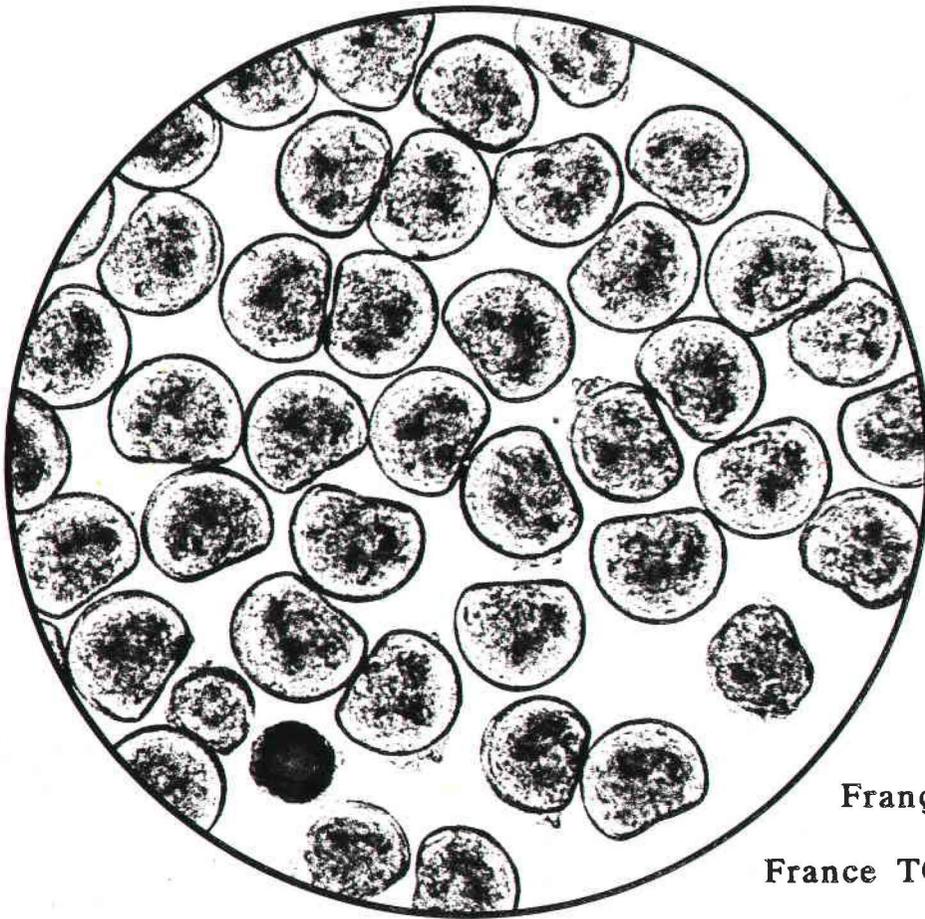


47636

Direction des Recherches Océaniques

Département Environnement Littoral

UTILISATION DES BIOESSAIS SUR LES EMBRYONS  
DE BIVALVES DANS LE CADRE D'UNE SURVEILLANCE  
DES EFFETS BIOLOGIQUES



Françoise QUINIOU

France TOULARASTEL

Geneviève LE FEVRE-LEHOERFF

F 24



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

IFREMER-DERO/EL



0EL04304

DRO. EL-91.09



## SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>METHODOLOGIE GENERALE</b>	<b>2</b>
<b>1. Induction de la ponte</b>	<b>3</b>
<b>2. L'eau de mer des milieux testés</b>	<b>3</b>
<b>3. Les élevages</b>	<b>3</b>
<b>4. Examen pratique des larves</b>	<b>3</b>
<b>RESULTATS OBTENUS ET CARACTERISTIQUES DES EXPERIENCES</b>	<b>4</b>
<b>1. Effet de l'eau de la Seine</b>	<b>4</b>
<b>2. Effet d'un rejet urbain</b>	<b>4</b>
<b>3. Effet de la remise en suspension     d'un sédiment côtier dans l'eau testée</b>	<b>7</b>
<b>CONCLUSION</b>	<b>13</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>13</b>
<b>ANNEXE 1</b>	<b>16</b>
<b>ANNEXE 2</b>	<b>17</b>
<b>ANNEXE 3</b>	<b>18</b>

## INTRODUCTION.

- La surveillance d'un milieu peut se faire par la mesure des concentrations de "contaminants" dans l'eau, la matière vivante et le sédiment. C'est d'ailleurs ce qui est réalisé par le RNO sur le littoral français depuis 1974. Le dosage de ces contaminants donne une évaluation des niveaux de leurs concentrations dans les zones étudiées.

Un effet de l'accumulation des contaminants dans la matière vivante peut aussi être mesuré grâce aux techniques biochimiques du type mesure de l'Acetylcholinestérase, EROD (GALGANI, 1987).

La mesure des effets biologiques sur les organismes marins peut être réalisée par le biais des bioessais. Ces derniers permettent d'évaluer la qualité biologique d'un milieu : eau, sédiment ou rejets et émissaires divers. (Les réponses des organismes pouvant être comparées à l'observation des symptômes dans le cas des maladies de l'homme). Plusieurs tests sont recommandés depuis longtemps aux Etats-Unis (WOELKE, 1972 ; CHAPMAN, 1983), leur utilisation en routine permet d'avoir un "indicateur" de la modification de la qualité du milieu.

Les différents auteurs préconisent l'emploi de plusieurs espèces "cibles" correspondant aux différents niveaux trophiques (coelentérés, annélides, mollusques, échinides, crustacés, vertébrés) afin de pouvoir modéliser l'effet à l'échelle des populations voire de l'écosystème (WGBEC, 1988, 1989, 1990 ; VAN DER HOEVEN, 1990 ; SIETZ et RATTE, 1990).

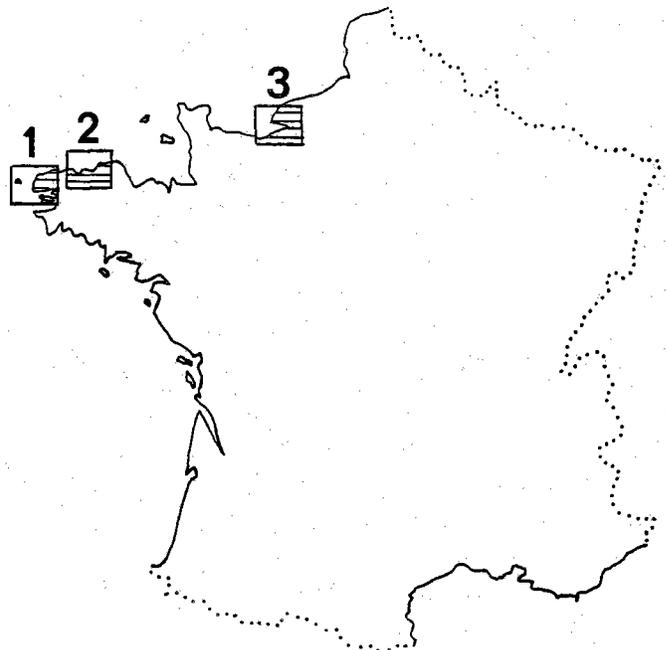
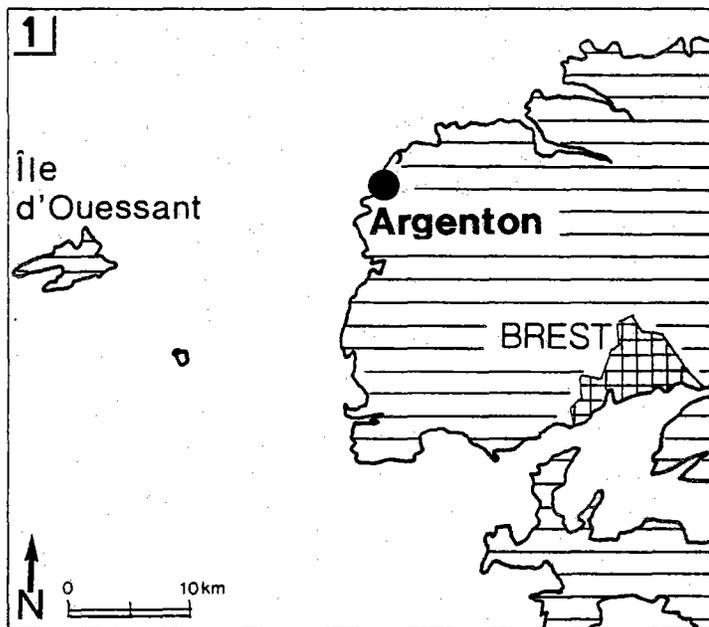
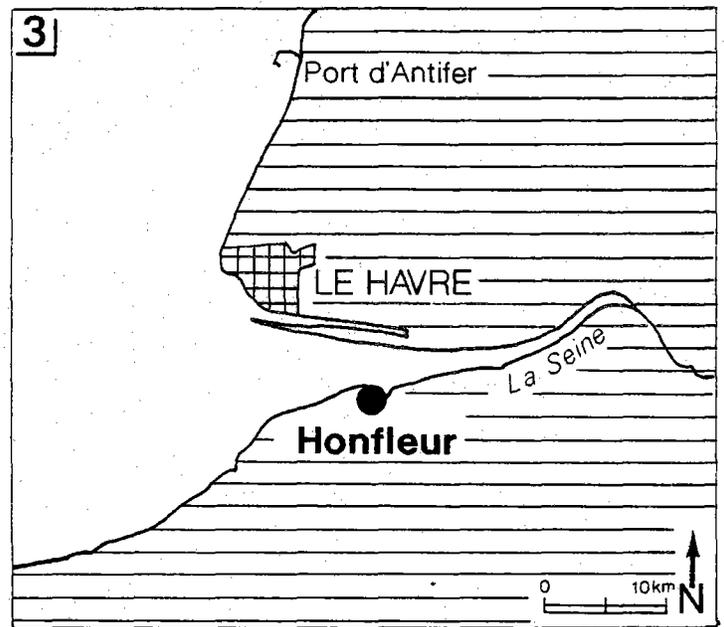
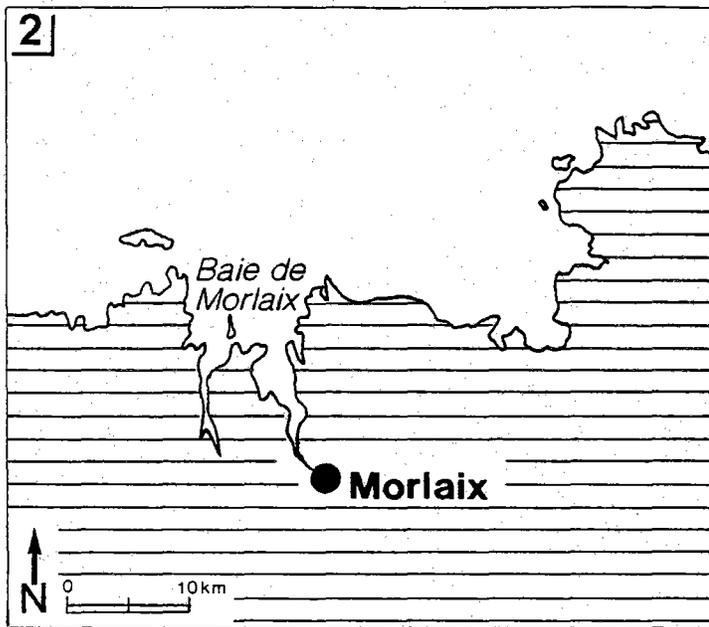
Nos premières expériences ont porté sur les mollusques bivalves comme *Mytilus edulis* et *Crassostrea gigas*. Le choix de ces espèces est lié à leur large répartition géographique et à la possibilité de se procurer des géniteurs matures pendant la majeure partie de l'année. Les animaux pouvant être récoltés dans la nature ou provenir d'une écloserie.

Les tests sont réalisés à partir de la fécondation et pendant la phase du développement embryonnaire : cette période est retenue en raison de sa très grande sensibilité à la qualité du milieu et particulièrement chez l'huître creuse (WOELKE, 1972 ; MARTIN *et al.*, 1981). Pendant cette phase, 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 à 20°C chez la moule et 24 h à 24°C chez l'huître 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 testée peut être responsable des effets observés.

Afin de prendre en compte les effets directs des altérageènes sur les gamètes (HIS et ROBERT, 1980) la fécondation est réalisée dans l'eau à tester. La période embryonnaire est critique pour tous les organismes puisque c'est à ce moment que se mettent en place les organes. Chez les mollusques c'est aussi pendant cette phase que l'animal secrète sa première coquille. Au moment de l'arrêt de l'expérience, l'effet biologique de l'eau testée est caractérisée par le pourcentage de larves "D" anormales rapporté à celui obtenu dans les bioessais témoins.

Les applications du test devraient permettre :

- de détecter la plus faible dilution, d'une eau, d'un émissaire ou d'un sédiment entraînant l'apparition d'anomalies.
- d'établir des gradients de qualité des milieux testés selon leur origine.



**Figure 1 :**  
Zones de prélèvement de l'eau, du rejet urbain et du sédiment employés dans les bioessais.

**METHODOLOGIE GENERALE.**

**1. Induction de la ponte.**

La ponte des géniteurs est induite selon une méthode dérivée 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 sur filtre industriel de porosité 1 µm : 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 sur cartouche millipore de porosité 0.2  $\mu$ m. Après passage sur un tamis stérile de 100  $\mu$ m de vide de maille pour retenir les fèces, les ovocytes sont recueillis sur un tamis stérile de vide de maille 32  $\mu$ m.

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

## 2. L'eau de mer des milieux testés.

L'eau employée dans les élevages témoins provient de l'écloserie du Centre IFREMER d'Argenton. Le problème de sa qualité sera discuté plus loin. Avant emploi, elle est filtrée sur membrane stérile millipore de porosité 0.2  $\mu$ m.

L'eau des milieux testés peut être soit :

- de l'eau de mer d'une zone donnée.
- de l'eau d'un estuaire ou d'un émissaire diluée dans l'eau témoin.
- de l'eau de mer témoin dans laquelle a été remis en suspension un sédiment. Dans ce cas on testera le surnageant, filtré ou non, à différents degrés de dilution.

Dans tous les cas la salinité des milieux est ramenée à la même valeur pour chaque série de bioessais (28 ou 30  $\pm$  1 ‰).

## 3. Les élevages.

Une fois recueillis, les ovocytes sont comptés et répartis à raison de 30 000 à 50 000/l dans des béchers stériles contenant le milieu à tester.

La fécondation est réalisée dans la demi-heure qui suit l'émission des gamètes (1.5 ml de sperme concentré/l d'élevage) et directement dans l'eau à tester. Un seul couple de géniteurs est utilisé pour éviter l'intervention de facteurs génétiques.

Les élevages sont maintenus à l'obscurité, sans bullage, pendant 48 h à la température de 20  $\pm$  1°C pour les moules, et durant 24 h à 24°C  $\pm$  1°C pour les huîtres creuses. A la fin de l'incubation, les élevages sont observés immédiatement ou formolés pour un examen ultérieur.

## 4. Examen pratique des larves.

Pour chaque élevage une ou plusieurs observations sont faites au microscope optique et le pourcentage de larves anormales est calculé. Une larve est considérée normale si sa coquille a la forme d'un D aux bords réguliers pouvant contenir la totalité des organes à la fermeture des valves. Toute coquille vide est comptée comme larve morte. Les anomalies observées peuvent être dues au milieu testé ou à la qualité des produits génitaux (cf. annexes 1 et 2).

Les résultats sont exprimés en pourcentage brut de larves anormales (PBA) ou en pourcentage net de larves anormales (PNA) selon la formule de ABOIT (Anonyme, 1980) :

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

### RESULTATS OBTENUS ET CARACTERISTIQUES DES EXPERIENCES.

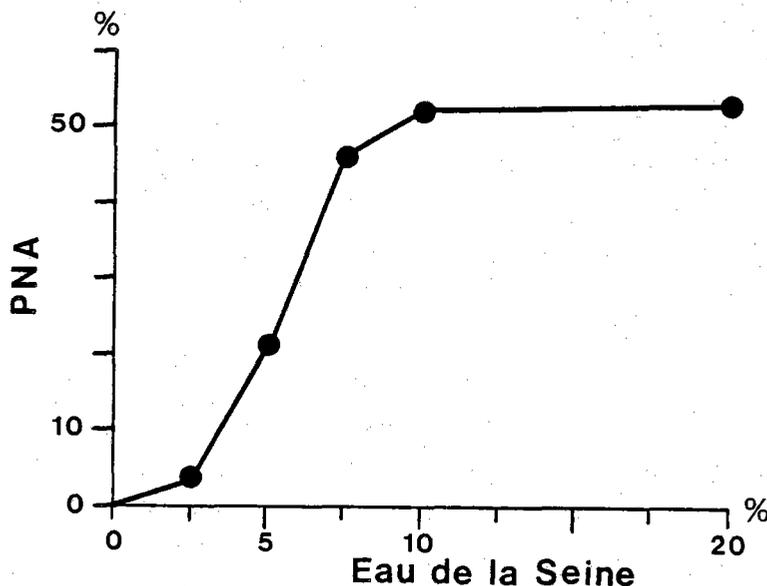
Différents types de milieux ont été expérimentés afin de tester la sensibilité des bioessais.

#### 1. Effet de l'eau de la Seine.

Ce bioessai a été réalisé le 07 juillet 1988 sur *Crassostrea gigas*. Dans cette expérience on ajoute 2,5 % à 20 % d'eau de la Seine à l'eau témoin prélevée la veille. L'eau de la Seine, prélevée au niveau de Honfleur le 25 mai 1988, a été stockée à - 20°C et filtrée sur membrane millipore de porosité 0.2 µm avant emploi.

Les bioessais sont réalisés dans quatre répliquats de 30 ml pour chaque concentration, les résultats (fig. 2) correspondent à la moyenne des comptages réalisés sur 1 000 à 1 500 larves (annexe 3).

Le taux de mortalité est nul, le pourcentage net de larves anormales (PNA) dépasse 30 % dès qu'il y a plus de 7.5 % d'eau provenant de la Seine dans le milieu.



**Figure 2 :**

Pourcentage net de larves "D" anormales (PNA) chez *Crassostrea gigas* en fonction du pourcentage d'eau de la Seine présent dans le milieu d'élevage (juillet 1988).

#### 2. Effet d'un rejet urbain.

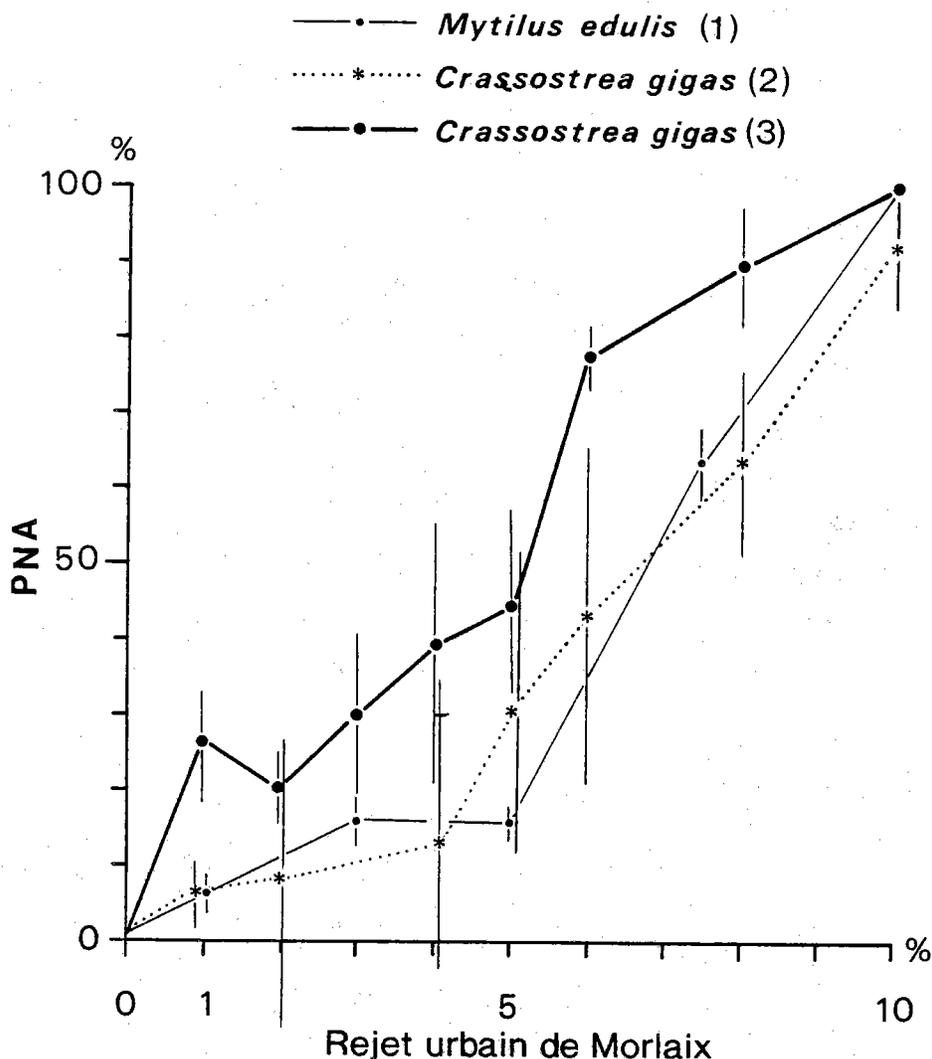
a) Bioessais du mois de juin 1989 :

Ces expériences ont été conduites au mois de juin 1989 sur *Mytilus edulis* et *Crassostrea gigas*. Le rejet urbain utilisé est épuré mais non chloré, il

provient de la station d'épuration biologique à boues activées de Morlaix. Prélevé dans la semaine précédant les bioessais, il a été stocké à une température de 0 à + 4°C et maintenu à l'obscurité jusqu'au jour des tests.

Le rejet urbain est ajouté à l'eau témoin afin d'obtenir des milieux contenant de 0 à 10 % de rejet, ce dernier étant filtré soit à 0.2 µm soit à 100 µm. Quatre répliquats de 30 ml sont réalisés par dilution et les résultats sont exprimés en pourcentage net de larves "D" anormales (PNA) correspondant à la moyenne des observations d'environ 800 larves.

Aucune mortalité n'est observée. Les courbes de la figure 3 montrent que l'effet observé sur l'huître et la moule sont tout à fait semblables et qu'il y a au moins 50 % de larves anormales pour une dilution de 7 % au rejet urbain filtré à 0.2 µm (courbes 1 et 2). Lorsque le rejet urbain n'est filtré qu'à 100 µm (courbe 3), le pourcentage net de larves anormales 50 % est atteint dès la dilution 5 % pour l'huître : ceci indique une toxicité liée à des particules en suspension de plus grande taille.



**Figure 3 :**

Pourcentage net de larves "D" anormales (PNA) en fonction de la concentration de rejet urbain de Morlaix dans le milieu d'élevage (juin 1989).

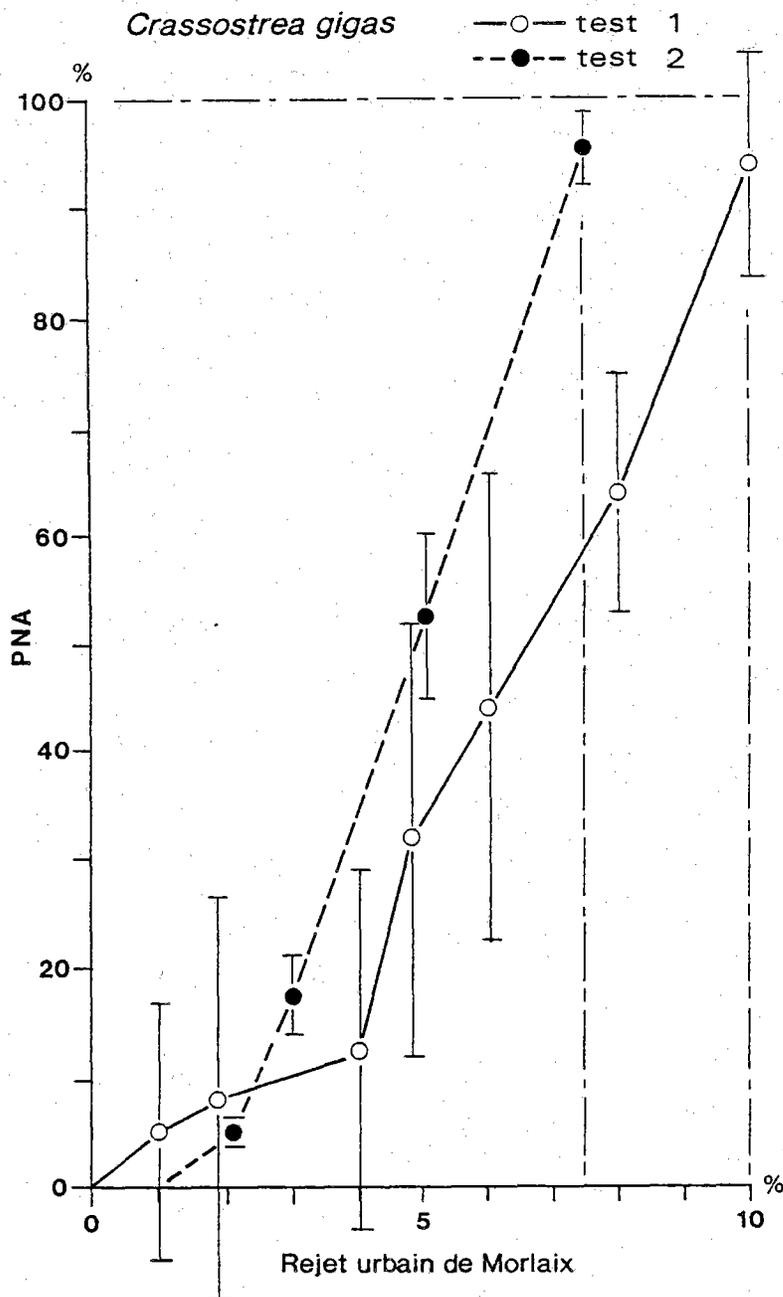
(PNA : valeur moyenne de 6 à 8 dénombrements ± écart type).

Courbes 1 et 2 rejet filtré à 0.2 µm, courbe 3 rejet filtré à 100 µm.

Les taux d'anomalies sont faibles mais significativement supérieurs aux témoins (PNA > 5 %) dès que le rejet atteint une concentration de 2 %, ce qui correspond à des teneurs réelles dans le milieu.

b) Bioessais du mois de juillet 1989 :

Le même test renouvelé début juillet sur l'huître avec du rejet prélevé fin juin et filtré à 0.2 µm montre qu'entre le début et la fin du mois de juin la toxicité du rejet a évolué. En effet, la figure 4 montre que la valeur 100 du PNA est atteinte pour une concentration de 10 % de rejet début juin (test 1) et qu'en fin de mois 7.5 % suffisent pour avoir 100 % d'anomalies (test 2).



**Figure 4 :**

Variation de la toxicité du rejet urbain de Morlaix en fonction de sa date de prélèvement. Rejets filtrés à 0.2 µm.

Test 1 : début juin 1989 - Test 2 : fin juin 1989.

PNA : pourcentage net de larves anormales.

Le test sur les embryons de bivalves est donc sensible et peut permettre de suivre l'évolution de la toxicité globale d'un rejet en mer.

### 3. Effet de la remise en suspension d'un sédiment côtier dans l'eau testée.

#### 3.1. Sédiment provenant de Honfleur.

##### a) Test du 11 septembre 1990 : Influence de la concentration de sédiment dans l'eau :

Dans cette expérience on utilise un sédiment prélevé en surface à basse mer (coefficient de marée 75) le 11 mai 1990. Ce sédiment est congelé sur le terrain et décongelé quatre mois plus tard au moment du test. Après décongélation on effectue une remise en suspension dans l'eau de mer témoin à raison de 50 grammes de sédiment pour 1 litre. L'extrait aqueux ainsi obtenu est employé ensuite à différents degrés de dilution, ce qui donne une gamme équivalant à 6 concentrations, soit 0, 10, 20, 30, 40 et 50 g/l.

Dans cette expérience, l'eau témoin filtrée sur 0.2  $\mu\text{m}$  provient d'Argenton. L'extrait aqueux est centrifugé et le test est réalisé sur la moule avec la phase surnageante non filtrée.

La fécondation est faite en piluliers stériles dans 100 ml de milieu. Deux répliquats sont réalisés par concentration. Comme pour les autres tests, le développement se fait à 20°C et à l'obscurité pendant 48 heures.

Dans chaque pilulier sont prélevés plusieurs fois 3 ml pour le comptage de larves. Si la densité d'ovocytes de 50 000/litre est bien respectée, le prélèvement de 3 ml donne environ 150 larves. Cinq "répliquats de comptage" ont été nécessaires afin que le nombre observé dépasse 100. Il est en fait compris pour les 60 comptages entre 113 et 191 larves.

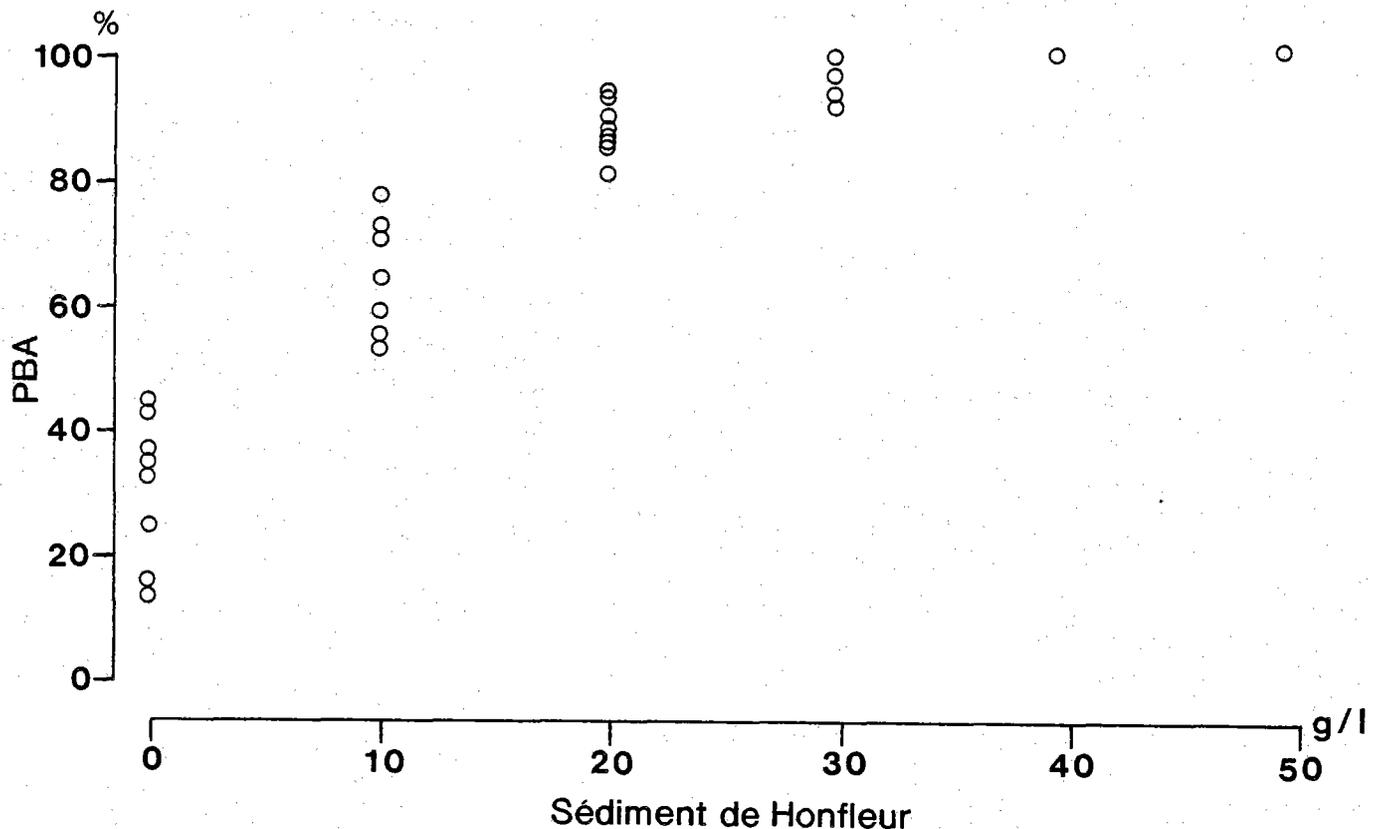
Nous avons observé le nombre de larves anormales pour chaque comptage. Les valeurs sont exprimées en pourcentage brut (PBA). Toutes les valeurs sont portées sur les figures 5 et 9 (cf. annexe 3).

On remarque immédiatement un effet toxique croissant, en fonction de la concentration en sédiment du milieu. Dans les conditions de ce test toutes les larves sont anormales à partir de 40 g/l de sédiment (PBA = 100).

##### b) Test du 30 juin 1988 sur la moule :

Dans ce bioessai, le milieu testé est réalisé de la même façon que le précédent, à la différence, qu'ici, 100 g de sédiment humide ont été remis en suspension dans un litre d'eau de mer témoin. Le sédiment prélevé fin mai 1988 a été stocké à - 20°C jusqu'au moment de l'expérience. Quatre répliquats de 30 ml sont réalisés par concentration testée, les résultats exprimés en pourcentages nets de larves anormales (PNA) représentent la moyenne des observations de 600 à 800 larves (annexe 3).

La figure 6 montre la similitude de la réponse des embryons de moule à la qualité du milieu testé : le nombre de larves normales est quasiment nul pour un milieu d'élevage correspondant à une concentration de 50 g de sédiment par litre. La différence des réponses pour les concentrations inférieures peut être due au fait que lorsque 100 g de sédiment sont remis en suspension dans un litre d'eau au lieu de 50, le relargage ne se fait pas de la même façon pour tous les "contaminants".



**Figure 5 :**

Effet d'un extrait aqueux du sédiment de Honfleur : influence de la concentration - test du 11 septembre 1990.

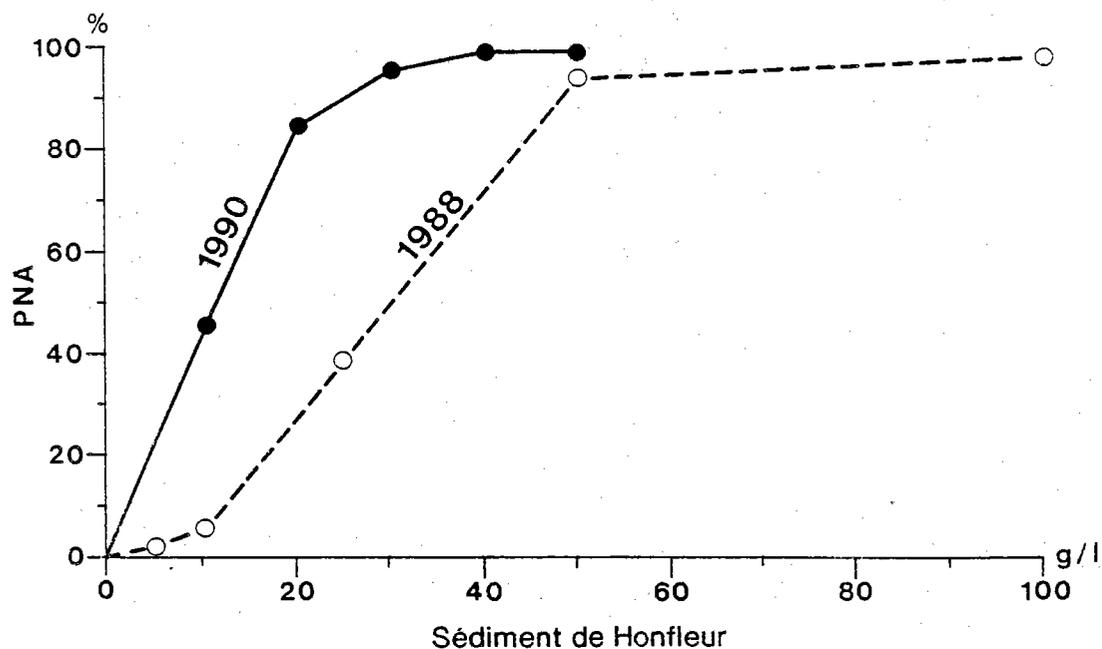
**c) Tests de juillet 1988 sur l'huître creuse :**

Les conditions expérimentales sont les mêmes que pour le test du 30 juin 1988. Les bioessais sont réalisés sur *Crassostrea gigas* les 07 et 21 juillet 1988 avec le sédiment du mois de mai stocké à - 20°C et remis en suspension avec une concentration de départ de 100 g/litre. La figure 7 présente les moyennes des observations faites sur 500 à 800 larves (annexe 3).

Il est intéressant de noter que les résultats sont tout à fait semblables pour les deux bioessais et qu'ils se superposent à ceux obtenus le 30 juin 1988 avec la moule.

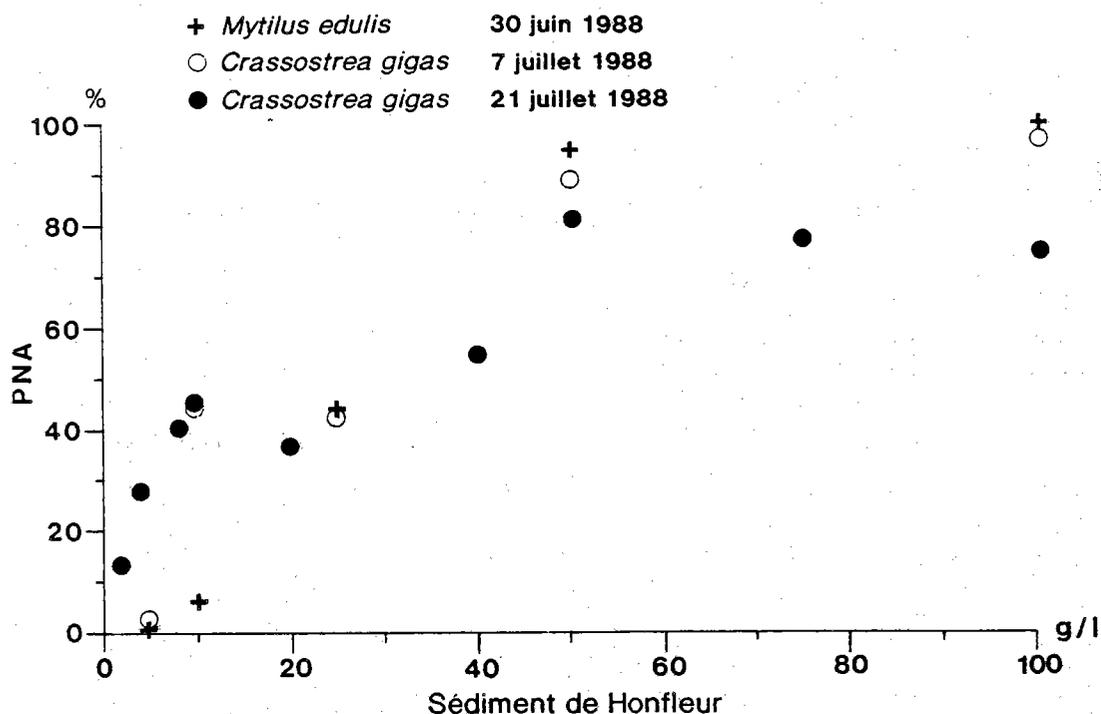
Pour une concentration de 30 à 40 g/l le PNA se situe aux environs de 50 %, il dépasse 80 % dès que la concentration de sédiment atteint 50 g/l.

Les réponses sont obtenues en 24 heures pour l'huître et 48 heures pour la moule : il apparait donc que les tests avec *Crassostrea gigas* sont plus sensibles ce qui corrobore les résultats de WOELKE (1972) et MARTIN *et al.* (1981) pour le zinc et le plomb.



**Figure 6 :**

Pourcentage net de larves D anormales chez la moule en fonction de la concentration du sédiment de Honfleur dans l'extrait aqueux testé.



**Figure 7 :**

Pourcentage net de larves D anormales (PNA) chez la moule (M.e.) et l'huître creuse (C.g.) en fonction de la concentration du sédiment de Honfleur dans l'extrait aqueux testé (juin et juillet 1988).

3.2. Modalités et effets du sédiment en fonction du site de prélèvement, de la concentration dans l'eau et de la durée de conservation avant le test : expérience du 11 juillet 1990.

a) Protocole particulier à l'expérience :

L'expérience consiste à étudier l'effet de l'eau mise en contact avec un sédiment. Différents bioessais ont été réalisés selon les conditions suivantes :

- Deux sédiments prélevés au mois de mai à Argenton (A) et à Honfleur (H) sont comparés.
- Deux modes de conservation sont testés :
  - . Le sédiment est remis en suspension juste après la récolte (A1, H1). Sur le terrain 50 grammes de sédiment humide sont remis en suspension dans un litre d'eau témoin. Après décantation le surnageant est congelé.
  - . Le sédiment est congelé sur le terrain (A2 et H2).
- Deux concentrations sont testées :
  - . Le surnageant de la solution 50 g/l réalisée sur le terrain ou au laboratoire au moment de l'expérience est centrifugé et filtré à 0.2 µm. Nous obtenons les solutions A1 50, H1 50, A2 50, H2 50.
  - . Une dilution au 1/5 est réalisée avec la solution d'origine 50 g/l ce qui donne une concentration 10 g/l pour les solutions A1 10, H1 10, A2 10, H2 10.

Dans l'expérience du 11 juillet le sédiment est employé après deux mois de stockage à - 20°C (contre quatre mois pour celle du 11 septembre 1990). Pour tous les bioessais l'eau témoin employée a été prélevée en mai 1990 et stockée à - 20°C après filtration sur membrane 0.2 µm.

Dans l'expérience du 11 juillet 1990 nous testons neuf milieux

- un milieu témoin,
- quatre milieux "Argenton" A1 10, A1 50, A2 10, A2 50
- quatre milieux "Honfleur" H1 10, H1 50, H2 10, H2 50.

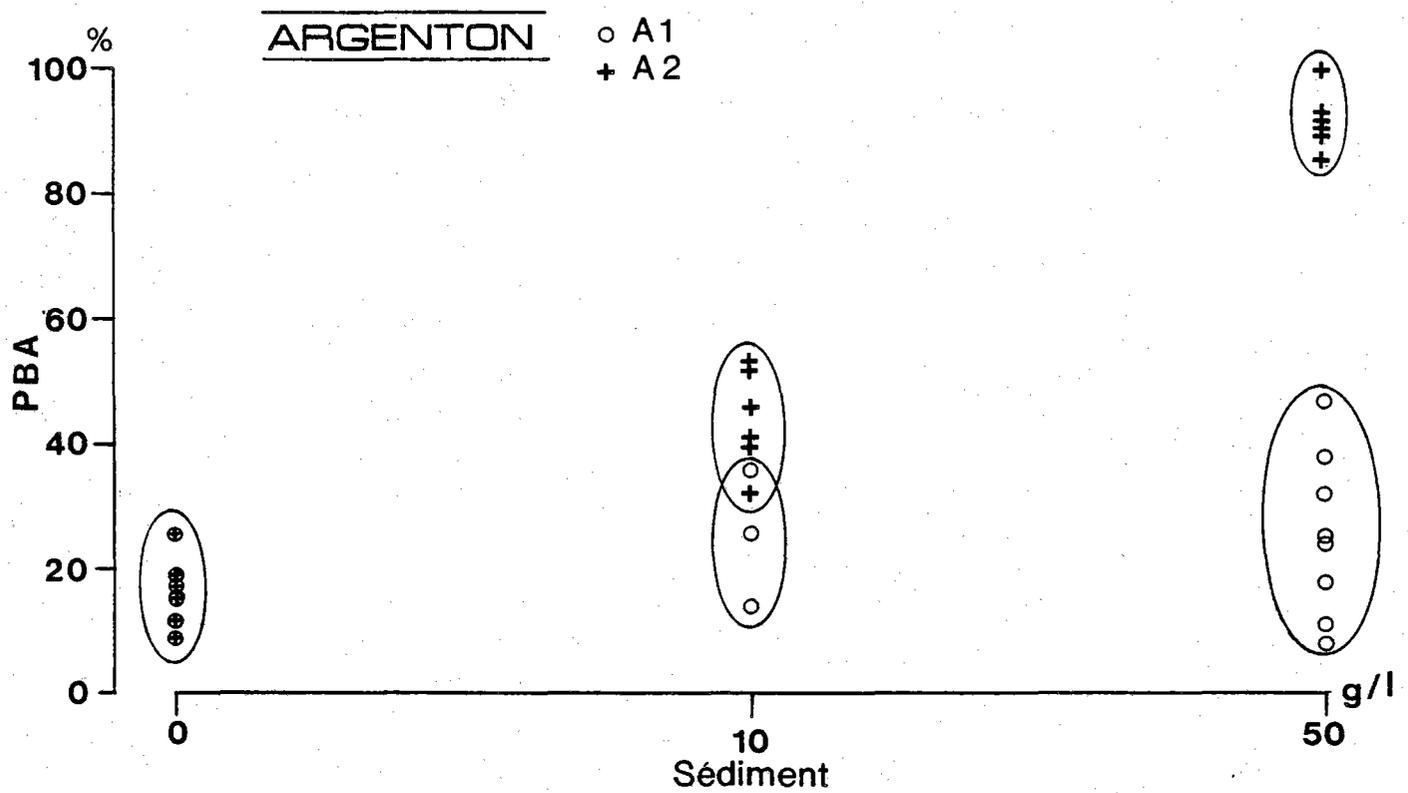
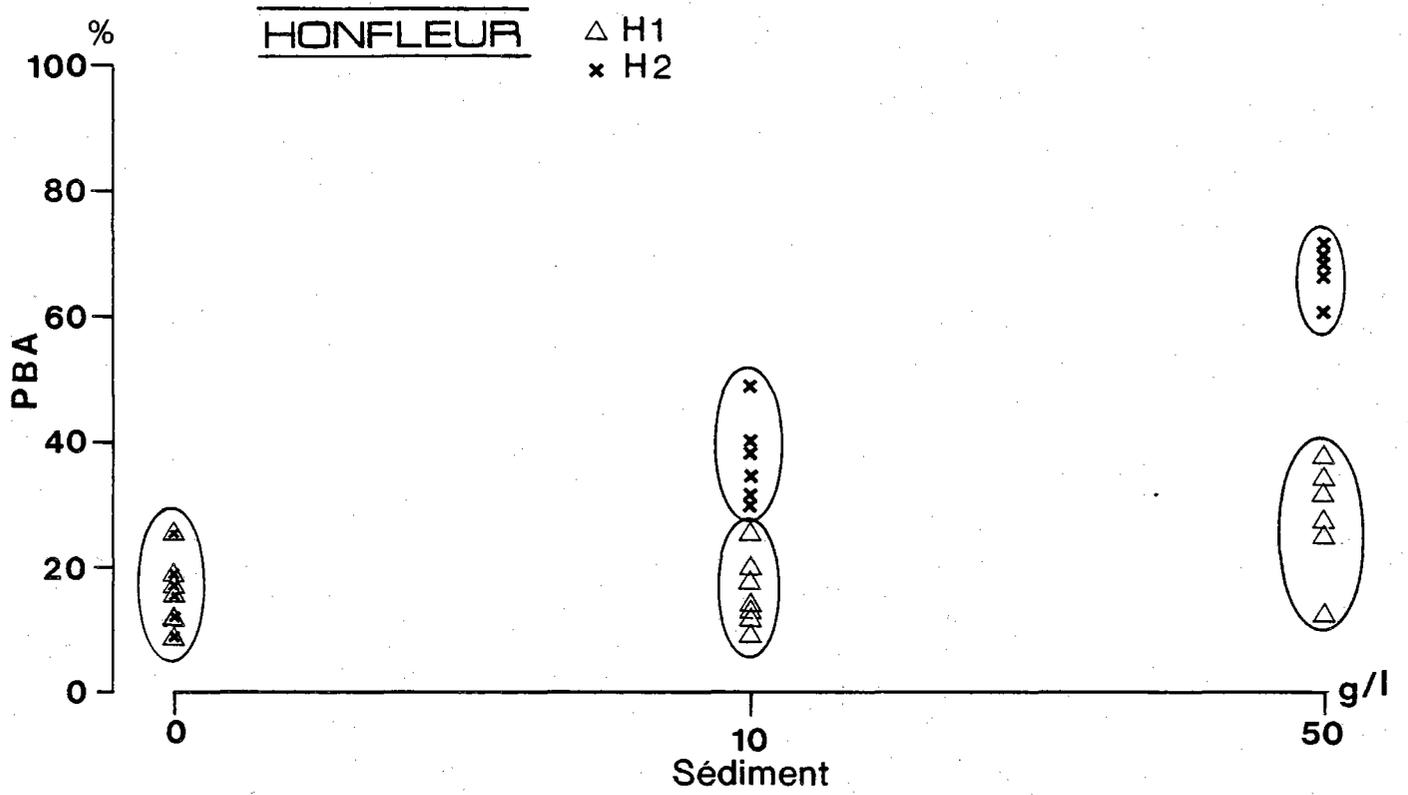
Pour chaque milieu la fécondation est réalisée dans un volume de 150 ml et le développement embryonnaire se déroule à 20°C pendant 48 heures dans quatre sous-échantillons de 30 ml. Deux comptages sont réalisés par sous échantillon.

Les résultats sont donnés en pourcentage brut de larves anormales (PBA) dans un nombre total de larves qui correspondent à environ 150 ovocytes pour 3 ml de milieu au moment de la fécondation (50 000 ovocytes/litre).

Les résultats peuvent aussi être donnés en pourcentage net de larves anormales (PNA) selon la formule donnée précédemment (annexe 3).

b) Principaux résultats mis en évidence par cette expérience :

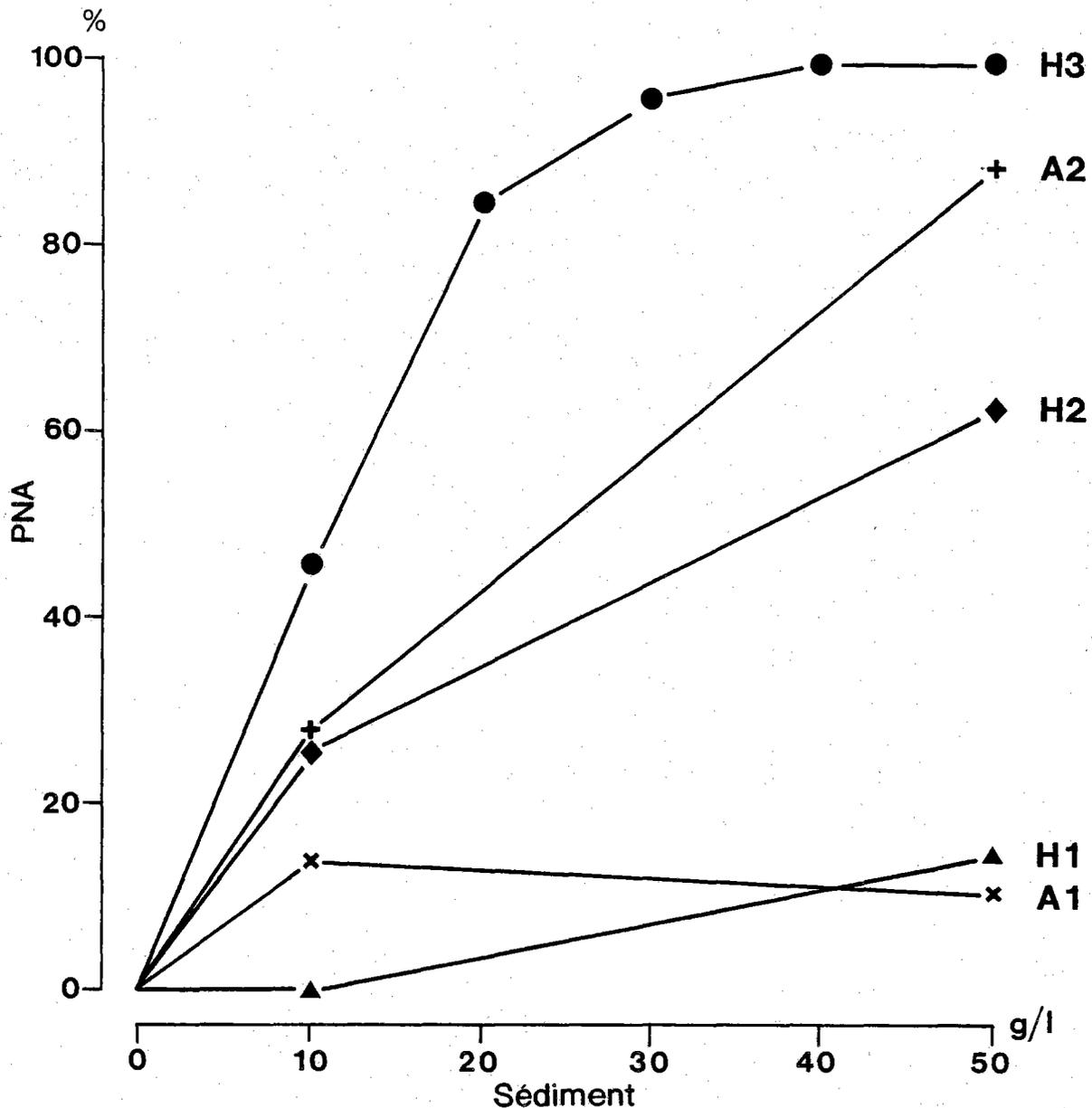
Les deux sites étudiés ne sont pas fondamentalement différents. Le sédiment recueilli à Argenton en mai 1990 montre un fort effet toxique. Les larves qui se développent dans l'eau mise en contact avec le sédiment présentent un taux élevé d'anomalies (fig. 8).



**Figure 8 :**  
 Effets des extraits aqueux des sédiments prélevés à Honfleur (H1, H2) et à Argenton (A1, A2).

Pour les deux sites le taux le plus élevé d'anomalies est provoqué par l'extrait aqueux réalisé le jour de l'expérience et à la concentration de 50 g/litre ; PNA Argenton 89.4 % et Honfleur 62.9 %. Ces résultats concordent avec ceux du 11 septembre 1990 et mettent en évidence une relation positive entre les effets et les concentrations de sédiment (fig. 5).

Une différence apparaît nettement entre les effets des extraits aqueux immédiatement sur le terrain (A1, H1) et ceux réalisés le 11 juillet (A2, H2), ce qui pose le problème de la stabilité des caractéristiques d'un sédiment congelé (Chapman, P.M., 1988) (fig. 9).



**Figure 9 :**  
 Comparaison des expériences du 11 juillet 1990 et du 11 septembre 1990.  
 Effets d'extraits aqueux de sédiments provenant de Honfleur (H) et Argenton (A).

Ce résultat nous a semblé suffisamment intéressant car le stockage par congélation d'eau ou de sédiment pour analyses ultérieures est d'un usage courant. On remarque que pour Honfleur du 11 septembre (H3, figure 9) on obtient pour des concentrations comparables 10 g/l et 50 g/l des taux plus élevés d'anomalies. Le pourcentage net dépasse 40 % à 10 g/l et atteint 100 % à 50 g/l. De plus les solutions testées en juillet sont filtrées sur 0.22 µm tandis qu'en septembre l'extrait aqueux est utilisé brut après centrifugation.

Une comparaison de l'effet de la filtration serait intéressante, comme il a été déjà observé en figure 3, avec le rejet urbain de Morlaix.

La recherche d'une eau témoin de référence dans l'absolu est souhaitable car si le témoin est toujours valable pour une expérience donnée il est délicat de comparer les expériences avec des témoins différents. Il serait intéressant de tester une eau de mer "artificielle" et de comparer les résultats avec les expériences classiques présentées plus haut.

### CONCLUSION.

Les résultats montrent la sensibilité des bivalves à la qualité de l'eau pendant le développement embryonnaire. L'ensemble des expériences décrites permet l'application du test dans divers cas : rejets urbains, industriels ou autres peuvent être testés.

Des développements méthodologiques complémentaires restent nécessaires afin d'utiliser ce test en routine dans un réseau de surveillance des zones côtières (RNO) et de l'étendre sur les différents sites du littoral.

Une intercalibration internationale reste une nécessité afin de permettre la comparaison des résultats et le choix d'une eau de référence, commune. Enfin, les tests embryons de mollusques restent un "indicateur" de qualité des eaux dont les résultats doivent être comparés aux réponses des autres tests actuellement développés sur les différents niveaux trophiques de l'écosystème végétaux, oursins, hydriques, crustacés, poissons.

Un travail de recherche dans la mise au point méthodologique reste à poursuivre dans deux domaines principalement :

- En premier lieu, il convient de connaître l'évolution de la qualité du sédiment ou de l'eau à tester conservé au froid à différentes températures et pendant une durée plus ou moins importante.
- Un autre problème à résoudre est celui du choix de l'eau témoin ou eau de référence. Ainsi qu'il a été montré précédemment, si une eau de référence est valable pour une expérience donnée en général, il est tout de même souhaitable de rechercher une "référence absolue" du milieu d'élevage qui permettrait un très bon déroulement des larves "D", ne laissant comme source de variation que la qualité des géniteurs utilisés.

### BIBLIOGRAPHIE.

- Anonyme, 1980 - Standard methods for the examination of water and wastewater, 15th ed.; American Public Health Association, Washington, D.C., 301 p.
- CHAPMAN, P.M. et MORGAN, J.D., 1983 - Sediment bioassays with oyster larvae Bill. Environ. Caontam. Toxicol., 31 : 438-444.

- CHAPMAN, P.M., 1988 - Marine sediment toxicity test. in J.J. Lichtenberg, F.A. Winter, C.I. Weber and L.Fradkin, eds. Chemical and Biological Characterization of Sludges, Sediments, Dredge Spoils, and Drilling Muds. STP 976. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, pp. 391-401.
- HIS, E. et ROBERT, R., 1986 - Utilisation des élevages larvaires de *Crassostrea gigas* en écotoxicologie marine. Haliotis, 15 : 301-308.
- 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.
- SEITZ, A. et RATTE, H.T., 1990 - Aquatic toxicology : on the problems of the extrapolation from laboratory experiments with individuals and populations to community effects. 12th Annual conference of European society of comparative physiology and biochemistry. Lecture.
- 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 DER HOEVEN, N., 1990 - Extrapolation of effects of toxicants on individuals to population level. 12th Annual conference of European society of comparative physiology and biochemistry. Lecture.
- WGBEC, 1988 - Working group on biological effects of contaminants. Copenhagen 5-8 April 1988. ICES-CM 1988 /E 26.
- WGBEC, 1989 - Working group on biological effects of contaminants. Aberdeen 9-12 May 1989. ICES-CM 1989 /E 19.
- WGBEC, 1990 - Working group on biological effects of contaminants. Nantes 24-26 April 1990. ICES-CM 1990 /Poll : 4.
- 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.

LISTE DES PUBLICATIONS REALISEES DANS LE CADRE DE LA SURVEILLANCE BIOLOGIQUE.

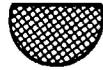
- GALGANI, F., 1987 - Evaluation des méthodes biochimiques applicables à la surveillance biologique de l'environnement marin. Rapport IFREMER DERO-87.17-MR, 49 p.
- HOCH, Th., 1990 - Effet d'un sédiment marin sur le développement embryonnaire de mollusques bivalves : optimisation du protocole expérimental et traitement des résultats. Mémoire de fin d'études, DAA Halieutique, ENSAR de Rennes. Rapport IFREMER DRO-90.21-EL, 54 p.
- LASSUS, P., BOGE, G., GENTIEN, P., LOARER, R., PAGANO, G. et QUINIOU, F., 1990 Toxicité des rejets urbains. Colloque national : La mer et les rejets urbains. Bendor 13-15 juin 1990. Communication (sous presse).
- LE FEVRE-LEHOERFF, G., 1988 - La surveillance biologique des côtes : une nécessité. I : Généralités, premières actions proposées. Rapport IFREMER DERO-88;31-EL, 25 p.
- LE GALL, J., 1989 - Effets des rejets urbains en mer sur le développement embryonnaire de mollusques bivalves. Mémoire de fin d'études, IUT de Brest, 49 p.
- QUINIOU, F., 1989 - Taux de réussite du développement embryonnaire de la moule et de l'huître creuse en présence d'eau ou de sédiment côtier de la baie de Seine. Rapport IFREMER DERO-89.03-EL, 13 p.
- QUINIOU, F. et LE GALL, J., 1990 - Use of marine bivalve embryo bioassay in testing the sublethal toxicity of urban sewage. 12th Annual conference of European society of comparative physiology and biochemistry. Poster.
- QUINIOU, L., 1989 - Etude de faisabilité pour la surveillance de l'effet des contaminants sur les poissons dans le cadre du Réseau National d'Observation. Rapport de contrat IFREMER-UBO n° 88.2.430420 DERO/EL, 37 p.
- QUINIOU, L., 1990 - Etude de faisabilité pour la surveillance de l'effet des contaminants sur les poissons dans le cadre du Réseau National d'Observation. Rapport de contrat IFREMER-UBO n° 89.2.430436 DRO/EL, 26 p.
- QUINTIN, J.Y., 1990 - Etude de l'effet des rejets urbains sur le développement embryonnaire de moules : essais méthodologiques préliminaires. Rapport IFREMER DRO-90.04-EL.

*Crassostrea gigas*  
*Mytilus edulis* et *M. galloprovincialis*

TABLEAU INDICATIF  
DES DIFFERENTS TYPES DE LARVES OBSERVEES 48 h.  
APRES LA FECONDATION

1) NORMALES

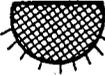
NORMALES "TYPE"



75 µm

NORMALES

cils



manteau

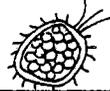
de SEGMENTATION



ovocyte non fécondé

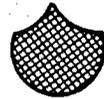


segmentation à différents stades



trocophore

de COQUILLE



charnière

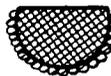


bord



réduite

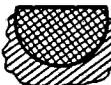
de MANTEAU



bulles



sortie faible



sortie importante



coquille en partie vide



coquille vide

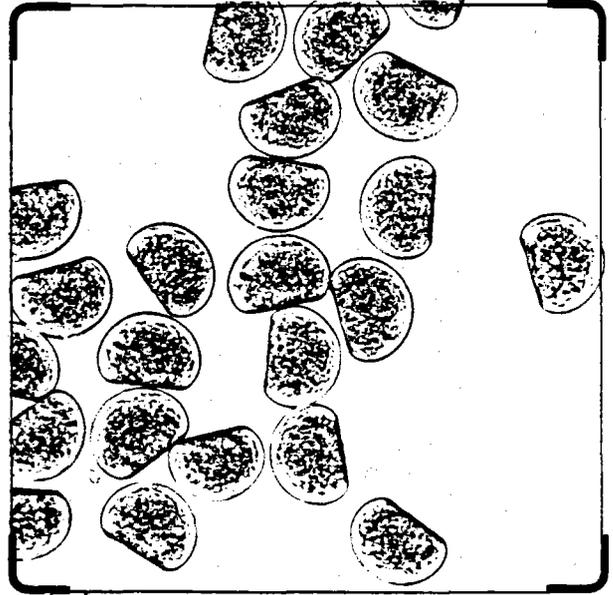
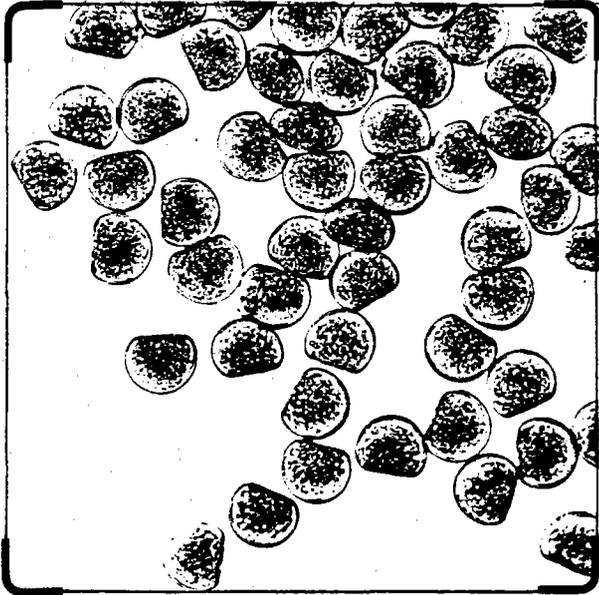
de TAILLE



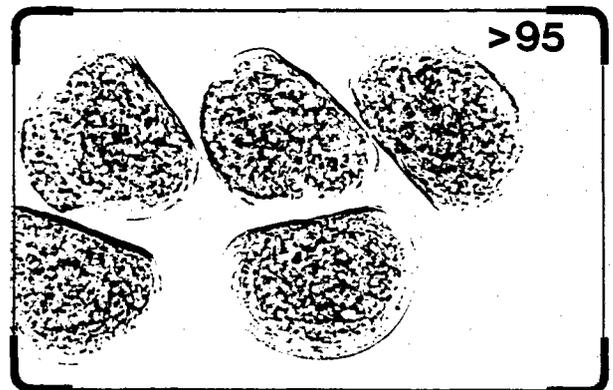
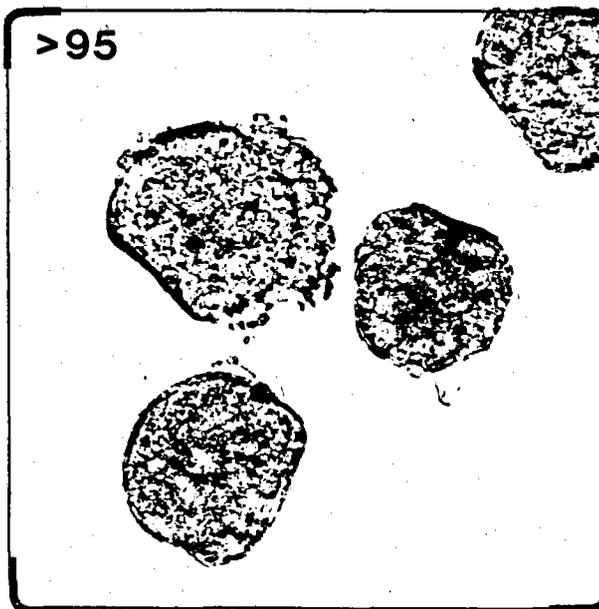
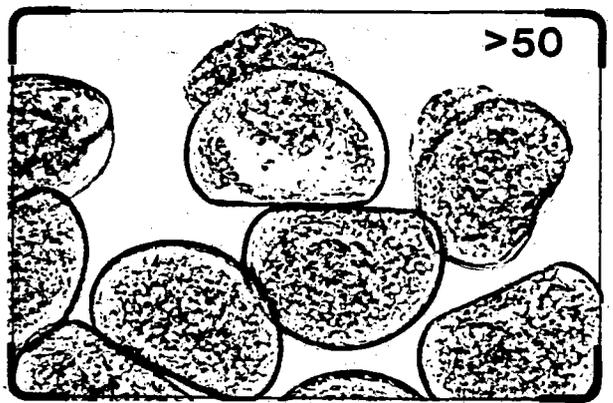
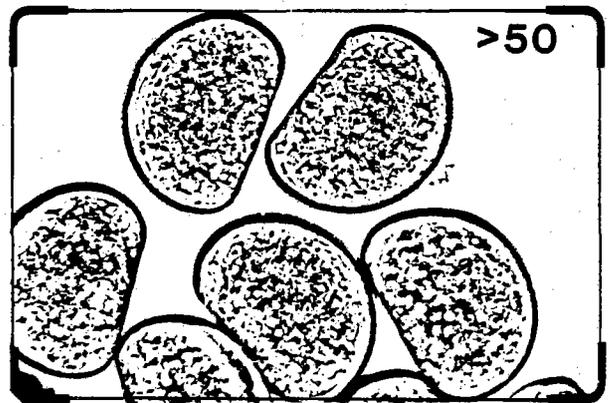
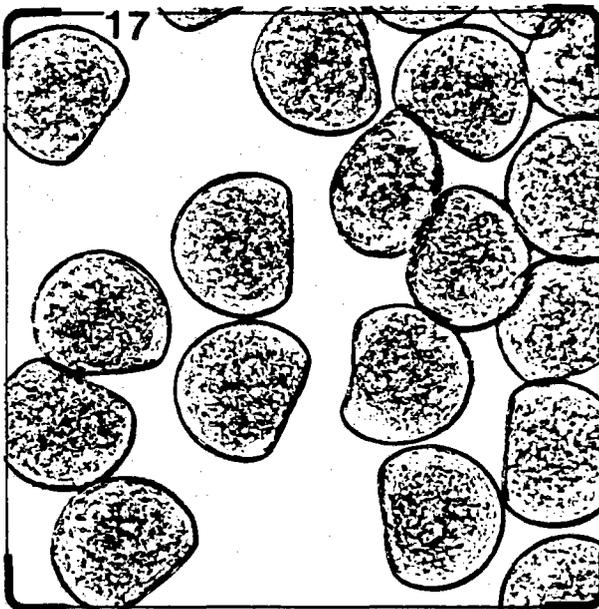
< 75 µm

2) ANOMALES

EAU TÉMOIN [—|—| = 100 µm]



LARVES ANORMALES (%) [—|—| = 50 µm]



## ANNEXE 3

VALEURS DES POURCENTAGES DE LARVES D ANORMALES  
DANS LES DIFFERENTES EXPERIENCES

Moyennes des pourcentages nets de larves D anormales (PNA) de *Crassostrea gigas* en présence d'eau de la Seine (07.07.88).  
(PNA  $\pm$  écart-type).

% eau de la Seine	2.5	5	7.5	10	20
PNA	3.8 $\pm$ 2.6	21.7 $\pm$ 14.1	46.4 $\pm$ 22.4	52.3 $\pm$ 31.4	53 $\pm$ 8.1

Moyennes des pourcentages nets de larves D anormales (PNA) d'huitre et de moule dans un extrait aqueux de sédiment provenant de la Seine (juin juillet 1988).  
(PNA  $\pm$  écart-type).

Sédiment g/l	5	10	25	50	100
<i>Crassostrea gigas</i>	1.9 $\pm$ 5.5	44.1 $\pm$ 3	49.3 $\pm$ 3.7	89.1 $\pm$ 7.7	96.6 $\pm$ 2
<i>Mytilus edulis</i>	1.7 $\pm$ 2.1	6 $\pm$ 0.8	47.1 $\pm$ 7.9	95.2 $\pm$ 5.6	100

Moyennes des pourcentages nets de larves D anormales d'huitre ou de moule en présence de rejet urbains de la station d'épuration de Morlaix filtré sur 0.2 ou 100  $\mu$ m (juin 1989).

		Début Juin		Fin Juin
% rejet urbain	<i>Mytilus edulis</i> 0.2 $\mu$ m	<i>Crassostrea</i> 100 $\mu$ m	<i>gigas</i> 0.2 $\mu$ m	0.2 $\mu$ m
1	5.6 $\pm$ 2.6	26.3 $\pm$ 6.1	5.3 $\pm$ 11.3	-0.004 $\pm$ 0.05
2	-	20.4 $\pm$ 5	7.8 $\pm$ 18.2	4.9 $\pm$ 1.3
3	14.6 $\pm$ 3.6	30.3 $\pm$ 10.9	-	17.5 $\pm$ 3.4
4	-	39.6 $\pm$ 18.1	12.4 $\pm$ 16.5	-
5	15.3 $\pm$ 2	44.9 $\pm$ 12.5	31.8 $\pm$ 20	52.6 $\pm$ 7.9
6	-	77.8 $\pm$ 4.1	48.8 $\pm$ 21.5	-
7.5	63 $\pm$ 5	-	-	95.9 $\pm$ 2.9
8	-	89.6 $\pm$ 7.9	63.4 $\pm$ 11.8	-
10	100	100	93.1 $\pm$ 10	-

Valeurs moyennes des pourcentages bruts (PBA) et nets (PNA) des larves D anormales de moules en présence d'un extrait aqueux de sédiment de la Seine (septembre 1990).

Concentration	%	%
g/l	PBA	PNA
0	32	0
10	65	46
20	90	85
30	97	96
40	100	100
50	100	100

Pourcentages bruts (PBA) de larves D anormales en présence d'un extrait aqueux de sédiment de la Seine (H) ou d'Argenton (A). Bioessai du 11 juillet 1990 sur *Mytilus edulis*.

Milieu N° sous échantillon	Té- moin	A1 10	A1 50	A2 10	A2 50	H1 10	H1 50	H2 10	H2 50
1	15.5	29.3	17.9	41.3	100	11.6	23.5	29.4	69.1
1	18.2	14.1	24.1	46.2	92.6	12.1	38.2	30.8	69.1
2	16.1	28.6	7.8	53.2	93.3	16.7	11.8	34.3	66.7
2	24.7	31.2	10.7	51.7	84.6	25.0	32.1	37.7	69.5
3	11.1	35.8	47.2	27.0	91.7	10.7	31.6	40.5	72.3
3	16.3	26.3	25.4	39.2	90.0	9.2	27.4	40.5	70.5
4	7.7	25.9	38.1	26.8	85.7	18.6	26.6	39.6	60.8
4	16.2	27.5	31.9	32.0	90.7	13.4	33.8	49.5	71.7
Moyenne	15.7	27.3	25.4	39.7	91.9	14.7	28.1	37.8	68.7
écart- type	5.0	6.2	13.4	10.4	4.8	5.2	8.0	6.4	3.6
variance	24.8	38.6	180.4	108.2	22.8	27.0	64.9	40.9	13.2

Pourcentage net de larves anormales (PNA) de *Mytilus edulis* (11 juillet 1990).

	A1 10	A1 50	A2 10	A2 50	H1 10	H1 50	H2 10	H2 50
Moyenne par milieu	13.8	11.5	28.5	89.4	1.2	14.7	26.2	69.2