

**ETUDE EXPERIMENTALE DE L'EFFET DE PESTICIDES UTILISES
SUR LES BASSINS VERSANTS DE LA RADE DE BREST - DIURON
MCPA, GLYPHOSATE - SUR LE DEVELOPPEMENT
EMBRYONNAIRE ET LARVAIRE DE LA
COQUILLE SAINT-JACQUES *PECTEN MAXIMUS*
-Validation de la méthode SIRIS en milieu marin-**

Rapport final, janvier 2000

Hélène Larvor-Cario¹, Loïc Philip de Laborie¹
Dorothee Hureau¹, Marie Louise Muzellec²,
Germaine Dorange⁴, Gaël Durand¹, Nicole Devauchelle³

EXCLU DU PRET



1- Service Conseil et Expertise en Environnement,
Pôle Analytique des Eaux,
120, av. Alexis de Rochon
BP 52
29280 Plouzané,



3- Laboratoire de Physiologie des Invertébrés, DRV - RA,
IFREMER, BP70,
29280 Plouzané,

**Ecloserie
du Tinduff**

2- 29470-Plougastel Daoulas

**INSTITUT DE SYNERGIE DES
SCIENCES ET DE LA SANTE**

4- Unité de Culture Cellulaire,
EA 2217 Physiologie Comparée de l'Adaptation,
I3S - Université de Bretagne Occidentale
5, avenue Foch
29617 Brest cedex.

Etude financée par : Agence de l'Eau Loire - Bretagne, Communauté Urbaine de Brest, Direction Régionale de l'Agriculture et de la Forêt, CORPEP-Bretagne Eau Pure 2-

KK

10510204
E-11

2001

SOMMAIRE

EXCLU DU PRÉY

INTRODUCTION	5
OBJECTIFS	6
DESCRIPTIF ET MODE DE VIE DE LA COQUILLE SAINT-JACQUES EN RADE DE BREST	7
1/ DISTRIBUTION	7
2/ CYCLE DE DÉVELOPPEMENT (FIGURE 1, 2, 3)	7
3/ GAMÉTOGENÈSE ET FÉCONDATION	7
4/ DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE ET LARVAIRE	11
5/ CROISSANCE	13
LES PRINCIPAUX PESTICIDES RETROUVES EN RADE DE BREST	14
1/ UTILISATION	14
1.1/ Diuron ($C_9H_{10}N_2O$)	14
1.2/ MCPA ($C_9H_9ClO_3$)	14
1.3/ Glyphosate ($C_3H_8NO_5P$)	14
DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES ECOTOXICOLOGIQUES	16
ETUDE EXPERIMENTALE DE L'EFFET DE PESTICIDES SUR LE DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE ET LARVAIRE DE <i>PECTEN MAXIMUS</i>, L.	18
MATERIEL / METHODES ET RESULTATS	18
FECONDATION	18
1/ PROTOCOLE	18
1.1/ Choix des gamètes	18
1.2/ Les conditions testées sont les suivantes	
1.3/ Prélèvements	
1.4/ Calculs et mesures	

IFREMER Bibliothèque de BREST



OBR36473

IFREMER
Bibliothèque
Centre de Brest
BP 70 - 29200 PLOUZANÉ

6360

2/ PREMIERS RÉSULTATS	20
DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE	22
1/ PROTOCOLE	22
1.1/ Choix des œufs fécondés	22
1.2/ Les conditions retenues sont les suivantes	22
1.3/ Prélèvements	22
1.4/ Calculs, mesures et statistiques	23
2/ RÉSULTATS	23
2.1/ Représentation des différents types de larves observées	23
2.2/ Variations inter-femelles	24
2.2.1/ Variation du taux d'éclosion	24
2.2.2/ Taux d'abaissement	24
2.2.2.1/ Résultats statistiques pour le groupe I	24
2.2.2.2/ Résultats statistiques pour le groupe II	25
2.2.3/ Variations inter-femelles concernant les taux de :	25
2.2.3.1/ Résultats statistiques du Groupe I	25
2.2.3.2/ Résultats statistiques du Groupe II	26
2.3/ Variation des taux d'abaissement en fonction du traitement	26
2.3.1/ Résultats graphiques et statistiques pour le groupe I	26
2.3.2/ Résultats graphiques et statistiques pour le groupe II	27
2.4/ Variation en fonction des traitements des différents taux :	28
2.4.1/ Résultats statistiques du groupe I	28
2.4.2/ Résultats statistiques du groupe II	29
CROISSANCE LARVAIRE	31
1/ PROTOCOLE	31
1.1/ Matériel animal	31
1.2/ Méthodologie	32
1.2.1/ Tests préliminaires	32
1.2.2/ Protocole d'élevage larvaire en conditions toxiques	33
1.3/ Observations et analyses	33
2/ RÉSULTATS	34
2.1/ Suivi de la croissance	34
2.1.1/ Effet mois	34
2.1.2/ Effets traitements : Mois de avril / mai / août	34
2.1.2.1/ AVRIL	34
2.1.2.2/ MAI	34
2.1.2.3/ AOÛT	35
2.2/ Evolution des populations larvaires	37
2.2/ Structure cristalline	39

2.2.1/ Les différentes microstructures des larves et post-larves	39
2.2.2/ Résultats concernant les différents traitements.	44
VERIFICATION DU SEUIL DE MORTALITE POUR LE DIURON ET LE MCPA	45
1/ PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL	45
2/ RÉSULTATS	45
TESTS DE REFIXATION DES POST-LARVES EN PRESENCE DE PESTICIDES	48
1/ PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL	48
2/ RÉSULTATS	48
DISCUSSION	49
BIBLIOGRAPHIE	52
ANNEXE 1 : PROTOCOLES DE FÉCONDATION ET DE PRÉLÈVEMENT DES ŒUFS	54
ANNEXE 2 : CONCENTRATIONS DES PESTICIDES (DIURON ET MCPA) ANALYSES DANS LES ÉCHANTILLONS D'EAU	55
ANNEXE 3 : PROTOCOLE DE FIXATION ET DE COLORATION AU HOECHST	57
ANNEXE 4 : GRAPHES REPRÉSENTANT LES TAUX D'ABAISSEMENT OBTENUS DANS LES DIFFÉRENTES CONDITIONS ENVISAGÉES, POUR LES 11 FEMELLES TESTÉES	61
ANNEXE 5 : EVOLUTION DES POPULATIONS POUR LES EXPÉRIENCES DES MOIS DE AVRIL / MAI ET AOÛT	67
ANNEXE 6 : PROTOCOLE DE FIXATION DES ÉCHANTILLONS POUR L'OBSERVATION AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE À BALAYAGE (MEB)	70

INTRODUCTION

La coquille Saint-Jacques est un bivalve largement exploité sur les côtes françaises. En Rade de Brest, cette espèce présente un intérêt commercial tout particulier du fait de présenter une noix (muscle adducteur) et un corail (organe reproducteur) bien développés toute l'année. Elle fait l'objet d'une pêche spécifique et très contrôlée.

Durant la phase préparatoire du contrat de Baie de la Rade de Brest, des travaux financés par le programme Rade ont été menés à l'écloserie du Tinduff dans le but d'améliorer le soutien au stock naturel exploité par cette pêche. Malgré de nettes avancées dans la production de cette écloserie, des mortalités de larves constatées dans les élevages restent inexplicables.

D'autre part, des études menées par l'UBO et l'IFREMER, ont montré qu'en Rade de Brest, il existait un problème dans la croissance des coquilles Saint-Jacques lors de la phase de pré-recrutement naturel des larves. Celui-ci est très variable en Rade de Brest (Boucher et Fifas, 1995). Il est anormalement bas certaines années.

En parallèle, des expérimentations en laboratoire sur des élevages de juvéniles et d'adultes de coquilles Saint-Jacques en conditions contrôlées ont mis en évidence trois causes potentielles au développement d'anomalies de la cristallogénèse, de la pigmentation coquillière, et de la gamétogénèse : une forte baisse de la salinité, et l'action de deux pesticides à usage non agricole ou agricole, couramment utilisés sur le Bassin versant de la Rade de Brest : le diuron et le mécoprop. C'est la première fois que de tels effets sont démontrés chez un Pectinidé. Il a été constaté que les modifications induites dans les structures calcifiées sont rapidement mesurables par des méthodes de détection précoce des anomalies : l'analyse micro structurale et la colorimétrie (Larvor, 1996).

Sachant que les larves sont généralement plus sensibles que les juvéniles ou les adultes à la présence de xénobiotiques, il paraît vraisemblable que le diuron et le mécoprop aient des effets toxiques létaux ou sublétaux sur des jeunes stades de développement de la coquille Saint-Jacques. Nous nous proposons de vérifier à travers cette étude, l'action de certains xénobiotiques sur les jeunes stades de développement de la coquille Saint-Jacques.

OBJECTIFS

L'objectif de ce travail est de rechercher si trois pesticides : diuron, glyphosate et MCPA (herbicide acide comme le mécoprop et retrouvé dans les prélèvements effectués en 1996 (Thomas *et al.*, 1997)), peuvent être à l'origine d'anomalies ou d'empêchements dans la fécondation, le développement embryonnaire, la survie et la croissance larvaire, et enfin la métamorphose chez la coquille Saint-Jacques.

Les expériences en laboratoires seront conduites de telle sorte qu'elles apporteront les premiers éléments de réponse aux relations possibles entre pesticides en Rade de Brest et mortalités larvaires inexplicées en écloserie ou réduction inexplicée du recrutement naturel en milieu ouvert.

Ce rapport aborde les points suivants :

- Des indications nécessaires à la bonne compréhension des expérimentations mises en œuvre dans cette étude sont présentées en préambule :
une description du matériel biologique et de ses spécificités et des informations sur les principaux pesticides retrouvés en Rade de Brest, notamment ceux que nous allons tester.
- Les expériences réalisées sur chacun des stades de développement sont ensuite décrites indépendamment les unes des autres, accompagnées des résultats :
 - La fécondation
 - Le développement embryonnaire
 - La croissance et la survie larvaire
 - Seuil de mortalité
 - La capacité à la refixation post larvaire

DESCRIPTIF ET MODE DE VIE DE LA COQUILLE SAINT-JACQUES EN RADE DE BREST

La coquille Saint-Jacques est un mollusque bivalve appartenant à la classe des Lamellibranches, de l'ordre des Filibranches, de la famille des Pectinidés. L'espèce présente sur le littoral français de la Manche et de l'Atlantique est *Pecten maximus*, Linné.

1/ Distribution

Pecten maximus est présente dans les eaux tempérées européennes depuis les côtes de Norvège jusqu'au nord de l'Espagne.

On la trouve sur les fonds sablo-vaseux, depuis le niveau des basses mers jusqu'à la profondeur de 120 mètres environ. Les gisements de la Rade de Brest se tiennent généralement de 20 à 50 mètres. L'animal repose enfoui sur sa valve droite convexe. Il est détritivore et planctonophage. C'est un mollusque purement filtreur.



Photo 1 : coquille Saint-Jacques dans son milieu naturel.

2/ Cycle de développement (Figure 1, 2, 3)

3/ Gamétogenèse et fécondation

La coquille Saint-Jacques est un hermaphrodite simultané. Elle atteint sa maturité sexuelle à 2 ans. Sa gonade présente deux parties distinctes : une zone proximale qui va du rose orangé au rouge vif et qui correspond à la partie femelle et une zone distale de couleur blanc crème qui représente la partie mâle (photo 2). Cette gonade est une glande acineuse en grappes d'où partent 2 collecteurs principaux (Dorange, 1989). Ces 2 canaux fusionnent dans la partie supérieure et déversent la totalité des gamètes dans le rein. Les voies génitales à son niveau sont mixtes (Widowati, 1991). L'émission des ovocytes et des spermatozoïdes est quasi simultanée pouvant provoquer des autofécondations.

En Rade de Brest, la gamétogenèse est non saisonnière et asynchrone. Toutefois, la période de ponte s'étend généralement de mars à septembre, avec généralement trois pics d'émission : le premier en mars-avril, le deuxième en juin, et un dernier, parfois absent, en septembre. Cette chronologie peut se décaler selon les années, en fonction des paramètres environnementaux. Les gamètes sont émis dans le milieu, et la fécondation suit (Devauchelle *et al.*, 1997).

Figure 1

Les cycles biologiques et d'élevage de la coquille Saint Jacques *Pecten maximus*
(Dao et al., 1992)

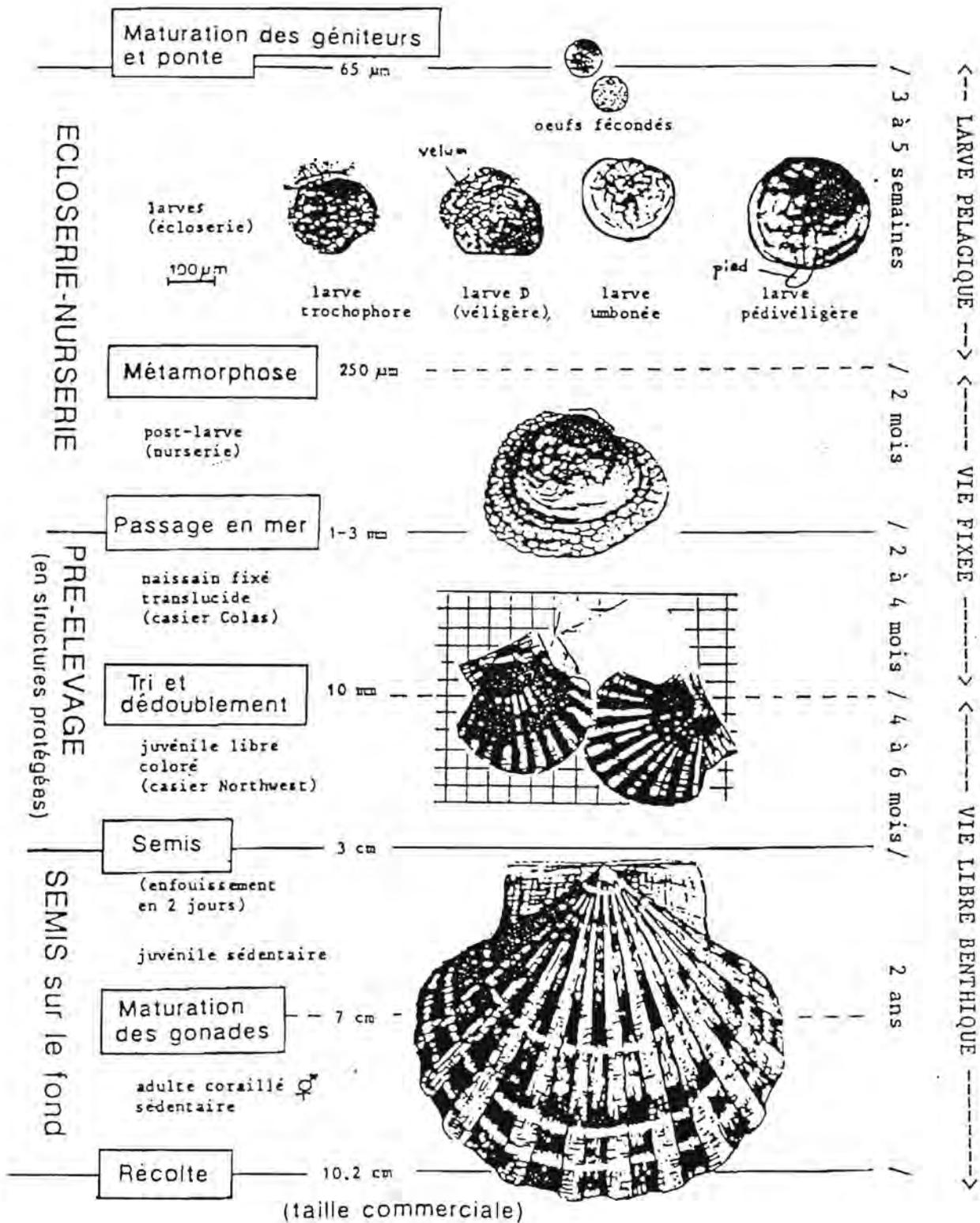


Figure 2

Morphogenèse de *Pecten Maximus* au cours des 45 premiers jours de vie larvaire
(Le Pennec, 1974)

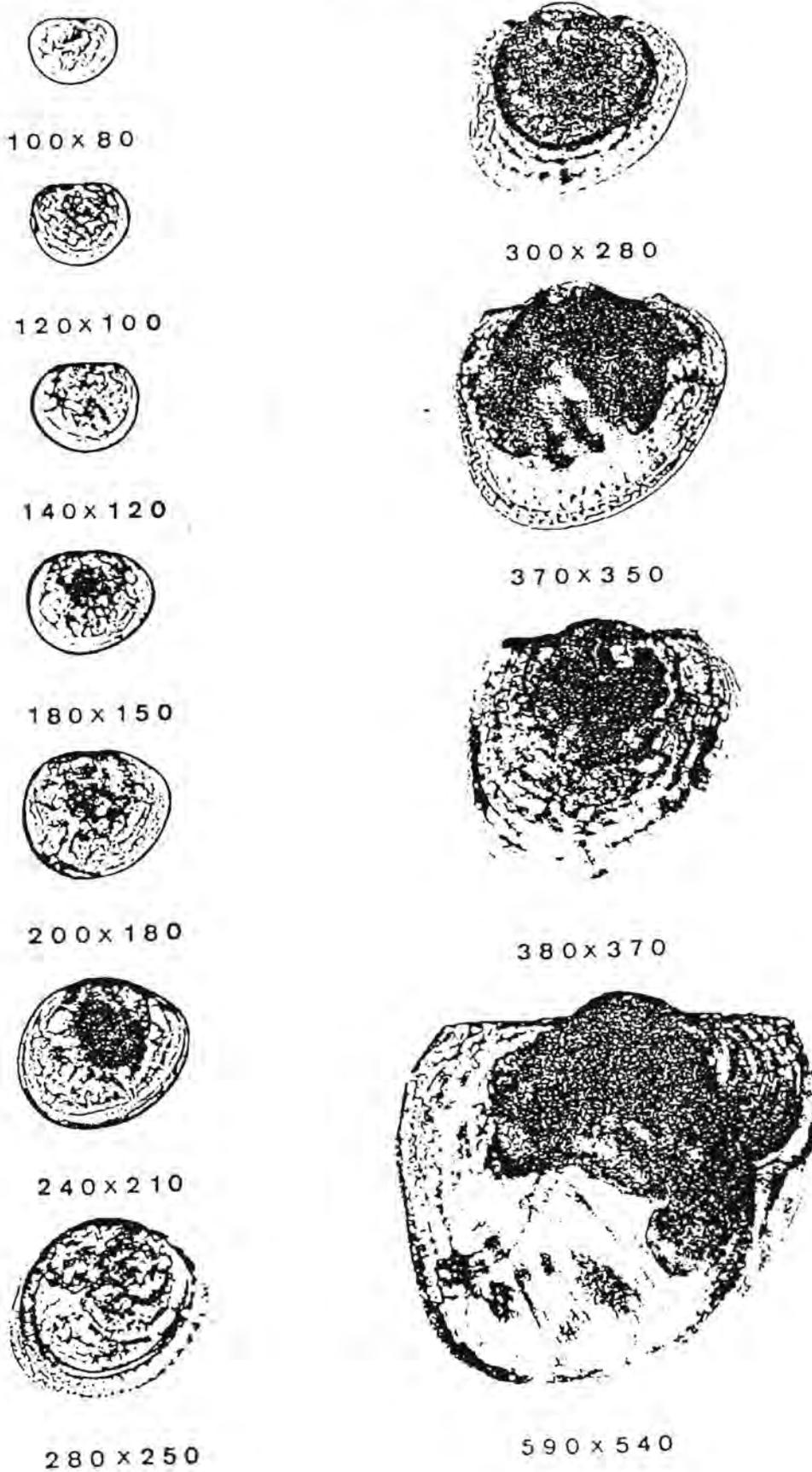
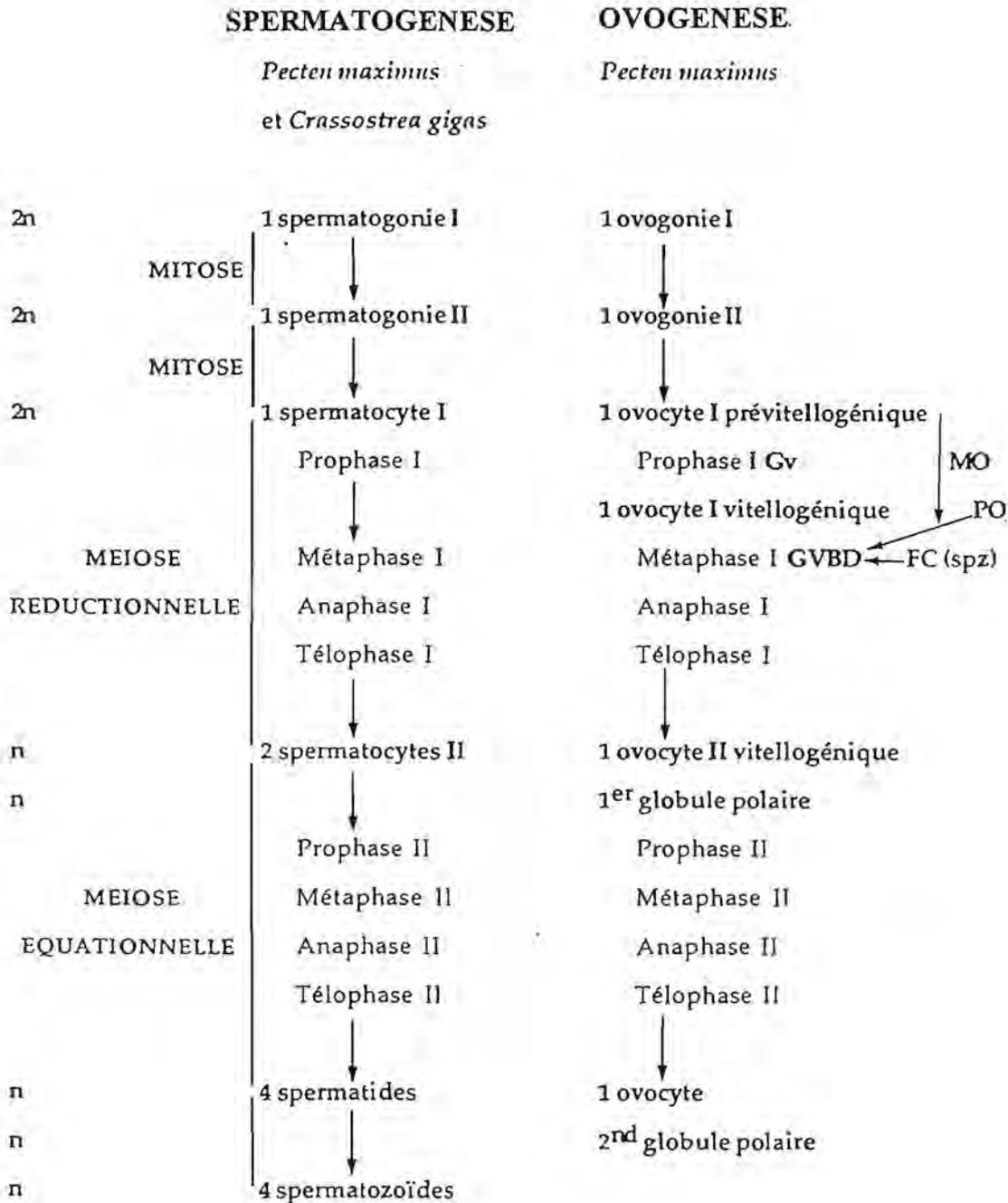


Figure 3

Evènements de la spermatogenèse et de l'ovogenèse chez *Pecten maximus* (d'après Faure, 1996)



n = Cellule haploïde et 2 n = cellule diploïde ; I = de premier ordre ; II = de second ordre ;
 Gv = vésicule germinative ; GVBD = rupture de la vésicule germinative ; MO = maturation ovocytaire ; PO = « pont » ou émission des gamètes ; FC (spz) = fécondation (pénétration du spermatozoïde)

Les ovocytes dans la gonade sont bloqués en début de méiose en prophase (figure 3). La reprise de division se caractérise par la rupture de la vésicule germinale et le passage en métaphase I où tous les chromosomes se concentrent pour former la plaque métaphasique. Les ovocytes sont émis à ce stade ou au précédent (Widowati, 1991). Les œufs sont obtenus par fécondation externe.

Les protocoles standardisés d'obtention et de fécondation des gamètes - ou "ponte" - par l'écloserie du Tinduff sont présentés en annexe 1.

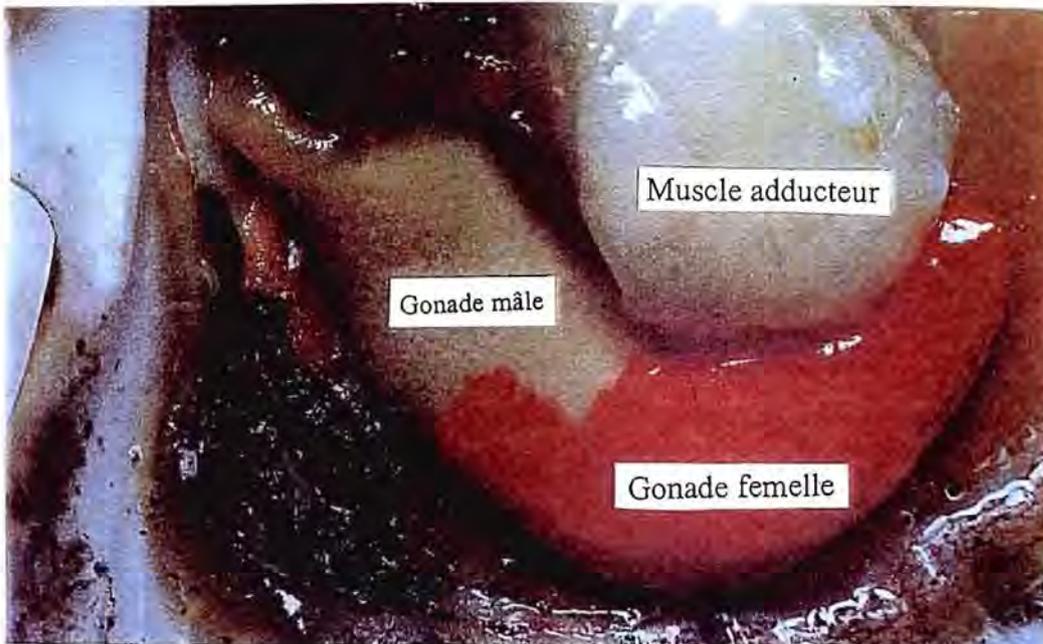


Photo 2 : Gonade hermaphrodite de *Pecten maximus*

4/ Développement embryonnaire et larvaire

Environ 45 minutes après fécondation, se produit l'expulsion des deux globules polaires. Le stade embryon à 2 cellules constaté à ce temps correspond à des autofécondations (ces œufs avortent par la suite). Les embryons "normaux" sont au stade 4 cellules, environ deux heures après fécondation. La première phase d'organogenèse dure de 19 à 24 heures après fécondation, la larve devient alors nageuse. C'est une **larve trochophore** (photo 3), possédant une troque (couronne de cils apicaux), mais sans coquille. Elle commence ensuite à former sa coquille unilatéralement. Après formation de la charnière, la coquille entoure presque totalement la larve. La touffe ciliaire s'est transformée entre-temps en vélum et est rétractable dans la coquille, équivalve. La larve devient une **larve véligère**. Entre 30 et 48 heures après fécondation, les larves prennent une forme caractéristique d'où leur appellation de **larves D** (photo 4) (Casse, 1995). A ce stade, la larve fait en moyenne 110 μm selon l'axe antéro-postérieur (figure 2).

En écloserie, cette phase de développement embryonnaire et d'organogenèse larvaire se déroule en bacs de 450 L cylindro-coniques, sous bullage, de façon à maintenir les œufs et les larves en suspension dans la masse d'eau. Dans ces conditions, le taux moyen de formation de larves D (ou encore appelé taux d'éclosion à 2 jours) peut varier énormément, de 0 à plus de 80%. Les valeurs moyennes se situent à 30% (Robert *et al.*, 1994).

Une fois ces larves D obtenues, la phase de croissance larvaire se déroule ensuite en circuit fermé, en bacs cylindro-coniques de 450 L, sous bullage. Les larves sont nourries quotidiennement. Pour une bonne hygiène d'élevage, l'eau des bacs est renouvelée tous les 2 ou 3 jours, et additionnée d'antibiotiques.

Au bout de 20 à 28 jours, la larve véligère initie sa métamorphose, pour devenir une **larve pédivéligère**. C'est une nouvelle phase d'organogenèse. Le pied se forme alors que le vélum n'a pas encore régressé, la larve peut nager et ramper. Les bourgeons branchiaux apparaissent. Une gouttière se met en place sur le bord interne de la coquille larvaire et amorce la formation d'une nouvelle coquille (Cochard et Gérard, 1987). Ce dédoublement du bord des valves larvaires est nettement visible au microscope photonique et c'est lui qui permet en éclosion de Pectinidés de reconnaître l'initiation de la métamorphose. Ce stade est appelé stade "**double barres**" (photo 5).

Alors que la coquille de la larve véligère est constituée d'aragonite, la coquille néoformée, comme celle des adultes, est constituée de calcite cristallisée sous la forme de microstructures foliées et prismatiques. On parle alors de **post-larve**. Cette métamorphose s'accompagne de la fixation de la larve.

A l'éclosion, la réussite de cette phase nécessite le transfert des larves double barres dans des structures d'élevage radicalement différentes. Elles sont alors placées dans des cylindres-tamis, en suspension dans un bassin et soumises à un flux d'eau de mer courante, et à une agitation régulière. Le maillage des tamis augmente en fonction de la croissance des larves.

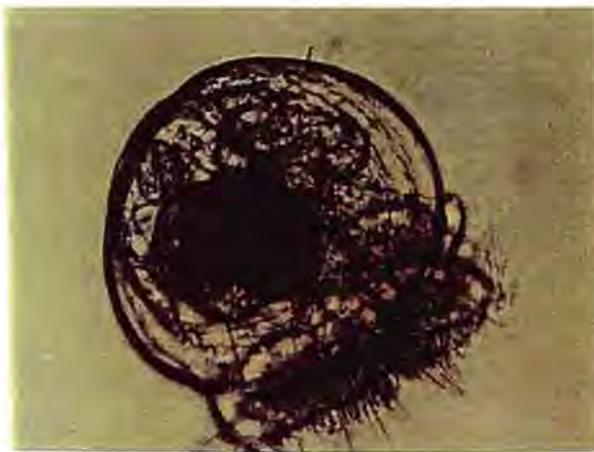


Photo 3 : Larve trochophore



Photo 4 : Larve D

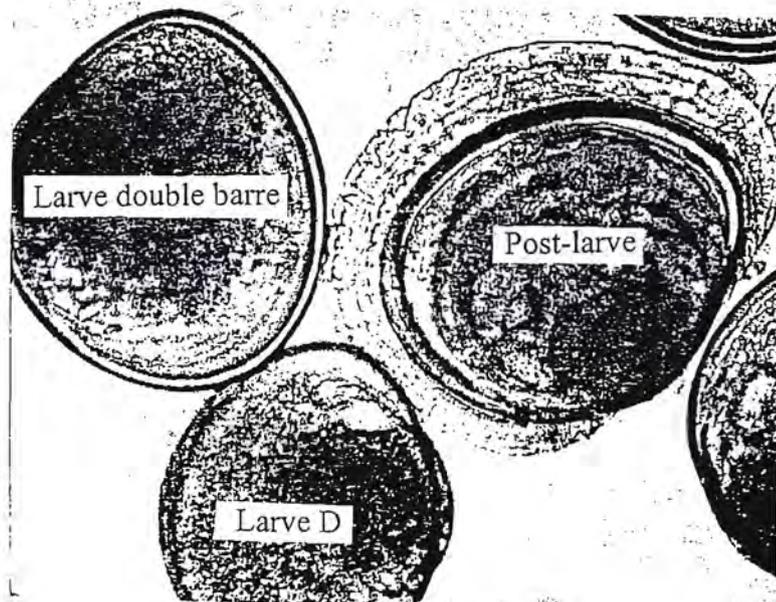


Photo 5 : Larve double barre

5/ Croissance

La morphologie définitive apparaît lorsque la larve atteint une taille de 1 cm environ. Le comportement de la jeune coquille devient alors celui de l'adulte, libre, nageur.

La croissance est irrégulière. Elle se déroule pendant les mois les plus chauds et ralentit fortement l'hiver. Elle dépend également des conditions du milieu. On peut observer, sur la coquille, aussi bien sur sa valve droite que sur la valve gauche des stries plus ou moins marquées, correspondant aux arrêts de croissance hivernaux, et des anneaux de croissance en légère dépression. La croissance est surtout forte les trois premières années, délai normal pour que les coquilles atteignent la taille marchande (10.2 cm).

LES PRINCIPAUX PESTICIDES RETROUVES EN RADE DE BREST

Selon Thomas *et al.* (1997), les principaux pesticides présents en Rade de Brest sont l'Atrazine, la Simazine, le Diuron et le MCPA

Pour notre étude, trois types de pesticides largement utilisés sur les bassins versants de la Rade de Brest ont été testés :

- une phénylurée, le **diuron**, ayant des effets sur les adultes et les juvéniles de coquille Saint-Jacques (Larvor, 1996)
- un pesticide acide apparenté au mécoprop (déjà testé sur la coquille, Larvor, 1996), le **MCPA**,
- un nouveau type de pesticide, le **glyphosate**, dont les effets écotoxicologiques en milieu marin sont très peu connus.

1/ Utilisation

1.1/ Diuron ($C_9H_{10}N_2O$)

Herbicide systémique sélectif absorbé principalement par les racines et qui inhibe la photosynthèse. Il est homologué sur zones agricoles mais l'apport ne peut excéder 1800 g/ha traité et par an. On peut donc l'épandre sur de grandes cultures (luzerne), sur les vignes, les arbres fruitiers (poiriers, pommiers,...), sur les cultures légumières (asperges, lentilles,...), sur les cultures tropicales (ananas, bananiers,...). Il est compatible avec de nombreux autres pesticides et peut y être associé.

Dans la région brestoise, il est principalement appliqué en usage non agricole. Son utilisation débute vers le mois de mars. Il est également associé à certaines peintures antisalissures pour la réparation navale. Le diuron a vu son emploi sanctionné en région Bretagne par un arrêté préfectoral actif dans le Finistère depuis la date du 15/07/98 qui interdit l'emploi de spécialités contenant cette matière active pendant la période allant du 01/04 au 31/12 de chaque année.

1.2/ MCPA ($C_9H_9ClO_3$)

Herbicide sélectif systémique de type Hormone absorbé par les feuilles et les racines. Il agit comme inhibiteur de croissance et est notamment utilisé dans les cultures céréalières ou les herbages. Son utilisation débute au printemps. Il est aussi présent dans de nombreuses formulations pour un usage non agricole.

1.3/ Glyphosate ($C_3H_8NO_5P$)

Herbicide à large spectre d'action, non sélectif et systémique. Il agit sur les enzymes de la plante en interférant avec la formation d'acides aminés et d'autres composés endogènes. Il est largement utilisé dans le contrôle des mauvaises herbes annuelles ou vivaces mais il n'est pas sélectif des cultures. Il est principalement utilisé sur céréales, arbres fruitiers, viticulture et jachère. En région Bretagne, son usage est d'ordre non-agricole.

Le glyphosate est la molécule active du Round Up. Le glyphosate est un acide faible anionique. Il est utilisé principalement sous forme de sels (isopropylamine ou triméthylsulfonium) et commercialisé sous forme de poudre ou concentré aqueux.

Tableau 1 : Quelques valeurs de pesticides enregistrées lors d'une étude menée en 1996 dans le cadre du contrat de Baie par Thomas *et al.* (1997).

Pesticide	Lieu	Période	Concentration
Diuron	Bassin versant de l'Elorn : la Roche Maurice	Oct. 1996	1,5 µg/L
	Bassin versant de l'Aulne : Chateaulin	Mai 1996	0,35 µg/L
	Bassin Versant Littoraux : Penfeld	Mai 1996 : Août-Nov. Oct.	>5 µg/L
	Daoulas		0,5 à 1 µg/L >0,2 µg/L
	Rade de Brest : Moulin Blanc (28.6‰)	Mai 1996	1,2 µg/L
	Moulin Blanc (35‰)	“ bruit de fond ”	0,2 - 0,3 µg/L
	Aulne (10-15 ‰)	Avril 1996	3,24 µg/L
	Le Caro (32 ‰)	Mai 1996	0,071 µg/L
	L'Auberlach (30 ‰)	Juin 1996	0,035 µg/L
	MCPA	Bassin versant de l'Elorn : le Quinquis	Mai 1996
Bassin versant de l'Aulne : Ty Glaz		Juillet 1996	2,5 µg/L
Bassin Versant Littoraux : Penfeld (10,2 ‰)		Juillet 1996	1,4 µg/L
Le Faou (0-2 ‰)		Juil.-oct. 96	1,5 - 2,1 µg/L
Rade de Brest : Hôpital - Camfrout (3,8 ‰)		Avril 1996	1,5 µg/L
Hôpital - Camfrout (28 ‰)		Juin 1996	0,4 µg/L

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES ECOTOXICOLOGIQUES

Les principaux résultats écotoxicologiques enregistrés chez les Mollusques dulcicoles ou marins, sont présentés dans les tableaux 2 et 3. Les données exploitées concernent les pesticides employés lors des tests sur la coquille Saint-Jacques, ainsi que les pesticides de la même famille.

Tableau 2 : Informations bibliographiques sur l'action des Phénylurées (Cadour, 1995)

Famille des Phénylurées					
Pesticides	Organismes	Concentration en mg/L	Paramètres	Remarques	Références
Diuron	<i>Crassostrea virginica</i>	1.6	96-h EC 50	indice de croissance -	Menzie 1979
	<i>Mercenaria mercenaria</i>	2.53	48-h LC50	Stade des oeufs fertilisés	Davies et Hidu 1969
		5	12-j EC 38	Croissance larvaire -	
		1	48-h EC 20	Stade des oeufs fertilisés	Davies 1961
	<i>Ostrea sp.</i>	1.8	96-h EC 50	Croissance juvéniles	Butler 1964
	<i>Pecten maximus</i>	0.005 ou 0.01	14-j EC	gamétogenèse cristallogénèse juvéniles et adultes	Larvor 1996
			2-mois LC0	juvéniles et adultes	
48-h LC 90			juvéniles et adultes		
Diflubenzuron	<i>Anodonta cygnea</i>	200	3-mois EC 3-mois LC 0	Cristallogénèse adultes	Machado <i>et al.</i> 1990
	<i>Juga plicifera</i>	0.036-0.045	3-sem NOEC	Survie, croissance, reproduction	Eisler 1992
			3-sem NOEC		
	<i>Physa Sp.</i>	>0.036	3-sem LC 0	Adultes	Nebeker <i>et al.</i> 1983
			3-sem NOEC		
Chlortoluron	<i>Crassostrea gigas</i>	0.60	9-j EC 10	Larves, indice poids -	His et Seaman 1993
		0.1	EC	Indice Croissance -	
Isoproturon	<i>Crassostrea gigas</i>	0.37	9-j LC 50	Larves	His et Seaman 1993
		0.25	9-j EC 10	Larves, indice poids -	
		0.1	EC	Larves, croissance -	
Linuron	<i>Physa acuta</i>	>40	48-h LC 50	adultes	Hashimoto et Nishiuchi 1982

Tableau 3 : Informations bibliographiques sur l'action des familles de pesticides acides.

Famille des pesticides acides									
Pesticides	Organismes	Concentration en mg/L	Paramètres	Remarques	Références				
MCPA	<i>Pecten maximus</i>	0.01	14-j EC	gamétogenèse cristallogénèse juvéniles et adultes	Larvor 1996				
		0.1	2-mois LC0	juvéniles et adultes					
		1	7-j LC 90	juvéniles et adultes					
	<i>Crassostrea virginica</i>	15.62	48-h TL m	Embryons, 24°C	Davies et Hidu 1969				
		31.3	14-j TL m	Larves, 24°C					
2.5		14-j EC	Larves, 24°C, indice croissance -						
2,4-D	<i>Crassostrea gigas</i>	0.025	EC	Indice croissance -	His et Seaman 1993				
	<i>Crassostrea virginica</i>	64.29	14-j TL m	2,4-D sels, larves	Vershueren 1983				
		0.74	14-j TL m	2,4-D esters, larves					
		8	48-h TL m	Oeufs, 2,4-D esters					
		20.44	48-h TL m	Oeufs, 2,4-D sels					
	3.75	96-h EC 50	2	2,4-D butoxyéthanol	Butler 1963				
						2	96-h NOEC	9°C, 2,4-D acide libre	
						2	96-h NOEC	30°C 2,4-D acide libre	
						2	96-h NOEC	25°C 2,4-D diéthylamine	
						1	96-h EC 50	Croissance, 29°C, 2,4-D isooctyl	Mayer, 1987
						0.055	96-h EC 50	Croissance, 28°C,	
						<i>Mytilus edulis</i>	91.4 - 182.8	10-j EC	Indice croissance - larves
	91.4	20-j EC							
	182.8	12/22-j LC100							
	176	40-j NOEC	métamorphose larves						
259	96-h LC 50	2,4-D acide libre Trochophores							
262	96-h EC 50	Fixation							
211.7	96-h EC 50	Développement							
Bentazone	<i>Physa acuta</i>	> 40	48-LC 50	Adultes	Hashimoto et Nishiuchi 1982				
Dicamba	<i>Crassostrea virginica</i>	1	96-h NOEC	juvéniles 28°C	Menzie 1979				
		5	96-h NOEC	juvéniles 13°C					
Mécoprop	<i>Crassostrea gigas</i>	4.2	9-j LC 50	larves	His et Seaman 1993				
		0.13	9-j EC 10	larves, indice poids -					
		0.1	EC	indice croissance -					

LC : concentration létale

EC : concentration ayant un effet

NOEC : Concentration sans effet

TL m : Tolérance moyenne d'un organisme pour un produit

ETUDE EXPERIMENTALE DE L'EFFET DE PESTICIDES SUR LE DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE ET LARVAIRE DE *PECTEN MAXIMUS*, L.

MATERIEL / METHODES ET RESULTATS

FECONDATION

Le déroulement d'une ponte de coquille Saint-Jacques est présenté en annexe 1.

1/ Protocole

1.1/ Choix des gamètes

Après émission des œufs, ces derniers sont observés au microscope photonique pour une vérification de leur qualité (comptage des ovocytes immatures, atrétiques, normaux (photographies 6.1/ 6.2/ 6.3)). En parallèle, après émission du sperme de 1 ou plusieurs mâles, les spermatozoïdes sont dénombrés.

Pour obtenir une fécondation efficace, un rapport de 50 spermatozoïdes/ovocyte, dans 100 mL d'eau de mer est préconisé (Faure, 1996).

Après ces vérifications, les spermatozoïdes et les ovocytes sont mis en contact pour fécondation dans des béchers de 100 mL (100 à 150 ovocytes/mL et 5000 à 7500 spermatozoïdes/mL) préalablement additionnés en pesticides, à une température de 18 à 20°C. Ces diverses manipulations doivent être effectuées dans l'heure qui suit l'émission des gamètes, de façon à éviter leur vieillissement et donc une altération de leur qualité (Faure, 1996).

Les concentrations réelles sont calculées à partir de l'analyse par chromatographie liquide réalisée sur les solutions mères de chacun des pesticides employés, et en considérant une erreur au niveau de l'échantillonnage sur le volume final de mise en solution (1.75 L ± 50 mL) et sur le prélèvement de chacun des pesticides (10 mL ± 0.2 mL). Les résultats présentés sont moyennés sur l'ensemble des expériences réalisées.

1.2/ Les conditions testées sont les suivantes

Tableau 4 : Listes des différents pesticides testés, à des concentrations diverses.

Traitements	Concentration théorique visée (µg/L)	Concentration réelle * (µg/L) avec borne inférieure et supérieure	Réplicats
Témoin	0	0	3
Diuron	1	1.06 < 1.1 < 1.15	3
	0.5	0.49 < 0.53 < 0.54	3
	0.1	0.096 < 0.101 < 0.106	3
MCPA	1	0.96 < 1 < 1.05	3
	0.5	0.455 < 0.495 < 0.505	3
	0.1	0.089 < 0.094 < 0.099	3
Glyphosate	1	0.955 < 0.995 < 1.045	3
	0.5	0.45 < 0.49 < 0.50	3
	0.1	0.088 < 0.093 < 0.098	3
Synergie	1)-Diuron	1.06 < 1.1 < 1.15	3
	2)-MCPA	0.96 < 1 < 1.05	3

* : les concentrations des analyses réalisées seront données pour chaque date de test en annexe 2.

1.3/ Prélèvements

Différents prélèvements ont été effectués :

* *Fécondation + 2 heures et/ou Fécondation + 4 heures*

Vérification de la fécondation et de l'apparition des premières divisions cellulaires au Hoechts (Détail du protocole de fixation et de coloration décrit en annexe 3)

* *Fécondation + 48 heures*

Fixation au formol à 4 % et dénombrement des larves D normales, des D anormales, des trochophores, des morula, et des œufs non développés, afin d'estimer la qualité du développement embryonnaire et les premières étapes du développement larvaire.

1.4/ Calculs et mesures

L'estimation de la fécondation est faite de la façon suivante :

Lorsque l'on observe des lots d'ovocytes après fécondation, on peut noter la présence d'ovocytes, d'œufs et d'embryons (tableau 5). Chez *Pecten maximus*, les ovocytes sont émis au stade ovocyte I vitellogénique métaphase I. La pénétration du spermatozoïde et donc la fécondation déclenche la reprise de méiose réductionnelle et l'émission du premier globule polaire, puis la méiose équationnelle et l'émission du deuxième globule polaire (Figure 3).

Tableau 5 : Distinction entre ovocyte fécondé et non fécondé d'après Faure (1996).

Catégories	Descriptions	Illustrations
Non fécondés	Ovocyte immature	Annexe 2 Pl.1 Photo 1
	Ovocytes mature	An. 2 Pl. 1 Photo 2 et 3
	Ovocyte surmature ou atrésique	Photo 6.1 et 6.3 page 19
Fécondés	Polyspermie	Annexe 2 Pl.1 Photo 4
	Œuf à différents stades de la méiose, avec 1 ou 2 globules polaires	Annexe 2 Pl.1 Photo 6
	Embryon au stade 2 cellules	Annexe 2 Pl.2 Photo 1 à 6
	Embryon au stade 4 cellules	
	Embryon au stade 8 cellules	
	Embryon avec plus de 8 cellules	

Les calculs concernant la fécondation et l'initiation des premières divisions de l'œuf sont effectués comme suit et portent sur une centaine d'"individus" :

*Taux de fécondation = $100 \times \text{nombre de "fécondés"} / \text{total d'ovocytes et d'œufs}$

*Taux d'embryons = $100 \times \text{nombre d'embryons} / \text{total d'ovocytes, d'œufs et d'embryons}$

Les calculs concernant le développement embryonnaire puis larvaire, jusqu'à la larve D, 48 heures après fécondation, sont effectués sur au moins 300 "individus" :

Taux d'éclosion*

* taux d'éclosion 1 = $100 \times \text{nombre de larves D normales} / \text{total}$

* taux d'éclosion 2 = $100 \times \text{nombre de larves D normales} / (\text{total} - \text{œufs non développés})$

Taux d'anomalie*

*taux de larves D anormales = $100 \times \text{nombre de D anormales} / \text{total}$

2/ Résultats

Ces expériences n'ont pu être menées à terme. Deux pontes de femelles ont été testées. Les taux d'éclosion ont été très faibles, même pour le lot témoin. Ces taux d'éclosion trop faibles n'ont permis aucune analyse statistique des résultats.

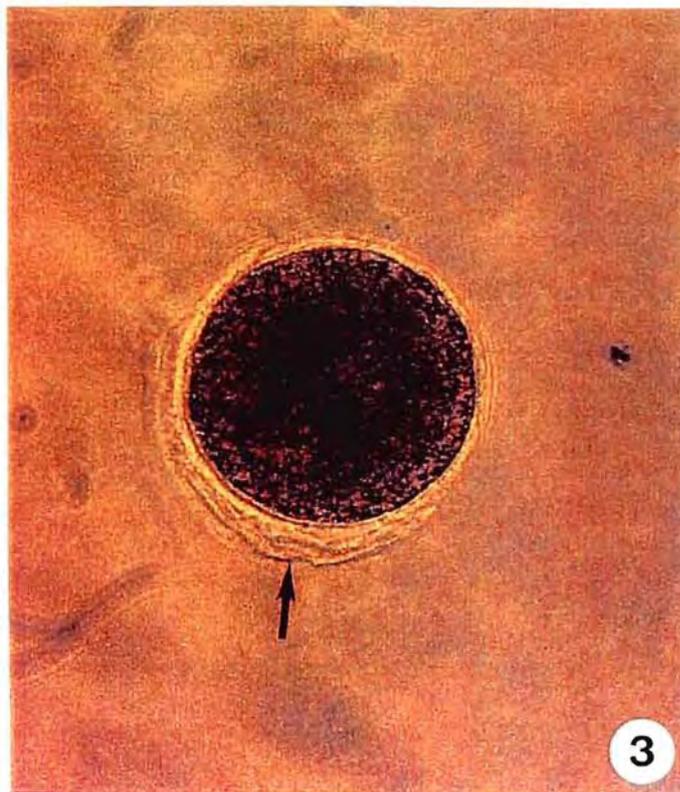
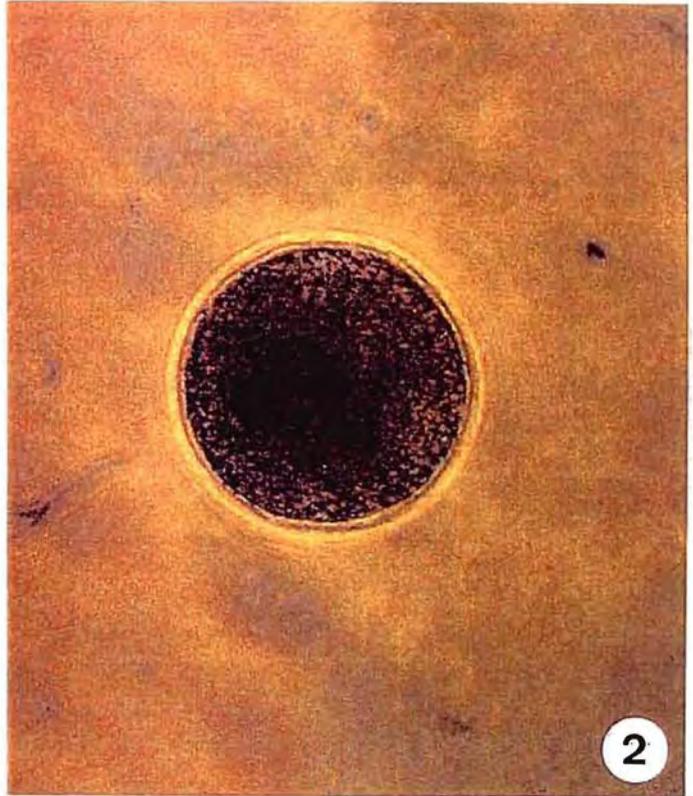
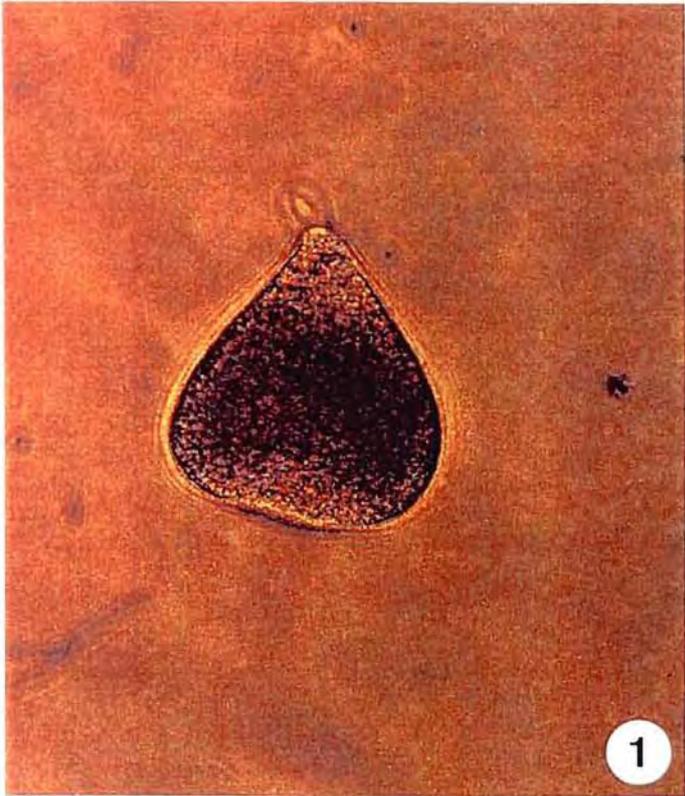
Pour des raisons biologiques (approvisionnement en œufs), aucun autre test n'a pu être pratiqué dans le cadre de cette étude.

Afin de mieux connaître les effets des pesticides sur la fécondation, des tests futurs peuvent être envisagés :

- * Fécondation en milieu contaminé (Cf. protocole ci-dessus).
- * Fécondation en milieu sain, après balnéation, de 10 minutes à 2 heures, des ovocytes et des spermatozoïdes en milieu contaminé.
- * Etude des caractéristiques membranaires des ovocytes, en fin de gamétogenèse : notamment développement de diagnostics de la maturation membranaire.
- * Traçage des pesticides et évolution dans les gamètes : recherche des points d'impact écotoxicologiques cellulaires.

(...).

Photo 6.1 / 6.2 / 6.3 : Respectivement : oeuf atrétique, normal et surmature.



DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE

1/ Protocole

1.1/ Choix des œufs fécondés

1 femelle fécondée par 2 ou 3 mâles (pour chaque test).

Après vérification au microscope photonique de la qualité des fécondations (nombre de spermatozoïdes = 10 en couronne autour de l'ovocyte) et des œufs (comptage des immatures, atrétiques, normaux (se référer aux photographies 6.1/ 6.2/ 6.3/), les œufs (100 à 150 œufs / mL) sont répartis dans des béchers de 100 mL préalablement additionnés de pesticides, environ 30 à 45 minutes après la fécondation (temps nécessaire aux diverses manipulations). La température est stabilisée à 18-20°C.

1.2/ Les conditions retenues sont les suivantes

Tableau 6 : Listes des différents pesticides testés, à des concentrations diverses.

Traitements	Dose réelle en µg/L	Dose visée (µg/L)	Réplicats
Témoin	0	0	3
Diuron	1.06 < 1.1 < 1.15	1	3
	0.49 < 0.53 < 0.54	0.5	3
	0.096 < 0.101 < 0.106	0.1	3
MCPA	0.96 < 1 < 1.05	1	3
	0.455 < 0.495 < 0.505	0.5	3
	0.089 < 0.094 < 0.099	0.1	3
Glyphosate	0.955 < 0.995 < 1.045	1	3
	0.45 < 0.49 < 0.50	0.5	3
	0.088 < 0.093 < 0.098	0.1	3
Synergie 1)-Diuron 2)-MCPA	1.06 < 1.1 < 1.15	1	3
	0.49 < 0.53 < 0.54	0.5	
	0.96 < 1 < 1.05	1	
	0.455 < 0.495 < 0.505	0.5	

2 groupes de femelles ont été composés en fonction des traitements pratiqués :

Tableau 7 : Listes des différentes femelles testées dans différentes conditions.

Groupe	Femelles	Traitements
I	J / K / G / H	Diuron, MCPA, Glyphosate à 0.1 / 0.5 et 1 µg/L synergie Diuron et MCPA 1 µg/L
II	A / B / C / D / E / F / I	Diuron, MCPA, Glyphosate à 0.5 et 1 µg/L Synergie Diuron et MCPA à 1 µg/L

Toutes les femelles choisies étaient des femelles préalablement conditionnées. C'est à dire conservées dans un milieu où la température et la luminosité sont contrôlées afin de gérer la maturation des gonades.

1.3/ Prélèvements

Idem chapitre 1.1.3

1.4/ Calculs, mesures et statistiques

Idem chapitre 1.1.4

Les taux d'éclosion des différentes fécondations sont testés et comparés pour mettre en évidence les variations inter-femelles.

Des tests statistiques seront alors effectués pour quantifier ces différences :

Tests ANOVA (mise en évidence de différences significatives ou non (effet traitement, effet mois,...) puis test Newman-Keuls (tests plus approfondis pour voir entre quels traitements ou entre quels mois...se situent ces différences significatives).

Afin de permettre ces analyses statistiques, les taux d'éclosion donnés en pourcentage seront transformés. Ainsi, par exemple pour le taux de larves normales après éclosion, qui traduit le taux d'éclosion, le calcul est le suivant :

Pour chaque bécher : $ASin((\%Normales/100)^{0.5})$,
Puis une moyenne des trois b chers est calculée.

Le calcul sera le même pour les larves anormales, les trochophores et les oeufs.

Ce sera à partir de ces valeurs que l'ensemble des tests seront effectués.

Par la suite, étant donné la disparité possible des taux d'éclosion témoins, ils ont été transformés en taux d'abaissement du taux d'éclosion, de façon à permettre la comparaison des différentes femelles entre elles.

Le calcul est le suivant, pour chaque bécher :

$$\text{Taux d'abaissement} = \frac{(100 * (\text{taux  clo.} - \text{moyenne Taux  cloT moin des 3 b chers}))}{\text{Moyenne Taux  cloT moin des 3 b chers}}$$

De même, ces taux d'abaissement seront transformés en $ASin(X)^{0.5}$, afin de permettre des analyses statistiques.

2/ Résultats

2.1/ Représentation des différents types de larves observées

Photos 7.1 / 7.2 / 7.3 (fixation au formol).

(Toutes les formes possibles ne sont pas représentées).

7.1



L. normale

L. avec charnière concave

7.2



Trochophores

Velum extrudé

7.3



Valves irrégulières, fermeture impossible

2.2/Variations inter-femelles

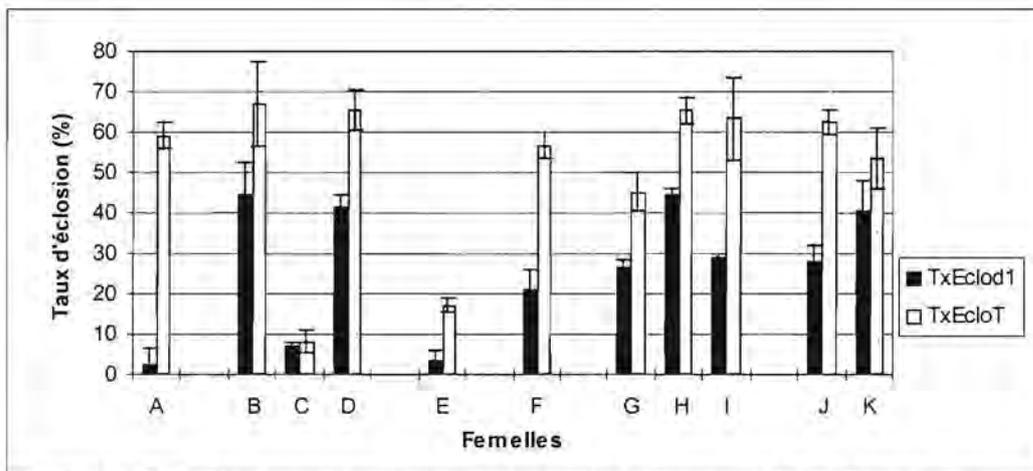
2.2.1/ Variation du taux d'éclosion

Rappelons que les expériences ont été pratiquées sur 11 femelles (toutes conditionnées), du mois de mai au mois d'août 1999, indiquées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 8 : Liste des 11 femelles et des dates leur correspondant

Femelles	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
Dates	12 mai	25 mai	25 mai	25 mai	26 juil.	28 juil.	10 août	10 août	10 août	25 août	25 août

Les résultats concernant les taux d'éclosion de chacune de ces femelles en condition non toxique et en présence de Diuron à 1 µg/L sont représentés sur le graphe ci-dessous.



Graph 1 : Taux d'éclosion témoin et en présence de Diuron 1 µg/L de 11 femelles testées
Les intervalles de confiance sont représentés sur chaque histogramme

Il apparaît de façon évidente que les taux d'éclosion suivant la fécondation de chacune des femelles sont différents.

Il est donc absolument nécessaire de prendre en compte l'effet femelle dans nos analyses statistiques.

2.2.2/ Taux d'abaissement

Les graphes représentant les taux d'abaissement obtenus dans les différentes conditions envisagées, pour les 11 femelles testées sont présentés en Annexe 4.

A titre de rappel, l'ensemble des femelles a été divisé en deux groupes, dont le descriptif figure dans le tableau ci-dessous (*Id.* Tableau 7)

Groupe	Femelles	Traitements
I	J / K / G / H	Diuron, MCPA, Glyphosate à 0.1 / 0.5 et 1 µg/L synergie Diuron et MCPA 1 µg/L
II	A / B / C / D / E / F / I	Diuron, MCPA, Glyphosate à 0.5 et 1 µg/L Synergie Diuron et MCPA à 1 µg/L

2.2.2.1/ Résultats statistiques pour le groupe I

Une ANOVA révèle un effet femelle significatif ($\alpha=0.05$) souligné par un test Newman-Keuls, qui permet d'identifier les différences.

Tableau 9 : Groupe I / Test de l'effet femelle / Test Newman-Keuls; ASINTAUX

Femelle	ASIN $\sqrt{\text{ (Taux d'abaissement)}}$	1	2	3
K	0.37259	*		
G	0.50691		*	
H	0.53752		*	
I	0.61284			*

* : signifie une différence significative avec un alpha = 0.05

Cette analyse révèle 3 lots de femelles. La femelle K réagit différemment des femelles G et H et de la femelle J. Cette dernière réagit différemment des femelles G et H.

2.2.2.2/ Résultats statistiques pour le groupe II

Une ANOVA révèle un effet femelle significatif (alpha=0.05) souligné par un test Newman-Keuls, qui permet d'identifier les différences.

Tableau 10 : Groupe II / Test de l'effet femelle / Test Newman-Keuls; ASINTAUX

Femelle	ASIN $\sqrt{\text{ (Taux d'abaissement)}}$	1	2	3	4
B	0.5081	*			
A	0.52569	*	*		
D	0.56636	*	*		
C	0.57676	*	*		
I	0.6238		*	*	
E	0.6882			*	
F	0.92245				*

* : signifie une différence significative avec un alpha = 0.05

Cette analyse révèle de façon moins nette les différences entre les femelles. La femelle F réagit différemment de l'ensemble des autres femelles. La femelle E réagit différemment des femelles B/A/D/C/I. La femelle I réagit différemment des femelles B/A/D/C. Cependant, il existe des recouvrements intergroupes.

2.2.3/ Variations inter-femelles concernant les taux de :

Larves D Normales / Larve D Anormales / Trochophores / Oeufs non éclos.

2.2.3.1/ Résultats statistique du Groupe I

Tableau 11 : Test de l'effet femelle / Test Newman-Keuls; ASINTAUX

Fem.	Normales			Anormales			Trochophores			Oeufs			
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	4
G	*					*		*			*		
J		*		*			*					*	
K			*	*						*			*
H			*		*					*	*		

* décalée signifie une Différence Significative avec un alpha = 0.05

* superposée signifie un groupement de valeur non SD

L'analyse de chacun des taux avec le test Newman-Keuls isole des groupes qui se recourent ou non. L'interprétation détaillée des résultats statistiques n'est pas utile à ce niveau.

2.2.3.2/ Résultats statistique du Groupe II

Tableau 12 : Test de l'effet femelle / Test Newman-Keuls

Fem.	Normales						Anormales						Trochophores			Oeufs			
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	1	2	3	4
F	*											*			*	*			
B		*					*								*	*			
I			*						*				*					*	
A			*				*							*				*	
D				*					*				*					*	
E					*					*				*	*			*	
C						*	*						*						*

* décalée signifie une Différence Significative avec un alpha = 0,05

* superposée signifie un groupement de valeur non SD

L'analyse de chacun des taux avec le test Newman-Keuls isole des groupes qui se recoupent ou non. L'interprétation détaillée des résultats statistiques n'est pas utile à ce niveau.

2.3/ Variation des taux d'abaissement en fonction du traitement

Les graphes représentant les résultats des 11 femelles testées sont présentés en Annexe 4.

2.3.1/ Résultats graphiques et statistiques pour le groupe I

Tableau 13 : Test de l'effet traitement Test Newman-Keuls

Traitements	ASIN $\sqrt{}$ (Taux d'abaissement)	Taux d'abaissement moyen (%)	1	2	3	4	5
Témoin	0	0	*				
Gly0.1 ⁽¹⁾	0.3256	10.23		*			
Gly0.5	0.5091	23.76			*		
MCPA0.1 ⁽²⁾	0.5706	29.17			*	*	
D0.1 ⁽³⁾	0.6291	34.62			*	*	*
Gly1	0.6656	38.13			*	*	*
D0.5	0.7002	41.52			*	*	*
MCPA0.5	0.7009	41.59			*	*	*
MCPA1	0.7233	43.81			*	*	*
D1	0.76	47.46			*	*	*
MCPA/D0.5 ⁽⁴⁾	0.7971	51.17				*	*
MCPA/D1	0.865	57.93					*

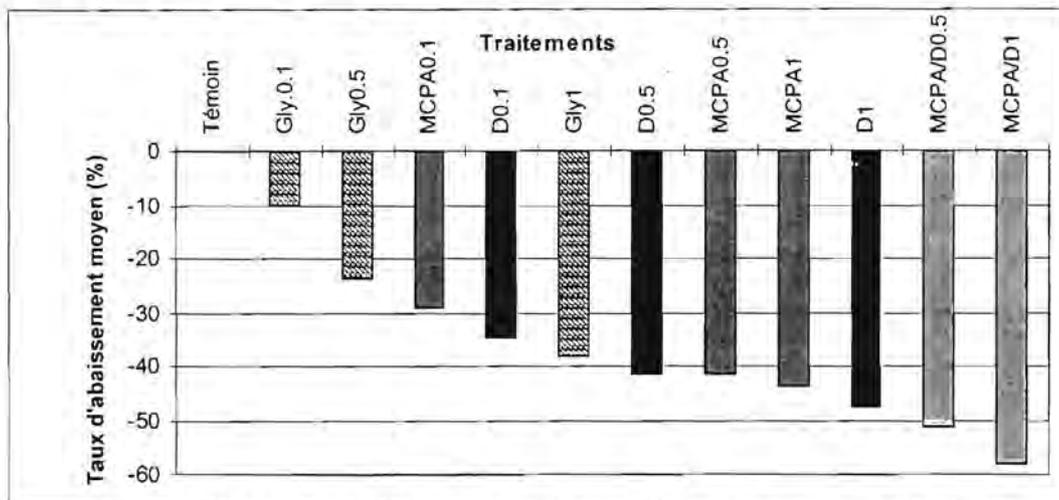
* : signifie une différence significative avec un alpha = 0,05

(1) Gly0.1, Gly0.5 et Gly1 : pesticide glyphosate aux concentrations : 0.1 ; 0.5 et 1 $\mu\text{g/L}$

(2) MCPA0.1, MCPA0.5 et MCPA1 : pesticide MCPA aux concentrations : 0.1; 0.5 et 1 $\mu\text{g/L}$

(3) D0.1, D0.5 et D1 : pesticide diuron aux concentrations : 0.1; 0.5 et 1 $\mu\text{g/L}$

(4) MCPA/D0.5 ou encore Syn.0.5 et MCPA/D1 ou encore Syn.1 : synergie des pesticides MCPA et diuron à des concentrations de 0.5 et 1 $\mu\text{g/L}$



Graph 2 : Taux d'abaissement du taux d'éclosion pour les femelles du groupe I, tous résultats confondus.

Cette analyse révèle que les lots témoins sont toujours significativement différents des lots traités. De même, le Glyphosate à 0,1 µg/L présente des résultats significativement différents des autres traitements.

La suite de l'analyse présente de grands groupes de traitements qui se chevauchent, sans résultat significativement différent.

Cependant, il est intéressant de noter une hiérarchisation des traitements, à partir du témoin dont la valeur a été amenée à 0 :

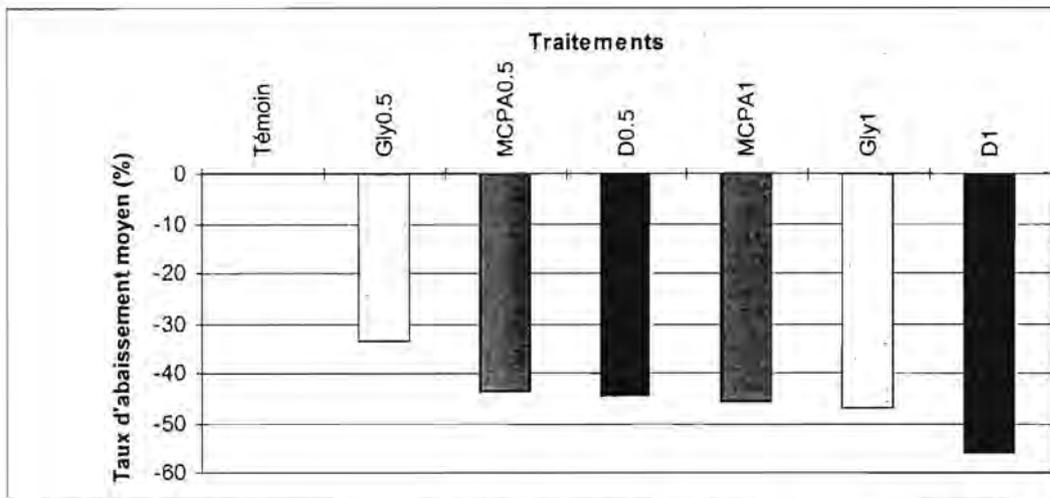
Gly0.1 < Gly0.5 < MCPA0.1 < D0.1 < Gly1 < D0.5 < MCPA0.5 < MCPA1 < D1 < Syn0.5 < Syn1

2.3.2/ Résultats graphiques et statistiques pour le groupe II

Tableau 14 : Test de l'effet traitement Test Newman-Keuls

Traitement	ASIN [√] (Taux d'abaissement)	Taux d'abaissement moyen (%)	1	2	3	4
Témoin	0	0	*			
Gly0.5	0.61772	33.54		*		
MCPA0.5	0.72155	43.63			*	
D0.5	0.732	44.67			*	
MCPA1	0.7414	45.61			*	
Gly1	0.7531	46.77			*	
D1	0.8455	56				*

* : signifie une différence significative avec un alpha = 0.05



Graphe 3 : Taux d'abaissement du taux d'éclosion pour les femelles du groupe I, tous résultats confondus.

Cette analyse révèle que les lots témoins sont toujours significativement différents des lots traités. De même, le Glyphosate à 0,5 µg/L présente des résultats significativement différents des autres traitements.

La suite de l'analyse présente un grand groupe de traitements (MCPA 0.5 / Diuron 0.5 / MCPA 1 / Gly. 1) significativement différents du Diuron 1, lui même, significativement différent de l'ensemble des valeurs obtenues.

Cependant, il est intéressant de noter à nouveau une hiérarchisation des traitements, à partir du témoin dont la valeur a été amenée à 0 :

$$\text{Gly } 0.5 < \text{MCPA}0.5 < \text{D}0.5 < \text{MCPA}1 < \text{Gly}1 < \text{D}1$$

Ainsi, on retrouve toujours les valeurs de taux d'abaissement du taux d'éclosion les plus fortes pour les concentrations en pesticides les plus fortes.

2.4/ Variation en fonction des traitements des différents taux de :

Larves D Normales / Larve D Anormales / Trochophores / Oeufs non éclos.

2.4.1/ Résultats statistiques du groupe I

Il s'agit de Tests Newman-Keuls

Tableau 15a/15b/15c/15d : représentations respectives des résultats obtenus avec les femelles du groupe I, concernant l'aspect des populations : Larves Normales / Anormales / Trochophores et Oeufs.

15a : Larves Normales

Trait.	ASIN√ (Taux d'abaissement)	Taux moyen (%)	1	2	3	4	5
MCPA1	0.586	30.58	*				
MCPA0.5	0.628	34.52		*			
D1	0.629	34.61	*	*			
D0.5	0.639	35.57		*			
D0.1	0.656	37.20		*			
MCPA0.1	0.699	41.40			*		
Gly1	0.708	42.29			*		
Gly0.5	0.741	45.57			*	*	
Gly0.1	0.776	49.06				*	
Témoin	0.853	56.74					*

15b : Larves Anormales

Trait.	ASIN√ (Taux d'abaissement)	Taux moyen (%)	1	2	3	4	5
Témoin	0.565	28.67	*				
Gly0.1	0.609	32.72	*	*			
Gly0.5	0.644	36.05		*	*		
MCPA0.1	0.662	37.79		*	*	*	
D1	0.662	37.79		*	*	*	
Gly1	0.663	37.88		*	*	*	
MCPA0.5	0.702	41.70			*	*	*
D0.5	0.702	41.70			*	*	*
D0.1	0.726	44.07				*	*
MCPA1	0.738	45.27					*

15c : Trochophores

Trait.	ASIN√ (Taux d'abaissement)	Taux moyen (%)	1	2
Témoin	0.193	3.68	*	
D0.1	0.211	4.39	*	*
D0.5	0.218	4.68	*	*
D1	0.223	4.89	*	*
MCPA0.1	0.227	5.06	*	*
Gly1	0.231	5.24	*	*
Gly0.5	0.240	5.65	*	*
MCPA0.5	0.241	5.70	*	*
Gly0.1	0.241	5.70	*	*
MCPA1	0.275	7.37		*

15d : Oeufs

Trait.	ASIN√ (Taux d'abaissement)	Taux moyen (%)	1	2	3	4
Témoin	0.304	8.96	*			
Gly0.5	0.333	10.69	*	*		
Gly0.1	0.340	11.12	*	*	*	
Gly1	0.369	13.01	*	*	*	
D0.1	0.372	13.21	*	*	*	
MCPA1	0.380	13.76		*	*	
MCPA0.1	0.389	14.38		*	*	
D0.5	0.410	15.89		*	*	*
MCPA0.5	0.415	16.26			*	*
D1	0.459	19.63				*

* Différence Significative avec un alpha = 0.05

Il ressort de cette analyse, que le témoin présente toujours plus de larves normales et moins de larves anormales et d'œufs. Rien ne semble ressortir de l'analyse du taux de trochophores. De plus, les traitements au glyphosate donnent des résultats très similaires aux témoins. Les traitements qui s'en écartent le plus, de façon significative, sont principalement le MCPA 1 µg/L (Larves normales, Larves anormales, Trochophores) et le Diuron 1 µg/L (œufs).

2.4.2/ Résultats statistiques du groupe II

Il s'agit de tests Test Newman-Keuls

Tableau 16a/16b/16c/16d : Représentations respectives des résultats obtenus avec les femelles du groupe II, concernant l'aspect des populations : Larves Normales / Anormales / Trochophores et Oeufs.

16a : Larves Normales

Trait.	ASIN√ (Taux d'abaissement)	Taux moyen (%)	1	2	3
D1	0.437	17.91	*		
Gly1	0.507	23.58		*	
MCPA1	0.514	24.17		*	
MCPA0.5	0.520	24.69		*	
D0.5	0.535	25.99		*	
Gly0.5	0.552	27.50		*	
Témoin	0.754	46.86			*

16b : Larves Anormales

Trait.	ASIN√ (Taux d'abaissement)	Taux moyen (%)	1	2	3	4
Témoin	0.438	17.99	*			
Gly1	0.516	24.34		*		
Gly0.5	0.519	24.60		*		
D1	0.532	25.73		*	*	
D0.5	0.558	28.04			*	*
MCPA0.5	0.568	28.94				*
MCPA1	0.581	30.12				*

16c : Trochophores

Trait.	ASIN√ (Taux d'abaissement)	Taux moyen (%)	1	2	3
D0.5	0.370	13.08	*		
Témoin	0.373	13.28	*		
Gly0.5	0.405	15.53	*	*	
MCPA0.5	0.410	15.89	*	*	
MCPA1	0.424	16.93		*	
Gly1	0.448	18.76		*	*
D1	0.473	20.75			*

* DS avec un alpha = 0.05

16d : Oeufs

Trait.	ASIN√ (Taux d'abaissement)	Taux moyen (%)	1	2
Témoin	0.379	13.69	*	
MCPA1	0.494	22.48		*
Gly0.5	0.494	22.48		*
Gly1	0.513	24.09		*
MCPA0.5	0.518	24.52		*
D0.5	0.526	25.21		*
D1	0.527	25.30		*

Il ressort de cette analyse des résultats moins tranchés, traduits par un nombre moindre de groupes significativement différents. **Cependant, le témoin présente toujours plus de larves normales et moins de larves anormales et d'œufs.** Rien ne semble ressortir de l'analyse du taux d'œufs, hormis la distinction significative du témoin. L'analyse des trochophores montre une démarcation entre les concentrations faibles reliées au témoin et les concentrations élevées qui s'en détachent.

Les traitements qui s'écartent le plus, de façon significative, du témoin, sont encore une fois de plus le Diuron 1 µg/L et le MCPA 1 µg/L (Larves Anormales) et le Diuron 1 µg/L (Larves Normales, trochophores et œufs).

NB : Les concentrations théoriques des différents expériences sont celles indiquées sur chacun des graphiques ou tableaux, mais les concentrations réelles en pesticides (rétrocalculées à partir de la concentration de la solution mère, en tenant compte des erreurs de pipetage et d'ajustement du volume) auxquelles ont été soumises ces différentes femelles de coquilles Saint-Jacques sont répertoriées ci-dessous :

Pour le diuron : 1.14 < **1.18** < 1.23 µg/L ; 0.51 < **0.55** < 0.56 µg/L ; 0.10 < **0.105** < 0.11 µg/L

Pour le MCPA : 0.92 < **0.96** < 1.01 µg/L ; 0.42 < **0.46** < 0.47 µg/L ; 0.082 < **0.087** < 0.092 µg/L

Pour le glyphosate : 1.01 < **1.05** < 1.10 µg/L ; 0.47 < **0.51** < 0.52 µg/L ; 0.092 < **0.097** < 0.102 µg/L.

CROISSANCE LARVAIRE

1/ Protocole

1.1/ Matériel animal

- Les larves à J2 :

De la fécondation à " l'éclosion " (2 jours plus tard : " J2 "), les larves sont élevées en bacs cylindroconiques de 450 litres à l'écloserie du Tinduff.

A ce stade, des mesures du taux d'éclosion sont effectuées afin de vérifier la qualité des larves D obtenues.

En fonction des résultats, les larves D issues de plusieurs femelles (généralement 5 femelles) sont sélectionnées (Tableau 17). Le choix se porte sur les larves issues des femelles présentant des taux d'éclosion " moyens " avec de faibles taux d'anomalies. Les forts taux d'éclosion et les trop faibles ont été éliminés dans le but d'éviter de sélectionner -1) des larves potentiellement très résistantes aux stress environnementaux, -2) des larves trop faibles pour survivre à l'expérimentation.

Quatre séries d'élevages ont été réalisées : la première au mois de mars pour déterminer les conditions ultérieures d'expérimentation, et les suivantes en avril, juin et août 1999.

Tableau 17 : Caractéristiques et origine des larves D sélectionnées.

Période d'expérimentation	nombre de femelles et caractéristiques	taux d'éclosion en %	taux d'anomalie en %
mars 1999	bac 2 : 1 conditionnée (c)	23,6	19,45
25.03.99	bac 12 : 2 c	22,6	11,4
19.04.99	bac 14 : 2 c	20,55	10,56
avril 1999	bac 10 : 3 c	10,35	20,45
30.04.99	bac 5 : 2 c	13,12	22
26.05.99			
mai 1999	bac 4 : 2 c	16,75	10
03.06.99	bac 6 : 3 c	8,4	9,8
28.06.99			
août 1999	bac 3 : pool de 10 naturelles	22	25
28.07.99			
23.08.99			

La concentration de larves D à J2 préconisée (Faure, 1996) au début de l'expérimentation est de 10 à 13 larves / mL d'eau de mer, soit :

- 35 000 à 40 000 larves pour un volume de 3,5 litres.
- 17 500 à 20 000 larves pour un volume de 1,750 litres.

- Alimentation des larves :

Le protocole de nutrition est le même que celui établi par le Tinduff. Trois algues issues de cultures axéniques (*Pavlova sp.*, *Chaetoceros sp.*, *Skeletonema sp.*) seront distribuées à raison de un tiers de chacune des souches par jour :

A J2 (début de l'alimentation larvaire), 20 cellules de chaque souche par microlitre d'eau de mer, puis 10 cellules à J3.

Ensuite, 15 cellules / μ L d'eau de mer de chacune des souches quotidiennement.

1.2/ Méthodologie

1.2.1/ Tests préliminaires

Durant le mois de mars 1999, des tests préliminaires ont été réalisés afin de déterminer les conditions expérimentales choisies pour les élevages larvaires qui suivront :

- Comparaison des survies en béciers de 5 litres (3.5 L d'eau de mer) ou de 2 litres (1.750 L d'eau de mer),
- Tests de survie et de croissance larvaire à 2 concentrations de diuron et de MCPA (0.1 et 0.5 µg/L).
- Elevage avec filtration à J15 ou sans filtration.

A l'écloserie du Tinduff, pour des nécessités de production, une sélection des têtes de lot par filtration graduelle (tamis de 60 µm à 120 µm) est effectuée durant l'élevage larvaire. Cette filtration sélective permet en outre d'éviter un développement bactérien lié à la dégradation de matière organique.

Lors des tests préliminaires, une seule filtration à 100 µm (à J15) a été envisagée dans le but de vérifier son utilité pour garantir une bonne hygiène d'élevage, tout en conservant la plus large distribution de la population.

Les larves D sélectionnées sont réparties, à raison de 10 à 13 larves D normales par mL, dans des béciers préalablement remplis de 1.750 L ou de 3.5 L (\pm 50 mL) d'eau de mer filtrée à 1 µm, d'antibiotique et contaminés ou non en pesticides.

Les béciers sont placés dans un bain-marie thermostaté à environ 18-20°C, grâce à une résistance chauffante. Une pompe assure la circulation de l'eau de baignation, donc l'homogénéisation de la température qui est enregistrée régulièrement.

L'eau de mer des béciers est renouvelée tous les deux ou trois jours, comme suit :

Le contenu de chaque bécier est filtré sur un tamis de 60 µm (ou de 100 µm à la date préconisée). Les larves sont récupérées dans une éprouvette de 50 mL. Chaque bécier est soigneusement lavé et rincé (savon, eau douce chaude, eau de mer) puis de nouveau rempli (eau de mer filtrée, antibiotique, pesticide ou non, larves).

Tout le matériel de filtration (éprouvette, agitateur, filtre, entonnoir) est passé à l'eau de javel puis soigneusement rincé entre chaque bécier.

L'expérimentation se poursuit jusqu'à l'initiation de la métamorphose (maximum 28 jours après fécondation).

Des prélèvements sont effectués tous les 7 jours afin de suivre l'évolution de la population.

Les résultats obtenus lors de ces tests préliminaires - non détaillés ici- ont abouti aux conclusions suivantes :

Survie et croissance équivalente en béciers de 5 L ou de 2 L,

Survie et croissance équivalente avec ou sans filtration à 100 µm à J15,

Survie et croissance équivalente pour les concentrations théoriques de 0.1 et 0.5 µg/L en diuron et en MCPA (soit respectivement pour les concentrations réelles de 0.106 ; 0.53 µg/L et 0.099 ; 0.495 µg/L).

Ces résultats nous ont permis de déterminer un protocole standard pour les études ultérieures. Au regard des bons résultats de survie et de croissance, le diuron et le MCPA ont été testés à des doses un peu plus élevées (correspondant aux pics enregistrés en Rade), et des tests

supplémentaires concernant le glyphosate (peu d'informations en écotoxicologie marine, malgré une large utilisation) ont été envisagés.

1.2.2/ Protocole d'élevage larvaire en conditions toxiques

Trois produits sont testés à différentes concentrations ainsi qu'une synergie :

Diuron :	0.49 < 0.53 < 0.54 µg/L et 1.06 < 1.1 < 1.15 µg/L
MCPA :	0.455 < 0.495 < 0.505 µg/L et 0.96 < 1 < 1.05 µg/L
Glyphosate :	0.45 < 0.49 < 0.50 µg/L et 0.955 < 0.995 < 1.045 µg/L
Synergie :	MCPA 0.96 < 1 < 1.05 µg/L et Diuron 1.06 < 1.1 < 1.15 µg/L
Témoin :	eau de mer d'élevage.

Pour chacun des tests, trois répliquats sont effectués, soit 24 béchers.

Les tests ont lieu en béchers de 2 litres, sans bullage, avec une concentration d'environ 12 larves par mL.

Il n'y a pas de sélection par filtration.

Ces tests débutent à J2 (après éclosion) et se terminent lorsque la majorité (plus de 60 %) des larves sont en phase de " double barres ", période après laquelle un élevage en système ouvert est primordial pour que la métamorphose se produise.

Les larves sont nourries tous les jours de la même façon que les larves d'élevage de l'écloserie.

Trois élevages ont été réalisés, en **avril**, en **mai** et en **août** 1999 (tableau 17).

1.3/ Observations et analyses

La survie et la croissance des larves sont suivies de façon hebdomadaire (pour information, chaque mercredi), grâce à différentes observations et analyses :

- * Une observation de la croissance larvaire et de l'aspect des populations dans chaque bécher.
- * Un comptage et une estimation de l'évolution des populations de chaque bécher : larves normales et anormales, mortalité, apparition des " double barres ".
- * Des mesures **morphométriques** par analyse d'image (Logiciel Samba).
- * Une analyse de la **crystallogénèse** au microscope électronique à balayage (MEB)

A cet effet, plusieurs prélèvements et fixations sont réalisés (Tableau 18)

Tableau 18 : Les différents prélèvements réalisés au cours des élevages larvaires.

	larves concentrées dans une éprouvette de 50 mL		
objectif	comptage immédiat des différents types de larves	suivi des paramètres morphométriques	observations coquillières au MEB
volume prélevé	5 x 100 µL	1 mL	1 mL
fixation	formol 4 %	formol 4%	glutaraldéhyde (annexe 6)

2/ Résultats

2.1/ Suivi de la croissance

2.1.1/ Effet mois

Un bilan des différents résultats des mesures effectuées à J21, pour les expérimentations d'avril, de mai et d'août souligne le **caractère très " saisonnier " des élevages**. La survie, l'apparition des doubles barres et l'initiation de la métamorphose ne sont pas les mêmes à chaque période de l'année (cf. annexe 5).

Une ANOVA réalisée sur l'ensemble des valeurs obtenues en avril, mai et août pour l'ensemble des traitements a révélé un effet significatif de la période d'élevage sur le diamètre maximum. Le tableau 19 présente les résultats détaillés (Test Newman-Keuls). Le mois d'août présente des résultats très significativement différents des mois de mai et avril qui eux sont semblables.

Tableau 19 : Test Newman-Keuls sur le Dia. Max. (μm)

Effet testé : le mois

Mois	(1) : 174,73	(2) : 172,76	(3) : 163,54
Avril (1)		0.232	0.0001
Mai (2)	0.232		0.0001
Août (3)	0.0001	0.0001	

Seuil significatif à 0.05

L'impact des traitements est également différent suivant la période d'élevage. Une ANOVA à deux facteurs hiérarchisés (traitements et mois) ne révèle ni effet traitement seul ni effet mois seul, mais un effet combiné ($p=0.002971$) sur le rapport des diamètres (Dia. Max./ Dia. Min.). Ainsi, les analyses des résultats soulignent des effets significatifs des différents traitements sur la croissance (diamètre maximum) et la morphologie des larves (rapport Diamètre maximum / Diamètre minimum), **notamment au mois d'août**.

2.1.2/ Effets traitements : Mois de avril / mai / août

2.1.2.1/ AVRIL

Effets Traitement et Bécher :

Après analyse des résultats, une ANOVA concernant le rapport (Dia. Max./ Dia. Min.) et le diamètre maximum révèle l'absence d'effet traitement et d'effet bécher.

Population : (Graphe 4)

L'analyse de la distribution des diamètres maximums dans la population de larves à J21 révèle des distributions de populations semblables entre les différents traitements. Un seul mode, avec une queue de lot importante (confirmé par un test de loi normale).

2.1.2.2/ MAI

Effets Traitement et Bécher :

Après analyse des résultats, une ANOVA révèle des effets traitements sur le rapport (Dia. Max./ Dia. Min.) ($p=0.009$), mais pas d'effet bécher ($p=0.787$). La seule différence significative (Test de Newman-Keuls) est observée entre le Diuron 0.5 $\mu\text{g/L}$ et le Glyphosate 0.5 $\mu\text{g/L}$ ($p=0.0089$). La même analyse pour la variable diamètre maximum ne révèle ni effet traitement, ni effet bécher.

Population : (Graphe 5)

L'analyse de la distribution des diamètres maximums dans la population de larves à J21 révèle des distributions de populations semblables entre les différents traitements. Un seul mode, avec une queue de lot importante (confirmé par un test de loi normale).

2.1.2.3/ AOÛT

Effets Traitement et Bécher :

Après analyse des résultats, une ANOVA révèle des effets traitement ($p=0.00099$), mais pas d'effet bécher ($p=0.830$) pour la variable rapport (Dia. Max./ Dia. Min).

L'absence d'effet bécher permet de réunir les valeurs des trois répliquats pour chacun des traitements, de façon à analyser en détail l'effet traitement (Tableau 20).

Tableau 20 : Test Newman-Keuls sur le rapport Dia. Max/ Dia. Min.

Effet testé : le traitement

Trait. (µg/L)	rapport	1	2	3	4	5	6	7	8
Témoin	1 : 1.2182		0.052	0.0126	0.3297	0.0124	0.00004	0.0011	0.6279
Diuron 1	2 : 1.2058	0.052		0.5276	0.2575	0.7352	0.0977	0.4581	0.0963
Diuron 0.5	3 : 1.1967	0.0126	0.5276		0.1818	0.9079	0.2557	0.6815	0.0349
MCPA 1	4 : 1.2062	0.3296	0.2575	0.1818		0.2368	0.0043	0.0706	0.3488
MCPA 0.5	5 : 1.1953	0.0124	0.7352	0.9079	0.2368		0.197	0.4722	0.039
Synergie	6 : 1.1843	0.00004	0.0977	0.2557	0.0043	0.197		0.3159	0.0001
Glyphosate 1	7 : 1.1911	0.0011	0.4581	0.6815	0.0706	0.4722	0.3159		0.0055
Glyphosate 0.5	8 : 1.2128	0.6279	0.0963	0.0349	0.3488	0.0399	0.0001	0.0055	

Les chiffres en gras représentent les valeurs significativement différentes ($p \geq 0.05$)

Population J23 : (graphe 6)

L'analyse de la distribution des diamètres maximums dans la population de larves à J21 révèle des distributions de populations dissemblables entre les différents traitements. Un seul mode, avec une queue de lot importante (confirmé par un test de loi normale).

Par conséquent, pour le mois d'août, certaines populations de larves sont différentes en fonction du traitement, contrairement aux deux précédents mois. Des tests de comparaison de distribution (test Mann-Whitney) et de moyenne, concernant le diamètre maximum, soulignent les différences significatives ($p=0.001$) (Tableau 21). Ainsi, il ressort que :

MCPA0.5 / Diuron 1 et Gly0.5 ont des distributions de populations différentes du Témoin. De plus, Gly0.5 a une distribution de population significativement différentes de Gly1 et de Synergie 0.5.

MCPA0.5 / Diuron 1 et Gly0.5 ont une moyennes significativement différente du Témoin. Gly0.5 a une moyenne significativement différente de Gly1.

Tableau 21 : Tests comparatifs de la distribution (Mann-Whitney) et de la moyenne.

Traitement (µg/L)	Moyenne (µm)	Gly. 1	Synergie 1	MCPA 1	Diuron 0.5	MCPA 0.5	Diuron 1	Gly. 0.5
Témoin	186.61					# / ##	# / ##	# / ##
Gly. 1	191.66							# / ##
Synergie 1	192.70							##
MCPA 1	196.61							
Diuron 0.5	197.32							
MCPA 0.5	201.41							
Diuron 1	201.46							
Gly. 0.5	203.57							

Signifie une différence significative des moyennes ($p=0.001$)

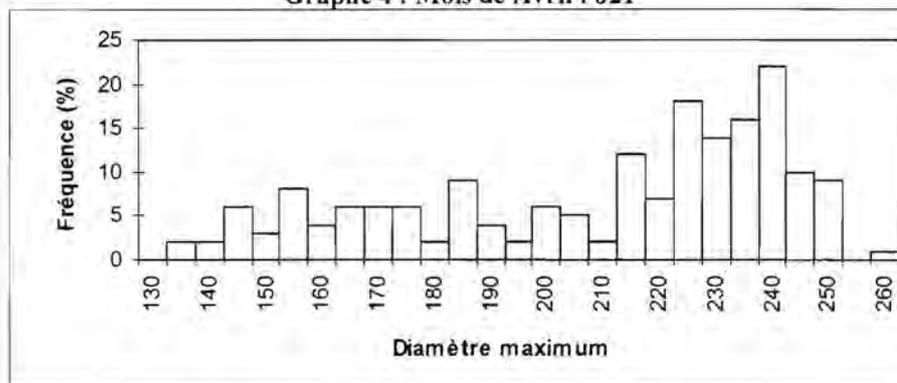
Signifie une différence significative de la distribution ($p=0.001$)

Aucune croix signifie aucune différence significative de distribution ou de moyenne.

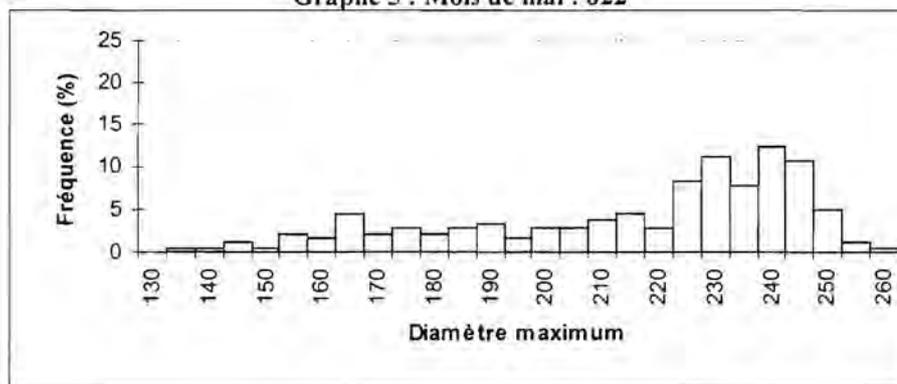
Les larves du témoin sont toujours plus petites que les larves issues de l'ensemble des traitements toxiques (Diamètre moyen = 186,61 μm). Des différences significatives sont enregistrées pour MCPA 0,5 / Diuron 1 / Glyphosate 0,5. Il semble que les produits toxiques produisent un effet Hormèse (activateur de croissance).

Graphe 4/5/6 : Représentation des histogrammes de populations Témoins pour les mois de avril / mai et août.

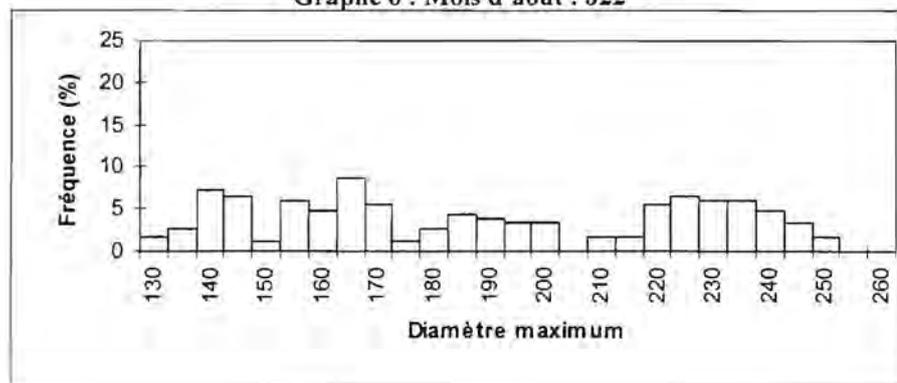
Graphe 4 : Mois de Avril : J21



Graphe 5 : Mois de mai : J22

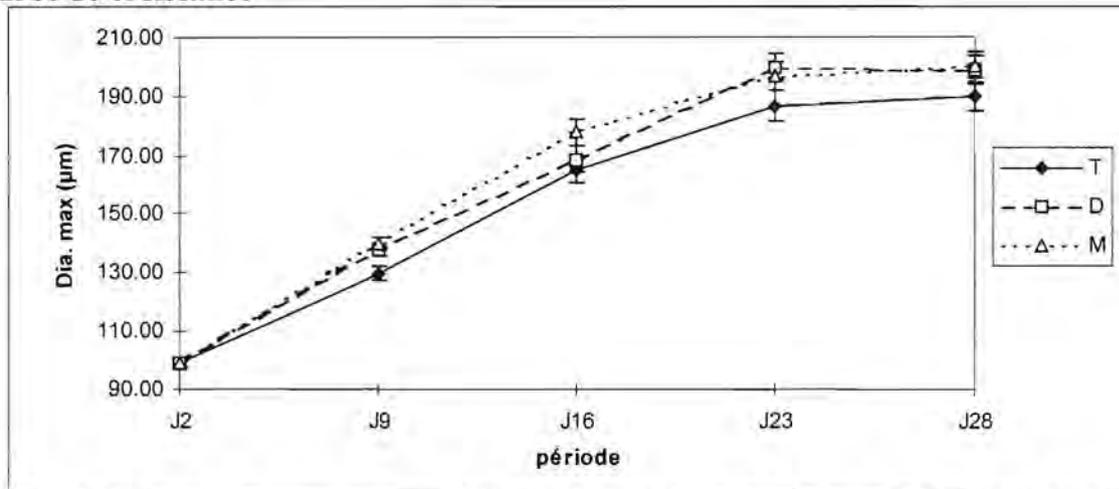


Graphe 6 : Mois d'août : J22



Les courbes de croissance (graphe 7) représentées pour le Témoin, le diuron 1 et le MCPA 1 soulignent l'effet activateur des pesticides dès le 9ème jour d'élevage (différence significative à $p=0.05$).

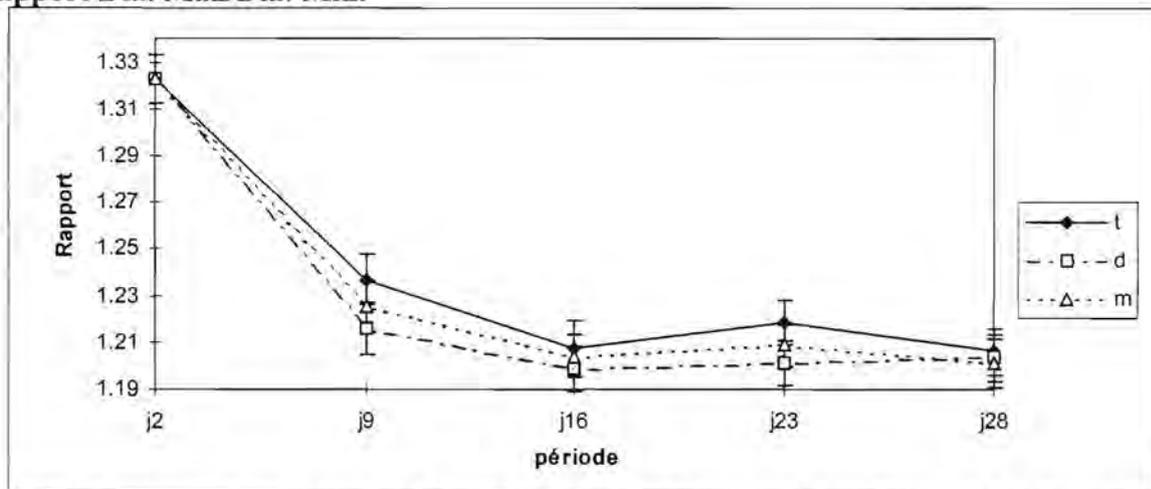
Courbe de croissance



Graphe 7 : Courbe de croissance pour l'élevage du mois d'août, à J22, pour le Témoin, le traitement Diuron 1µg/L et le traitement MCPA 1µg/L

De la même façon, les courbes représentant le rapport des diamètres maximum et minimum (graphe 8), représentés pour le Témoin, le Diuron 1 et le MCPA 1 soulignent l'effet "boullant", (c'est à dire que les larves ont une forme plus ronde, moins allongée) des pesticides, là aussi dès le 9ème jour. Cependant, les intervalles de confiance se recoupent.

Rapport Dia. Max/Dia. Min.



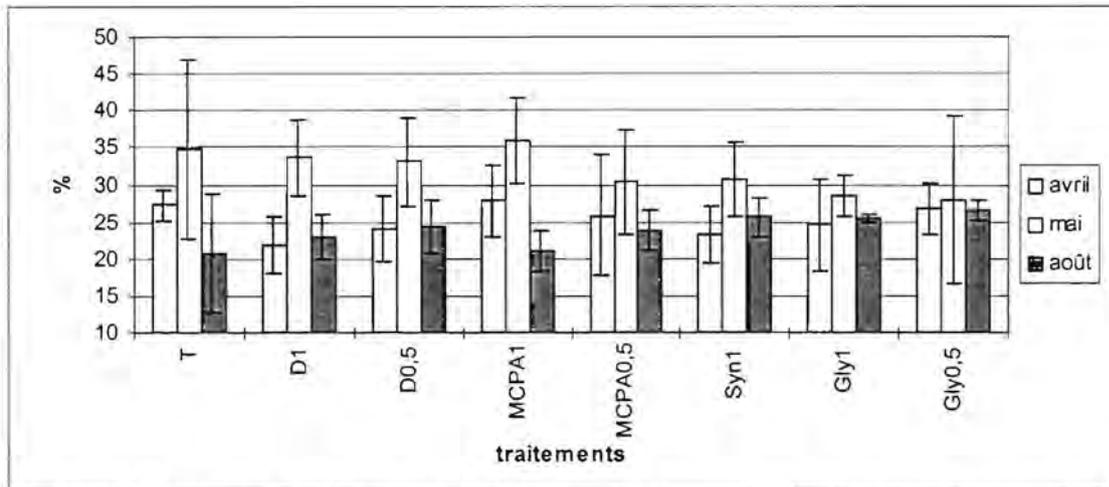
Graphe 8 : Courbe du rapport Dia. Max. / Dia. Min. pour l'élevage du mois d'août, à J22, pour le Témoin, le traitement Diuron 1µg/L et le traitement MCPA 1µg/L

2.2/ Evolution des populations larvaires

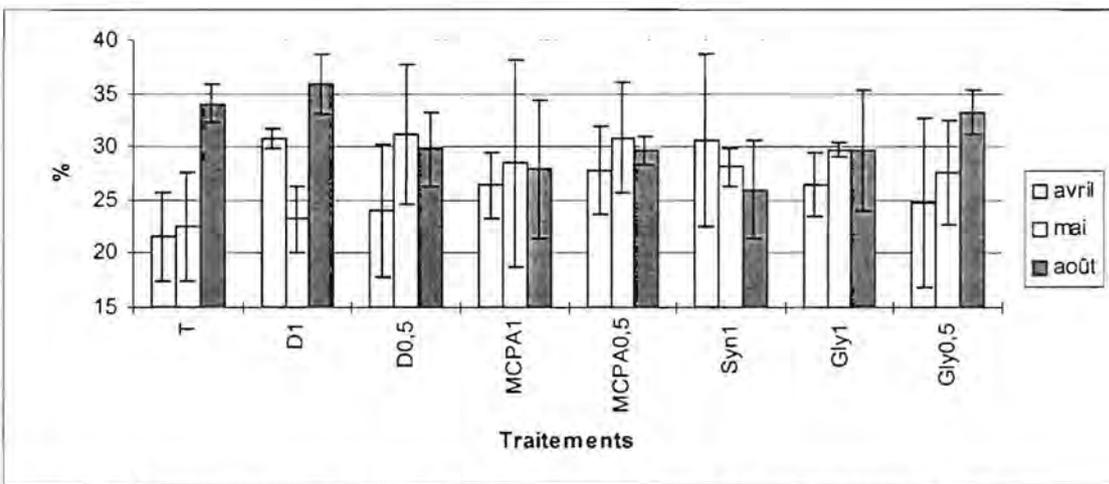
Les résultats concernant les répartitions des Larves Normales, Anormales, Double barres, mortes au cours des élevages sont présentées en annexe 5.

A titre d'exemple, les résultats à J21 sont présentés dans les graphes 9 / 10 et 11 (les intervalles de confiance ont été représentés sur chacun des histogrammes).

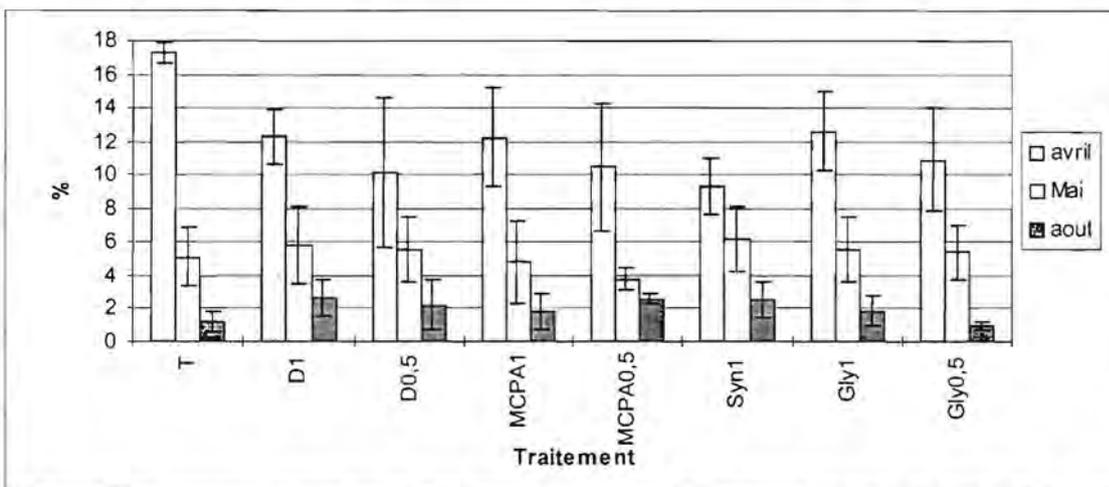
En fin d'expérience à " J28 ", de forts taux de mortalité sont observés. Les larves se retrouvent dans des conditions inadéquates à leur métamorphose. Habituellement, à l'écloserie, à cette phase de l'élevage, les larves sont transférées en cylindres tamis, en eau courante. Dans nos conditions de laboratoire, l'interprétation des différences à ce stade devient impossible.



Graph 9 : Représentation du taux de double barres, à J21, pour les mois de avril / mai et août



Graph 10 : Représentation du taux de mortalité, à J21, pour les mois de avril / mai / août



Graph 11 : Représentation du taux de larves anormales, à J21, pour les mois de avril / mai / août

2.2/ Structure cristalline

2.2.1/ Les différentes microstructures des larves et post-larves

Les larves D placées en élevage ont une coquille bivalve, constituée par la prodissoconque 1 (microstructure aragonitique granulaire) (Salaün, 94).

La croissance des valves se poursuit par l'élaboration de la prodissoconque 2 (microstructure aragonitique granulaire). Sur la coquille de cette larve véligère, des stries concentriques de croissance sont bien apparentes. L'initiation de la métamorphose se traduit par l'apparition d'une gouttière coquillière au niveau de la marge de croissance des valves, qui va permettre l'élaboration de la dissoconque de la post-larve. Cette dissoconque est constituée de cristaux calciques de différentes structures :

La couche interne des deux valves a une microstructure foliée.

Les couches externes des deux valves sont différentes : respectivement prismatique pour la valve inférieure et « gaufrée » pour la valve supérieure.

Ces différentes structures et microstructures sont représentées sur les photographies A à L.

Légende des photographies A à L.

A : Larve véligère : Vue latérale de la coquille larvaire (Observation MEB, sans attaque)

PD 1 : Prodissoconque 1

PD 2 : Prodissoconque 2 (Stries concentriques de croissance bien visibles).

B : Lave véligère : Vue dorsale de la coquille larvaire (Observation MEB, sans attaque).

PD 1 : Prodissoconque 1

PD 2 : Prodissoconque 2 (Stries concentriques de croissance bien visibles).

CH : Charnière

C : Larve véligère en début de métamorphose, détail de la gouttière associée à la double barres (Observation MEB, sans attaque).

D : Post-larve, vue ventrale (Observation MEB, sans attaque).

PD : Prodissoconque

D : Dissoconque, valve supérieure, structure gaufrée.

E : Prodissoconque 2 de larve véligère, détail de la surface externe (Observation MEB, sans attaque).

PE : Périostracum décollé de la microstructure granulaire sous-jacente.

F : Détail de la surface externe de la prodissoconque 2, microstructure granulaire. Distinction des stries de croissance (Observation MEB après attaque à l'eau de javel 48 %).

G : Dissoconque de la post-larve, valve inférieure, microstructure prismatique (Observation MEB après attaque à l'eau de javel 48 %).

PD 2 : Prodissoconque 2.

D : Dissoconque.

P : Prisme.

H : Détail de la surface externe de la dissoconque de la valve inférieure, microstructure prismatique (Observation MEB après attaque à l'eau de javel 48 %).

I : Zone de fracture au niveau de la marge ventrale de la valve inférieure. Visualisation de la microstructure foliée de la couche interne sous la microstructure prismatique de la couche externe (Observation MEB après attaque à l'eau de javel 48 %).

CF : Cristaux foliés.

P : Prismes.

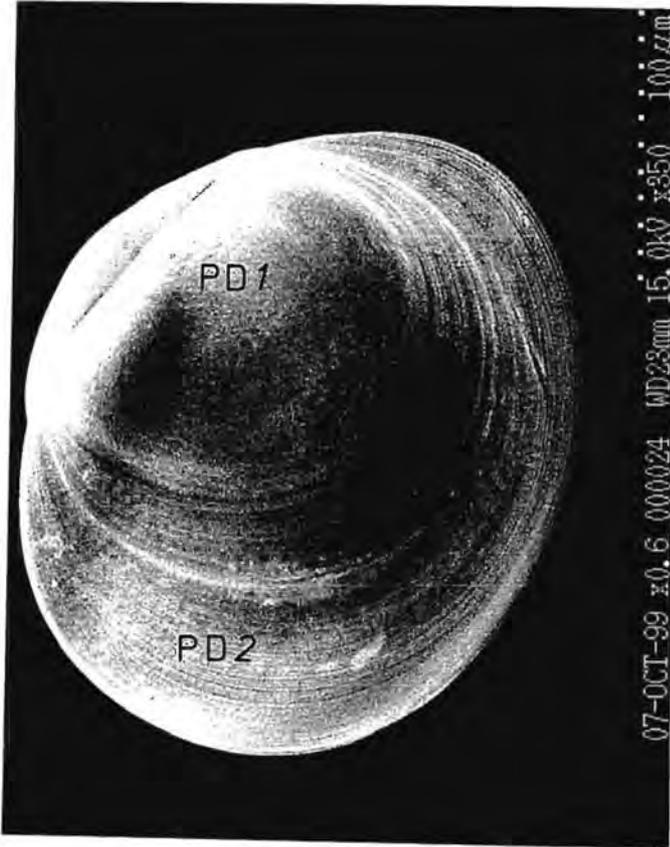
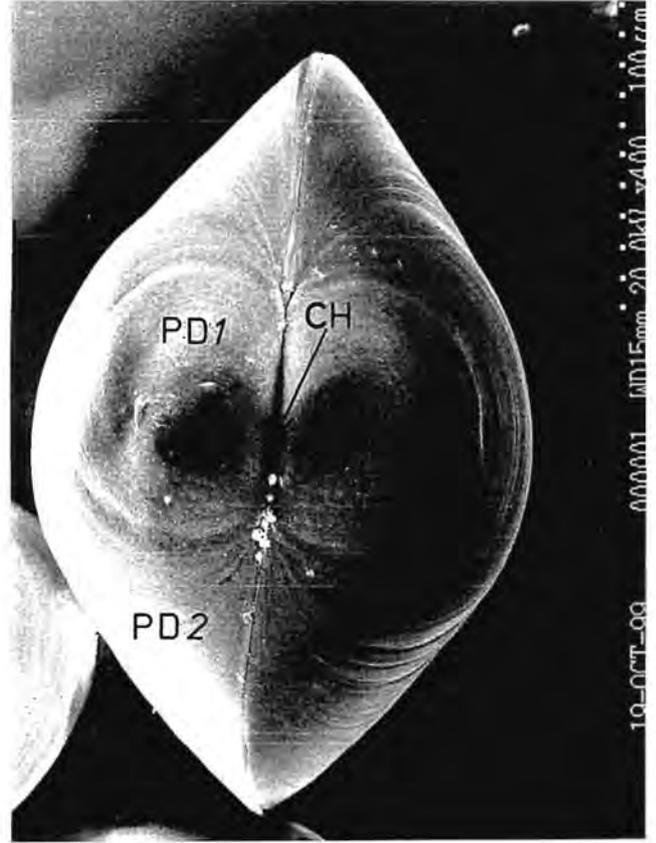
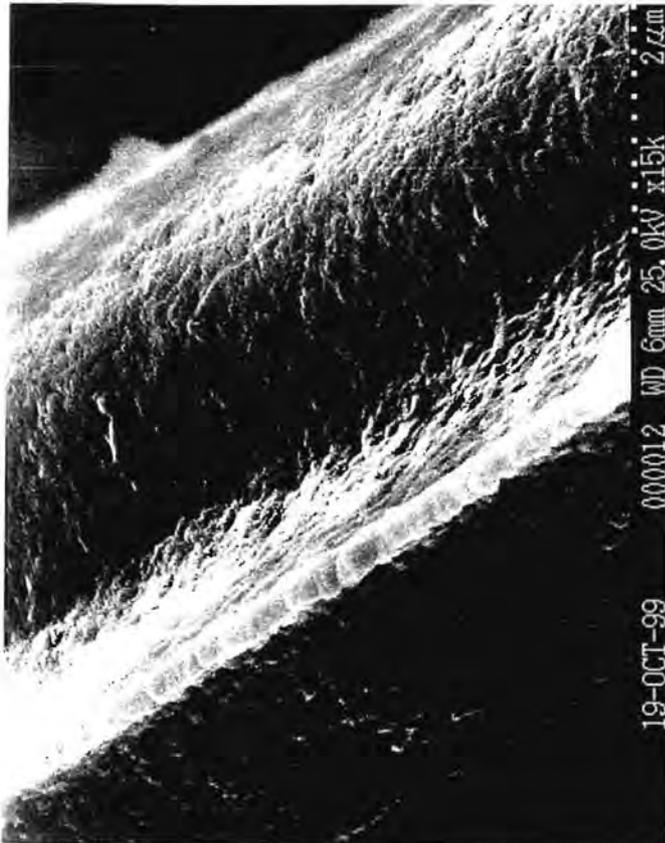
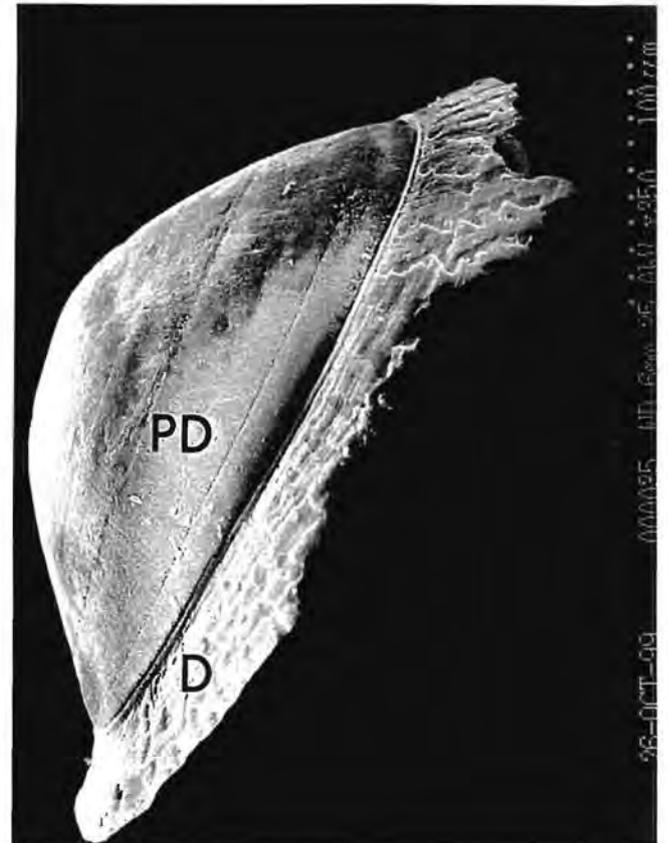
J : Détail de la surface externe de la valve supérieure. Microstructure « gaufrée ». Bonne visualisation des tries de croissance au niveau des creux (Observation MEB après attaque à l'eau de javel 48 %).

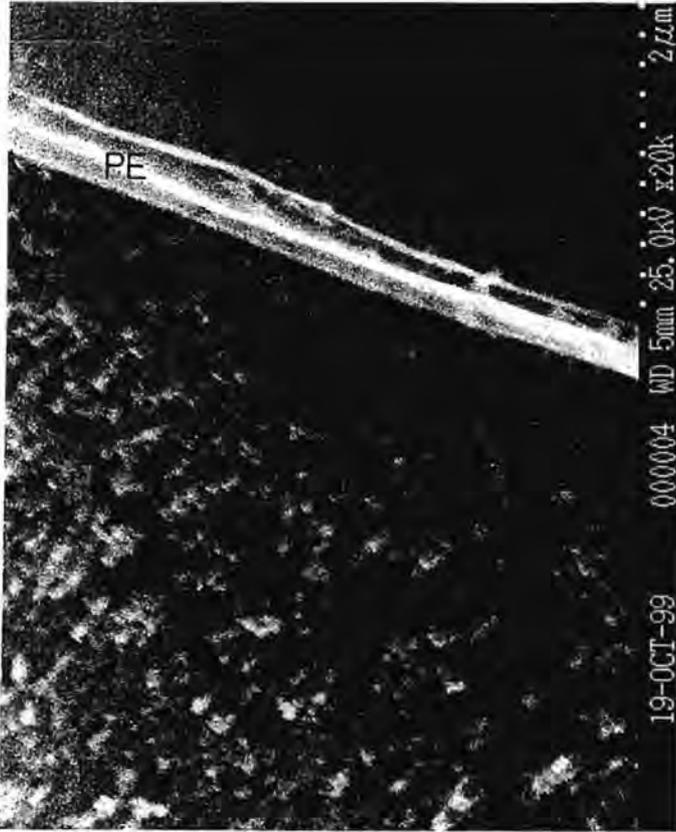
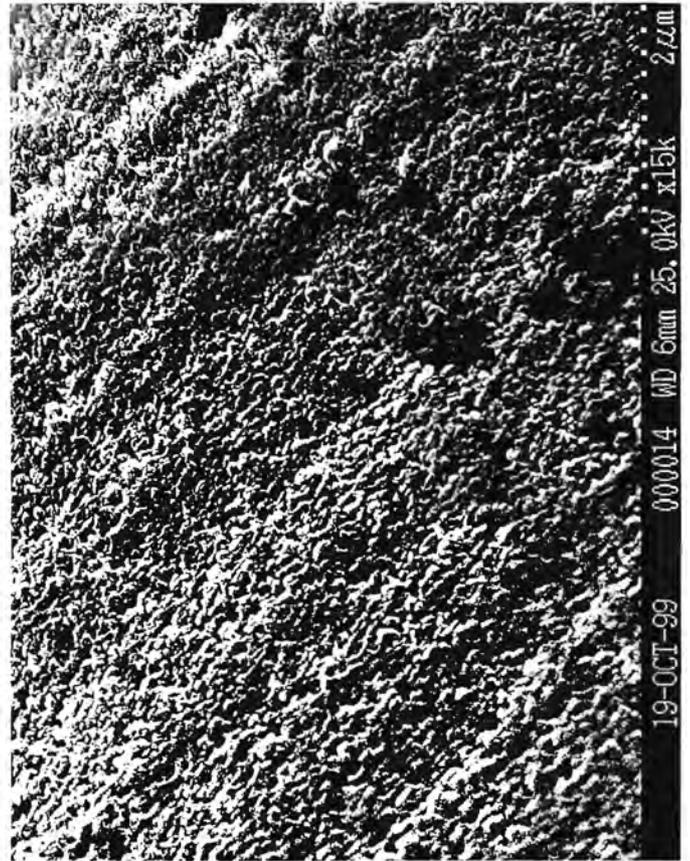
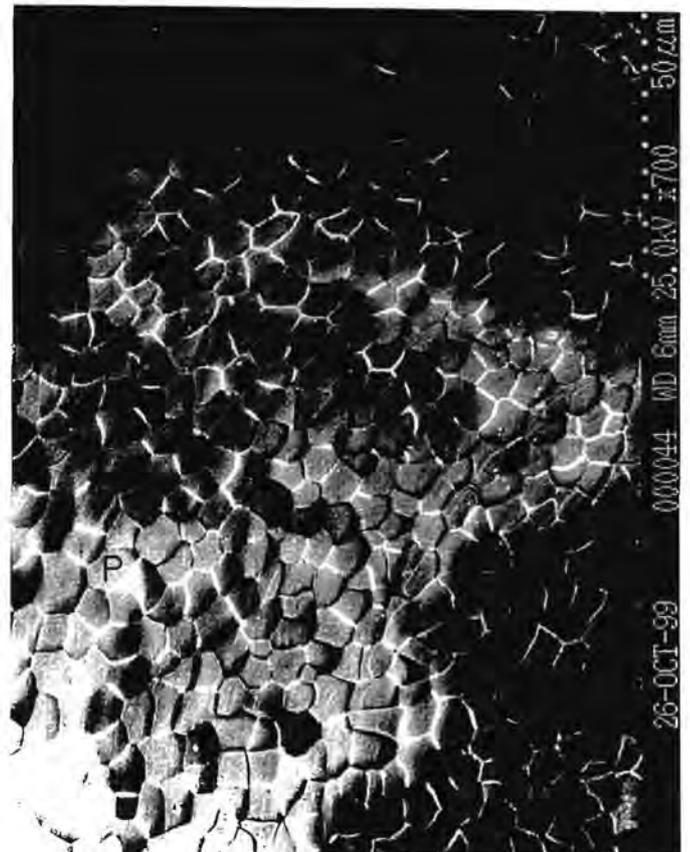
C : Creux

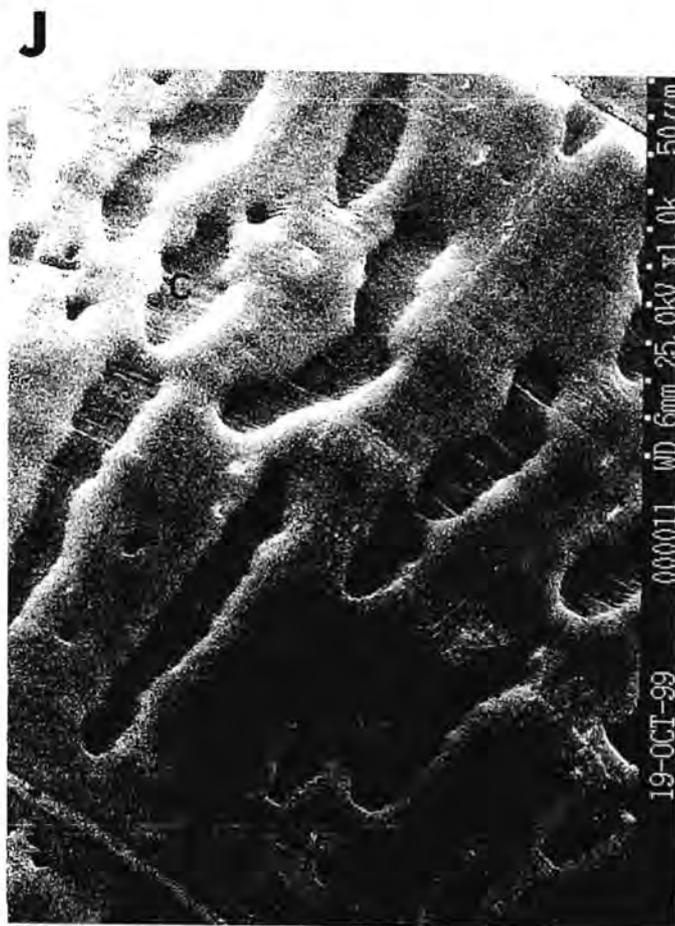
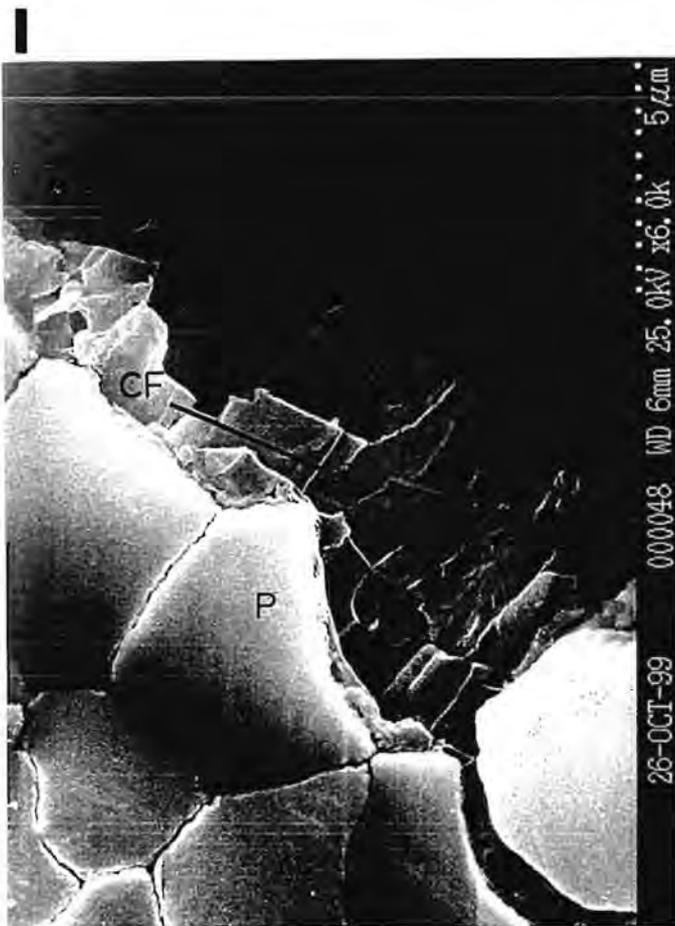
K et L : Microstructure foliée de la surface interne des deux valves de la dissoconque (Observation MEB après attaque à l'eau de javel 48 %).

K : Cristaux plus ou moins anormaux : Tailles et formes des cristaux inégales.

L : Structure normale.

A**B****C****D**

E**F****G****H**



2.2.2/ Résultats concernant les différents traitements.

Aucun résultat évident n'a été obtenu. Les microstructures granulaires, foliées, prismatiques ou gaufrées retrouvées sur les larves et post-larves témoins ou traitées aux pesticides ne présentent pas de différence apparente de structures.

Néanmoins, rappelons que les individus observés sont ceux qui ont réussi avec succès l'étape de la métamorphose, par conséquent, les individus **les plus résistants**. Il serait intéressant d'envisager d'autres protocoles utilisant ces microstructures comme indicateur écotoxicologique. Larvor (1996) a effectué ce type d'analyse sur des **juvéniles**, en baignation dans un milieu contaminé, et a pu mettre en évidence des différences entre les traitements, visualisables sur les microstructure concernées (Foliées). Dans ce sens, il serait intéressant de faire ce type d'analyse sur des post-larves mis en baignation (tests de croissance) dans un milieu contaminé durant un laps de temps suffisamment long. Il n'y aurait pas alors sélection des individus les plus résistants. Cependant ce type de test implique une infrastructure plus importante(travail en milieu ouvert ou du moins circulant imposé par la vie post-larvaire).

VERIFICATION DU SEUIL DE MORTALITE POUR LE DIURON ET LE MCPA

1/ Protocole expérimental

Ces tests ont été effectués à titre indicatif, dans le but de situer les doses théoriques testées (0,5 et 1 $\mu\text{g/L}$: doses retrouvées dans la Rade de Brest) par rapport à des seuils d'influence des produits sur la croissance ou la mortalité de mollusques marins (tableaux 2 et 3).

Les doses testées sont les suivantes.

10 / 100 / 500 et 1000 $\mu\text{g/L}$,

1 seul bécher par dose.

L'élevage est poursuivi jusqu'à la période de la métamorphose.

Des prélèvements ont été effectués tous les deux ou trois jours.

Une analyse morphométrique similaire aux analyses effectuées précédemment a été pratiquée à J22.

Une analyse de la cristallogenèse a aussi été effectuée.

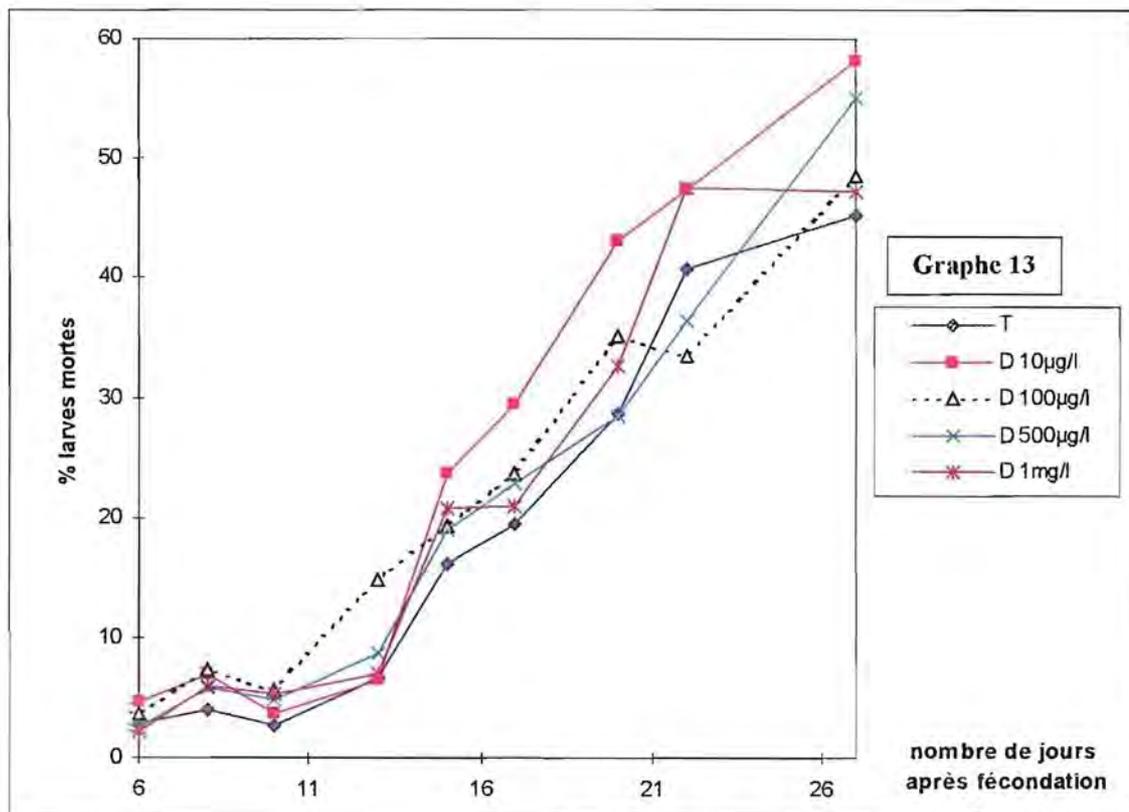
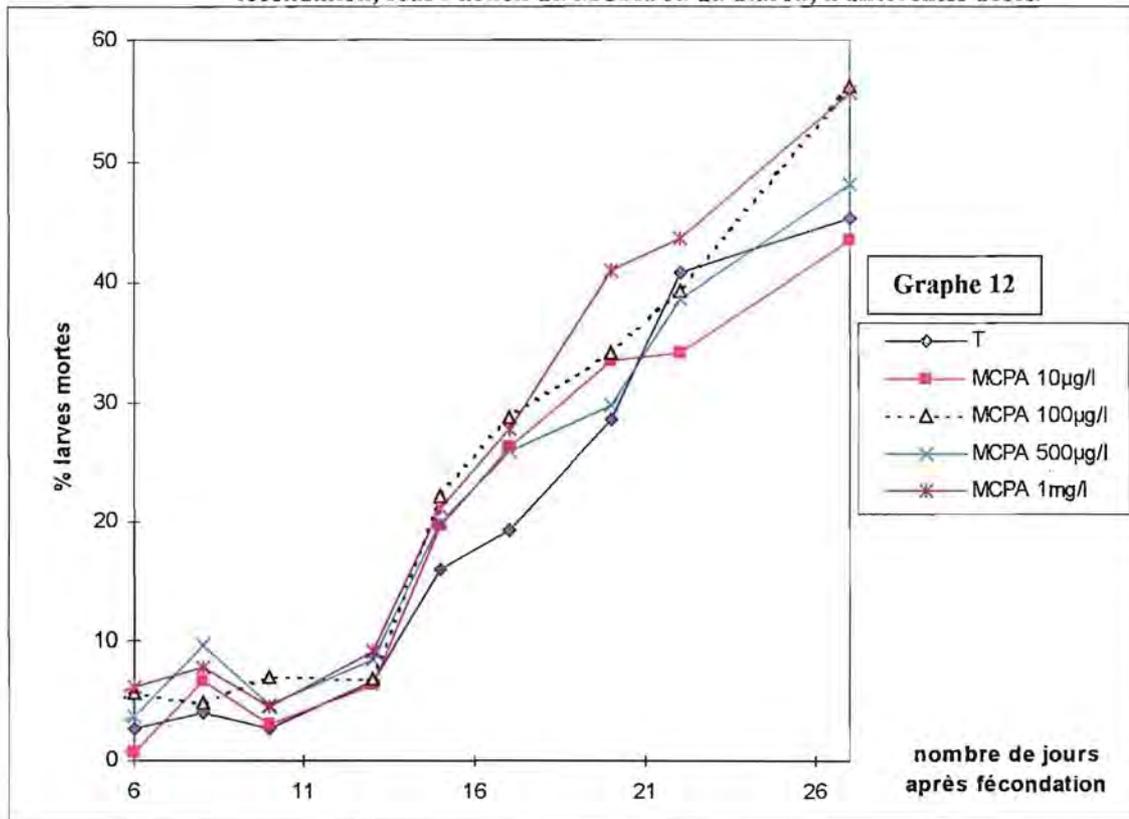
2/ Résultats

Des différences sur l'évolution du taux de double barres sont notées en fonction des différents traitements.

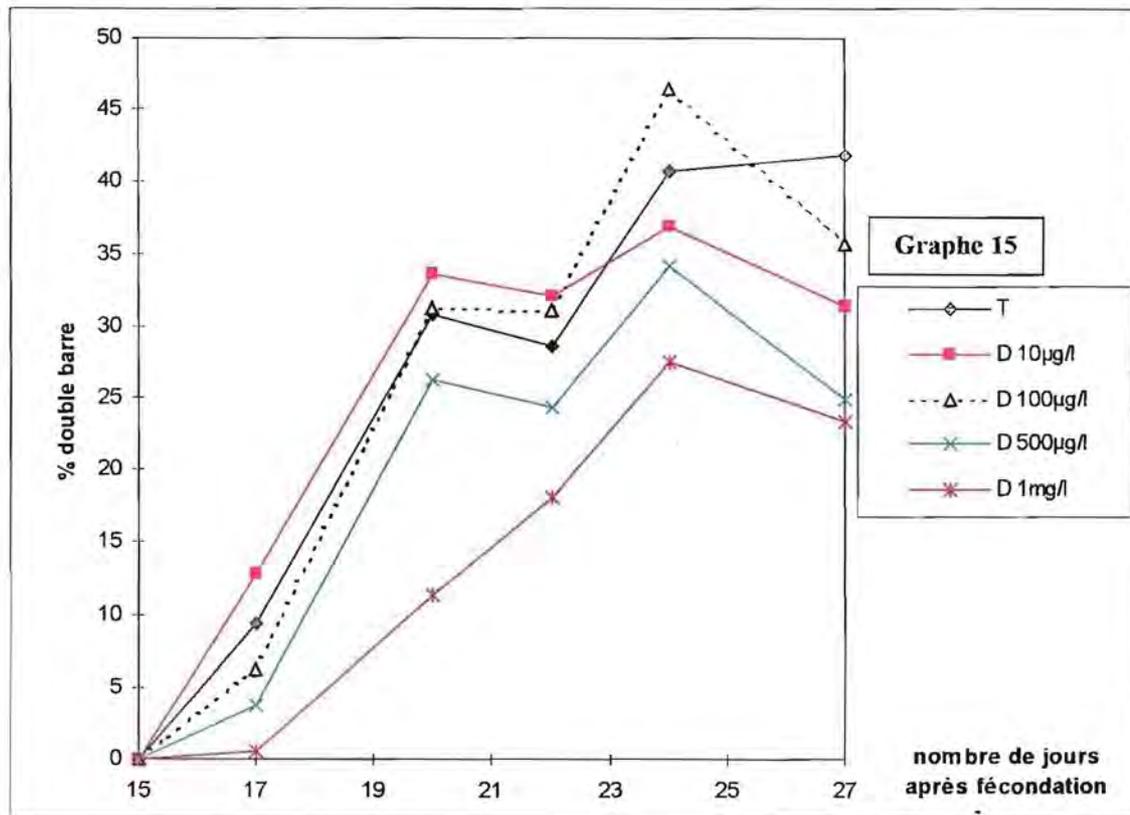
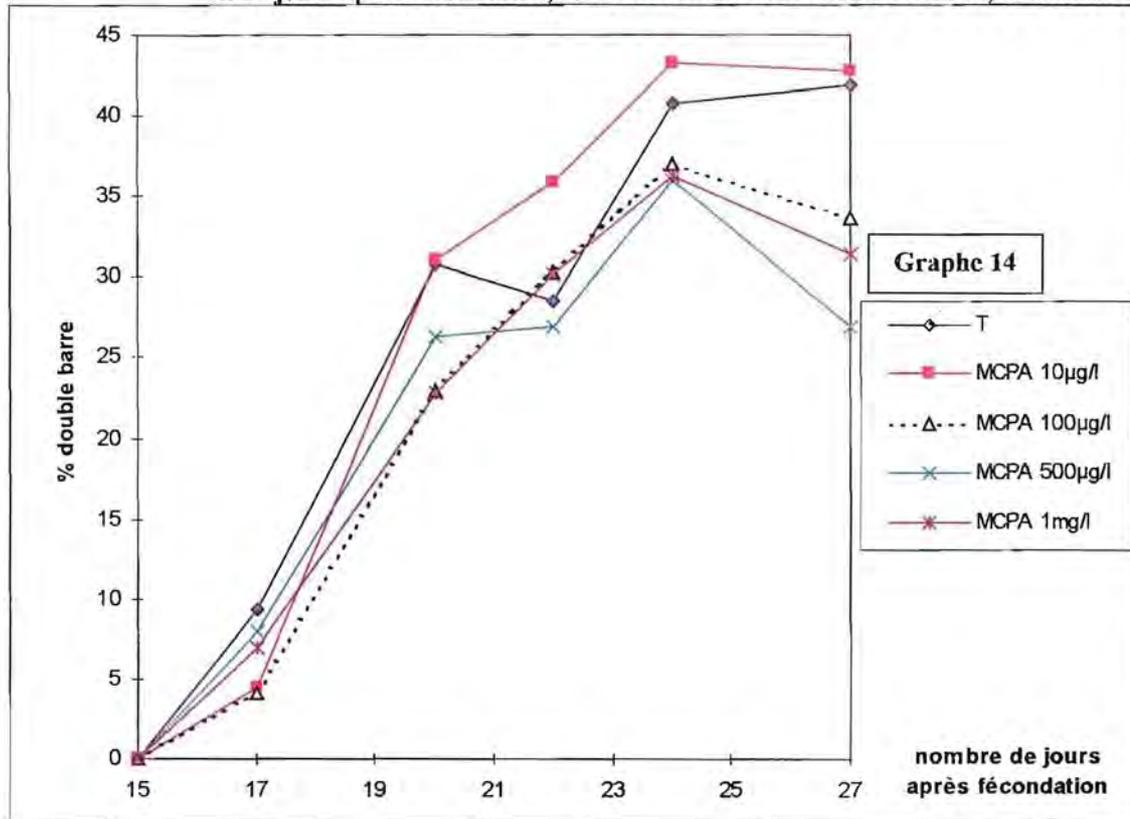
Les graphes 12 / 13 / 14 / 15 représentent des résultats préliminaires concernant l'évolution de la mortalité et l'évolution du nombre de double barres.

Comme dit précédemment, aucun résultat apparent n'a été mis en évidence par cristallogenèse.

Graphes 12 et 13 : Représentation respective de l'évolution du taux de mortalité, de 6 à 27 jours après fécondation, sous l'action du MCPA ou du diuron, à différentes doses.



Graphe 14 et 15 : Représentation respective de l'évolution du taux de larves au stade double barre, de 15 à 27 jours après fécondation, sous l'action du MCPA ou du Diuron, à différentes doses.



TESTS DE REFIXATION DES POST-LARVES EN PRESENCE DE PESTICIDES

1/ Protocole expérimental

Afin de tester la qualité du byssus et sa régénération pour la refixation, les mêmes produits que ceux utilisés pour l'élevage larvaire aux mêmes doses ont été testés en système fermé : boîtes de pétri (12x12x1,2 cm) (trois répliquats par produit et par dose).

Les larves devant servir à l'expérience sont prélevées dans un cylindre-tamis, au pinceau et mises en suspension dans l'eau. Immédiatement après, 100 à 300 larves sont réparties dans chaque boîte et conservées 5 heures pour vérifier le taux de refixation.

A l'issue de cette période, chaque boîte subit le traitement suivant :

Après comptage précis de toutes les larves présentes, un rinçage doux est effectué à la pissette, de façon à évacuer délicatement les larves non fixées, sans décoller les individus fixés. Un second comptage est alors effectué. Puis le taux de refixation est calculé :

$$(100 \times \text{Nombre de larves fixées} / \text{Nombre total de larves}).$$

2/ Résultats

Une seule expérience de ce type a été pratiquée. Elle a été effectuée en période estivale avec de fortes températures (> 23 °C). Les résultats obtenus ne sont pas satisfaisants, sans doute dû au fait de l'impossibilité de thermoréguler l'eau de mer des boîtes de pétri. L'optimum de température à cette période du développement de la coquille Saint-Jacques se situant à 16/17 °C, la trop forte chaleur a nui à l'expérimentation.

D'autres expérimentations avaient été envisagées à des températures plus conformes aux référendum thermique de la coquille Saint-Jacques. Cependant, ces expériences n'ont pu être menées pour diverses raisons biologiques.

DISCUSSION

Les expérimentations réalisées sur le développement précoce de la coquille Saint-Jacques *Pecten maximus* ont révélé les **effets nocifs des pesticides à différentes phases de l'ontogénèse**. Ces actions sont enregistrées à des **doses faibles (de 0.1 à 1 µg/L)** tout à fait en rapport avec les concentrations retrouvées en Rade de Brest en milieu marin (Thomas *et al.* 1997). Comme cela a été présupposé dans les perspectives de recherche à l'initiative de ce contrat, les pesticides - Diuron, MCPA, Glyphosate - retrouvés dans la Rade, même à faibles doses, peuvent être responsables, d'une part, des fluctuations du recrutement naturel et par conséquent de l'état des stocks, et d'autre part, des difficultés d'élevage rencontrées en éclosion à certaines périodes de l'année.

Les travaux d'écotoxicologie sur les animaux marins effectués jusque là montrent que seules les concentrations de l'ordre de 0.1 mg/L ou supérieure (pour les produits considérés ou des pesticides apparentés (Cf. page 14 et 15)) ont une action effective. Cependant, les travaux de Larvor (1996) ont montré des actions sublétales sur des juvéniles de *Pecten maximus* à des doses proches (5 à 10 µg/L) de celles testées ici. La coquille Saint-Jacques est considérée comme une espèce très sensible (Glémarec *et al.* 1995), elle est donc d'autant plus vulnérable. Les pesticides à faible concentration ont, chez cette espèce, un effet sans doute plus marqué que chez d'autres invertébrés marins comme l'oursin ou l'huître (His *et al.* 1999).

L'ensemble de ces expériences a concerné la phase pélagique de la coquille, phase de vie libre où l'animal est particulièrement sujet aux variations de la qualité des eaux de surface. Du fait de la configuration géographique et de la circulation des eaux dans cette baie, cette phase pélagique constitue le stade de développement le plus sensible aux apports d'eau douce des bassins versants et à leur cortège de produits dissous. Si le recrutement dans les zones très littorales de la Rade est alors probablement très dépendant des variations climatiques, le recrutement dans les zones plus profondes et plus marines peut également être affecté.

Les travaux effectués soulignent des effets à deux niveaux du cycle de développement :

- **Un impact décisif sur le développement embryonnaire et l'organogénèse larvaire**
- **Des effets moins tranchés sur la croissance larvaire.**

Impact des pesticides sur le développement embryonnaire et l'organogénèse larvaire

Les tests effectués sur la première phase de l'élevage - de l'œuf fécondé à la larve D - révèlent des effets observables sur la segmentation de l'œuf, à forte dose, sur l'organogénèse larvaire quelle que soit la concentration, notamment sur l'organogénèse du velum et de la coquille. L'augmentation de la quantité d'œufs non développés et de larves anormales conduit à **un abaissement moyen du taux d'éclosion de 10 % (Glyphosate 0,1 µg/L) à près de 60 % (Synergie 1 µg/L)**. Cet effet sur le recrutement larvaire peut être une des raisons des problèmes de recrutement rencontrés dans le milieu naturel.

Concernant cet effet, le **Diuron et le MCPA semblent être les plus toxiques**. Le glyphosate a un impact moindre. Il faut cependant souligner que les effets les plus marqués sont obtenus par l'action synergique du Diuron et du MCPA, même à faible concentration (0,5 µg/L). C'est en fait ce qui se passe en milieu naturel où les apports sont simultanés et où les produits agissent le plus souvent en synergie.

A cet effet « produit » peut être relié un effet « dose » : **les concentrations les plus fortes produisant les effets les plus importants**. *Il serait ici intéressant d'élargir la gamme de concentrations à expérimenter, notamment en testant des doses plus faibles et des synergies, afin de déterminer plus finement le seuil d'impact des produits concernés.*

Il est de plus nécessaire de souligner l'existence d'un effet femelle incontournable sur le taux d'éclosion. Ce dernier est très variable (entre 15 et 80 %) et a déjà été mis en évidence chez cette espèce (Casse 1995). Dans des expériences ultérieures, il faudrait peut-être envisager d'éliminer de l'analyse les femelles présentant les taux d'éclosion trop faibles (< 30%).

L'ensemble de ces résultats laisse envisager des perspectives de recherches intéressantes :

Sur la base de protocoles de manipulations identiques, il serait intéressant de :

- * *comparer des femelles naturelles à des femelles conditionnées.*
- * *élargir les gammes de concentrations testées et d'envisager d'autres synergies pouvant correspondre aux données enregistrées dans l'eau de mer.*
- * *tester d'autres toxiques (pesticides, métaux lourds,...).*
- * *croiser les effets toxiques avec des facteurs naturels pouvant leurs être associés (Température, salinité, oxygénation de l'eau, rythmes nyctéméraux...).*

Sur la base d'un développement de nouveaux protocoles, il serait intéressant de :

- * *suivre le développement précoce, en milieu sain ou contaminé, après balnéation des ovocytes en milieu contaminé.*
- * *envisager des tests écotoxicologiques avec des conditions plus draconiennes de façon à vérifier les sites cellulaires et les phases de développement affectés par les différents toxiques (Pesando, 1995) ainsi que cela a été étudié chez l'oursin *Paracentrotus lividus*.*

Impact sur la croissance larvaire

Les tests effectués sur la phase de croissance larvaire révèlent des effets moins tangibles, observables seulement en période estivale. La larve est alors sujette à des stress environnementaux naturels : température de l'eau élevée, qualité de l'eau affectée par des blooms phytoplanctoniques, oxygénation, charge en matière organique,... C'est peut-être ce qui explique sa plus forte sensibilité à cette saison. Sa croissance est d'ailleurs moins forte à cette période (diamètre maximal au mois d'avril : 174,73 µm - diamètre maximal au mois de mai : 172,73 µm - diamètre maximal au mois d'août : 163,54 µm). D'autres facteurs, plus intrinsèques peuvent également avoir affecté indirectement la qualité de l'élevage. La qualité des gamètes n'est peut être pas la même en période estivale. A cette fin, il serait intéressant de conditionner des géniteurs en milieu toxique, dans le but de suivre la gamétogenèse.

Durant ces expériences, aucun effet léthal n'a pu être mis en évidence (de 0,25 µg/L à 1 mg/L). Cette phase de croissance larvaire est généralement moins sensible à l'action des pesticides (Cf. pages 14 et 15) que les phases d'organogenèse. On ne note pas d'effet majeur sur la morphologie et la croissance des larves dans les élevages du mois d'avril et du mois de mai.

Cependant, les tests effectués au mois d'août révèlent des résultats intéressants. Tous les pesticides aux doses étudiées engendrent un **effet Hormèse** (activateur de croissance) significatif ou non. Cet effet est significatif pour le Glyphosate 0,5 / le Diuron 1 et le MCPA 0,5 µg/L. Il est également **rapide** car observable dès le 9ème jour d'élevage.

Des **changements de morphologie** sont également observés. Les pesticides conduisent au développement de larves plus ramassées (forme « boule »), phénomène traduit par la réduction du rapport du diamètre maximum sur le diamètre minimum. Salaün (1994) a observé ce phénomène dans des lots de larves de *Pecten maximus* à croissance faible, associé à des malformations de valve. Il se traduit par une augmentation de la largeur de la coquille.

Les effets inhibiteurs des pesticides sur le développement de la double barres et donc l'initiation de la métamorphose, ne sont enregistrés qu'à des doses relativement fortes (MCPA 0,1 / 0,5 / 1mg/L et Diuron 0,5 / 1 mg/L).

L'ensemble de ces résultats mériterait confirmation et laisse envisager des perspectives de recherche à approfondir :

Sur la base de protocoles de manipulations identiques, il serait intéressant de :

- * *Reprendre les manipulations en période estivale (période de stress) afin de vérifier les résultats obtenus.*
- * *Combiner des stress naturels (température, salinité,...) aux produits toxiques à différentes périodes de l'année.*

La phase larvaire s'achève par la métamorphose qui nécessite des conditions d'élevage très particulières et des adaptations zootechniques. Les moyens d'élevage mis en œuvre ne permettaient pas d'envisager des tests écotoxicologiques sur cette phase du développement (métamorphose et phase post-larvaire). C'est pourtant une phase critique d'organogenèse et de changement de mode de vie (fixation) potentiellement plus sensible aux conditions environnementales toxiques que la phase de croissance larvaire pure. Cette étape mériterait certainement d'autres investigations grâce au développement de nouveaux moyens d'élevage.

Sur la base d'un développement de nouveaux protocoles, il serait judicieux :

- * *D'observer les capacités de métamorphose après un élevage larvaire en conditions toxiques et transfert en milieu ouvert sain.*
- * *De développer un système zootechnique de re-circulation de l'eau en circuit fermé et d'observer la métamorphose en milieu toxique.*
- * *De tester la fixation, la défixation et la re-fixation de post-larves (déjà métamorphosées) en contact avec différents toxiques, donc la capacité de l'animal à sécréter un byssus de bonne qualité.*

L'étude de la cristallogenèse larvaire en présence des pesticides ne révèle pas d'effet clairement identifiable. La morphologie des valves et de la charnière ne change pas. Des modifications dans le réseau micro structural granulaire de la larve (prodissoconques 1 et 2) sont difficiles à visualiser et à interpréter. L'observation de la microstructure foliée de la dissoconque des post-larves est plus aisée, mais elle implique la sélection des meilleurs individus de chaque lot (croissance optimale et succès de la métamorphose dans des conditions inappropriées) et engendre donc un biais dans l'analyse. Il serait plus judicieux d'utiliser ce critère de diagnostic pour des tests de croissance de post-larves en milieu toxique, ou pour l'observation de l'organogenèse de la coquille de la larve D (véligère).

BIBLIOGRAPHIE

- Boucher et Fifas, 1995.** Dynamique de la population de coquilles Saint-Jacques (*Pecten maximus*) de la Rade de Brest. Hier était-il différent d'aujourd'hui ? Rapport du contrat de Baie, Rade de Brest, Troisièmes Rencontres scientifiques Internationales. Vol. 2 : 12 pp.
- Butler P.A. 1963.** Circ. Fish. Wildl. Serv., Wash., 167 : 11-25.
- Butler P.A. 1964.** Circ. Fish. Wildl. Serv., Wash., 199 : 5-28.
- Cadour, 1995.**
- Casse N. 1995.** Eléments d'embryologie de *Pecten maximus* L. (Mollusque bivalve). Thèse de Doctorat d'Université, Université de Bretagne Occidentale, I : 109pp, II : 32 planches.
- Cochard J.C. et Gérard A. 1987.** Production artificielle de naissain de Coquille Saint-Jacques *Pecten maximus* L. en Rade de Brest : Analyse des facteurs affectant la croissance larvaire. Sixth International Pectinid Workshop., Menai Bridge , UK.13pp
- Dao J.C., Fleury P.G. et Paquette P. 1992.** Eléments de réflexion, pour l'évaluation économique de la filière d'élevage de la coquille Saint-Jacques. Rapport IFREMER N° DRV92.001-RA, Brest, 60 pp.
- Davies H.C. 1961.** Comm. Fish. Rev., 23(12) : 8-23.
- Davies H.C. et Hidu H. 1969.** Fisheries Bull. Fish. Wild l. Serv. U.S., 67 : 393-404.
- Devauchelle N., Barret J. et Salaun G., Coord. 1997.** Groupe de travail sur la reproduction naturelle et contrôlée des bivalves cultivés en France, Nantes (France), IFREMER, rapport interne DRV97-11-RA/RST/Brest : 217 pp.
- Dorange G. 1989.** Les gamètes de *Pecten maximus*L. (Mollusca Bivalvia). Thèse de Doctorat, Université de Bretagne Occidentale, I : 133pp, II : 33 planches.
- Eisler R. 1992.** Diflubenzuron Hazard to Fish, Wildlife and Invertebrate : a Synoptic review. Contaminant Hazard review report, 25 : 36pp.
- Faure C. 1996.** Paramètres physiologiques de l'émission et de l'activation des gamètes mâles de deux mollusques bivalves : la coquille Saint-Jacques *Pecten maximus* (L.) et l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Thunberg). Thèse de doctorat d'Université, Université de Paris VII. 254 pp.
- Glémarec M., Grall J. & Dao S., 1995.** Bioévaluation des structures benthiques dans la Rade de Brest. Rapport du Contrat de Baie, Rade de Brest, Troisièmes rencontres scientifiques internationales, 1 : 16pp.
- Hashimoto Y. et Nishiuchi Y. 1982.** Pesticide chemistry : human welfare and the environment. Proceedings of the 5th int. congress of pesticide chemistry, Kyoto, Japan 1982. Eds Miyamoto J. *et al.* Vol. 2 : 355-358.
- His E., Heyvang I., Geffard O. & de Montaudouin X. 1999.** A comparison between oyster (*Crassostrea gigas*) and sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larval bioassays for toxicological studies. Water research 33(7) : 1706-1718.
- His E. et Seaman M.N.L. 1993.** Effects of twelve pesticides on larvae of oysters (*Crassostrea gigas*) and on two species of unicellular marine algae (*Isochrysis galbana* and *Chaetoceros calcitrans*). ICES C.M. / E : 22. International council for the exploration of the sea. Marine environmental Quality committee. 8pp
- Larvor H. 1996.** La biominéralisation de *Pecten maximus* L. : anomalies liées aux perturbations du milieu. Thèse de Doctorat d'Université, Université de Bretagne Occidentale, 296pp.

- Le Pennec M. 1974.** Morphogenèse de la coquille de *Pecten maximus* élevé au laboratoire. Cahiers de Biologie Marine, XV : 475-482.
- Liu H.W. et Lee M. 1975.** Toxicity of selected pesticides to the bay mussel *Mytilus edulis*, Washington D.C., US, Departement of Commerce, National technical information service, (NTIS report PB-243 221).
- Machado J., Coimbra J., Castilho F. et Sa C. 1990.** Effet of Diflubenzuron on shell formation of the Freshwater clam, *Anodonta cygnea*. Arch. Envir. Contam. Toxicol. 19 : 35-39.
- Mayer F.L. 1987.** Acute toxicity handbook of chemicals to estuarine organisms, Washington D.C., US, Departement of the interior Fish and Wildlife service, 506pp, (Ressource publication 160)
- Menzie C.M. 1979.** Fish and Wildlife service, Parks, and Marine Ressources. Departement of the Interior Bureau of Sport Fisheries an Wildlife. Washington D.C.
- Nebeker A.V. et al. 1983.** Environ. Toxicol. Chem. 2 : 329-336.
- Pesando D., Dominice C., Dufour M.N., Guillon G., Jouin P. et Ciapa B. 1995.** Effect of nordidemnin on the cell of the sea urchin embryos. Rôle in synthesis and phosphorylation of proteins and in polyphosphoinositide turnover. Exp. Cell Res. 220 : 18-28.
- Robert R., Miner P., Mazuret M., et Connan J.P. 1994.** Ecloserie expérimentale de Mollusques d'Argenton, bilan et perspectives. Equinoxe 49 : 20-33.
- Salaün M. 1994.** La larve de *Pecten maximus*, genèse et nutrition. Thèse de Doctorat d'université. 242pp.
- Thomas S. Douy B. et Durand G. 1997.** Suivi des pesticides en Rade de Brest et sur son bassin versant, Année 1996, Communauté Urbaine de Brest, Service Rade de Brest. 99pp.
- Vershueren K. 1983.** Hand book of environmental data on organic chemicals. 2nd edition . Van Nostrand Reinhold Co., New York, NY.
- Widowati I. 1991.** Etude du trajet ovocytaire chez *Pecten maximus* lors de la ponte et de la maturation ovocytaire chez *Pecten maximus* et *Crassostrea gigas*. DEA d'Océanologie Biologique et Environnement Marin, Université de Bretagne Occidentale, 30pp.

Annexe 1 : Protocoles de fécondation et de prélèvement des œufs

Les géniteurs sont conditionnés à l'écloserie (2 à 3 mois, 14°C, photopériode croissante) ou prélevés en mer (en période estivale).

L'émission des œufs est induite par une stimulation des géniteurs par chocs thermiques. La température de l'eau de mer est élevée de 12-14 °C à 20°C en une dizaine de minutes. Les animaux sont alors maintenus en circuit ouvert, à 20°C. En fonction des réponses obtenues, des variations du débit de l'eau peuvent être opérées.

Les individus qui émettent des ovocytes sont rincés, et isolés individuellement dans des béciers de 2 litres pendant quelques minutes, jusqu'à ce qu'ils aient émis 4 à 5 jets d'ovocytes, puis ils sont transférés dans d'autres containers.

Les individus qui émettent du sperme demandent moins de vigilance, ils sont également isolés dans des béciers.

Sachant qu'un même animal peut émettre successivement du sperme, puis des ovocytes (ou l'inverse) au cours d'une même stimulation, il faut être très vigilant lors de la sélection des gamètes, et changer régulièrement les animaux de bécier afin d'éviter des autofécondations.

La fécondation a lieu par mise en contact des ovocytes avec un pool de spermes émis par plusieurs mâles choisis pour la bonne mobilité de leurs spermatozoïdes. On évite la polyspermie en ajustant la concentration du sperme à un nombre de 10 spermatozoïdes visibles au microscope autour de l'œuf.

Les œufs fécondés sont ensuite incubés à 18°C dans des cylindres à fond conique sous bullage d'air comprimé, pendant 2 jours.

Annexe 2 : Concentrations des pesticides (Diuron et MCPA) analysés dans les échantillons d'eau

(Analyses réalisées au cours des différentes expérimentations)

		Concentration retrouvée en µg/L dans les eaux de mer des expériences réalisées	
Expérimentation du mois de Mars - Avril			
Concentration théorique (µg/L)	Diuron	0,5	1
	31-mars	0,46	
	02-avr	0,52	0,98
	05-avr	0,71	1,06
	07-avr	0,57	
	09-avr		1,14
	12-avr	0,47	
	14-avr	0,33	1,13
	16-avr	0,5	1,08
	19-avr	0,44	
Expérimentation du mois de Mai			
Concentration théorique (µg/L)	Diuron	0,5	1,03
	<i>04-mai</i>	<i>0,66</i>	<i>1,28</i>
	07-mai	0,68	1,29
	10-mai		1,24
	Syn 05 mai		1,31
	Syn 07 mai		1,24
	Syn 10 mai		1,23
	Syn 12 mai		1,2
	Syn 14 mai		1,57
	Syn 17 mai		1,15
Expérimentation du mois de Juin			
Concentration théorique (µg/L)	Diuron	0,51	1,03
	<i>Syn 06 juin</i>		<i>0,925</i>
	<i>09-juin</i>	<i>0,35</i>	<i>0,76</i>
Concentration théorique (µg/mL) de la solution mère		17,28	
Concentration réelle* (µg/mL) de la solution mère		18,7	
Expérimentation du mois d'Août			
Concentration théorique (µg/L)	Diuron	0,55	1,18
	<i>05-août</i>	<i>0,434</i>	<i>0,876</i>
	<i>13-août</i>		<i>0,875</i>
	<i>13-août</i>		<i>1,005</i>
Concentration théorique (µg/mL) de la solution mère		17,3	
Concentration réelle* (µg/mL) de la solution mère		18,32	

En italique sont mentionnées les concentrations déterminées par le Laboratoire d'Analyses de Brest Océan

* : Concentrations déterminées par HPLC.

Concentration retrouvée en µg/L
dans les eaux de mer des
expériences réalisées

Expérimentation du mois de Mars - Avril				
Concentration théorique (µg/L)	MCPA	0,5	1	
	31-mars	0,31		
	02-avr	0,37	0,61	
	05-avr	0,34	0,63	
	07-avr		0,5	
	09-avr	0,38	0,51	
	12-avr		0,77	
	14-avr	0,33	0,83	
	16-avr	0,34	0,59	
	19-avr	0,41	0,66	
Expérimentation du mois de Mai				
Concentration théorique (µg/L)	MCPA	0,53	1,04	
	<i>04-mai</i>	<i>0,15</i>	<i>0,48</i>	
	07-mai	0,27	0,66	
	10-mai	0,15		
	12-mai		1,85	
	14-mai		1,6	
	17-mai		1,18	
	Syn 05 mai		0,68	
	Syn 07 mai		0,63	
	Syn 10 mai		0,64	
	Syn 12 mai		0,61	
	Syn 14 mai		0,63	
	Syn 17 mai		0,54	
	Expérimentation du mois de Juin			
	Concentration théorique (µg/L)	MCPA	0,53	1,04
<i>Syn 06 juin</i>			<i>1,34</i>	
<i>09-juin</i>		<i>0,37</i>	<i>0,81</i>	
Concentration théorique (µg/mL) de la solution mère			17,62	
Concentration réelle* (µg/mL) de la solution mère			18,72	
Expérimentation du mois d'Août				
Concentration théorique (µg/L)	MCPA	0,23	0,48	
	<i>04-août</i>	<i>< 0,05</i>	<i>< 0,05</i>	
	<i>13-août</i>		<i>0,16</i>	
	<i>13-août</i>		<i>< 0,05</i>	
Concentration théorique (µg/mL) de la solution mère			13,2	
Concentration réelle* (µg/mL) de la solution mère			6	

En italique sont mentionnées les concentrations déterminées par le Laboratoire d'Analyses de Brest Océan.

* : Concentrations déterminées par HPLC.

Annexe 3 : Protocole de fixation et de coloration au Hoechst

Coloration au Hoechst 33258 (bisbenzimidide hoechst 33258 trihydrochloride)

PREPARATION DES PRODUITS NECESSAIRES

*** Tampon GA** conserver au frigo

			<u>pour 1 L</u>	<u>pour 500 mL</u>
N-methylglucamine	195.2 TA	250mM	48.80g	24.40g
K-gluconate (D-gluconic Acid)	234.2 TA	250mM	28.55g	14.225g
HEPES	238.3 TA	50mM	11.91g	5.955g
EGTA	380.4 TA	10mM	3.80g	1.90g

Ajuster à pH 7.4 avec de l'acide acétique glacial
soit environ 5 à 6 mL d'acide acétique glacial pour 500 mL

*** Tampon GA + Formol 6%** conserver au frigo

79 mL de formaldéhyde 38%
ajuster à 500 mL avec du tampon GA pH 7.4

FILTRE LES DEUX TYPES DE TAMPON SI TROUBLES

Solution stock de HOECHST 33258 533.9 (AU CONGELATEUR)
Bisbenzimidide hoechst 33258 trihydrochloride

0.5 mg de bisbenzimidide par mL de diméthylsulfoxyde (DMSO 78.13 TA), à conserver au congélateur.

PROTOCOLE DE MANIPULATION

FIXATION

Dans un tube Eppendorf de 2 mL mettre 1 mL de tampon GA+ formol 6%.
Ajouter 1 mL d'échantillon concentré.

CONSERVATION JUSQU'À 24 H à +4°C

COLORATION

Après fixation (1h à 24 h) et sédimentation, aspirer le surnageant avec la trompe à vide (attention à s'arrêter au repère du cône).

Laver avec 1 mL de Tampon GA, laisser sédimenter (20 à 30 min).

Aspirer à nouveau le surnageant et laver à nouveau au Tampon GA.

Préparation du colorant

Attention, le Hoechst est un produit cancérigène, travailler avec des gants, sous la hotte, dans des récipients en plastique, vider dans un container spécial les récipients et les pipettes seront jetées et emballées dans de l'aluminium.

Préparer le colorant : Hoechst (0.5 mg/mL de DMSO) dilué mille fois dans le tampon GA, dans un récipient jetable. (exemple : 20 µL de colorant dans 20 mL de tampon GA).

Aspirer le surnageant dans les échantillons et ajouter 1 mL de colorant par Eppendorf.

Mettre à l'**obscurité** (1 à 4h)

Après sédimentation, aspirer le colorant avec une pipette pasteur (JAMAIS AVEC LA TROMPE À VIDE!!!!)

Après les avoir rincées 2 fois au tampon GA, jeter les pipettes pasteurs enveloppées dans de l'aluminium.

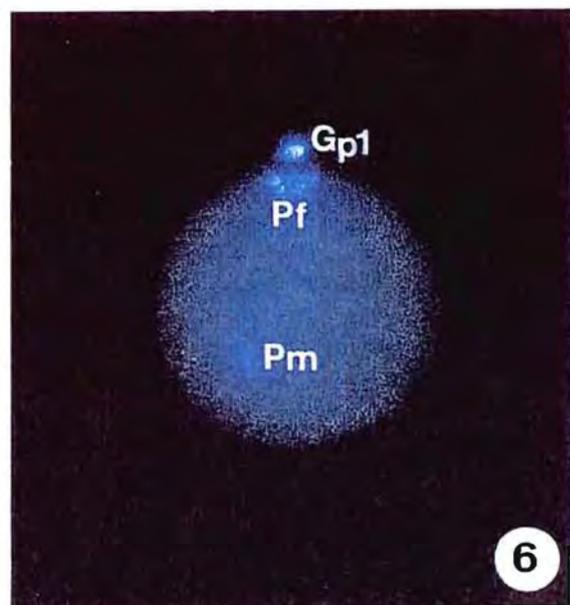
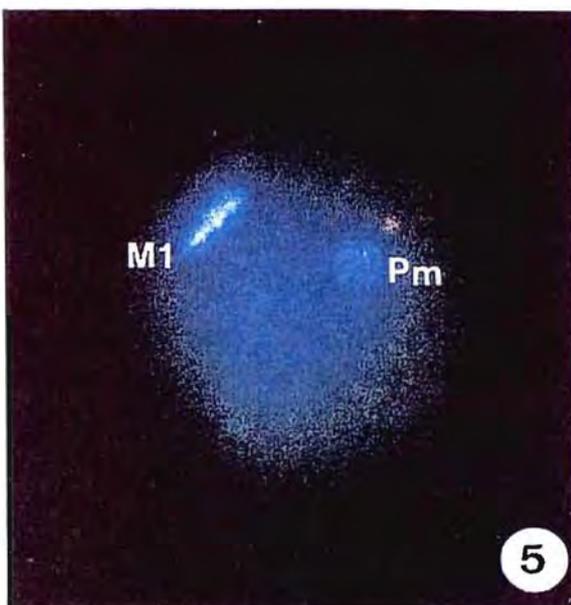
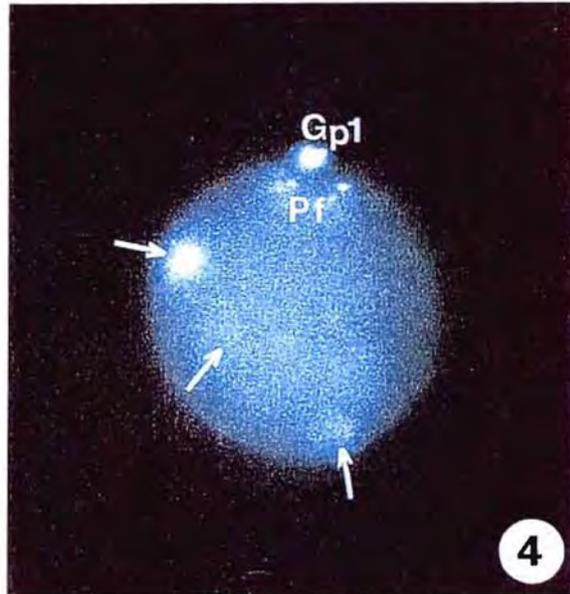
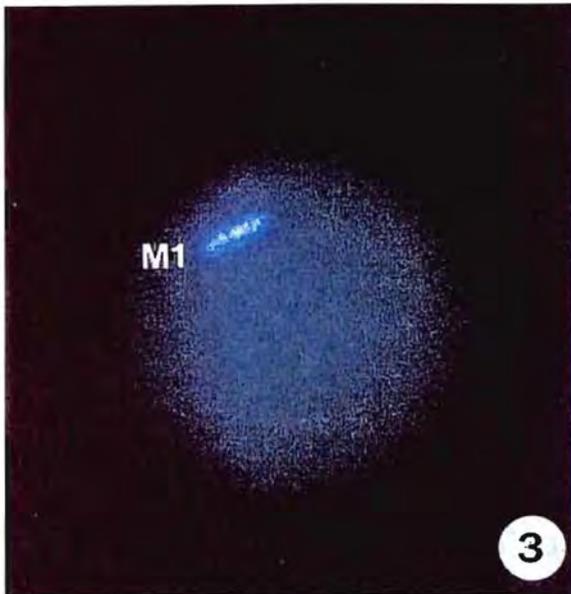
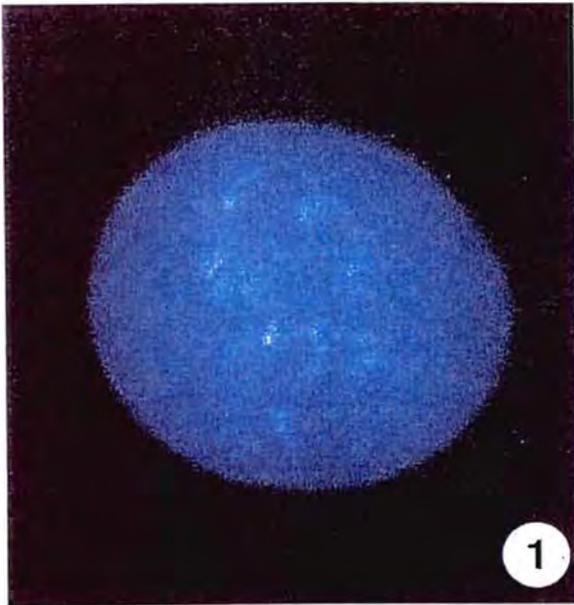
Le colorant aspiré est remis dans le récipient jetable, le contenu final est versé dans le container à produits toxiques, le récipient est emballé dans du papier aluminium et jeté.

Rajouter 1 mL de tampon GA dans les échantillons.

Conservation à +4°C, la fluorescence se maintient correctement pendant à peu près un mois.

25 µL de solution contenant les œufs préalablement colorés sont prélevés avec des cônes coupés et sont observés au microscope à épifluorescence, filtre UV, excitation 340-380 nm, émission 430 nm, entre lame et lamelle.

Annexe 3 planche 1

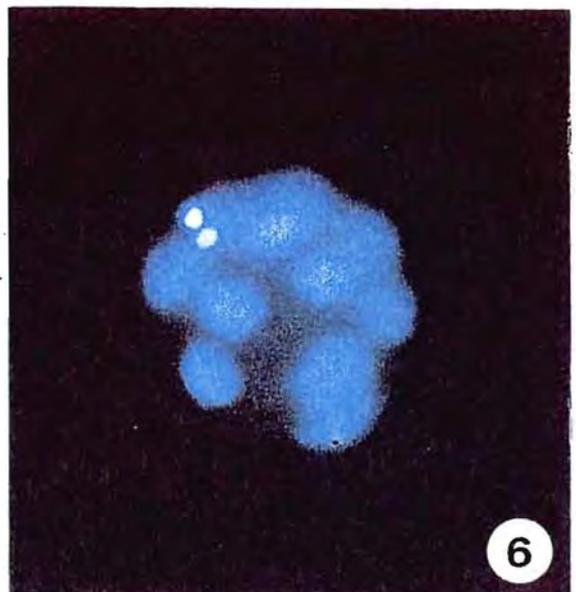
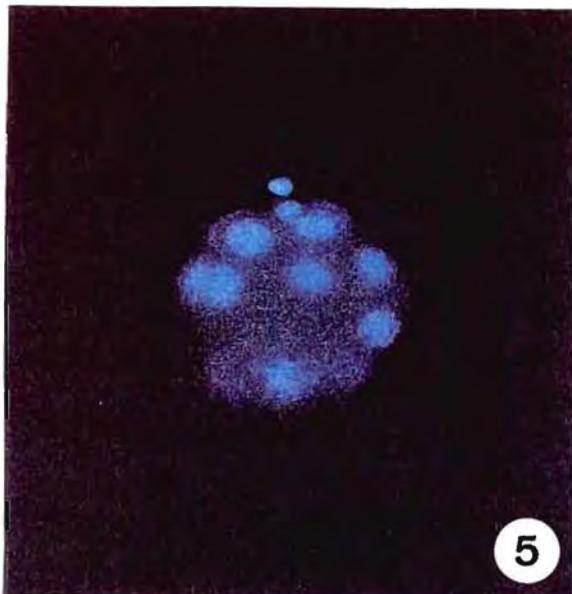
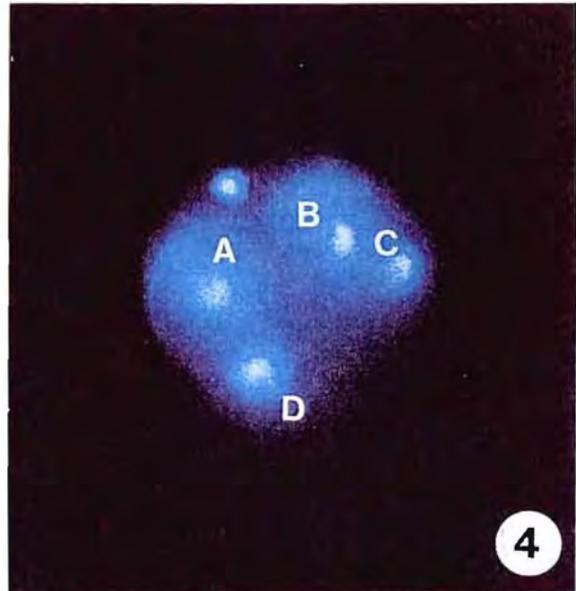
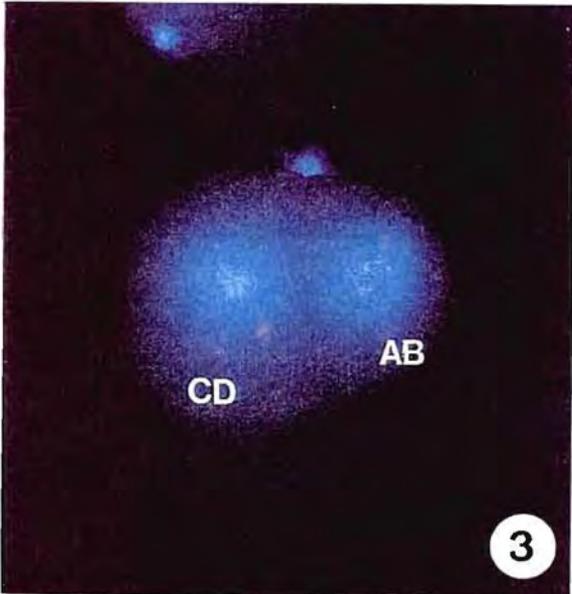
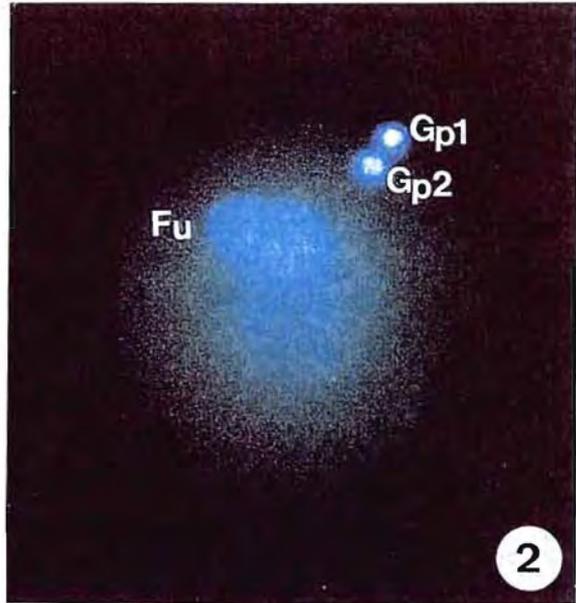
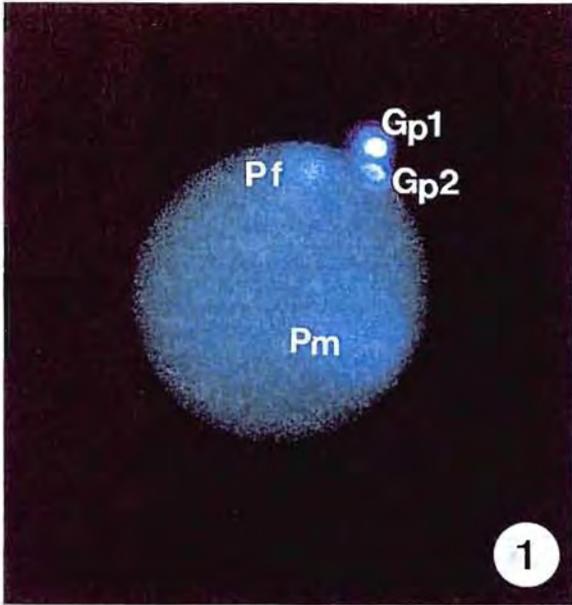


Annexe 3 planche 1

OVOCYTES ET ŒUFS DE *PECTEN MAXIMUS* OBSERVÉS AU MICROSCOPE A EPIFLUORESCENCE APRES COLORATION AU HOECHST 33258 (Faure, 1996)

- Photo 1 :** Ovocyte immature au stade vésicule germinale : les chromosomes sont décondensés. Echelle : $10\ \mu\text{m} = 0.75\ \text{cm}$.
- Photo 2 :** Ovocyte mature dont la vésicule germinative s'est rompue : les chromosomes sont condensés, le pronucléus femelle (P1) est en prophase de la première division de méiose. Echelle : $10\ \mu\text{m} = 0.75\ \text{cm}$.
- Photo 3 :** Ovocyte mature dont le pronucléus femelle (M1) est en métaphase de première division de méiose. Echelle : $10\ \mu\text{m} = 0.75\ \text{cm}$.
- Photo 4 :** Polyspermie : plusieurs têtes spermatisques (→) sont présentes à l'intérieur de l'œuf. Le pronucléus femelle (Pf) et le premier globule polaire (Gp1) sont visibles. Echelle : $10\ \mu\text{m} = 0.50\ \text{cm}$.
- Photo 5 :** Œuf dont le pronucléus femelle (M1) est en métaphase I et dont le pronucléus mâle (Pm) est décondensé. Echelle : $10\ \mu\text{m} = 0.75\ \text{cm}$.
- Photo 6 :** Œuf montrant le premier globule polaire (Gp1), le pronucléus femelle (Pf) et le pronucléus mâle (Pm) décondensé. Echelle : $10\ \mu\text{m} = 0.50\ \text{cm}$.

Annexe 3 planche 2



Annexe 3 planche 2

ŒUFS ET EMBRYONS DE *PECTEN MAXIMUS* OBSERVÉS AU MICROSCOPE A EPIFLUORESCENCE APRES COLORATION AU HOECHST 33258 (Faure, 1996)

Photo 1 : Œuf montrant les 2 globules polaires (Gp1) et (Gp2) et les pronucléi femelle (Pf) et mâle (Pm). Echelle : $10\ \mu\text{m} = 0.50\ \text{cm}$.

Photo 2 : Œuf montrant les 2 globules polaires (Gp1) et (Gp2) et la fusion des 2 pronucléi (Fu). Echelle : $10\ \mu\text{m} = 0.75\ \text{cm}$.

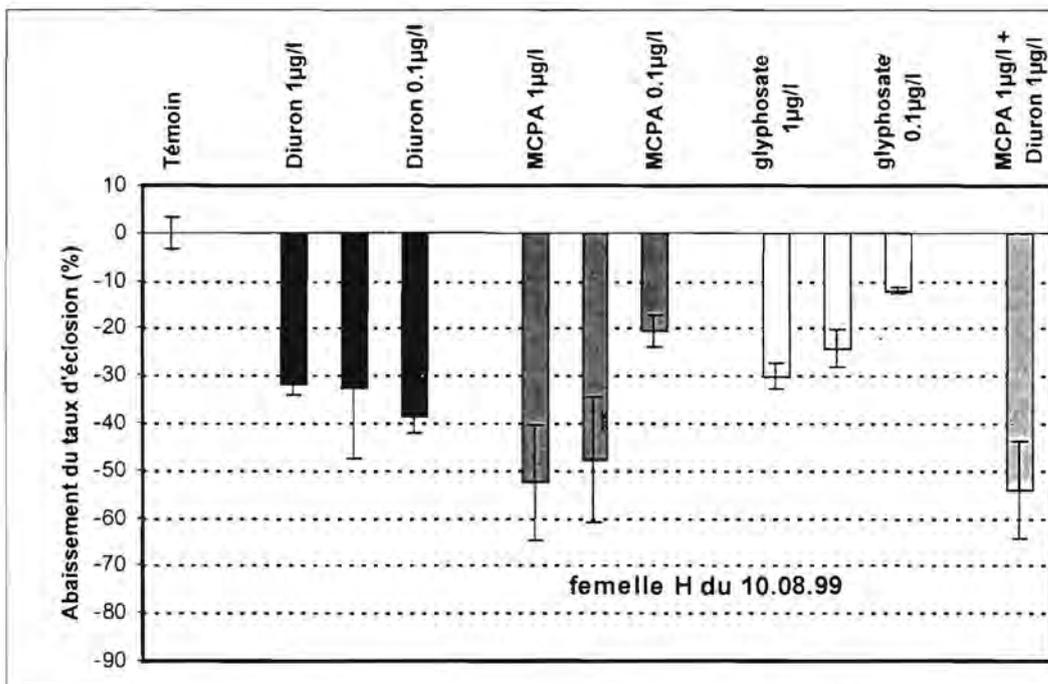
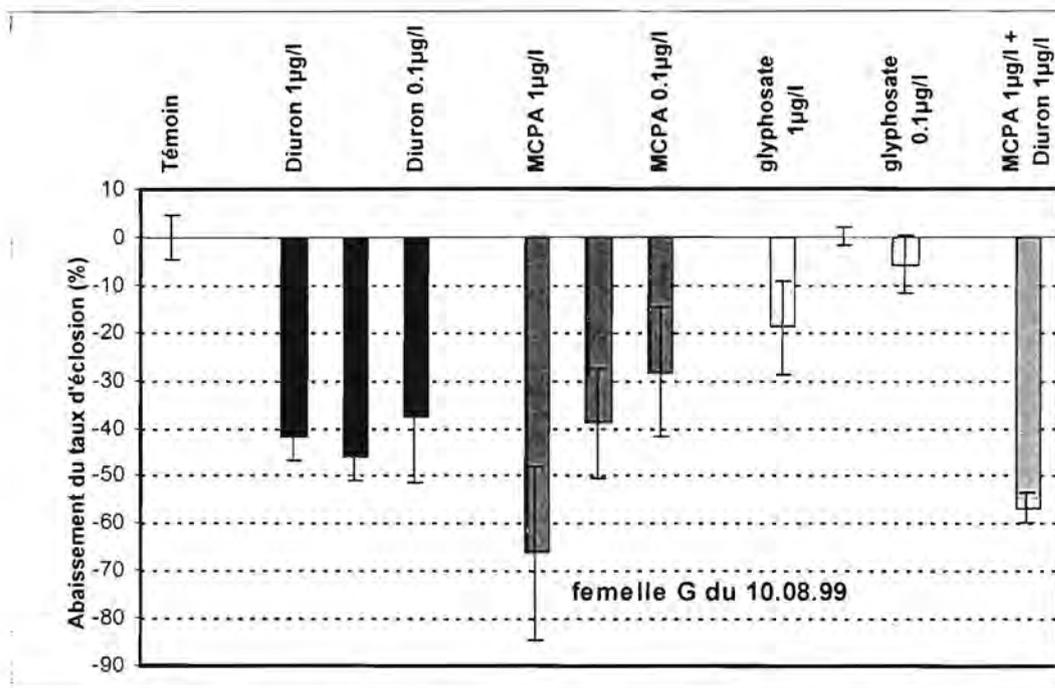
Photo 3 : Embryon au stade 2 cellules. Le blastomère CD est plus volumineux que le blastomère AB. Echelle : $10\ \mu\text{m} = 0.50\ \text{cm}$.

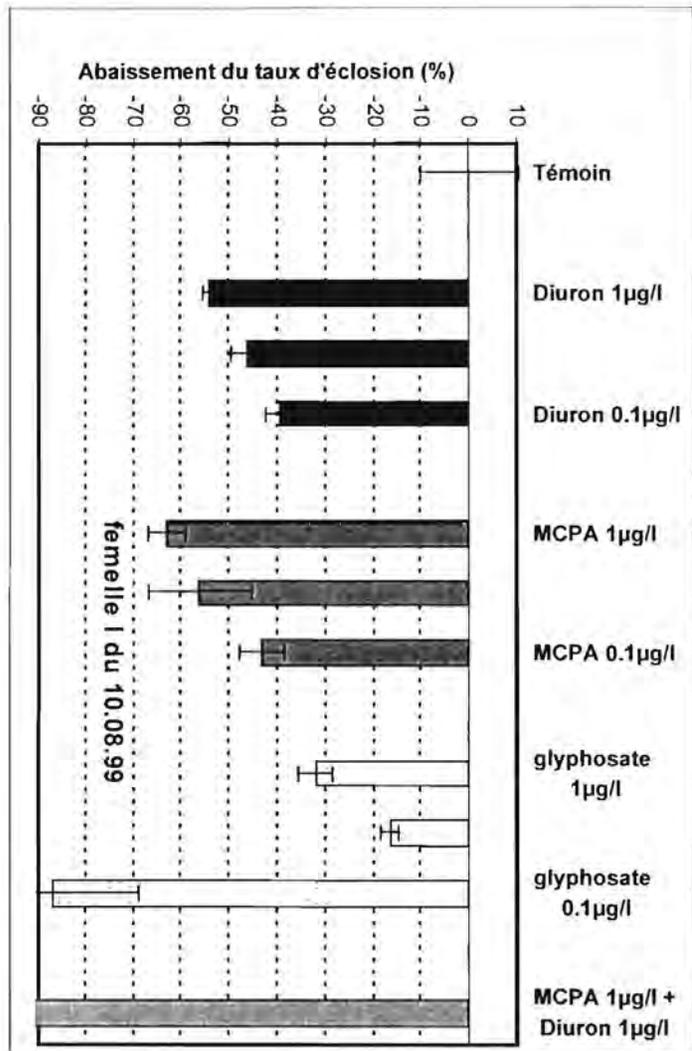
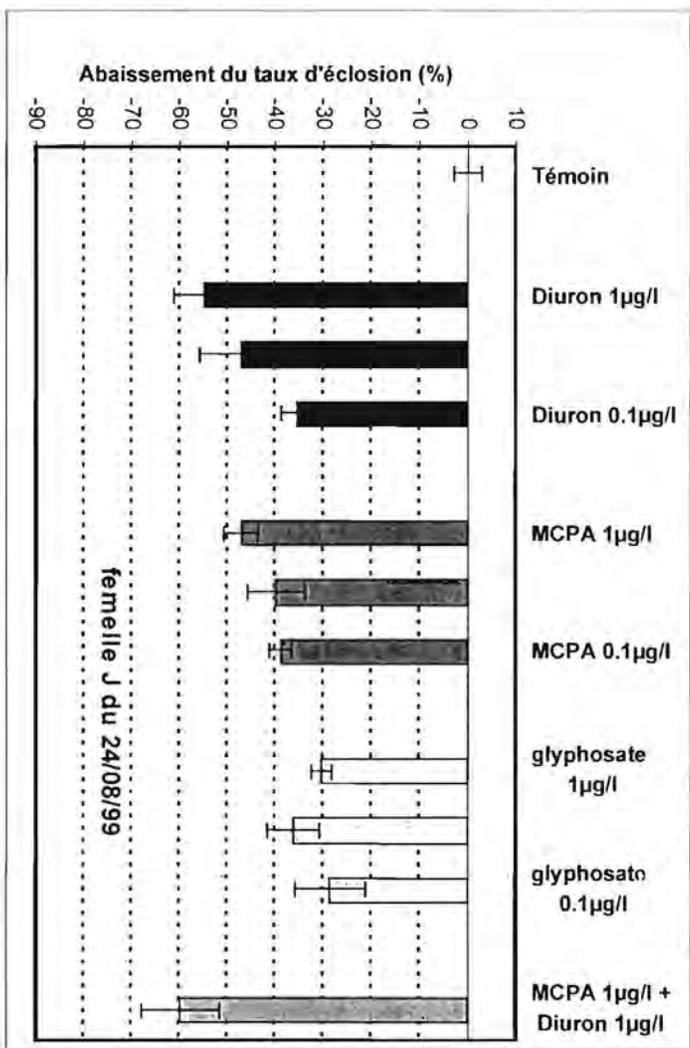
Photo 4 : Embryon au stade 4 cellules. Le blastomère D est plus volumineux que les blastomères A, B et C. Echelle : $10\ \mu\text{m} = 0.50\ \text{cm}$.

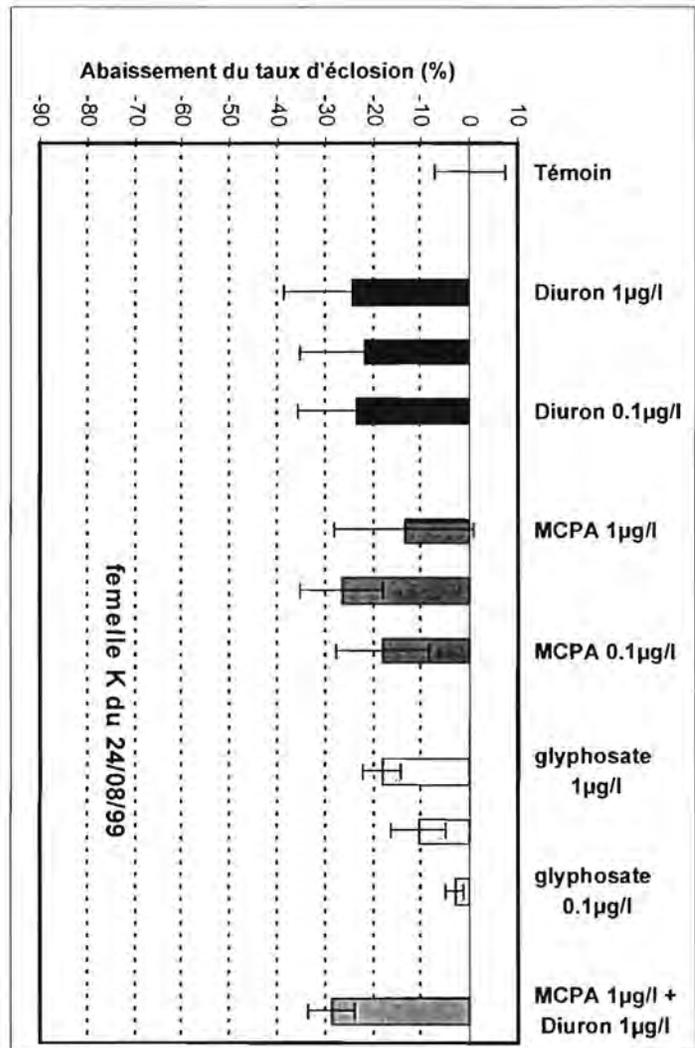
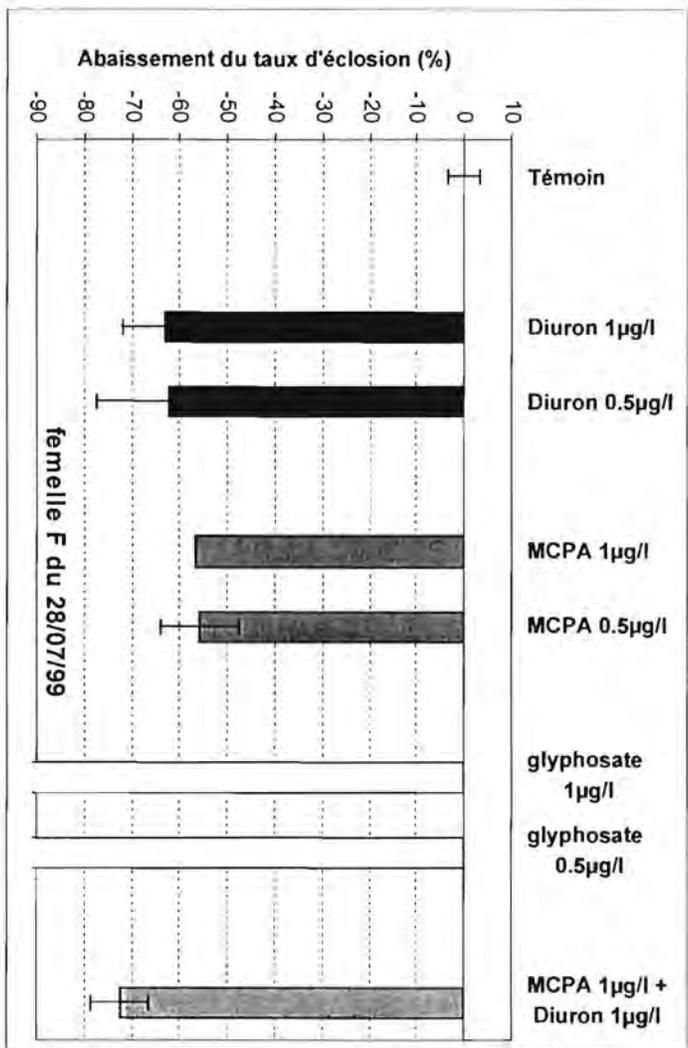
Photo 5 : Embryon au stade 8 cellules. Echelle : $10\ \mu\text{m} = 0.40\ \text{cm}$.

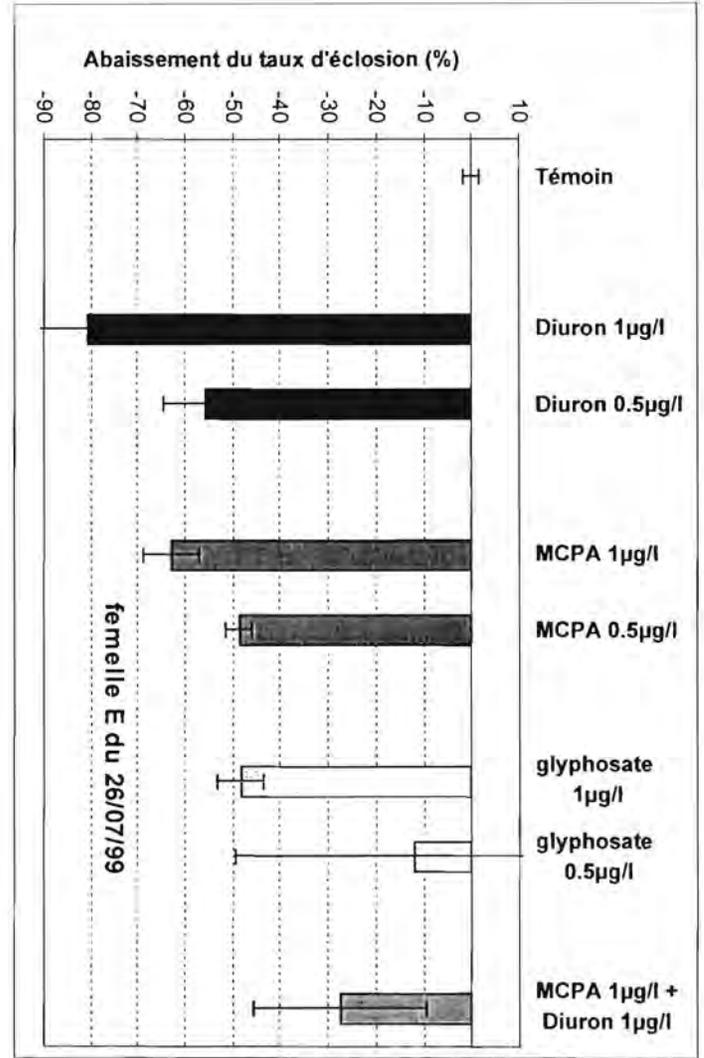
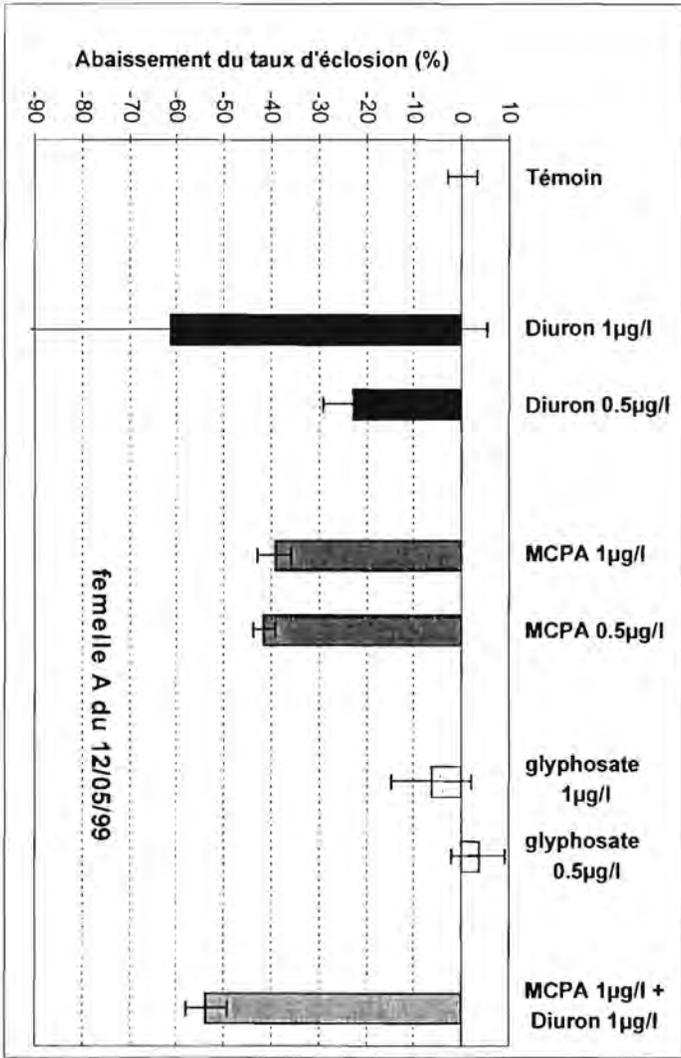
Photo 6 : Embryon à plus de 8 cellules. Echelle : $10\ \mu\text{m} = 0.50\ \text{cm}$.

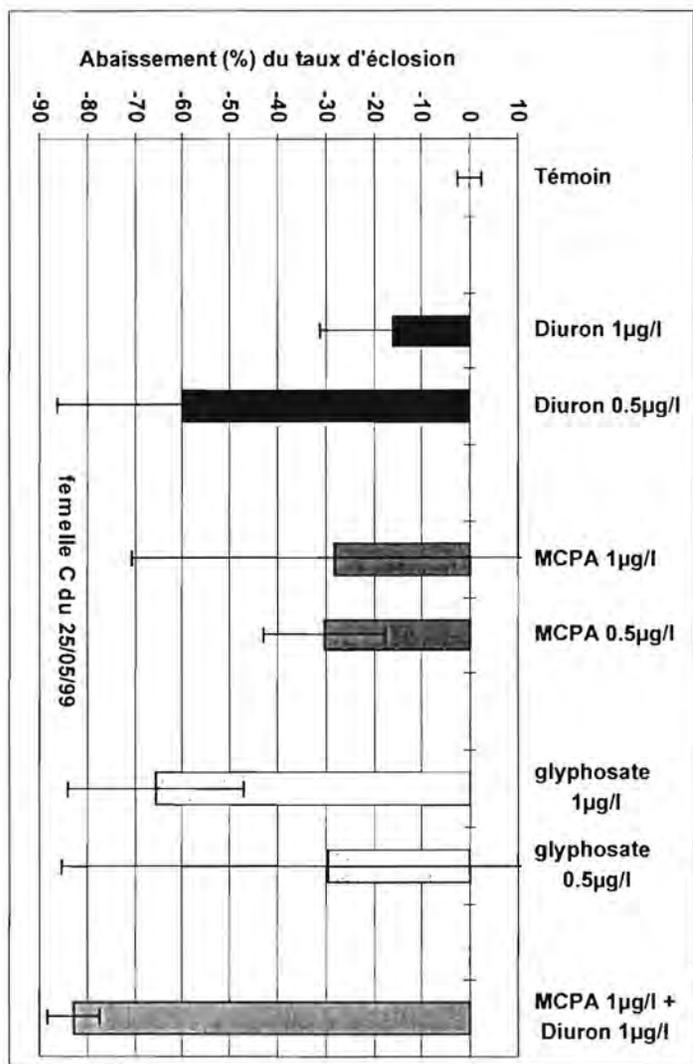
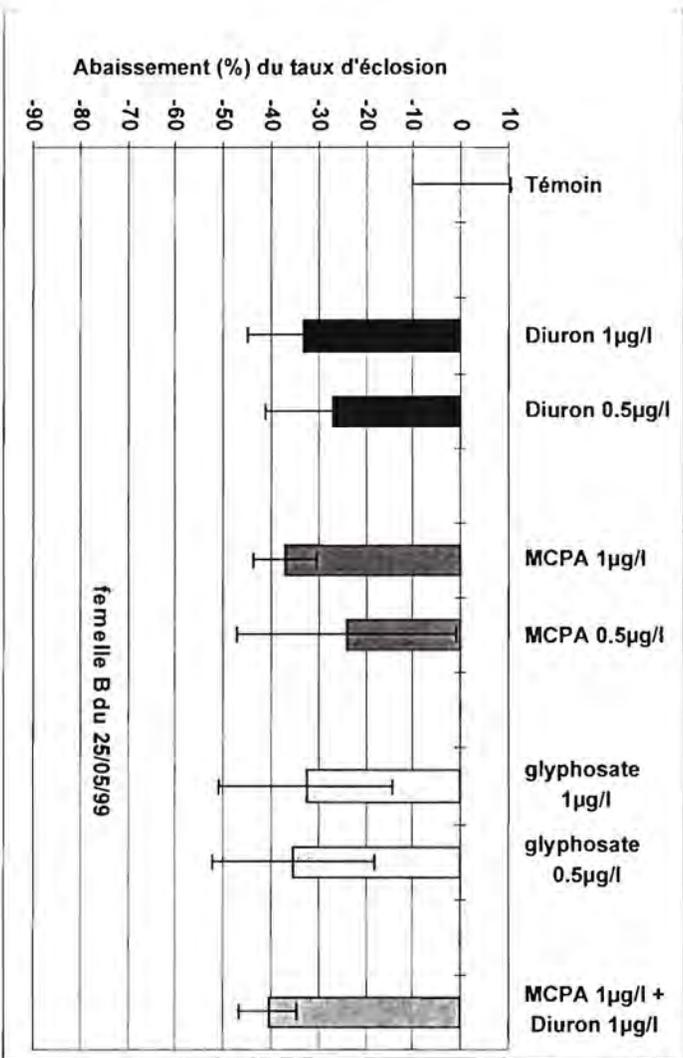
Annexe 4 : Graphes représentant les taux d'abaissement obtenus dans les différentes conditions envisagées, pour les 11 femelles testées

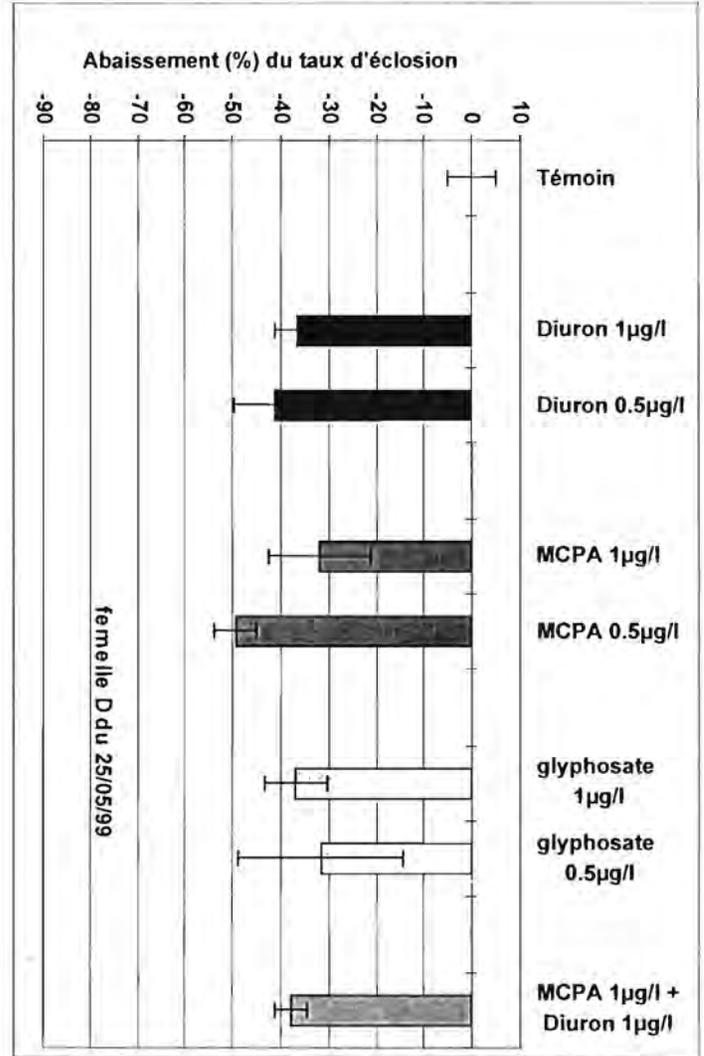












Annexe 5 : Evolution des populations pour les expériences des mois de Avril / Mai et Août

Légende :

m : moyenne

It : Intervalle de confiance

Avril : Evolution des populations

taux de larves anormales

traitement		J7	J17	J21	J28
T	m	16,35	23,03	17,28	7,00
	it	2,05	4,29	0,63	2,25
D1	m	19,68	24,55	12,26	4,91
	it	3,35	1,82	1,63	1,46
D0,5	m	17,49	27,67	10,14	2,04
	it	4,21	3,22	4,49	0,92
MCPA1	m	20,13	26,81	12,25	2,64
	it	6,13	4,17	2,95	1,83
MCPA0,5	m	19,30	24,15	10,47	2,59
	it	0,47	2,47	3,79	0,49
Syn1	m	17,92	26,13	9,32	2,52
	it	2,84	3,16	1,69	2,01
Gly1	m	15,72	24,89	12,61	2,51
	it	6,21	1,60	2,37	1,24
Gly0,5	m	19,04	24,62	10,88	2,26
	it	3,75	1,98	3,08	3,18

Taux de mortalité

traitement		J7	J17	J21	J28
T	m	2,89	10,29	21,64	37,98
	it	0,58	3,99	4,16	5,09
D1	m	2,14	7,52	30,82	49,43
	it	1,02	0,36	0,88	4,21
D0,5	m	2,29	8,45	23,98	56,75
	it	0,31	2,95	6,21	8,35
MCPA1	m	0,83	5,47	26,40	49,83
	it	0,30	1,51	3,07	3,53
MCPA0,5	m	2,07	8,64	27,81	58,58
	it	1,51	1,82	4,08	19,08
Syn1	m	2,99	7,42	30,69	44,22
	it	1,43	2,15	8,08	4,78
Gly1	m	2,08	7,78	26,48	48,02
	it	0,78	3,85	3,02	10,61
Gly0,5	m	2,05	7,81	24,76	60,72
	it	2,65	0,33	7,89	34,74

taux de double barre

traitements		J21	J28
T	m	27,37	33,34
	it	2,07	2,76
D1	m	21,88	29,42
	it	3,89	1,82
D0,5	m	24,06	23,12
	it	4,54	2,44
MCPA1	m	27,82	29,71
	it	4,77	3,79
MCPA0,5	m	25,79	23,34
	it	8,08	7,28
Syn1	m	23,32	34,27
	it	3,83	2,93
Gly1	m	24,56	33,64
	it	6,16	8,63
Gly0,5	m	26,77	25,62
	it	3,46	22,65

Taux de double barre parmi les larves vivantes

traitements		J21	J28
T	m	35,94	58,57
	it	1,11	2,97
D1	m	33,64	65,03
	it	9,17	1,18
D0,5	m	32,36	64,10
	it	4,52	8,84
MCPA1	m	39,05	67,64
	it	5,41	9,48
MCPA0,5	m	36,29	66,45
	it	10,77	18,42
Syn1	m	34,78	68,52
	it	1,91	2,88
Gly1	m	33,59	76,09
	it	7,71	7,70
Gly0,5	m	38,35	81,23
	it	5,86	19,31

Mai : Evolution des populations

Taux de larves anormales

Traitements		J8	J15	J22	J27
T	m	13,14	16,50	5,13	2,77
	it	4,20	4,59	1,79	2,54
D1	m	15,08	15,79	5,79	1,88
	it	4,97	3,95	2,31	0,78
D0,5	m	20,06	14,38	5,55	1,19
	it	2,00	6,39	1,90	0,68
MCPA1	m	23,14	13,84	4,79	0,46
	it	1,80	4,95	2,46	0,90
MCPA0,5	m	21,96	12,76	3,80	0,23
	it	5,95	5,53	0,66	0,37
Syn1	m	21,51	11,41	6,14	1,55
	it	2,77	2,37	1,94	1,41
Gly1	m	21,67	15,93	5,56	1,40
	it	0,05	0,48	1,94	0,62
Gly0,5	m	15,12	11,40	5,39	1,99
	it	3,40	2,19	1,60	0,50

Taux de mortalité

Traitements		J8	J15	J22	J27
T	m	3,61	9,96	22,52	39,62
	it	0,90	2,68	5,00	7,06
D1	m	2,28	6,83	23,27	38,85
	it	1,48	3,44	3,05	0,96
D0,5	m	2,55	10,30	31,23	47,78
	it	0,29	8,67	6,57	11,05
MCPA1	m	2,05	12,21	28,48	50,34
	it	0,51	2,23	9,68	2,88
MCPA0,5	m	4,00	12,77	30,82	60,98
	it	0,50	3,91	5,15	5,66
Syn1	m	3,53	13,67	28,20	46,49
	it	0,98	1,71	1,72	0,75
Gly1	m	4,17	11,88	29,76	45,66
	it	0,72	1,48	0,73	10,14
Gly0,5	m	2,48	13,50	27,77	40,13
	it	0,89	4,15	4,83	3,01

Taux de double barre

Traitements		J22	J27
T	m	35,01	33,56
	it	11,69	9,48
D1	m	33,85	37,43
	it	4,80	6,13
D0,5	m	33,29	33,17
	it	6,28	11,99
mCPA1	m	35,96	32,39
	it	5,80	1,43
mCPA0,5	m	30,30	27,32
	it	6,95	4,22
Syn1	m	31,09	28,38
	it	5,33	4,06
Gly1	m	28,65	30,71
	it	2,82	5,01
Gly0,5	m	28,95	30,30
	it	11,66	14,20

Taux de double barre parmi les larves vivantes

Traitements		J22	J27
T	m	45,70	54,19
	it	17,60	16,09
D1	m	44,12	59,84
	it	7,20	10,31
D0,5	m	48,22	59,67
	it	6,53	13,37
mCPA1	m	50,43	61,16
	it	6,41	7,35
mCPA0,5	m	43,53	70,38
	it	7,00	20,73
Syn1	m	43,06	51,47
	it	6,38	7,90
Gly1	m	40,69	56,73
	it	3,60	6,27
Gly0,5	m	39,18	49,24
	it	13,60	20,50

Août : Evolution des populations

Taux de larves anormales

Traitements		J8	J15	J22	J27
T	m	7,63	2,82	1,19	0,48
	it	1,34	1,46	0,57	0,64
D1	m	8,32	4,55	2,64	3,22
	it	0,40	1,48	1,07	0,55
D0,5	m	11,12	3,23	2,22	3,53
	it	1,60	1,55	1,47	1,31
MCPA1	m	8,66	4,85	1,81	0,82
	it	2,04	1,04	1,04	0,60
MCPA0,5	m	8,38	3,95	2,57	1,05
	it	1,17	0,80	0,33	1,31
Syn1	m	13,11	7,70	2,52	1,50
	it	2,00	2,35	1,13	1,52
Gly1	m	7,37	3,74	1,87	0,76
	it	0,93	1,13	0,88	0,03
Gly0,5	m	6,80	3,77	1,01	1,80
	it	1,29	2,63	0,23	2,50

Taux de mortalité

Traitements		J8	J15	J22	J27
T	m	15,04	23,94	43,97	53,93
	it	2,28	4,73	19,46	13,98
D1	m	13,90	22,97	35,80	41,36
	it	1,41	1,70	2,79	12,90
D0,5	m	13,57	22,12	29,76	34,53
	it	2,90	4,40	3,46	6,80
MCPA1	m	13,06	20,10	27,88	34,73
	it	1,32	1,81	6,48	4,04
MCPA0,5	m	12,27	22,48	29,67	30,47
	it	1,59	3,65	1,25	4,37
Syn1	m	13,59	22,11	25,99	32,33
	it	1,82	6,31	4,62	4,04
Gly1	m	12,84	21,81	29,68	30,98
	it	2,21	3,73	5,66	3,79
Gly0,5	m	11,65	21,43	33,27	40,61
	it	0,91	8,70	2,09	9,57

Taux de doubles barres

Traitements		J8	J15	J22	J27
T	m	0,00	4,33	14,88	15,95
	it	0,00	1,97	13,19	9,83
D1	m	0,00	1,19	23,01	26,53
	it	0,00	0,63	3,46	4,03
D0,5	m	0,00	3,24	24,37	27,17
	it	0,00	0,51	4,04	4,68
MCPA1	m	0,00	2,19	21,01	27,84
	it	0,00	1,03	3,19	4,82
MCPA0,5	m	0,00	0,87	23,91	30,97
	it	0,00	0,73	3,12	3,86
Syn1	m	0,00	1,00	25,70	33,09
	it	0,00	0,61	2,96	6,41
Gly1	m	0,00	0,79	25,48	38,39
	it	0,00	0,22	0,62	1,24
Gly0,5	m	0,00	1,11	26,51	36,10
	it	0,00	1,25	1,59	3,66

Taux de doubles barres parmi les larves vivantes

Traitements		J15	J22	J27
T	m	5,77	31,41	37,25
	it	2,887	15,76	14,5
D1	m	1,56	35,75	45,76
	it	0,836	3,913	6,267
D0,5	m	4,14	34,64	41,44
	it	0,43	4,849	4,674
MCPA1	m	2,74	29,37	42,65
	it	1,3	6,078	6,973
MCPA0,5	m	1,11	34,04	44,50
	it	0,903	4,931	3,997
Syn1	m	1,27	34,86	48,95
	it	0,768	5,279	9,259
Gly1	m	1,01	36,36	55,73
	it	0,28	3,264	4,179
Gly0,5	m	1,36	39,72	61,32
	it	1,47	1,444	8,185

Annexe 6 : Protocole de fixation des échantillons pour l'observation au Microscope Electronique à Balayage (MEB)

Les échantillons fixés à la glutaraldéhyde en tampon cacodylate 0.2 M (24 heures minimum), puis conservés à + 4 °C en tampon cacodylate 0,2 M.

Pour l'observation en microscopie électronique à balayage (MEB), différents types de traitements ont été mis au point :

- Observation directe sans attaque.
- Observation après sonication douce durant 5' dans le but de casser les valves et attaque ménagée à l'hypochlorite de sodium à 5 % (v:v) réalisé à partir de javel 5,25% pendant 30'(élimination de la matière organique), puis un rinçage à l'eau distillée.
- Observation après attaque forte avec de l'hypochlorite de sodium à 48 % durant 30' de façon à dissocier les deux valves et à éliminer les matières organiques, puis un rinçage à l'eau distillée.

Après ces traitements, chaque échantillon est déshydraté à l'alcool (bains successifs d'une heure : 70° / 90° / 100°) puis passé au point critique.

Les échantillons sont ensuite collés sur des plots métalliques et métallisés à l'or palladium. Ils sont ensuite conservés sous vide jusqu'à l'observation afin d'éviter toute réhydratation.