

## UTILISATION DES ELEVAGES LARVAIRES DE *CRASSOSTREA GIGAS* EN ECOTOXICOLOGIE MARINE

par

Edouard HIS et René ROBERT

I.F.R.E.MER - 63, Boulevard Deganne - 33120 ARCACHON

### ABSTRACT.

The anomalies in the reproduction of the Japanese oyster in the Bay of Arcachon were studied by concentrating our research on the action of different micropollutants on the larvae of *Crassostrea gigas*. The larvae show a great sensitivity to these stress factors. The toxicity levels of these compounds on the fecundation, the formation of D larvae and particularly on the growth of the veligers were determined and the techniques used are described.

The action of these micropollutants on the growth of two algae, *Chaetoceros calcitrans* and *Isochrysis galbana*, which are used as food for the veligers is also analysed.

Finally, bioassays were carried out with sea water and sediments collected from different areas and by extrapolating with the laboratory results the degree of contamination is shown.

### RESUME.

L'étude des anomalies de la reproduction de *Crassostrea gigas* dans le bassin d'Arcachon a été abordée par la mise au point de protocoles expérimentaux tentant à dégager l'action de différents altéragènes sur les véligères; ce matériel biologique s'est révélé particulièrement intéressant compte tenu de sa grande sensibilité aux facteurs d'agression. Les techniques utilisées sont décrites. Elles s'appuient sur la recherche des limites d'action des produits qui sont testés sur les fécondations, la formation des larves D et leur croissance. En outre la sensibilité aux micropolluants des algues fourrages servant à l'alimentation des véligères est précisée.

Elevages larvaires et suivi de la croissance algale permettent enfin d'évaluer la qualité de l'eau de mer et des sédiments en zone conchylicole.

MOTS CLES : Ecotoxicologie, bio-essais, larves, *C. gigas*, Algues unicellulaires, *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros calcitrans*

KEY WORDS : Ecotoxicology, bioassays, larvae, *C. gigas*, unicellular marine algae, *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros calcitrans*

### INTRODUCTION.

La mise au point de la reproduction des huîtres en milieu contrôlé a été motivée par le déclin de l'industrie ostréicole : réduction progressive du captage, liée à une dégradation du milieu (LOOSANOFF, 1969). De même l'étude des mortalités larvaires de *Crassostrea gigas* à Arcachon a été effectuée à l'aide des expériences d'écophysiologie et de molysmologie larvaires (HIS et ROBERT, 1985).

Les techniques mises au point sont décrites avec leurs particularités et leur intérêt. Les différentes applications sont exposées.

### Protocole expérimental, particularité des techniques.

#### Les élevages larvaires.

Le conditionnement des géniteurs permet d'obtenir des produits sexuels toute l'année. L'émission des gamètes est provoquée par chocs thermiques (passages répétés de  $28 \pm 1^\circ \text{C}$  à  $15 \pm 1^\circ \text{C}$  toutes les demi-heures). L'obtention des gamètes par scarification de gonades est proscrite car elle peut donner lieu à l'utilisation de produits non mûrs.

Les ovocytes récupérés sur un tamis de 32 µm sont comptés et répartis à raison de 30.000/litre dans des béchers stériles contenant 2 litres d'eau de mer filtrée à 0,2 µm, aux différentes concentrations du micropolluant étudié (2 témoins et 2 élevages par concentration). Les fécondations sont effectuées en présence de l'altéragène : certains peuvent, en effet, avoir une action directe sur les gamètes (HIS et ROBERT, 1980).

Les résultats obtenus par utilisation, soit d'oeufs déjà fécondés, soit de larves D de 24 heures semblent moins fiables; surtout lorsque les véligères proviennent d'une éclosion de type industriel (WATLING, 1978) : plusieurs couples parentaux sont utilisés et le matériel biologique est sélectionné par tamisage, les larves les plus performantes étant réservées à la production de naissain.

Les élevages sont maintenus à la température de 24<sup>±</sup> 1° C, à l'obscurité et sans aération (ROBERT et al., 1982).

Un premier changement d'eau est effectué au bout de 24 heures : les larves D sont déjà formées dans les témoins; on les répartit à raison de 16.000 dans chaque bécher de 2 litres; puis le renouvellement a lieu tous les deux jours pendant la durée des observations (9 à 12 Jours).

Les véligères sont nourries sur la base de 100 cellules /µl d'élevage à l'aide de cultures d'*Isochrysis galbana* et de *Chaetoceros calcitrans* var. *pusillum* (HELM et MILLICAN, 1977).

Chaque changement d'eau donne lieu aux observations suivantes :

- pourcentages de larves D obtenues dès les premières 24 heures,
- pourcentages de véligères anormales. Il s'agit, soit d'anomalies au niveau du velum qui présente des excroissances irrégulières (CALABRESE et al., 1977) ou de la véliconche (LE PENNEC et LE ROUX, 1979). Le comportement des larves est observé : nage, mobilité, coloration du tractus digestif, traduisant la prise en charge ou non de la nourriture disponible. Les pourcentages d'anomalies ne doivent pas atteindre 5 % dans les témoins (WOELKE, 1972), les valeurs supérieures à 10 % admises par certains auteurs permettent de mettre en doute la validité de leurs observations.

- pourcentages de mortalités par élevage. De la même façon ne peuvent être considérées comme valables que les expériences dans lesquelles les mortalités culminent à 10 % dans les témoins pendant les observations. Les valeurs de 30 à 50% que l'on trouve dans la littérature sont excessives et traduisent l'intervention d'artefacts (action bactérienne par exemple).

- croissance larvaire. Cinquante véligères par élevage sont mesurées sur cliché photographique à l'aide d'une binoculaire stéréoscopique munie d'un micromètre oculaire. Les hauteurs moyennes sont donc calculées sur 100 individus par concentration, à 1,5 µm près, avec intervalle de confiance, au seuil de sécurité de 95 %.

En aucun cas la LC<sub>50</sub> ou la LC<sub>100</sub> ne sont utilisées. En effet, un ralentissement sensible de la croissance larvaire suffit à hypothéquer les chances de maintien d'une espèce dans un biotope donné. La durée des observations (9 à 12 jours) permet de discerner les anomalies de croissance liées à l'action des toxiques; une durée de 48 heures, fréquemment utilisée par les auteurs ne le permet pas : l'expérience montre, en effet, que l'action du polluant peut n'être sensible qu'au bout d'une semaine d'exposition.

L'action d'une dizaine de micropolluants sur les véligères de *Crassostrea gigas* a été étudiée ces dernières années (sels métalliques, pesticides, herbicides), avec les seuils d'action compris entre  $5.10^{-2} \mu\text{g.l}^{-1}$  et  $5.10^2 \mu\text{g.l}^{-1}$ ; or il est impossible de présager du seuil d'action des toxiques. Un test préliminaire est donc nécessaire; d'une durée de 48 heures il permet de dénombrer les pourcentages de larves D anormales obtenues par une gamme très étalée de concentrations, et de choisir les teneurs à tester pour les observations définitives.

#### Les cultures d'algues monocellulaires.

L'action des altéragènes sur les multiplications cellulaires des algues fourrages, *Isochrysis galbana* et *Chaetoceros calcitrans* est étudiée. Les tests sont effectués dans des erlenmeyers de 2 litres contenant un litre de milieu de Conway (WALNE, 1966) enrichi en métasilicate de sodium dans le cas de la diatomée. Sont généralement testées les valeurs égales ou inférieures à celles qui retardent la croissance des véligères; en effet, au dessus de ce seuil, le produit exerce une action suffisamment néfaste pour qu'il représente un danger pour la reproduction de l'huître. Les cultures, en double exemplaire pour les témoins et les différentes concentrations, sont maintenues sous éclairage constant, à la température de  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  et à la salinité de 27 p.mille. Chaque culture reçoit un inoculum de départ tel que la concentration initiale soit de  $10^6$  cellules/ml; on procède à une agitation mécanique trois fois par jour. Les mesures de densité cellulaire sont effectuées au compteur de particules (Coulter Counter) pendant 21 jours; les témoins sont en phase stationnaire. Les observations sur la croissance des algues et des véligères sont complémentaires. En effet, les véligères de bivalves, et celles de *Crassostrea gigas* en particulier, présentent des exigences nutritionnelles particulières. Dans le milieu naturel, les échecs de la reproduction ont pu être mis en relation avec un déficit nutritionnel (LOOSANOFF, 1950; BERG, 1971; HIS et ROBERT, 1985). L'étude d'impact d'un altéragène doit donc inclure des recherches concernant son influence sur les algues fourrages de façon à lever l'hypothèque d'une éventuelle action par voie indirecte. L'utilisation d'un phytoflagellé (*Prymnesiophycée*), *Isochrysis galbana* et d'une diatomée centrique *Chaetoceros calcitrans* est intéressante; outre la qualité nutritionnelle de ces deux algues pour les larves de *Crassostrea gigas*, la réponse des algues unicellulaires aux herbicides, par exemple, varie en fonction de la position taxonomique de l'algue étudiée (HOLLISTER et WALSH, 1973).

Les observations permettent de mettre en évidence la progression de l'action des altéragènes en fonction de leur toxicité croissante (tableau 1). Sera considérée comme seuil, la concentration en dessous de laquelle on n'observe :

- aucun ralentissement de la croissance larvaire pendant la période minimum de 9 jours après les fécondations.
- aucune action sur les multiplications cellulaires des algues fourrages utilisées pendant les 21 jours d'observations.

#### Intérêt du choix de *Crassostrea gigas*, Champ d'application des élevages larvaires de *Crassostrea gigas*.

Intérêt du choix de *Crassostrea gigas*.

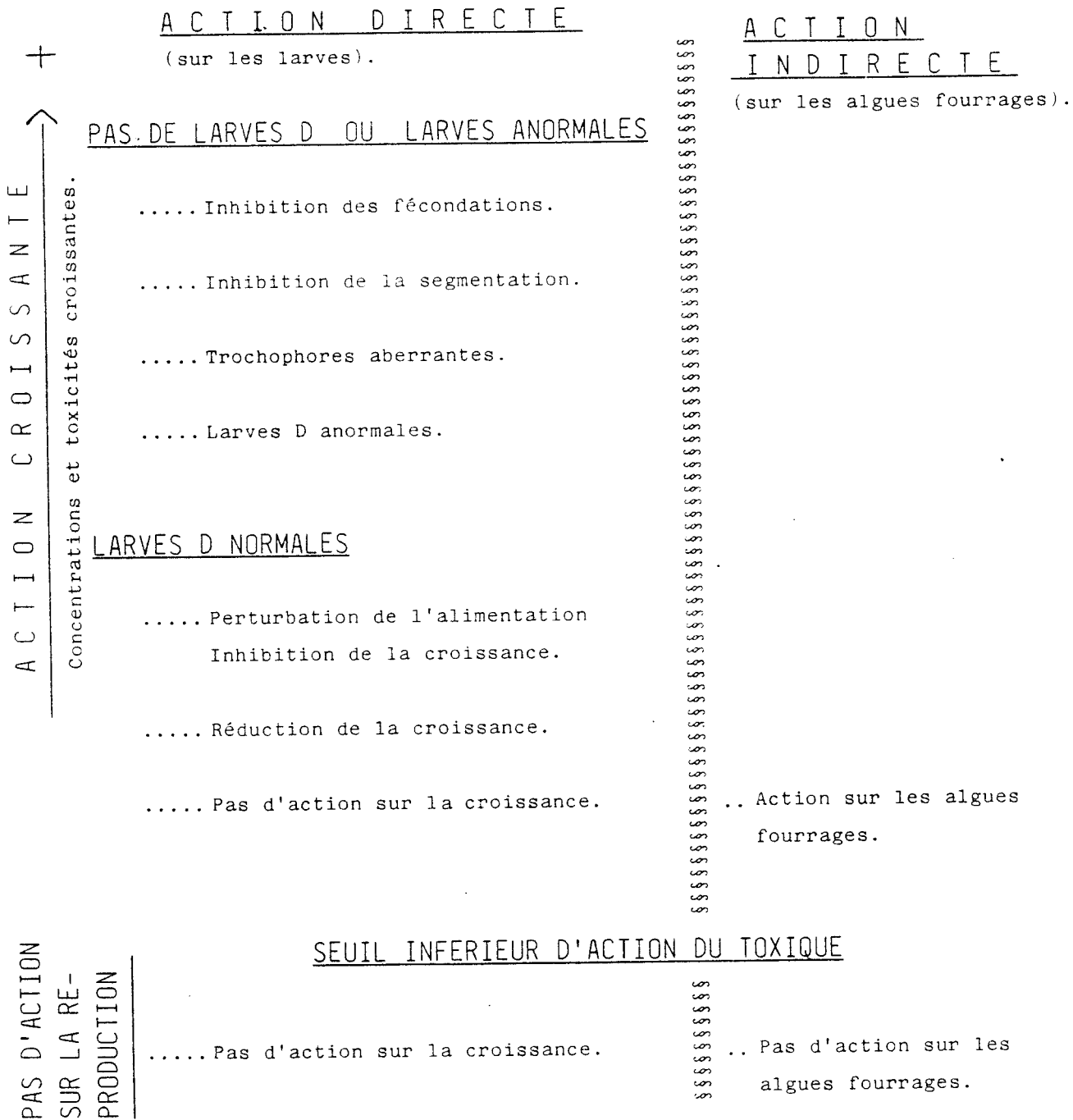


Tableau 1 Progression de l'action des altéragènes sur les oeufs, les embryons et les larves de *Crassostrea gigas* en fonction de leur toxicité croissante.

Il n'est pas possible d'estimer ou de prévoir les conséquences de la transformation, de la complexation ou de l'interaction des altéragènes sur leur toxicité : seuls les systèmes vivants peuvent intégrer toutes les variables qui sont importantes sur le plan biologique (STEBBING *et al.*, 1980). Le choix d'un matériel biologique particulièrement sensible aux facteurs d'agression est donc fondamental : c'est le cas des embryons et des premiers stades larvaires de bivalves; les stades larvaires et juvéniles des invertébrés marins sont en effet les plus sensibles aux stress des polluants (CONNOR, 1972; COSSON et MARTIN, 1981; SHEFFRIN *et al.*, 1984). De plus, bien qu'on ne sache pas exactement si les résultats obtenus sur les embryons d'huitres sont applicables à d'autres espèces, WOELKE (1967) estime que quand les huitres se reproduisent bien c'est en général également le cas pour les autres organismes marins.

La maturation et l'émission des gamètes chez la plupart des bivalves peuvent être obtenues toute l'année; il est facile de réaliser les fécondations sous des conditions expérimentales; le nombre important d'ovocytes émis par une seule femelle (plusieurs millions) permet de mener en même temps un nombre important d'élevages en faible volume.

De nombreux animaux utilisés en toxicologie ne trouvent pas en laboratoire des conditions optimales; il s'en suit "une aggravation de l'action néfaste des polluants" (AMIARD-TRIQUET, 1983). Les véligères, au contraire, croissent et se métamorphosent normalement même en faible volume, ce qui indique un bon déroulement de la vie larvaire.

Malgré l'intérêt que présentent les larves de moules en écotoxicologie (LUCAS, 1976), celles des huitres creuses sont généralement deux fois plus sensibles aux facteurs d'agression (MARTIN *et al.*, 1981). Ces résultats basés sur des observations de laboratoire se sont révélés exacts en ce qui concerne le bassin d'Arcachon, puisque la reproduction de *Crassostrea gigas* a été perturbée de 1977 à 1981 et non celle de *Mytilus galloprovincialis*.

*Crassostrea virginica*, espèce très voisine de *Crassostrea gigas* en ce qui concerne le déroulement de la vie pélagique, a très souvent été utilisée en toxicologie (CALABRESE *et al.*, 1967, 1973, 1977; DAVIS, 1961; DAVIS et HIDU, 1969; HIDU, 1965, par exemple). Néanmoins ces dernières décennies, l'aire de répartition géographique de *Crassostrea gigas* a été largement étendue : région asiatique, Europe, Amérique du Nord et Canada, Australie. Son importance commerciale est beaucoup plus considérable que celle de l'huitre américaine et elle tend à devenir le matériel de choix en écotoxicologie marine (voir synthèse de DESLOUS-PAOLI, 1982).

#### Champ d'application des élevages larvaires de *Crassostrea gigas*.

Outre les études concernant l'action directe des altéragènes, les larves de *Crassostrea gigas* sont utilisées pour la surveillance des zones littorales. On peut estimer avec CHAPMAN et LONG (1983) que la surveillance des pollutions marines par voie chimique et par étude des communautés benthiques, doit être complétée par des "essais biologiques" sur des échantillons d'eau prélevés dans le milieu. WOELKE (1967, 1972) propose l'utilisation des embryons de *Crassostrea gigas*. Cette méthode a permis de mieux appréhender les causes des anomalies de la reproduction à Arcachon (HIS *et al.*, 1983 b, HIS et ROBERT, 1985) et de mettre en évidence la décontamination de cette zone conchylicole perturbée par les sels organométalliques de l'étain; les méthodes chimiques n'étant pas assez sensibles (HIS *et al.*, 1983 a).

Peuvent être recherchées par la technique des bio-essais, l'incidence des eaux de ruissellement sur le potentiel reproducteur des zones conchylicoles (HIS *et al.*, 1983 b) ou l'incidence des rejets de dragage des zones portuaires (NELSON *et al.*, 1983); dans ce dernier cas, les auteurs démontrent l'existence d'une toxicité résiduelle un mois après les déversements dans la zone de rejet. Enfin, les élevages permettent d'évaluer le degré de contamination des sédiments eux-mêmes (CHAPMAN et MORGAN, 1983).

Néanmoins, les auteurs basent généralement leurs observations d'une durée de 48 heures, sur le seul développement larvaire. Des données plus précises doivent être obtenues par l'établissement des courbes de croissance et par les observations sur les multiplications cellulaires des algues fourrages.

#### REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

- AMIARD-TRIQUET, C., 1983. Les tests de toxicité aigüe en milieu aquatique : méthodologie, standardisation, interprétation, limites d'application. *Oceanis*, 9 (6) : 451-463.
- 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.
- CALABRESE, A., DAVIS, H.C., 1967. Effects of "soft" detergents on embryos and larvae of the American oyster (*Crassostrea virginica*). *Proc. Nat. Shellfish. Ass.*, 57 11 - 17.
- CALABRESE, A., COLLIER, R.S., NELSON, D.A., MACINNES, J.R., 1973. The toxicity of heavy metals to embryos of the American oyster *Crassostrea virginica*. *Marine Biology*, 18 : 162 - 166.
- CALABRESE, A., MAC INNES, J.R., NESLON, D.A., MILLER, J.E., 1977. Survival and growth of bivalve larvae under heavy-metal stress. *Marine Biology*, 41 : 179 - 184.
- CHAPMAN, P.M., 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., 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.
- COSSON, R.P., MARTIN, J.L., 1981. The effects of copper on the embryonic development, larvae, alevins and juveniles of *Dicentrachus Labrax* (L) *Rapp. P.V. Réun. Cons. Int. Explor. Mer*, 178 : 71 - 75.
- DAVIS, H.C., 1961. Effects of some pesticides on eggs and larvae of oysters (*Crassostrea virginica*) and clams (*Merceneria merceneria*). *Coml. Fish. Rev.*, 23 (12) : 8 - 23.
- 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.
- HELM, M.M. et MILLICAN, P.F., 1977. Experiments in the hatchery rearing of Pacific Oyster larvae (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture* 11 : 1 - 12.
- HIDU, H., 1965. Effects of synthetic surfactants on the larvae of clams (*Merceneria merceneria*) and oysters (*Crassostrea virginica*). *Journal Water Pollution Control Federation*, 37(2) : 262 - 267.
- 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. moll. 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.
- HOLLISTER, T.A. et WALSH, G.E., 1973. Differential responses of marine phytoplankton to herbicides: oxygen evolution. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 9 (5) : 201 - 295.
- LE PENNEC, M. et LE ROUX, S., 1979. Effets d'un pétrole brut sur la formation de la coquille de *Mytilus edulis* (L.) (*Mytilidae Bivalvia*). *Rev. Int. Oceanogr. Med.*, 55 : 49 - 55.
- LE ROUX, S., 1975. The toxicity of pure hydrocarbons to mussel larvae. *Rapp. P.U. réun. Cons. Int. Explor. Mer.*, 171 : 189 - 190.
- 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) : 2 381 - 2 384.
- LOOSANOFF, V.L., 1950. Variations in long Island oyster set. *All. Fisheries*, 30 : 15 - 16.
- LOOSANOFF, V.L., 1969. Development of shellfish culture techniques. *Proc. Conference on Artificial Propagation of commercially valuable Shellfish, Oysters 22 at 23 october 1969, College of Marine Studies University of Delaware, New York*, 40 p.
- 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., 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.
- ROBERT, R., HIS, E. et MAURER, D., 1982. L'unité d'écophysiologie et de molysmologie larvaires des bivalves d'intérêt commercial du laboratoire I.S.T.P.M. d'Arcachon. *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.*, 45 (3) : 197 - 209.
- 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.
- SIGLER, M. et LEIBOVITZ, L., 1982. Acute toxicity of oil and bilge cleaners to larval American oysters (*Crassostrea virginica*). *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, 29 : 137 - 145.
- STEBBING, A.R.D., AKESSON, B., CALABRESE, A., GENTILE, J.H., JENSEN, A. et LLOYD, R., 1980. The role of bioassays in marine pollution. Bioassay panel report. *Rapp. P.U. Reun. Cons. Int. Explor. Mer.*, 179 : 322-332.
- 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.

- 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. *U.S. Public Health Service Transactions, 3 Seminar on Biological Problems in Water Pollution*.
- WOELKE, C.E., 1967. Measurement of water quality with the Pacific oyster embryo bioassay. *Water quality Criteria, Am. Soc. Testing Mats*, 416 : 112 - 120.
- 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.