

Direction des Recherches Océaniques

Département Environnement Littoral

Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes

Département Halieutique

65, Rue de Saint-Brleuc

35042 RENNES Cedex

EFFET D'UN SEDIMENT MARIN
SUR LE DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE
DE MOLLUSQUES BIVALVES:

Optimisation du protocole expérimental
et traitement des résultats

HOCH Thierry

Ce mémoire a été réalisé dans le cadre du stage de fin d'études
d'ingénieur agronome, option Halieutique.

13 Octobre 1990

IFREMER Centre de BREST
BP. 70 29280 PLOUZANE
Tél: 98.22.40.40 - Télex 940627 F

DRO.EL-90.21

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE de RENNES

- E. N. S. A. R. -

65, rue de Saint-Brieuc

35042 RENNES Cédex

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

DIPLOME D'AGRONOMIE APPROFONDIE

- D. A. A. -

DATE : 13/10/90

CHAIRE : HALIEUTIQUE

PROFESSEUR : M. J.C. LE GUEN

ORGANISME D'ACCUEIL : IFREMER Brest

ADRESSE : BP 70

29280 PLOUZANE

DIRECTEUR SCIENTIFIQUE : Mme F. QUINIOU

AUTEUR(S) : Thierry HOCH

TITRE : Effet d'un sédiment marin sur le développement
embryonnaire de Mollusques bivalves

Nombre de pages : 54

Référence : DRO.EL-90.21

Année : 1990

RESUME :

(français)

Les tests biologiques permettent de mesurer l'effet global d'une solution supposée polluée. Ils sont d'une grande importance dans la surveillance de la qualité du milieu marin. Les expériences décrites, effectuées sur des embryons de Mollusques bivalves, concernent le sédiment, qui accumule de nombreux produits toxiques. Afin d'obtenir rapidement des résultats précis, une optimisation du protocole expérimental est proposée. Le traitement des données, particulier, est abordé ensuite et une analyse des résultats de l'année est détaillée. Cette analyse fait ressortir l'intérêt du test pratiqué ainsi que les orientations et les modifications éventuelles à apporter, à l'avenir.

ABSTRACT :

(anglais)

Biological tests allow to measure the global effect of a presumed polluted solution. They are of great importance in the control of the marine medium quality. Described experiences, made on bivalve Molluscs, are concerning sediment, which accumulates a lot of toxicants. In order to obtain quickly precise test results, an optimization of the experimental protocol is proposed. The particular data treatment is then taken up and an analyse of the results of the year is detailed. This analyse brings out the interest of the performed test as well as the orientations to take and the eventual modifications to bring in the future.

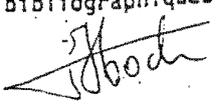
MOTS CLES.: test biologique, sédiment,
Mollusque bivalve, statistiques

Diffusion et référence

- non limitées
 sous réserve d'accord
 non autorisées

Je, soussigné HOCH Thierry propriétaire des droits de reproduction du
du résumé du Mémoire mentionné ci-dessus, autorise, par la présente, toutes les sources bibliographiques
à signaler et publier ledit résumé.

Date : 20 / 10 / 90

Signature, 

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier toutes les personnes du Département Environnement Littoral qui ont pu contribuer à la réalisation de ce mémoire. Ces remerciements s'adressent plus particulièrement à Françoise QUINIOU, ma maître de stage, et à Philippe GROS, qui m'a apporté une aide précieuse pour l'aspect statistique. Leurs conseils furent toujours pertinents et je leur en suis reconnaissant.

TABLE DES MATIERES

	Page
Résumé.....	1
Introduction.....	2
1 Matériel et méthodes.....	3
1.1 Les Mollusques.....	3
1.1.1 Intérêt des larves "D" de bivalves.....	3
1.1.2 Origine des bivalves.....	4
1.1.3 La maintenance des animaux.....	4
1.2 Collecte et congélation du sédiment.....	5
1.3 L'eau de mer témoin.....	5
1.4 Le déroulement du test.....	7
1.4.1 Préparation des milieux.....	7
1.4.2 Ponte et fécondation.....	9
1.4.3 L'observation des larves.....	12
2 Optimisation du protocole expérimental.....	13
2.1 Les sources d'erreur et d'amélioration possibles..	13
2.2 L'optimisation du dénombrement des ovocytes.....	14
2.3 Le choix du plan d'expérience.....	16
2.4 Le choix du plan d'échantillonnage.....	18
2.4.1 Le plan d'échantillonnage suivi en 1990.....	18
2.4.2 Optimisation de l'échantillonnage.....	19
2.5 Etude de la variabilité inter-observateur.....	22
3 Traitement statistique des résultats.....	25
3.1 Méthodologie du traitement des données.....	25
3.1.1 La transformation des données.....	26
3.1.2 Calcul de l'intervalle de confiance.....	26
3.1.3 L'analyse de variance et la comparaison des moyennes.....	27
3.2 Analyse des résultats de l'année 1990.....	30
3.2.1 Influence de la filtration.....	30
3.2.2 Influence de la conservation et d'une deuxième filtration de l'eau de mer référence.....	31

3.2.3 Influence de la provenance, de la concentration et du lieu de remise en suspension du sédiment.....	32
3.2.4 Influence de plusieurs concentrations en sédiment.....	36
Conclusion.....	39
Bibliographie.....	40
Annexes	
Annexe I: Développement embryonnaire chez <i>Mytilus edulis</i>	42
Annexe II: Observation des larves après arrêt du développement avec du formol neutre.....	45
Annexe III: Illustration de la réalisation pratique des fécondations.....	47
Annexe IV: Table de permutations aléatoires de vingt nombres.....	50
Annexe V: Tables des tests employés.....	51
Annexe VI: Mode d'emploi pour le traitement des données.....	53

RESUME

Les tests biologiques permettent de mesurer l'effet global d'une solution supposée polluée. Ils sont d'une grande importance dans la surveillance de la qualité du milieu marin. Les expériences décrites, effectuées sur des embryons de Mollusques bivalves, concernent le sédiment, qui accumule de nombreux produits toxiques. Afin d'obtenir rapidement des résultats précis, une optimisation du protocole expérimental est proposée. Le traitement des données, particulier, est abordé ensuite et une analyse des résultats de l'année est détaillée. Cette analyse fait ressortir l'intérêt du test pratiqué ainsi que les orientations et les modifications éventuelles à apporter, à l'avenir.

ABSTRACT

Biological tests allow to measure the global effect of a presumed polluted solution. They are of great importance in the control of the marine medium quality. Described experiences, made on bivalve Molluscs, are concerning sediment, which accumulates a lot of toxicants. In order to obtain quickly precise test results, an optimization of the experimental protocol is proposed. The particular data treatment is then taken up and an analyse of the results of the year is detailed. This analyse brings out the interest of the performed test as well as the orientations to take and the eventual modifications to bring in the future.

INTRODUCTION

Au sein du R.N.O. (Réseau National d'Observation) a été mis en place un programme de surveillance des effets de contaminants sur les organismes marins. Dans ce cadre, des tests biologiques sont effectués à l'IFREMER. Ces tests ont pour but de montrer et de quantifier l'action de substances, ou de solutions biologiquement actives sur des organismes testés.

Les expériences ont été réalisées sur des embryons de Mollusques bivalves, jusqu'au stade larve "D". La moule (*Mytilus edulis*) et l'huître creuse (*Crassostrea gigas*) ont été choisies en raison de leur importance économique et de leur large répartition géographique. En outre, leur reproduction est aisément réalisable en laboratoire.

Les études ont été conduites cette année au sein de l'équipe Ecologie Pélagique du département Environnement Littoral. Elles ont eu pour but de comparer l'effet de deux sédiments. L'un provenait de Honfleur, en Baie de Seine, qui est une région polluée. L'autre sédiment étudié, ainsi que l'eau de mer témoin, ont été collectés dans une zone supposée non polluée, Argenton au Nord-Ouest de la Bretagne. Argenton n'est pas un site proche d'implantations industrielles, contrairement à Honfleur. Le sédiment possède en effet comme propriété d'accumuler les polluants; il fait donc l'objet d'importantes études toxicologiques. Le protocole mis en oeuvre, décrit dans un premier temps, s'inspire largement de celui décrit par F. QUINIOU (1989).

Dans l'optique d'une surveillance du milieu, et pour être facilement applicable et reproductible, ce test doit être sensible, simple et efficace. Ainsi, afin d'optimiser le protocole suivi, des expériences ont été réalisées, avec de l'eau de mer témoin, parallèlement aux études portant sur le sédiment. Ces expériences ont eu notamment pour objectif de mettre en place les plans d'expérience et d'échantillonnage adéquats. Le nombre optimal de réplicats à effectuer doit également être fixé. Les problèmes posés lors du déroulement du test, ainsi que les

solutions envisageables, seront étudiés donc dans un deuxième temps.

Enfin, nous aborderons le traitement des résultats. Une méthodologie générale du traitement des données doit être élaborée: nous détaillerons la méthode et les tests employés. Nous discuterons des conclusions que l'on peut tirer des expériences.

1. MATERIEL ET METHODES

Dans ce chapitre, nous décrirons le matériel utilisé lors des tests: les Mollusques, le sédiment et l'eau de mer témoin. Puis, nous aborderons dans le détail le déroulement de l'expérience.

1.1 Les Mollusques

1.1.1 Intérêt des larves "D" de bivalves

La moule et l'huître creuse sont bien adaptées aux expériences en laboratoire. Les données sur leur physiologie, leur taxonomie et leur rôle au sein des écosystèmes, sont en outre importantes. De nombreux auteurs travaillent sur ce matériel vivant (HIS et ROBERT, 1985 ; MITCHELL et al., 1985; THAIN, 1989).

De plus, la phase de développement embryonnaire chez ces animaux est de courte durée (24 heures pour la moule et 48 heures chez l'huître creuse) et les embryons sont pendant cette période sensibles aux polluants et aux perturbations du milieu naturel en général. La réponse aux agressions de ce milieu est par conséquent enregistrée de façon rapide et efficace. Qui plus est, les larves possèdent par rapport aux adultes les avantages suivants:

"- Les individus testés, en raison de leur jeunesse, n'ont pas acquis une certaine adaptation vis-à-vis de telle ou telle substance, ce qui peut arriver chez les adultes par suite de leurs antécédents avant l'expérimentation.

- Le comportement des larves de Bivalves, qui nagent avec un

vélum déployé, n'est généralement pas perturbé par des doses faibles de substance toxique, contrairement aux adultes, qui ont tendance à fermer leurs valves et donc à supprimer tout contact avec la substance testée.

- Les larves ne subissent aucune perturbation physiologique du fait de la reproduction, alors que ce phénomène est intense chez les adultes.

- Il est très facile de reconnaître les larves mortes par examen microscopique, les valves étant transparentes. Au contraire, chez l'adulte la connaissance de la mort n'est qu'approximative et basée sur des tests arbitraires" (LUCAS, 1976).

1.1.2 Origine des bivalves

Les moules sont collectées dans le milieu naturel, en rade de Brest, aux Ducs d'Albe ou près de la Pointe des Espagnols. Il est possible d'y trouver des géniteurs matures du mois de janvier au mois d'août (LE PENNEC, 1978). Toutefois, il s'avère difficile de prélever des moules dans un état de maturité satisfaisant durant ou après une période de forte chaleur, la ponte s'étant déjà produite dans le milieu.

La période de maturité naturelle des huîtres est en revanche plus restreinte: elle s'étale de juin à août. Nous obtenons des animaux prêts à pondre par l'intermédiaire de la SATMAR (Société Atlantique de MARiculture), située à Barfleur, dans la Manche. Elle nous expédie des géniteurs parvenus à maturité après conditionnement.

1.1.3 La maintenance des animaux

Les bivalves sont maintenus dans une salle thermostatée. Ils sont stockés dans des petits bacs en circuit ouvert, dans lesquels l'oxygénation est assurée par un "bullage" et l'eau provient de la station de pompage du centre. La température de l'eau est sensiblement identique à celle du milieu naturel. Les animaux ne subissent donc pas de stress thermique. Un tel dispositif permet de maintenir les animaux dans de bonnes

vélum déployé, n'est généralement pas perturbé par des doses faibles de substance toxique, contrairement aux adultes, qui ont tendance à fermer leurs valves et donc à supprimer tout contact avec la substance testée.

- Les larves ne subissent aucune perturbation physiologique du fait de la reproduction, alors que ce phénomène est intense chez les adultes.

- Il est très facile de reconnaître les larves mortes par examen microscopique, les valves étant transparentes. Au contraire, chez l'adulte la connaissance de la mort n'est qu'approximative et basée sur des tests arbitraires" (LUCAS, 1976).

1.1.2 Origine des bivalves

Les moules sont collectées dans le milieu naturel, en rade de Brest, aux Ducs d'Albe ou près de la Pointe des Espagnols. Il est possible d'y trouver des géniteurs matures du mois de janvier au mois d'août (LE PENNEC, 1978). Toutefois, il s'avère difficile de prélever des moules dans un état de maturité satisfaisant durant ou après une période de forte chaleur, la ponte s'étant déjà produite dans le milieu.

La période de maturité naturelle des huîtres est en revanche plus restreinte: elle s'étale de juin à août. Nous obtenons des animaux prêts à pondre par l'intermédiaire de la SATMAR (Société Atlantique de MARiculture), située à Barfleur, dans la Manche. Elle nous expédie des géniteurs parvenus à maturité après conditionnement.

1.1.3 La maintenance des animaux

Les bivalves sont maintenus dans une salle thermostatée. Ils sont stockés dans des petits bacs en circuit ouvert, dans lesquels l'oxygénation est assurée par un "bullage" et l'eau provient de la station de pompage du centre. La température de l'eau est sensiblement identique à celle du milieu naturel. Les animaux ne subissent donc pas de stress thermique. Un tel dispositif permet de maintenir les animaux dans de bonnes

conditions deux à trois jours. Ils sont utilisés le plus rapidement possible: le jour même ou le lendemain.

1.2 Collecte et congélation du sédiment

Les sédiments à comparer dans ce test ont été prélevés, d'une part à Honfleur, en Baie de Seine, le 11 mai 1990, d'autre part à Argenton, dans le nord du Finistère, deux jours auparavant (Fig.1). La collecte a été effectuée de façon similaire dans les deux cas. En période de basse mer, la couche superficielle du sédiment (1 à 2 cm) a été prélevée sur de petites surfaces. Nous avons donc récupéré essentiellement la fraction susceptible d'être remise en suspension lors d'une forte marée et de libérer alors dans le milieu des substances actives.

Nous désirons comparer deux types de conservation du sédiment, deux lieux de remise en suspension: sur le terrain et au laboratoire, le jour de l'expérience. Ainsi, une partie du sédiment récupéré a été remise en suspension sur place. Pour ce faire, nous avons réalisé des solutions de 50 g/l, avec de l'eau témoin. Nous avons alors agité ces solutions pendant une demi-heure. Après décantation pendant 3 heures, nous avons récupéré le surnageant, que nous avons filtré sur un tamis de 32 μm et placé au congélateur, dans des bouteilles stériles de 1 l. Le reste du sédiment collecté a été, en revanche, directement congelé dans des flacons stériles en polystyrène cristal de 50 ml.

Il est à remarquer que le sédiment est utilisé dans le cas présent sous forme "humide". Certains auteurs, en revanche, ne considère que le sédiment "sec" (CHAPMAN et MORGAN, 1983). Une étude sur le site de Honfleur a montré que le poids de l'eau représente entre 30 et 40% du poids total du sédiment prélevé (QUINIOU, comm.pers.)

1.3 L'eau de mer témoin

L'eau de mer utilisée dans toutes les solutions et notamment dans les témoins provient de la station IFREMER d'Argenton. Elle y est reconnue de qualité constante. Elle n'est pas souillée par les polluants, comme ce peut être le cas en Rade de Brest (LUCAS,

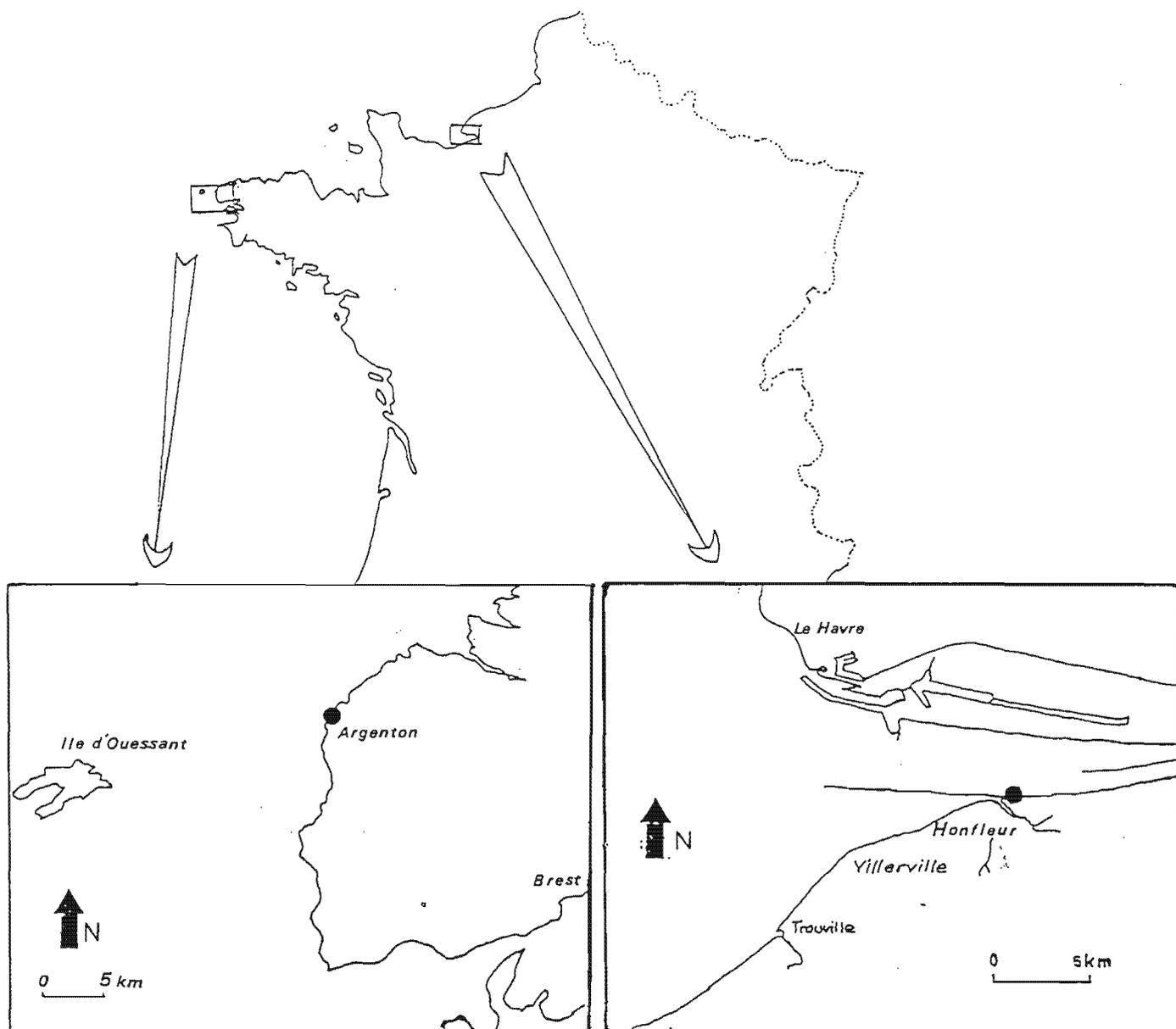


Fig.1: Localisation des sites de prélèvement du sédiment en 1990

1976). L'eau est ramenée au laboratoire à la salinité de $28 \pm 1\text{‰}$, puis filtrée à $0,22 \mu\text{m}$. Après quoi, elle est stockée dans des bouteilles stériles.

Toutefois, nous avons aussi utilisé de l'eau conservée en salle thermostatée à 10 °C depuis un ou deux jours afin de pouvoir comparer deux types d'eau de mer référence, appelées "eau du stock" et "eau du jour".

1.4 Le déroulement du test

Le travail en laboratoire s'effectue, dans un ordre chronologique, selon les étapes suivantes:

- la préparation des milieux testés
- la réalisation des pontes et de la fécondation
- l'observation et le comptage des larves

1.4.1 Préparation des milieux (Fig.2)

La préparation des milieux pour l'expérience varie bien entendu suivant le test mis en oeuvre. D'une façon générale, on cherchera à élaborer une gamme de concentrations pour le surnageant, obtenu après remise en suspension du sédiment. Cette remise en suspension s'effectue de la même façon en laboratoire que sur le terrain (§ 1.2). L'ultra-centrifugation, à 5000 t/mn pendant 10 minutes, permet, ensuite, d'éliminer la majorité des éléments solides des solutions. Les "micro-polluants" dissous et une grande partie des bactéries sont cependant conservés. Pour obtenir des concentrations variant de 0 à 50g/l , les surnageants sont dilués avec de l'eau témoin.

Qui plus est, on cherche à montrer l'influence du niveau de filtration des milieux préparés sur le développement des larves de Mollusques. A cet effet, les solutions aux différentes concentrations sont filtrées respectivement à $0,22 \mu\text{m}$ et à $0,45 \mu\text{m}$ ou utilisées "telles quelles", sans filtration. GARLAND et al. (1986) ont montré que l'eau de mer filtrée à $0,2 \mu\text{m}$ était un milieu approprié pour l'élevage de *Crassostrea gigas*, jusqu'au stade de la larve D. Les seules bactéries présentes sont introduites par les gamètes. Une eau filtrée à $0,45 \mu\text{m}$ est

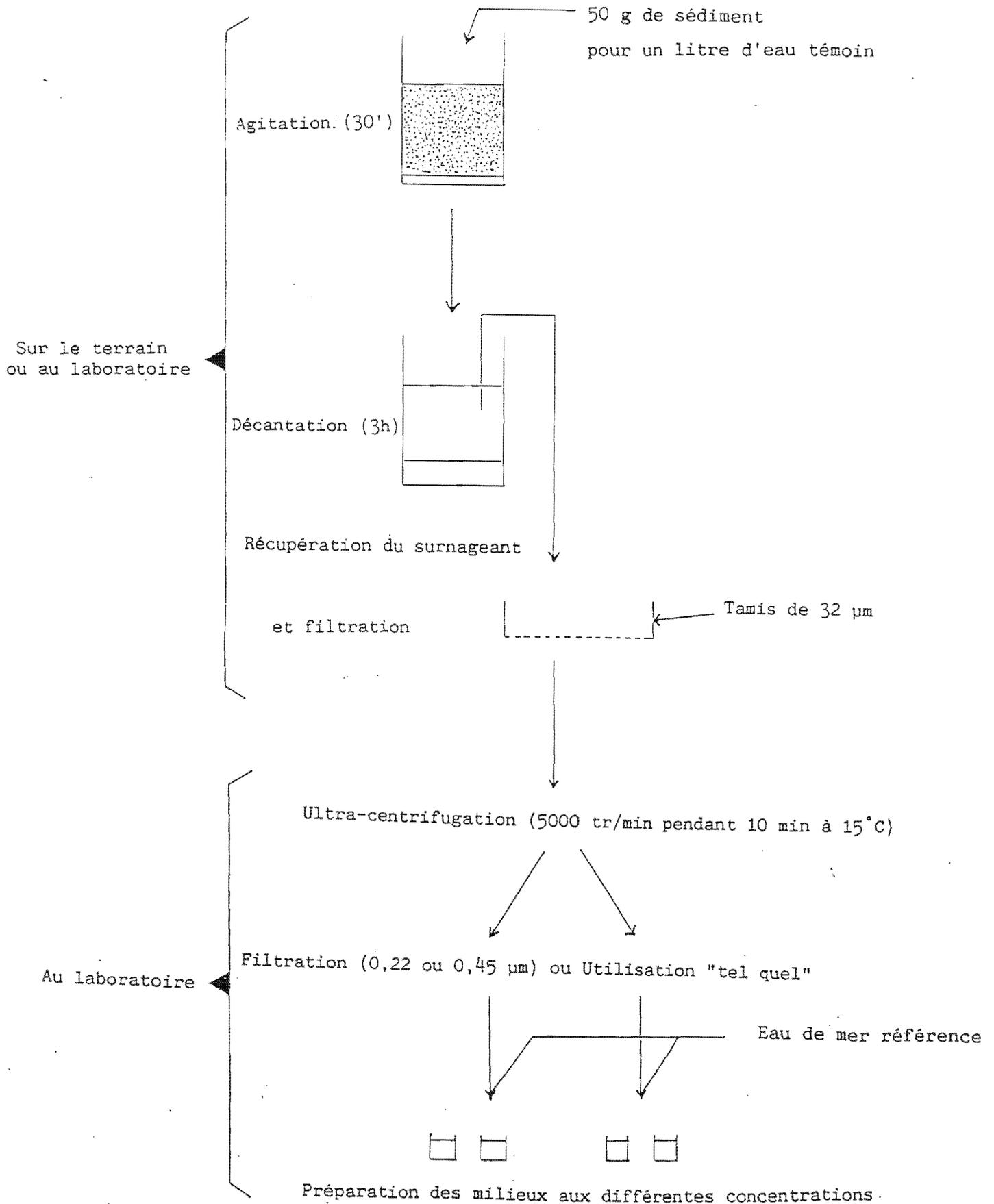


Fig.2: Schéma de remise en suspension du sédiment et de préparation des milieux

exempte de phytoplancton mais de nombreuses colonies bactériennes peuvent s'y développer. Les échantillons testés "tels quels" seront a priori les plus "pollués".

L'eau de mer témoin est filtrée à 0,22 µm. Cette opération concerne aussi bien l'eau dite du "jour" que celle du "stock". Pour cette dernière, une deuxième filtration est rendue nécessaire par la croissance forte et soudaine du nombre de bactéries, qu'entraîne généralement la décongélation.

En somme, les milieux obtenus permettront de juger l'influence respective de plusieurs facteurs:

- la concentration en sédiment
- sa provenance
- la filtration
- le mode de conservation du sédiment, à savoir le lieu de remise en suspension, sur terrain ou au laboratoire, le jour du test.

Pour les témoins, on comparera "l'eau du jour" et "l'eau du stock". Tous les milieux sont contenus dans des piluliers stériles ou des béchers, stérilisés au préalable.

1.4.2 Ponte et fécondation

Les techniques employées ici ont été décrites dans le détail par LOOSANOFF et DAVIS (1963) et utilisées également par HIS, ROBERT et MAURER (1983). Afin d'induire la ponte chez les géniteurs, deux types de chocs, l'un mécanique, l'autre thermique, leur sont appliqués. Dans un premier temps, les bivalves sont brossés et grattés, cette opération ayant également pour but d'éliminer l'épifaune. Après quoi, la ponte est obtenue par des passages répétés dans des bacs d'eau de mer chaude et froide. Les températures d'immersion varient suivant les espèces: respectivement, 10 et 25°C pour *Mytilus edulis*, 15 et 30°C chez *Crassostrea gigas*. En outre, dans un même bac, l'émission de gamètes par l'un des animaux favorise la ponte des autres.

Certains auteurs procèdent par scarification (THAIN, 1989). Ce n'est cependant pas le plus sûr moyen d'obtenir des gamètes matures.

Puis les Mollusques qui ont commencé à pondre sont isolés. Les individus mâles sont mis au sec en attendant que la femelle soit choisie. Seuls un mâle et une femelle seront sélectionnés. Ainsi, la variabilité génétique entre les individus n'intervient pas. A cet effet, les géniteurs passent successivement dans deux récipients. Pour s'assurer que l'on récupèrera uniquement les gamètes issu d'un seul organisme, les géniteurs sont placés dans un premier récipient, le temps qu'une émission de gamètes se produise. Le second, rempli d'eau témoin filtrée à 0,22 μm , sera le lieu de ponte final. Les ovocytes sont observés à la loupe binoculaire, avec un grossissement de 50. L'aspect des gamètes conditionne le choix de la femelle: la forme ronde est un indice de bonne qualité.

Le sperme et la solution d'ovocytes en suspension sont alors passés sur un tamis de 100 μm (Fig.3). Les fèces sont ainsi retirées. Les gamètes mâles sont recueillis dans un pilulier ou un bécher tandis que les ovocytes sont retenus sur un tamis de 32 μm , puis placés dans une éprouvette de 500 ml.

Le nombre d'ovocytes total contenu dans l'éprouvette est ensuite estimé. On réalise alors la fécondation en mélangeant dans les milieux le sperme, à raison de 1,5 ml par litre, et les gamètes femelles. Le volume de l'injection d'ovocytes à inoculer est calculé de façon à obtenir une concentration d'environ 50000 gamètes/l.

Le succès de la fécondation est d'autant plus grand que le temps qui s'écoule entre la ponte et l'inoculation des gamètes est faible. On considère que, s'il dépasse une heure, les chances de réussite s'amenuisent fortement. La rapidité d'exécution est donc une condition de succès.

Après homogénéisation, de façon à augmenter le taux de réussite de la fécondation, les milieux sont placés dans une armoire thermostatée, dont la température est réglée à $20 \pm 1^\circ\text{C}$ pour les moules et $24 \pm 1^\circ\text{C}$ pour les huîtres creuses. En effet, la croissance optimale chez la moule est obtenue pour une température de 20°C et une salinité comprise entre 25 et 30‰ (BRENKO et CALABRESE, 1969). La durée de développement pour atteindre le stade de larve D diffère également suivant les espèces: 48 heures chez *Mytilus edulis* et 24 heures en ce qui

produits génitaux

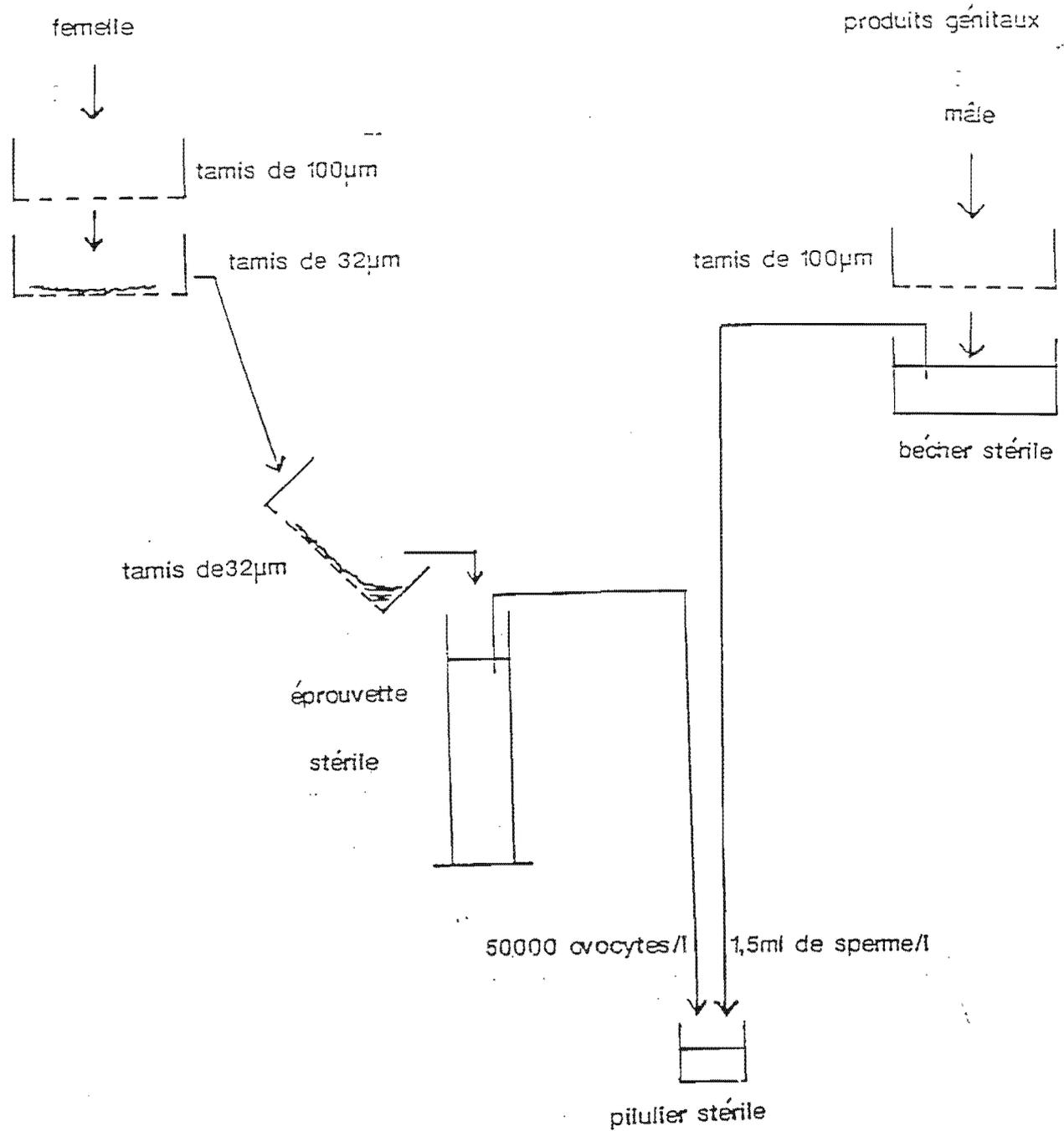


Fig.3: Schéma de réalisation des fécondations (d'après LE GALL, 1989)

concerne *Crassostrea gigas*.

Cette période passée, les milieux sont sortis de l'armoire et le développement des larves est alors stoppé en ajoutant du formol neutre à 8%, à raison de 0,5 ml pour 30 ml de la solution à tester.

1.4.3 L'observation des larves

Des échantillons de 3 ml, correspondant à environ 150 individus, sont prélevés dans les milieux et placés dans des lames. Les larves D sont observées et comptées à l'aide d'un microscope inversé, avec un grossissement de 100. Nous classons les larves de façon dichotomique: nous les considérons soit normales, soit anormales. Une larve D normale possède une coquille régulière en forme de D et qui renferme l'ensemble des organes à la fermeture des valves.

Nous avons toutefois pu distinguer plusieurs types de larves anormales:

- les larves dont la charnière est bombée ou creuse
- les larves de forme D irrégulière
- celles dont les valves ne sont pas symétriques
- celles dont le manteau dépasse des valves
- les embryons sans coquille
- les coquilles vides, assimilées à des larves mortes
- les ovocytes non fécondés.

Ces catégories sont a priori classées suivant un degré croissant de toxicité de la solution.

Les résultats sont, dans un premier temps, exprimés en Pourcentage Brut de larves Anormales (PBA). Néanmoins, afin de ne prendre en compte que l'influence des polluants sur le développement larvaire, la formule de Abbott (APHA, 1980) est utilisée. Les résultats sont alors obtenus en termes de Pourcentage Net de larves Anormales (PNA), tels que:

$$PNA = \frac{\% \text{ larves anormales du test} - \% \text{ larves anormales du témoin}}{100 - \% \text{ de larves anormales du témoin}} \times 100$$

Une comparaison entre des expériences effectuées à des moments différents est alors possible.

Le PNA d'une solution témoin est nul. Le PNA sera d'autant plus élevé que le milieu considéré sera pollué.

Ainsi, nous avons détaillé la mise en place pratique de ce test biologique. Celui-ci est simple et ne nécessite pas la mise en oeuvre de matériel important. Il convient cependant d'effectuer les différentes étapes du test avec soin et rapidité.

2 OPTIMISATION DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Dans toute expérience, des erreurs sont susceptibles de perturber la réalisation des mesures. Ces erreurs peuvent toutefois être atténuées, le protocole simplifié et ainsi optimisé. Les réponses obtenues sont alors plus fiables et plus rapides.

2.1 Les sources d'erreur et d'amélioration possibles

Le nombre de larves, observées à la fin du test, ne correspond pas au chiffre attendu, qui est de 150 par échantillon de 3 ml. En effet, comme l'indique THAIN (1989), les problèmes suivants peuvent être rencontrés:

- La mesure du nombre total d'ovocytes présents dans l'éprouvette de 500 ml peut s'avérer inexacte.
- Le prélèvement dans la solution d'ovocytes en suspension occasionne également des erreurs, lors de la fécondation.
- Ces prélèvements entraînent une extra-dilution dans les milieux à tester, celle-ci étant d'autant plus forte que les gamètes femelles sont peu concentrés au départ. Cette dilution est également le fait des gamètes mâles, même si la quantité inoculée ne varie pas, pour un volume préparé donné.
- Les échantillons prélevés pour le comptage ne sont pas toujours l'exacte représentation des milieux testés.

Les erreurs pendant le pipetage des ovocytes pour la fécondation et des larves pour l'observation sont aléatoires. Elles peuvent être atténuées en homogénéisant convenablement les solutions.

Les erreurs dans le dénombrement des ovocytes et celles

dues à l'extra-dilution sont identiques pour les milieux contaminés et pour le témoin. En outre, les problèmes de dilution ont une moindre importance dans le cas présent, car on ne travaille pas sur des concentrations précises associées à un produit particulier. Toutefois, on peut optimiser les dénombrements en réalisant un nombre adéquat de comptages sous la loupe binoculaire.

Il est également important de choisir un plan d'expérience approprié. Le plan d'échantillonnage retenu pour l'observation des larves devra également s'avérer adéquat: il s'agit en effet de réaliser un échantillonnage représentatif en peu de temps et à un moindre coût.

Qui plus est, des différences peuvent survenir entre plusieurs observateurs lors du comptage des larves "D".

Il apparaît ainsi important de se pencher sur ces multiples problèmes et de voir comment y remédier.

2.2 L'optimisation du dénombrement des ovocytes

On cherche à dénombrer la totalité des ovocytes contenus dans l'éprouvette de 500 ml, avec la plus grande précision possible et en un minimum de temps. Comme nous l'avons signalé, il faut, en effet, effectuer cette estimation rapidement. Il s'agit par conséquent de déterminer le nombre optimal de comptages à effectuer.

Pour ce faire, nous avons considéré que nous nous trouvions dans le cas d'un échantillonnage aléatoire simple (E.A.S.). Une bonne homogénéisation de la solution en assure le caractère aléatoire. Les prélèvements de 50 μ l, réalisés avec une micro-pipette, représentent les unités d'échantillonnage. Nous allons construire la courbe donnant le coefficient de variation (noté CV) en fonction du nombre d'unités comptées. On veut en effet connaître le nombre de prélèvements à partir duquel la décroissance du coefficient de variation se stabilise, indiquant que l'augmentation de l'effort d'échantillonnage n'amène plus une augmentation de précision intéressante.

Le coefficient de variation d'un échantillonnage se définit comme le rapport de l'écart-type de l'estimation à la valeur de celle-ci. Le coefficient de variation vaut donc:

$$CV = \sqrt{v(\hat{Y})} / \hat{Y}$$

Or : $\hat{Y} = N\bar{y}$ et $v(\hat{Y}) = N^2 v(\bar{y})$

Ainsi: $CV = \sqrt{v(\bar{y})} / \bar{y}$

où N est le nombre total d'unités d'échantillonnage contenues dans l'éprouvette et \bar{y} la moyenne du nombre d'ovocytes observé.

La variance d'estimation est donnée par la formule:

$$v(\bar{y}) = \frac{s_y^2}{n} (1-f) \quad \text{avec} \quad f = \frac{n}{N}$$

- s_y^2 représente la variance d'échantillonnage, c'est-à-dire la variance du paramètre observé pour les échantillons pris en compte :

$$s_y^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{n-1}$$

- n est le nombre d'unités comptés

- $(1 - n/N)$ est un facteur de correction pour une population finie.

Cependant, dans le cas présent, la quantité n/N est considérée comme négligeable, car N vaut 10^4 et nous n'avons pas effectué plus de 9 comptages. On estime donc que:

$$v(\bar{y}) = \frac{s_y^2}{n}$$

soit: $CV = \sqrt{\frac{s_y^2}{n}} / \bar{y}$

On calcule par conséquent plusieurs coefficients de variation en fonction du nombre d'unités n comptés au cours d'une même opération et on trace la courbe $CV = f(n)$. Afin d'exploiter les résultats de la courbe, nous faisons l'hypothèse qu'il n'existe pas d'interaction moyenne-variance.

Cette courbe a été tracée pour deux expériences différentes. Dans chacun des cas, 9 unités ont été comptées (fig.4 et 5). Sur la figure 4, une décroissance monotone du coefficient de variation en fonction de n peut être notée, contrairement à la figure 5. Cette dernière courbe traduit l'hétérogénéité et la variabilité qui peut provenir des prélèvements et des comptages. En effet, aux erreurs dues à une mauvaise homogénéisation dans l'éprouvette peuvent venir s'ajouter celles imputables à des

comptages erronnés des gamètes.

Afin de "lisser" cette dernière courbe, nous effectuons 10 permutations aléatoires entre les nombres d'ovocytes obtenus pour les différentes unités d'échantillonnage. Pour chaque permutation, le coefficient de variation, correspondant à un nombre d'unités d'échantillonnage donné, est calculé. Pour un nombre de prélèvements, on effectue la moyenne des coefficients de variation obtenus avec chaque permutation et on trace alors la figure 6, qui se rapproche de la figure 4. Ces deux courbes tendent à montrer que le coefficient de variation se stabilise pour un nombre de comptages de l'ordre de 6. Au delà, l'augmentation de précision devient insuffisante en regard de l'effort demandé.

Cependant, les contraintes pratiques, de rapidité notamment, doivent être prises en compte dans le choix du nombre de prélèvements comptés. C'est pourquoi, le comptage de 4 unités, qui était réalisé jusqu'à présent, semble suffisant. En effet, dans tous les cas, le coefficient de variation est alors faible, inférieur à 5%. Qui plus est, le gain de précision réalisé entre 4 et 6 comptages est très inférieur à celui obtenu entre 2 et 4 prélèvements.

2.3 Le choix du plan d'expérience

Il faut trouver le plan le plus approprié pour étudier les effets des différents facteurs en présence. De plus, le nombre de répétitions à effectuer pour chaque niveau d'un facteur doit être déterminé.

Les unités expérimentales sont homogènes: les récipients sont identiques et les facteurs lumière et température sont bien contrôlés. Un plan en "randomisation totale", sans contrôle d'hétérogénéité semble convenir. Outre sa simplicité d'exécution, il permet d'estimer l'erreur avec un maximum de degrés de liberté (PHILIPPEAU, 1989).

Cependant, si les milieux à féconder sont trop nombreux, le temps écoulé entre la première et la dernière fécondation introduira un biais. En effet, les chances de succès de l'élevage s'amenuisent si la ponte et la fécondation sont trop éloignées

Fig.4: Coefficient de Variation en fonction du nombre de comptages

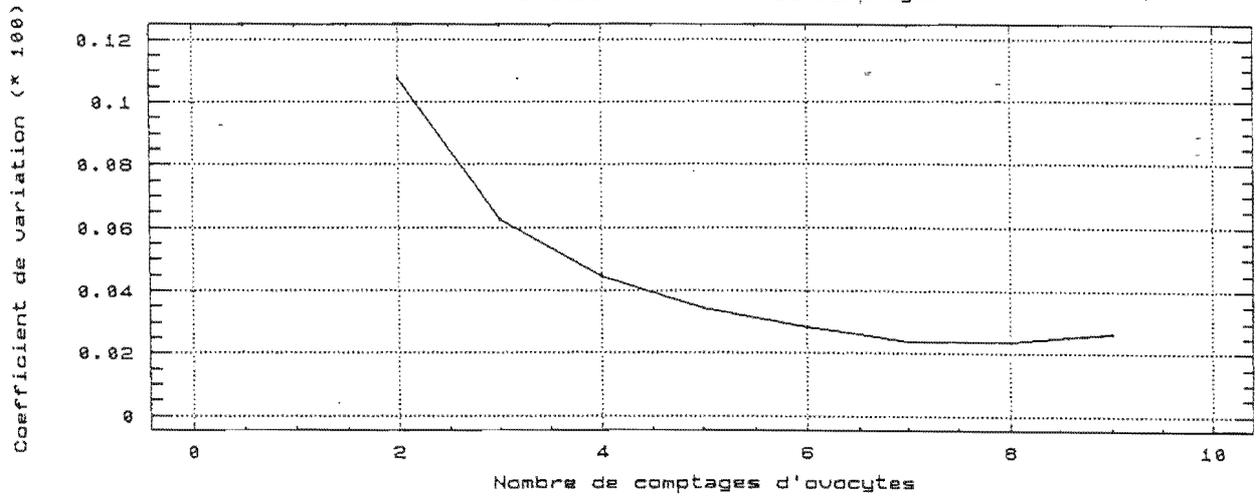


Fig.5: Coefficient de Variation en fonction du nombre de comptages

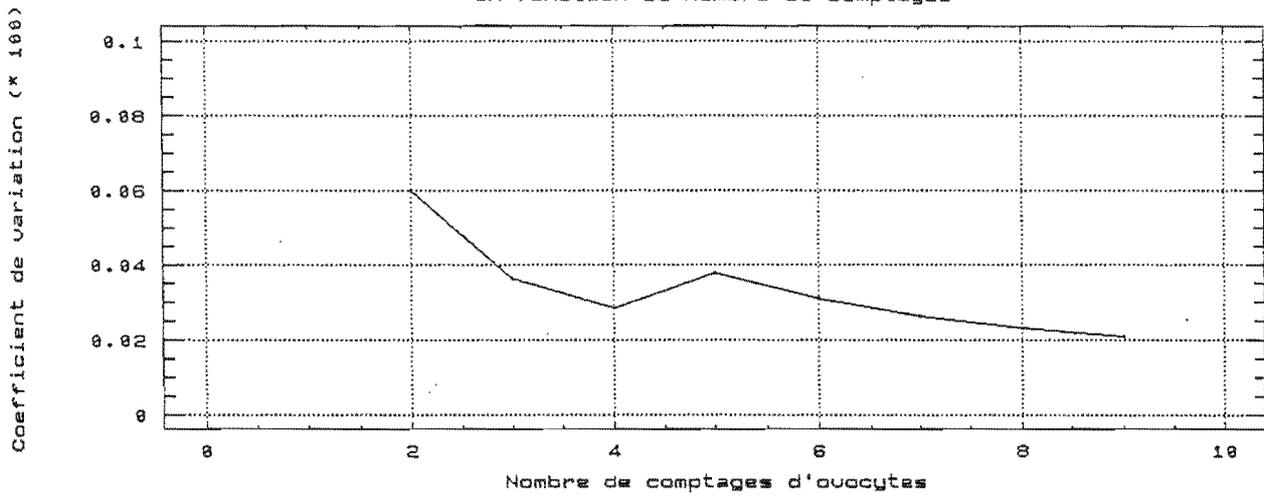
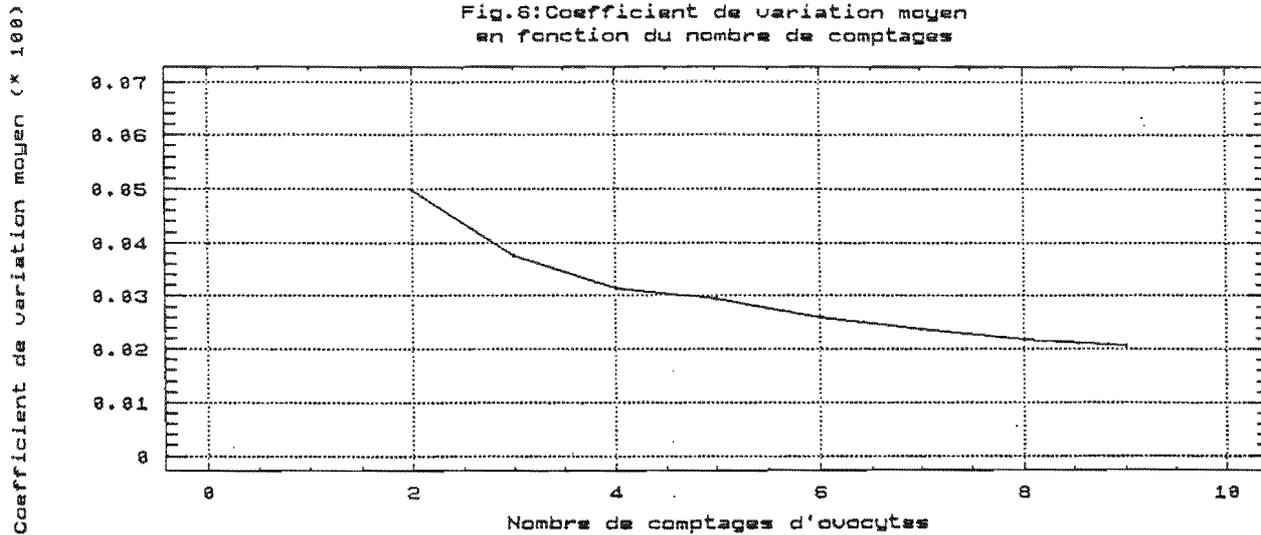


Fig.6: Coefficient de Variation moyen en fonction du nombre de comptages



dans le temps. Des différences observées entre le premier et le dernier milieu fécondé pourraient alors en découler. Il est alors opportun d'effectuer ces fécondations dans les milieux suivant un ordre donné par la table des nombres tirés au hasard (cf annexe IV).

Comme le préconisent certains auteurs (CHAPMAN et MORGAN, 1983; APHA, 1980), il est souhaitable de réaliser deux réplicats pour chaque concentration testée. Si deux résultats diffèrent fortement pour une même concentration, l'utilisation de deux répétitions renseignent sur la valeur à prendre en compte, et celle à éliminer. Afin de pouvoir comparer une valeur supposée aberrante avec les résultats précédents et suivants, il est nécessaire dans ce cas d'établir une gamme de concentrations "étroite". Si tel n'est pas le cas, il peut s'avérer difficile de trancher entre deux résultats distincts. Il est alors préférable d'effectuer trois réplicats.

Finalement, le choix de deux réplicats par milieu, dans un plan en "randomisation totale", dans lequel les niveaux successifs de concentration sont proches les uns des autres, semble adéquat.

2.4 Le choix du plan d'échantillonnage

L'observation des larves sous le microscope représente l'étape la plus longue du test. Un plan d'échantillonnage approprié s'impose donc, afin de limiter les coûts, calculés principalement en temps de travail. Dans un premier temps, le plan suivi cette année sera décrit. Dans un deuxième temps, un plan d'échantillonnage plus adapté sera proposé.

2.4.1 Le plan d'échantillonnage suivi en 1990

Il s'appuie sur la méthode employée par THAIN (1989). Celui-ci effectue les fécondations dans un grand volume (200 ml) d'eau témoin. Il attend une à deux heures, afin que les premières divisions se produisent dans le volume initial. Après sous-échantillonnage, les oeufs se développent dans des volumes de 30 ml de solution test et témoin. THAIN ne considère donc pas

l'influence des polluants sur la réussite de la fécondation.

En revanche, au cours des tests effectués en 1990 par G. LEHOERFF, F. QUINIOU et F. TOULARASTEL, les fécondations ont lieu directement dans des milieux "pollués", les volumes d'eau étant de 150 ml. Quatre sous-échantillons, de 30 ml chacun, sont réalisés après arrêt du développement larvaire avec du formol neutre. Après quoi, dans chaque sous-échantillon, deux unités d'échantillonnage, contenant trois ml de solution chacune, sont observées au microscope.

Cette méthode est précise mais peu rapide et il semble possible de l'améliorer.

2.4.2 Optimisation de l'échantillonnage

Un Echantillonnage Aléatoire Simple (E.A.S.), effectué sans remise, semble ici plus adapté. En effet, d'après SCHERRER (dans FRONTIER, 1983), l'échantillonnage par degré, adopté cette année, présente notamment les inconvénient suivants:

- Il est moins efficace que l'E.A.S. et l'échantillonnage systématique, lorsque le coefficient de corrélation intra-grappe s'avère très élevé, c'est-à-dire lorsque les grappes se composent d'éléments qui se ressemblent beaucoup.

- Certains estimateurs comportent un biais, même si ce biais décroît rapidement avec l'augmentation de l'effectif n.

De plus, l'application de l'E.A.S. est plus appropriée dans les situations suivantes:

- La série d'éléments étudiés est totalement inconnue.

- Il n'existe pas de phénomène d'autocorrélation entre les éléments les plus rapprochés.

- L'effort d'échantillonnage reste constant dans toutes les catégories de la population.

Afin d'établir une relation entre le temps de comptage et la variabilité associée à chaque type d'échantillonnage, nous avons utilisé la fonction de coût g, telle que:

$$g(e) = c(e) * v_e(y)$$

- e représente le type d'échantillonnage, par degré ou aléatoire simple. L'échantillonnage par degré concerne un volume

initial de 150 ml. Dans le cas de l'E.A.S., deux volumes ont été considérés: 150 et 50 ml.

- $v_e(\bar{y})$: variance d'échantillonnage associée à e. La variable observée est dans le cas présent le pourcentage de larves anormales estimé pour chaque solution témoin. Dans le cas d'un échantillonnage par degré, la variance d'échantillonnage vaut:

$$v(\bar{y}) = \frac{1-f}{n} s_1^2 + \frac{f(1-f_2)}{mn} s_2^2 \quad \text{avec } f_2 = m/M$$

$$s_1^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (\bar{y}_i - \bar{y})^2}{n-1} \quad s_2^2 = \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m (y_{ij} - \bar{y}_i)^2}{n(m-1)}$$

$$\bar{y}_i = \frac{\sum_{j=1}^m y_{ij}}{m}$$

$$\bar{y} = \frac{\sum_{i=1}^n \bar{y}_i}{n}$$

- M est le nombre d'unités secondaires composant une unité primaire.
- m est le nombre d'unités secondaires échantillonnées par unité primaire

- c(e) correspond au coût de l'expérience. Il est égal au nombre d'unités d'échantillonnage comptées. Une unité est constituée de 3 ml de la solution, prélevés aléatoirement.

Dans le cas de l'échantillonnage par degré et de l'E.A.S. du volume de 150 ml, douze comptages ont été effectués. En revanche, seules quatre unités d'échantillonnage ont été prélevées dans 50 ml, ce qui entraînent un coût trois fois inférieur aux précédents. Quatre répliqués de 50 ml ont été réalisés. La variance prise en compte est la moyenne des variances obtenues pour ces quatre répétitions.

Le tableau I donne les pourcentages de larves anormales observés et les variances obtenues.

Type d'échant.	PBA (en %)	variance
E.A.S.		
50 ml (4 répétitions)	- 5,8 - 5,8 - 7,4 - 9,9	0,50 0,14 1,31 0,62
150 ml	- 5,9	0,190
Echantillonnage par degré (4 piluliers)	- 7,4 - 7,9 - 32,3 - 18,5	7,855

Tab.I: PBA et variance associée pour chaque échantillonnage considéré

La fonction de coût vaut donc, suivant les types d'échantillonnage effectués:

- échantillonnage par degré:

$$7,855 * 12 = 94,26$$

- E.A.S.:

pour 150 ml: $0,190 * 12 = 2,28$

pour 50 ml: $0,645 * 4 = 2,58$

Une variance élevée est associée à l'échantillonnage par degré. Celle-ci s'explique principalement par une mauvaise homogénéisation lors du sous-échantillonnage. Les risques d'hétérogénéité des solutions finales sont par conséquent importants si on adopte ce plan d'échantillonnage. Même si la pratique permet d'atténuer ce risque, il est plus judicieux de pratiquer un E.A.S..

La fonction de coût varie peu dans ce cas suivant les volumes considérés. Des solutions de 50 ml semblent toutefois suffisantes. En effet, les quantités d'eau utilisées doivent être minimisées, lorsque les milieux à préparer s'avèrent trop nombreux, en raison de contraintes pratiques de stockage.

Nous allons estimer le nombre optimal de prélèvements à réaliser dans le cas d'un E.A.S.. Pour ce faire, nous allons

construire la courbe du coefficient de variation en fonction du nombre de prélèvements. Les unités d'échantillonnage prises en compte et les deux volumes considérés sont identiques à ceux utilisés précédemment. Cependant, la variable considérée est à présent le nombre total de larves observées par unité de 3 ml.

Les formules sont similaires à celles associées au dénombrement des ovocytes. Toutefois, le terme de correction pour population finie ne peut être considéré comme négligeable.

Les figures 7 et 8 montrent les courbes obtenues après "lissage". Vingt permutations aléatoires ont été réalisées pour le volume de 150 ml. En ce qui concerne le volume de 50 ml, le coefficient de variation est la moyenne, pour chaque nombre de comptages, de toutes les valeurs possibles prises après permutations aléatoires.

Les courbes montrent que:

- pour des volumes de 50 ml, trois prélèvements, voire deux, si le temps manque, suffisent.
- pour des volumes de 150 ml, le nombre d'unités d'échantillonnage approprié varie entre six et neuf.

Le temps dont on dispose et la précision que l'on veut obtenir gouverneront avant tout le choix. Néanmoins, quelque soit le nombre de comptages effectué, le coefficient de variation sera alors faible. Ceci indique que la précision associée à l'échantillonnage est importante.

2.5 Etude de la variabilité inter-observateur

Les résultats diffèrent dans l'observation des larves suivant les expérimentateurs. Pour étudier ce phénomène, des comptages par plusieurs observateurs ont été effectués, à deux reprises. Les résultats de ces comptages sont détaillés sur le tableau II.

Fig.7: Coefficient de Variation moyen
en fonction du nombre de comptages

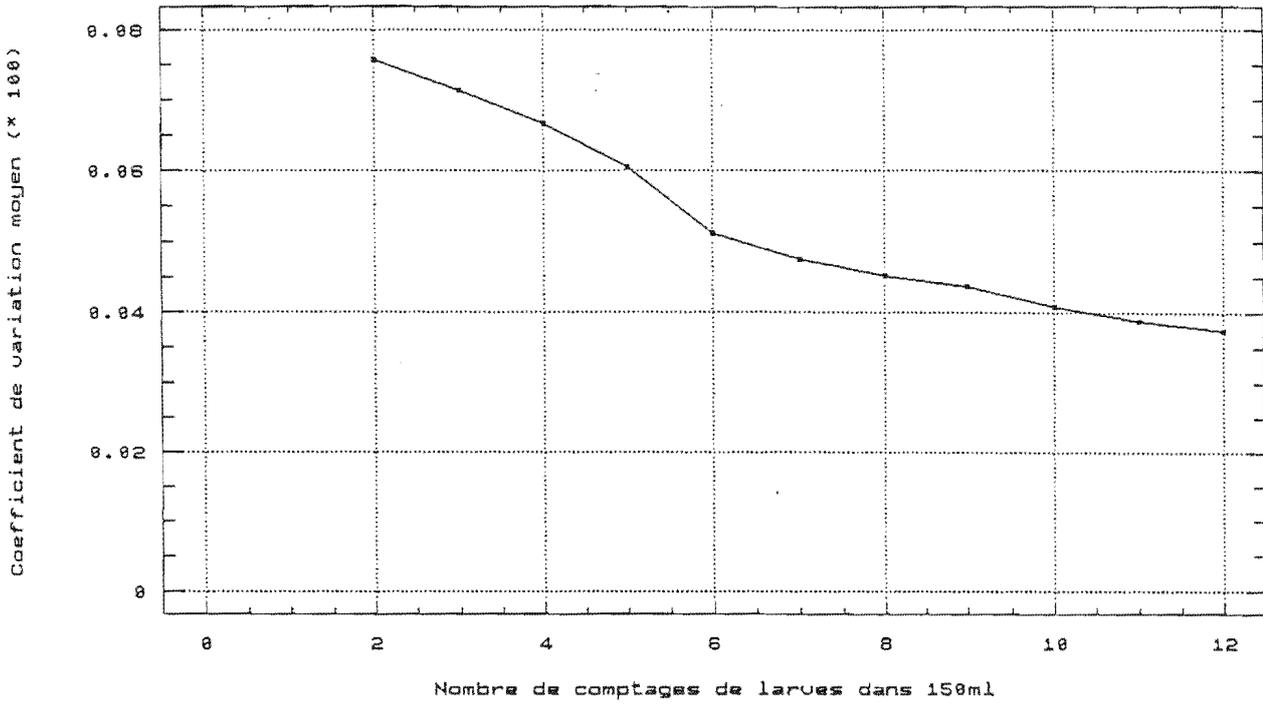
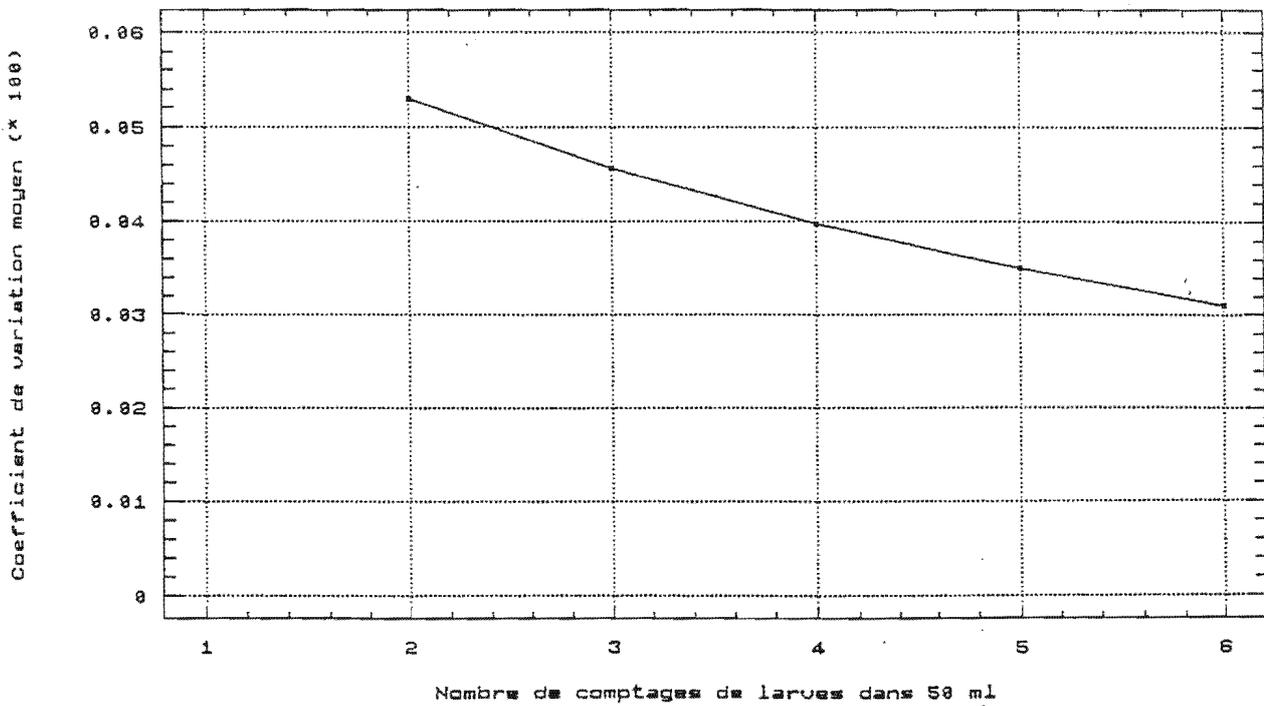


Fig.8: Coefficient de Variation moyen
en fonction du nombre de comptages



	Observateur 1		Observateur 2		Observateur 3	
	Total	PBA(%)	Total	PBA(%)	Total	PBA(%)
Témoin n° 1	156	31,4	156	35,9		
2	141	25,5	139	22,3		
3	154	23,4	153	29,4		
4	129	21,7	122	27,9		
Témoin						
Comptage n°1	60	3,3			58	1,7
n°2	86	9,3			79	8,9
Honfleur 25 g/l						
Comptage n°1	72	22,2			67	19,4
n°2	74	9,5			75	10,7

Tab. II: Nombre total de larves et Pourcentage Brut d'Anormales observés par différents opérateurs pour plusieurs échantillons

Le nombre total de larves compté varie peu suivant les expérimentateurs. Cette erreur a de plus peu de conséquences importantes. En revanche, des différences peuvent être observées quant au pourcentage d'anomalies. Dans 75% des cas, les proportions observées par l'expérimentateur 1 sont supérieures à celles obtenues pour les deux autres. L'analyse de variance ne montre cependant pas de résultats significativement différents. De plus nombreuses inter-comparaisons seraient nécessaires.

Pour une même expérience, afin d'assurer une certaine homogénéité dans les résultats du comptage, il apparaît judicieux qu'un seul opérateur effectue l'observation des larves. Il est de même préférable de réaliser cette étape rapidement, le temps pouvant biaiser l'observation et le jugement. Toutefois, la solution la plus appropriée pour diminuer le biais occasionné par cette opération consiste à effectuer la moyenne des résultats obtenus pour plusieurs observateurs différents. Les contraintes pratiques nous obligent cependant à rejeter cette possibilité.

Par conséquent, le protocole expérimental optimal se déroule a priori dans les conditions suivantes:

- Le dénombrement des ovocytes s'effectue en quatre comptages de 50 µl.

- L'échantillonnage est aléatoire et simple.
- Un volume initial de 50 ml semble approprié, de plus grands volumes n'apportant pas de précision supplémentaire.
- Pour chaque volume, deux réplicats sont effectués.
- Trois prélèvements de 3 ml suffisent alors pour l'observation des larves. Si le temps fait défaut, deux unités d'échantillonnage peuvent être comptées.
- Un opérateur unique réalise le comptage des larves, le plus rapidement possible. Dans l'optique d'une extension du test, une inter-calibration entre les laboratoires concernés serait nécessaire. L'harmonisation des résultats entre les différents opérateurs lors de l'observation conditionne en effet la fiabilité des réponses obtenues.

Dans une étape ultérieure, il serait intéressant d'optimiser la taille des unités d'échantillonnage lors du comptage. La méthode consisterait alors à tracer différentes courbes de coefficient de variation pour des prélèvements de 1, 2, 3, voire 4 ml de solution et de choisir le volume et le nombre de prélèvements apportant le maximum de précision à un moindre coût.

3 TRAITEMENT STATISTIQUE DES RESULTATS

Les résultats obtenus lors de tests biologiques sont des proportions, que l'on traite de manière appropriée. Nous allons, dans un premier temps, décrire la méthodologie employée. Puis, nous appliquerons cette méthode aux réponses observées pour les années 1989 et 1990.

3.1 Méthodologie du traitement des données

Nous allons étudier successivement les trois volets de la méthode utilisée:

- la transformation des données
- le calcul de l'intervalle de confiance associé à un résultat
- l'analyse de variance et la comparaison des moyennes.

3.1.1 La transformation des données

Les larves sont classées selon deux caractères opposés. Si on prélève un échantillon aléatoire et simple d'effectif n , le nombre X d'individus possédant le caractère anormal est une variable binomiale de moyenne et d'écart-type:

$$m_X = np \text{ et } \sigma_X = \sqrt{npq} = \sqrt{np(1-p)}.$$

La proportion d'individus possédant , dans l'échantillon, le caractère considéré est une variable aléatoire:

$$X' = X/n$$

de moyenne et d'écart-type:

$$m_{X'} = p \text{ et } \sigma_{X'} = \sqrt{pq/n} = \sqrt{p(1-p)/n}.$$

Les distributions d'échantillonnage exactes de X et de X' dépendent donc de deux paramètres: n et p . n est connu et p est estimé sans biais à partir de l'échantillon:

$$\hat{p} = x/n = x'$$

De même que CHAPMAN et al. (1987), nous allons appliquer, dans ce cas, une transformation angulaire, appelée également transformation arcsinus, à la variable X et nous obtenons:

$$Y = \arcsin \sqrt{X/n} = \arcsin \sqrt{X'}$$

La variable transformée Y est asymptotiquement normale, de moyenne et d'écart-type (DAGNELIE, 1969):

$$m_Y \simeq \arcsin \sqrt{p} \quad \sigma_Y \simeq 1/2 \sqrt{n}$$

Le paramètre inconnu p n'apparaît alors plus dans l'écart-type. Cela facilite l'emploi de la méthode de l'erreur-standard dans le calcul de l'intervalle de confiance.

Cette transformation peut être appliquée aussi bien au PNA qu'au PBA. En effet, seuls des facteurs constants interviennent dans l'élaboration du PNA.

L'effectif n est supposé constant ou sensiblement constant.

3.1.2 Calcul de l'intervalle de confiance

Les limites de confiance y_1 et y_2 de la moyenne m_Y de la variable transformée sont calculées grace à la méthode de l'erreur-standard:

$$y_1 = \arcsin \sqrt{x/n} - u_{1-\alpha/2}/2\sqrt{n}$$

$$y_2 = \arcsin \sqrt{x/n} + u_{1-\alpha/2}/2\sqrt{n}$$

Les limites de confiance p_1 et p_2 sont obtenues par la transformation inverse:

$$p_1 = (\sin y_1)^2 \text{ et } p_2 = (\sin y_2)^2$$

Cette méthode de calcul est simple et appropriée dans le cas d'événements non rares. Dans le cas contraire, des erreurs peuvent être introduites dans le calcul des bornes.

Il est alors possible de mesurer les limites de l'intervalle de confiance de la façon suivante:

- A chaque larve comptée est associé un nombre: 0 si elle est normale, 1 dans la cas contraire.

- Toutes les larves observées sont ordonnées de 1 à n.

- Un tirage aléatoire avec remise de n nombres parmi les n observations est réalisé suivant une loi discrète uniforme. Cette opération est répétée une centaine de fois, grace à un générateur de nombres aléatoires.

- Pour chaque tirage, la proportion de larves anormales est calculée.

- Tous les résultats sont alors reportés sur un diagramme en fréquences cumulées. Les deux limites de l'intervalle de confiance à 95 % correspondent aux proportions obtenues pour des fréquences respectives de 5 et de 95 %.

Ces calculs aboutissent à des résultats fiables mais possèdent l'inconvénient d'être longs et fastidieux. L'intervalle de confiance étant essentiellement utilisé pour détecter des valeurs suspectes, nous emploierons la première méthode décrite.

3.1.3 L'analyse de variance et la comparaison des moyennes

La variable Y représente les résultats, exprimés en PNA et transformés. Le modèle liant Y au traitement T, par exemple la concentration, est supposé linéaire:

$$Y = \mu + T + e$$

- μ : "effet moyen"

- T: effet dû au traitement T

- e: composante aléatoire, ou résidu. Cette Variable Aléatoire est calculée par rapport au modèle théorique. Dans la pratique, nous n'obtiendrons que des "écarts à l'ajustement", qui sont des

réalisations de cette Variable Aléatoire.

On considère que les coefficients du modèle sont sans biais et convergents si les hypothèses suivantes, concernant les résidus, sont vérifiées (TRANCHEFORT, 1974):

- Le modèle choisi est correct: aucune variable explicative n'a été omise.

- Les résidus sont indépendants entre eux et suivent une loi normale de moyenne nulle et de variance constante.

Par construction du modèle (méthode des moindres carrés), les résidus sont d'espérance nulle. Les conditions expérimentales assurent l'indépendance. Par examen graphique, c'est-à-dire en établissant le graphe des écarts à l'ajustement en fonction de l'estimation de Y, nous pouvons tester la validité des autres hypothèses.

L'analyse de variance permet de déterminer si il existe des différences significatives entre les effets des différents facteurs. Les degrés de liberté correspondent à un plan en "randomisation totale". Suivant les résultats de l'analyse, l'hypothèse H_0 , selon laquelle la différence réelle entre les traitements est nulle, est acceptée ou rejetée avec un risque α . α est égal dans le cas présent à 5 %.

Après quoi, et afin d'effectuer une comparaison multiple des moyennes, nous procédons au test de Newman-Keuls. Ce dernier est fondé sur la comparaison des amplitudes des groupes de moyennes avec une amplitude maximale théorique correspondant à une probabilité donnée de réalisation.

La Plus Petite Amplitude Significative (P.P.A.S.) se calcule de la façon suivante, pour un groupe de v moyennes:

$$\hat{\Delta}_{NK} = q_{1-\alpha} * \sqrt{V_e/n}$$

- V_e correspond à la variance résiduelle obtenue pour l'expérience considérée.

- n est le nombre de répétitions par traitement.

- $q_{1-\alpha}$ (cf table en annexe V) est tel que, pour v populations et pour un nombre donné de degrés de liberté associé à la variance résiduelle, la probabilité de dépasser la P.P.A.S. soit α .

Plus généralement, pour plusieurs critères de classification, la variance résiduelle doit être remplacée par le carré moyen qui

a servi de base de comparaison pour les moyennes considérées. Cette remarque vaut essentiellement pour un modèle aléatoire.

Dans la pratique, les comparaisons s'effectuent de la façon suivante:

- On compare dans un premier temps, l'amplitude observée pour les moyennes considérées à la P.P.A.S. correspondante. Si l'amplitude observée est inférieure à l'amplitude théorique, le test s'arrête alors. Dans le cas contraire:

- On compare l'amplitude des différents groupes de $(v-1)$ moyennes à la P.P.A.S. correspondante.

- Le test est prolongé jusqu'à obtenir une amplitude observée inférieure à la P.P.A.S.. Les moyennes des derniers groupes pris en compte ne sont pas considérées comme différentes.

Si l'on veut comparer des solutions polluées, pour différents sédiments à une même concentration, avec un témoin, il est judicieux d'utiliser le test de DUNNETT (GOUET, 1974). Le test est dans ce cas unilatéral: on teste l'hypothèse nulle H_0 contre l'hypothèse alternative, les traitements sont supérieurs au témoin.

"La différence entre la moyenne du témoin et la moyenne de l'un quelconque des traitements est significative lorsqu'elle égale ou dépasse la valeur:

$$\Delta_D = D_{1-\alpha} * \sqrt{2V_e/n} \quad "$$

Les valeurs de $D_{1-\alpha}$ sont données par DUNNETT (1964). Elles dépendent des mêmes paramètres que les constantes $q_{1-\alpha}$ utilisées dans le test de Newman-Keuls. Toutefois, le témoin sera exclu du nombre de moyennes à comparer.

L'utilisation de ces deux tests pourrait ainsi permettre d'une part de déterminer si les sédiments sont pollués ou non et d'autre part de classer les sédiments suivant leur degré de pollution relative. C'est ainsi que procèdent CHAPMAN et MORGAN (1983).

3.2 Analyse des résultats de l'année 1990

Suite à des problèmes matériels, seules les résultats des expériences concernant les moules ont pu être exploités

3.2.1 Influence de la filtration

Cette expérience vise à montrer l'influence de la filtration sur le taux de larves anormales. Pour ce faire, quatre types de milieu ont été réalisés:

- un témoin
- trois milieux "pollués", à une concentration de 25 g/l de sédiment provenant de Honfleur. Après centrifugation, les solutions contaminées ont été soit utilisées sans filtration ("telles quelles"), soit filtrées respectivement à 0,22 μm et à 0,45 μm avant la préparation des milieux.

Les résultats obtenus sont décrits sur le tableau III.

Milieu testé	Témoin	25 g/l tel quel	25 g/l 0,22 μm	25 g/l 0,45 μm
Pourcentage de larves anormales (en %)	58,7	100	85,5	85,1

Tab. III: Pourcentage Brut de larves Anormales pour une solution témoin et des solutions contaminées, à différents niveaux de filtration.

Le PBA au sein des témoins est très élevé. Selon STEPHAN (1977), la formule de Abbott n'est pas applicable si le taux d'anomalies observé pour des solutions témoin dépasse une valeur minimale. Dans ce cas, le PBA indique en effet que les animaux subissent un stress, indépendamment de l'influence des polluants. Les réponses obtenues peuvent alors être biaisées. Les causes d'un si fort taux d'anomalies sont multiples:

- eau de référence polluée
- verrerie non stérile
- gamètes non matures
- gamètes issus de géniteurs en mauvaise condition.

Quant au seuil admissible, les avis divergent selon les auteurs:

- LUCAS (1976) considère que, pour toute expérimentation sur des larves de bivalves, les résultats perdent toute signification si la mortalité des témoins atteint 50 %.

- Pour THAIN (1989), le PBA admissible chez des témoins varie entre 30 et 40 %.

- WOELKE (1972, dans CHAPMAN et MORGAN, 1983) suggère un pourcentage acceptable de 3 %, mais les anomalies ne tiennent alors compte ni des mortalités lors des premiers stades de développement, ni des ovocytes non fécondés.

Pour notre part, nous considérerons les limites fixées par THAIN.

Compte tenu de ces remarques, les réponses observées en fonction de la filtration perdent beaucoup de leur signification. Toutefois, les solutions utilisées "telles quelles" semblent avoir un effet toxique plus important que celles filtrées à 0,22 μm et à 0,45 μm . En revanche, aucune différence apparente n'a pu être enregistrée entre les résultats des milieux filtrés.

L'effet bactérien, sans doute associé à l'utilisation de solutions non filtrées, peut s'avérer très variable suivant les expériences. La filtration est par conséquent un bon moyen de se prémunir contre ces variations.

3.2.2 Influence de la conservation et d'une deuxième filtration de l'eau de mer référence

Le but de cette expérience est de comparer d'une part l'influence du type de conservation de l'eau de référence, d'autre part, l'effet d'une deuxième filtration à 0,22 μm avant la préparation des milieux. L'eau utilisée est de l'"eau du jour" ou de l'"eau du stock", conservée au réfrigérateur ou au congélateur. La deuxième filtration concerne uniquement l'eau stockée.

Le tableau IV synthétise les réponses observées.

	Type de conservation		
	Congélation	Réfrigération	"eau du jour"
Une seule filtration à 0,22 μm	92,3	98,2	98
2 filtrations à 0,22 μm	91,2	98,2	

Tab. IV: Pourcentage de larves normales (en %) obtenu pour différents types de conservation de l'eau témoin et pour une ou deux filtrations à 0,22 μm

Les résultats montrent qu'une deuxième filtration n'influe pas sur les effets enregistrés. De plus, quelque soit le mode de stockage choisi, les pourcentages observés sont du même ordre de grandeur: toujours supérieurs à 90 %.

Le choix du mode de conservation de l'eau témoin doit avant tout reposer d'une part sur des considérations pratiques, d'autre part sur les procédés employés par d'autres auteurs. A ce sujet, THAIN congèle l'eau de mer qu'il utilise comme référence. Cela permet d'effectuer des tests successifs avec la même eau. Ce choix dépend néanmoins des possibilités matérielles, de place notamment, dont on dispose pour pouvoir conserver les quantités d'eau nécessaires à toutes les expériences de l'année.

3.2.3 Influence de la provenance, de la concentration et du lieu de remise en suspension du sédiment

Au cours de ce test, trois facteurs ont été considérés:

- la provenance, Honfleur ou Argenton
- la concentration, 10 et 50 g/l
- le lieu de remise en suspension, sur le terrain et au laboratoire. Les deux niveaux de ce facteur sont notés respectivement "surnageant" et "sédiment": ils correspondent à deux formes de conservation des prélèvements.

Les résultats obtenus sont les suivants:

Provenance	Lieu de remise en suspension	Concentration (en g/l)	PBA (en %)	PNA (en %)	PNA transf
ARGENTON	SURNAGEANT	10	27,3	13,8	0,381
		50	25,4	11,5	0,346
	SEDIMENT	10	39,7	28,5	0,563
		50	91,1	89,4	1,239
HONFLEUR	SURNAGEANT	10	11,7	-4,7	0
		50	28,1	14,7	0,393
	SEDIMENT	10	37,8	26,2	0,537
		50	68,4	62,5	0,912
TEMOIN			15,7		

Tab. V: PBA, PNA et PNA transformés, observés suivant les différentes solutions testées

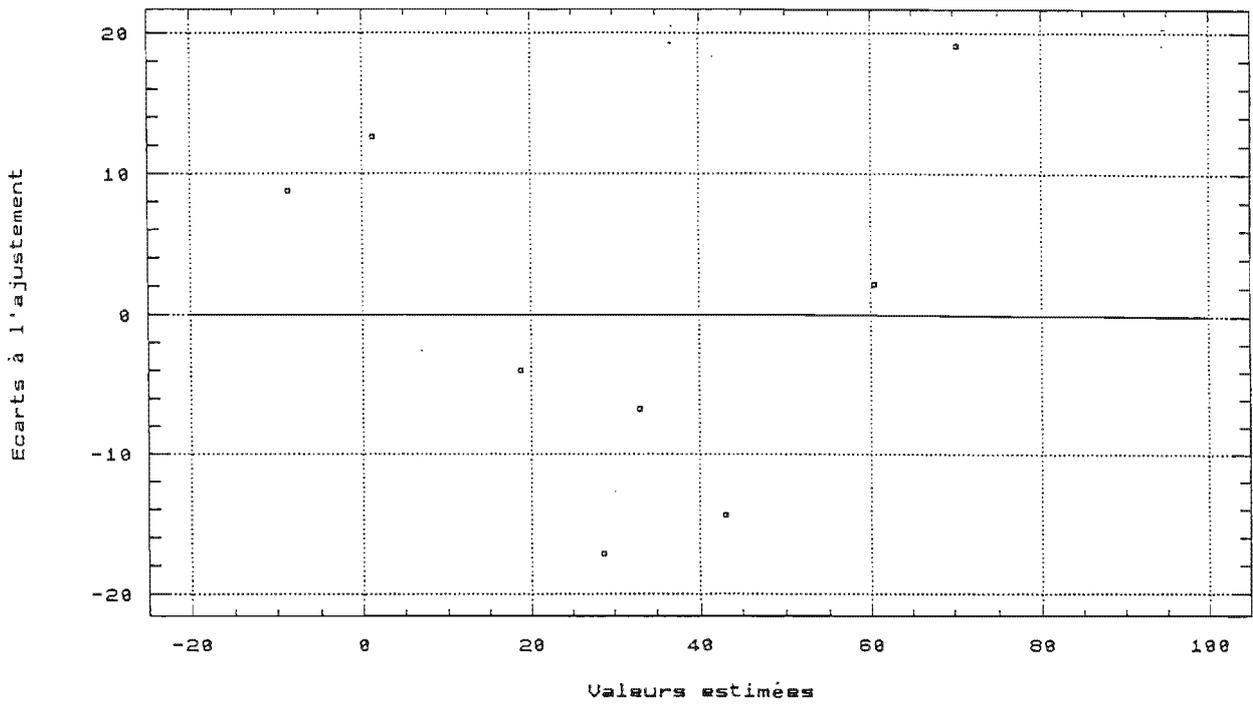
Dans le cas du surnageant de Honfleur et pour une concentration de 10 g/l, le pourcentage d'anomalies est inférieur à celui obtenu pour le témoin. Ceci s'explique par le fait que, pour des concentrations faibles en produits toxiques, les embryons ne sont pas sensibles aux polluants et le développement est favorisé par les éléments nutritifs présents en solution. Dans l'interprétation statistique, le PNA est ramené à la valeur nulle et ainsi "calé" sur le témoin.

Nous avons ensuite procédé à une analyse de variance à trois facteurs sans répétition. Nous avons au préalable examiné la répartition des écarts à l'ajustement en fonction des estimations des pourcentages transformés et non transformés (Fig. 9).

La figure 9 montre que la transformation entraîne un relatif regroupement autour de l'axe des abscisses, ce qui justifie par conséquent son emploi. En ce qui concerne les données transformées, le manque de valeurs ne nous permet cependant pas d'expliquer la présence de points dispersés dans le plan.

L'analyse de variance met en évidence des différences d'une part entre le "surnageant" et le "sédiment", et d'autre part entre les deux concentrations. Les probabilités critiques

Variable non transformée



Variable transformée

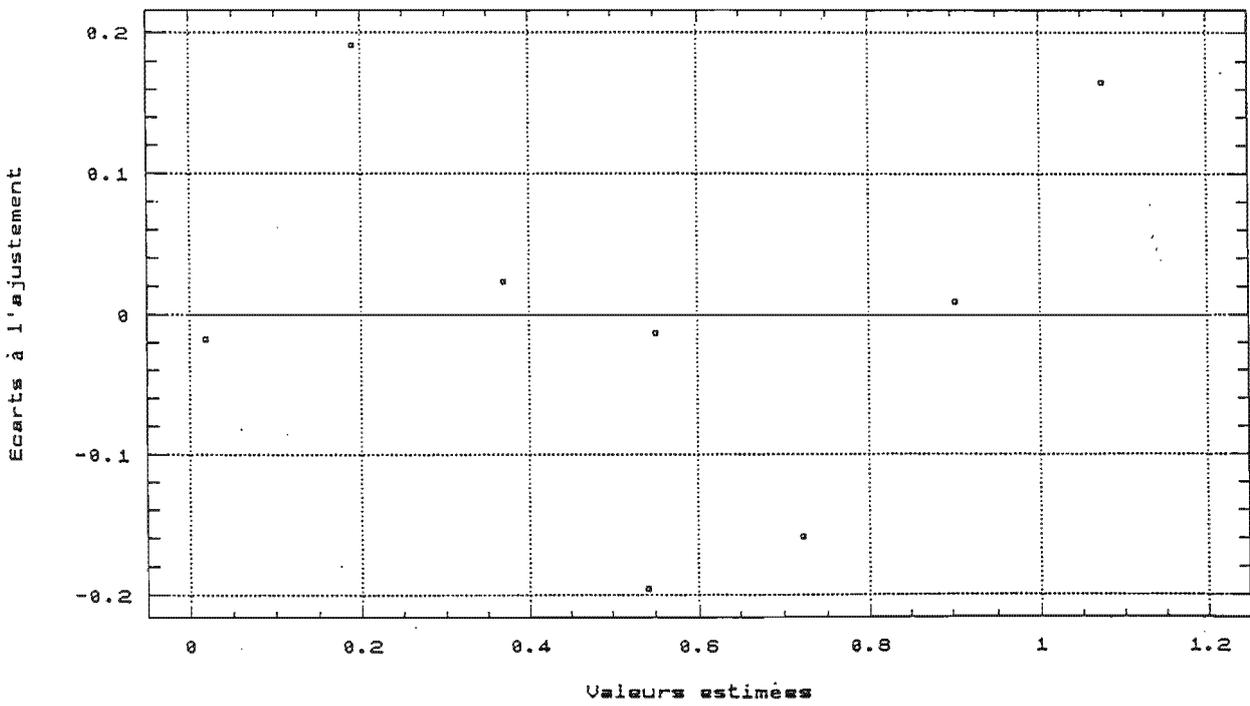


Fig.9: Comparaison des écarts à l'ajustement obtenues pour une variable non transformée puis transformée

observées sont respectivement de 0,013 et de 0,049, ce qui indique que la différence de PNA entre des concentrations de 10 g/l et de 50 g/l est peu importante.

L'effet du "sédiment" apparaît plus important que celui du "surnageant". Certains produits toxiques seraient ainsi plus facilement libérés après congélation dans le sédiment, à cause notamment de l'éclatement des cellules de la matière vivante. Des analyses chimiques seraient nécessaires, afin de mieux comprendre les phénomènes en cause. D'un point de vue pratique, il semble plus judicieux de congeler directement les échantillons prélevés.

En ce qui concerne les concentrations, l'effet toxique est logiquement plus important pour des concentrations de 50 g/l que pour 10 g/l. Un examen des données montre que les différences sont plus marquées pour le sédiment que pour le surnageant. Ainsi, dans ce dernier cas, pour Argenton, l'effet est plus faible à 50 g/l qu'à 10 g/l.

Les deux sites considérés n'entraînent pas de résultats significativement différents, contrairement à ce que nous aurions pu prévoir. Cependant, il convient de tenir compte de la période pendant laquelle les prélèvements ont été effectués. En effet, au printemps, l'activité biologique au sein du sédiment croît fortement. Ceci explique que les échantillons prélevés n'aient pas permis de déceler l'influence de la toxicité propre à chaque lieu de collecte.

La collecte du sédiment pose en outre le problème important de la variabilité spatiale et temporelle liée à ce matériel. Des prélèvements effectués à une date précise en des endroits distincts d'un même site peuvent induire des résultats différents et il serait intéressant de pouvoir les comparer. Même si un mélange des échantillons permet d'atténuer les différences potentielles, l'influence du lieu de prélèvement est mal connue. Il importe d'effectuer des prélèvements homogènes de ce point de vue.

De même, la collecte doit être réalisée à une date déterminée pour tous les sites choisis. La fin de l'hiver apparaît être une période appropriée, car l'activité, bactérienne notamment, est alors moindre. Les échantillons devront de toute façon être prélevés dans un intervalle de temps court.

Les conclusions tirées de cette expérience ne peuvent toutefois qu'être partielles. En effet, trop peu de données ont été obtenues. Il eût été, à mon sens, intéressant d'effectuer un nombre de concentrations plus important et de réaliser deux réplicats pour chaque milieu testé.

3.2.4 Influence de plusieurs concentrations en sédiment

Nous voulons déterminer l'ordre de grandeur d'une concentration qui engendre un effet ni trop important, ni trop faible. Pour ce faire, lors de ce test, une gamme "étroite" de concentrations a été établie. Les milieux testés ont été contaminés avec du sédiment de Honfleur, utilisé "tel quel", selon des concentrations de 0, 10, 20, 30, 40 et 50 g/l. Pour chaque milieu, deux répétitions ont été effectuées.

Les pourcentages observés dans les solutions témoin sont élevés (Tab.VI), mais nous considérerons tout de même les résultats des expériences comme valides.

Concentration (en g/l)	Réplicat n°	PBA en %	Moy.	PNA en %	Moy.	PNA transformé
0	1	25,7	32,3	0	0	0
	2	38,9		0		0
10	1	50,2	55,95	33	35,15	0,612
	2	61,7		37,3		0,657
20	1	90,1	90,35	86,7	85,65	1,197
	2	90,6		84,6		1,167
30	1	98,8	97,75	98,4	96,5	1,444
	2	96,7		94,6		1,336
40	1	100	100	100	100	1,5708
	2	100		100		1,5708
50	1	100	100	100	100	1,5708
	2	100		100		1,5708

Tab. VI: Pourcentage, brut et net, d'anomalies en fonction de la concentration en sédiment.

La figure 10 représente l'évolution du PNA avec la concentration en sédiment. La toxicité du sédiment apparaît très rapidement. De plus, il a été possible d'ajuster à ces points une courbe d'équation:

$$y = 0,001 * \exp (6,9 * (1 - \exp (-0,189 * x))).$$

Nous pouvons ainsi modéliser l'effet du sédiment sur les larves de moules. Cette courbe ajustée nous permet en outre de calculer la concentration qui engendre un pourcentage net d'anomalies de 50 % et qui vaut 12,1 g/l.

Toutefois, il faut remarquer que l'on dispose de peu de points pour les faibles concentrations et aux alentours du point d'inflexion. Des études plus poussées seraient nécessaire en considérant par exemple une gamme de six concentrations, s'étalant de 0 à 25 g/l.

Après transformation angulaire, nous avons traité les résultats par analyse de variance. Les différences obtenues sont évidemment très significatives, la probabilité critique étant nulle.

Puis, nous avons effectué un test de comparaison de moyenne de Newman-Keuls. La P.P.A.S. vaut, pour une comparaison de deux moyennes:

$$\Delta_{NK} = q_{1-\alpha} * \sqrt{V_e/n} = 0,085$$

Or, si on excepte les PNA transformés obtenus pour 40 et 50 g/l, qui sont égaux, la plus petite différence observée entre deux concentrations vaut 0,18. Ainsi, pour des concentrations de 0 à 40 g/l, les effets observés sont considérés comme significativement différents les uns des autres.

Ces résultats ne concernent que le sédiment de Honfleur, utilisé "tel quel". Il serait intéressant d'effectuer la même étude d'une part avec le sédiment d'Argenton, d'autre part en filtrant les solutions obtenues après centrifugation.

Cette expérience montre néanmoins que, dans le cas où on ne réalise pas de filtration, une concentration de 10 g/l engendre le PNA le plus proche de 50 %. Ainsi, cette concentration pourra être choisie pour comparer des sédiments de provenances différentes, entre eux et avec un témoin. Les tests de Dunnett et de Newman-Keuls permettraient de distinguer les sédiments pollués de ceux qui ne le sont pas.

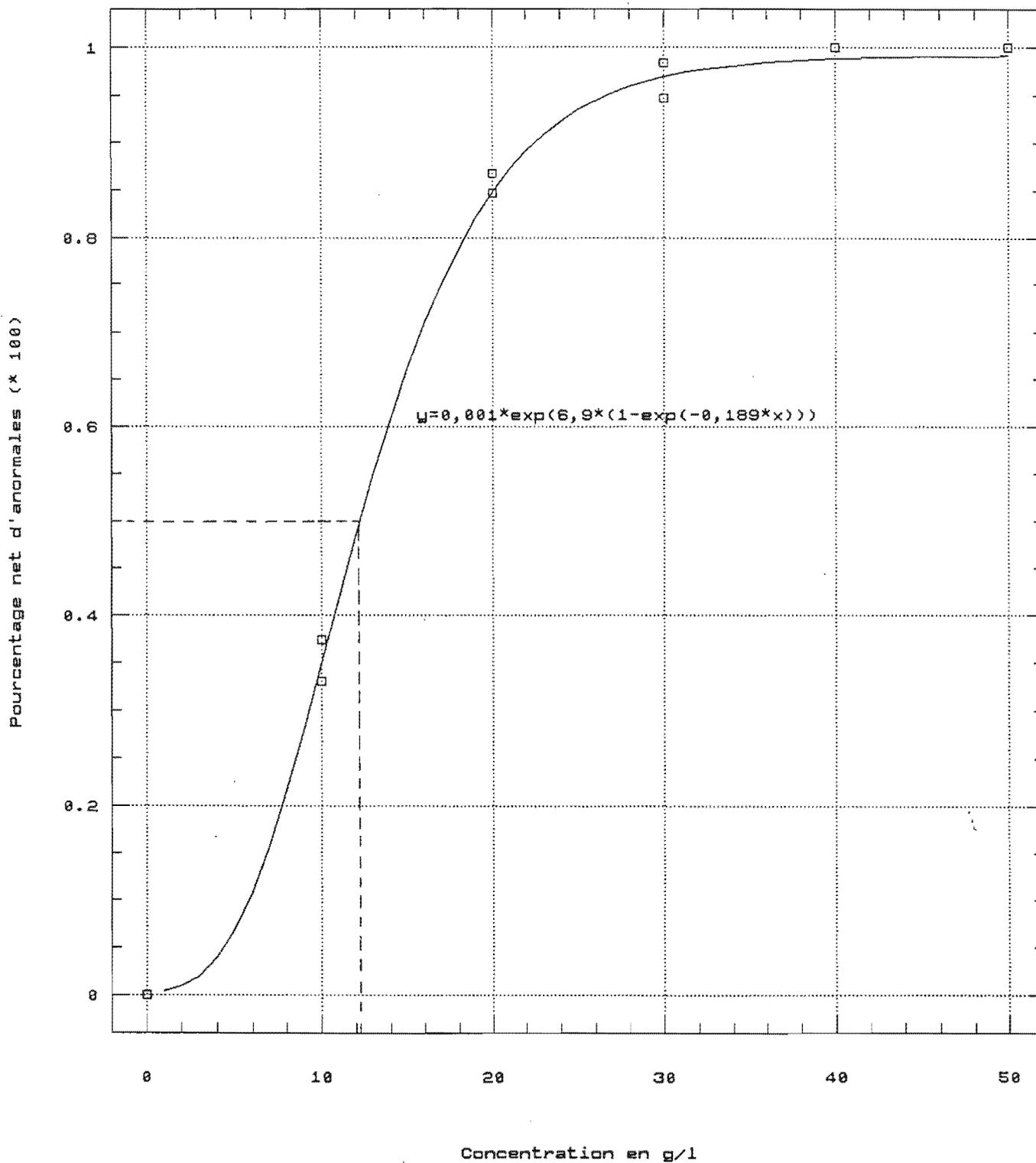


Fig.10: Pourcentage net d'anormales en fonction de la concentration en sédiment

CONCLUSION

Le test biologique mis en place, simple et peu coûteux, permet de mesurer l'effet global d'un sédiment. Il s'agit d'une première approche fort intéressante de la qualité de celui-ci. La connaissance des substances chimiques qui entrent en jeu peut faire l'objet d'une deuxième approche. Mais de nombreux polluants peuvent intervenir (cuivre, métaux lourds, hydrocarbures, PCB, sels nutritifs, etc...) et des interactions entre ces produits toxiques sont également susceptibles de jouer un rôle. Il est donc parfois délicat, voire faux, de tirer des conclusions uniquement à partir des analyses chimiques. Les tests pratiqués peuvent par conséquent être la base première du travail et engendrer par la suite des études plus poussées.

Néanmoins, des problèmes se posent d'une part dans la collecte et la conservation du sédiment, d'autre part dans le stockage de l'eau de mer. La période de prélèvement du sédiment doit être bien choisie et il est de plus impératif de réaliser un échantillonnage homogène et représentatif en un même lieu, afin de ne pas faire intervenir la variabilité spatiale inhérente au site. La congélation directe du sédiment est la technique la plus pratique et les réponses enregistrées alors sont les plus nettes. Il serait important de connaître l'évolution de la qualité du sédiment congelé et la durée maximale pendant laquelle les prélèvements peuvent être stockés de la sorte. La conservation de l'eau de mer sous forme congelée permet en outre de disposer d'une eau de qualité identique tout au long des expériences successives. Si l'effet bactérien ne doit pas être pris en compte, il faut filtrer les solutions contaminées à 0,22 μm .

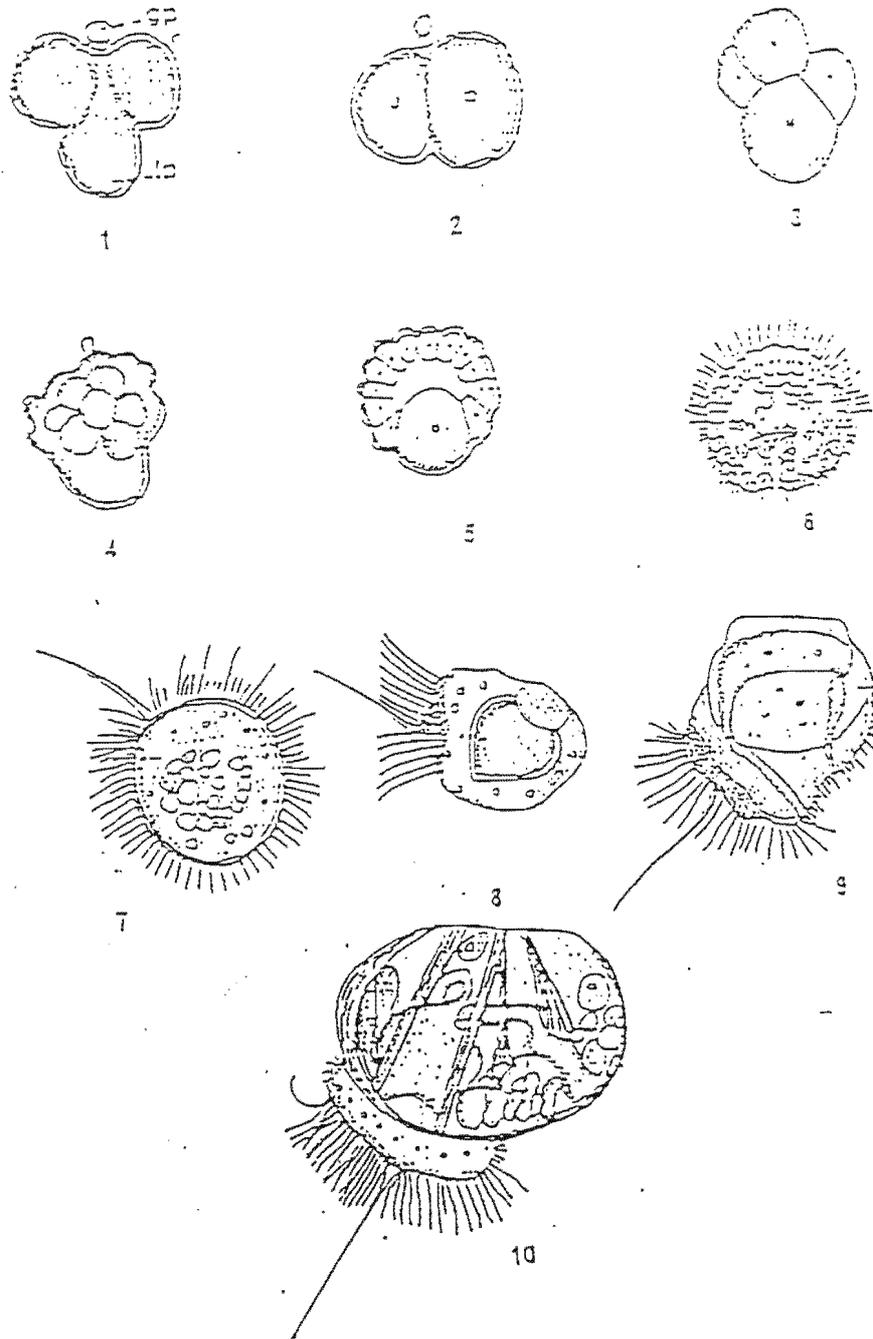
L'application future de ce test nécessite la comparaison de sédiments de différents sites, entre eux et avec une solution d'eau de mer référence. Les résultats obtenus permettraient alors d'établir une cartographie des sédiments pollués, qui serait un bon outil dans le cadre de la surveillance de la qualité du milieu marin.

BIBLIOGRAPHIE

- APHA, 1980, Standard methods for the examination of water and wastewater, 15th ed., American Public Health Association, Washington, D.C., 301 p.
- Bureau d'Etudes Statistiques de l'ITCF, 1975, L'élaboration d'un protocole d'essai - Proposition d'un plan type et quelques commentaires, Publication ITCF, 55 p.
- CHAPMAN P.M., MORGAN J.D., 1983, Sediment bioassays with oyster larvae, Mar. Poll. Bull., 31, 438-444.
- CHAPMAN P.M., DEXTER R.N. et LONG E.R., 1987, Synoptic measures of sediment contamination, toxicity and infaunal community composition (the Sediment Quality Triad) in San Francisco Bay, Mar. Ecol. Prog. Ser., 35, 75-96.
- DAGNELIE P., 1969, Théorie et méthodes statistiques - Tome II, Duculot, Presses Agronomiques de Gembloux, 463 p.
- DUNNETT C.W., 1964, New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics, 20, 482-491.
- FIELD I., 1922, Biology and economic value of the sea mussel, *Mytilus edulis*, Bull. U.S. Bur. Fish, 38, 922, 127-259.
- FRONTIER S., 1983, Stratégies d'échantillonnage en écologie, Masson, Les presses de l'université Laval, Québec, 492 p.
- GARLAND C.D., COOKE S.L., MACMEEKIN T.A. et VALENTINE J.E., 1986, Effects of a 0,2 µm membrane-filtered as a culture medium on fertilized eggs and larvae of the pacific oyster *Crassostrea gigas*, Austr. J. Mar. Fresw. Res., 37, 713-720.
- GOUET J.P., 1974, Les comparaisons de moyennes et de variances - Application à l'agronomie, Publication ITCF, 55 p.
- HIS E., ROBERT R. et MAURER D., 1983, Estimation de la teneur en acétate de tributyl-étain dans l'eau de mer par une méthode biologique, J. Mall. Stud., Suppl. 12(A), 60-68.
- HIS E., ROBERT R., 1986, Utilisation des élevages larvaires de *Crassostrea gigas* en écotoxicologie marine, Haliotis, 15, 301-308.
- HRS-BRENKO M., CALABRESE A., 1969, The combined effect of temperature and salinity on larvae of the mussel *Mytilus edulis*, Marine Biology, 4, 3, 224-226.
- LE GALL J., 1989, Rapport de stage, IUT Brest, Département Biologie Appliquée, 40 p.
- LE PENNEC M., 1978, Genèse de la coquille larvaire et post-larvaire chez divers bivalves marins, Thèse Doc. ès Sciences-Nat., Université de Bretagne Occidentale, 229 p.

- LOOSANOFF V.L., DAVIS N.C., 1963, Rearing of bivalve mollusks, Adv. Mar. Biol., 1, 1-136.
- LUCAS A., 1976, Remarques méthodologiques sur l'emploi des larves de moule comme tests biologiques, Haliotis 5, 126-132.
- MITCHELL D.G., MORGAN J.D., VIGERS G.A. et CHAPMAN P.M., 1985, Acute toxicity of mine tailings to four marine species, Mar. Poll. Bull., 16, 11, 450-455.
- PHILIPPEAU G., 1973, Théorie des plans d'expérience - Application à l'agronomie, Publications du Bureau d'Etudes Statistiques de l'ITCF, 205 p.
- QUINIOU F., 1989, Etude préalable à la mise en route dans le cadre du RNO d'un programme de surveillance des effets biologiques, Rapport IFREMER DERO, 89-03-EL, 13 p.
- STEPHAN C.E., 1977, Methods for calculating an LC 50, Aquatic toxicology and hazard evaluation, ed. par Mayer F.L. et Hamelink J.L., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, P.A., 65-84.
- THAIN J.E., 1989, Oyster embryo bioassay, Draft Method for "Techniques in Environmental Sciences", ICES working group on biological effects of contaminants, Aberdeen, 9 p.
- TRANCHEFORT J., 1974, La régression - Application à l'agronomie, Publication ITCF, 178 p.
- WOELKE C.E., 1972, Development of a receiving water quality bioassay criterion based on the 48 hours pacific oyster (*Crassostrea gigas*) embryo, Washington Department of Fisheries, Technical Rep., 9, 1-93.

ANNEXES



Embryologie de *Mytilus edulis* Linné (d'après FIELD, 1922)

1-4: segmentation (gp: globules polaires
lp: lobe polaire)

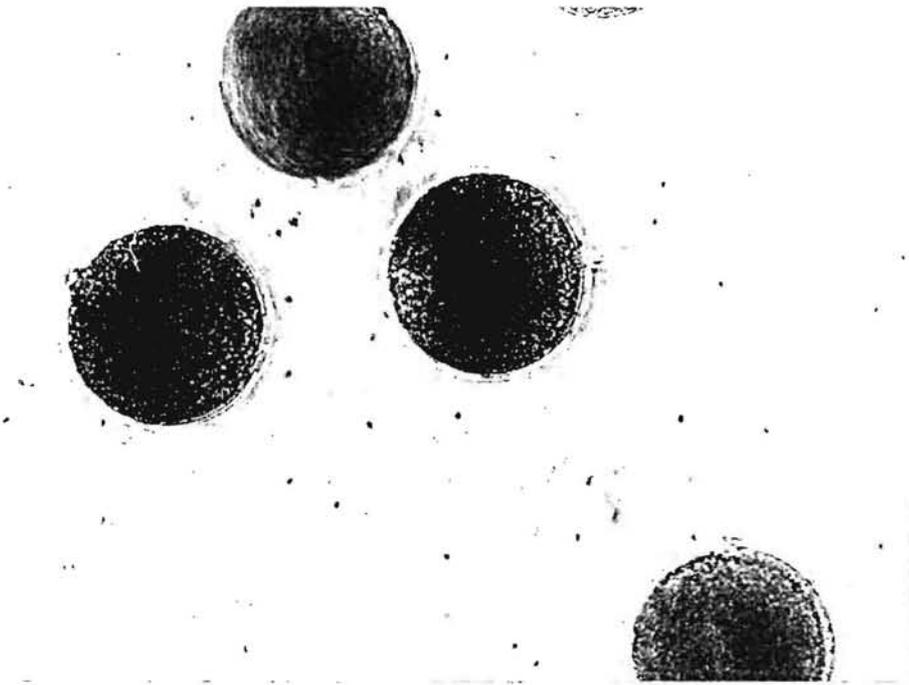
5: blastula

6: gastrulation

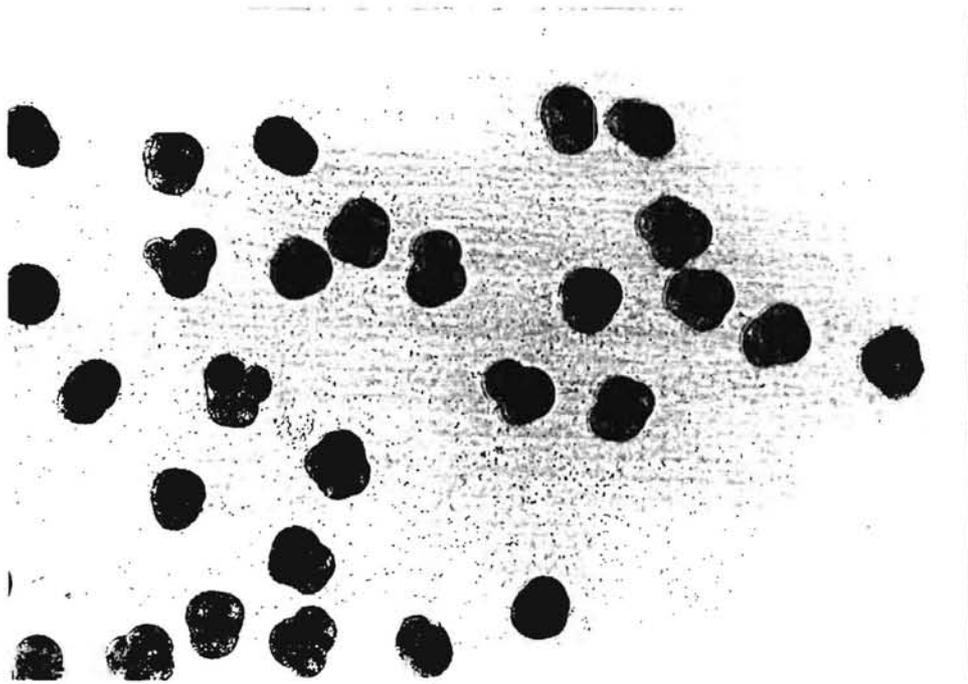
7: gastrula ciliée

8-9: larve trocophore

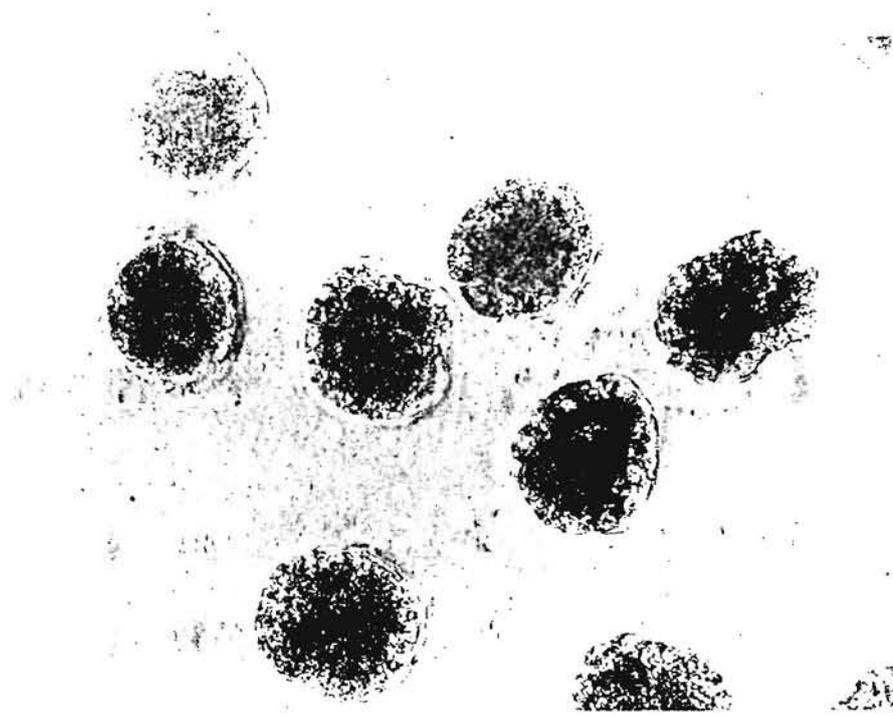
10: véligère à charnière droite



FECONDATION

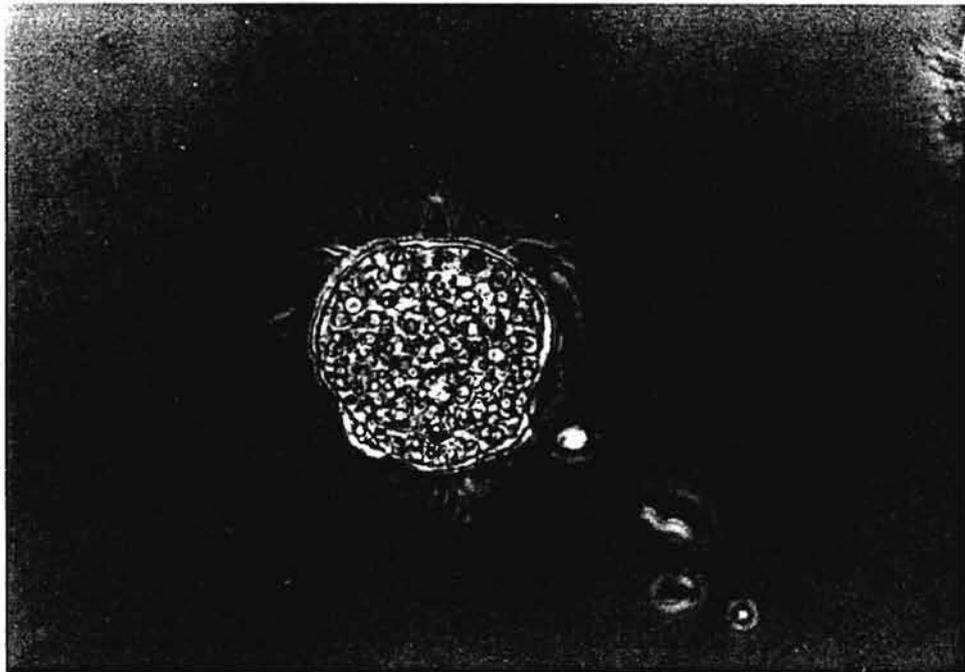


SEGMENTATION



40 μm 

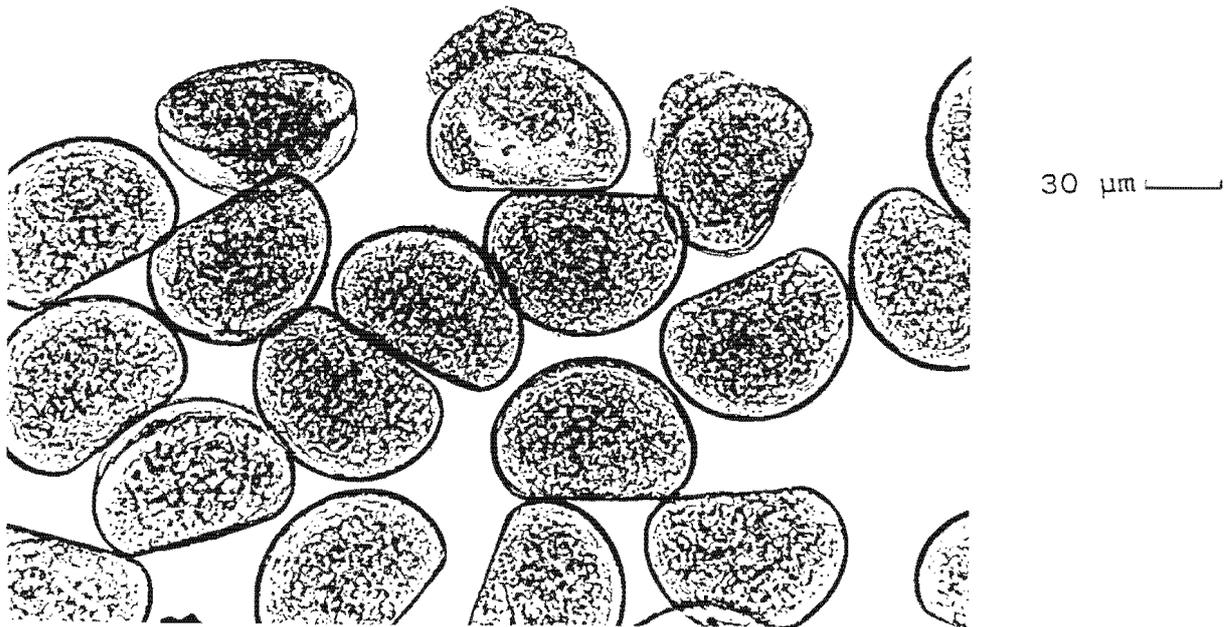
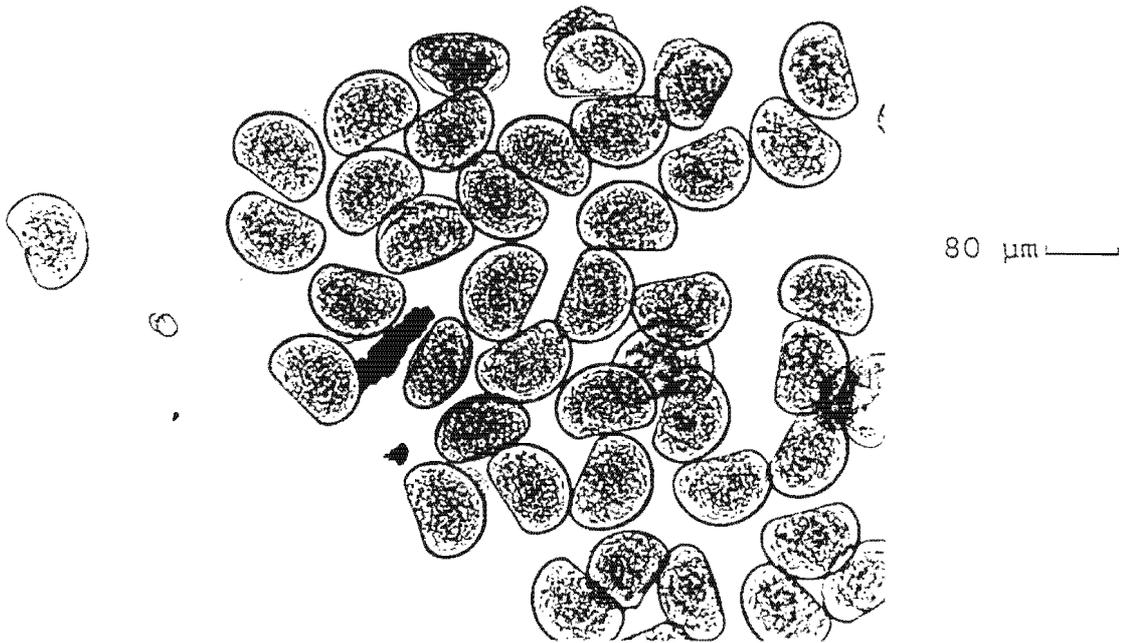
BLASTULAS



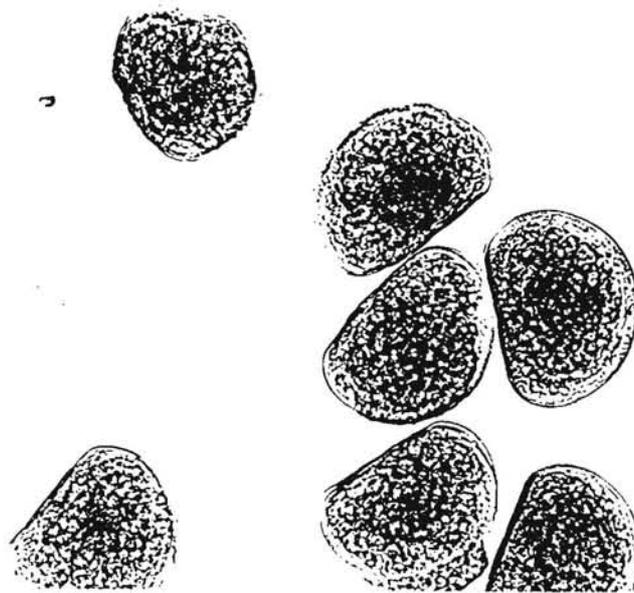
20 μm 

LARVE TROCOPHORE

Annexe II: Observation des larves après arrêt du développement
avec du formol neutre

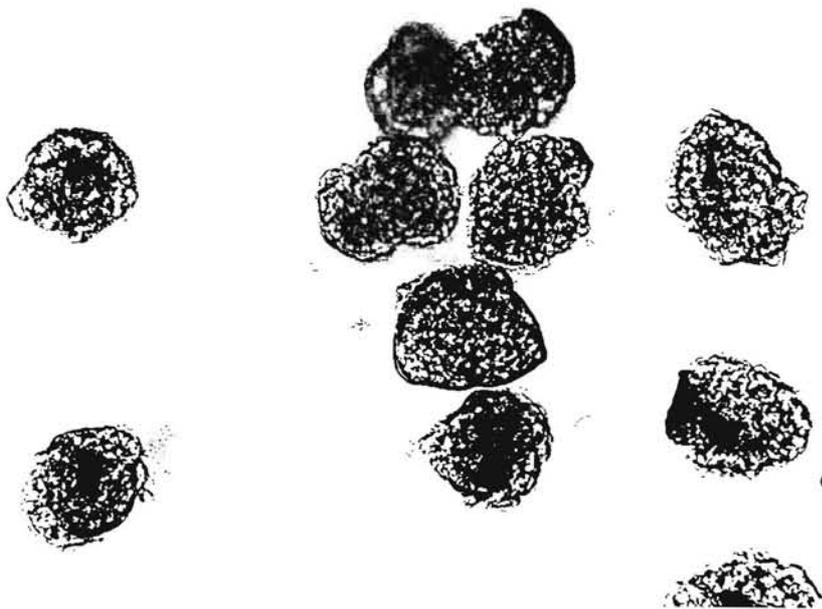


Larves D normales et larves dont le manteau dépasse



40µm 

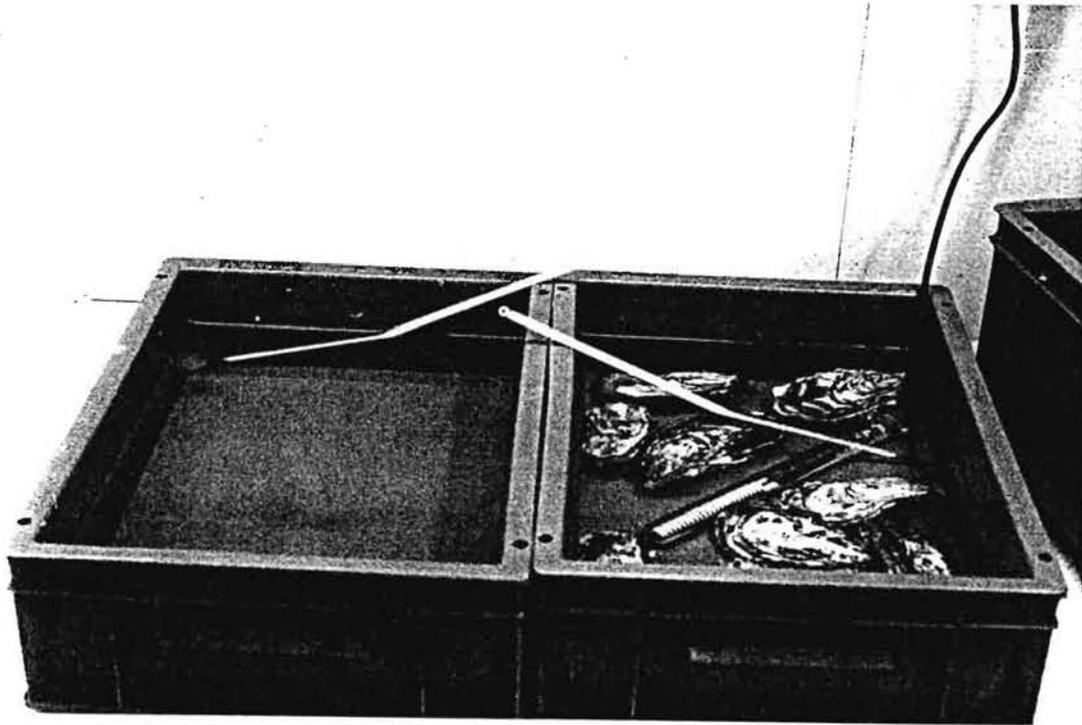
Larves déformées



40 µm 

Larves déformées et embryons sans coquille

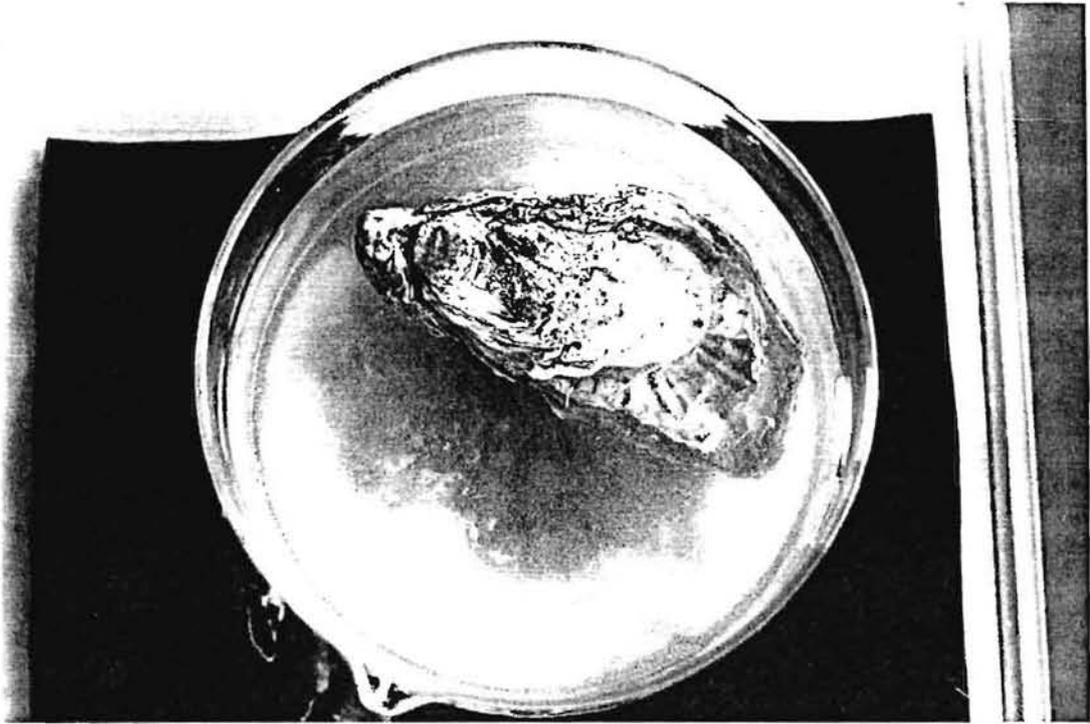
Annexe III: Illustration de la réalisation pratique
des fécondations



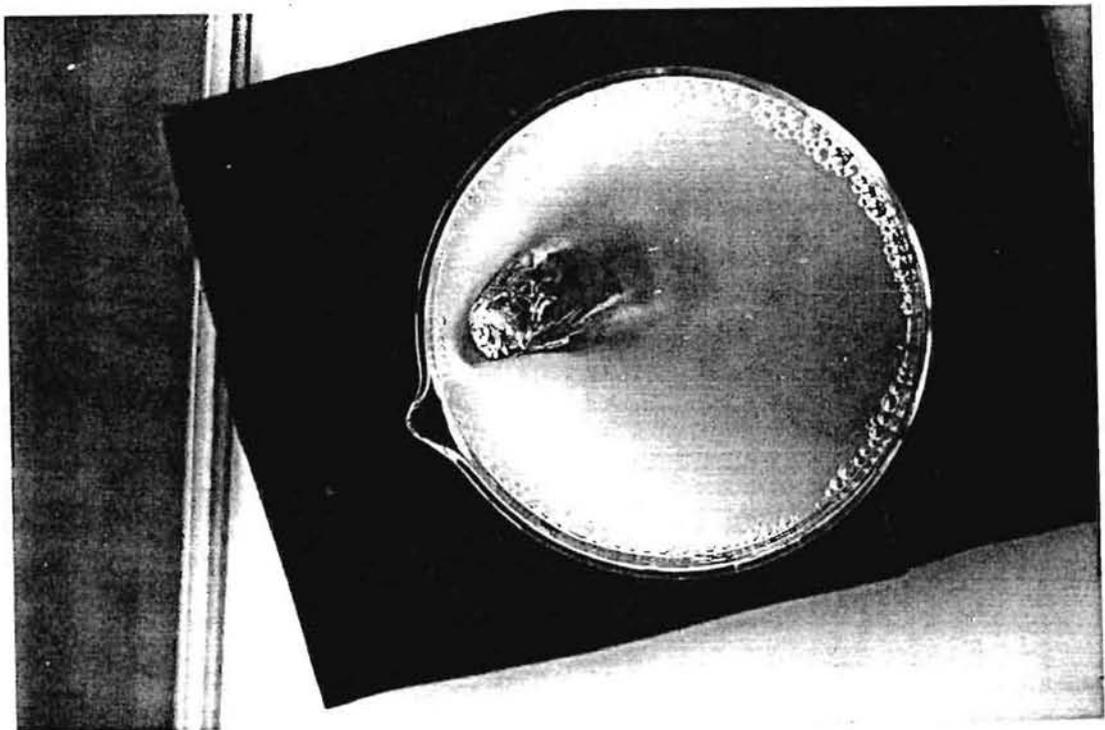
Stimulation thermique des huîtres creuses



A gauche, moule mâle émettant son sperme
A droite, moule femelle émettant ses ovocytes



Huitre femelle émettant ses ovocytes



Huitre mâle émettant son sperme



Inoculation des milieux à l'aide de micro-pipettes

Annexe IV: Table de permutations aléatoires de vingt nombres
 (Source: Bureau d'Etudes Statistiques de l'ITCF, 1975)

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	1 13 6 8 5 10 17 12 11 9 2 16 18 0 3 14 7 4 13 19	2 13 7 4 10 18 19 9 3 15 11 1 6 12 0 17 5 14 8 16	11 9 10 1 6 8 5 14 2 16 0 7 15 4 17 3 18 13 19 12	10 2 12 13 9 0 14 7 4 8 5 15 6 3 19 16 1 17 11 18	7 6 10 0 1 19 8 11 17 5 12 16 9 2 4 13 15 18 3 14	16 19 14 8 18 0 12 13 3 4 6 10 2 5 7 1 17 9 15 11	1 15 3 10 17 18 7 2 8 16 0 11 5 12 9 14 19 13 6 4	3 16 0 15 9 17 8 6 14 7 5 12 1 10 13 11 4 19 18 2	14 19 12 17 10 11 13 7 5 3 0 2 6 8 18 1 16 9 4 15	13 17 11 12 14 10 4 8 6 9 1 0 3 18 16 2 7 19 5 15
1	11 19 2 15 1 7 14 5 4 3 16 9 18 0 12 8 13 10 17 6	3 16 13 7 12 6 18 8 2 19 9 1 11 10 5 0 17 14 15 4	3 15 5 0 11 7 12 13 18 4 8 10 17 6 16 9 1 14 19 2	12 9 16 10 1 6 13 2 19 5 18 4 0 8 7 11 17 14 15 3	2 16 6 18 19 0 7 10 15 1 8 14 5 9 13 1 11 4 12 17	11 14 10 13 5 0 17 4 9 7 8 12 16 6 15 3 18 19 2 1	4 14 3 10 1 8 11 18 9 6 16 2 15 12 13 1 19 7 17 5 0	6 4 19 14 17 16 7 3 11 2 10 8 0 9 5 1 18 15 12 13	18 17 9 19 6 5 14 13 1 4 7 15 12 3 2 0 10 8 11 16	0 13 18 16 2 11 6 12 14 17 8 15 1 19 10 7 5 4 9 3
2	18 8 11 9 15 4 5 14 3 0 7 10 16 12 6 19 2 1 13 17	19 13 4 1 11 2 0 7 16 18 5 17 6 8 14 9 10 12 15 3	18 6 3 17 11 4 14 9 10 16 1 12 2 8 19 15 5 0 13 7	3 1 14 12 0 8 2 10 13 18 17 7 11 16 4 5 15 9 19 6	2 17 0 7 19 14 9 12 11 8 6 3 16 13 5 15 10 1 4 18	1 2 10 9 12 6 11 15 0 17 16 8 4 18 5 13 3 14 19 7	17 7 4 3 19 10 0 13 11 14 8 9 5 2 18 16 12 6 15 1	13 0 9 5 17 15 11 1 12 7 10 14 4 18 16 3 2 19 6 8	1 12 9 9 16 5 17 0 7 13 18 4 19 11 15 8 6 2 10 14	0 11 8 4 12 7 2 15 3 18 10 13 6 16 5 9 17 19 1 14
3	4 0 1 12 7 3 14 5 15 6 8 17 11 19 10 9 18 16 13 2	12 9 0 5 19 7 3 4 6 1 8 13 2 18 16 11 17 14 10 15	15 16 2 5 19 7 8 3 4 12 6 1 0 17 10 9 13 18 11 14	5 14 16 11 6 15 13 3 1 17 19 2 7 8 18 12 9 0 10 4	11 7 5 12 2 13 19 15 14 3 9 10 8 6 1 16 0 4 18 17	15 11 8 5 3 1 9 18 0 14 4 12 16 6 17 19 10 2 7 13	18 14 8 19 15 6 4 3 7 1 0 13 12 2 10 17 9 16 5 11	8 16 19 0 4 13 5 11 14 6 1 18 17 7 12 15 10 3 2 9	13 8 5 1 14 18 11 2 4 12 10 9 3 15 6 17 16 0 7 19	1 11 3 17 7 9 16 0 6 5 4 18 8 15 2 13 14 12 19 10
4	0 2 5 1 18 15 6 14 12 8 13 16 17 3 19 10 9 7 4 11	14 16 19 7 8 1 11 9 3 4 10 6 5 17 13 12 15 2 18 0	14 6 8 1 19 10 7 12 13 5 17 0 15 18 4 3 9 11 16 2	5 2 3 14 13 18 9 0 12 16 10 6 15 17 7 8 19 1 11 4	18 9 2 12 16 3 10 7 8 13 15 14 17 0 6 11 19 4 1 5	0 1 18 4 15 17 8 13 6 16 14 9 12 19 3 11 5 2 10 7	13 14 0 2 11 3 19 18 1 6 12 10 4 15 17 5 9 16 7 8	0 14 5 12 13 9 16 7 6 4 3 19 18 10 1 2 17 15 11 8	0 6 18 7 16 8 11 1 10 15 3 17 5 2 13 14 4 9 12 19	7 9 19 11 5 18 16 2 12 9 14 13 1 17 0 3 15 4 10 8
5	6 2 8 4 14 18 1 10 16 9 7 15 5 3 12 13 0 11 19 17	7 16 6 2 1 5 8 17 0 12 9 18 10 3 11 15 19 4 14 13	14 8 3 19 4 9 15 0 11 5 1 6 2 18 7 13 16 17 10 12	7 16 11 19 17 5 14 18 9 3 0 10 4 8 12 4 12 5 10 14	2 11 0 1 7 19 13 18 8 6 9 15 3 17 16 6 17 1 16 11	10 4 12 5 19 8 7 14 2 18 0 3 9 15 13 6 17 1 16 11	4 13 11 9 2 110 15 16 17 6 19 8 14 3 7 18 0 1 12 5	1 6 19 16 11 2 7 12 15 10 10 18 8 2 15 3 0 7 12 4	5 3 11 9 0 8 7 12 15 10 6 6 19 1 14 16 17 13 4 18	3 6 7 9 1 11 16 4 12 10 17 8 2 13 19 0 5 14 18 15
6	19 13 17 0 9 3 5 1 7 14 8 6 15 10 4 2 11 12 18 16	8 7 10 5 4 9 1 15 6 12 13 18 19 2 11 14 17 16 0 3	12 15 5 17 9 6 1 18 14 4 2 16 19 7 11 0 8 13 3 10	17 19 0 14 11 3 2 18 8 16 4 10 6 12 1 7 15 5 9 13	4 10 7 19 2 0 16 3 8 6 14 11 17 18 15 12 9 13 5 1	17 10 3 0 14 2 9 18 19 1 8 15 6 11 12 4 5 13 16 7	19 9 4 17 1 10 14 15 18 3 6 16 5 13 7 0 8 11 12 2	11 7 17 3 10 14 1 2 19 6 15 0 5 9 8 12 16 13 4 18	5 18 1 13 8 11 0 6 3 19 17 9 16 10 15 4 14 12 2 7	13 10 18 16 19 1 11 14 8 4 0 6 5 9 17 15 2 12 3 7
7	3 1 17 13 19 5 18 12 15 2 0 9 16 4 10 11 8 14 7 6	14 1 12 6 8 18 17 2 3 5 15 19 13 16 4 0 7 10 9 11	16 12 6 7 1 15 3 18 0 17 8 10 19 3 11 2 4 9 13 14	2 18 3 8 6 4 7 14 0 10 19 1 9 11 13 15 12 16 5 17	11 1 6 8 9 18 12 15 0 19 13 2 10 14 5 4 3 7 16 17	6 1 10 11 15 8 7 2 14 4 13 17 0 9 19 16 3 12 18 5	2 11 10 9 8 1 13 18 3 16 12 14 17 6 19 5 15 7 4 0	17 7 6 15 19 18 0 16 4 3 10 2 9 5 12 14 8 1 11 13	10 0 14 3 19 13 18 1 8 2 12 11 15 9 7 4 5 16 6 17	1 3 13 9 14 6 12 4 18 11 16 8 2 17 7 0 19 15 5 10
8	19 16 6 8 15 2 10 4 14 18 9 0 12 5 13 11 1 7 3 17	10 11 9 3 12 14 2 4 17 0 15 5 16 18 6 19 7 13 8 1	13 6 4 8 5 1 2 9 14 11 3 12 0 15 7 16 10 17 18 19	13 7 6 1 2 8 9 0 12 11 19 14 5 4 3 15 17 10 18 16	12 15 13 5 3 4 9 18 16 7 2 10 0 17 1 6 11 19 8 14	10 15 0 11 9 3 16 13 5 2 18 19 14 4 12 17 6 1 7 8	19 18 7 11 17 4 5 0 16 2 12 1 6 10 3 13 14 15 9 8	13 14 10 6 18 2 12 4 1 3 17 19 9 16 15 11 8 7 0 5	18 10 17 7 1 12 13 4 8 9 14 16 3 15 5 2 0 19 11 6	8 10 6 18 11 9 17 13 19 1 15 14 4 16 3 2 5 12 0 7
9	2 7 18 0 17 3 11 1 16 15 13 19 12 6 8 9 4 10 14 5	5 6 13 15 16 7 9 19 10 4 3 1 12 18 8 17 11 2 0 14	4 15 9 3 10 13 8 6 14 12 0 16 7 5 2 18 17 11 1 19	13 18 19 4 3 9 16 14 5 0 17 1 11 15 10 2 6 8 12 7	9 17 15 11 10 6 1 4 16 7 19 5 14 3 0 12 2 8 13 18	13 10 11 3 14 7 9 0 12 5 18 19 17 8 6 2 16 15 4 1	6 13 1 19 12 4 7 15 8 3 2 18 14 16 5 9 0 17 11 10	9 16 2 8 6 19 14 5 15 10 1 4 13 18 11 3 17 12 7 0	13 2 1 9 5 8 6 14 4 16 0 18 11 17 12 19 15 10 3 7	3 15 10 5 1 16 8 12 13 0 7 9 4 2 11 18 6 17 14 19

Annexe V: Tables des tests employés
(Source: DAGNELIE, 1969)

TABLES DES DISTRIBUTIONS F. DE SNEDECOR: $p = 0,95$

Valeurs critiques F_p , telles que:

$$\int_0^{F_p} cx^{k_1/2-1}(k_1x + k_2)^{-(k_1+k_2)/2} dx = p,$$

pour $p = 0,95, k_1 = 1(1)10, 15, 20, 30, 50, 100, 200, 500, \infty$
et $k_2 = 1(1)20(2)30(10)60(20)100, 200, 500, \infty$.

$k_1 \backslash k_2$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	15	20	30	50	100	200	500	∞
1	161	200	216	225	230	234	237	239	241	242	246	248	250	252	253	254	254	254
2	18,5	19,0	19,2	19,2	19,3	19,3	19,4	19,4	19,4	19,4	19,4	19,4	19,5	19,5	19,5	19,5	19,5	19,5
3	10,1	9,55	9,28	9,12	9,01	8,94	8,89	8,85	8,81	8,79	8,70	8,66	8,62	8,58	8,55	8,54	8,53	8,53
4	7,71	6,94	6,59	6,39	6,26	6,16	6,09	6,04	6,00	5,96	5,86	5,80	5,75	5,70	5,66	5,65	5,64	5,63
5	6,61	5,79	5,41	5,19	5,05	4,95	4,88	4,82	4,77	4,74	4,62	4,56	4,50	4,44	4,41	4,39	4,37	4,37
6	5,99	5,14	4,76	4,53	4,39	4,28	4,21	4,15	4,10	4,06	3,94	3,87	3,81	3,75	3,71	3,69	3,68	3,67
7	5,59	4,74	4,35	4,12	3,97	3,87	3,79	3,73	3,68	3,64	3,51	3,44	3,38	3,32	3,27	3,25	3,24	3,23
8	5,32	4,46	4,07	3,84	3,69	3,58	3,50	3,44	3,39	3,35	3,22	3,15	3,08	3,02	2,97	2,95	2,94	2,93
9	5,12	4,26	3,86	3,63	3,48	3,37	3,29	3,23	3,18	3,14	3,01	2,94	2,86	2,80	2,76	2,73	2,72	2,71
10	4,96	4,10	3,71	3,48	3,33	3,22	3,14	3,07	3,02	2,98	2,85	2,77	2,70	2,64	2,59	2,56	2,55	2,54
11	4,84	3,98	3,59	3,36	3,20	3,09	3,01	2,95	2,90	2,85	2,72	2,65	2,57	2,51	2,46	2,43	2,42	2,40
12	4,75	3,89	3,49	3,26	3,11	3,00	2,91	2,85	2,80	2,75	2,62	2,54	2,47	2,40	2,35	2,32	2,31	2,30
13	4,67	3,81	3,41	3,18	3,03	2,92	2,83	2,77	2,71	2,67	2,53	2,46	2,38	2,31	2,26	2,23	2,22	2,21
14	4,60	3,74	3,34	3,11	2,96	2,85	2,76	2,70	2,65	2,60	2,46	2,39	2,31	2,24	2,19	2,16	2,14	2,13
15	4,54	3,68	3,29	3,06	2,90	2,79	2,71	2,64	2,59	2,54	2,40	2,33	2,25	2,18	2,12	2,10	2,08	2,07
16	4,49	3,63	3,24	3,01	2,85	2,74	2,66	2,59	2,54	2,49	2,35	2,28	2,19	2,12	2,07	2,04	2,02	2,01
17	4,45	3,59	3,20	2,96	2,81	2,70	2,61	2,55	2,49	2,45	2,31	2,23	2,15	2,08	2,02	1,99	1,97	1,96
18	4,41	3,55	3,16	2,93	2,77	2,66	2,58	2,51	2,46	2,41	2,27	2,19	2,11	2,04	1,98	1,95	1,93	1,92
19	4,38	3,52	3,13	2,90	2,74	2,63	2,54	2,48	2,42	2,38	2,23	2,16	2,07	2,00	1,94	1,91	1,89	1,88
20	4,35	3,49	3,10	2,87	2,71	2,60	2,51	2,45	2,39	2,35	2,20	2,12	2,04	1,97	1,91	1,88	1,86	1,84
22	4,30	3,44	3,05	2,82	2,66	2,55	2,46	2,40	2,34	2,30	2,15	2,07	1,98	1,91	1,85	1,82	1,80	1,78
24	4,26	3,40	3,01	2,78	2,62	2,51	2,42	2,36	2,30	2,25	2,11	2,03	1,94	1,86	1,80	1,77	1,75	1,73
26	4,23	3,37	2,98	2,74	2,59	2,47	2,39	2,32	2,27	2,22	2,07	1,99	1,90	1,82	1,76	1,73	1,71	1,69
28	4,20	3,34	2,95	2,71	2,56	2,45	2,36	2,29	2,24	2,19	2,04	1,96	1,87	1,79	1,73	1,69	1,67	1,65
30	4,17	3,32	2,92	2,69	2,53	2,42	2,33	2,27	2,21	2,16	2,01	1,93	1,84	1,76	1,70	1,66	1,64	1,62
40	4,08	3,23	2,84	2,61	2,45	2,34	2,25	2,18	2,12	2,08	1,92	1,84	1,74	1,66	1,59	1,55	1,53	1,51
50	4,03	3,18	2,79	2,56	2,40	2,29	2,20	2,13	2,07	2,03	1,87	1,78	1,69	1,60	1,52	1,48	1,46	1,44
60	4,00	3,15	2,76	2,53	2,37	2,25	2,17	2,10	2,04	1,99	1,84	1,75	1,65	1,56	1,48	1,44	1,41	1,39
80	3,96	3,11	2,72	2,49	2,33	2,21	2,13	2,06	2,00	1,95	1,79	1,70	1,60	1,51	1,43	1,38	1,35	1,32
100	3,94	3,09	2,70	2,46	2,31	2,19	2,10	2,03	1,97	1,93	1,77	1,68	1,57	1,48	1,39	1,34	1,31	1,28
200	3,89	3,04	2,65	2,42	2,26	2,14	2,06	1,98	1,93	1,88	1,72	1,62	1,52	1,41	1,32	1,26	1,22	1,19
500	3,86	3,01	2,62	2,39	2,23	2,12	2,03	1,96	1,90	1,85	1,69	1,59	1,48	1,38	1,28	1,21	1,16	1,11
∞	3,84	3,00	2,60	2,37	2,21	2,10	2,01	1,94	1,88	1,83	1,67	1,57	1,46	1,35	1,24	1,17	1,11	1,00

Exemples: $F_{0,95} = 3,33$ pour $k_1 = 5$ et $k_2 = 10$;
 $F_{0,05} = 1/4,74 = 0,211$ pour $k_1 = 5$ et $k_2 = 10$.

TABLES DES VALEURS CRITIQUES DU TEST DE NEWMAN ET KEÜLS: $\alpha = 0,05$

Valeurs critiques $q_{1-\alpha}$

pour $\alpha = 0,05$, $p = 2(1)20$ et $k = 2(1)20, 24, 30, 40, 60, 120, \infty$.

$k \backslash p$	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
2	6,08	8,33	9,80	10,88	11,74	12,44	13,03	13,54	13,99	14,39	14,75	15,08	15,38	15,65	15,91	16,14	16,37	16,57	16,77
3	4,50	5,91	6,82	7,50	8,04	8,48	8,85	9,18	9,46	9,72	9,95	10,15	10,35	10,52	10,69	10,84	10,98	11,11	11,24
4	3,93	5,04	5,76	6,29	6,71	7,05	7,35	7,60	7,83	8,03	8,21	8,37	8,52	8,66	8,79	8,91	9,03	9,13	9,23
5	3,64	4,60	5,22	5,67	6,03	6,33	6,58	6,80	6,99	7,17	7,32	7,47	7,60	7,72	7,83	7,93	8,03	8,12	8,21
6	3,46	4,34	4,90	5,30	5,63	5,90	6,12	6,32	6,49	6,65	6,79	6,92	7,03	7,14	7,24	7,34	7,43	7,51	7,59
7	3,34	4,16	4,68	5,06	5,36	5,61	5,82	6,00	6,16	6,30	6,43	6,55	6,66	6,76	6,85	6,94	7,02	7,10	7,17
8	3,26	4,04	4,53	4,89	5,17	5,40	5,60	5,77	5,92	6,05	6,18	6,29	6,39	6,48	6,57	6,65	6,73	6,80	6,87
9	3,20	3,95	4,41	4,76	5,02	5,24	5,43	5,59	5,74	5,87	5,98	6,09	6,19	6,28	6,36	6,44	6,51	6,58	6,64
10	3,15	3,88	4,33	4,65	4,91	5,12	5,30	5,46	5,60	5,72	5,83	5,93	6,03	6,11	6,19	6,27	6,34	6,40	6,47
11	3,11	3,82	4,26	4,57	4,82	5,03	5,20	5,35	5,49	5,61	5,71	5,81	5,90	5,98	6,06	6,13	6,20	6,27	6,33
12	3,08	3,77	4,20	4,51	4,75	4,95	5,12	5,27	5,39	5,51	5,61	5,71	5,80	5,88	5,95	6,02	6,09	6,15	6,21
13	3,06	3,73	4,15	4,45	4,69	4,88	5,05	5,19	5,32	5,43	5,53	5,63	5,71	5,79	5,86	5,93	5,99	6,05	6,11
14	3,03	3,70	4,11	4,41	4,64	4,83	4,99	5,13	5,25	5,36	5,46	5,55	5,64	5,71	5,79	5,85	5,91	5,97	6,03
15	3,01	3,67	4,08	4,37	4,59	4,78	4,94	5,08	5,20	5,31	5,40	5,49	5,57	5,65	5,72	5,78	5,85	5,90	5,96
16	3,00	3,65	4,05	4,33	4,56	4,74	4,90	5,03	5,15	5,26	5,35	5,44	5,52	5,59	5,66	5,73	5,79	5,84	5,90
17	2,98	3,63	4,02	4,30	4,52	4,70	4,86	4,99	5,11	5,21	5,31	5,39	5,47	5,54	5,61	5,67	5,73	5,79	5,84
18	2,97	3,61	4,00	4,28	4,49	4,67	4,82	4,96	5,07	5,17	5,27	5,35	5,43	5,50	5,57	5,63	5,69	5,74	5,79
19	2,96	3,59	3,98	4,25	4,47	4,65	4,79	4,92	5,04	5,14	5,23	5,31	5,39	5,46	5,53	5,59	5,65	5,70	5,75
20	2,95	3,58	3,96	4,23	4,45	4,62	4,77	4,90	5,01	5,11	5,20	5,28	5,36	5,43	5,49	5,55	5,61	5,66	5,71
24	2,92	3,53	3,90	4,17	4,37	4,54	4,68	4,81	4,92	5,01	5,10	5,18	5,25	5,32	5,38	5,44	5,49	5,55	5,59
30	2,89	3,49	3,85	4,10	4,30	4,46	4,60	4,72	4,82	4,92	5,00	5,08	5,15	5,21	5,27	5,33	5,38	5,43	5,47
40	2,86	3,44	3,79	4,04	4,23	4,39	4,52	4,63	4,73	4,82	4,90	4,98	5,04	5,11	5,16	5,22	5,27	5,31	5,36
60	2,83	3,40	3,74	3,98	4,16	4,31	4,44	4,55	4,65	4,73	4,81	4,88	4,94	5,00	5,06	5,11	5,15	5,20	5,24
120	2,80	3,36	3,68	3,92	4,10	4,24	4,36	4,47	4,56	4,64	4,71	4,78	4,84	4,90	4,95	5,00	5,04	5,09	5,13
∞	2,77	3,31	3,63	3,86	4,03	4,17	4,29	4,39	4,47	4,55	4,62	4,68	4,74	4,80	4,85	4,89	4,93	4,97	5,01

Exemple: $q_{0,95} = 3,96$ pour $p = 4$ populations et $k = 20$ degrés de liberté.

Annexe VI: Mode d'emploi pour le traitement des données

Nous utilisons le logiciel STATGRAPHICS

- Création d'un répertoire pour la saisie des données
- System environment puis System profile pour se positionner sur le répertoire créé. Sortir par F₁₀
- Data management
 - File operation
 - Nom d'un fichier puis B (Création), puis C (Edit)
 - Donner le nom de la variable
 - F₁₀
 - puis rentrer les données
 - sauvegarder en faisant F₆
- Pour transformer les données par transformation angulaire:
 - * charger arcsin:
 - Supplementary operations
 - Mathematical functions
 - Read
 - * puis retourner au menu principal
 - Data management
 - Nom du fichier + J (Update)
 - N (New) + nom d'une nouvelle variable
 - Tapez ASIN (SQRT (Nom de la variable à transformer))
 - Comment (facultatif: pour se rappeler ce que l'on a fait)
- Analyse de variance:
 - Si un seul critère de classification
 - Se placer sur Regression Analysis et Simple Regression
 - Effectuer régression de la variable transformée en fonction du critère de classification
 - Sauver les écarts à l'ajustement et les valeurs estimées (seule la première colonne nous intéresse chez ces dernières)
 - En retournant sur File Operations, changez le nom de la variable pour la première colonne (Edit + F₅ + Modify +

nouveau nom + F_6)

Se placer sur Plotting functions et effectuer X-Y Line and Scatterplot avec X: valeurs estimées et Y: écarts à l'ajustement

Si bonne répartition des écarts à l'ajustement:

Se positionner sur Analysis of Variance et One-Way Analysis of variance avec:

Data: Donnée à traiter

Level codes: critère de classification

Dans le cas le plus général où on choisit un risque de 5 %, si sign. lev. $< 0,05$ ("Conf.int.: 95"), on considère que les différences sont significatives

Si plusieurs critères de classification, se placer sur Analysis of variance et Multifactor analysis of variance

Data: de même que précédemment

Factors: critères de classification

En général, dans le cas qui nous concerne, on néglige les interactions (effacer les étoiles correspondantes).

La question est cependant à régler au cas par cas.

Les différences significatives suivant les facteurs se jugent de la même façon que précédemment (la probabilité critique donne toutefois des renseignements sur l'importance des différences).

Puis effectuer Plot residuals avec Predicted values et il est alors possible d'étudier la répartition des écarts à l'ajustement.

Si les écarts à l'ajustement sont trop dispersés par rapport aux valeurs prédites, chercher un autre modèle pour la variable en fonction du critère.

Conserver la valeur de la variance résiduelle donnée par l'analyse de variance pour l'utiliser dans les tests de Newman-Keuls et de Dunnett.