

Cette communication ne peut être citée sans l'autorisation préalable des auteurs.

C.M. 1981/F : 42

Comité de la Mariculture

Action de l'acétate de tributyle-étain sur les oeufs et les larves D de deux mollusques d'intérêt commercial : Crassostrea gigas (Thunberg) et Mytilus galloprovincialis (Lmk).

par

R. ROBERT * et E. HIS*

Résumé.

L'acétate de tributyle-étain, qui entre dans la composition de certaines peintures antisalissures, est fortement toxique pour les oeufs et les larves D de Crassostrea gigas à la teneur de 5 p.p.b. (HIS et ROBERT, 1980). Des concentrations inférieures, aussi basses que 1 microgramme par litre, ont été testées sur cette même espèce, mais aussi sur la moule, Mytilus galloprovincialis. Dans les deux cas, le développement embryonnaire est excessivement perturbé (100 % de véligères anormales chez l'huître et 50 % chez la moule) ; les larves D obtenues sont tuées en quelques jours. Il en est de même pour les véligères âgées de 24 heures, formées en milieu non pollué, lorsqu'elles sont exposées au produit. La croissance est inhibée chez les deux espèces.

Les larves de M. galloprovincialis semblent cependant moins sensibles.

* R. ROBERT et E. HIS, ISTPM, 63 Boulevard Deganne, 33120 ARCACHON (France).

Abstract.

The Tributyl tin acetate, a component of certain antifouling paints, has deleterious effects on eggs and D shaped larvae from Crassostrea gigas at 5 p.p.b. (HIS & ROBERT, 1980). Here we have tested concentrations as low as 1 p.p.b. on eggs and on 24 hours old larvae both from Crassostrea gigas and Mytilus galloprovincialis. The same results are got ; this product kills embryos and larvae in a few days ; it prevents growth of 24 hours old larvae exposed to this toxic. Mussels larvae seem to be less sensitive.

1. Introduction.

L'acétate de tributyle-étain inhibe la formation des larves D chez Crassostrea gigas à des concentrations aussi basses que 5 p.p.b., valeur située à la limite des possibilités de détection de ce produit dans le milieu naturel (HIS et ROBERT 1980).

Les sels organiques de l'étain entrent dans la composition des peintures antisalissures récemment utilisées pour le carénage des bateaux ; le taux de lixiviation de ces produits est de l'ordre de 1 à 5 micro-grammes/cm² par 24 heures ; (CALLANE communication personnelle) ; le développement important de la navigation de plaisance ces dernières années a amené les conchyliculteurs français, à mettre en cause les composés organo-stanniques dans les échecs répétés du captage dans certains secteurs du littoral français.

Dans la présente étude nous avons testé des concentrations aussi basses que 1 p.p.b. sur les oeufs et les larves D de C.gigas et de M. galloprovincialis : la sensibilité d'espèces voisines étant parfois très différente vis à vis des micropolluants.

2. Protocole expérimental.

Des huîtres chargées en réserves glycogénées ont été conditionnées en circuit fermé ; maintenues un mois à la température de 21 degrés centigrades elles recevaient un apport journalier de 5 litres de Pavlova lutheri à des concentrations comprises entre 4 et $6 \cdot 10^6$ cellules par ml. Ainsi au mois d'avril des pontes abondantes ont pu être obtenues par choc thermique (passages répétés de 15° C à 28°C).

En ce qui concerne M. galloprovincialis, les géniteurs ont été récoltés en février à pleine maturité, dans le bassin d'Arcachon. Le frai a été obtenu par choc thermique (passages répétés de 11 degrés à 24 degrés centigrades).

Les élevages, en béciers stériles de deux litres, ont été menés comme pour l'étude précédente (HIS et ROBERT 1980), en tenant compte des exigences particulières des deux espèces (LUCAS et Coll, 1976 et HELM et Coll. 1977).

La température était maintenue à $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pour les larves d'huîtres et à $19^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pour les larves de moules.

L'eau de mer était changée tous les jours la première semaine, puis tous les deux jours, avec adjonction de sel d'étain à chaque changement ; chaque série d'expériences comprenait :

- deux élevages témoins.
- deux élevages pour chaque concentration.

Isochrysis Galbana, Pavlova lutheri et Chaetoceros calcitrans ont été apportés journalièrement à raison de 100 \varnothing μl . d'élevage.

L'action du composé a été testée d'une part sur les oeufs fraîchement émis, en cours de fécondation ; d'autre part

sur des larves D âgées de 24 heures, formées en milieu non pollué .

Nous avons étudié l'action du toxique sur le développement embryonnaire (fécondations en présence de TBT) ; sur l'apparition d'anomalies morphologiques (charnières concave ; échancrures à la commissure des valves ; boursouflures du vélum ; rétraction de la masse viscérale) ; 200 observations étaient effectuées par élevage.

La mesure de la hauteur (distance dorso-ventrale), à partir d'agrandissements microphotographiques nous a permis d'établir la croissance larvaire ; la moyenne au seuil de 95 % a été calculée à partir de 50 mesures par élevage (100 au total pour chaque concentration considérée).

3. Résultats.

3.1. Observations complémentaires sur les oeufs et les larves D de C. gigas.

3.1.1. Action sur les fécondations, la la segmentation et la formation des larves D.

Dès les premières 24 heures (tableau 1) les élevages témoins sont constitués de larves D parfaitement normales. A la concentration de 1 p.p.b., la véliconche est incomplètement formée (98 % des cas) ; persistent 2 % de trochophores ; à 3 p.p.b. nous ne notons que la présence de trochophores monstrueuses : formes aberrantes, présentant des protubérances cellulaires. Il en est de même à la valeur de 5 p.p.b. et au dessus, conformément à nos observations antérieures (HIS et ROBERT 1980).

Le second jour, les taux de mortalités et d'anomalies se situent à 2 % dans les élevages témoins ; à 1 micro-gramme par litre toutes les larves D sont anormales (mortalité de 5%).

Aux concentrations supérieures, la plupart des trochophores anormales sont mortes. Aucune évolution n'a été observée vers le stade véligère.

Ultérieurement et jusqu'au sixième jour, les larves des élevages témoins ne présentent que de faibles mortalités (6 %) ; par contre à 1 micro-gramme par litre, les mortalités augmentent progressivement ; les élevages sont entièrement décimés le sixième jour.

Les larves D incomplètement formées à 1 $\mu\text{g/l}$. présentent dès les premières 24 heures une taille franchement inférieure ($54,90 \pm 1,24$ microns) à celles des véligères témoins ($61,07 \pm 0,50$ microns). Ces dernières passent progressivement à $94,91 \pm 0,95$ microns le cinquième jour, alors qu'à 1 $\mu\text{g/l}$. les larves n'atteignent que $57,14 \pm 0,86$ microns.

3.1.2. Action du T.B.T. sur les larves D de C.gigas.

Les larves D, âgées de 24 heures, ne présentent aucune anomalie au départ ; la taille moyenne est de $60,93 \pm 0,33$ microns. (Tableau 2).

Les mortalités sont peu importantes dans les élevages témoins (7 % le douzième jour). Elles augmentent très sensiblement le 8ème jour à 1 micro-gramme par litre (passage de 5 à 25 %) ; les élevages sont totalement décimés le douzième jour. Le phénomène a été plus précoce à 3 micro-grammes par litre ; il se manifeste le cinquième jour, avec mortalité totale au bout d'une semaine.

Les résultats obtenus à 5 micro-grammes et à 10 micro-grammes par litre sont différents de ceux qui avaient été observés antérieurement (HIS et ROBERT, 1981).

- A 5 micro-grammes par litre la mortalité totale des élevages est obtenue après 4 jours d'exposition au toxique et non en 24 heures comme constaté dans la précédente étude.

- A 10 micro-grammes par litre toutes les larves sont éliminées après 48 heures d'exposition et non 24 heures.

Les anomalies morphologiques ou de comportement sont peu importantes, si ce n'est à 5 micro-grammes par litre, où l'on note principalement à partir du quatrième jour, une rétraction de la masse viscérale qui prend peu à peu l'apparence d'une boule à l'intérieur des valves. Le même phénomène est observé à 3 micro-grammes par litre au huitième jour.

La hauteur moyenne passe de $60,93 \pm 0,33$ microns à $152,7 \pm 3,58$ microns au dixième jour, dans les élevages témoins. (Tableau 2).

La croissance n'a pu être observée que pendant les premières 24 heures d'exposition à 1 p.p.b. (passage de $60,93 \pm 0,33$ microns à $67,46 \pm 0,45$ microns). ; ainsi au neuvième jour la hauteur moyenne était encore de $67,46 \pm 0,80$ microns, soit un taux de croissance d'environ 7 % par rapport à celui des élevages témoins.

Dès la valeur de 1 micro-gramme par litre, il y a donc un arrêt presque total de la croissance larvaire, le blocage se produit dès le 2ème jour d'exposition. De même aux valeurs supérieures, la croissance est totalement inhibée.

3.2. Action sur les oeufs et les larves D de Mytilus galloprovincialis.

3.2.1. Action sur les fécondations, la segmentation et la formation des larves D.

Aux valeurs de 50 et 25 micro-grammes par litre

nous ne notons aucune segmentation au bout de 24 heures ; il en est de même pour 34 % des oeufs à 10 micro-grammes par litre, le reste de la population étant constitué de trochophores aberrantes.

A ces trois valeurs, les élevages, en décomposition, ont été arrêtés au bout de 48 heures.

A 5 et 3 p.p.b., les trochophores observées le premier jour sont encore anormales ; les élevages ont dû être abandonnés au bout de 72 heures (Tableau 1).

A 1 p.p.b. des larves D, incomplètement formées, sont obtenues en 24 heures. Dès le second jour, des mortalités se manifestent (14 %) ; elles augmentent progressivement jusqu'au sixième jour : tous les élevages sont alors décimés. Au départ, 50 % de la population présente cependant des anomalies, soit au niveau de la véliconche, soit au niveau du velum, la nage est désordonnée.

Les élevages témoins au contraire, sont constitués de 90 % de véligères normales ; les taux de mortalité sont faibles jusqu'au 6ème jour. (2 %).

Quant à la croissance larvaire, la hauteur moyenne le second jour est de $76,76 \pm 0,67$ microns pour les témoins et de $66,53 \pm 1,96$ microns à 1 p.p.b. (Tableau 1). Dans ce dernier cas il faut en effet attendre 48 heures pour obtenir des larves D complètement formées ; de plus nous notons l'existence de deux populations larvaires distinctes quant à la taille :

- 38 % atteignent une taille comparable à celles des larves des élevages témoin, longueur moyenne $74,50 \pm 1,27$ microns.

- 62 % de la population a une taille franchement réduite longueur moyenne de $61,65 \pm 1,47$ microns, (photographie 1).

Le troisième jour, ne persistent que 5 % des véligères de taille voisine de celle des témoins ; ceci explique la chute sensible de la hauteur moyenne de l'ensemble de la population (régression à $59,71 \pm 1,03$ microns). La croissance larvaire est donc nulle dès la valeur de 1 micro-gramme par litre.

3.2.2. Action sur les larves D.

Nous observons deux types d'anomalies sur les larves D exposées à l'acétate de tributyle-étain ;

- à la plus faible concentration (1 p.p.b.), le vélum présente des boursouflures en forme de verrue.

- aux valeurs supérieures, outre la précédente anomalie, il se produit une rétraction progressive de la masse viscérale, puis décollement de celle-ci de la coquille larvaire. Le phénomène se manifeste en 24 heures d'exposition au toxique à 10 microgrammes par litre ; dès le 3ème jour à 5 p.p.b. ; et dès le quatrième à 3 p.p.b. Il n'est apparu que rarement à 1 micro-gramme par litre.

Parallèlement, les mortalités sont les suivantes (Tableau 3).

- 95 % le troisième jour d'exposition à 10 p.p.b.
- 70 % le 5ème jour " à 5 p.p.b.
- 25 % le 9ème jour " à 3 p.p.b.

La croissance est fortement affectée dès la concentration de 1 micro-gramme par litre : le taux de croissance du premier au dixième jour ne représente que 6 % de celui des élevages témoins (Tableau 3) ; il est encore plus réduit pour les concentrations supérieures où l'on note même une régression de la hauteur moyenne : les mortalités importantes qui surviennent se traduisent souvent par l'élimination des véligères de grande taille.

4. Discussions.

4.1. Action de l'acétate de tributyle-étain sur le développement embryonnaire.

Dès la valeur de un micro-gramme par litre, le produit intervient sur la formation de larves D chez les deux espèces considérées. Chez C.gigas, la taille des véligères anormales obtenues est franchement inférieure à celle des témoins ; chez Mytilus galloprovincialis, 50 % des larves D sont normales ; en outre on obtient deux populations distinctes quant à la taille :

- la première présente une hauteur sub-normale.
- la seconde, comme chez l'huître, est franchement plus petite. L'utilisation d'un seul mâle et d'une femelle pour les tests, permet de supposer qu'au cours des combinaisons géniques qui accompagnent la maturation des ovules (déclenchement par la fécondation), certaines combinaisons pourraient amener la formation de formes larvaires moins sensibles à l'action du polluant ; or la population larvaire formée d'individus de plus grande taille est ultérieurement la première atteinte par les mortalités. Ces deux faits semblent contradictoires.

Pour les deux espèces des teneurs aussi basses que 1 p.p.b. inhibent la croissance.

Cependant l'obtention de 50 % de véligères parfaitement formées chez la moule, alors que toutes les larves D sont anormales chez l'huître, permet de penser que la première est moins sensible à l'action du polluant.

4.2. Action de l'acétate de Tributyle-étain sur les larves D.

Les différences précédemment mentionnées se confir-

- ment : les mortalités n'affectent que 6% de l'élevage chez la moule à la valeur de 1 p.p.b., le dixième jour, contre 65% chez l'huître.

De même à 5 p.p.b., 50% de la population est détruite chez la première le quatrième jour contre la totalité chez la seconde.

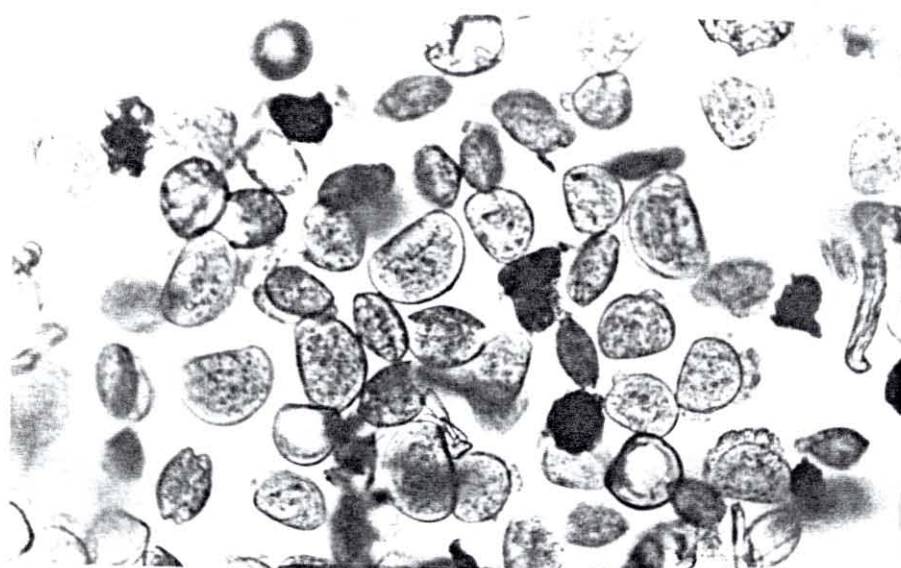
5. Conclusions

Ces résultats confirment et précisent nos observations antérieures. Les oeufs en cours de fécondation, sont plus sensibles que les larves D âgées de 24 heures. Cependant, dans les deux cas le seuil de sensibilité se situe très nettement en deçà des possibilités de détection dans le milieu naturel, dans l'état des possibilités analytiques actuelles.

A un p.p.b., les perturbations liées à l'action du sel organo-métallique sur la formation des véligères, sont irréversibles ; même chez la moule qui semble plus résistante, les élevages sont rapidement décimés. La croissance des véligères formées hors d'atteinte de ce produit, est inhibée à cette même concentration ; les mortalités se manifestent en quelques jours.

Sans attribuer les perturbations de la reproduction naturelle de *C. gigas* observées dans certains secteurs du littoral français à l'action des sels organo-métallique de l'étain, nous pensons que ces produits représentent un danger potentiel pour les zones conchylicoles à vocation de centre de captage. Comme l'ont montré Mac INNES et Coll. (1979) en ce qui

concerne le chlorure de cuivre, les végétales sont rendues plus sensibles aux conditions
adverses de milieu par les micropolluants, en dessous du seuil établi de toxicité de ces
derniers.



200 μ

Photographie 1 - Larves D de Mytilus galloprovincialis âgées de 48 heures, formées dès le départ en présence d'acétate de tributyle-étain à la concentration de 1 p.p.b. Noter les deux populations larvaires, quant à la taille des véligères. Un seul géniteur mâle et un seul géniteur femelle ont été utilisés.

| TEMPS | 0 µg/l. | | | 1 µg/l. | | | 3 µg/l. | | | 5 µg/l. | | |
|---|---------|-----|----------------|---|-----|----------------|---|---|---|---|---|---|
| | A | B | C | A | B | C | A | B | C | A | B | C |
| ACTION SUR LES OEUFs DE CRASSOSTREA GIGAS | | | | | | | | | | | | |
| D1 | 0 | 0 | 61,07 ±0,50 | Larves D incomplète- ment formées | | | 100% de tro- chophores aberrantes | | | 100% de tro- chophores aberrantes | | |
| D2 | 2 | 2 | 71,49 ±0,59 | 100 | 2 | 56,19 ±0,77 | rares tro- chophores vivantes | | | ARRET DES OBSERVATIONS | | |
| D3 | 2 | 1,5 | 75,72 ±0,74 | 100 | 5 | 56,96 ±0,76 | ARRET DES OBSERVATIONS | | | | | |
| D4 | 2 | 2,5 | 83,04 ±0,66 | 100 | 11 | 56,57 ±0,75 | | | | | | |
| D5 | 2 | 3 | 94,91 ±0,95 | 100 | 25 | 57,14 ±0,86 | | | | | | |
| D6 | 2 | 6 | 99,18 ±1,49 | 100 | 100 | -- | | | | | | |
| ACTION SUR LES OEUFs DE MYTILUS GALLOPROVINCIALIS | | | | | | | | | | | | |
| D1 | 0 | 0 | 72,96 ±0,61 | 75% des larves D incomplète- ment formées | | | 100% de tro- chophores aberrantes | | | 100% de tro- chophores aberrantes | | |
| D2 | 2 | 1 | 76,76 ±0,67 | 50 | 14 | 66,53 ±1,96 | 100% de tro- chophores aberrantes | | | 100% de tro- chophores aberrantes | | |
| D3 | 2 | 1,5 | 79,22 ±0,55 | 45 | 21 | 59,71 ±1,03 | 100% de tro- chophores aberrantes | | | ARRET DES OBSERVATIONS | | |
| D4 | 2 | 2 | 86,25 ±0,82 | -- | 50 | 60 ± 1,05 | ARRET DES OBSERVATIONS | | | | | |
| D5 | 2 | 1,5 | 94,07 ±0,98 | | 80 | -- | | | | | | |
| D6 | 2 | 2 | 98,78 ±1,14 | -- | 100 | -- | | | | | | |

Tableau 1 : Action de l'acétate de tributyle-étain sur les oeufs de Crassostrea gigas et de Mytilus galloprovincialis. D1, D2 etc... correspondent à l'âge des larves. A : pourcentages d'anomalies ; B : pourcentages de mortalités ; C : hauteur moyenne des véligères (distance dorso-ventrale) exprimée en microns au seuil de 95%.

| TEMPS | 0 µg/l. | | | 1 µg/l. | | | 3 µg/l. | | | 5 µg/l. | | |
|--------------------------|---------|-----|----------------|---------|-----|----------------|---|-----|----------------|--|-----|----------------|
| | A | B | C | A | B | C | A | B | C | A | B | C |
| ACTION SUR LES LARVES D. | | | | | | | | | | | | |
| D1 | 0 | 0 | 60,93 ±0,33 | 0 | 0 | 60,93 ±0,33 | 0 | 0 | 60,93 ±0,33 | 0 | 0 | 60,93 ±0,33 |
| D2 | 0,5 | 1 | 70,18 ±0,49 | 0 | 0,5 | 67,46 ±0,45 | 2 | 0,5 | 62,60 ±0,62 | | 7 | 60,75 ±0,50 |
| D3 | 1 | 2 | 78,38 ±0,64 | 0 | 0,5 | 67,69 ±0,53 | 1,5 | 0,5 | 62,99 ±0,59 | | 8 | 62,48 ±0,46 |
| D4 | 1,5 | 2,5 | 83,71 ±0,79 | 0 | 0,5 | 66,90 ±0,66 | 2 | 1,5 | 62,35 ±0,73 | Rétraction de la masse viscérale. 25 62,26 ±0,34 | | |
| D5 | | 3 | 92,75 ±1,05 | | 2 | 67,77 ±0,74 | | 17 | 62,98 ±0,58 | | 100 | -- |
| D6 | | 3 | 97,82 ±1,52 | | 5 | 67,54 ±0,61 | | 70 | -- | | | |
| D8 | | 5 | 129,8 ±2,79 | | 25 | 66,54 ±0,58 | Rétraction de la masse viscérale 100 | | | | | |
| D10 | | 7 | 152,7 ±3,58 | | 65 | 67,46 ±0,80 | | | | | | |

Tableau 2 : Action de l'acétate de tributyle-étain sur les larves D de *Crassostrea gigas*.

D1, D2, D3, correspondent à l'âge des larves en jours.

D2 correspond à 24 h d'exposition au produit, D3 à 48 h d'exposition...etc.

A : pourcentages d'anomalies. B : pourcentages de mortalités.

C : hauteur moyenne des véligères (distance dorso-ventrale) exprimée en microns.

| TEMPS | 0 µg/l. | | | 1 µg/l. | | | 3 µg/l. | | | 5 µg/l. | | |
|--------|--------------|---|-----------------|---------|-----|----------------|---------|----|----------------|---------------------------|-----|----------------|
| | A | B | C | A | B | C | A | B | C | A | B | C |
| ACTION | SUR LARVES D | | | | | | | | | | | |
| D1 | 2 | 0 | 73,31 ±0,55 | 2 | 0 | 73,31 ±0,55 | 2 | 0 | 73,31 ±0,55 | 2 | 0 | 73,31 ±0,55 |
| D2 | 2 | 0 | 78,72 ±0,62 | 2 | 0 | 75,71 ±0,59 | 2 | 1 | 76,00 ±0,55 | 2 | 1 | 75,59 ±0,66 |
| D3 | 2 | 1 | 83,56 ±0,59 | 8 | 0,5 | 77,54 ±0,53 | 8 | 1 | 77,94 ±0,60 | 8 | 5,5 | 77,74 ±0,46 |
| D4 | 2 | 1 | 90,52 ±0,79 | 8 | 1 | 77,11 ±0,60 | 8 | 1 | 77,96 ±0,61 | 20 | 25 | 76,85 ±0,48 |
| D5 | 2 | 1 | 97,48 ±0,83 | 10 | 1 | 75,77 ±0,67 | 12,5 | 4 | 75,60 ±0,58 | 50 | 50 | 75,46 ±0,57 |
| D6 | | 2 | 100,7 ±1,14 | | 4 | 74,54 ±0,62 | | 6 | 73,63 ±0,65 | | 70 | 73,59 ±0,76 |
| D7 | | | | | | | | | | | | |
| D8 | | 3 | 111,86 ±2,45 | | 6 | -- | | 10 | 73,75 ±0,83 | ARRET DES OBSERVATIONS | | |
| D9 | | | | | | | | | | | | |
| D10 | | 5 | 124,19 ±2,65 | | 6 | 76,17 ±0,61 | | 25 | 73,61 ±0,54 | | | |

Tableau 3 : Action de l'acétate de tributyle-étain sur les larves D de *Mytilus galloprovincialis*.

D1, D2, D3, correspondent à l'âge des larves en jours.

D2, correspond à 24 h d'exposition au produit, D3 à 48 h d'exposition...etc.

A : pourcentages d'anomalies. B : pourcentages de mortalités.

C : hauteur moyenne des véligères (distance dorso-ventrale) exprimée en microns.

Références bibliographiques.

- CALLAME B., 1976.- Le problème des salissures marines.
Océanographie biologique appliquée. L'ex-
ploitation de la vie marine, P. BOUGIS et
Coll, Masson édit, Paris : 301-312.
- HELM M.M. et MILLICAN P.F., 1977.- Experiments in the hatchery
of Pacific oyster larvae (Crassostrea gigas
Thunberg). Aquaculture 11 : 1-12
- HIS E. et ROBERT R., 1980.- Action d'un sel organo-métallique,
l'acétate de Tributyle-étain sur les oeufs
et les larves D de Crassostrea gigas (Thun
berg). Cons. Inter. Explor. mer, Comité de
la Mariculture, C.M. 1980/F : 27, 10 p.
- LUCAS A., LE PENNEC M., PRIEUR D. et LE ROUX S., 1976.-
Elevages expérimentaux de larves de mollus-
ques marins., Laboratoire de Zoologie,
Aquaculture et Pollutions Marines. Brest.
12 p. ronéotypé.-
- Mac INNES J.R. et CALABRESE A., 1979.- Combined effects of
salinity, temperature and Copper on embryos
and early larvae of the American Oyster,
Crassostrea virginica. Arch. Environn. Contam.
Toxicol., 8 : 553 - 562.