

43935

N713-7-QVI-T

DEL 29/6

Direction de l'Environnement et des Recherches Océaniques

F

DÉPARTEMENT ENVIRONNEMENT
LITTORAL ET GESTION DU MILIEU
MARIN

TAUX DE REUSSITE DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE
DE LA MOULE ET DE L'HUITRE CREUSE
EN PRESENCE D'EAU OU DE SEDIMENT COTIER DE LA BAIE DE SEINE

Françoise QUINIOU

N713-7
QVI
T



IFREMER

IFREMER - Centre de BREST
BP. 70 - 29263 PLOUZANE
Tél 98 22 40 40 - Télex 940627 F

DERO. EL-89.03

IFREMER
Centre de BREST
S.D.P.
B.P. 70
29263 PLOUZANE
Tél. : 98.22.40.40
Télex 940 627

DIRECTION ENVIRONNEMENT
ET RECHERCHES OCEANIQUES

DEPARTEMENT ENVIRONNEMENT LITTORAL

AUTEUR(S) : Françoise QUINIOU		CODE : N° <u>DERO/89-03/EL</u>
TITRE TAUX DE REUSSITE DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DE LA MOULE ET DE L'HUITRE CREUSE EN PRESENCE D'EAU OU DE SEDIMENT COTIER DE LA BAIE DE SEINE.		Date : 31 Janvier 1989 Tirage nb : 20 Nb pages : 13 Nb figures : 4 Nb tableaux : 1
CONTRAT (intitulé) N° <u>53/87</u>	Convention Ministère de l'Environ- nement / IFREMER-RNO	DIFFUSION Libre <input type="checkbox"/> Restreinte <input type="checkbox"/> Confidentielle <input type="checkbox"/>
<u>RESUME</u> - Une étude préalable à la mise en route, dans le cadre du RNO, d'un programme de surveillance des effets biologiques a été menée en recherchant l'effet de la présence d'eau ou de sédiment côtier de la baie de Seine sur le développement embryonnaire de la moule et de l'huître creuse. Les résultats montrent que ce test est très intéressant à proposer dans le cadre d'une surveillance biologique, après mise au point spécifique du protocole expérimental pour le suivi du sédiment. -		
Mots-clés : Surveillance biologique. Baie de Seine. Développement embryonnaire. Moule. Huître creuse.		
Key words :		



Ifremer Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer

CONVENTION N° 53/87

MINISTERE DE L'ENVIRONNEMENT / IFREMER

TAUX DE REUSSITE DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE

DE LA MOULE ET DE L'HUITRE CREUSE

EN PRESENCE D'EAU OU DE SEDIMENT COTIER DE LA BAIE DE SEINE

Françoise QUINIOU

INTRODUCTION.

La mise en place, au sein du RNO, d'une surveillance des effets de contaminants sur les organismes marins, répond à un besoin exprimé au plan international par le Groupe Conjoint de Contrôle et Surveillance Continus (GCCSC) des Conventions d'Oslo et Paris, par les groupes de travail "Effets biologiques" de la Commission Océanographique Internationale (COI/UNESCO) ainsi que par le Conseil International pour l'Exploration de la Mer (CIEM). Mais les méthodes possibles de détection de l'impact biologique d'une pollution sont multiples, allant du subcellulaire à la communauté. Par ailleurs, il existe de nombreux tests pour évaluer la toxicité de produits dont certains déjà normalisés (AFNOR), mais ils ne sont pas applicables au milieu lui-même.

Plusieurs programmes de recherche ont été initiés à l'IFREMER pour cette surveillance biologique. Ils ont pour objectif de comparer la qualité biologique de l'eau d'une zone reconnue comme étant polluée, la baie de Seine, à celle d'une zone reconnue non polluée, choisie dans la région "Ouest-Bretagne", ceci en tentant de mettre en évidence un effet des polluants sur les organismes marins.

Le but de notre étude est de tester la faisabilité d'une technique rapide et facilement réalisable, pour la mise en place d'une surveillance des effets biologiques de la qualité de l'eau. La moule (Mytilus edulis) et l'huitre creuse (Crassostrea gigas) ont été choisies en raison de leur intérêt économique et leur très large répartition géographique. De nombreux auteurs (cf. annexe 1) utilisent ces espèces dans le cadre d'études de toxicité.

La phase du développement embryonnaire a été retenue en raison de sa très grande sensibilité à la qualité du milieu et particulièrement chez l'huitre creuse (WOELKE, 1972 ; MARTIN et al., 1981). Pendant cette période, l'oeuf fécondé se transforme en larve "D", première étape de la vie larvaire. La durée de cette phase a l'avantage d'être courte (48 h chez la moule et 24 h chez l'huitre creuse), ce qui permet l'obtention d'une réponse rapide aux altérations du milieu testé. Les embryons ne nécessitant aucun apport de nourriture avant d'atteindre le stade larve "D", seule la qualité de l'eau peut être responsable des effets observés.

1. MATERIEL ET METHODES.

1.1. Prélèvements en baie de Seine.

1.1.1. Lieux et dates.

Le secteur de Honfleur et Villerville a été choisi, car cette zone est reconnue comme fortement contaminée par les apports de la Seine et les dépôts de dragages portuaires, tout en restant sous une influence marine (figure 1).

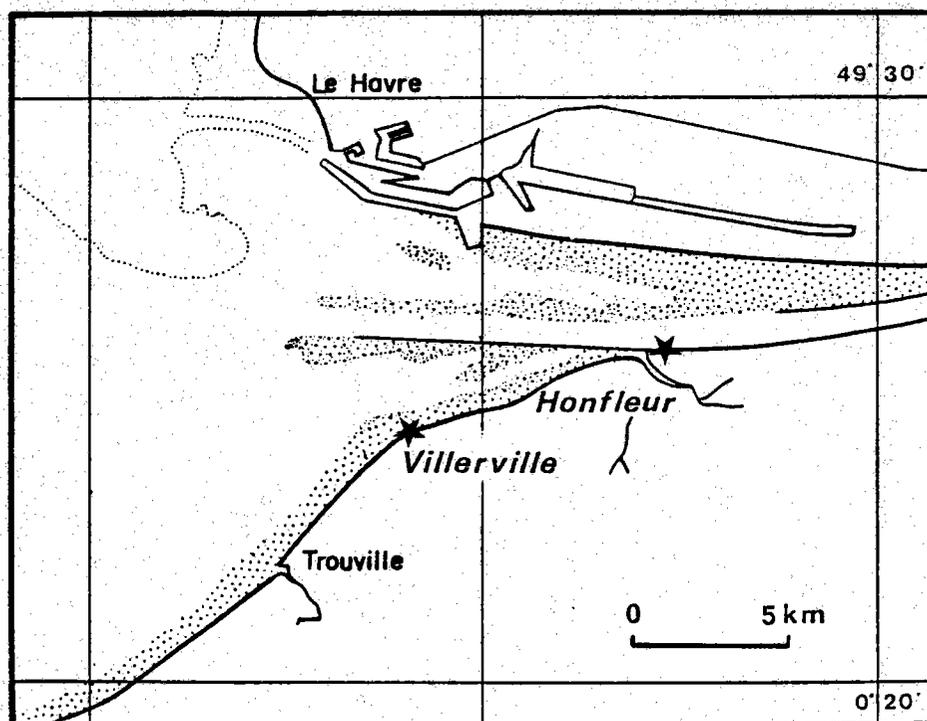


Figure 1 : Situation des stations de prélèvement d'eau et sédiment : Honfleur et Villerville.

Une première sortie, le 25 mai 1988, a permis de reconnaître les lieux et de prélever les échantillons d'eau et de sédiment à basse mer à proximité du radar de Honfleur.

Le 11 juillet, une seconde sortie de prélèvements d'eau a été réalisée à Honfleur (basse mer) et à Villerville (pleine mer, mi-marée et basse mer).

1.1.2. Modes de prélèvement et de conservation.

L'eau de mer est filtrée sur une soie de 200 μ m de vide de maille afin d'éliminer les "macro-déchets", et recueillie dans des flacons de verre propres d'un volume de un à deux litres. Le sédiment est prélevé à l'aide de boîtes de pétri stériles (diamètre 8.7 cm) afin de ne prendre que la partie superficielle (1 cm) susceptible d'être remise en suspension dans le milieu au moment de la pleine mer, libérant ainsi une partie des "polluants" piégés par les particules de vase.

Une fois réalisés, tous les échantillons sont ramenés au laboratoire et conservés au congélateur pour leur utilisation ultérieure.

1.2. Les bivalves.

1.2.1. Origine des géniteurs (annexe 2).

Il est possible de trouver des moules naturellement matures depuis la fin de l'hiver jusqu'à l'automne ; pour les huîtres la période de maturité naturelle est estivale et plus courte (LE PENNEC, 1978). Cependant, il est facile de se procurer des géniteurs prêts à pondre auprès des écloseries pendant presque toute l'année.

Pour l'expérience du 30 juin, les moules proviennent de Morgat en baie de Douarnenez. Les tests du 07 juillet ont été réalisés avec des huîtres fournies par l'écloserie du Centre IFREMER de La Tremblade ; celles du 21 juillet sont issues du bassin d'Arcachon.

1.2.2. Maintenance des géniteurs.

Afin de pouvoir réaliser les tests dans les conditions optimales, il s'avère souvent nécessaire de maintenir les géniteurs matures un ou deux jours en stabulation. Cette maintenance s'effectue dans une salle thermostatée à la température de 18 à 20°C pour les moules et de 20 à 22°C pour les huîtres.

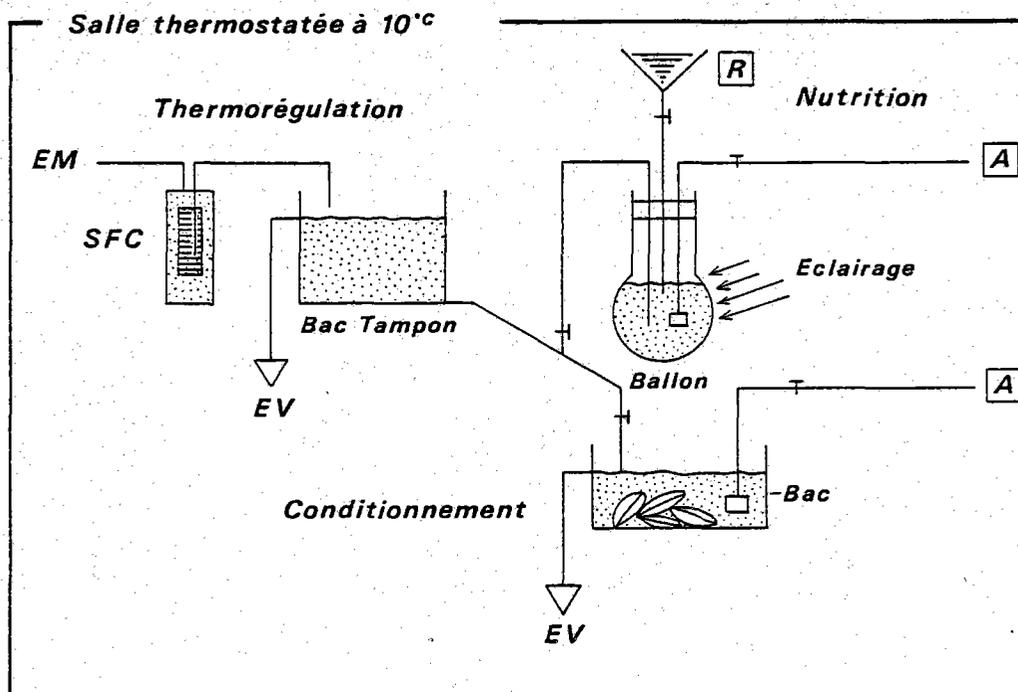


Figure 2 : Schéma de l'unité de maintenance des géniteurs en circuit ouvert

EM : arrivée d'eau de mer.

EV : évacuation du trop plein.

SFC : système de filtration "CUNO" 10 µm.

R : entonnoir de remplissage.

A : arrivée d'air.

La figure 2 présente le schéma de l'unité de maintenance fonctionnant au laboratoire. L'eau de mer fournie par la station de pompage est filtrée à 10 μm puis recueillie dans un bac "tampon" assurant la thermorégulation. Les géniteurs au nombre de 15 à 20 par bac de 20 litres, sont alimentés par un système de goutte à goutte fournissant cinq à dix litres de culture d'algues phytoplanctoniques par jour. Cette culture peut être mono ou plurispécifique et d'une densité de 2 à $5 \cdot 10^6$ cellules par litre. Les espèces utilisées le plus couramment sont : Skeletonema costatum, Tetraselmis suecica, Isochrysis galbana, Pavlova lutheri et Chaetoceros calcitrans.

1.2.3. Induction de la ponte.

La méthode utilisée dérive des techniques de culture des larves de bivalves décrites par LOOSANOFF et DAVIS (1963) et HIS et ROBERT (1986).

Les géniteurs sont débarrassés de leur épifaune et brossés énergiquement. Ils sont ensuite mis à dégorger dans de l'eau propre (eau témoin) filtrée à 1 μm sur filtre industriel : un à deux bains d'une demi-heure suffisent. L'induction de la ponte est alors provoquée par chocs thermiques et stimulation chimique (ajout d'une suspension de gamètes d'animaux sacrifiés). Quand le processus de ponte est engagé, chaque géniteur est isolé dans un bécher contenant 1 litre d'eau témoin filtrée à 0.2 μm . Après passage sur un tamis stérile de 100 μm de vide de maille pour retenir les débris, les ovocytes sont recueillis sur un tamis stérile de 32 μm .

La technique de scarification des gonades peut être appliquée lorsque les animaux n'émettent pas leurs produits génitaux spontanément. Cependant, cela peut entraîner des artefacts dus à la présence de gamètes non mûres et il est nécessaire d'en tenir compte lors de l'examen des résultats.

1.3. Caractéristiques des expériences.

1.3.1. L'eau de mer.

L'eau employée dans les élevages témoins provient de l'écloserie du Centre IFREMER d'Argenton, où sa qualité est reconnue excellente toute l'année.

Trois types de milieux ont été testés :

- en ajoutant à l'eau témoin un pourcentage croissant de l'eau provenant de la Seine (salinité (3 ‰)).
- en réalisant des élevages directement dans l'eau prélevée à Villerville.
- en ajoutant à l'eau témoin un pourcentage croissant d'eau dans laquelle du sédiment a été remis en suspension. Pour cela : 100 g de sédiment, récoltés à basse-mer à Honfleur, sont remis en suspension dans un litre d'eau témoin pendant une heure ; le surnageant est ensuite prélevé, filtré et incorporé au milieu d'élevage. Ceci de façon à obtenir des solutions correspondant à une remise en suspension de 5 à 100 g de sédiment par litre.

Dans tous les cas, la salinité de l'eau est ramenée à 30 ‰. Les milieux testés sont filtrés sur membrane de 0.2 μm de vide de maille, à l'exception de l'eau où a été remis en suspension le sédiment filtré, elle, sur membrane de 0.45 μm .

1.3.2. Les élevages.

Une fois recueillis, les ovocytes sont comptés et répartis à raison de 30 000/1 dans des béchers stériles contenant 30 ml de milieu à tester.

La fécondation est réalisée dans la demi-heure qui suit l'émission des gamètes (1.5 cc de sperme/l d'élevage) et directement dans l'eau à tester, certains altéragènes pouvant avoir une action directe sur les gamètes (HIS et ROBERT, 1980). Un seul couple de géniteurs est utilisé pour éviter l'intervention de facteurs génétiques.

Les élevages sont maintenus à l'obscurité et sans bullage : pendant 48 h à la température de $20 \pm 1^\circ\text{C}$ pour les moules, et durant 24 h à $24 \pm 1^\circ\text{C}$ pour les huîtres creuses. A la fin de l'incubation, les élevages sont observés immédiatement ou formolés (8 à 10 %) pour un examen ultérieur.

1.3.3. Examen pratique des larves.

Quatre catégories ont été prises en compte : les larves mortes, les trocophores aberrantes, les larves "D" anormales et les larves "D" normales. Une larve "D" normale étant définie comme une larve ayant une coquille en forme de D aux bords réguliers, pouvant contenir la totalité des organes à la fermeture des valves.

Pour chaque élevage, les comptages sont effectués sur 200 à 400 larves, un pourcentage du taux de larves anormales est alors établi. Les anomalies observées peuvent être dues au milieu testé ou à la qualité des produits génitaux. Les résultats sont donc exprimés en pourcentage net d'obtention de larves anormales. Un fort pourcentage indiquant une piètre qualité du milieu.

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

2. RESULTATS.

2.1. Effet de la présence d'eau de la baie de Seine.

2.1.1. Eau de mer de Villerville.

La série de tests réalisée (le 21 juillet) avec l'eau prélevée à Villerville à trois moments de la marée n'a pu être exploitée. Les résultats obtenus sont aberrants et peu fiables en raison d'un problème lié à la filtration de l'eau de culture.

2.1.2. Milieu contenant de l'eau de la Seine.

Dans cette expérience, un milieu contenant 2.5 à 20 % d'eau de la Seine a été testé sur le développement embryonnaire de Crassostrea gigas.

Le taux de mortalité observé est nul, mais l'on observe (figure 3) que le pourcentage de larves anormales dépasse 30 % dès qu'il y a plus de 7.5 % d'eau provenant de la Seine dans le milieu. Les résultats correspondent à la moyenne des comptages réalisés sur deux à quatre répliquats.

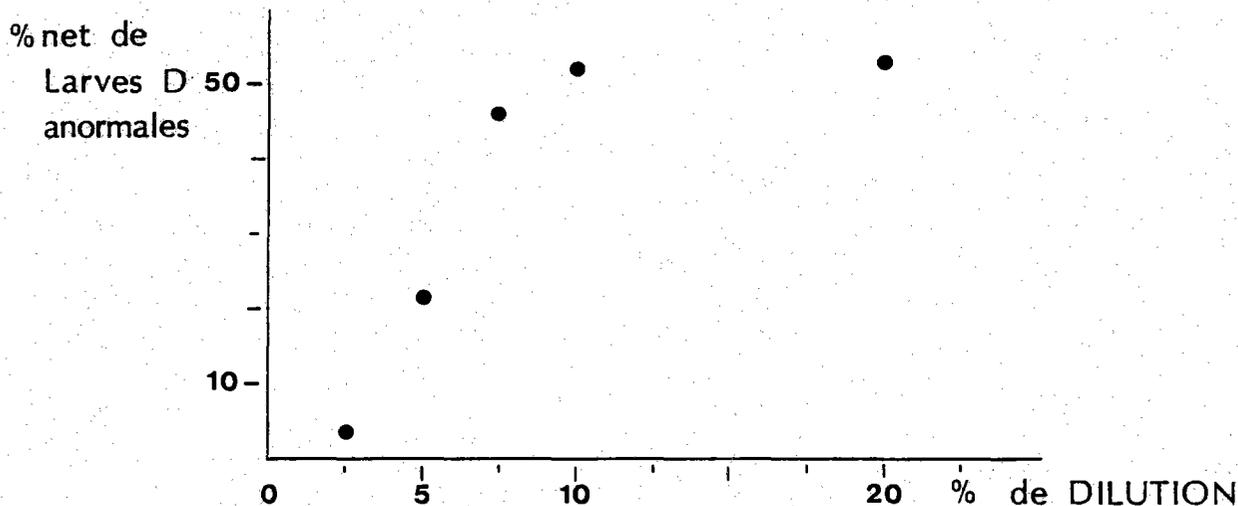


Figure 3 : Pourcentage net de larves "D" anormales chez Crassostrea gigas en fonction du pourcentage d'eau de la Seine présent dans le milieu d'élevage.

2.2. Effet de la présence de sédiment.

La figure 4 présente les résultats obtenus au cours du développement embryonnaire de la moule (48 h) et de l'huître creuse (24 h). La réponse est tout à fait semblable pour les deux organismes ; en effet, dès que l'eau d'élevage correspond à une remise en suspension de 30 à 40 g de sédiment par litre, le taux de larves anormales se situe aux environs de 50 %. Au-dessus de 50 g de sédiment/l, ce taux d'anomalie dépasse 80 %. Du fait de la durée du développement embryonnaire, deux fois plus longue chez la moule, il apparaît que l'huître creuse a une sensibilité double de la moule ; ce qui corrobore les résultats de WOELKE (1972) et MARTIN et al. (1981) pour le zinc et le plomb.

2.3. Conclusions.

Les résultats de cette étude préliminaire montre que pour la surveillance de la qualité du milieu marin il est tout à fait possible d'utiliser le test proposé. Car une larve anormale au stade larve "D" a peu de chance d'atteindre le stade juvénile, et un taux élevé d'anomalie signifie que la population concernée aura un moins bon recrutement.

3. CONCLUSION.

La mise en oeuvre d'un tel test ne demande pas d'investissements trop importants, si ce n'est une eau de mer témoin de bonne qualité, et pourrait être réalisé en surveillance de routine comme le proposent WOELKE

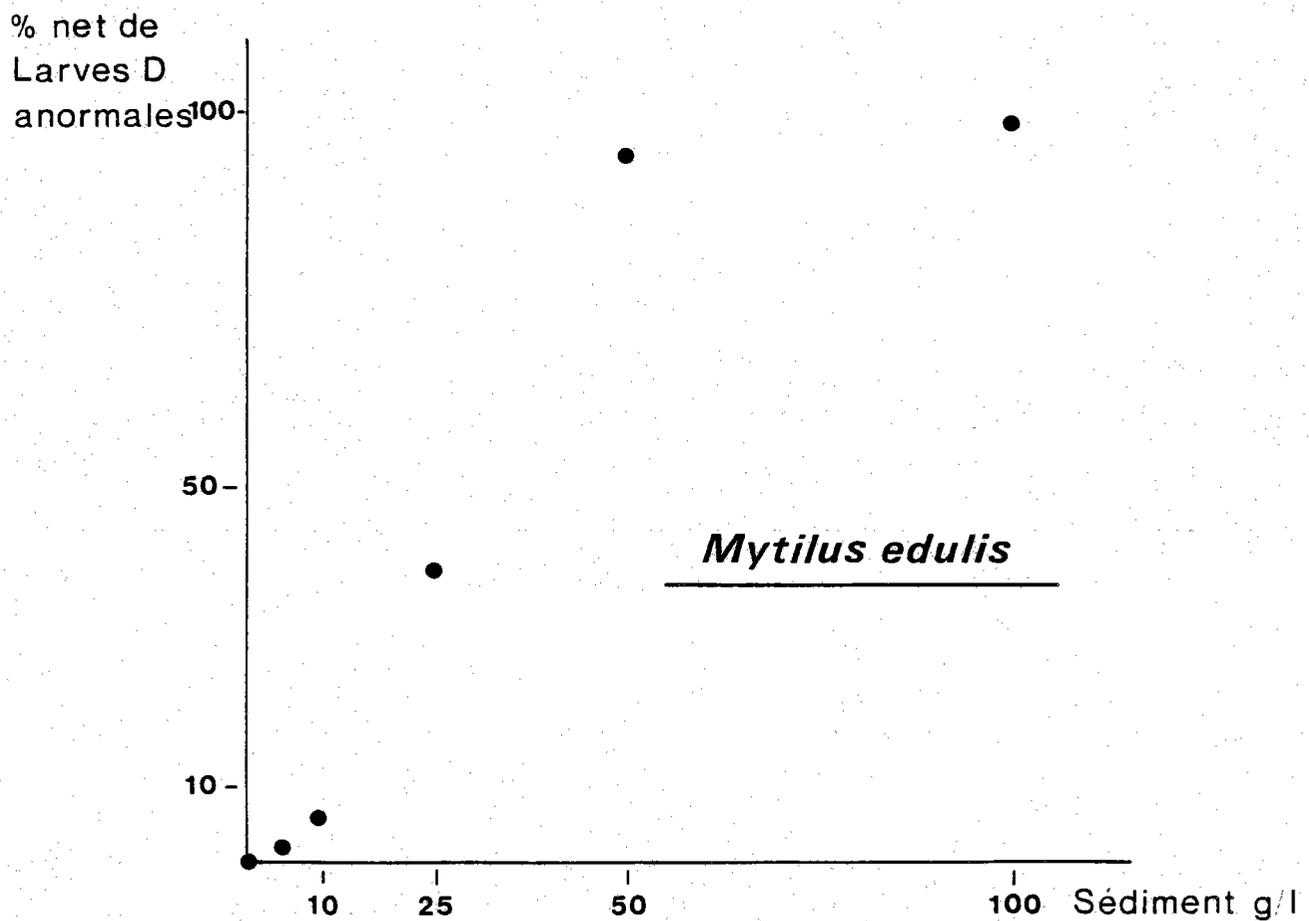
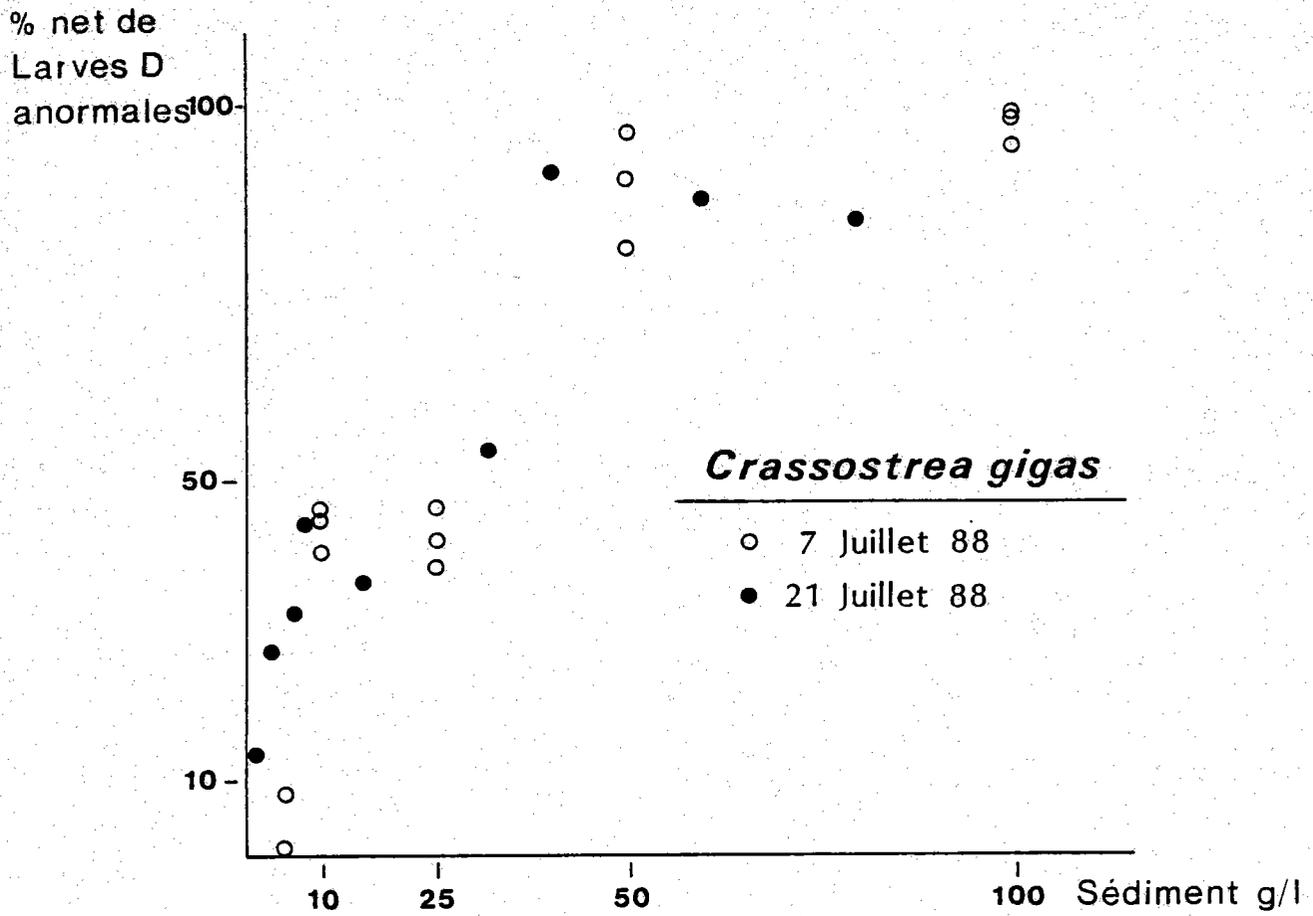


Figure 4 : Pourcentage net de larves "D" anormales en fonction de la quantité de sédiment remis en suspension dans le milieu d'élevage.

(1972) et THAIN et WATTS (1987). Si Crassostrea gigas est très sensible et permet l'obtention d'une réponse rapide, elle ne peut être employée que comme "indicateur" de la qualité du milieu (MARTIN et al., 1981). En effet, la moule et le crabe (Cancer magister) montrent une sensibilité de deux à dix fois supérieure pour certains métaux (MARTIN et al., 1981). Il serait donc judicieux de disposer d'une panoplie d'espèces animales permettant de détecter le plus grand nombre de "polluants".

Par ailleurs, si la surveillance de la qualité du milieu ou des rejets semble primordiale, il paraît indispensable d'y inclure la surveillance de la qualité du sédiment, piège de toutes les "toxines" contenues dans l'eau et susceptibles d'être remises en suspension dans le milieu. Ce compartiment (sédiment) est couramment suivi dans des études de "toxicologie" des eaux douces (VAN DE GUCHTE et al., 1988) ; sa contamination et décontamination peuvent être suivies par des élevages (CHAPMAN et MORGAN, 1983).

Si le test sur le développement embryonnaire permet l'obtention rapide d'une indication sur la qualité du milieu, des précisions peuvent être obtenues en suivant le taux de croissance larvaire des bivalves et celui de la multiplication cellulaire des algues fourrage (HIS et ROBERT, 1986 ; ROBERT et al., 1986).

A N N E X E 1

Bibliographie non exhaustive sur les tests réalisés au cours
du développement embryonnaire et larvaire
de Mytilus edulis et Crassostrea gigas

- BAYNE, B.L., 1969 - Growth and the delay of metamorphosis of the larvae of Mytilus edulis (L). Ophelia, 2 : 1-47.
- BEAUMONT, A.R., TSERPES, G. et BUDD, M.D., 1987 - Some effects of copper on the veliger larvae of the mussel Mytilus edulis and the scallop Pecten maximus (Mollusca, Bivalvia). Mar. Env. Res., 21 : 299-309.
- BERG, C.J., 1971 - Review of possible causes of mortality of oyster larvae of the genus Crassostrea in Tomales Bay, California. Fish and Game, 57 (1) : 69-75.
- BRERETON, A., LORD, H., THORNTON, I. et WEBB, J.S., 1973 - Effect of zinc on growth and development of larvae of the pacific oyster Crassostrea gigas. Marine Biology, 19 : 96-101.
- CALABRESE, A. et DAVIS, H.C., 1970 - Tolerances and requirements of embryos and larvae of bivalves molluscs. Helgoländer Wiss. Meeresunters., 20 : 553-564.
- CALABRESE, A., COLLIER, R.S., NELSON, D.A. et MACINNES, J.R., 1973 - The toxicity of heavy metals to embryos of the American oyster Crassostrea virginica. Marine Biology, 18 : 162-166.
- CALABRESE, A., MACINNES, J.R., NELSON, D.A. et MILLER, J.E., 1977 - Survival and growth of bivalve larvae under heavy-metal stress. Marine Biology, 41 : 179-184.
- CHAPMAN, P.M. et LONG, E.R., 1983 - The use of bioassays as part of a comprehensive approach to Marine pollution assessment. Marine Pollution Bulletin, 14 (3) : 81-84.
- CHAPMAN, P.M. et MORGAN, J.D., 1983 - Sediment bioassays with oyster larvae. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 31 : 438-444.
- CONNOR, P.M., 1972 - Acute toxicity of heavy metals to some marine larvae. Mar. Pollut. Bull., 3 : 190-192.
- DAVIS, H.C. et HIDU, H., 1969 - Effects of pesticides on embryonic development of clams and oysters and on survival and growth of the larvae. Fish. Bull. Fish. Wildl. Serv. U.S., 67 : 393-404.
- DESLOUS-PAOLI, J.M., 1982 - Toxicité des éléments métalliques dissous pour les larves d'organismes marins : données bibliographiques. Rev. Trav. Inst. Pêches Marit., 45 (1) : 73-83.

- GARLAND, C.D., COOKE, S.L., MACMEEKIN, T.A. et VALENTINE, J.E., 1986 - Effects of 0.2 μ m membrane - filtered seawater as a culture medium on fertilized eggs and larvae of the pacific oyster, Crassostrea gigas. Aust. J. Mar. Freshw. Res., 37 : 713-720.
- GRANMÖ, A., 1972 - Development and growth of eggs and larvae of Mytilus edulis exposed to a linear dodecylbenzenesulphonate (LAS). Marine Biology, 15 : 356-358.
- HELM, M.M. et MILLICAN, P.F., 1977 - Experiments in the hatchery rearing of pacific oyster larvae (Crassostrea gigas Thunberg). Aquaculture, 11 : 1-12.
- HIS, E. et ROBERT, R., 1980 - Action d'un sel organo-métallique l'acétate de tributyl-étain sur les oeufs et les larves D de Crassostrea gigas (Thunberg). C.I.E.M., C.M. 1980/F : 27 : 10 p.
- HIS, E. et ROBERT, R., 1981 - Effects of copper chloride on the eggs and D larvae of Crassostrea gigas (Thunberg). C.I.E.M., C.M. 1981/F : 43 : 13 p.
- HIS, E. et ROBERT, R., 1982 - Les dangers de traitement par le sulfate de cuivre en zone conchylicole : toxicité vis-à-vis des oeufs et des jeunes larves de Crassostrea gigas. Rev. Trav. Inst. Pêches Marit., 45 (2) : 117-125.
- HIS, E., MAURER, D. et ROBERT, R., 1983 - Estimation de la teneur en acétate de tributyl-étain dans l'eau de mer, par une méthode biologique. J. mall. Stud., Suppl. 12 (A) : 60-68.
- HIS, E., ROBERT, R. et MAURER, D., 1983 - Recherches expérimentales sur les causes des anomalies de la reproduction de Crassostrea gigas (Thunberg) dans le bassin d'Arcachon. Contrat D.G.R.S.T. n° 82 J. 0657 : 58 p.
- HIS, E. et ROBERT, R., 1985 - Développement des véligères de Crassostrea gigas dans le bassin d'Arcachon. Etudes sur les mortalités larvaires. Rev. Trav. Inst. Pêches Marit. 47 (1) : 63-88.
- HIS, E. et ROBERT, R., 1986 - Utilisation des élevages larvaires de Crassostrea gigas en écotoxicologie marine. Haliotis, 15 : 301-308.
- HRS-BRENKO, M. et CALABRESE, A., 1969. The combined effects of salinity and temperature on larvae of the mussel Mytilus edulis. Marine Biology, 4 (3) : 224-226.
- HRS-BRENKO, M., CLAUS, C. et BUBIC, S., 1977 - Synergistic effect of lead, salinity and temperature on embryonic development of mussel Mytilus galloprovincialis. Marine Biology, 44 : 109-115.
- LE PENNEC, M., 1978 - Génèse de la coquille larvaire et post-larvaire chez divers bivalves marins. Thèse Doc. es-Sciences Nat., UBO, 2 tomes
- LE PENNEC, M. et LE ROUX, S., 1979 - Effets d'un pétrole brut sur la formation de la coquille de Mytilus edulis (L.) (Mytiliaie Bivalvia). Rev. Int. Océanogr. Mel., 55 : 49-55.

- LE ROUX, S., 1975 - The toxicity of pure hydrocarbons to mussel larvae. Rapp. P.V. réun. Cons. Int. Explor. Mer, 171 : 189-190.
- LUCAS, A., 1975 - Remarques méthodologiques sur l'emploi des larves de moules comme tests biologiques. Haliotis, 5 : 126-132.
- LUCAS, A. et LE ROUX, S., 1975 - Mise en évidence de la toxicité de divers pétroles bruts vis-à-vis des larves de moule. C.R. Acad. Sci., Paris, 280 (série D) : 2381-2384.
- LOOSANOFF, V.L. et DAVIS, N.C., 1963 - Rearing of bivalve mollusks. Adv. mar. biol., 1 : 1-136.
- MARTIN, M., OSBORN, K.E., BILLY, P. et GLICKSTEIN, N., 1981 - Toxicities of ten metals to Crassostrea gigas and Mytilus edulis embryos and Cancer magister larvae. Marine Pollution Bulletin, 12 (9) : 305-308.
- NELSON, D., MILLER, J., PEREIRA, J. et CALABRESE, A., 1983 - Monitoring water quality at a dredge spoil dump site using oyster larvae. C.I.E.M., C.M. 1983/E : 59 : 8 p.
- PAVICIC, J., 1976 - Combined cadmium-zinc toxicity on embryonic development of Mytilus galloprovincialis Lam. (Mollusca, Mytilidae). IIIes Journées Etud. Pollutions, Split, CIEM : 79-80.
- RENZONI, A., 1973 - The influence of some detergents on the larval life of marine bivalve larvae. Atti Ve coll. int. océanogr. med., Messina : 101-104.
- RENZONI, A., 1973 - Influence of crude oil, derivatives and dispersants on larvae. Mar. Poll. Bull., 4 (1) : 9-13.
- RENZONI, A., 1974 - Ulteriori dati sull'influenza di tensioattivi sulla vita larvale di alcuni bivalvi marini. Archivio di oceanografica e limnologia, 18 (2) : 99-113.
- RENZONI, A., 1974 - Influence of toxicants on marine invertebrate larvae. Thalassia jugoslavica, 10 (1 & 2) : 197-211.
- RENZONI, A., 1975 - Toxicity of three oils to bivalve gametes and larvae. Mar. Poll. Bull., 6 (8) : 125-128.
- ROBERT, R., HIS, E. et MAURER, D., 1982 - L'unité d'écophysiologie et de molysmologie larvaires des bivalves d'intérêt commercial du laboratoire ISTPM d'Arcachon. Rev. Trav. Inst. Pêches Marit., 45 (3) : 197-209.
- ROBERT, R. et HIS, E., 1985 - Combined effects of salinity and cadmium chlorine upon embryos and larvae of the japanese oyster, Crassostra gigas. Marine Env. Res., 15 : 303-312.
- ROBERT, R., HIS, E. et MAURER, D., 1986 - Toxicité d'un desherbant, l'atrazine-simazine, sur les jeunes stades larvaires de Crassostra gigas et sur deux algues fourrage, Isochrysis aff-galbana et Chaetoceros calcitrans. Haliotis, 15 : 319-325.

- SHEFFRIN, N.M.H., FIELLER, N.R.J. et WILLIAMS, E.E., 1984 - A behavioural bioassay for the impaired sea-water quality using the plantigrades of the common mussel, Mytilus edulis L. : the response to copper. *Aquatic Toxicology*, 5 : 77-91.
- SPRUNG, M. et BAYNE, B.L., 1984 - Some practical aspects of fertilizing the eggs of the mussel Mytilus edulis L. *J. Cons. int. Explor. Mer.*, 41 : 125-128.
- THAIN, J.E. et WATTS, J., 1987 - The use of a bioassay to measure changes in water quality associated with a bloom of Gyrodinium aureolum Hulburt. *Rapp. P.V. Réun. Cons. Int. Explor. Mer.*, 187 : 103-107.
- VAN DE GUCHTE, C., MAAS-DIEPEVEEN, J.L. et GROOTELAAR, L., 1988 - Midge larvae in sediment ecotoxicology. 1st European conference on ecotoxicology, 17-19 Oct. 88, Copenhagen, Denmark.
- WALNE, P.R., 1966 - Experiments in the large-scale culture of the larvae of Ostrea edulis L. *Fishery Invest. London.*, 25 : 1-53.
- WATLING, H.R., 1978 - Effects of cadmium on larvae and spat of the oyster, Crassostrea gigas (Thunberg). *Trans. Roy. Soc. S. Afr.*, 43 (2) : 125-134.
- WISELY, B. et BLICK, R.A., 1967 - Mortality of marine invertebrate larvae in mercury, copper and zinc solutions. *Aust. Freshw. Res.*, 18 : 73-88.
- WOELKE, C.E., 1960 - Effects of sulfite waste liquor on the normal development of Pacific oyster (Crassostrea gigas) larvae. Washington State Department Fisheries, Research Bulletin, 6.
- WOELKE, C.E., 1962 - Bioassays of pulp mill wastes with oysters. V.S. Public Health Service Transactions, 3 Seminar on Biological Problems in Water Pollution. P
- WOELKE, C.E., 1967 - Measurement of water quality with the Pacific oyster embryo bioassay. *Water Quality Criteria, Am. Soc. Testing Mats.*, 416 : 112-120. X
- WOELKE, C.E., 1972 - Development of a receiving water quality bioassay criterion based on the 48 hours Pacific oyster (Crassostrea gigas) embryo. Washington Department of Fisheries, Technical Rep., 9 : 1-93.

ANNEXE 2

Date et type des bio-essais.
BM : basse mer ; mM : mi-marée ; PM : pleine mer

	Date	30.06	07.07	21.07
HONFLEUR	sédiment	Moules	Huîtres	Huîtres
	eau BM		Huîtres	
VILLERVILLE	eau BM			Huîtres
	eau mM			Huîtres
	eau PM			Huîtres
Provenance des géniteurs		Morgat	La Tremblade	Arcachon