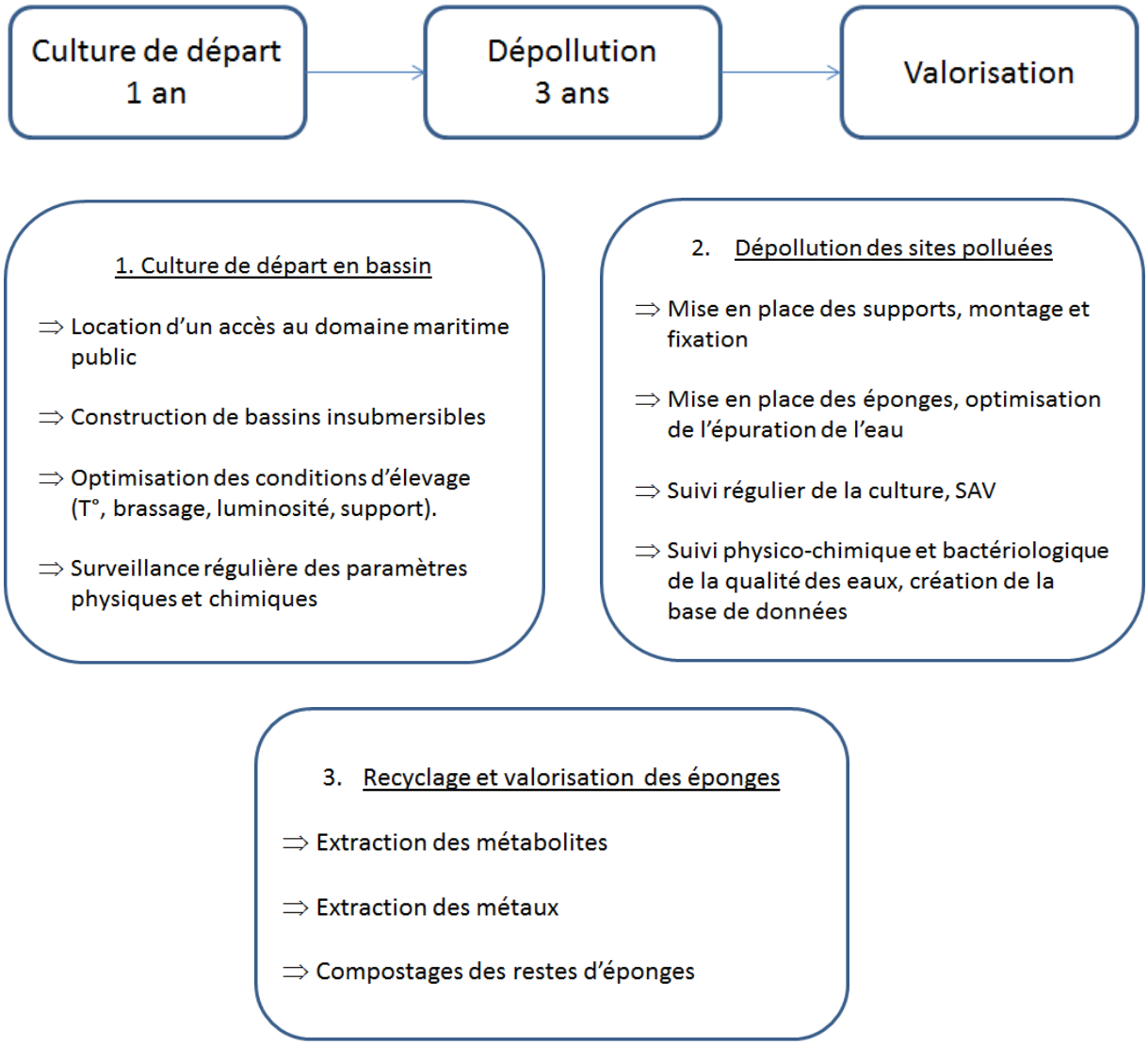


Figure 4.3. Description du procédé d'épuration biologique et écologique des eaux marines.

- Dimensionnement :

Une éponge d'1 kg filtre 10 m^3 d'eau/jour en moyenne. Pour filtrer 600 000 m^3 d'eau (taille d'un port de plaisance comme celui de Lorient ou d'une concession ostréicole de taille importante) en 1 mois, il faudrait environ 2000 éponges soit une culture de départ de 470 greffons de 125 cm^3 (croissance de 400 % / an en moyenne).

4.3. Le marché visé

La Bretagne est la région française qui bénéficie de la plus grande longueur de côtes. De Cancale à Pornic, le littoral se déroule sur 1 100 km, mais il double sa longueur si l'on inclut les nombreuses îles. Étendu sur l'ensemble du littoral, le tissu portuaire breton compte près de 220 sites aux dimensions et activités variables. Les côtes bretonnes font parties des zones de croisières les plus prisées en France. Pour toutes ces raisons, le siège social de l'entreprise sera implanté en Bretagne. L'entreprise pourra ensuite s'étendre au niveau national et international.

A) Identification du marché

Afin de réaliser ou de maintenir un bon état écologique du milieu marin au plus tard en 2020, la directive 2008/56/CE du Parlement européen et du Conseil du 17 juin 2008 appelée « directive-cadre pour le milieu marin » conduit les États membres de l'Union européenne à prendre les mesures nécessaires pour réduire les impacts des activités anthropiques sur ce milieu. En France, la directive a été transposée dans le code de l'environnement (articles L. 219-9 à L. 219-18 et R. 219-2 à R. 219-17) et s'applique aux zones sous souveraineté ou juridiction française, divisées en 4 sous-régions marines : la Manche-mer du Nord, les mers celtiques, le golfe de Gascogne, la Méditerranée occidentale.

Pour chaque sous-région marine, un plan d'action pour le milieu marin (PAMM) doit être élaboré et mis en œuvre. Ce plan d'action comporte 5 éléments :

- **une évaluation initiale de l'état écologique** des eaux marines et de l'impact environnemental des activités humaines sur ces eaux ;
- **la définition du bon état écologique** pour ces mêmes eaux reposant sur des descripteurs qualitatifs ;
- **la définition d'objectifs environnementaux** et d'indicateurs associés en vue de parvenir à un bon état écologique du milieu marin ;

- **un programme de surveillance** en vue de l'évaluation permanente de l'état des eaux marines et de la mise à jour périodique des objectifs ;
- **un programme de mesures** qui doit permettre de parvenir à un bon état écologique des eaux marines ou à conserver celui-ci.

Les intervenants dans la lutte contre les pollutions marines sont les communes, les collectivités territoriales (la région et le département peuvent jouer un rôle dans le domaine économique, notamment en apportant une aide à la préparation à la lutte contre les pollutions), les préfets de département et les préfets maritimes qui dirigent les opérations de lutte et peuvent faire appel à tout moyen public ou privé. Les ports de plaisance en particulier ont un rôle important dans le développement durable des régions. Ils sont des lieux où s'exercent des enjeux économiques et environnementaux importants. Ils représentent un atout économique et touristique pour la région et offrent des opportunités d'activités et d'emplois. Les ports doivent s'inscrire dans une gestion intégrée et concertée de la mer et du littoral, prenant en compte l'ensemble des activités humaines, la préservation du milieu marin et la valorisation des ressources dans une perspective de développement durable. Une démarche « Ports propres en France » est mise en œuvre par la Fédération Française des Ports de Plaisance (FFPP). Elle vise à aider les gestionnaires de port de plaisance à maitriser le management environnemental et à encourager toutes les opérations qui concourent à l'amélioration de la qualité environnementale des ports par la prise en compte de façon globale à l'échelle d'une région, de la problématique gestion des déchets et rejet des effluents dans les ports.

B) Les clients potentiels

Dans un premier temps, la principale clientèle sera composée de collectivités désireuses d'améliorer la qualité des eaux portuaires. Les ports sont une source de pollution : pollutions accidentelles ou liées aux dégâts des tempêtes, hydrocarbures, huiles de vidange, déchets de dragage, biocides et polluants métalliques provenant des systèmes de protection cathodique utilisés pour protéger de la corrosion les matériaux métalliques et des peintures antisalissure qui protègent les coques (figure 4.4). Enfin, la pollution de type

urbain provenant de l'habitat à bord des bateaux dans le bassin portuaire peut être significative (rejets des toilettes, lessives, shampoings, savons). Toutefois, les gestionnaires de ports sont aujourd'hui de plus en plus soucieux de l'environnement et en recherche de solutions pour améliorer la qualité de l'eau. D'ailleurs, depuis 2001, la certification « Port propre » est proposé aux gestionnaires mettant en place un management environnemental. En France, il y a plus de 200 ports de plaisance ainsi que 370 installations d'accueil (bouées, ponton...).

Dans un second temps, les clients pourraient être des aquaculteurs en difficulté à cause de la dégradation de la qualité de l'eau. En France, près de 3000 entreprises aquacoles sont dénombrés. Confrontés à des pollutions chroniques ou aigues pouvant entrainer des maladies chez les animaux ou un risque sanitaire chez le consommateur de produits de la mer, aujourd'hui ces professionnels recherchent des solutions innovantes pour maintenir leur production.

Enfin, près de 300 stations d'épuration en France rejettent leurs eaux directement en mer entrainant une forte concentration bactérienne en sortie. Les clients seront donc les collectivités désireuses de limité l'impact négatif de ces rejets (risques sanitaires, impacts sur la pêche, l'aquaculture et le tourisme...).

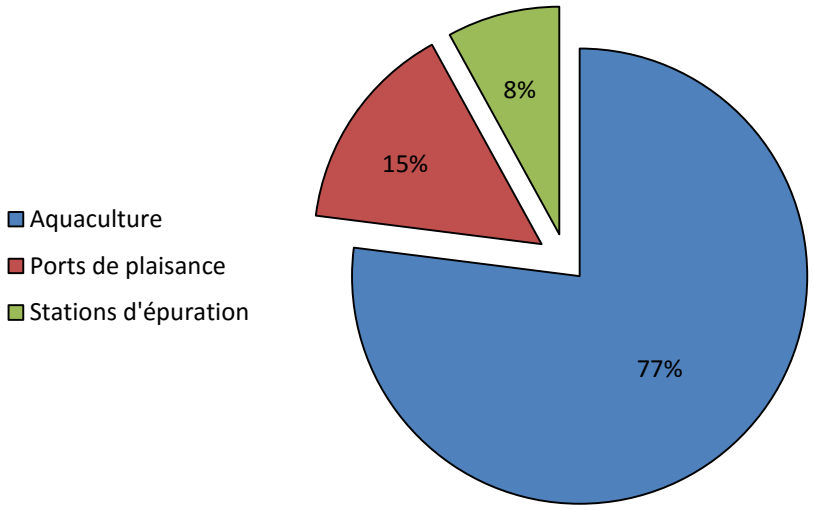


Figure 4.4. L'accès au marché : les clients potentiels.

Entre mars et juin 2015, un sondage qualitatif a été réalisé auprès de dix ostréiculteurs et dix ports de plaisance. Les résultats montrent que huit ostréiculteurs sur dix sont intéressés par le concept et souhaitent être tenus au courant des avancées de la création de l'entreprise. Les 20 % restant sont des professionnels n'étant pas ou peu confrontés à la pollution marine ou des professionnels découragés ne croyant plus à la possibilité d'amélioration de la qualité de l'eau. De plus, tous les ports de plaisance contactés sont sujets à des phénomènes de pollution. Un sur deux semble intéressé par des nouvelles techniques pour améliorer la qualité de l'eau portuaires et ainsi améliorer l'image du port auprès des plaisanciers. Au vu des résultats, des « cultures tests » sont actuellement en cours chez deux ostréiculteurs à Locmariaquer et Locoal-Mendon et dans le port d'Etel (Morbihan, France).

C) Les moyens de lutte anti-pollution déjà existants

Il existe certaines inventions de dépollutions comme les bateaux de nettoyages de la surface des eaux en mer qui aspirent les déchets solides (déchets plastiques flottants...) ainsi que les bateaux de récupération des nappes d'hydrocarbures. L'intervention d'un bateau de récupération d'hydrocarbures coute très cher (plusieurs milliers d'euros selon le modèle et le type de polluants) et donc réservée aux grosses pollutions type marée noire. Certains ports disposent également de barrages absorbants qui sont des barrages en PVC antipollution pour les hydrocarbures (compter 200 euros par barrage pour une capacité totale d'absorption de 60 l d'un mélange eau/hydrocarbures). Ces barrages sont déployés lors d'une pollution pour confiner les hydrocarbures et absorber les nappes de surface. En revanche, ces solutions sont des solutions à court terme en cas de pollution soudaine et sont totalement inefficaces contre la pollution chronique. Les avantages des éponges est que non seulement elles sont biologiques mais elles permettent un nettoyage achevé, en profondeur de l'eau de mer et la filtration de fines particules en suspension dans l'eau. Les éponges amènent en plus une vision écologique des systèmes portuaires et des concessions aquacoles. Elles permettent de biorestaurer des sites pollués et de maintenir une bonne qualité des eaux tout en respectant l'écosystème marin. Reste également comme solution

antipollution le ramassage manuel et les actions de sensibilisation de l'environnement auprès des usagers afin de limiter les comportements inciviques.

D) Les partenaires financiers potentiels

Les industries pharmaceutiques désireuses de valoriser les molécules extraites d'éponges comme source d'inspiration pour de nouveaux médicaments sont de potentiels partenaires. Afin d'obtenir une quantité de matière suffisante, une récolte intensive de spécimens sauvages est inenvisageable car risquerait d'entrainer un impact négatif sur l'environnement et un déséquilibre de l'écosystème. De plus, la synthèse chimique de ces métabolites peut s'avérer difficile ou peu rentable industriellement. La culture d'éponges marines reste une voie originale pour la production biotechnologique de principes actifs.

E) La concurrence directe

- L'entreprise PORIFARMA

Le principal concurrent est la start-up PORIFARMA basée aux Pays-Bas. Fondée en 2005 par le docteur Ir Jasper de Goeij, la première mission de cette société a été de vendre des techniques et des supports de culture d'éponge aussi bien en aquarium qu'en milieu naturel. L'entreprise s'est ensuite développée en proposant aux clients des métabolites secondaires produits par les éponges. Les éponges semblent être une source sans limite de nouveaux produits, tels que les compléments alimentaires de haute qualité, les produits pharmaceutiques développés comme nouveaux médicaments contre le cancer et le VIH ou nouveaux antibiotiques, les biomatériaux comme le collagène, le verre ou la silice et les cosmétiques. Leurs éponges sont également vendues dans le monde entier comme éponge de bain. Depuis peu, l'entreprise souhaite se lancer aussi dans la pisciculture intégrée avec des éponges c'est-à-dire la co-culture éponges-poissons. Il s'agit d'un système naturel de recyclage, les éponges se nourrissant des déchets produits par les poissons. La société PORIFARMA n'a pas déposé de brevet à ce jour. Tout de même, le directeur de la société, Ronald Osinga, en a déposé deux avant la création de la société. Cependant, les

brevets créés concernent la culture des éponges marines en bioréacteur *in vitro* (« Selenium-enriched liquid media for the cultivation of siliceous sponges and for biogenic silica production » AB(EP1731597) ; « Bioreactor system for the cultivation of aquatic organisms » AB(EP1508272)).

- La concurrence chinoise

Il existe un brevet chinois sur les éponges marines et leur capacité à filtrer les matières organiques provenant d'eaux usées d'élevages marins (« Method for filtering organic waste matter in cultivation sea water by marine sponge » AB(CN101209879)). Ce brevet n'inclus pas les polluants chimiques, seulement les polluants organiques. Or les éponges sont capables de filtrer et de bioaccumuler des polluants chimiques (HAP, éléments traces métalliques, PCB...) en quantité non négligeable (plusieurs mg par kg d'éponge). Aucune voie de valorisation n'est proposée dans ce brevet. Aucune société n'a été créée suite au dépôt de ce brevet.

4.4. La mise en œuvre opérationnelle

Pour créer une nouvelle entreprise, l'entrepreneur doit développer, mettre en œuvre et contrôler la stratégie du projet de création en lien avec la production, les services et les environnements.

A) Le positionnement de LECOMER par rapport au marché international

Depuis plusieurs années, le marché mondial de l'environnement connait un fort développement. Limité au départ au système de recyclage, il s'est depuis élargi avec l'apparition de technologie propre, de matériau éco-conçu, de circuit éco-efficient et de système de dépollution. Son émergence et sa croissance dépendent beaucoup de l'intervention publique, au travers de politiques règlementaires et tarifaires.

Le marché de l'environnement est difficile à appréhender en termes statistiques, en raison de l'absence de définition standardisée. Néanmoins, le Programme des Nations-Unies pour l'environnement (PNUE) l'évaluait en 2010 à 1400 milliards d'euros, soit 2,5 % du PIB mondial (Ministère des finances et des comptes publics). Les plus grosses parts du marché mondial concerne la gestion des déchets (collecte, recyclage...) suivie de près par le traitement de l'eau (station d'épuration, station d'eau potable, dépollution de l'eau...) puis vient ensuite les « nouvelles » technologies propres (énergies renouvelables, moteurs électriques, stockages de l'énergie) appelées à des perspectives de croissances fortes (figure 4.5).

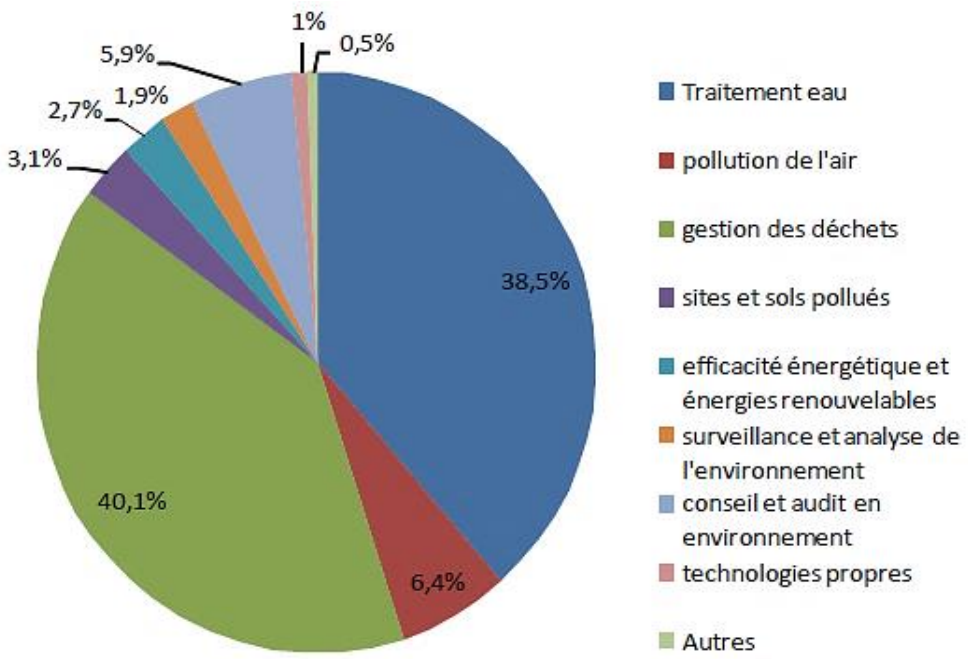


Figure 4.5. Répartition du marché mondial de l'environnement. Source : Global Environment Markets and the UK environmental Industry Opportunities to 2020, JEMU, 2005.

LECOMER est une entreprise dont la composante principale est la dépollution des eaux marines et la restauration des écosystèmes marins à l'aide d'un procédé de production propre. Le service proposé vise donc le marché de traitement de l'eau et celui des sites pollués. La montée en puissance de la question environnementale favorise grandement le développement de nouvelles technologie et la création d'entreprises.

B) La stratégie commerciale

Le premier objectif de l'entreprise est de nature commerciale soit d'augmenter la clientèle de 50 % en 2 ans. Pour mieux orienter la prospection de nouveaux clients une étude de marché sera réalisée par Britt&Tech avant le lancement de l'entreprise afin d'établir le portrait type des futurs clients et ainsi définir leurs attentes. De plus, face aux pressions concurrentielles, l'engagement dans une démarche qualité constitue un atout pour accéder au marché. C'est pour cela qu'un label « Mer Propre » sera créée plus tard afin d'attirer de nouveaux clients.

C) Mes besoins au démarrage

Pour lancer la culture d'éponge et donc l'entreprise, le besoin le plus important est d'obtenir une autorisation d'exploitation du littoral. La démarche à faire pour ce type d'installation est une demande d'accès au Domaine Public Maritime (DPM) auprès de la Direction Départementale des Territoires de la Mer (DDTM).

4.5. L'état d'avancement du projet

La participation à plusieurs concours a permis l'émergence du projet et surtout la signature d'un contrat d'accompagnement avec la technopole VIPE Vannes.

A) Les démarches administratives

La première démarche administrative réalisée est le dépôt d'une enveloppe Soleau à l'INPI qui, sans être un titre de propriété industrielle, permet de dater de façon certaine le début du projet et de bien identifier son auteur.

Les démarches restantes à faire sont l'immatriculation au Registre du Commerce et des Sociétés (RCS) requise lors d'une création d'entreprise et le dépôt de la marque LECOMER auprès de l'INPI (292 euros minimum).

B) Les démarches de recherche de financement

Pour démarrer la phase de maturation du projet, une collaboration avec l'UBS et la SATT Ouest Valorisation peut être envisagée. En effet, les SATT disposent de fonds de maturation pour la protection des inventions, le financement et l'accompagnement des projets d'innovation. Sinon, les ASSEDIC versent des indemnités de chômage dans le cadre de la création d'entreprise et notamment pour les jeunes entrepreneurs. Ce sera une manière d'éviter l'endettement tout en prenant le temps de développer le projet sans me précipiter. Pour la création, un apport personnel de 5000 euros est envisagé afin de couvrir le capital de création de l'entreprise ainsi que les comptes courants associés. Cette première levée de fond associera ma famille au projet. Etre lauréat de concours nationaux me permettra aussi d'augmenter mon capital de départ (participation au concours I-LAB).

C) Les étapes du développement

Avec VIPE Vannes, nous travaillons actuellement sur la mise en place du modèle économique (figure 4.6). Aujourd'hui, nous sommes en plus en contact avec la SATT Ouest Valorisation pour le dépôt de brevet (financement UBS/SATT) afin de donner plus de crédibilité au projet. Le brevet ne porte pas sur le projet en lui-même mais sur des aspects techniques (support de culture, techniques de culture...) facilitant ainsi les démarches commerciales. Depuis décembre 2015, j'ai également acquis le nouveau statut d'étudiant entrepreneur proposé par le Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche. L'objectif final est de créer l'entreprise fin 2016 (tableau 4.2).

Partenaires clés

UBS

Agence web pour le site internet ou hébergeur web gratuit

SATT

Activités clés

Ressource stock, production de départ

Culture et surveillance

Filière de recyclage, proposition de solutions

Ressources clés

Brevet pour protéger l'entreprise

1 zone maritime pour la culture stock

Niveau 1 de plongée

Doctorat

Offre

Premier système d'épuration de l'eau et de stockage de polluants par les éponges marines

Extraire du milieu des polluants

Biologique et écologique

Plateforme qualité de l'eau portuaire en temps réel

Label « amélioration qualité de l'eau »

Améliorer l'image du port (certification port propre)

Support biodégradable, non polluant

Coûts

Couts de fabrication du support

Couts de production des éponges (mer ou bassin),

Couts du transport vers les ports

Couts de suivi (maintenance et analyse)

Cout recyclage

Revenus

Mise à disposition des filtres pour 3 ans

Valorisation des métaux et métabolites récupérés

Prestation de service avec loyer

Base de données qualité de l'eau

Figure 4.6. Schéma du modèle économique.

Tableau 4.2. Etapes du développement du projet de création d'entreprise.

	Année 2016											
	Janvier	Février	Mars	Avril	Mai	Juin	Juillet	Août	Septembre	Octobre	Novembre	Décembre
Thèse				Soutenance								
Brevet			Dépôt									
Réalisation du modèle économique												
Maturation du projet												
Création de l'entreprise												

4.6. Conclusion du chapitre

Le projet LECOMER répond à une problématique de dépollution de l'eau de mer. Le service proposé est un système écologique et biologique d'épuration de l'eau de mer par les éponges marines. Cultiver les éponges en milieu portuaire ou près des sites de dragage ou d'immersion des boues de dragage pourrait alors être une solution pour améliorer la qualité des eaux. Les clients sont les professionnels de la mer : aquaculteurs, ports de plaisance et collectivités désireux d'améliorer la qualité des eaux côtières. LECOMER propose un produit spécifique auquel il n'existe aucun produit de substitution.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion

En collaboration avec le Comité Régional de la Conchyliculture de Bretagne Sud ainsi qu'avec plusieurs professionnels ostréiculteurs, le projet de recherche REMEDBIO a cherché à valoriser les éponges marines dans le but de réduire l'accumulation de polluants chimiques dans les sédiments marins et de réduire la prolifération de contaminants biologiques dans la colonne d'eau. La bioremédiation *in situ* des parcs conchylicoles par les éponges marines est envisageable. Elle apparaît être une stratégie innovante, économique et respectueuse pour l'environnement.

Dans une première phase, la culture d'éponges marines sur le littoral breton et plus particulièrement en milieu conchylicole a été réalisée. Les éponges se sont accrochées à la poche qui les protègerait bien du courant et des tempêtes. Les fragments d'éponges ont « cicatrisé » mais les premiers suivis de culture ont montré une croissance relativement faible des greffons d'éponges. Il est néanmoins important d'utiliser des espèces endémiques pour ne pas impacter l'élevage des huîtres ni introduire de nouvelles espèces potentiellement envahissantes ou génératrices de nouvelles pathologies. La diversification des activités (co-culture éponges-huîtres, par exemple) pourrait ainsi contribuer à limiter les pertes économiques dans le secteur de la conchyliculture en cas de mortalité des huîtres. L'étude d'un matériau écoconçu comme le PLA, peu colonisable par le biofouling, nouvellement utilisé pour la spongiculture, nous paraissait indispensable dans un but de protection de l'environnement.

Durant la seconde phase expérimentale, un modèle d'éponges marines a été sélectionné comme agent naturel de bioremédiation. Nous avons voulu exploiter le potentiel de dépollution d'*H. perlevis* grâce à son système naturel de filtration. Les résultats *in vitro* ont montré que les éponges avaient la capacité de filtrer une eau contaminée et de retenir les polluants. La méthode de purification des huîtres, en cas de contamination, consiste à immerger des bivalves vivants dans des bassins insubmersibles alimentés en eau de mer purifiée grâce à des procédés chimiques ou mécaniques de dépollution. Le temps de purification peut varier entre deux et plusieurs jours. Les résultats obtenus au cours de ce travail proposent alors d'utiliser les éponges marines comme procédé naturel d'amélioration de la qualité de l'eau en milieu conchylicole afin d'éviter ou diminuer le temps de

purification. L'objectif final est d'améliorer la qualité de l'eau *in situ* et de réduire l'impact des polluants chimiques (métaux lourds, HAP, PCB...) et des contaminants biologiques (bactéries, virus, dinoflagellés...) sur les élevages de bivalves.

Enfin dans une dernière partie, nous avons présenté le projet d'entreprise LECOMER et le business plan associé. Ce projet a été monté dans l'objectif de finaliser les travaux réalisés durant cette thèse et de créer une entreprise à la fin de l'année 2016. Plusieurs ostréiculteurs et responsables portuaires se sont montrés intéressés par le projet et veulent être tenus au courant de l'avancée de la création de l'entreprise.

En conclusion, cultiver des éponges en des points stratégiques pour les utiliser comme biofiltres puis recycler la biomasse pour l'extraction des métabolites à des fins commerciales est une stratégie innovante et respectueuse de l'environnement pour l'amélioration de la qualité de l'eau.

Perspectives

Les travaux ont mis en avant la capacité des éponges à dépolluer un environnement contaminé grâce à leurs propriétés naturelles de filtration et de bioaccumulation ce qui en fait de bonnes candidates pour la bioremédiation.

Essais biologiques

Les essais sur *E. coli, V. aestuarianus* et le plomb ont été concluants. Plusieurs autres essais pourront être réalisés comme, par exemple, mettre les animaux en présence d'un mélange de polluants. En effet, nous avons vu précédemment que le plomb affectait l'activité de filtration des éponges. Il peut être judicieux de vérifier que les éponges sont toujours capables de filtrer des bactéries en présence de plomb.

Dans une prochaine étude, nous suggérons de répéter les expériences de décontamination avec d'autres polluants comme des médicaments, des pesticides ou encore

des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Par exemple, la concentration en œstrogène est en hausse dans les rivières. Ils ont des effets néfastes sur les écosystèmes aquatiques.

Il est également important d'améliorer les protocoles d'observation des tissus d'éponges au microscope pour bien observer la localisation des métaux dans l'éponge. Les mécanismes de rétention des métaux ne sont pas encore bien connus.

En se basant sur les protocoles réalisés *in vitro*, il sera judicieux de transférer *in situ* les résultats obtenus et de valider le modèle d'éponge marine, non plus à l'échelle du laboratoire mais à l'échelle du bassin insubmersible. Après une période d'adaptation de quelques mois, nécessaire à l'éponge qui passe d'un milieu ouvert (pleine eau) à un milieu relativement clos, les éponges seront mises en contact avec des d'huîtres. Toutefois, nous avons travaillé *in vitro* avec un rapport huîtres/éponges de 1 pour 1 en masse. Dans la perspective d'une culture d'éponge à grande échelle, il faudrait diminuer ce rapport tout en gardant l'efficacité de dépolluer des éponges.

Concernant le virus OsHV-1, faire un suivi de la concentration virale dans les éponges en fonction de la localisation des animaux et de la saison pourrait être intéressant. Il faudrait s'assurer que les éponges ne sont pas une niche écologique pour le virus. A notre connaissance, il n'y a pas de donnée bibliographique sur les relations entre les éponges et le virus OsHV-1. Mettre au point les protocoles d'observation du virus dans l'éponge sera nécessaire.

Valorisation chimique

La capacité d'adaptation des éponges pourrait provenir de l'arsenal de molécules actives qu'elles produisent. Elles sont connues pour produire une très grande diversité de métabolites naturels (antibactériens, antiviraux, anti-inflammatoire…). *Hymeniacidon perlevis* est une espèce d'éponge originale d'un point de vue chimique. Il serait intéressant d'extraire puis d'analyser les substances naturelles produites par l'éponge par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire et par spectrométrie de masse.

Ces molécules sont présentes en faibles quantités dans l'éponge. Or, leur isolement et leur identification structurale ainsi que les tests d'activité biologique nécessitent des

quantités importantes de matière première. Cela justifie à ce jour leur culture sur le littoral. Maintenant, les molécules isolées de l'éponge peuvent avoir différentes origines. Elles peuvent provenir de l'éponge elle-même, de microorganismes retenus par filtration et assimilés lors de l'alimentation ou de microorganismes vivant en symbiose avec l'éponge. L'isolement de ces microorganismes pourrait être la prochaine étape de l'étude chimique des éponges.

De plus, il semble important de réaliser le profil chimique des éponges. Cela consiste à analyser leur composition en métabolites durant un temps donné. Cela permet à la fois d'indiquer la présence de nouveaux métabolites dans l'éponge et de se servir de ce profil chimique comme bio-indicateur : une variation inhabituelle dans la composition chimique de l'éponge, en dehors de son cycle naturel, peut indiquer une acclimatation à un changement environnemental (contamination, stress, réchauffement de l'eau, déséquilibre de la faune et de la flore...).

Bibliographie

Aboubaker, M. H., Sabrié, J., Huet, M. & Kohen, M. Establishment of stable GFP-tagged *Vibrio aestuarianus* strains for the analysis of bacterial infection-dynamics in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas. Veterinary Microbiology* **164,** 392-398 (2013).

Akutsu-Shigeno, Y., Teeraphatpornchai, T., Teamtisong, K., Nomura, N., Uchiyama, H., Nakahara, T. & Nakajima-Kambe, T. Cloning and sequencing of a poly(DL-lactic acid) depolymerase gene from *Paenibacillus amylolyticus* strain TB-13 and its functional expression in *Escherichia coli. Applied and Environmental Microbiology* **62,** 2393-2397 (2003).

Amman, A. A., Michalke, B. & Schramel, P. Speciation of heavy metals in environmental water by ion chromatography coupled to ICP-MS. *Analytical Biochemistry* **372,** 448-452 (2002).

Annoura, H. & Tatsuoka, T. Total syntheses of Hymenialdisine and Debromohymenialdisine: stereospecific construction of the 2-amino-4-Oxo-2-Imidazolin-5(Z)-Disubstituted ylidene ring system. *Tetrahedron Letters* **36,** 413-416 (1995).

Auby, I. & Maurer, D. Etude de la production de l'huître creuse dans le Bassin d'Arcachon [en ligne]. Disponible sur : http://archimer.ifremer.fr/doc/00040/15145/ (2004) (page consultée le 18 mars 2016).

Avilés, E. & Rodríguez, A. D. Monamphilectine A, a potent antimalarial β-Lactam from marine sponge *Hymeniacidon* sp: isolation, structure, semisynthesis and bioactivity. *Organic Letters* **12,** 5290-5293 (2010).

Babel, S. & Del Mundo Dacera, D. Heavy metal removal from contaminated sludge for land application: A review. *Waste Management* **26,** 988-1004 (2006).

Bai, R. L., Paull, K. D., Herald, C. L., Malspeis, L., Pettit, G. R. & Hamel, E. Halichondrin B and homohalichondrin B, marine natural products binding in the vinca domain of tubulin: discovery of tubulin-based mechanism of action by analysis of differential cytotoxicity data. *Journal of Biological Chemistry* **266,** 15882-15889 (1991).

Battershill, C. N. & Page, M. J. Sponge aquaculture for drug production. *Aquaculture* **16,** 5-6 (1996).

Bayen, S., Lee, H. K. & Obbard, J. P. Exposure and response of aquacultured oysters, *Crassostrea gigas* to marine contaminants. *Environmental Research* **103,** 375-382 (2007).

Beaumont, A. & Cassier, P. *Biologie animale : des Protozoaires aux Metazoaires epithélioneuriens*. Paris : Dunod, 995 pages (1983).

Becerro, M. A., Turon, X. & Uriz, M. J. Multiple functions for secondary metabolites in encrusting marine invertebrates. *Journal of Chemical Ecology* **23,** 1527-1547 (1997).

Belarbi, E. H., Contreras Gómez, A., Chisti, Y., Garcia Camacho, F. & Grima, E. M. Producing drugs from marine sponges. *Biotechnology Advances* **21,** 585-598 (2003a).

Belarbi, E. H., Dominguez, M. R., Garcia, M. C. C., Gomez, A. C., Camacho, F. G. & Grima, E. M. Cultivation of explants of the marine sponge *Crambe*. *Biomolecular Engineering* **20,** 333-337 (2003b).

Belin, C., Claisse, D., Daniel, A., Fleury, E., Miossec, L., Piquet, J. C. & Ropert, M. Qualité du milieu marin littoral. Synthèse nationale de la surveillance 2013 [en ligne]. Disponible sur : http://envlit.ifremer.fr/documents/bulletins/nationaux_de_la_surveillance (2013) (page consultée le 24 novembre 2015).

Bergquist, P. R. *Sponges*. Berkeley : University of California Press, 268 pages (1978).

Bergquist, P. R. & Tizard, C. A. « Sponge industry », dans Firth F. E., *The Encyclopaedia of Marine Resources*. New York : Van Nostrand Reinhold Company, p. 665-670 (1969).

Bergmann, W. & Burke, D. C. Contributions to the study of marine products. XXXIX. The nucleosides of sponges. III.1 Spongothymidine and spongouridine. *Journal of Organic Chemistry* **20,** 1501-1507 (1955).

Bergmann, W. & Feeney, R. J. The isolation of a new thymine pentoside from sponges. *Journal of the American Chemical Society* **72,** 2809-2810 (1950).

Bergmann, W. & Feeney, R. J. Nucleosides of sponges: discovery of the arabinose-based nucleosides-*Tethya crypta*. *Journal of Organic Chemistry* **16,** 981-987 (1951).

Bonhomme, S., Cuer, A., Delort, A.-M., Lemaire, J., Sancelme, M. & Scott, G. Environmental biodegradation of polyethylene. *Polymer Degradation and Stability* **81,** 441-452 (2003).

Boudry, P., Barre, M. & Gerard, A. Genetic improvement and selection in shellfish: a review based on oyster research and production. *Cahiers Options Méditerranéennes (CIHEAM)* **34,** 61-75 (1998).

Boutet, I., Tanguy, A. & Moraga, D. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. *Gene* **329,** 147-157 (2004).

Braekman, J.-C., Daloze, D., Stoller, C. & Van Soest, R. W. M. Chemotaxonomy of *Agelas* (Porifera: Demospongiae). *Biochemical Systematics and Ecology* **20,** 417-431 (1992).

Burres, N. S. & Clement, J. J. Antitumor activity and the mechanism of action of the novel marine natural products mycalamide-A and –B and onnamide. *Cancer Research* **49,** 2935-2940 (1989).

Carver, C. E., Thériault, I. & Mallet, A. L. Infection of cultured eastern oysters *Crassostrea virginica* by the boring sponge *Cliona celata*, with emphasis on sponge life history and mitigation strategies. *Journal of Shellfish Research* **29,** 905-915 (2010).

Cebrian, E., Martí, R., Uriz, J. & Turon, X. Sublethal effects of contamination on the Mediterranean sponge *Crambe*: metal accumulation and biological responses. *Marine Pollution Bulletin* **46,** 1273-1284 (2003).

Cebrian, E. & Uriz, M. J. Do heavy metals play an active role in sponge cell behavior in the absence of calcium? Consequences in larval settlement. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **346,** 60-65 (2007).

Cheshire, A. C., Butler, A. J., Westphalen, G., Rowland, B. Stevenson, J. & Wilkinson, C. R. Preliminary study of the distribution and photophysiology of the temperate phototrophic sponge *Cymbastela* sp. from South Australia. *Marine and Freshwater Research* **46,** 1211-1216 (1995).

Chopin T. Mixed, integrated, poly-, or multi-level aquaculture—whatever you call it, it is time to put seaweeds around your cages! In: Proceedings of the Conference on Cold Water Aquaculture to the Year 2000, St. Andrews, Canada, 6-8 September 1995. *Aquaculture Association of Canada, Special Publication* 2:110 (1997).

Chopin, T., Robinson, S., Sawhney, M., Bastarache, S., Belyea, E., Shea, R., Armstrong, W., Stewart, I. & Fitzgerald, P. The AquaNet integrated multi-trophic aquaculture project: rationale of the project and development of kelp cultivation as the inorganic extractive component of the system. *Bulletin of the Aquaculture Association of Canada* **104,** 11-18 (2004).

Cimino, G., De Rosa, S., De Stefano, S., Mazzarella, L., Puliti, R. & Sodano, G. Isolation and X-ray crystal structure of a novel bromo-compound from two marine sponges. *Tetrahedron Letters* **23**, 767-768 (1982).

Cochennec-Laureau N. (2014). Rapport d'activités 2013. Laboratoire Environnement Ressources Morbihan - Pays de Loire [en ligne]. Disponible sur : http://archimer.ifremer.fr/doc/00199/30998/ (page consultée le 5 janvier 2016).

Comité national de la conchyliculture (CNC) [en ligne]. Disponible sur : http://www.cnc-france.com/ (page consultée le 4 janvier 2016).

Comité régional de la conchyliculture (CRC) de Bretagne Sud [en ligne]. Disponible sur : http://www.huitres-de-bretagne.com/ (page consultée le 27 janvier 2016).

Comps, M., Bonami, J.R., Vago, C. & Razet, D. La mise en évidence d'une infection virale chez l'huître portugaise à l'occasion de l'épizootie de 1970-1974. *Science et Pêche, Pêche maritime* **256,** 13-15 (1976).

Comps, M. Epizootic diseases of oysters associated with viral infections. *American Fisheries Society* **18,** 23-27 (1988).

Corriero, G., Longo, C., Mercurio, M., Marzano, C. N., Lembo, G. & Spedicato, M. T. Rearing performance of *Spongia officinalis* on suspended ropes off the Southern Italian Coast (Central Mediterranean Sea). *Aquaculture* **238,** 195-205 (2004).

Crawshay, L. R. Studies in the Market Sponges I. Growth from the Planted Cutting. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **23,** 553-574 (1939).

De Caralt, S., Uriz, M. J. & Wijffels, R. H. Cell culture from sponges: pluripotency and immortality. *Trends in Biotechnology* **25,** 467-471 (2007).

De Mestre, C., Maher, W., Roberts, D., Broad, A., Krikowa, F. & Davis, A. R. Sponges as sentinels: Patterns of spatial and intra-individual variation in trace metal concentration. *Marine Pollution Bulletin* **64,** 80-89 (2012).

De Nanteuil, G., Ahond, A., Guilhem, J., Poupat, C., Dau, E. T. H., Potier, P., Pusset, M., Pusset, J. & Laboute, P. (1985) Isolement et identification des métabolites d'une nouvelle espèce de spongiaire, *Pseudaxinyssa cantharella. Tetrahedron* **41,** 6019-6033 (1985).

De Vos L., Rützler K., Boury-Esnault N., Donadey C. & Vacelet J. *Atlas de morphologie des éponges*. Washington : Smithsonian Press, 117 pages (1991).

Deroiné, M., Le Duigou, A., Corre, Y.-M., Le Gac, P.-Y., Davies, P., César, G. & Bruzaud, S. Accelerated ageing of polylactide in aqueous environments : Comparative study between distilled water and seawater. *Polymer Degradation and Stability* **108,** 319-329 (2014).

Directive 2008/56/CE du Parlement européen et du Conseil. *Journal officiel de l'Union européenne* [En ligne]. Disponible sur : http://www.developpement-durable.gouv.fr (page consultée le 16 mars 2016).

Directive 2013/39/UE du Parlement européen et du Conseil. *Journal officiel de l'Union européenne* [En ligne]. Disponible sur : http://www.developpement-durable.gouv.fr (page consultée le 09 janvier 2016).

Directive 2000/60/CE du Parlement européen et du Conseil. *Journal officiel de l'Union européenne* [En ligne]. Disponible sur : http://www.developpement-durable.gouv.fr (page consultée le 5 juin 2015).

Duckworth, A. R. Farming sponges for chemicals with pharmaceutical potential. *World Aquaculture Magazine* **32,** 16-18 (2001).

Duckworth, A. R. Farming sponges to supply bioactive metabolites and bath sponges: A review. *Marine Biotechnology* **11,** 669-679 (2009).

Duckworth, A. R. & Battershill, C. N. Developing farming structures for production of biologically active sponge metabolites. *Aquaculture* **217,** 139-156 (2003a).

Duckworth, A. R. & Battershill, C. N. Sponge aquaculture for the production of biologically active metabolites: the influence of farming protocols and environment. *Aquaculture* **221,** 311-329 (2003b).

Duckworth, A. R., Battershill, C. N. & Bergquist, P. R. Influence of explant procedures and environmental factors on culture success of three sponges. *Aquaculture* **156,** 251-267 (1997).

Duckworth, A. R., Battershill, C. N. & Schiel, D. R. Effects of depth and water flow on growth, survival and bioactivity of two temperate sponges cultured in different seasons. *Aquaculture* **242,** 237-250 (2004).

Duckworth, A. R., Brück, W. M., Janda, K. E., Pitts, T. P. & McCarthy, P. J. Retention efficiencies of the coral reef sponges *Aplysina lacunosa*, *Callyspongia vaginalis* and Niphates digitalis determined by Coulter counter and plate culture analysis. *Marine Biology Research* **2,** 243-248 (2006).

Duckworth, A. R. & Pomponi, S. Relative importance of bacteria, microalgae and yeast for growth of the sponge *Halichondria melanadocia* (De Laubenfels, 1936): A laboratory study. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **323,** 151-159 (2005).

Duckworth, A. R. & Wolff, C. Bath sponge aquaculture in Torres Strait, Australia: Effect of explant size, farming method and the environment on culture success. *Aquaculture* **271,** 188-195 (2007).

Dussud, C. & Ghiglione, J.-F. La degradation des plastiques en mer [en ligne]. Disponible sur : http://www.sfecologie.org/regards/2014/12/26/r63-plastiques-en-mer-dussud-et-ghiglione/ (page consultée le 07 mars 2016).

Feng, D. Q., Qiu, Y., Wang, W., Wang, X., Ouyang, P. G. & Ke, C. H. Antifouling activities of Hymenialdisine and Debromohymenialdisine from the sponge *Axinella* sp. *International Biodeterioration and Biodegradation* **85,** 359-364 (2013).

Flannery, G., Lynch, S. A., Carlsson, J., Cross, T. F. & Culloty, S. Assessment of the impact of a pathogen, *Bonamia ostreae*, on *Ostrea edulis* oyster stocks with different histories of exposure to the parasite in Ireland. *Aquaculture* **432**, 243-251 (2014).

Fleury, P. G., Goyard, E., Mazurie, J., Claude, S., Bouget, J.F., Langlade, A. & Le Coguic, Y. The assessing of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) rearing performances by the IFREMER/REMORA network: method and first results (1993-98) in Brittany (France). *Hydrobiologia* **465,** 195-208 (2001).

Fu, W. T., Sun, L. M., Zhang, X. C. & Zhang, W. Potential of the marine sponge *Hymeniacidon perlevis* as a bioremediator of pathogenic bacteria in integrated aquaculture ecosystems. *Biotechnology and Bioengineering* **93,** 1112-1122 (2006).

Fu, W., Wu, Y., Sun, L. & Zhang, W. Efficient bioremediation of total organic carbon (TOC) in integrated aquaculture system by marine sponge *Hymeniacidon perleve*. *Biotechnology and Bioengineering* **97,** 1387-1397 (2007).

Gagnaire, B., Gay, M., Huvet, A., Daniel, J-Y., Saulnier, D. & Renault, T. Combination of a pesticide exposure and a bacterial challenge: *In vivo* effects on immune response of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquatic Toxicology* **84,** 92-102 (2007).

Gantzer, C., Dubois, E., Crance, J-M., Billaudel, S., Kopecka, H., Schwartzbrod, L., Pommepuy M. & Le Guyader F. Devenir des virus entériques en mer et influence des facteurs environnementaux. *Oceanologica Acta* **21,** 983-992 (1998).

Garderes, J., Taupin, L., Bin Saïdin, J., Dufour, A. & Le Pennec, G. N-acyl homoserine lactone production by bacteria within the sponge *Suberites domuncula* (Olivi, 1792) (Porifera, Demospongiae). *Marine Biology* **159,** 1685-1692 (2012).

Garnier, M., Labreuche, Y. & Nicolas, J.-L. Molecular and phenotypic characterization of *Vibrio aestuarianus* subsp. *francensis* subsp. nov., a pathogen of the Oyster *crassostrea gigas*. *Systemactic and Microbiology* **31,** 358-365 (2008).

Genta-Jouve, G., Cachet, N., Oberhänsli, F., Noyer, C., Teyssié, J.-L., Thomas, O. P. & Lacoue-Labarthe, T. Comparative bioaccumulation kinetics of trace elements in Mediterranean marine sponges. *Chemosphere* **89,** 340-349 (2012).

Gentric, C., Rehel, K., Dufour, A. & Sauleau, P. Bioaccumulation of metallic trace elements and organic pollutants in marine sponges from the South Brittany coast, France. *Journal of Environmental Science and Health Part A:* Toxic/hazardous substances & environmental engineering **51,** 213-219 (2016).

Gentric, C. & Sauleau, P. Distribution, abundance and pollution tolerance of the marine invasive sponge *Celtodoryx ciocalyptoides* (Burton, 1935) in the Etel River. *Cahiers de Biologie Marine* **57,** 57-64 (2016).

Gifford, S., Dunstan, R. H., O'Connor, W., Koller, C. E. & MacFarlane, G. R. Aquatic zooremediation: deploying animals to remediate contaminated aquatic environments. *Trends in Biotechnology* **25,** 60-65 (2007).

Gifford, S., Dunstan, R. H., O'Connor, W., Roberts, T. & Toia, R. Pearl aquaculture—profitable environmental remediation? *Science of The Total Environment* **319,** 27-37 (2004).

Goldberg, E. D. The mussel watch — A first step in global marine monitoring. *Marine Pollution Bulletin* **6,** 111 (1975).

Goldberg, E. D., Koide, M., Hodge, V., Flegal, A. R. & Martin, J. U. S. Mussel Watch: 1977–1978 results on trace metals and radionuclides. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **16,** 69-93 (1983).

Goulletquer, P., Soletchnik, P., Le Moine, O., Razet, D., Geairon, P., Faury, N. & Taillade, S. Summer mortality of the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* in the Bay of Marennes-Oleron (France). CIEM Conseil International pour l'Exploration de la mer, Cascais (Portugal), 16-19 Septembre 1998.

Gray, J. S. *Biomagnification in marine systems: the perspective of an ecologist*. Marine Pollution Bulletin **45,** 46 - 52 (2002).

Grizel, H. « Pathologie des mollusques bivalves et protection des cheptels coquilliers » dans Troader, J. P., *L'Homme et les Ressources Halieutiques*. Brest : IFREMER, p. 389-418 (1989).

Grizel, H. Les maladies des mollusques bivalves : risques et prévention. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties* **16,** 161-171 (1997).
Grizel, H., Bachere, E., Mialhe, E. & Tige, G. Solving parasite-related problems in cultured molluscs. *International Journal for Parasitology* **17,** 301-308 (1987).

Grizel, H. & Héral, M. Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). *Journal du Conseil Permanent International pour l'Exploration de la Mer* **47,** 399-403 (1991).

Guillaud, J. F. Les rejets urbains en mer. *Hydroécologie Appliquée* **2,** 159-172 (1992).

Gunasekera, S. P., Gunasekera, M., Longley, R. E. & Schulte, G. K. Discodermolide: a new bioactive polyhydroxylated lactone from the marine sponge *Discodermia dissoluta*. *Journal of Organic Chemistry* **55,** 4912-4915 (1990).

Handå, A., Ranheim, A., Olsen, A. J., Altin, D., Reitan, K. I., Olsen, Y. & Reinertsen, H. Incorporation of salmon fish feed and feces components in mussels (*Mytilus edulis*): Implications for integrated multi-trophic aquaculture in cool-temperate North Atlantic waters. *Aquaculture* **370-371,** 40-53 (2012).

Hansen, I. V., Weeks, J. M. & Depledge, M. H. Accumulation of copper, zinc, cadmium and chromium by the marine sponge *Halichondria panicea* Pallas and the implications for biomonitoring. *Marine Pollution Bulletin* **31,** 133-138 (1995).

Hattori, T., Adachi, K. & Shizuri, Y. New ceramide from marine sponge *Haliclona koremella* and related compounds as antifouling substances against macroalgae. *Journal of Natural Products* **61,** 823-826 (1998).

Hébert, S. & Légaré, S. Suivi de la qualité des rivières et petits cours d'eau, Québec, Direction du suivi de l'état de l'environnement, ministère de l'Environnement, envirodoq no ENV-2001-0141, rapport n° QE-123, 24 pages et 3 annexes (2000).

Henkel, D. & Janussen, D. Redescription and New Records of *Celtodoryx ciocalyptoides* (Demospongiae: Poecilosclerida)—a Sponge Invader in the North East Atlantic Ocean of Asian Origin? *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **91,** 347-355 (2011).

Hood, K. A., West, L. M., Rouwé, B., Northcote, P. T., Berridge, M. V., Wakefield, S. J. & Miller, J. H. Peloruside A, a novel antimitotic agent with paclitaxel-like microtubule-stabilizing activity. *Cancer Research* **62,** 3356-3360 (2002).

Howard, A. E. The possibility of long distance transmission of *Bonamia* by fouling on boat hulls. *Bulletin European association of Fish Pathologists* **14,** 211-212 (1994).

Hummel, H., Sepers, A. B. J., De Wolf, L. & Melissen, F. W. Bacterial growth on the marine sponge *Halichondria panicea* induced by reduced waterflow rate. *Marine Ecology Progress Series* 42, 195-198 (1988).

Hussenot, J. Les systèmes intégrés en aquaculture marine : une solution durable pour un meilleur respect de l'environnement littoral. Actes du Colloque *Pêche et Aquaculture : pour une exploitation durable des ressources vivantes de la mer et du littoral,* Nantes, 21-23 janvier 2004.

Inaba, K., Hiroyasu Sato, H., Masashi Tsuda, M. & Kobayashi, J. Spongiacidins A−D, new bromopyrrole alkaloids from *Hymeniacidon* sponge. *Journal of Natural Products* **61,** 693-695 (1998).

James, I. D. Modelling pollution dispersion, the ecosystem and water quality in coastal waters: a review. *Environmental Modelling and Software* **17,** 363-385 (2002).

Jokiel, P. L. Solar Ultraviolet Radiation and Coral Reef Epifauna. *Science* **207,** 1069-1071 (1980).

Jones, T. O. & Iwama, G. K. Polyculture of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), with Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. *Aquaculture* **92,** 313-322 (1991).

Kasiotis, K. M., Emmanouil, C., Anastasiadou, P., Papadi-Psyllou, A., Papadopoulos, A., Okay, O. & Machera, K. Organic pollution and its effects in the marine mussel *Mytilis galloprovincialis* in Eastern Mediterranean coasts. *Chemosphere* **119**, 145-152 (2015).

Kelly, M., Handley, S., Page, M., Butterfield, P., Hartill, B. & Kelly, S. Aquaculture trials of the New Zealand bath-sponge *Spongia* (*Heterofibria*) *manipulatus* using lanterns. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* **38,** 231-241 (2004).

Kitagawa, I., Kobayashi, M., Kitanaka, K., Kido, M. & Kyogoku, Y. Marine natural products. XII. On the Chemical Constituents of the Okinawan Marine Sponge *Hymeniacidon aldis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **31**, 2321-2328 (1983).

Kobayashi, J., Kanda, F., Ishibashi, M. & Shigemori, H. Manzacidins A-C, novel tetrahydropyrimidine alkaloids from the Okinawan marine sponge *Hymeniacidon* sp. Journal of Organic Chemistry **56,** 4574-4576 (1991).

Kobayashi, J., Ohizumi, Y., Nakamura, H. & Hirata, Y. A novel antagonist of serotonergic, hymenidin, isolated from the Okinawan marine sponge *Hymeniacidon* sp. Experientia **42,** 1176-1177 (1986a).

Kobayashi, J, Ohizumi, Y, Nakamura, H. Hirata, Y. Wakamatsu, Y. & Miyazawa, T. Hymenin, a novel 7-adrenoceptor blocking agent from the Okinawan marine sponge *Hymeniacidon* sp. *Cellular and Molecular Life Sciences* **42,** 1064-1065 (1986b).

Kobayashi, J., Suzuki, M. & Tsuda, M. Konbu'acidin A, a new bromopyrrole alkaloid with cdk4 inhibitory activity from *Hyminiacidon* Sponge. *Tetrahedron* **53,** 15681-15684 (1997).

Kobayashi, J., Tsuda, M., Nakamura, T., Mikami, Y. & Shigemori, H. Hymenamides A and B, new proline-rich cyclic heptapeptides from the okinawan marine sponge *Hymeniacidon* sp. *Tetrahedron* **49,** 2391-2402 (1993).

Kobayashi, J., Nakamura, T. & Tsuda, M. Hymenamide F, New Cyclic Heptapeptide from Marine Sponge *Hymeniacidon* sp. *Tetrahedron* **52**, 6355-6360 (1996).

Kwon, B. G., Koizumi, K., Chung, S.-Y., Kodera, Y., Kim, J.-O. & Saido, K. Global styrene oligomers monitoring as new chemical contamination from polystyrene plastic marine pollution. *Journal of Hazardous Materials* **300,** 359-367 (2015).

Labreuche, Y., Lambert, C., Soudant, P., Boulo, V., Huvet, A. & Nicolas, J.-L. Cellular and molecular hemocyte responses of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*, following bacterial infection with *Vibrio aestuarianus* strain 01/32. *Microbes and Infection* **8,** 2715-2734 (2006a).

Labreuche, Y., Soudant, P., Gonçalves, M., Lambert, C. & Nicolas, J.-L. Effects of extracellular products from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on lethality and cellular immune response of the oyster *Crassostrea gigas*. *Development and Comparative Immunology* **30,** 367-379 (2006b).

Lambert, L. Les gisements naturels d'huîtres indigènes (*Ostrea edulis*) et d'huîtres portugaises (*Gryphea angulata*) sur les côtes françaises. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* **11,** 465-476 (1938).

Larsen, P. S. & Riisgård, H. U. The sponge pump. *Journal of Theoretical Biology* **168,** 53-63 (1994).

Le Deuff, R.-M. & Renault, T. Purification and partial genome characterization of a herpes-like virus infecting the Japanese oyster, *C. gigas*. *Journal of General Virology* **80,** 1317-1322 (1999).

Le Pennec, G., Perovic, S., Ammar, M. S. A., Grebenjuk, V. A., Steffen, R., Brümmer, F. & Müller, W. E. G. Cultivation of primmorphs from the marine sponge *Suberites domuncula*: morphogenetic potential of silicon and iron. *Journal of Biotechnology* **100,** 93-108 (2003).

Le Roux, F., Gay, M., Lambert, C., Nicolas, J.L., Gouy, M. & Berthe F. Phylogenetic study and identification of *Vibrio splendidus*-related strains based on *gyrB* gene sequences. *Diseases of Aquatic Organisms* **58,** 143-50 (2004).

Le Roux, F., Gay, M., Lambert, C., Waechter, M., Poubalanne, S., Chollet, B., Nicolas, J. L. & Berthe, F. Comparative analysis of *Vibrio splendidus*-related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. *Aquatic Living Resources* **15,** 251-258 (2002).

Le Saux, J. C. & Pommepuy, M. La purification des coquillages. *Risques sanitaires liés aux coquillages – Dossier S.I.A*. (2003).

Li, Z., Dong, T., Proschel, C. & Noble, M. Chemically diverse toxicants converge on Fyn and c-Cbl to disrupt precursor cell function. *PLOS Biology* **5,** e35 (2007).

Longo, C., Corriero, G., Licciano, M. & Stabili, L. Bacterial accumulation by the Demospongiae *Hymeniacidon perlevis*: A tool for the bioremediation of polluted seawater. *Marine Pollution Bulletin* **60,** 1182-1187 (2010).

Louden, D., Inderbitzin, S., Peng, Z. & de Nys, R. Development of a new protocol for testing bath sponge quality. *Aquaculture* **271,** 275-285 (2007).

Lupo, C., François, C., Arzul, I., Garcia, C., Joly, J-P. & Renault, T. Défis de la surveillance des maladies chez les coquillages marins en France. *Epidémiologie et Santé animale* **61,** 27-42 (2012).

Madin, J., Chong, V. C. & Basri, B. Development and short-term dynamics of macrofouling assemblages on fish-cage nettings in a tropical estuary. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **83,** 19-29 (2009).

Mahaut, M.-L., Basuyaux, O., Baudinière, E., Chataignier, C., Pain, J. & Caplat, C. The porifera *Hymeniacidon perlevis* (Montagu, 1814) as a bioindicateur for water quality monitoring. *Environment Science and Pollution Research* **20,** 2984-2992 (2012).

Manuel, M., Boury-Esnault, N. & Vacelet, J. L'éponge… une république cellulaire. *Pour la Science* **310,** 27-34 (2003).

Marchand M. La pollution chimique marine. Quelles politiques pour une protection durable de l'océan et des mers côtières ? *Actualité Chimique* **325,** 35-40 (2008).

Mayer, A. M. S. & Gustafson, K. R. Marine pharmacology in 2005–2006: Antitumour and cytotoxic compounds. *European Journal of Cancer* **44,** 2357-2387 (2008).

Mayer, A. M. S. & Hamann, M. T. Marine pharmacology in 1999: compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anthelmintic, anti-inflammatory, antiplatelet, antiprotozoal and antiviral activities affecting the cardiovascular, endocrine, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **132,** 315-339 (2002).

McCaffrey, E. J. & Endean, R. Antimicrobial activity of tropical and subtropical sponges. *Marine Biology* **89,** 1-8 (1985).

McLellan, S. L. & Eren, A. M. Discovering new indicators of fecal pollution. *Trends in Microbiology* **22,** 697-706 (2014).

Meylan A. « Nutritional characteristics of the sponges in the diet of the hawksbill turtle » dans Rutzler, K., *New Perspectives in Sponges Biology*. Washington : Institution Press, p. 472-477 (1990).

Mialhe, E., Bachère, E., Chagot, D. & Grizel, H. Isolation and purification of the Protozoan *Bonamia ostrea,* a parasite affecting the flat oyster *Ostrea edulis. Aquaculture* **71,** 293-299 (1988).

Milanese, M., Chelossi, E., Manconi, R., Sarà, A., Sidri, M. & Pronzato, R. The marine sponge *Chondrilla nucula* Schmidt, 1862 as an elective candidate for bioremediation in integrated aquaculture. *Biomolecular Engineering* **20,** 363-368 (2003).

Ministère de l'écologie, du développement durable et de l'énergie [en ligne]. Disponible sur http://www.developpement-durable.gouv.fr/Le-contexte.html (page consultée le 17 février 2016).

Ministère des affaires sociales, de la santé et des droits des femmes [en ligne]. Disponible sur http://baignades.sante.gouv.fr/baignades/editorial/fr/accueil.html (page consultée le 17 février 2016).

Ministère des finances et des comptes publics [en ligne]. Disponible sur http://www.tresor.economie.gouv.fr/2150_tresor-eco-2010-2011 (page consultée le 16 février 2016).

Mottier, A., Séguin, A., Devos, A., Le Pabic, C., Voiseux, C., Lebel, J. M., Serpentini, A., Fievet, B. & Costil, K. Effects of subchronic exposure to glyphosate in juvenile oysters (*Crassostrea gigas*): From molecular to individual levels. *Marine Pollution Bulletin* **95,** 665-677 (2015).

Mottin, E., Caplat, C., Latire, T., Mottier, A., Mahaut, M-L., Costil, K., Barillier, D., Lebel, J.-M. & Serpentin, A. Effect of zinc sacrificial anode degradation on the defence system of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: Chronic and acute exposures. *Marine Pollution Bulletin* **64,** 1911-1920 (2012).

Morel, M. *Surveillance de la qualité de l'environnement littoral.* Brest : IFREMER, 72 pages (1999).

Müller, W. E. G., Zahn, R. K., Kurelec, B., Lucu, C., Müller, I. & Uhlenbruck, G. Lectin, a possible basis for symbiosis between bacteria and sponges. *Journal of Bacteriology* **145,** 548-558 (1981).

Munaron, D., Dubernet, J. F., Delmas, F., Stanisiere, J. Y. & Scribe, P. Assessment of the quantities of herbicides and nutrients brought down by the river Charente to the coast and modelling of the dispersion of atrazine in the Marennes-Oleron bay. *Cahiers de Biologie Marine* **47,** 85-92 (2006).

Munaron, D., Tapie, N., Budzinski, H., Andral, B. & Gonzalez, J-L. Pharmaceuticals, alkylphenols and pesticides in Mediterranean coastal water: Results from a pilote survey using passive samplers. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **114,** 82-92 (2012).

Munro, M. H. G., Blunt, J. W., Dumdei, E. J., Hickford, S. J. H., Lill, R. E., Li, S., Battershill, C. N. & Duckworth, A. R. The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. *Journal of Biotechnology* **70,** 15-25 (1999).

Naciri-Graven, Y., Martin, A. G., Baud, J. P., Renault, T. & Gerard, A. Selecting the flat oyster *Ostrea edulis* (L.) for survival when infected with the parasite *Bonamia ostreae. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **224**, 91-107 (1998).

Napolitano, A., Bruno, I., Rovero, P., Lucas, R., Payà Peris, M., Gomez-Paloma, L. & Riccio, R. Synthesis, structural aspects and bioactivity of the marine cyclopeptide hymenamide C. *Tetrahedron* **57,** 6249-6255 (2001).

Nelson, E. J., MacDonald, B. A. & Robinson, S. M. C. The absorption efficiency of the suspension-feeding sea cucumber, *Cucumaria frondosa*, and its potential as an extractive integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) species. *Aquaculture* **370,** 28-38 (2012).

Neori, A., Chopin, T., Troell, M., Buschmann, A.H., Kraemer, G. P., Halling, C., Shpigel, M. & Yarish, C. Integrated aquaculture: rationale, evolution and state of the art emphasizing seaweed biofiltration in modern mariculture. *Aquaculture* 231, 361-391 (2004).

NF EN 13432 Novembre 2000. Emballage - Exigences relatives aux emballages valorisables par compostage et biodégradation - Programme d'essai et critères d'évaluation de l'acceptation finale des emballages.

NF EN ISO 9308-3 Mars 1999. Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement des Escherichia coli et des bactéries coliformes dans les eaux de surface et résiduaires - Partie 3 : méthode miniaturisée (nombre le plus probable) pour ensemencement en milieu liquide.

Normand, J., Li, R., Quillien, V., Nicolas, J-L., Boudry, P., Pernet, F. & Huvet, A. Contrasted survival under field or controlled conditions displays associations between mRNA levels of candidate genes and response to OsHV-1 infection in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* **15,** 95-102 (2014).

Northcote, P. T., Blunt, J. W. & Munro, M. H. G. Pateamine: a potent cytotoxin from the New Zealand Marine sponge, *Mycale* sp. *Tetrahedron Letters* **32,** 6411-6414 (1991).

Oaten, J. F. P., Hudson, M. D., Jensen, A. C. & Williams, I. D. Effects of organism preparation in metallothionein and metal analysis in marine invertebrates for biomonitoring marine pollution. *Science of the Total Environment* **518,** 238-247 (2015).

Olesen, T. M. E. & Weeks, J. M. Accumulation of Cd by the marine sponge *Halichondria panicea* Pallas: effects upon filtration rate and its relevance for biomonitoring. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **52,** 722-728 (1994).

Organisation Maritime Internationale [En ligne]. Disponible sur http://www.imo.org/pages/home.aspx (page consultée le 13 mars 2016).

Osinga, R., de Beukelaer, P. B., Meijer, E. M., Tramper, J. & Wijffels, R. H. Growth of the sponge *Pseudosuberites* (aff.) andrewsi in a closed system. *Journal of Biotechnology* **70,** 155-161 (1999a).

Osinga, R., Tramper, J. & Wijffels, R. H. Cultivation of marine sponges. *Marine Biotechnology* **1,** 509-532 (1999b).

Osinga, R., Sidri, M., Cerig, E., Gokalp, S. Z. & Gokalp, M. Sponge aquaculture trials in the East-Mediterranean Sea: new approaches to earlier ideas. *The Open Marine Biology Journal* **4,** 74-81 (2010).

Page, M., Handley, S. J., Northcote, P., Cairney, D. & Willan, R. C. Successes and pitfalls of the aquaculture of the sponge *Mycale hentscheli*. *Aquaculture* **312,** 52-61 (2011).

Page, M., West, L., Northcote, P., Battershill, C. & Kelly, M. Spatial and temporal variability of cytotoxic metabolites in populations of the New Zealand sponge *Mycale hentscheli*. *Journal of Chemical Ecology* **31,** 1161-1174 (2005).

Pasqualini, V., Pergent-Martini, C. & Pergent G. Environmental impacts identification along corsican coasts (Mediterranean Sea) using image processing. *Aquatic Botany* **65,** 311-320 (1999).

Patel, B., Balani, M. C. & Patel, S. Sponge 'sentinel' of heavy metals. *Science of the Total Environment* **41,** 143-152 (1985).

Pettit, G. R., Clewlow, P. J., Dufresne, C. & Doubek, D. L. Isolation and structure of the cyclic peptide hymenistatin 1. *Canadian Journal of Chemistry* **68,** 708 (1990).

Pérez-Lopez, P., Ternon, E., Gonzalez-Garcia, S., Genta-Jouve, G., Feijoo, G., Thomas, O. P. & Moreira, M. T. Environmental solutions for the sustainable production of bioactive natural products from the marine sponge *Crambe. Science of the Total Environment* **475,** 71-82 (2014).

Perez, T., Perrin, B., Carteron, S., Vacelet, J. & Boury-Esnault, N. *Celtodoryx girardae* gen. nov. sp. nov., a new sponge species (Poecilosclerida: Demospongiae) invading the Gulf of Morbihan (North East Atlantic, France). *Cahiers de Biologie Marine* **47,** 205-214 (2006).

Perry, N. B., Blunt, J. W., Munro, M. H. G. & Pannell, L. K. Mycalamide A, an antiviral compound from a New Zealand sponge of the genus *Mycale*. *Journal of the American Chemical Society* **110,** 4850-4851 (1988).

Pergent-Martini, C. & Pergent, G. Are marine phanerogams a valuable tool in the evaluation of marine trace-metal contamination: example of the Mediterranean Sea? *International Journal of Environmental Pollution* **13,** 126-147 (2000).

Pomponi, S. A. Biology of the Porifera: cell culture. *Canadian Journal of Zoology* **84,** 167-174 (2006).

Porifarma [en ligne]. Disponible sur : http://www.porifarma.com/ (page consultée le 30 janvier 2016).

Producteur d'huîtres [en ligne]. Disponible sur : http://www.lhuitrier.fr/ (page consultée le 29 mars 2016).

Proksch, P. Defensive roles for secondary metabolites from marine sponges and sponge-feeding nudibranchs. *Toxicon* **32,** 639-655 (1994).

Pronzato, R. Sponge farming in the Mediterranean Sea: new perspectives. *Memoirs of The Queensland Museum* **44,** 485-491 (1999).

Pronzato, R. A climber sponge. *Bollettino dei Musei e Degli Istituti Biologici dell'Università di Genova* **68,** 549-552 (2004).

Pubchem [en ligne]. Disponible sur : http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6439099#section=Top (page consultée le 14 janvier 2016).

Rashid, Z. M., Lahaye, E., Defer, D., Douzenel, P., Perrin, B., Bourgougnon, N. & Sire, O. Isolation of a sulfated polysaccharide from a recently discovered sponge species (*Celtodoryx girardae*) and determination of its anti-herpetic activity. *International Journal of Biological Macromolecules* **44,** 286-293 (2009).

Règlement (CE) n° 466/2001. *Journal officiel de l'Union Européenne* [en ligne]. Disponible sur : http://www.developpement-durable.gouv.fr (page consultée le 12 mars 2016).

Règlement (CE) n° 854/2004. *Journal officiel de l'Union Européenne* [en ligne]. Disponible sur : http://www.developpement-durable.gouv.fr (page consultée le 12 mars 2016).

Reiswig, H. M. Particle feeding in natural populations of three marine Demospongiae. *Biological Bulletin of the Marine Biological Laboratory* 141, 568-591 (1971).

Ren, J. S., Stenton-Dozey, J., Plew, D. R., Fang, J. & Gall, M. An ecosystem model for optimising production in integrated multitrophic aquaculture systems. *Ecological Modelling* **246,** 34-36 (2012).

Renault, T. Les virus infectant les mollusques marins : un exemple d'actualités, les herpèsvirus. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France* **164,** 359-364 (2011).

Renault, T., Le Deuff, R., Cochennec, N., Chollet, B. & Maffart, P. Herpes-like viruses associated with high mortality levels in larvae and spat of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*: A comparative study, the thermal effects on virus detection in hatchery-reared larvae, reproduction of the disease in axenic larvae. *Veterinary Research* **26,** 539-543 (1995).

Renault, T., Le Deuff, R., Cochennec, N. & Maffart, P. Herpesviruses associated with mortalities among Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in France – Comparative study. *Revue de Medecine Vétérinaire* **145,** 735-742 (1994).

Renault, T. & Novoa, B. Viruses infecting bivalve molluscs. *Aquatic Living Resource* **17,** 397-409 (2004).

Riisgård, H. U. & Larsen, P. S. Filter-feeding in marine macro-invertebrates: Pump characteristics, modelling and energy cost. *Biological Reviews Cambridge Philosophical Society* **70,** 67-106 (1995).

Robert, R., Borel, M., Pichot, Y. & Trut, G. Growth and mortality of the European oyster *Ostrea edulis* in the Bay of Arcachon (France). *Aquatic Living Resources* **4**, 265-274 (1991).

Romo, D., Rzasa, R. M., Shea, H. A., Park, K., Langenhan, J. M., Sun, L., Akhiezer, A. & Liu, J. O. Total synthesis and immunosuppressive activity of (-)-pateamine A and related compounds: Implementation of a β-lactam-based macrocyclization. *Journal of the American Chemical Society* **120,** 12237-12254 (1998).

Saulnier, D., De Decker, S. & Haffner, P. Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio aestuarianus* in oyster and seawater: A useful tool for epidemiologic studies. *Journal of Microbiological Methods* **77,** 191-197 (2009).

Schikorski, D., Renault, T., Saulnier, D. Faury, N., Moreau, P. & Pépin, J.-F. Experimental infection of Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat by ostreid herpesvirus 1: Demonstration of oyster spat susceptibility. *Veterinary research* **42,** 1-13 (2011).

Schmitz, F. J., Gunasekera, S P., Lakshmi, V. & Tillekeratne, L. M. V. Marine natural products: Pyrrololactams from several sponges. *Journal of Natural Products* ***48,*** 47-53 (1985).

Schmitz, F. J., Bowden, B. F. & Toth, S. I. « Pharmaceutical and Bioactive Natural Products », dans Attaway, D. H. & Zaborsky, O. R., *Marine Biotechnology.* New York : Springer US, p. 197-308 (1993).

Segarra, A., Pepin, J.F., Arzul, I., Morga, B., Faury, N. & Renault, T. Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Virus Research* **153,** 92-95 (2010).

Shick, J. M., Lesser, M. P. & Jokiel, P. L. Effects of ultraviolet radiation on corals and other coral reef organisms. *Global Change Biology* **2,** 527-545 (1996).

Shimizu, Y., Norte, M., Hori, A., Genenah, A. & Kobayashi, M. Biosynthesis of saxitoxin analogues: The unexpected pathway. *Journal of the American Chemical Society* **106,** 6433-6434 (1984).

Silva, E., Daam, M. A. & Cerejeira, M. J. Aquatic risk assessment of priority and other river basin specific pesticides in surface waters of Mediterranean river basins. *Chemosphere* **135,** 394-402 (2015).

Simpson, T. L. *The Cell Biology of Sponges*. New York : Springer US, 627 pages (1984).

Södergard, A. & Stolt, M. Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition. *Progress in Polymer Science* **27,** 1123-1163 (2002).

Soletchnik, P., Ropert, M., Mazurié, J., Gildas Fleury, P. & Le Coz, F. Relationships between oyster mortality patterns and environmental data from monitoring databases along the coasts of France. *Aquaculture* **271,** 384-400 (2007).

Song, Y., Cao, X. & Zhang, W. Cellular localization and quantification of bioactive alkaloids hymenialdisine and debromohymenialdisine in marine sponge *Axinella* sp. *Journal of Biotechnology* **136,** 577-588 (2008).

Stabili, L., Licciano, M., Giangrande, A., Longo, C., Mercurio, M., Marzano, C. N. & Corriero, G. Filtering activity of *Spongia officinalis* var. *adriatica* (Schmidt) (Porifera, Demospongiae) on bacterioplankton: Implications for bioremediation of polluted seawater. *Water Research* **40,** 3083-3090 (2006).

Stabili, L., Licciano, M., Longo, C., Corriero, G. & Mercurio, M. Evaluation of microbiological accumulation capability of the commercial sponge *Spongia officinalis var. adriatica* (Schmidt) (Porifera, Demospongiae). *Water Research* **42,** 2499-2506 (2008).

Sipkema, D., Fransen, M. C. R., Osinga, R., Tramper, J. & Wijffels, R. H. Marine sponges as pharmacy. *Marine Biotechnology* **7,** 142-162 (2005).

Storr, J. F. *Ecology of the Gulf of Mexico commercial sponges and its relation to the fishery*. Washington : United States Fish and Wildlife Service, 73 pages (1964).

Strady, E., Blanc, G., Baudrimont, M., Schäfer, J., Robert, S. & Lafon, V. Roles of regional hydrodynamic and trophic contamination in cadmium bioaccumulation by Pacific oysters in the Marennes-Oleron Bay (France). *Chemosphere* **84,** 80-90 (2011).

Stuart, V. & Klumpp, D. W. Evidence for food-resource partitioning by kelp-bed filter feeders. *Marine Ecology Progress Series* **16**, 27-37 (1984).

Ter Haar, E., Kowalski, R. J., Hamel, E., Lin, C. M., Longley, R. E., Gunasekera, S. P., Rosenkranz, H. S. & Day, B. W. Discodermolide, a cytotoxic marine agent that stabilizes microtubules more potently than taxol. *Biochemistry* **35,** 243-250 (1996).

Thompson, J. E. Exudation of biologically-active metabolites in the sponge *Aplysina fistularis*. *Marine Biology* **88,** 23-26 (1985).

Torres, A., Li S. M. & Roussos, M. Screening of microorganisms for biodegradation of poly(lactic acid) and lactic acid-containing polymers. *Applied and Environmental Microbiology* **62,** 2393-2397 (1996).

Torres, Y. R., Berlinck, R. G. S., Nascimento, G. F., Fortier, S. C., Pessoa, C. & Moraes, M., O. Antibacterial activity against resistant bacteria and cytotoxicity of four alkaloid toxins isolated from the marine sponge *Arenosclera brasiliensis*. *Toxicon* **40,** 885-891 (2002).

Thacker, R. W. & Freeman, C. J. Sponge-microbe symbioses: recent advances and new directions. *Advances in Marine Biology* **62,** 57-111 (2012).

Troell, M., Joyce, A., Chopin, T., Neori, A., Buschmann, A. H. & Fang, J.-G. Ecological engineering in aquaculture — Potential for integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) in marine offshore systems. *Aquaculture* **297,** 1-9 (2009).

Tsuda, M., Shigemori, H., Mikami, Y. & Kobayashi, J. Hymenamides C-E, new cyclic heptapeptides with two proline residues from the okinawan marine sponge *Hymeniacidon* sp. *Tetrahedron* **49,** 6785-6796 (1993).

Tsuda, M., Sasaki, T. & Kobayashi, J. Hymenamides G, H, J, and K, four new cyclic octapeptides from the Okinawan marine sponge *Hymeniacidon* sp. *Tetrahedron* **50,** 4667-4680 (1994).

Tsukamoto, S., Kato, H., Hirota, H. & Fusetani, N. Pseudoceratidine: A new antifouling spermidine derivative from the marine sponge *Pseudoceratina purpurea*. *Tetrahedron Letters* **37,** 1439-1440 (1996a).

Tsukamoto, S., Kato, H., Hirota, H. & Fusetani, N. Ceratinamides A and B: New antifouling dibromotyrosine derivatives from the marine sponge *Pseudoceratina purpurea*. *Tetrahedron* **52,** 8181-8186 (1996b).

Uemura, D., Takahashi, K., Yamamoto, T., Katayama, C., Tanaka, J., Okumura, Y. & Hirata, Y. Norhalichondrin A: an antitumor polyether macrolide from a marine sponge. *Journal of the American Chemical Society* **107,** 4796-4798 (1985).

Vacelet, J. Bases historiques et biologiques d'une éventuelle spongiculture. *Océanis* **11,** 551-584 (1985).

Vacelet, J. & Boury-Esnault, N. *Taxonomy of Porifera from the N. E. Atlantic and Mediterranean Sea*. Berlin : Springer-Verlag, 332 pages (1987).

Vacelet, J. & Donadey, C. Electron microscope study of the association between some sponges and bacteria. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **30,** 301-314 (1977).

Van Treeck, P., Eisinger, M., Müller, J., Paster, M. & Schuhmacher, H. Mariculture trials with Mediterranean sponge species: The exploitation of an old natural resource with sustainable and novel methods. *Aquaculture* **218,** 439-455 (2003).

Vazquez-Roig, P., Andreu, V., Blasco, C. & Pico, Y. Risk assessment on the presence of pharmaceuticals in sediments, soils and waters of the Pego-Oliva Marshlands (Valencia, eastern Spain). *Science of the Total Environment* **440,** 24-32 (2012).

Verdenal, B. & Vacelet, J. "Sponge culture on vertical ropes in the Northwestern Mediterranean Sea" dans Rützler, K., *New Perspectives in Sponge Biology.* Washington : Smithsonian Institution Press, p. 416-424. (1990).

Walczak, M., Brzezinska, M. S., Sionkowska, A., Michalska, M., Jankiewicz, U. & Deja-Sikora, E. Biofilm formation on the surface of polylactide during its biodegradation in different environments. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **136,** 340-345 (2015).

Webster, N. S. & Taylor, M. W. Marine sponges and their microbial symbionts: love and other relationships: Marine sponge microbiology. *Environmental Microbiology* **14,** 335-346 (2012).

Wehrl, M., Steinert, M. & Hentschel, U. Bacterial Uptake by the Marine Sponge *Aplysina aerophoba*. *Microbial Ecology* **53,** 355-365 (2007).

Wesche, S. J., Adlard, R. D. & Hopper, J. N. A. The first incidence of clinoid sponges (Porifera) from the Sydney rock oyster *Saccostrea commercialis* (Iredale and Roughley, 1933). *Aquaculture* **175,** 173-180 (1997).

Wilkinson, C. R., Garrone, R. & Vacelet, J. Marine sponges discriminate between food bacteria and bacterial symbionts: electron microscope radioautography and *in situ* evidence. *Proceedings of the Royal Society (Ser B)* **220,** 519-528 (1984).

Wilkinson, C. R. & Vacelet, J. Transplantation of marine sponges to different conditions of light and current. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **37,** 91-104 (1979).

Williamson, M. H. & Fitter, A. The characters of successful invaders. *Biological Conservation* **78,** 163-170 (1996).

White, J. D. & Kawasaki, M. Total synthesis of (+)-latrunculin A, an ichthyotoxic metabolite of the sponge *Latrunculia magnifica* and its C-15 epimer. *The Journal of Organic Chemistry* **57,** 5292-5300 (1992).

World Register of Marine Species – WoRMS [en ligne]. Disponible sur http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=132663 (page consultée le 21 décembre 2016).

Yokoyama, H. Growth and food source of the sea cucumber *Apostichopus japonicus* cultured below fish cages – Potential for integrated multi-trophic aquaculture. *Aquaculture* **372,** 28-38 (2013).

Yu, Z., Zhu, X., Jiang, Y., Luo, P., & Hu. C. Bioremediation and fodder potentials of two *Sargassum* spp. in coastal waters of Shenzhen, South China. *Marine Pollution Bulletin* **85,** 797-802 (2014).

Zhang, H., Jin, Y. & Zhang, W. Two bioactive aldisine alkaloids isolated from marine sponge *Axinella* sp. in the South China Sea. *Journal of Chinese Medicine* **29,** 1299-1301 (2006).

Zhang, X., Zhang, W., Xue, L. & Zhang, B. Feasibility of sponge *Hymeniacidon perlevis* in controlling pathogenic bacteria in turbot *Scophthalmus maximus*-culture water system. *Journal of Biotechnology* **136,** 685 (2008).

Zouboulis, P. A. & Moussas, P. A. “Groundwater and soil pollution: Bioremediation” dans Jerome O. N., *Encyclopedia of Environmental Health*. Londres : Elsevier, p. 1037-1044 (2011).

Annexes

A.1. Poster présenté au congrès Eurobiofilm 2013 : 3ème prix du meilleur poster

Impact of an exopolysaccharide from the marine introduced sponge *Celtodoryx ciocalyptoides* on biofilm formation

Gentric Charline and Sauleau Pierre

Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines, EA3884, Université de Bretagne-Sud (UEB), Institut Universitaire Européen de la Mer, Lorient, France

charline.gentric@univ-ubs.fr

Introduction

The marine sponge *Celtodoryx ciocalyptoides* is recently discovered near shellfish farms in the Ria d'Etel and in the Golfe du Morbihan (France). This species is probably originate from the Chinese Yellow Sea and have been introduced by the transfer of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to aquaculture farms. *C. ciocalyptoides* is characterized by the secretion of large amounts of transparent and viscous mucus composed of high molecular weight sulfated polysaccharide (> 800 kDa). In this study, are presented the preliminary results concerning the polysaccharide effects on *Escherichia coli* and *Paracoccus* 4M6 biofilm formation.

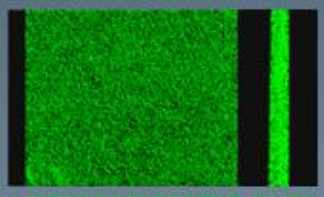
Materials and methods

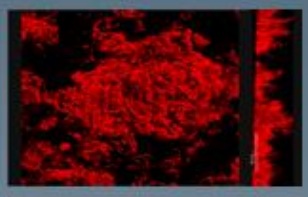
The sponge was collected by scuba diving at a depth of 15 m in the Ria d'Etel. To recover the mucus secreted, the sponge was placed in a funnel over a beaker and polysaccharides were precipitated with absolute ethanol then centrifuged. The pellet was dissolved in distilled water before analysis for their proteins, neutral sugars and sulfates content. To investigate the effect of the sponge's polysaccharide on marine bacterial biofilm formation, a system of flow chambers was used. The biofilm was observed after 48 hours at 20 °C by confocal laser scanning microscopy after staining with syto 9 and syto 61 for *E. coli* and 4M6 respectively.

Results and discussion

- Chemical composition of polysaccharide isolated from the marine sponge *C. ciocalyptoides* :
  - Neutral sugars represent approximately 65 % of the chemical composition of polysaccharides. The sulfate content is 30 %. As expected, low protein contents are observed (1 %) (Rashid *et al.*, 2009).
- Overview of the 3D structure of *E. coli* biofilm after 48 h by confocal laser scanning microscopy :

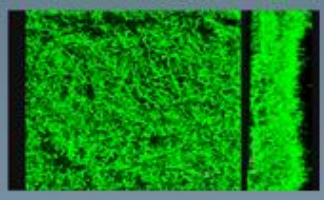
Biofilm *E. coli*
Standard condition
Biomass : 2.65 µm³/µm²
Thickness : 4.74 µm

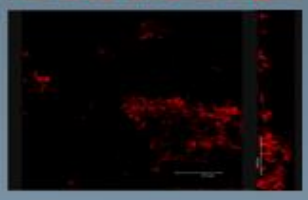




Biofilm 4M6
Standard condition
Biomass : 1.06 µm³/µm²
Thickness : 4.72 µm

Biofilm *E. coli*
20 mg EPS/mL
Biomass : 9.85 µm³/µm²
Thickness : 15.95 µm





Biofilm 4M6
20 mg EPS/mL
Biomass : 0.18 µm³/µm²
Thickness : 0.61 µm

- Without polysaccharide, *E. coli* biofilm is homogeneous. With 20 mg/mL of polysaccharide, biomass and biofilm thickness are multiplied by 5. In contrast, same concentration of polysaccharide has a negative effect on 4M6 biofilm formation.
- The activity of polysaccharides is not related to their protein content as consistent with previous results. Sponges harbor a impressive quantity microbial communities of considerable ecological importance (Webster and Taylor, 2012). The sponge-bacteria relationships are complex and bacteria can play several roles. It is possible that *C. ciocalyptoides* tolerate and/or favors colonization of some bacterial species as food supply. Polysaccharides may be necessary for the cell-to-surface interactions so for the formation of biofilm (Rendueles *et al.*, 2013).

Conclusion

The polysaccharides of *C. ciocalyptoides* has a positive effect on *E. coli* biofilm formation. The next phase of this work will be to observe the effect of polysaccharide on the *E. coli* adhesion. In parallel, experiments of contamination by *E. coli* in aquarium with *C. ciocalyptoides* are necessary to show that the sponge is able to filter and digest bacteria.

- Rashid, T. M., Lahaye, E., Delic, D., Douzenel, P., Perin, B., Bourgougnon, N., Sire, O. *International Journal of Biological Macromolecules* 44, 188-193 (2009).
- Rendueles, O., Kaplan, J. B., Ghigo, J.-M. *Environmental Microbiology* 15, 334-346 (2013).
- Webster, N. S., Taylor, W. *Environmental Microbiology* 14, 335-346 (2012).

A.2. Diffusion scientifique

- Publications

I. Gentric, C. and Sauleau, P. Distribution, abundance and pollution tolerance of the marine invasive sponge *Celtodoryx ciocalyptoides* (Burton, 1935) in the Etel River. *Cahiers de Biologie Marine* **57,** 57-64 (2016).

II. Gentric, C., Rehel, K., Dufour, A. and Sauleau, P. Bioaccumulation of metallic trace elements and organic pollutants in marine sponges from the South Brittany coast, France. *Journal of Environmental Science and Health* **51,** 213-219 (2016).

- Demande de dépôt de brevet

I. Charline Gentric, Pierre Sauleau et Stéphane Bruzaud (2016). Nouveau support de culture pour éponges marines.

- Communications orales

I. Charline Gentric (2013). Bioremédiation *in situ* des parcs conchylicoles par les éponges marines. 12ème forum des doctorants de l'Institut Universitaire Européen de la Mer, Brest, France.

II. Charline Gentric and Pierre Sauleau (2014). The marine invasive sponge *Celtodoryx ciocalyptoides* as a renewable source of natural compounds "Drugs from the sea" workshop, Eilat, Israël.

III. Charline Gentric and Pierre Sauleau (2014). The marine invasive sponge *Celtodoryx ciocalyptoides,* an abundant and renewable source of natural compounds. Molécules et Ingrédient Santé, Quimper, France.

- Posters

I. Charline Gentric, Pierre Sauleau et Karine Réhel (2013). Bioremédiation des parcs conchylicoles par les éponges marines. Congrès national des Jeunes Chercheurs en Ecologie Chimique, Montpellier, France.

II. Charline Gentric and Pierre Sauleau (2013). Impact of an exopolysaccharide from the marine introduced sponge *Celtodoryx ciocalyptoides*. Eurobiofilm 2013 international congress, Ghent, Belgium **(3rd prize Poster Award)**.

III. Charline Gentric and Pierre Sauleau (2014). The marine invasive sponge *Celtodoryx ciocalyptoides* as a renewable source of natural compounds facing the supply problem? “Drugs from the sea” workshop, Eilat, Israël.

IV. Charline Gentric and Pierre Sauleau (2014). The marine invasive sponge *Celtodoryx ciocalyptoides,* an abundant and renewable source of natural compounds. Molécules et Ingrédient Santé, Quimper, France.

- Projet de creation d’entreprise

I. **Concours universitaire START’UBS 2014.** Programme d’accompagnement à la création d’une entreprise innovante. Projet LECOMER : un nouveau procédé biologique de dépollution des eaux portuaires **(Lauréat)**.

II. **Les Trophées de l’Innovation 56 2014.** Les Trophées de l'Innovation 56, organisés par la CCI du Morbihan et ses partenaires, récompensent les entreprises et les porteurs de projet du Morbihan qui développent une innovation. Projet LECOMER : un nouveau procédé biologique de dépollution des eaux portuaires **(Lauréat)**.

- Communications de vulgarisation

I. **Journées immersion avec les lycéens 2014.** L’université de Bretagne Sud propose des journées d’immersion avec des lycéens.

II. **Congrès Jeunes Chercheurs 2014 et 2015.** L’objectif de ces congrès est de présenter les métiers de jeunes chercheurs auprès d’élèves d’écoles primaires (35 classes, 900 élèves) et de permettre à des élèves de classes différentes, d’échanger sur leur démarche et de confronter leurs résultats suite à des recherches scientifiques communes.

III. **Journée nationale Les Sciences de l’Ingénieur au Féminin 2014.** Cette journée a pour objectif de sensibiliser les jeunes collégiennes et lycéennes aux carrières scientifiques et technologiques et de susciter des vocations.

IV. **Les sciences au féminin, 2ème édition.** Une journée qui a pour objectif de sensibiliser les jeunes collégiennes et lycéennes aux carrières scientifiques et technologiques au travers des témoignages de femmes scientifiques.

A.3. Publication 1

Distribution, abundance and pollution tolerance of the marine invasive sponge *Celtodoryx ciocalyptoides* (Burton, 1935) in the Etel River

Charline GENTRIC and Pierre SAULEAU *

Univ. Bretagne-Sud, EA 3884, LBCM, IUEM, F-56100 Lorient, France
** Tel. 00 33 2 97 87 45 19, Fax. 00 33 2 97 87 46 10. E-mail: pierre.sauleau@univ-ubs.fr*

Abstract: The distribution and abundance of the marine invasive sponge *Celtodoryx ciocalyptoides* is described for the first time along the Etel River, a Natura 2000 site of the French Atlantic coast. This invasive species is now well established along both sides of the Etel River and has colonized about 29.3% of the surface of the rocky reef at a depth of 10-18 m. In the Etel marina, *C. ciocalyptoides* covers all the pilings with a covering rate estimated to 17.4% between 5 and 9 m deep. The bioaccumulation capacities of this species exposed to metallic and organic pollutants (polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls, and organotin derivatives) was also measured during a three-year study in the Etel marina. Preliminary results suggest this marine invasive species has the capacities to adapt in few months to its changing environment by sequestering and/or metabolizing those pollutants.

Keywords: Invasive species; Porifera; *Celtodoryx ciocalyptoides*; MTEs; PAHs; PCBs

Introduction

Marine biological invasions are now considered to be one of the greatest threats to biodiversity. In addition to their negative impacts on the ecosystem of their new location, invasive species have also serious economic and social consequences on fisheries, mariculture, human health, industrial development and infrastructure worldwide (Bax et al., 2003; Olenin et al., 2011). This problem of invasive species is expected to grow exponentially due to expanding international shipping.

Factors that mediate the “invasiveness” of marine species have been poorly studied. Tolerance to metal pollution is one trait that may facilitate invasion in contaminated environments (Piola et al., 2009; McKenzie et al., 2012). In harbours, ports and marinas where hydrodynamics is reduced and contaminants concentrated, invaders find favourable environmental conditions for their settlement. By reducing biodiversity and competition with endemic species, copper-based anti-fouling paints applied to ship hulls, recreational vessels and immersed structures to limit the growth of fouling organisms, increase the

availability of resources (space, light, nutrients) for invasive species (McKenzie et al., 2012). In addition, due to the long-term use of copper-based anti-fouling biocides on ship hulls, a number of marine species developed copper-tolerance (Piola & Johnston, 2006). Pre-adapted to contaminated conditions, invasive species unintentionally imported through hull fouling and ballast water discharge in harbours, ports, and marinas impacted by metal pollution, find favourable conditions to establish (Piola et al., 2009). In contrast, other studies have found that pollution may also affect invasive species (Canning-Clode et al., 2011). Artificial hard structures (i.e. piers, pontoons, pilings, seawalls, buoys) also provide new habitats facilitating the establishment, persistence and spread of invasive species (Ruiz et al., 2009; Vaz-Pinto et al., 2014). In parallel, aquaculture activities are also one major vector for marine bio-invasions: the Japanese oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), the clam *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850), the macro-algae *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt, 1955 and *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar, 1873, and probably the sponge *Celtodoryx ciocalyptoides* (Burton, 1935) are thought to have been directly or indirectly introduced through aquaculture in coastal Europe (Perez et al., 1984; Belsher & Pommellec, 1988; Castric-Fey et al., 1993; Troost, 2010; Henkel & Janussen, 2011).

The marine sponge *Celtodoryx ciocalyptoides* (Burton, 1935) formerly named *Celtodoryx girardae* Perez, Perrin, Carteron, Vacelet and Boury-Esnault, 2006 was discovered in 1996 in the Etel River (Brittany, France), in the nearby Gulf of Morbihan and simultaneously around the Oesterschelde (Netherlands) (Perez et al., 2006; van Soest et al., 2007). The sponge has an encrusting form with round lobes at the surface. The colour is pale yellow to yellow. The consistency is soft. The three main spicules are tylotes, arcurate isochelae and oxychaetes (Perez et al., 2006). This species native to the Chinese Yellow Sea has been unintentionally introduced in North-East Europe by the transfer of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* during the 1960s to aquaculture farms (Henkel & Janussen, 2011). Extending its cover over artificial and natural substrates, and competing successfully for space with other sessile invertebrates, *C. ciocalyptoides* is now considered an invasive species (Perez et al., 2006; GISD; DAISIE, AquaNIS, EASIN).

The aim of this study was to evaluate for the first time the distribution, abundance of the invasive sponge *C. ciocalyptoides* along the Etel River and its tolerance to metallic and organic pollution in the Etel marina. For this purpose, sponge samples were transplanted from one site of the river to the marina. During a three-year study, the kinetic of bioaccumulation of this marine species exposed to different concentrations of Metal Trace Elements (MTEs), Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), PolyChlorinated Biphenyls (PCBs) and organotin derivatives was measured.

Materials and methods

Study area

Experiments were realized from April 2011 to September 2014 in the Etel River, French Atlantic coast (Fig. 1A). The Etel River, 15 km long, is located between Lorient and Vannes (Morbihan, France) and belongs to the Natura 2000 network areas (FR5300028). The river

occupies an area of 22 km² with a maximum of 20 m deep at mean high water neaps (MHWN). Only the southern part of the river, between the Etel marina and Pont-Lorois have been explored during this study. Surveys were conducted using Self-Contained Underwater Breathing Apparatus (SCUBA) at five locations including a marina. The four rocky reefs "Chantier Rameau", "Magouër", "Vieux passage" and "Pont Lorois" are located throughout the river from 200 m to 2 km from the Etel marina. At those four stations, the seawater temperature varies between 8 and 18°C with a constant salinity. At Pont-Lorois, during high water springs, the tidal range is about 1.2-5.3 m and the tidal stream can reach up to 10 knots while at the three other stations the current flow can reach up to 5 knots. The Etel marina (47.659°, -3.207°) is located at the mouth on the south-east part of the Etel River (Fig. 1B). This marina, delimited by concrete pilings spaced every 20 m, has about 450 berths which can accommodate a range of recreational boats up to 18 m in length.

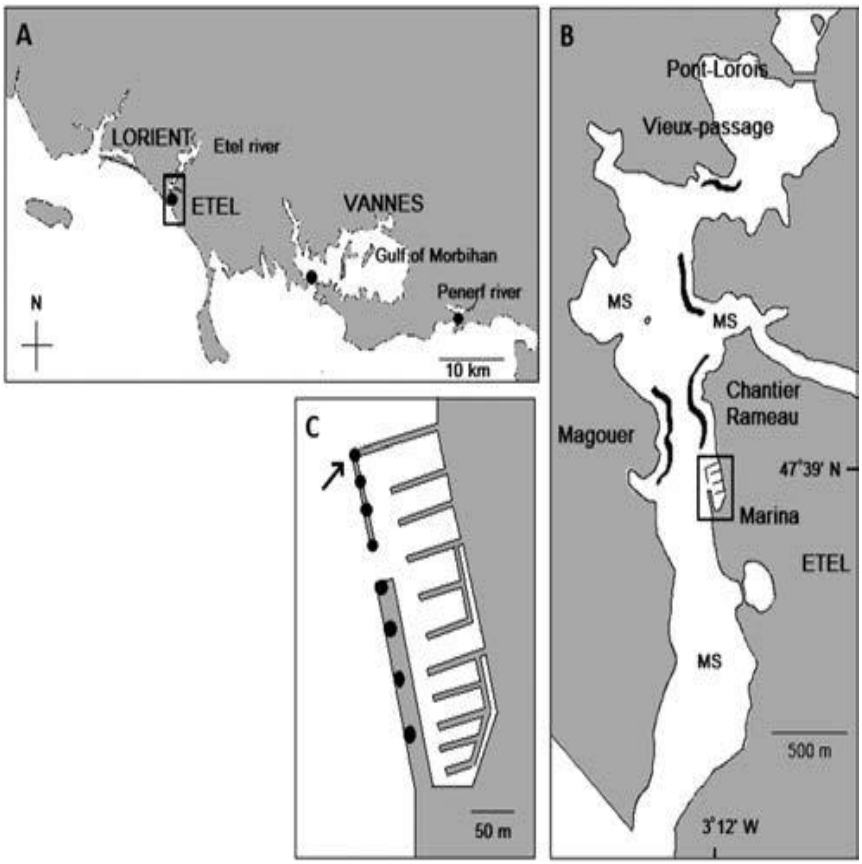


Figure 1. Distribution of *Celtodoryx ciocalyptoides.* **A.** The South Brittany coast (France). **B.** The monitoring sites along the Etel River. **C.** The Etel marina where the holding frame (indicated by an arrow) has been merged; in black, the distribution of *C. ciocalyptoides*; MS: Mud and/or Sand.

Distribution and abundance estimation

The percentage cover of the benthic biota along the river was estimated with a 1 m² PVC quadrat randomly placed on the rocky slope at depth classes from 10 to 12, 13 to 15, 16 to 18 m, in five replicates per range, and at the four adjacent sites. Abundance was

quantitatively determined by measuring the covering surface by each individual per m². All species identified were named with WoRMS. All data concerning abundance of marine invertebrates are presented as mean of five independent replicates. Due to the non-normally distributed data, abundance of *C. ciocalyptoides* was analysed statistically by the Kruskal–Wallis test for differences between those four locations and for differences between depth classes.

In the Etel marina, four concrete pilings were examined to evaluate the abundance of the sponge *C. ciocalyptoides*. Twenty pictures (20 x 20 cm) were taken per piling, 5 of each face (North, East, South and West), between 5-9 m deep using a PowerShot G12 camera (Canon) within an underwater housing (Ikelite). Percentage cover of *C. ciocalyptoides* was determined in the lab with the Cell^D imaging software (Olympus). The Kruskal–Wallis test analysed differences between exposition to the North, East, South or West on the four pilings from the marina.

Sample collection and transplantation

Sponge samples were collected by SCUBA diving at a depth of 10-15 m during MHWN in April 2011 along the Magouër site situated 200 m west of the marina and immediately transferred to Etel marina for transplantation. Sponges were freshly cut in approximately 125 cm^3 pieces, weighted, tagged, and directly placed in a nylon net (36 x 29 cm, 3 mm mesh) (Duckworth & Battershill 2003). A cubic apparatus was made of 4 panels (1 m²) with PVC tubes (25 mm diameter). Each panel was divided in five columns with a nylon rope, strengthened every 20 cm, each length containing 5 replicates i.e. 5 nylon nets containing a sponge specimen. A total of 80 nets were fixed to the structure. Panels were immersed at a depth of 9 m, at the bottom of the marina, and fixed around the north-western piling of the marina in front of the Magouër site (Fig. 1C). The distance between the piling and the holding frame was 30 cm. Sponge transplants were let grow for all the duration of the three-year study.

Metal Trace Elements (MTEs) and organic pollutants analysis

Pollutants were measured in *C. ciocalyptoides* collected the same day from both the Etel marina and the Magouër site. From the Etel marina, five nets each containing one sponge specimen were sampled by SCUBA, every year for three years. From the Magouër site, five sponge specimens were also sampled by SCUBA every year for three years. Samples were lyophilized (Cryotec), ground with a blender, and kept at – 80 °C. Two gram sub-samples were weighted and sent at the CNRS INEE – FRE3484 BioMEA Laboratory from the University of Caen for MTEs analysis and to the LABEO-Manche laboratory for PCBs, PAHs and TBT analysis. Metal Trace Elements (MTEs) analysis was determined by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometer (ICP-AES) as previously described (Mahaut et al. 2013). The detection limits were 1 $\mu g.g^{-1}$ for Cd and Ti, and 15 $\mu g.g^{-1}$ for Al and Zn in solid phase. Analytical performance was checked by analyzing a certified reference material (SRM NIST-1566b oyster tissue from National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA). The relative errors between measured and certified values given for the metal concentrations reached 5% for Cd, Cu, Zn and 5% to 10% for Ni and Al. Polycyclic Aromatic

Hydrocarbons (PAHs), PolyChlorinated Biphenyls (PCBs) and organotins (i.e. monobutyl tin, dibutyl tin, tributyl tin) analyses were performed by capillary gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry (Thermo) (Munschy et al. 2005; Veyrand et al. 2007; Beaumont & Lestremau 2012). Mixtures of the 16 PAHs (ACSD) and of the 7 PCBs (ACSD) were used as internal standards. The recovery percentage ranged from 70% to 120%. The detection limit for PAHs and PCBs was 1.25 $\mu g.kg^{-1}$. Organotin derivatives analyses were performed using the internal standard method (Organotin Mix 4 - Internal standard (DIN EN ISO173) CERTAN from LGC Promochem). The accuracy and precision of the analyses were checked using certified reference material (SOPH-1 marine sediment from the National Research Council of Canada). MBTCl, DBTCl, TBTCl, and TeTCl were purchased from Techlab (Metz, France). Analyses were realized in triplicate. Results are presented as the ratio of the concentration of contaminants (mg/kg dry weight) in sponge samples from the Etel marina over the concentration of contaminants (mg/kg dry weight) in sponge samples from the Magouër site.

Results

Distribution and abundance of C. ciocalyptoides *in the Etel River*

Underwater observations indicated *C. ciocalyptoides* were, during this three-year study, abundant along both sides of the river, from the Etel marina located at the mouth of the river to the northern Vieux-Passage site. No significant specimens of *C. ciocalyptoides* were observed on the middle part of the river composed of gravels and south to the Etel marina where the shore is composed of sand (Fig. 1).

On rocky slopes at the Magouër site, *C. ciocalyptoides* coverage averaged 33.2% of the total bottom surface area between 10-18 m deep (Fig. 2). In some areas of the same site, the species covered up to 90% of the natural substrate. There was no significant differences with the depth (chi-squared = 10.833, df = 7, P = 0.1461).

At the Chantier Rameau site, the percentage cover was about 28.1% (Fig. 2) with no significant differences with the depth (chi-squared = 5.109, df = 8, P = 0.7458). The sponge's thickness averaged 2-3 cm in both localities and the most prevalent native species were the marine sponges *Cliona celata* Grant, 1826, *Tethya aurantium* (Pallas, 1766), *Haliclona (Haliclona) oculata* (Linnaeus, 1759), *Polymastia penicillus* (Montagu, 1814), the Octocorallia *Alcyonium digitatum* Linnaeus, 1758, the Hexacorallia *Actinothoe sphyrodeta* (Gosse, 1858) and *Corynactis viridis* Allman, 1846.

At the Vieux passage site, *C. ciocalyptoides* coverage averaged 25.1% between 10-12 m deep (Fig. 2). Below 12 m depth, the sponge population decreased substantially (chi-squared = 5.9512, df = 1, P = 0.0147). In addition, the site was marked by a loss of biodiversity with the prevalence of mussels accompanied with the sea-stars *Asterias rubens* Linnaeus, 1758, the latter counting for more than 100 individuals/m^2.

Only few *C. ciocalyptoides* specimens were recorded at the Pont Lorois site where the total bottom surface was colonized by a significant amount of mussels covering more than 400 m² of the bottom competing with the marine sponges *Cliona celata* and *Halichondria (Halichondria) bowerbanki* Burton, 1930.

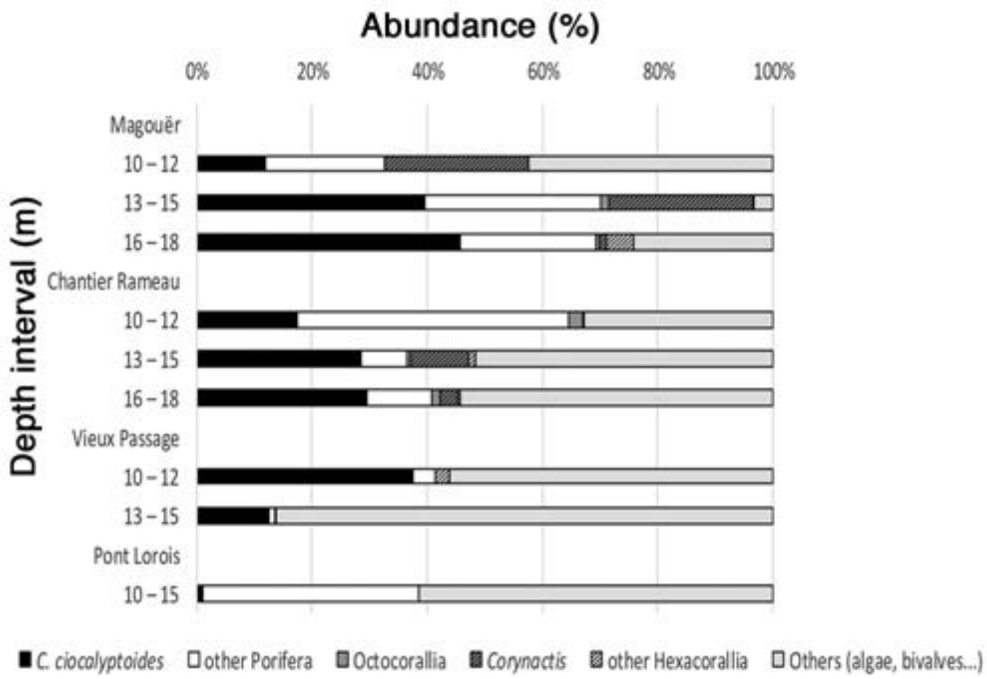


Figure 2. Abundance of *Celtodoryx ciocalyptoides* and other benthic invertebrates with the depth at four sites along the Etel River.

Percentage cover of Celtodoryx ciocalyptoides *on pilings from the Etel marina*

Before the transplantation experiments, all pilings from the Etel marina were already colonized by the invasive sponge *C. ciocalyptoides* forming a mat of 5-6 cm of thickness. The cover had a restricted bathymetric distribution from 5 m just below the mussel belt (0-5 m) to 9 m maximum depth at the marina. The *C. ciocalyptoides* coverage between 5-9 m averaged 17.4% of the surface of the concrete pilings irrespective to the orientation (chi-squared = 2.668, df = 3, P = 0.446) (Fig. 3). The most prevalent native species were the Hexacorallia *Metridium senile* (Linnaeus, 1761), the tunicate *Diplosoma spongiforme* (Giard, 1872) and the barnacle *Balanus* sp. No others sponge species were recorded on the pilings.

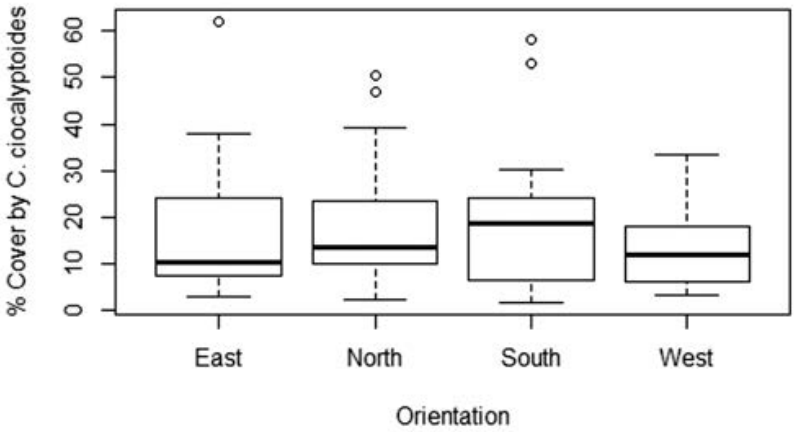


Figure 3. Abundance of *Celtodoryx ciocalyptoides* on the concrete pilings in Etel marina according to its orientation.

Analyses of Metal Trace Elements (MTEs) and organo-pollutants

As indicated in figure 4, increasing amounts of Al, Cd, Cu, Pb, Ti and Zn accumulated in *C. ciocalyptoides* transplants from the marina in comparison with samples from the Magouër site (ratio > 1). After three years of growth (i.e. in 2014), samples from the marina contained 1.6 time more Cu and Zn, and up to 2 times more Al than samples from the Magouër site during the same period. Most of PAHs also accumulated the first year in sponge specimens from the Etel marina at higher levels compared to specimens from the Magouër site (ratio > 4) except for acenaphtylene and dibenzo(a,h)anthracene (Fig. 5). After three years, PAHs levels in samples from the marina decreased with the time but at levels still higher than those measured in samples from the Magouër site. At the opposite, as shown in figure 6, slight amounts of PCB-101, 118, 138, 153 and 180 accumulated in transplants after three years of growth in the marina in comparison with samples from the Magouër site. TBT and derivatives (MBT, DBT) presented levels under 20 µg/kg dry weight during the three-year study in both sites (data not shown).

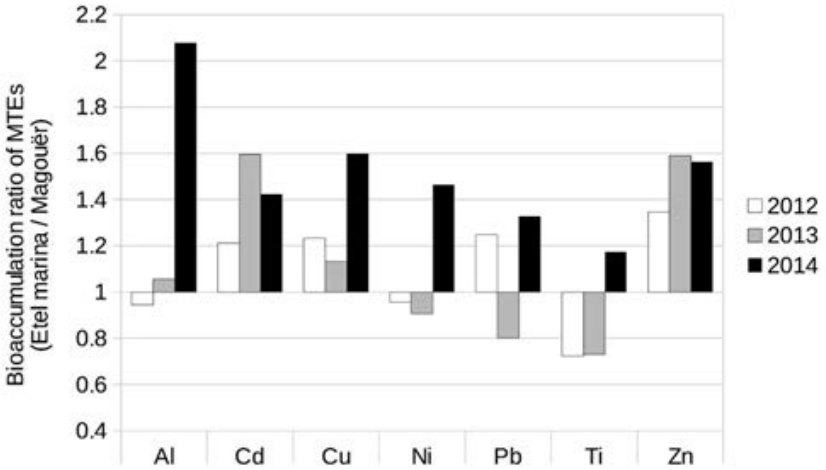


Figure 4. Bioaccumulation ratio of MTEs between *Celtodoryx ciocalyptoides* specimens from the Etel marina and specimens from the site of Magouër during 2012, 2013 and 2014.

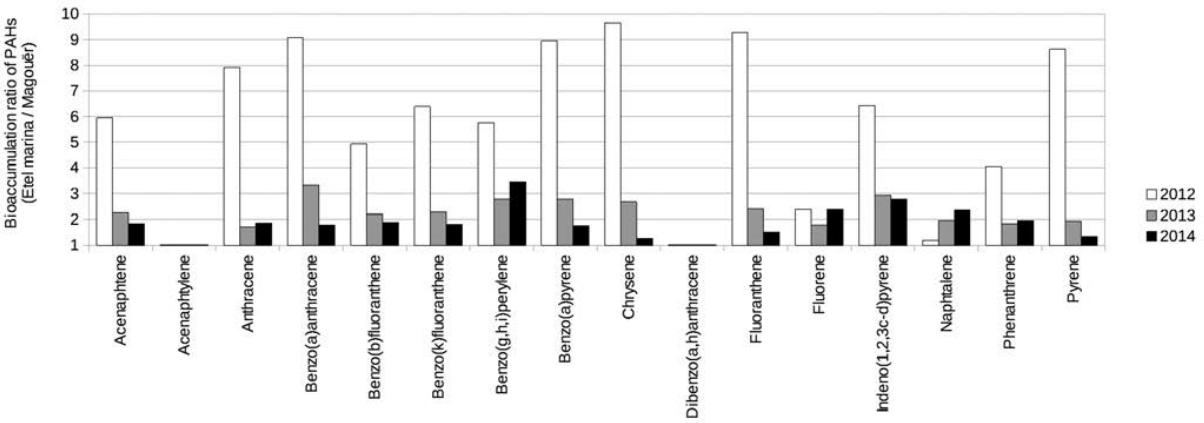


Figure 5. Bioaccumulation ratio of PAHs between *Celtodoryx ciocalyptoides* specimens from the Etel marina and specimens from the site of Magouër during 2012, 2013 and 2014.

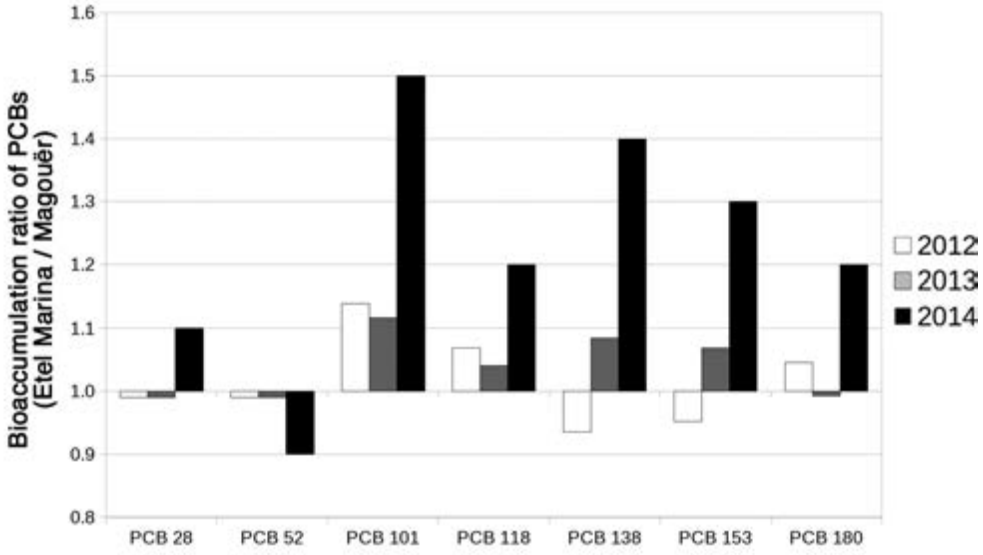


Figure 6. Bioaccumulation ratio of PCBs between *Celtodoryx ciocalyptoides* specimens from the Etel marina and specimens from the site of Magouër during 2012, 2013 and 2014.

Discussion

According to database on marine invasive species (GISD; DAISIE, AquaNIS, EASIN), *C. ciocalyptoides* is the only marine invasive sponge in Brittany. In the Oesterschelde (Netherlands), the sponge *C. ciocalyptoides* is reported to cover area of up to 25 m² (van Soest et al., 2007). In the Gulf of Morbihan (France) (Fig. 1B), the species is reported to form a mat of 50 cm width (Perez et al., 2006) competing with other sessile invertebrates such as the gorgonian *Eunicella verrucosa* (Pallas, 1766) and the Demospongiae *Amphilectus fucorum* (Esper, 1794) (Perez et al., 2006). While first *C. ciocalyptoides* specimens were

probably observed in 1996 in the Etel River, no reports existed on its life cycle, abundance, distribution and impact on the marine endemic fauna within this Natura 2000 area.

The biological invasion process can be categorized into four determining stages: (1) the entrainment of an organism by a human vector (ballast water discharge, hull fouling, aquaculture); (2) the transport of that organism outside of its natural range and its arrival in the receiving habitat; (3) establishment of viable populations; and (4) diffusion after establishment (Lockwood et al., 2005; Piola et al., 2009). The sponge *C. ciocalyptoides* is thought to have been introduced in North-West Europe by the transfer of the pacific oyster *Crassostrea gigas* during the 1960s to shellfish farms (Henkel & Janussen, 2011). In France, the first spat from Japan were probably scattered in the Bay of Marennes-Oléron in 1966. However, to date, no specimens of *C. ciocalyptoides* have been reported in this area. In Brittany, it's reasonable to assume that the Etel River was probably one of the primary hot-spots of introduction of this marine species between 1971 and 1976 by the transfer by truck of an estimated 930 billion spats from Japan. During this importation, other species such the annelid *Hydroides ezoensis* Okuda, 1934, the cnidarian *Aiptasia pulchella* Carlgren, 1943, the mollusc *Anomia chinensis* Philippi, 1849, and the cirripedes *Amphibalanus amphitrite* (Darwin, 1854) and *Fistulobalanus albicostatus* (Pilsbry, 1916) were also introduced (Grizel & Héral, 1991). Our observations indicate that *C. ciocalyptoides* is now well established along both sides of the Etel River and has colonized part of the rocky reef counting for 29.3% of the areas at a depth of 10-18 m, from the southern Etel marina to the northern Vieux-Passage site. In some areas of the river, *C. ciocalyptoides* covered up to 90% of the rocky substrate whereas only few specimens were reported around the Pont-Lorois site colonized by a significant amount of mussels. Sponge's maximal thickness average 2-3 cm, irrespective of the depth, as previously described in all localities except in the Gulf of Morbihan. Such disparity may be explained by the environmental conditions (salinity, turbidity, current, nutrients, and pollution) which may vary according to the sites.

Further studies are needed to evaluate the real impact of this marine invasive species on natives. During our *in situ* observations in the Etel River, no *Eunicella verrucosa* specimens nor other sessile invertebrates were recorded to be colonized by *C. ciocalyptoides.* However, specimens of *C. ciocalyptoides* were observed hanged on oyster tables in shellfish farming area in the northern part of the Etel River and specimens of about 1 dm^3 were also observed for the first time in 2012 in the Penerf River (Fig. 1A), 20 km far from the Gulf of Morbihan, suggesting that the spread area of this introduced sponge is much larger than expected along the South Brittany coast.

Due to disturbances such as metal pollution of anthropic origins affecting marine biodiversity, artificial hard structures in marina are particularly prone to invasive species settlement thus favouring diffusion from port to port. Since invasive species are more abundant than native on artificial structures and more abundant on artificial structures compared to rocky reefs, habitat creations in estuaries are considered a threat to native biodiversity (Glasby et al., 2007). Part of the Etel marina was built during the 1960s, few years before oyster spats introduction in the Etel River. To date, *C. ciocalyptoides* covers all the pilings of the Etel marina between 5 and 9 m deep with a covering rate estimated to 17.4% irrespective to the exposition to the sunlight. Along the Etel River, at the same depths, the shore is mainly composed of sand and/or mud which may explain why encrusting specimens are absent at this depths. In contrast, in the Chinese Yellow Sea where the

sponge originates, *C. ciocalyptoides* was not recorded below 6 m deep (Henkel & Janussen, 2011).

In our study, it was shown that increasing amounts of MTEs, in addition with slight levels of PCBs, accumulated in sponge samples transplanted into the Etel marina compared to specimens on nearby rocky reefs during the same period. For example, at the end of this study, twice more Al were found in sponge samples from the marina in comparison with samples from the Magouër site. It is difficult to differentiate natural from anthropic part of MTEs in suspended matter without geochemical study of the area. However, Al is widely applied in marinas for the creation of floating or fixed dock. Thus, deposits of Al adsorbed on fine particles of marine sediments can be found at the bottom of marina. In ports or marina where hydrodynamics is reduced in comparison with rocky reef, larger amounts of marine muds tend to accumulate. Hence, the difference in trace metals accumulation measured in sponges which are filter-feeders might come from the re-suspension of particulate matters more abundant in marina than on rocky reefs. Concerning PAHs, the highest amounts were measured in 2012 in samples from the marina decreasing with time. Petrogenic PAHs found in marinas in relevant concentration generally come from oil leaking from oil reservoirs. In December 2011, 9 months after the beginning of this study, the cargo ship TK Bremen ran aground on the Kerminihy beach (Erdeven, Brittany, France) spilling tens of thousands litres of its fuel oil (Intermediate Fuel Oil 120) at the mouth of the Etel River. Not surprisingly, PAHs amounts decreased with the time suggesting this species has the capacities to metabolize PAHs probably through the components of its cytochrome P450-dependent monooxygenase system (Solé & Livingstone, 2005). The role of pollutants is not clearly incriminated in the invasion process of *C. ciocalyptoides*. However, our study indicated this invasive species has the capacities to accumulate or metabolize in one year higher amounts of pollutants to adapt to its novel environment. It would have been interesting to compare the pollutant bioaccumulation capacities of this invasive species with endemic species from the Etel marina. However, there was no endemic sponges along the pilings of the marina and attempts to transplant endemic ones from the Magouër site to the marina were unsuccessful (data not shown) to do any comparison.

Conclusion

Twenty years after its first discovery in the Etel River (France), the marine invasive sponge *C. ciocalyptoides* is now abundant along both sides of the river, from the Etel marina located at the mouth of the river to the northern Vieux-Passage site. In some areas, the species counts up to one third of the marine benthic biodiversity. However, additional long term studies are needed to evaluate whether the sponge is still invasive, enlarge its distribution area, has now reached an equilibration with its marine environment and is part of the ecosystem, or start to regress.

There are many reasons to explain the invasion process of this species. In marina, concentrated contaminants such as anti-fouling paints and artificial hard structures may facilitate biological invasions. Our results suggest the sponge has the capacity to tolerate metal and PCBs accumulations and in contrast to scavenge PAHs in few months to adapt to

its novel environment. However, the sponge has probably found many other favourable conditions (i.e. stream, nutrients, temperature, lacks of predators or competitors) to proliferate.

Acknowledgements

We are grateful to the UBS for providing financial support for this study during the “Epavart” project and to B. Legrand, administrator of the marina of Etel for diving permission, to ASAL, CSBE, Oxéa association, C. Jouannic for their contributions and to C. Izard-Mimbielle from the syndicat mixte de la ria d'Etel, Natura 2000.

References

AquaNIS. Editorial Board 2013. Information system on Aquatic Non-Indigenous and Cryptogenic Species (www.corpi.ku.lt/databases/aquanis).

Bax N., Williamson A., Aguero M., Gonzalez E. & Geeves W. 2003. Marine invasive alien species: a threat to global diversity. *Marine Policy,* **27** : 313–323.

Beaumont J. & Lestremau F. 2012. Composés Organostanniques "OTC" - Méthode d'analyse dans les biotes. Ineris.

Belsher T. & Pommellec S. 1988. Expansion de l'algue d'origine japonaise *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt, sur les côtes françaises, de 1983 à 1987. *Cahiers de Biologie Marine,* **29**: 221–231.

Canning-Clode J., Fofonoff P., Riedel G. F., Torchin M. & Ruiz G. M. 2011. The Effects of Copper Pollution on Fouling Assemblage Diversity: A Tropical-Temperate Comparison. *PLoS ONE*, **6**, e18026.

Castric-Fey A., Girard A. & L'Hardy-Halos M. T. 1993. The distribution of *Undaria pinnatifida* (Phaeophyceae, Laminariales) on the coast of Saint Malo Brittany, France. *Botanica Marina,* **36**: 351–358.

DAISIE, Delivering Alien Invasive Species Inventories for Europe (http://www.europe-aliens.org/).

Duckworth A. R. & Battershill C. N. 2003. Developing farming structures for production of biologically active sponge metabolites. *Aquaculture*, **217**: 139–156.

EASIN, European Alien Species Information Network (http://easin.jrc.ec.europa.eu/).

Glasby T. M., Connell S. D., Holloway M. G. & Hewitt C. L. 2007. Non indigenous biota on artificial structures: could habitat creation facilitate biological invasions ? *Marine Biology,* **151**: 887–895.

GISD, Global Invasive Species Database (www.Issg.org/database)

Grizel H. & Héral M. 1991. Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). *Journal du Conseil International pour l'Exploration de la Mer,* **47**: 399–403.

Henkel D. & Janussen D. 2011. Redescription and new records of *Celtodoryx ciocalyptoides* (Demospongiae: Poecilosclerida)—a sponge invader in the north east Atlantic Ocean of Asian origin ? *Journal of the Marine Biological Association (U.K.),* **91**: 347–355.

Lockwood J. L., Cassey P. & Blackburn T. 2005. The role of propagule pressure in explaining species invasions. *Trends in Ecology and Evolution*, **20**: 223–228.

Mahaut M.-L., Basuyaux O., Baudinière E., Chataignier C., Pain J. & Caplat C. 2013. The porifera *Hymeniacidon perlevis* (Montagu, 1818) as a bioindicator for water quality monitoring. *Environmental Sciences and Pollution Research,* **20**: 2984–2992.

McKenzie L. A., Johnston E. L. & Brooks R. 2012. Using clones and copper to resolve the genetic architecture of metal tolerance in a marine invader. *Ecology and Evolution,* **2**: 1319–1329.

Munschy C., Tronczynski J., Héas-Moisan K., Guiot N. & Truquet I. 2005. *Purification HAP–PCB: Analyse de contaminants organiques (PCB, OCP, HAP) dans les organismes marins*. Ifremer : Plouzané. 44 pp.

Olenin S., Elliott M., Bysveen I., Culverhouse P., Daunys D., Dubelaar G. B. J., Gollasch S., Goulletquer P., Jelmert A., Kantor Y., Mézeth K. B., Minchin D., Occhipinti-Ambrogi A., Olenina I. & Vandekerkhove J. 2011. Recommendations on methods for the detection and control of biological pollution in marine coastal waters. *Marine Pollution Bulletin,* **62**: 2598–2604.

Perez R., Kaas R. & Barbaroux O. 1984. Experimental culture of the algae *Undaria pinnatifida* on the French coasts Ifremer. *Science et Pêche,* **343**: 3–16.

Perez T., Perrin B., Carteron S., Vacelet J. & Boury-Esnault N. 2006. *Celtodoryx girardae* gen. nov. sp. nov., a new sponge species (Poecilosclerida: Demospongiae) invading the Gulf of Morbihan (North East Atlantic, France). *Cahiers de Biologie Marine,* **47**: 205–214.

Piola R. F. & Johnston E. L. 2006. Differential resistance to extended copper exposure in four introduced bryozoans. *Marine Ecology Progress Series,* **311**: 103–114.

Piola R. F., Dafforn K. A. & Johnston E. L. 2009. The influence of antifouling practices on marine invasions. *Biofouling,* **25**: 633–644.

Ruiz G. M., Freestone A. L., Fofonoff P. W. & Simkanin C. 2009. Habitat distribution and heterogeneity in marine invasion dynamics: The importance of hard substrate and artificial structure. In: *Marine Hard Bottom Communities: Patterns, Dynamics, Diversity and Change* (M. Wahl ed.), pp. 321–332. Springer-Verlag: Berlin Heidelberg.

Solé S. & Livingstone D. R. 2005. Components of the cytochrome P450-dependent monooxygenase system and 'NADPH-independent benzo[*a*]pyrene hydroxylase' activity in a wide range of marine invertebrate species. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology, **141**: 20–31

Van Soest R. W. M, de Kluijver M. J., van Bragt P. H., Faasse M., Nijland R., Beglinger E. J., de Weerdt W. H. & de Voogd N. J. 2007. Sponge invaders in Dutch coastal waters. *Journal of the Marine Biological Association (U.K.),* **87**: 1733–1748.

Troost K. 2010. Causes and effects of a highly successful marine invasion: Case-study of the introduced Pacific oyster *Crassostrea gigas* in continental NW European estuaries. *Journal of Sea Research,* **64**: 145–165.

Vaz-Pinto F., Torrontegi O., Prestes A. C. L., Alvaro N. V., Neto A. I. & Martins G. M. 2014. Invasion success and development of benthic assemblages: effect of timing, duration of submersion and substrate type. *Marine Environmental Research*, **94**: 72–79.

Veyrand B., Brosseaud A., Sarcher L., Varlet V., Monteau F., Marchand P., Andre F. & Le Bizec B. 2007. Innovative method for determination of 19 polycyclic aromatic hydrocarbons in food and oil samples using gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry based on an isotope dilution approach. *Journal of Chromatography,* **1149**: 333–344.

WoRMS Editorial Board 2015. World Register of Marine Species. Available from http://www.marinespecies.org at VLIZ. Accessed 2015-10-29.

A.4. Publication 2.

Bioaccumulation of metallic trace elements and organic pollutants in marine sponges from the South Brittany coast, France

CHARLINE GENTRIC, KARINE REHEL, ALAIN DUFOUR and PIERRE SAULEAU*

Univ. Bretagne-Sud, EA 3884, LBCM, IUEM, F-56100 Lorient, France

Abstract: the purpose of this study was to compare the accumulation of metallic and organic pollutants in marine sponges with the oyster *Crassostrea gigas* used as sentinel species. The concentrations of 12 Metallic Trace Elements (MTEs), 16 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), 7 PolyChlorinated Biphenyls (PCBs), and 3 organotin derivatives were measured in 7 marine sponges collected in the Etel River (South Brittany, France). Results indicated Al, Co, Cr, Fe, Pb, and Ti particularly accumulated in marine sponges such as *Hymeniacidon perlevis* and *Raspailia ramosa* at higher levels compared to oysters. At the opposite, Cu and Zn accumulated significantly at higher concentrations in oysters. Among PAHs analyzed, benzo(a)pyrene bioaccumulated in *H. perlevis* at levels up to 17 fold higher than in oysters. In contrast, PCBs bioaccumulated preferentially in oysters. Significant differences exist in the abilities of marine phyla and sponge species to accumulate organic and metallic pollutants however, among the few sponge species studied, *H. perlevis* showed impressive bioaccumulation properties. The use of this species as bioindicator and/or bioremediator near shellfish farming areas is also discussed.

Keywords: Bioaccumulation, marine sponges, metallic trace elements, polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls

Introduction

Coastal water quality deterioration is considered as one of the major factors influencing shellfish productivity through impairing immunological response in bivalves and increasing susceptibility to infectious diseases. In France, the most economically important bivalve species is the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, imported in Europe during the 1970s. Since few decades, studies have demonstrated deleterious effects of Metallic Trace Elements (MTEs), [1, 2] Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), [3] Polychlorinated Biphenyls (PCBs), [4, 5] and TriButylTin (TBT), [6] on *C. gigas* oysters, in particular on its immunological system. Those organic and inorganic contaminants have both anthropogenic (industry, mining, agriculture...) and natural sources. Further contaminants are also incriminated such as pesticides or pharmaceutical drugs. Pollutants can be found in the marine ecosystem at

levels that may adversely affect the biodiversity, aquaculture productivity but also human health through the food chain. [7, 8]

In various monitoring networks, sentinel species such as mussels or oysters are widely used to monitor the contamination levels of the marine environment. The phylum Porifera is also seen as a promising model of bioindication: in the marine environment, marine sponges are filter-feeders organisms filtering actively huge volumes of sea water higher than bivalves. Through their aquiferous canal system, sponges filter 15000-24000 liters per day per kg, extract organic matter, and accumulate trace elements vital for their growth. [9] Due to this filtering activity, marine sponges have the capacities to concentrate and accumulate heavy metals and other pollutants. Sponges have thus been proposed as bioindicators of pollution, [10-13] and even as bioremediators. [14-16]

Significant differences can exist in the abilities of marine phyla to accumulate organic and inorganic pollutants. Surprisingly, comparative studies of pollutants bioaccumulation between marine sponges with oysters or mussels have been poorly reported. The aim of this study is to measure the concentrations of MTEs, PAHs, PCBs and organotin derivatives in sponge species collected near shellfish farming areas from the south Brittany coast (Morbihan, France) and to compare with the concentrations of metallic and organic pollutants measured in the sentinel species *C. gigas*.

Materials and methods

Marine invertebrates sampling

Sponges were collected from the river of Etel (South Brittany, France) in March 2013. The marine sponge *Hymeniacidon perlevis* (Montagu, 1814) is an intertidal species commonly found on the sea shore. Specimens were collected at Locoal-Mendon (N 47° 43' 7.989'' W 3° 8' 40.4658'') on shellfish farming areas during low tide. Other sponge species: *Cliona celata* Grant, 1826, *Haliclona (Haliclona) oculata* (Linnaeus, 1759), *Polymastia mamillaris* (Müller, 1806), *Raspailia ramosa* (Montagu, 1814), *Suberites domuncula* (Olivi, 1792), and *Tethya aurantium* (Pallas, 1766) were collected (N 47° 39' 37.8102'' W 3° 12' 40.5498'') by SCUBA diving at 12-15 m deep during mean high water neap (MHWN); the tidal range is about 1.5-2 m. Three-year-old specimens of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) which is the species used as a sentinel by the French chemical contamination monitoring network (ROCCH) were purchased from shellfish farms from the same site for comparison.

Pollutants analysis

Five replicate samples of sponges and oysters (n= 5) were stored in plastic bags for MTE analysis and in glass tubes for PCBs, PAHs and TBT analysis. Samples were lyophilized (Cryotec), ground with a blender, and kept at – 80 °C. Two gram sub-samples were weighted and sent at the CNRS INEE – FRE3484 BioMEA Laboratory from the University of Caen for MTE analysis. Dried samples were ground using an agate ball mill before digesting with 10

mL nitric acid (69% VWR - AnalR Normapur) in a microwave digestion system (Berghof MWS-2) under controlled phases of temperature (205°C) and oven power (1000 W). Samples were mineralized in triplicate and the digested solutions were transferred to labeled bottles adding ultrapure water to 50 mL final volume and stored at 4°C before metal analysis. The total concentration of 12 trace elements (Al, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Pb, Ti, Zn) were measured by using Induced Coupled Plasma - Atomic Emission Spectroscopy (Varian Vista MPX). The detection limits were 1 $\mu g.g^{-1}$ for Cd, Co, Mn, Ti and 15 $\mu g.g^{-1}$ for Al, Fe, Zn in solid phase. Analytical performance was checked by analyzing a certified reference material (SRM NIST-1566b oyster tissue from National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA). The relative errors between measured and certified values given for the metal concentrations reached 5% for Cd, Cu, Fe, Mn, Zn and 5% to 10% for Co, Ni and Al. A total of 12 metallic elements were analyzed. Concentrations are reported as means of 3 replicates expressed in $mg.kg^{-1}$ of dry weight (dw).
In parallel, PCBs, PAHs and TBT analysis were sub-contracted to the LABEO-Manche laboratory (accredited COFRAC N°1-5685) and performed by capillary gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry (Thermo). [17-19] The PAH compounds measured in this study are the sixteen ones classified as priority pollutants by the United States Environmental Protection Agency (US-EPA). Seven PCB congeners were also measured. PAHs, PCBs and organotin concentrations are expressed in $\mu g.kg^{-1}$ dw. Concerning PAHs and PCBs, sponge dried samples were extracted by Accelerated Solvent Extraction system (Dionex 200) with an hexane/acetone (1:1) mixture. The ASE extracts were concentrated using a vacuum evaporation system (Genevac) and purified through an alumina and silica chromatography column. Fractions were successively eluted by hexane, hexane/dichloromethane (90:10), and hexane/dichloromethane (75:25). Mixtures of the 16 PAHs (ACSD) and of the 7 PCBs (ACSD) were used as internal standards. The recovery percentage ranged from 70% to 120%. The detection limit for PAHs and PCBs was 1.25 $\mu g.kg^{-1}$. Concerning TBT analysis, sponge samples were extracted with acetic acid at pH = 4.5. Ethylation was realized with $NaBEt_4$ and hexane was added for extraction. Extracts were purified on Florisil before injection. Analyses were performed using the internal standard method (Organotin Mix 4 - Internal standard (DIN EN ISO173) CERTAN from LGC Promochem). The accuracy and precision of the analyses were checked using certified reference material (SOPH-1 marine sediment from the National Research Council of Canada). MBTCl, DBTCl, TBTCl, and TeTCl were purchased from Techlab (Metz, France).

To compare the pollutant bioaccumulation between sponges and oysters, pollutant measurement in each sponge species was divided by the corresponding pollutant value measured in oyster samples according to Equation 1.

$$\text{Ratio} = \text{pollutant } (mg.kg^{-1}) \text{ in sponge} / \text{pollutant } (mg.kg^{-1}) \text{ in oyster} \quad (1)$$

Data treatment

All Statistical analysis were performed using R Studio. Mann-Whitney-Wilcoxon's test was used to compare contaminant contents between oysters and all sponge species. Relationships between MTEs were analyzed with the Kendall's rank correlation coefficients test. Statistical significance was designed as being at the levels of p-value < 0.05.

Results

MTEs bioaccumulation in marine sponges

Results indicated some metal accumulation trends common to all sponge species: this was the case for Al, Co, Cr, Fe, Mo, Ni, Pb and Ti (Fig. 1). Those MTEs particularly accumulated in *H. perlevis* and *R. ramosa*, and for some of them at higher levels compared to oysters or the other marine sponge species. At the opposite, Cu and Zn accumulated significantly (p-value < 0.05) in oysters at higher concentration as compared to marine sponges (Table 1). For example, the marine sponge *H. perlevis* concentrated 5 fold less Zn than oysters; the species *C. celata* concentrated 50 and 100 fold less Cu and Zn respectively than oysters. There was no significant difference in Cd and Mn accumulation between oysters and marine sponges.

To ascertain whether any relationships existed between the different MTEs levels, Kendall's rank correlation coefficients test was used. This analysis indicated high correlation between Fe and Ti levels (t = 0.927, p-value < 0.001), between Co and Mn (t = 0.891, p-value < 0.001), and between Fe and Al, Ni and Pb (t = 0.854, p-value < 0.001). At the opposite, correlation between Cd or Cu and the other MTEs measured in sponge samples was not significant (p-value > 0.05).

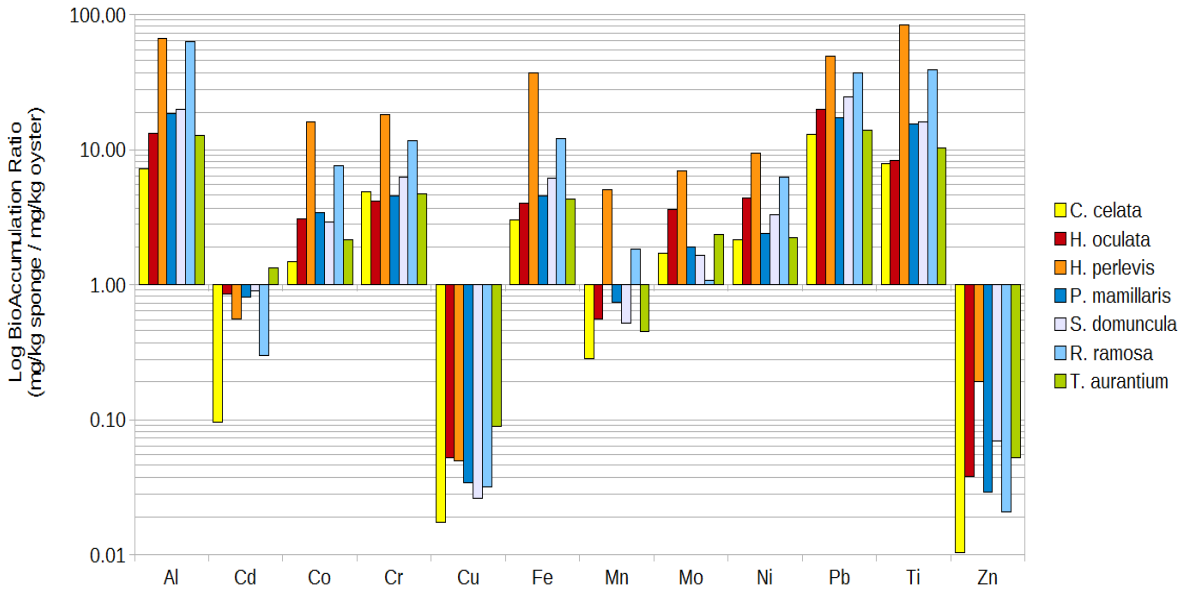


Figure 1. Concentration ratio for MTEs between all sponge species and the bivalve *Crassostrea gigas*.

Table 1. MTEs concentration in sponge species and oysters from the river of Etel

	mg.kg^{-1} (dw)							
	Cc	*Ho*	*Hp*	*Pm*	*Rr*	*Sd*	*Ta*	*Cg*
Al	480.6	889.6	4457.9	1246.1	4221.8	1324.1	846.2	66.8 *
Cd	0.1	0.9	0.6	0.9	0.3	1.0	1.5	1.2
Co	0.3	0.7	3.5	0.7	1.6	0.6	0.5	0.2 *
Cr	3.3	2.8	12.3	3.1	7.9	4.2	3.2	0.7 *
Cu	4.3	12.8	12.3	8.4	7.9	6.4	21.9	246.1 *
Fe	916.2	1205.8	11190.6	1377.5	3645.6	1855.6	1298.5	301.0 *
Mn	13.5	26.5	236.9	35.3	86.4	24.3	21.3	47.2
Mo	0.3	0.6	1.2	0.3	0.2	0.3	0.4	0.2
Ni	1.4	2.9	6.2	1.6	4.1	2.1	1.5	0.7 *
Pb	1.8	2.8	6.8	2.4	5.2	3.5	1.9	0.1 *
Ti	13.8	14.5	146.6	26.9	67.4	28.0	18.0	1.7 *
Zn	21.2	77.7	391.7	59.9	42.9	144.4	107.0	2058.8 *

Cc: Cliona celata; Ho: Haliclona oculata; Hp: Hymeniacidon perlevis; Pm: Polymastia mamillaris; Rr: Raspailia ramosa; Sd: Suberites domuncula; Ta: Tethya aurantia; Cg: Crassostrea gigas. * indicates significant differences (*p*-value < 0.05) between oysters and all sponge species.

PAHs bioaccumulation in marine sponges

Large disparity of PAHs accumulation was observed between *C. gigas* and marine sponges (Fig. 2). In comparison with oysters, several low and high molecular weight PAHs significantly bioaccumulated (*p*-value < 0.05) in all sponge species except for some of them in *T. aurantia.* For example, benzo(a)pyrene bioaccumulated in *H. perlevis* at levels up to 17 fold higher than in oysters (Table 2). Statistical analysis indicated no relation (R^2 = 0.181, *p*-value < 0.001) between the accumulation of PAHs in sponges and their log K_{ow} values. Large disparity was also observed between sponge species themselves in particular in the case of the sponge species *H. perlevis* which concentrated significantly (*p*-value < 0.05) almost all PAHs in higher amount except naphtalene, fluorene, phenanthrene, indeno(1,2,3,cd)pyrene and dibenzo(a,h)anthracene.

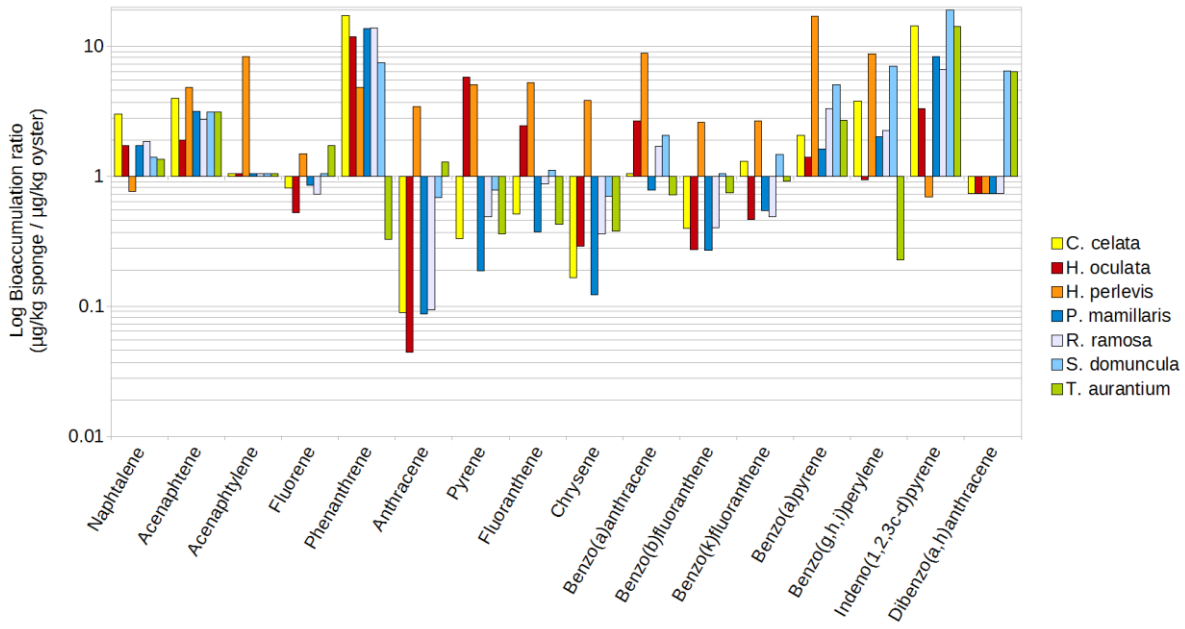


Figure 2. Concentration ratio for PAHs between all sponge species and the bivalve *Crassostrea gigas*. PAHs are presented by increasing order of their K_{ow}.

Table 2. PAHs concentration in sponge species and oysters from the river of Etel

	µg.kg^{-1} (dw)							
	Cc	*Ho*	*Hp*	*Pm*	*Rr*	*Sd*	*Ta*	*Cg*
Naphtalene	335.0	191.9	85.9	192.9	206.2	156.9	150.5	111.9
Acenaphtene	4.0	1.9	4.8	3.2	2.7	3.1	3.1	1.0 *
Acenaphtylene	1.0	1.0	8.3	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Fluorene	13.6	8.8	24.8	14.3	12.2	17.6	28.9	16.7
Phenanthrene	53.2	36.5	14.9	42.1	42.6	23.0	1.0	3.1 *
Anthracene	3.7	1.8	141.0	3.6	3.8	28.1	52.6	41.0
Pyrene	7.3	127.1	111.5	4.1	10.8	17.3	7.9	22.0
Fluoranthene	11.9	57.0	121.8	8.7	20.2	25.9	9.9	23.3
Chrysene	3.5	6.0	79.5	2.5	7.4	14.5	7.8	20.8
Benzo(a)anthracene	6.0	16.3	53.8	4.7	10.4	12.5	4.4	6.1
Benzo(b)fluoranthene	13.0	9.0	85.8	8.9	13.3	33.7	24.7	33.1
benzo(k)fluoranthene	15.0	5.4	30.8	6.3	5.6	17.0	10.6	11.6
Benzo(a)pyrene	7.0	4.8	58.0	5.5	11.3	17.3	9.2	3.4 *

Benzo(g,h,i)perylene	16.7	4.1	38.8	9.0	10.0	31.2	1.0	4.4 *
Indeno(1,2,3c-d)pyrene	20.9	4.8	1.0	12.0	9.6	14.3	20.6	2.0 *
Dibenzo(a,h)anthracene	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	4.9	8.6	1.9
Σ Total PAHs	512.7	477.3	861.9	319.8	368.2	418.2	342.0	303.1 *

Cc: Cliona celata; Ho: Haliclona oculata; Hp: Hymeniacidon perlevis; Pm: Polymastia mamillaris; Rr: Raspailia ramosa; Sd: Suberites domuncula; Ta: Tethya aurantia; Cg: Crassostrea gigas. * indicates significant differences (*p*-value < 0.05) between oysters and all sponge species.

PCBs bioaccumulation in marine sponges

Except for 3 of the 7 PCBs measured, PCBs significantly (*p*-value < 0.05) accumulated to higher concentrations in oysters as compared to marine sponges (Table 3). For example, PCB153 accumulated up to 10 times more in *C. gigas* oysters rather than in the marine sponges *R. racemosa* (ratio = 0.09) or *H. perlevis* (ratio = 0.11) (Fig. 3). There was no disparity among sponge species, except in the sole case of the marine sponge *P. mamillaris* which concentrated PCB180 two times higher in comparison with oysters and other sponge species.

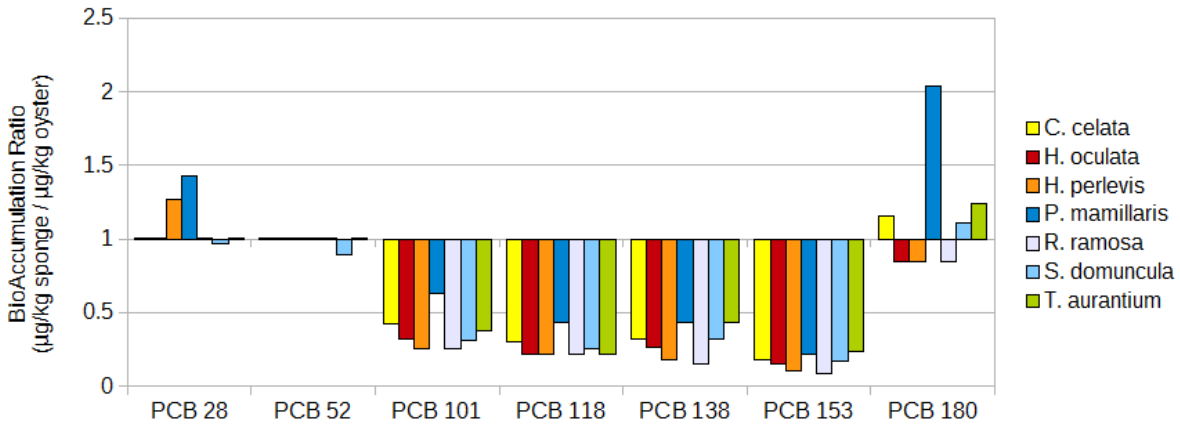


Figure 3. Concentration ratio for PCBs between all sponge species and the bivalve *Crassostrea gigas.*

Table 3. PCBs concentration in sponge species and oysters from the river of Etel

	µg.kg^{-1} (dw)							
	Cc	*Ho*	*Hp*	*Pm*	*Rr*	*Sd*	*Ta*	*Cg*
PCB 28	< 1.25	< 1.25	1.3	1.4	< 1.25	< 1.25	< 1.25	< 1.25
PCB 52	< 1.25	< 1.25	< 1.25	< 1.25	< 1.25	< 1.25	< 1.25	< 1.25
PCB 101	1.6	1.3	< 1.25	2.4	< 1.25	1.2	1.5	3.9 *
PCB 118	1.4	< 1.25	< 1.25	2.0	< 1.25	1.1	< 1.25	4.5 *
PCB 138	2.2	1.8	1.2	2.9	< 1.25	2.2	2.9	6.7 *
PCB 153	2.6	2.2	1.6	3.2	1.3	2.6	3.5	14.7 *
PCB 180	1.4	< 1.25	< 1.25	2.4	< 1.25	1.3	1.5	1.25
Σ Total PCBs	11.7	10.3	9.1	15.5	8.8	10.9	13.1	33.5 *

Cc: Cliona celata; Ho: Haliclona oculata; Hp: Hymeniacidon perlevis; Pm: Polymastia mamillaris; Rr: Raspailia ramosa; Sd: Suberites domuncula; Ta: Tethya aurantia; Cg: Crassostrea gigas. * indicates significant differences (*p*-value < 0.05) between oysters and all sponge species.

Organotin derivatives bioaccumulation in marine sponges

Tributyltin cation (TBT), monobutyl- and dibutyl-tin cations were not detected (< 20 µg.kg^{-1} dw) in any sponge or oyster samples (data not shown) due to the limit of detection by GC-MS.

Discussion

Bioaccumulation of MTEs

Oysters are proven to be interesting accumulators of heavy metals such as Zn, Cu and Cd. [20] Cu is an essential element required by all living organisms for a variety of physiological and biochemical process. However, at elevated levels, Cu is considered as one of the most hazardous substances. [1] Increasing Cu concentration in marine ecosystems can be due to release from antifouling paints for ship hulls. In excess, Cu and Zn showed toxicity to *C. gigas* oysters. [1, 2] In addition, Cu followed by Cd and Zn are also known to decrease significantly filtration rate in *C. gigas* by a factor 10, 4 and 3 respectively. [21]

Marine sponges are also known to accumulate Cu, Cd and other MTEs. Few Mediterranean sponge species collected in a polluted area were shown to bioaccumulate MTEs from 6 to 145 times higher than in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. For example, the marine

species *Cacospongia scalaris* accumulated Cu up to 151.6 $mg.kg^{-1}$ dry weight (dw) in comparison with 9.4 $mg.kg^{-1}$ dw in mussels. [22] In a recent study, the marine sponge *H. perlevis* collected in the Cherbourg harbour was shown to concentrate Cu element at levels up to 50 fold increase compared with the median concentration in mussels collected off the Normandy coast. [10] Exposed to dissolved Cu concentration of 1 $mg.L^{-1}$, the Demospongiae *H. panicea* accumulated up to 818 $mg.kg^{-1}$ dw. [23] While marine sponges seems to be good Cu bioaccumulator, impressive Cu levels of 4401 $mg.kg^{-1}$ dry weight were found in "green" *C. gigas* from Taiwan whose coloration was due to Cu accumulation. [24]

In contrast to Cu, Cd is an abundant, non-essential element. In *C. gigas*, Cd is known to accumulate preferentially in soft bodies, in particular in digestive glands. At 0.3 mM, Cd did not demonstrate any immunotoxic potential by killing haemocytes. [25] However, the element Cd has an extremely long biological half-life and is classified as human carcinogen by the International Agency for Research on Cancer (IARC). [26] High Cd levels have been found in marine sponges. For example, in the Antarctic species *Tedania charcoti*, up to 15 $g.kg^{-1}$ dw have been measured. [27] The marine sponge *H. panicea* off the coast of Bogebjerg Strand, Denmark, was shown to accumulate Cd up to 15-20 $mg.kg^{-1}$ dw. [28] During *in vitro* contamination experiments, Cd accumulated up to 1 $g.kg^{-1}$ dw in this species. [23] At high levels (500 $\mu g.L^{-1}$), Cd started to cause direct toxic effect on choanocyte cells reducing also sponge filtration rate. [28] The sponge species *S. domuncula* from Rovinj (Croatia) was shown to concentrate Cd *in vitro* up to 56 $mg.kg^{-1}$ wet weight, corresponding to approximately 560 $mg.kg^{-1}$ dw. [29] In our study, the element Cd was shown to accumulate at a relatively similar concentration in oysters compared to the few marine sponges collected from the river of Etel, except in *C. celata*. The majority of the other MTEs measured accumulated preferentially in sponges rather than in oysters. Among those MTEs, the element Pb is of high concern due to its toxicity. In French shellfish farming area, the regulatory limit for Pb in oysters is fixed at 1.5 $mg.kg^{-1}$ wet weight, corresponding to approximately 7.5 $mg.kg^{-1}$ dw. [30] In our study it was shown that the marine species *H. perlevis* concentrated Pb at levels 50 fold higher compared to oysters. Among the other marine sponge species, Pb accumulated in *C. celata* at lower levels but still 10 times higher than in oysters. Correlations between the bioaccumulation of Fe and Ti, Co and Mn, and between Fe, Al, Ni and Pb were probably related to their co-adsorption on suspended particles or plankton which are filtered and retained by sponges.

Bioaccumulation of Organic Pollutants

Some Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) formed by incomplete combustion of organic substances or spilled from tankers, and PolyChlorinated Biphenyls (PCBs) used in plasticizers in paint, flame retardants and dielectric fluids in transformers, bioaccumulate in oyster tissues and affect its immunological system. [3-5] PAHs are also known to cause photo-induced toxicity when exposed to ultraviolet for embryo-larval stages. [31]

As for MTEs, significant differences exist in the abilities of marine phyla and sponge species to accumulate PAHs and PCBs. In a recent work, the concentrations of fluoranthene in the marine sponges *H. panicea* and *H. oculata* were reported to be of the same order of magnitude as in mussels while the bioaccumulation of this compound was two times higher in *H. perlevis*. [10] Our observations confirm this previous study with a slightly more marked

bioaccumulation of fluoranthene in both *H. perlevis* and *H. oculata* as compared to oysters. Interestingly, benzo(a)pyrene which is listed as a group 1 carcinogen by the IARC and commonly monitored was also found in our study to strongly bioaccumulate in *H. perlevis* up to 17 times more as compared to oysters. No correlation existed between PAHs bioaccumulation in sponges and their hydrophobicity. However, results indicated some PAHs of high molecular weight (HMW > 250 $g.mol^{-1}$) preferentially bioaccumulated in sponges rather than in oysters. This difference already observed between sponges and mussels may be related to the low water solubility of PAHs of HMW and their high affinity for small particles retained by sponges and not by oysters. [32]

Concerning PCBs bioaccumulation, comparative studies between sponges and bivalves are very scarce. For example, the Mediterranean species *Spongia officinalis* was shown to concentrate all types of PCBs in higher proportions than the mussel *Mytilus galloprovincialis*. [13] In our study, 4 of the 7 PCBs accumulated significantly at levels 2 to 10 times higher in oysters rather than in sponges.

Tributyltin cation (TBT) and derivatives (monobutyl- and dibutyl-tin cations) were not detected in any sponges and oysters samples collected. This is probably a consequence of the ban on tributyltin as biocide in antifouling paints.

The sponge species H. perlevis *as a model for bioindication and/or zooremediation in shellfish farming areas*

Pollutants such as heavy metals, PAHs and PCBs contribute to the seawater degradation and probably affect oyster resistance to biological pathogens such as virus and bacteria. Since four decades, marine organisms such as oysters and mussels are used in South Brittany as sentinels by the French chemical contamination monitoring network (ROCCH) to monitor the contamination levels of the marine environment closed to shellfish farms. As shown in our study, the use of different phyla such as Porifera to monitor the health of the marine environment may contribute to give a better overall view of the pollution in shellfish farming areas.

Among sponge species evaluated, the species *H. perlevis* presented some interesting characteristics as a sentinel species. This species frequently occurs on shellfish farming areas and up to 20 meters deep in the river of Etel giving the possibilities to measure concentration of pollutants through the water column. It was recently shown that Zn exposure could significantly increase the uptake of Cd and Cu in the oyster *Crassostrea hongkongensis*. [33] Among the few sponge samples studied in our work, no significant correlations were shown between Zn and Cd or Cu. Thus, sponges may have a better reflect of metal pollution due to Cd or Cu irrespective to Zn concentration. Among the few sponge species evaluated in our study, MTEs particularly accumulated in *H. perlevis.* Such species-specific variation have already been observed in marine sponges. [9]

Due to their abilities to filter small particles, sponges may also be more appropriated for monitoring PAHs of high molecular weight rather than oysters. Whereas PAHs levels could suppress feeding rate in oysters to reduce toxicant intake, [34] PAHs effects on sponges are scarcely mentioned in the literature. [35] As illustrated in our study, the species *H. perlevis* concentrated almost all PAHs in higher amounts than the other sponge species or oysters

collected. Among sponge species collected, *H. perlevis* was the only one collected at the intertidal zone. However, a recent study showed no significant difference in PAHs bioaccumulation in marine sponges with the depth. [32]

In conclusion, all those data suggest oysters and sponges, in particular the species *H. perlevis*, may have both specificities as sentinel species and may be used in combination in a "sponge-oyster watch program" to monitor the health of the marine environment.

Measures concerning the prevention of the degradation and the restoration of the marine environment shall be engaged by the year 2020 at the latest by the Member States of the European Union. [36] From a remediation perspective, clean-up work in marine environment is costly, difficult and, in some cases, harmful for the marine ecosystem. Strategies such as dredging to remove sediments are costly and their efficiency controverted. Heavy metals, for example, associate temporarily to the sediments. Through resuspension and desorption processes, pollutants can release from sediments and be transferred directly to marine species. Other *in situ* remediation includes capping, natural attenuation or bioremediation. [37] Cultivation and harvest of animals to remediate pollution seems to be the most common form of bioremediation (or zooremediation). [38] In marine environment, marine sponges may play an important role in bioremediation process. For example, the marine sponge *Chondrilla nucula* Schmidt, 1862 was shown to remove *E. coli* in integrated aquaculture. [16] The Mediterranean *Spongia officinalis* var. *adriatica* was also shown to remove and concentrate pathogenic bacteria from the surrounding environment. [39] Co-culture of bath sponges with pearl oysters has been used to filter polluted waters in the Zanzibar channel in order to reduce nitrogen and phosphorous. [40] The marine sponge *H. perlevis* was shown to remove pathogenic bacteria and organic matters in integrative aquaculture and in turbot-culture water system. [15, 41-43] In our study, *H. perlevis* was shown to concentrate MTEs and PAHs at concentration higher that the majority of all other species suggesting this species may also contribute to the bioremediation of polluted marine area.

The storage, metabolism and excretion of those pollutants have been poorly studied in sponges. Contrary to MTEs, both PCBs and PAHs can be transformed and degraded mainly by biological processes. Pollutant detoxification (phase I and phase II) and multi-drug resistance occur in oysters. [44] In marine sponges, the impact and transformation of organic pollutants have been few studied. [13] At last, the presence in marine sponges of associated micro-organisms highly tolerant to a broad range of contaminants may also participate actively in the bioaccumulation and/or degradation process of such compounds. [45]

Conclusion

Significant differences can exist in the abilities of marine phyla to accumulate organic and inorganic pollutants. Herein, we compared the concentrations of Metallic Trace Elements (MTEs) and organic pollutants (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PolyChlorinated Biphenyls, TriButylTin) between *C. gigas* and 7 marine sponge species collected from the river of Etel (Brittany, France). This study confirms that marine sponges concentrate most of MTEs and PAHs in some cases at higher rates than the Pacific oyster *C. gigas* and for some of them in a species-specific manner. At the opposite, some pollutants such as Cu, Zn and PCBs

tend to bioaccumulate in oysters rather than in sponges. In combination with bivalves already used in monitoring networks, the phylum Porifera may contribute to give a better overall view of the contamination in the marine environment. The marine species *H. perlevis* may be useful to monitor sea-water quality in particular along the Manche and the Atlantic coasts. Those preliminary results also suggest sponges may be an interesting model to develop bioremediation concept in the preservation of the sea-water quality in shellfish farms. However, cultivation of sponges for sustainable supply of biomass required to efficiently remove contaminants is far from being successful. The mechanisms by which marine sponges concentrate, sequester, metabolize and potentially release pollutants remain also unclear.

Acknowledgment

We are grateful to S. Gachelin from the Comité Régional Conchylicole Bretagne Sud, J.F. Taugé, D. Le Baron and D. Perraud for allowing access on their shellfish farming concessions. Authors also acknowledge C. Caplat for her scientific advices.

Funding

This work was funded by the Fonds Européen pour la Pêche (FEP) Axe – 4 Pays d'Auray and supported by a PhD grant from the Conseil Général du Morbihan and the Conseil Régional de Bretagne.

References

[1] Mai, H.; Cachot, J.; Brune, J.; Geffard, O.; Belles, A.; Budzinski, H.; Morin, B. Embryotoxic and genotoxic effects of heavy metals and pesticides on early life stages of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). Mar. Pollut. Bull. **2012**, *64* (12), 2663-2670.

[2] Mottin, E.; Caplat, C.; Latire, T.; Mottier, A.; Mahaut, M.L.; Costil, K.; Barillier, D.; Lebel, J.M.; Serpentini, A. Effect of zinc sacrificial anode degradation on the defence system of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: chronic and acute exposures. Mar. Pollut. Bull. **2012**, *64* (9), 1911-1920.

[3] Bado-Nilles, A.; Gagnaire, B.; Thomas-Guyon, H.; Le Floch, S.; Renault, T. Effects of 16 pure hydrocarbons and two oils on haemocyte and haemolymphatic parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). Toxicol. In Vitro **2008**, *22* (6), 1610-1617.

[4] Bayen, S.; Lee, H.K.; Obbard, J.P. Exposure and response of aquacultured oysters, *Crassostrea gigas*, to marine contaminants. Environ. Res. **2007**, *103* (3), 375-382.

[5] Gagnaire, B.; Thomas-Guyon, H.; Burgeot, T.; Renault, T. Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes: screening of 23 molecules using flow cytometry. Cell Biol. Toxicol. **2006**, *22* (1), 1-14.

[6] Alzieu, C.; Heral, M.; Thibaud, Y.; Dardignac, M.J.; Feuillet, M. Influence des peintures antisalissures à base d'organostanniques sur la calcification de la coquille de l'huître *Crassostrea gigas.* Rev. Trav. Inst. Pech. Marit. **1982**, *45*, 100-116.

[7] EFSA. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to the presence of non dioxin-like polychlorinated biphenyls (PCB) in feed and food. EFSA Journal **2005**, *284*, 1-137.

[8] EFSA. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food. EFSA Journal **2008**, *724*, 1-114.

[9] Mayzel, B.; Aizenberg J.; Ilan, M. The elemental composition of Demospongiae from the Red Sea, Gulf of Aqaba. PLoS One **2014**, *9* (4), e95775.

[10] Mahaut, M.L.; Basuyaux, O.; Baudinière, E.; Chataignier, C.; Pain, J.; Caplat, C. The porifera *Hymeniacidon perlevis* (Montagu, 1818) as a bioindicator for water quality monitoring. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. **2013**, *20* (5), 2984-2992.

[11] Pan, K.; Lee, O.O.; Qian, P.Y.; Wang, W.X. Sponges and sediments as monitoring tools of metal contamination in the eastern coast of the Red Sea, Saudi Arabia. Mar. Pollut. Bull. **2011**, *62* (5), 1140-1146.

[12] Patel, B.; Balani, M.C.; Patel, S. Sponge 'sentinel' of heavy metals. Sci. Total Environ. **1985**, *41* (2), 143-152.

[13] Pérez, T.; Wafo, E.; Fourt, M.; Vacelet, J. Marine sponges as biomonitor of polychlorobiphenyl contamination: concentration and fate of 24 congeners. Environ. Sci. Technol. **2003**, *37* (10), 2152-2158.

[14] Aresta, A.; Nonnis Marzano, C.; Lopane, C.; Corriero, G.; Longo, C.; Zambonin, C.; Stabili, L. Analytical investigations on the lindane bioremediation capability of the demosponge *Hymeniacidon perlevis*. Mar. Pollut. Bull. **2015**, *90* (1-2), 143-149.

[15] Longo, C.; Corriero, G.; Licciano, M.; Stabili, L. Bacterial accumulation by the Demospongiae *Hymeniacidon perlevis*: A tool for the bioremediation of polluted seawater. Mar. Pollut. Bull. **2010**, *60* (8), 1182-1187.

[16] Milanese, M.; Chelossi, E.; Manconi, R.; Sarà, A.; Sidri, M.; Pronzato, R. The marine sponge *Chondrilla nucula* Schmidt, 1862 as an elective candidate for bioremediation in integrated aquaculture. Biomol. Eng. **2003**, *20* (4-6), 363-368.

[17] Munschy, C.; Tronczynski, J.; Héas-Moisan, K.; Guiot, N.; Truquet, I. *Analyse de contaminants organiques (PCB, OCP, HAP) dans les organismes marins*; Ifremer: Plouzané, 2005; 46 pp.

[18] Veyrand, B.; Brosseaud, A.; Sarcher, L.; Varlet, V.; Monteau, F.; Marchand, P.; Andre, F.; Le Bizec, B. Innovative method for determination of 19 polycyclic aromatic hydrocarbons in food

and oil samples using gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry based on an isotope dilution approach. J. Chromatogr. A. **2007**, *1149* (2), 333-344.

[19] Beaumont, J.; Lestremau, F. *Composés Organostanniques "OTC" - Méthode d'analyse dans le biote*. Ineris : 2012; Fiche MA-48.

[20] Giltrap, M.; Macken, A.; Davoren, M.; McGovern, E.; Foley, B.; Larsen, M.; White, J.; McHugh, B. Utilising caging techniques to investigate metal assimilation in *Nucella lapillus*, *Mytilus edulis* and *Crassostrea gigas* at three Irish coastal locations. Estuar. Coast. Shelf S. **2013**, *132*, 77-86.

[21] Lin, W.; Rice, M.A.; Chien, P.K. The effects of copper, cadmium and zinc on particle filtration and uptake of glycine in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. Comp. Biochem. Physiol. C Comp. Pharmacol. **1992**, *103* (1), 181-187.

[22] Pérez, T.; Vacelet, J.; Rebouillon, P. *In situ* comparative study of several Mediterranean sponges as potential biomonitors of heavy metals. Boll. Mus. Ist. Biol. Univ. Genova, **2004**, *68*, 517-525.

[23] Hansen, I.V.; Weeks, J.M.; Depledge, M.H. Accumulation of copper, zinc, cadmium and chromium by the marine sponge *Halichondria panicea* Pallas and the implications for biomonitoring. Mar. Pollut. Bull. **1995**, *31* (1-3), 133-138.

[24] Han, B.C.; Hung, T.C. Green oysters caused by copper pollution on the Taiwan coast. Environ. Pollut. **1990**, *65* (4), 347-362.

[25] Gagnaire, B.; Thomas-Guyon, H.; Renault, T. *In vitro* effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes. Fish Shellfish Immunol. **2004**, *16* (4), 501-512.

[26] IARC. Cadmium and Cadmium Compounds. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks. Hum. **1993**, *58*, 119-237.

[27] Capon, R.J.; Elsbury, K.; Butler, M.S.; Lu, C.C.; Hooper, J.N.A.; Rostas, J.A.P.; O'Brien, K.J.; Mudge, L.M.; Sim, A.T.R. Extraordinary levels of cadmium and zinc in a marine sponge, *Tedania charcoti* Topsent: inorganic chemical defense agents. Experientia **1993**, *49* (3), 263-264.

[28] Olesen, T.M.E.; Weeks, J.M. Accumulation of Cd by the marine sponge *Halichondria panicea* Pallas: effects upon filtration rate and its relevance for biomonitoring. Bull. Environ. Contam. Toxicol. **1994**, *52* (5), 722-728.

[29] Müller, W.E.G.; Batel, R.; Lacorn, M.; Steinhart, H.; Simat, T.; Lauenrothl, S.; Hassanein, H.; Schroder, H.C. Accumulation of cadmium and zinc in the marine sponge *Suberites domuncula* and its potential consequences on single-strand breaks and on expression of heatshock protein: a natural field study. Mar. Ecol. Prog. Ser. **1998**, *167*, 127-135.

[30] The Commission of the European Communities. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Off. J. Eur. Union **2006**, L364, 5-24.

[31] Lyons, B.P.; Pascoe, C.K.; McFadzen, I.R.B. Phototoxicity of pyrene and benzo[a]pyrene to embryo-larval stages of the pacific oyster *Crassostrea gigas*. Mar. Environ. Res. **2002**, *54* (3-5), 627-631.

[32] Batista, D.; Tellini, K.; Nudi, A.H.; Massone, T.P.; Scofield A.; Wagener A. Marine sponges as bioindicators of oil and combustion derived PAH in coastal waters. Mar. Environ. Res. **2013**, *92*, 234-243.

[33] Liu, F.; Wang W.X. Facilitated bioaccumulation of cadmium and copper in the oyster *Crassostrea hongkongensis* solely exposed to zinc. Environ. Sci. Technol. **2013**, *47* (3), 1670-1677.

[34] Jeong, W.G.; Cho, S.M. Long-term effect of polycyclic aromatic hydrocarbon on physiological metabolisms of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Aquaculture **2007**, *265* (1-4), 343-350.

[35] Zhan, R.K.; Zahn-Daimler, G.; Müller, W.E.; Michaelis, M.L.; Kurelec, B.; Rijavec, M.; Batel, R.; Bihari, N. DNA damage by PAH and repair in a marine sponge. Sci. Total Environ. **1983**, *26* (2), 137-156.

[36] The European Parliament and the Council of the European Union. Directive 2008/56/EC of the European Parliament and of the Council of 17 June 2008 establishing a framework for community action in the field of marine environmental policy (Marine Strategy Framework Directive). Off. J. Eur. Union **2008**, L164, 19-40.

[37] Perelo, L.W. Review: *In situ* and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. J. Hazard. Mater. **2010**, *177* (1-3), 81-89.

[38] Gifford, S.; Dunstan, R.H.; O'Connor, W.; Koller, C.E.; MacFarlane, G.R. Aquatic zooremediation: deploying animals to remediate contaminated aquatic environments. Trends Biotechnol. **2006**, *25* (2), 60-65.

[39] Stabili, L.; Licciano, M.; Longo, C.; Corriero, G.; Mercurio, M. Evaluation of microbiological accumulation capability of the commercial sponge *Spongia officinalis* var. *adriatica* (Schmidt) (Porifera, Demospongiae). Water Res. **2008**, *42* (10-11), 2499-2506.

[40] Oakland, H. *Bioremediation Mariculture in Zanzibar, Tanzania: A Viability Assessment of Using Bath Sponge and Pearl Oyster Farms to Filter Highly polluted Waters in the Zanzibar Channel.* Independent Study Project (ISP) Collection, 2013; paper 1526, 59 pp.

[41] Fu, W.; Sun, L.; Zhang, X.; Zhang, W. Potential of the marine sponge *Hymeniacidon perleve* as a bioremediator of pathogenic bacteria in integrated aquaculture systems. Biotechnol. Bioeng. **2006**, *93* (6), 1112-1122.

[42] Fu, W.; Wu, Y.; Sun, L.; Zhang, W. Efficient bioremediation of total organic carbon (TOC) in integrated aquaculture system by marine sponge *Hymeniacidon perleve*. Biotechnol. Bioeng. **2007**, *97* (6), 1387-1397.

[43] Zhang, X.; Zhang, W.; Xue, L.; Zhang, B.; Jin, M.; Fu, W. Bioremediation of bacteria pollution using the marine sponge *Hymeniacidon perlevis* in the intensive mariculture water system of turbot *Scophthalmus maximus*. Biotechnol. Bioeng. **2010**, *105* (1), 59-68.

[44] Boutet, I.; Tanguy, A.; Moraga, D. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. Gene **2004**, *329*, 147-157.

[45] Bauvais, C.; Zirah, S.; Piette, L.; Chaspoul, F.; Domart-Coulon, I.; Chapon, V.; Gallice, P.; Rebuffat, S.; Pérez, T.; Bourguet-Kondracki, ML. Sponging up metals: bacteria associated with the marine sponge *Spongia officinalis*. Mar. Environ. Res. **2015**, *104*, 20-30.

Résumé

La préservation de la qualité des eaux marines et la lutte contre les pollutions liées à l'activité humaine sont devenues des enjeux mondiaux. De nombreux contaminants biologiques et polluants chimiques se retrouvent dans l'eau de mer, par conséquent dans les produits aquacoles. Ce contexte fait qu'aujourd'hui, les professionnels de la mer sont à la recherche de solutions pour préserver voire améliorer la qualité de leurs eaux.
Au sein de notre biodiversité, les éponges marines sont des animaux capables de filtrer 10 000 fois leur volume en eau par jour et de retenir 80% des particules en suspension comme la matière organique, les minéraux, les bactéries et les virus. Par la même occasion, elles accumulent certains éléments traces métalliques comme le plomb, le cadmium ou le cuivre.
En collaboration avec le Comité Régional de Conchyliculture de Bretagne Sud, le projet REMEDBIO dans lequel s'inscrit cette thèse se propose d'exploiter le potentiel de filtration des éponges marines du littoral breton. Les objectifs sont de contrôler le développement de bactéries pathogènes et de réduire la présence de polluants chimiques.
L'éponge marine *Hymeniacidon perlevis* (Demospongiae) a été choisie comme modèle pour cette étude. Après avoir mis en évidence la faisabilité de la culture d'éponges marines sur l'estran, notre travail a montré, lors d'essais *in vitro*, une diminution de la contamination des huîtres par deux bactéries, *Escherichia coli* et *Vibrio aestuarianus*, et par le plomb, un élément trace métallique, en présence d'éponges. La dernière phase de ce travail a consisté à valoriser les résultats obtenus. Le projet d'entreprise LECOMER a débuté par le concours START'UBS (lauréat) proposé par l'Université de Bretagne Sud en 2014. Par la suite, LECOMER a été élu lauréat des Trophées de l'Innovation du Morbihan 2014.

Mots clés : bioremédiation, éponge marine, *Hymeniacidon perlevis*, *Escherichia coli*, *Vibrio aestuarianus*, plomb

Abstract

The conservation of waters quality and the fight against pollution due to human activities have become global issues. Many biological contaminants and chemical pollutants are found in sea water, therefore in aquaculture products. This context fact sea professional are looking for solutions to preserve or even improve the quality of their waters.
Among marine biodiversity, marine sponges filter 10 000 times their volume of water per day and retain 80 % of suspended particles such as organic matter, minerals, bacteria and viruses. In addition, sponges are therefore considered as bio-accumulators of metallic trace element such as lead, cadmium or copper.
In collaboration with the Comité Régional de Conchyliculture de Bretagne Sud, REMEDBIO project proposes to exploite potential of marine sponges of the Brittany coast. One of the main priorities of this project is to reduce the impact of chemicals (heavy metals) and of biological contaminants (bacteria, viruses) on shellfish breeding.
The marine sponges *Hymeniacidon perlevis* (Demospongiae) was chosen as the model for this study. Having demonstrated the feasibility of the culture of marine sponges on the foreshore, our work has shown, when tested *in vitro*, reduced contamination of oysters by two bacteria, *Escherichia coli* and *Vibrio aestuarianus*, and lead, a metal trace element, in the presence of sponges. The last phase of this work has been to enhance the results. The company LECOMER project began with the START'UBS contest (winner) proposed by the Université de Bretagne Sud in 2014. Thereafter, LECOMER was elected winner of the Innovation Awards of Morbihan in 2014.

Keywords: bioremediation, marine sponges, *Hymeniacidon perlevis*, *Escherichia coli*, *Vibrio aestuarianus*, lead