

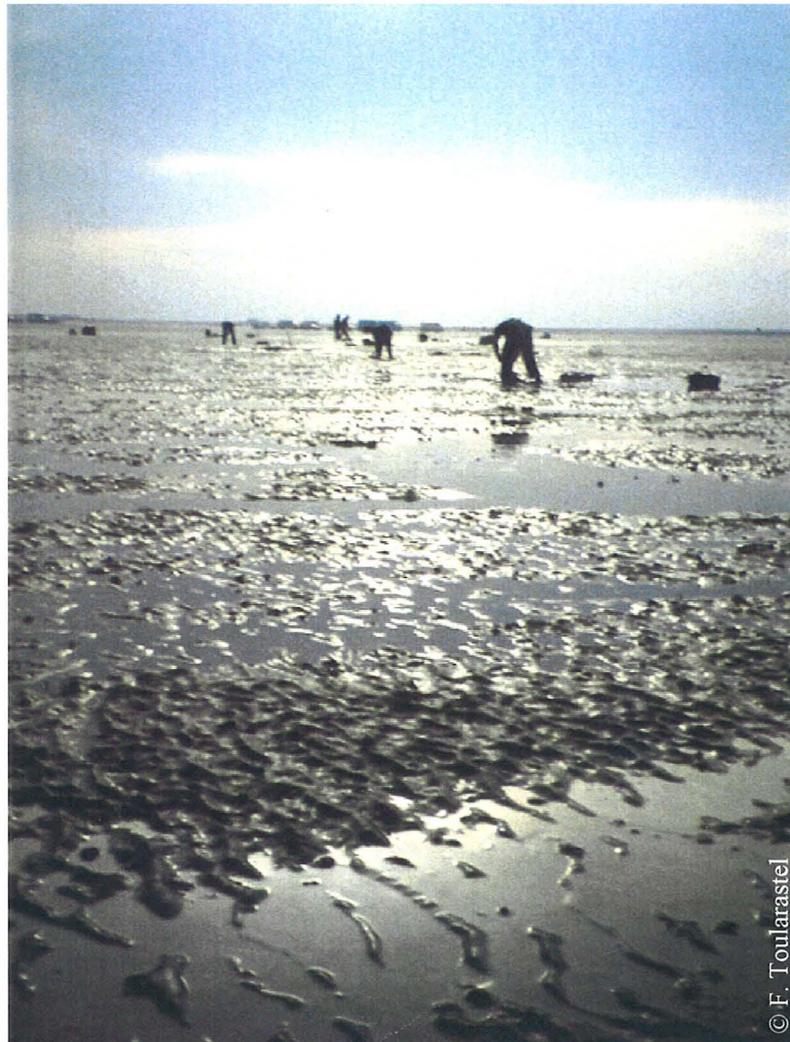
direction de l'environnement et de l'aménagement littoral
DEL/PC
DEL/99.10/Brest

ifremer

Herlé GORAGUER et France TOULARASTEL

Toxicité des sédiments

Test sur embryons de bivalves



© F. Toularastel

FICHE DOCUMENTAIRE

Type de rapport : Rapports de synthèse	
Numéro d'identification du rapport : DEL/99.10/Brest	date de publication août 1999
Diffusion : libre <input checked="" type="checkbox"/>	nombre de pages 16
Validé par :	bibliographie oui illustration(s) oui langue du rapport français
Titre et sous-titre du rapport : Toxicité des sédiments Test sur embryons de bivalves	
Titre traduit : Toxicity of sediments	
Auteur(s) principal(aux) : nom, prénom Herlé GORAGUER France TOULARASTEL	Organisme / Direction / Service, laboratoire IFREMER DEL/PC
Organisme commanditaire : nom développé, sigle, adresse Travaux réalisés dans le cadre du Réseau National d'Observation (RNO) physiologie.	
Résumé : Des bioessais sur le développement embryonnaire de <i>Mytilus</i> sont effectués à partir du moment de la fécondation. On teste ainsi l'eau de mer où à séjourné du sédiment de la Baie de Seine. Les résultats montrent une toxicité très variable selon les sites et les saisons, nettement plus forte en automne.	
Abstract : <i>Mytilus</i> early development bioassays have been used for sediment toxicity testing in the coastal zone heavily contaminated by the river Seine. This bioassays have been realized from fecundation to "D" larval stage in presence of sediment aqueous extracts. Results exhibit a high variability wich could not be related to any geographical gradient, probably due to a large effect on variance of seasonal variations.	
Mots-clés : Toxicité, Sédiment, Bivalve, Embryon, Bioessai, Baie de Seine, Estuaire, Manche.	
Keywords : Toxicity, Sediment, Bivalve, Embryo, Bioassay, Estuarie, Bay of Seine, Channel.	

Toxicité des sédiments

Test sur embryons de bivalves

Photographie de couverture : Pêcheurs de coques, Baie des Veys

Sommaire

Choix des sites

Honfleur

Cabourg

Ouistreham

Brévands

Géfosse

Matériel et méthode

Prélèvements du sédiment

Préparation des "milieux"

Préparation du "matériel" biologique et obtention des gamètes

Développement embryonnaire

Mesure du taux d'anormalité

Chimie

Résultats

Comparaison entre les différents sites par année (de 1991 à 1997)

Evolution au cours des six années

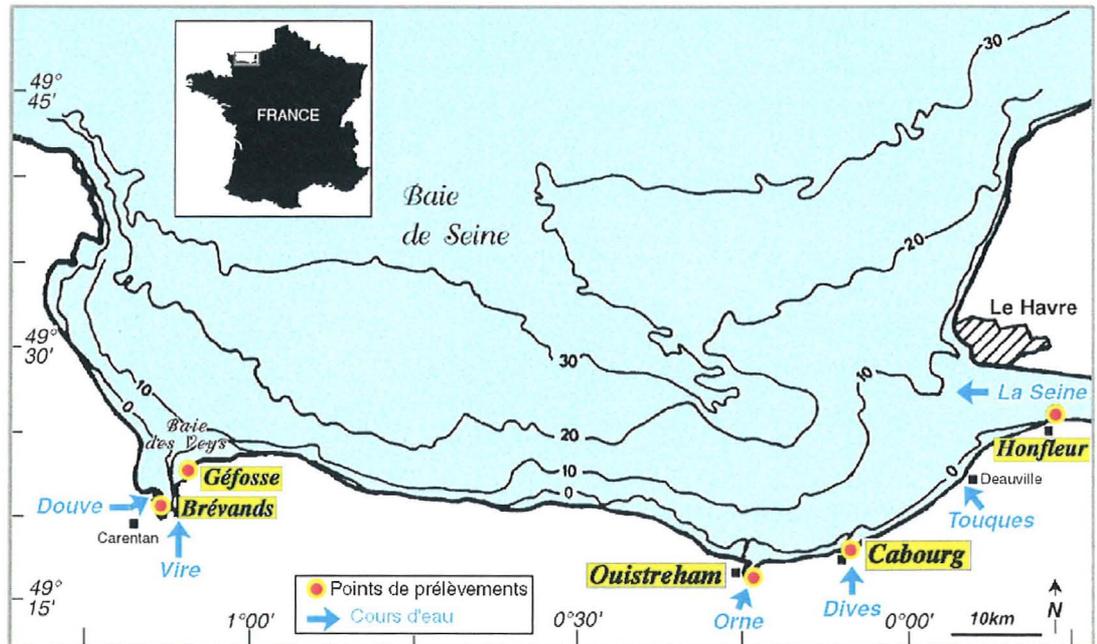
Comparaison entre le printemps et l'automne

Conclusion

De 1991 à 1997 a été mis en place une surveillance pour évaluer le degré de toxicité de sédiments provenant du littoral de la Baie de Seine. Cette mise en évidence de la toxicité est effectuée sur des embryons de mollusques bivalves et très précisément sur la première période de leur développement embryonnaire à partir de la fécondation. La fécondation et le développement se font dans une eau de mer de référence dans laquelle on a fait séjourner du sédiment de façon à ce que se libèrent les éventuelles toxines. La toxicité du milieu liquide ainsi obtenu se traduira alors par le fait que le développement embryonnaire s'y déroulera plus ou moins normalement, le critère d'anomalie retenu étant la *malformation* des coquilles après un temps donné connu.

1. Choix des sites*

Nous avons dû d'abord repérer des sites géographiques précis correspondant aux estuaires qui débouchent dans la baie de Seine, ce choix s'est fait, entre autre, en fonction de l'accès possible et sans trop de risque pour une personne physique faisant le prélèvement à la main, dans une zone de quelques mètres carrés et lors de la marée basse. Nous avons travaillé à cinq endroits caractérisés par un dépôt de vase et recouverts complètement deux fois par jour par la mer quel que soit le coefficient de marée. Les prélèvements et les tests biologiques correspondant sont faits deux fois par an, en avril et en octobre.



Position des stations de prélèvement

1.1. Honfleur

Le lieu de prélèvement est situé sur les berges même de la Seine, au niveau de la sortie du port, à l'extérieur de celui-ci : il s'agit d'une zone d'enrochement artificiel assez ancien situé au pied d'une digue où une vase très fine se dépose entre les blocs rocheux. Le dépôt de sédiment à cet endroit est peu stable apparemment, et parfois très sableux.

* La prospection des différents sites, leur choix, les premiers prélèvements sur le terrain et les premiers tests sur ces sédiments ont été effectués avec F. Quiniou.

1.2. Cabourg

Le lieu de prélèvement est situé en arrière de la plage sur le bord d'un chenal étroit qui est l'accès à un port de plaisance récent et complètement artificiel (Port Guillaume), mais qui correspond quand même au lit de la rivière Dives ; les bords de ce chenal sont des bancs très épais d'une vase fine, dense, très sombre et souvent nauséabonde. C'est sans doute l'endroit où le sédiment présente le plus de constance, au moins dans son aspect extérieur.

1.3. Ouistreham

L'endroit choisi se trouve dans l'estuaire de l'Orne en amont du débouché du canal de Caen et du port de Ouistreham, dans une zone qui a gardé sa configuration naturelle malgré l'aménagement récent d'un club nautique sans comparaison avec l'important port de plaisance de Cabourg. Les dépôts de vase sont très importants à cet endroit qui correspond à la rive concave d'un méandre.

1.4. Brévands

Les deux sites suivant sont choisis dans la Baie des Veys, à l'ouest de l'embouchure de la Seine, au débouché des rivières que sont la Vire et la Douves, et l'on peut dire qu'ils font partie de la Baie de Seine au sens "large" du terme. Le site choisi sur la commune de Brévands est en aval de la ville de Carentan qui possède aussi un important port de plaisance, à partir duquel la Douves est artificiellement canalisée

jusqu'à la mer. L'endroit des prélèvements est sur l'estran, très plat à cet endroit où la mer se retire très loin. Il s'agit de bancs de sable plus ou moins stables qui abritent des fortes populations de coques (*Cardium edule*).

1.5. Géfosse

La zone des prélèvements se trouve près du lit de la Vire qui débouche "naturellement" en aval d'Isigny, à l'ouest de la Baie des Veys. A cet endroit les surfaces découvertes à marée basse sont immenses et l'ostréiculture sur table est pratiquée de façon intense. Il semble que ce site, plus que les autres, est très directement influencé par le débit de la rivière. C'est à cet endroit que nous observons le plus de variations concernant la répartition, la quantité et la qualité de la vase, d'une saison à l'autre et d'une année à l'autre.

2. Matériel et méthode

2.1. Prélèvements du sédiment

Le sédiment est prélevé deux fois par an en surface sur une épaisseur de moins de 10 centimètres, sur quelques mètres carrés ; il est conservé à l'abri de l'air et de la lumière, entre 4° et 10°C. On essaie de le conserver le moins longtemps possible et d'effectuer les contrôles moins d'une semaine après le prélèvement. Des expériences faites en parallèle, ont montré que la toxicité au sein du sédiment pouvait varier avec le temps de façons diverses, et que la congélation ne bloquait en rien ces phénomènes. On a montré également que dans le " film" de surface ou dans une "carotte" de 20 cm d'épaisseur, les résultats étaient les mêmes.

2.2. Préparation des "milieux"

On travaille à partir de l'eau de mer naturelle. Jusqu'à ce jour nous avons pu bénéficier de l'eau d'une éclosérie située à Argenton sur la côte nord du Finistère. Cette eau a une salinité de 35, elle est filtrée d'abord à 1 μ , puis une deuxième fois à 0.2 μ . On s'applique à prélever l'eau le jour même de l'expérience.

Dans de l'eau de mer filtrée, dans des bechers de 250 cc, on laisse le sédiment "contaminer" le milieu par un brassage intense par agitateur magnétique à vitesse moyenne (300 tours/minutes). Nous opérons pour chaque site avec 2.5 grammes de sédiments humide dans 250 cc d'eau de mer. L'agitation est prolongée pendant trois

heures, elle est suivie d'une décantation de deux heures au moins. L'eau surnageante, après cette décantation, doit être parfaitement transparente, on prépare alors pour chacun des cinq sites, quatre répliquats de 50 cc dans lesquels seront mis les gamètes mâles et les gamètes femelles.

2.3. Préparation du "matériel" biologique et obtention des gamètes

La partie la plus délicate dans ces expériences est évidemment celle qui concerne l'obtention de gamètes en vue de la fécondation. Pour ce suivi toxicologique nous avons utilisé les moules mais la façon d'opérer est sensiblement la même avec les huîtres. Il est nécessaire d'avoir des adultes à maturité provenant de sites naturels "sains". Dans notre région du Finistère nord plusieurs moulières naturelles (*Mytilus galloprovincialis*) notamment à Morgat et à Bertheaume donnent satisfaction entre avril et octobre. On sait qu'il n'y a pas de dimorphisme sexuel chez ces mollusques, on prélève "au hasard" un lot d'une cinquantaine d'individus.

Pour que la ponte se déclenche, à condition que les animaux géniteurs soient à un stade de maturité suffisant, on provoque un "choc" thermique en les laissant alternativement pendant vingt minutes dans de l'eau de mer à 10°C et à 26°C environ. Dès que les premiers individus émettent leurs gamètes, on les isole soigneusement ; finalement on sélectionne un mâle et une femelle pour la reproduction. On laisse la femelle émettre ses ovocytes dans de l'eau de mer propre et l'on mesure leur quantité par comptage dans une goutte de volume connu, à partir de là on verse dans chaque

réceptif qui contient 50 cc du "milieu" une quantité d'ovocytes qui correspond à une concentration de 50000 par litre.

2.4. Développement embryonnaire

Après avoir ajouté une très petite quantité du sperme qui est toujours très concentré, on laisse au repos les milieux pendant 48 heures à 20°C. Après 48 heures on observe normalement un jeune bivalve à deux coquilles bien formées avec une charnière bien droite qui donne la forme d'un "D" majuscule parfait ; c'est pourquoi par commodité on parle de "larve D". A ce stade la larve est ciliée et nageuse, et se déplace très rapidement. C'est à ce moment que l'on arrête l'expérience par une fixation au formol neutre, les embryons se déposent alors au fond des récipients, une quantité connue sera alors prélevée à la pipette pour observation et comptage au microscope.

2.5. Mesure du taux d'anormalité

Pour les cinq sites observés, c'est à dire les cinq sédiments testés, on fait quatre répliquats au moment de la fécondation et l'on effectue au moins deux répliquats lors du comptage des larves. Dans une fraction de 2 cc, on compte tous les embryons, et on calcule le pourcentage des anormaux par rapport au nombre total. Sont considérés comme anormaux tous ceux qui n'ont pas la forme et la taille d'une larve "D" parfaite, y compris les ovocytes non fécondés. Un grand nombre d'anomalies peuvent exister.

Ce taux d'anormalité observé correspond au "pourcentage brut d'anormalité" dit "PBA" en fait les résultats sont toujours exprimés en "pourcentage net" dit "PNA"

obtenu par transformation selon la formule de Abott* qui fait intervenir la qualité du témoin, soit :

$$PNA = \frac{(PBA_{\text{test}} - PBA_{\text{Témoin}})}{(100 - PBA_{\text{Témoin}})} \times 100$$

La réussite est rarement de 100 % dans les témoins, il arrive au contraire curieusement que le taux d'anormalité y soit supérieur à celui des milieux contaminés, on a alors un PNA d'ordre négatif.

2.6. Chimie

Les analyses chimiques des sédiments n'ont été faites que de façon ponctuelle, en automne 1994 et au printemps 1996, ainsi l'absence de suivi n'aide pas à l'interprétation des résultats, on retiendra cependant que les secteurs étudiés ne sont pas considérée comme "pollués", en terme de chimiste, en ce qui concerne les métaux, les pesticides et les carbures aromatiques. (tableau ci-après).

* Abott, 1980. In Anonyme - Standard methods for the examination of water and wastewater, 15th ed. ; American Public Health Association, Washington, D.C., 301 p.

Pourcentage net d'anormalité

	cadmium	cuivre	plomb	zinc	pcb"138"
	mg/kg de poids sec				µg/kg
automne 94					
honfleur	0,1	6	17	37	1,6
cabourg	0,4	8,5	17	47	2,5
ouistreham	0,3	12,7	22	62	3,2
brévands	0,1	2,2	9	19	0,5
géfosse	0,1	1,5	7	11	0,5
printemps 96					
honfleur	0,6	12	23	67	22
cabourg	0,1	3,2	7	27	7,2
ouistreham	0,1	3	5,2	25	
brévands	0,1	0,7	2,8	14,6	
géfosse	0,1	0,1	4,4	17	

De toutes façons il ne faut pas perdre de vue que ces tests permettent d'observer une **réponse biologique globale d'un organisme à un milieu**, et que même une connaissance exacte voire "exhaustive" de la composition chimique des sédiments ne permettrait pas d'attribuer à tel ou tel composé chimique une anomalie donnée de l'embryogenèse.

3. Résultats

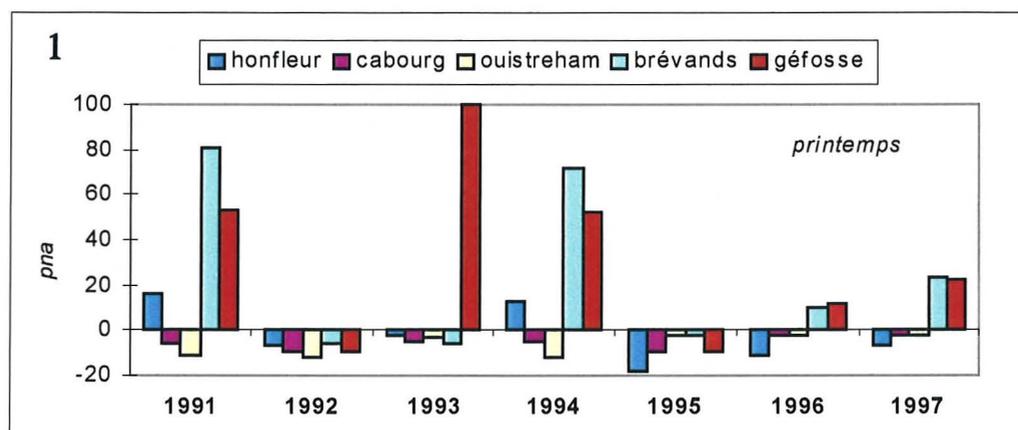
Les résultats exprimés en **pourcentage net d'anormalité** dit "PNA" s'avèrent en fait très délicats à interpréter. Ils sont résumés sous forme de tableaux et cinq histogrammes permettent la comparaison entre sites, saisons et années.

3.1. Comparaison entre les différents sites par année pour chaque année de 91 à 97

La comparaison du PNA entre sites de 1991 à 1997 (graphiques 1 et 2 ci-après) montre une faible toxicité au printemps, sauf à Brévands et à Géfosse situés sur la Baie des Veys, et une toxicité nettement supérieure en automne sur tous les sites entre 1991 et 1994, avec un gradient augmentant de l'est vers l'ouest avec des valeurs de PNA atteignant 50 à 100 % ; on observe par contre un net contraste lors des deux automnes suivants où les valeurs sont inférieures à 25% en 1995 et en 1996.

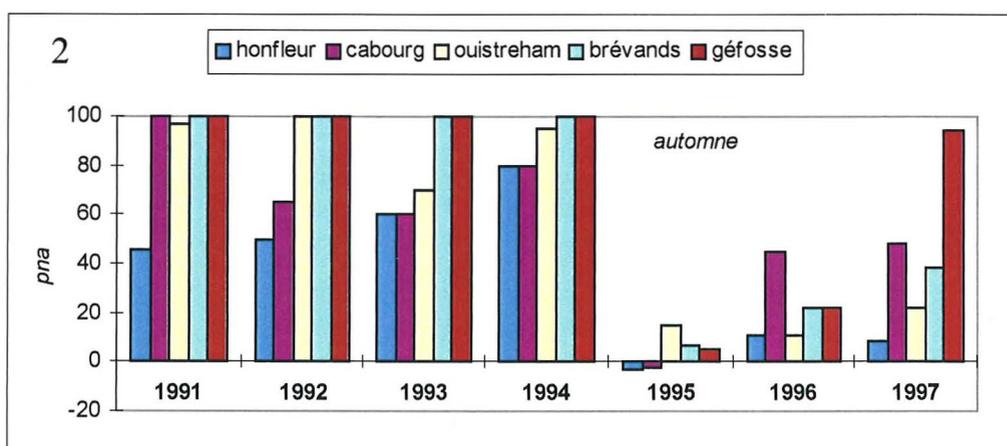
Pourcentage net d'anormalité

<i>printemps</i>	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997
honfleur	16	-7	-2	13	-18	-11	-7
cabourg	-6	-9	-5	-5	-9	-2	-2
ouistreham	-11	-12	-3	-12	-2	-2	-2
brévands	81	-6	-6	72	-2	10	23
géfosse	53	-9	100	52	-9	12	22



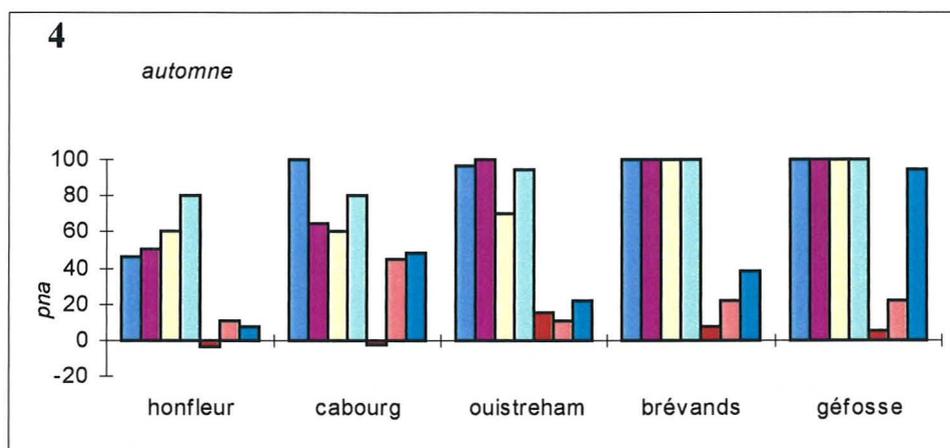
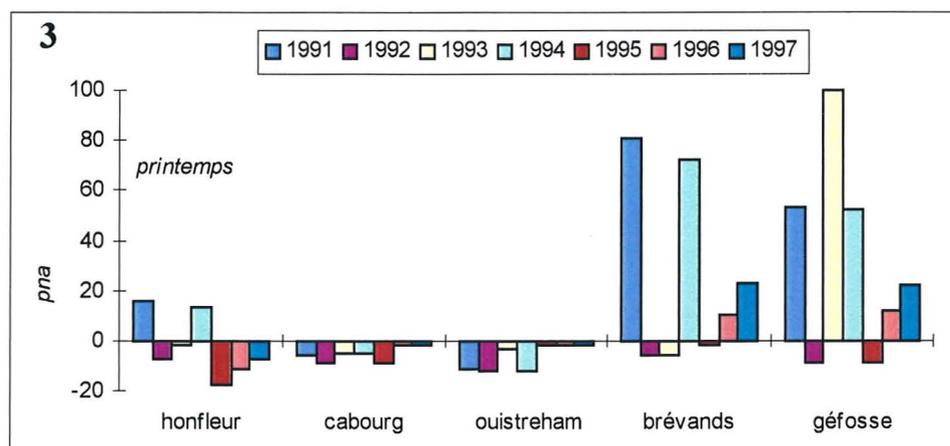
Pourcentage net d'anormalité

<i>automne</i>	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997
honfleur	46	50	60	80	-3	11	8
cabourg	100	65	60	80	-2	45	48
ouistreham	97	100	70	95	15	11	22
brevands	100	100	100	100	7	22	38
gefosse	100	100	100	100	5	22	94



3.2. Evolution au cours des six années à chaque site :

Les graphiques 3 & 4 mettent mieux encore en évidence une plus forte toxicité des sédiments dans la Baie des Veys comparativement aux autres sites, au printemps d'une part, et surtout en automne, en 1991, 1992, 1993 et 1994.

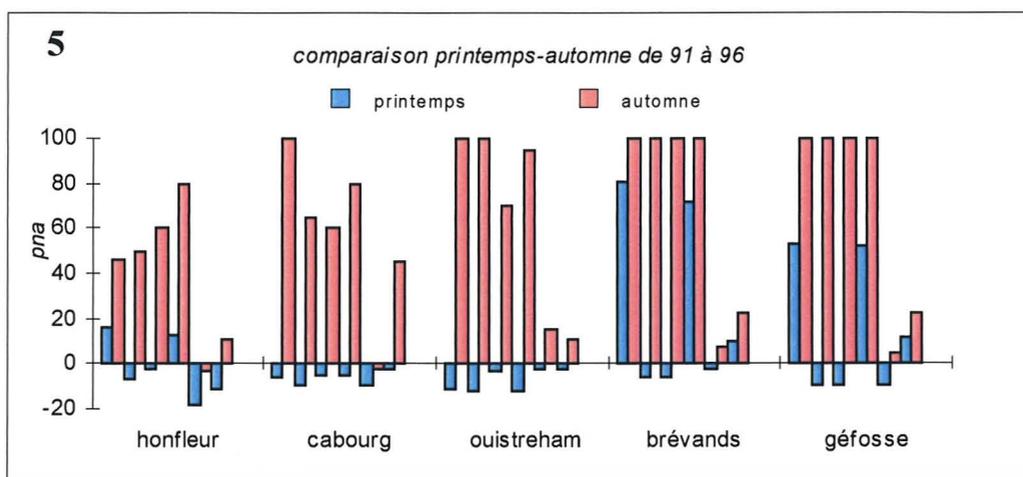


3.3. Comparaison entre le printemps et l'automne

Le graphique 5, ci-après, montre pour chaque site l'alternance "printemps-automne" des valeurs du PNA sur six ans : dans tous les cas, pour les 12 tests, on voit une toxicité nettement supérieure en automne, et parfois de façon spectaculaire comme à Cabourg et à Ouistreham où le PNA augmente par exemple de -12% à 95 %.

Pourcentage net d'anormalité

	printemps 91	automne 91	printemps 92	automne 92	printemps 93	automne 93	printemps 94	automne 94
honfleur	16	46	-7	50	-2	60	13	80
cabourg	-6	100	-9	65	-5	60	-5	80
ouistreham	-11	100	-12	100	-3	70	-12	95
brévands	81	100	-6	100	-6	100	72	100
géfosse	53	100	-9	100	-9	100	52	100
	printemps 95	automne 95	printemps 96	automne 96	printemps 97			
honfleur	-18	-3	-11	11	-7			
cabourg	-9	-2	-2	45	-2			
ouistreham	-2	15	-2	11	-2			
brévands	-2	7	10	22	23			
géfosse	-9	5	12	22	22			



Conclusion

Si l'analyse chimique des sédiments met en évidence des éléments toxiques à faible dose on ne peut cependant pas définir ces zones comme étant polluées mais on voit que l'expérimentation sur un matériel *vivant*, au moment très vulnérable qu'est la formation de l'embryon, met en évidence une toxicité parfois très forte (jusqu'à

100 %). Cette toxicité est bien démontrée dans les sédiments des rives de ces cinq estuaires : faible au printemps, nettement plus forte en automne, et beaucoup plus marquée du côté de la Baie des Veys que vers l'embouchure de la Seine. On remarquera surtout que la Baie des Veys qui est considérée comme une zone saine et prise le plus souvent comme une référence dans beaucoup d'études, révèle avec ces tests un aspect plutôt mauvais... Il apparaît aussi que le contraste entre le printemps et l'automne est nettement plus marqué là où se trouvent des ports de plaisance très fréquentés comme à Cabourg et à Ouistreham où s'ajoute l' influence de la ville de Caen. La baisse de la toxicité à partir de 1995 est nette et correspond à la reprise d'un régime de pluie normal après plusieurs années de faibles précipitations.

Cette étude correspond à un défrichage sérieux qui peut servir à l'établissement d'un programme d'action sur plusieurs années au cours desquelles on arriverait à distinguer les écarts entre les variations naturelles sur les sites et les apports de polluants.



Référence Bibliographique : G. Lefèvre-Lehoërff, F. Quiniou, F. Toularastel - Rapport IFREMER n° DRO.EL-91.09 - Utilisation des bioessais sur les embryons de bivalves dans le cadre d'une surveillance des effets biologiques