

Bal Amandine

IFREMER
BIBLIOTHEQUE
LA TREMBLADE

Rapport de stage de fin d'études du 17 Avril au 23 Juin 2001

Ecotoxicologie d'eaux de rejets agricoles dans le milieu marin



REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier M Daniel Masson qui fut mon maître de stage et qui m'a offert l'occasion de travailler durant dix semaines à ses côtés.

Merci à Pascale qui m'a fait découvrir le REPHY et m'a invité lors de ces différentes sorties en mer (même si c'était à six heure du matin). Et bien sûr tout le personnel et stagiaires de la station de La Tremblade qui m'ont accueilli toujours très amicalement.

Je n'oublie pas non plus Mme Berger ma responsable de stage, qui malgré les distances, m'a donné de précieux conseils.

SOMMAIRE

PRESENTATION de l' IFREMER.....	1
Sur le plan national.....	1
La station de la Tremblade	1
INTRODUCTION.....	4
I LE CONTEXTE DE L'ETUDE.....	6
1 . Les différents marais.....	6
2 . Une cohabitation difficile.....	7
3 . Pourquoi l'agriculture ?.....	8
4 . Le rôle de l'IFREMER et le test « larves d'huîtres ».....	10
II . MATERIELS ET METHODES.....	12
1 . Choix des points de prélèvement.....	12
2 . Protocole du test « larves d'huîtres ».....	14
2 . 1 . Rappels sur la reproduction de l'huître : <i>Crassostrea gigas</i>	14
2 . 2 . Préparation des eaux pour le test.....	16
2 . 3 . Préparation et ensemencement des embryons	17
2 . 4 . Comptage des anomalies.....	21

III . RESULTATS ET DISCUSSION.....	23
1 . Résultats des tests et interprétations	23
1 . 1 . Test du 29 mai 2001.....	23
1 . 2 . Test du 06 juin 2001.....	24
1 . 3 . Test du 11 juin 2001.....	25
1 . 4 . Graphiques des tests du 29/05/01, 06/06/01, 11/06/01.....	26
2 . Comparaison des résultats du 29 mai au 11 juin.....	27
CONCLUSION.....	28
INDEX DES ANNEXES.....	29
INDEX DES FIGURES.....	39
LEXIQUE.....	40
SIGLES.....	41
BIBLIOGRAPHIE.....	42

PRESENTATION DE L'IFREMER

Ce stage s'est déroulé dans une station de l'IFREMER, aussi il m'a semblé important de présenter cet institut et le laboratoire où j'ai été accueillie chaleureusement.

Sur le plan national

L'IFREMER ou Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer, est un établissement public à caractère industriel et commercial. Il est issu, d'après le décret du 5 juin 1984 modifié par celui du 18 février 1998, de la fusion entre la CNEXO (Centre National pour l'Exploitation des Océans) et l'ISTPM (Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes),

L'IFREMER est sous la tutelle conjointe des ministères de la recherche, de l'agriculture, des transports et du logement.

Son budget est de un milliard de francs soit cent cinquante millions d'Euros, et elle possède 1 700 cadres, chercheurs, ingénieurs, marins, techniciens et administratifs.

L'IFREMER a 72 laboratoires et gère la majorité de la flotte océanographique française (submersibles, navires...).

Tout le personnel travaille exclusivement dans le domaine marin, pour :

- Faire des recherches fondamentales.
- Réaliser des travaux dans les technologies de base (acoustique, hydrodynamique...), afin de promouvoir des techniques nouvelles dans l'industrie de la mer.
- Construire, programmer, mettre en œuvre une flotte océanique.
- Assurer le suivi des ressources halieutiques et aquacoles.

L'IFREMER est réparti sur cinq centres, (Boulogne, Toulon, Nantes, Brest, Tahiti) et 24 stations toutes situées le long du littoral français, de la frontière Belge à l'Espagne et à l'Italie.

La station de la Tremblade :

Elle fait partie d'une des 24 stations. Elle est implantée dans le premier bassin ostréicole d'Europe qui produit 30 000 tonnes d'huîtres, et commercialise 60 000 tonnes d'huîtres par an.

L'activité conchylicole est un véritable bassin d'emploi dans la région. Mais, elle est confrontée au tourisme et à l'agriculture qui sont parfois des activités antagonistes. Aussi à la Tremblade, la mission première, est de permettre aux conchyliculteurs de pérenniser leurs exploitations (recherches génétiques, amélioration des techniques d'élevage...), tout en respectant les autres acteurs de la mer, et de surveiller l'environnement littoral.

Cette station a trois laboratoires :

- Le laboratoire DRV/GAP (Direction des Ressources Vivantes, Génétique Aquaculture Pathologie) qui travaille sur les caractères génétiques dans le but d'améliorer les populations de mollusques présentes dans les bassins conchylicoles français, et qui contrôle également les agents pathogènes

- Le laboratoire DRV / LCPC (Direction des Ressources Vivantes / Laboratoire Conchylicole de Poitou Charente) qui étudie entre autres la croissance des coquillages et les stocks disponibles afin d'améliorer les productions du bassin.

- Le laboratoire DEL (Direction Environnement Littoral), qui contribue à la connaissance des écosystèmes côtiers, et à la recherche sur le devenir des masses d'eau. Au sein de ce laboratoire, on distingue trois réseaux :
 - Le REPHY (Réseau de suivi des Phytoplanctons). C'est un réseau de surveillance de phytoplanctons toxiques, qui alerte les autorités lorsqu'il y a un danger à récolter les coquillages.
 - Le REMI (Réseau de suivi Microbiologique) qui établit la qualité sanitaire des zones conchylicoles, en fonction de la concentration en bactéries. Son laboratoire qui fonctionne sous assurance qualité, est en cours d'accréditation par le COFRAC.
 - Le RNO (Réseau National d'Observation de la qualité de l'eau) apprécie la teneur en divers polluants dans la matière vivante (hydrocarbures, pesticides, métaux lourds).

Mon stage s'est déroulé dans le cadre du contrat de plan Etat-Région sur l'impact possible des eaux de rejets agricoles sur la vie marine, et plus précisément l'ostréiculture.

Lors de mon stage, j'ai eu l'occasion de faire des sorties en mer pour procéder à des prélèvements dans le cadre des réseaux REMI ou REPHY.

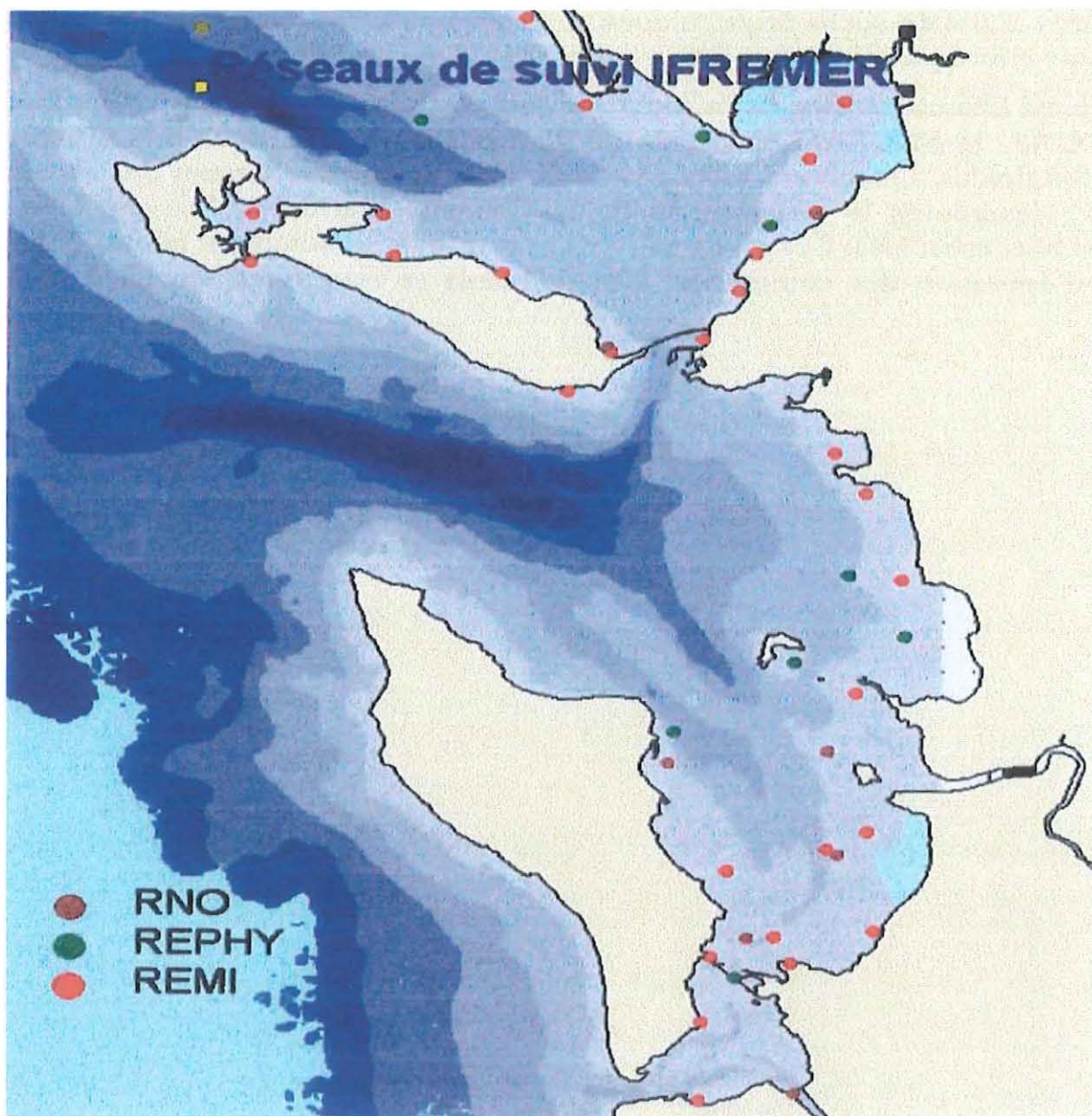


Figure 1 : Plan des points de prélèvement des réseaux RePHY, Remi, et RNO.

Maintenant que nous avons présenté l'organisation de l'IFREMER et de la station de la Tremblade, nous allons pouvoir exposer le travail réalisé durant les 10 semaines de stage.

INTRODUCTION

Les marais ont connu successivement des phases d'exploitation intensive et d'abandon. Ils ont été conquis, sur la mer tout d'abord, pour la production du sel. Mais l'activité salicole ayant déclinée à partir du 17^{ème} siècle, certains bassins ont été comblés, le reste du marais servant à d'autres fins (agricole, conchylicole)

Des claires endiguées ont été aménagés dans les prises d'anciennes salines. Ces claires ostréicoles, submersibles ou non, dites « de sartières », sont plus ou moins submergées à marée haute selon son coefficient.

Mais la principale transformation de structure, c'est la conversion des marais herbagés en îlots de culture, à partir des années soixante dix. Cette mutation porte sur 500 hectares des marais de Brouage. Et les surfaces agricoles atteignent 54% de la surface totale du marais.

La circulation de l'eau dans les marais se fait par des canaux de drainage servant autrefois d'abreuvoir et de clôtures au bétail. Le système est alimenté par le canal Charente-Seudre. Les cultures sont évidemment drainées et des pompes permettent d'évacuer l'eau.

Tous ces réseaux hydrauliques établissent d'étroites relations entre les claires ostréicoles et les îlots de culture. Les conchyliculteurs qui se trouvent en aval des vannes, se sont plaints de l'augmentation de mortalité des huîtres, notamment depuis l'accroissement de l'agriculture intensive en marais. Ils mettent en cause les produits phytosanitaires, comme les herbicides et les fongicides, utilisés abondamment par les cultures intensives du marais et de son bassin versant. L'eau qui traverse les marais est donc un vecteur de pollution.

Il a donc fallu évaluer l'impact de l'arrivée de ces produits, en milieu marin. D'autant plus qu'aucune réglementation n'impose, pour le moment, aux agriculteurs le traitement des eaux de drainage de leurs cultures

Diverses études destinées à évaluer l'impact de l'agriculture sur la vie marine en utilisant notamment l'huître *Crassostrea gigas* ont été mises en place. Cette espèce a été choisie car elle est très sensible aux contaminations, de plus c'est l'espèce dominante cultivée sur la région.

L'IFREMER a donc mis en place un suivi écotoxicologique qui permet, en observant le développement de *Crassostrea gigas* dans une eau, d'évaluer si celle-ci est polluée ou non.

Il s'agit du test d'embryotoxicité « larves d'huîtres ».

Ce rapport rend compte des tests réalisés de début mai à fin juin 2001 sur des eaux sortant du marais de Moëze-Brouage.



FIGURE 2 : PLAN DE SITUATION

Echelle: 1 / 100000

I LE CONTEXTE DE L'ETUDE

1 . Les différents marais

Les marais littoraux charentais ont une superficie de 100 000 hectares. On distingue trois types de marais :

- Les marais doux mouillés que les crues de printemps et d'hiver vont inonder (notamment les vallées de cours d'eau).
- Les marais doux desséchés, qui sont isolés des crues ou des eaux marines par des digues, Le réseau de canaux de drainage (500m/ha) forme le « chevelu ». Ces marais sont utilisés par l'agriculture, pour l'élevage sur prairie ou sont drainés pour y faire des cultures intensives (tournesol, blé, orge, maïs).
- Les marais salés dont l'état varie selon leur niveau par rapport à celui de la mer . Ils sont alimentés en eau de mer à marée haute (« le boire »), éventuellement vidangés à marée basse (« Le déboire »). Ces marais sont alimentés par des chenaux prolongeant ceux des marais doux et comportant surtout des claires ostréicoles. Les terres humides, qui ne sont jamais atteintes par les marées, se trouvent le plus en hauteur.

Le schéma ci-dessous illustre la situation des marais charentais.

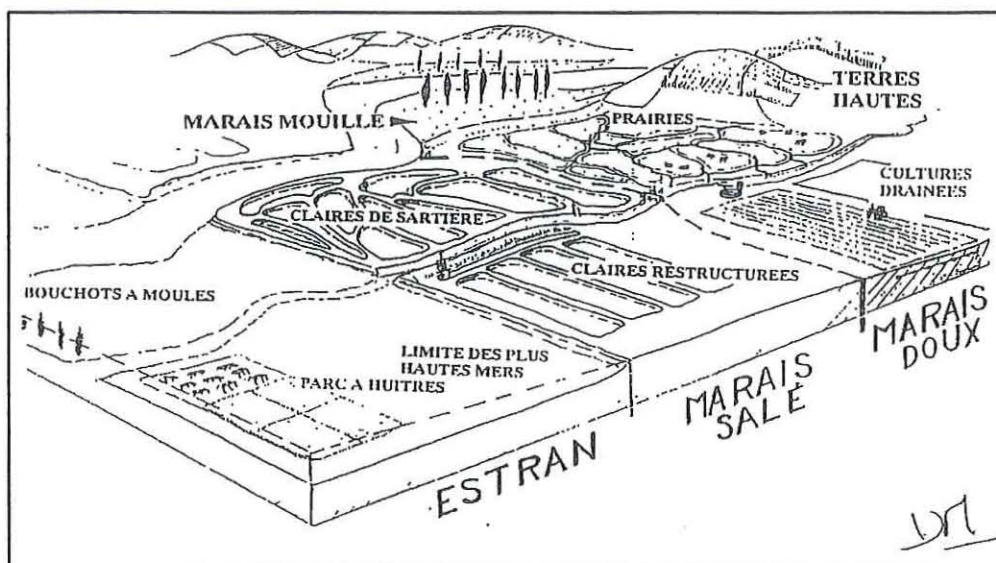


Figure 3 : Schéma des marais en Charente maritime

La gestion est confiée, en Charente Maritime, aux syndicats de marais (associations de propriétaires) qui s'appuie sur en l'UNIMA (Union des Marais de la Charente Maritime, société d'économie mixte), laquelle assure les travaux d'entretien du réseau hydraulique.

2 . Une cohabitation difficile.

Les marais sont mis en valeur par la conchyliculture et l'agriculture. Ces deux types d'exploitations ont une gestion de l'eau tout à fait différente.

En effet, les terres agricoles, primitivement utilisées comme prairie d'élevage, sont souvent amendées à l'aide de gypse (échange cationique entre le sodium et le calcium), pour les rendre cultivables. Ces zones ne cessent de s'étendre. Ce phénomène se traduit par le passage d'une agriculture extensive à une agriculture intensive qui présente des risques pour la qualité des eaux.

Sur le plan quantitatif, les cultures drainées ne peuvent supporter une submersion prolongée avec les pluies d'automne et d'hiver, contrairement aux anciennes prairies.

En aval, les conchyliculteurs ont besoin d'une eau suffisamment salée, dans la partie du marais qu'ils occupent, afin d'assurer la survie des huîtres.

Lorsque l'agriculteur décide d'évacuer l'eau en automne pour éviter de noyer ses champs, il va faire baisser la salinité des eaux dans les marais conchylicoles en aval, ce qui va mettre en péril la survie des coquillages (choc osmotique).

D'avril à septembre, en Charente Maritime, l'eau douce se fait rare, et il est important pour chaque acteur de la garder. Les écluses sont donc fermées, les irrigations pompent les réserves disponibles et il n'arrive plus assez d'eau à la mer pour y amener des sels nutritifs et favoriser la survie des larves d'huîtres.

Toutefois, depuis 1993, la mise en place de calendrier d'ouverture des vannes et la désignation de correspondants, a permis d'éviter la plupart des conflits entre les deux professions.

A ce problème quantitatif des lâchers d'eau et donc de la dilution de la salinité, s'ajoute celui de la qualité de l'eau qui pourrait être altérée par des rejets agricoles.

Il existe deux types de substances véhiculées par l'eau issue de l'agriculture :

- Les engrais et les effluents d'élevage lesquels , dans cette région, sont assez faibles étant donné le peu d'élevage intensif.
Quant aux phosphates, ils sont régulés par un équilibre hydro-minéral (adsorption/ désorption sur le sédiment).
Finalement, la fertilisation agricole n'a qu'un impact limité sur les écosystèmes marins (dans cette zone du moins).
- Les produits phytosanitaires : herbicides, fongicides et insecticides.
Bien qu'il existe une législation et des procédures strictes pour leur homologation, ces produits peuvent représenter un danger par une mauvaise maîtrise des techniques d'utilisation, ce qui se résume le plus souvent, à utiliser trop de produits.

Ces produits sont mis en cause, à tort ou à raison, par les conchyliculteurs, car ils sont suspectés d'augmenter la mortalité des huîtres.



Figure 4 : photo de claires à proximité d'un champs de colza

3 . Pourquoi l'agriculture ?

La proximité de la mer et de l'agriculture peut paraître atypique. En fait, depuis quelques années, le nombre de marais doux en culture a augmenté pour des raisons économiques (PAC, chute du prix de la viande) qui ont obligé les agriculteurs à diversifier leur activité.

De plus le sol des marais doux a quelques qualités, dont une fine couche de matière organique appelée mat racinaire qui se trouve en dessus de l'argile d'origine marine. Ce sol contient 40 à 50 % d'argile, beaucoup de sel, une teneur en calcaire élevée, et un pH alcalin entre 7 et 9.

cf. Annexe 1 Profil pédologique du sol des marais

Or on peut faire de bonnes cultures dans des sols peu sodés et riches en calcium, ce qui permet la floculation de l'argile. Il faut donc, dans le cas des marais charentais, diminuer la salinité du sol.

Il existe deux techniques qui vont permettre de rendre le sol de meilleure qualité :

- Le drainage qui va faire baisser la nappe sous jacente. On utilise pour cela, des rigoles ou des drains enterrés. Ce processus est à l'origine des rejets agricoles.
- Le dessodage qui est une élimination du sodium fixé par échange cationique avec le calcium (gypsage = apport de sulfate de calcium). Un marais argilo-calcique est bien plus favorable aux cultures qu'un marais argilo-sodique.

C'est en fonction du sol que va être déterminé le type de drainage et de dessodage.

Puis l'agriculteur doit en fonction des saisons, de sa culture (maïs, blé...), utiliser des produits phytosanitaires : désherbant total, puis sélectif, éventuellement insecticide.

Pour exemple, la culture de tournesol nécessite un apport « d'insecticide sol » d'avril à mi-Mai, alors que les céréales sont traitées de septembre à octobre.

cf. Annexe 2 : Les différentes périodes d'utilisation des produits phytosanitaires

On classe ces produits phytosanitaires en quatre catégories :

- Les herbicides
- Les fongicides
- Les insecticides
- Les molluscides.

Les risques qu'ils présentaient pour l'environnement ont également été évalués (notamment lors de procédures d'homologation).

- Pour cela on détermine cinq caractéristiques physico-chimiques :
 - Le coefficient de partage Carbone organique - eau (K_{oc}).
 - La demi-vie dans le sol ($T_{1/2}$)
 - L'indice de mobilité de Gustafson.
 - La stabilité de l'eau à différent pH
 - La photodégradation

cf Annexe 3 : Certains produits phytosanitaires et leurs caractéristiques

- Ensuite, l'on procède à des études écotoxicologiques.

Les recherches écotoxicologiques au niveau des produits phytosanitaires se font par des tests de CL_{50} (concentration létale à 50%) sur 96 à 48 heures.

cf Annexe 4 : Ecotoxicité des produits phytosanitaires.

Mais toutes les données sur tous les invertébrés ne sont pas publiées, et surtout aucun biotest n'est faite sur la faune marine (non inclus dans les procédures d'homologation).

4 . Le rôle de l'IFREMER et le test larves d'huîtres

Afin de fournir des éléments de discussion basés sur une réalité scientifique et de contribuer à pérenniser l'exploitation agricole et conchylicole du marais, l'IFREMER a tenté de mettre en place, depuis 1984, une étude de la qualité des rejets agricoles dans les marais charentais.

En 1993, après les tentatives d'évaluation des quantités de produits phytosanitaires arrivant à la mer (cf annexe 5), l'IFREMER a débuté une surveillance biologique.

Le test d'écotoxicité : « test larves d'huîtres de *Crassostrea gigas* » a ainsi été choisi. Il s'agit d'un test d'embryotoxicité puisqu'il se fait après fécondation à l'opposé du test de spermioxicité qui se déroule avant celle-ci.

Ce test présente plusieurs intérêts.

Tout d'abord on utilise un système vivant qui peut intégrer toutes les variations qui sont importantes sur le plan biologique.

D'autre part au stade embryonnaire comme aux premiers stades larvaires, les huîtres sont particulièrement sensibles et leur malformations mettent en évidence la présence d'un facteur nocif dans le milieu. Au stade dit « D », les anomalies sont faciles à discerner. Une larve anormale n'aura pas une forme en D régulier. Bien que l'on ne sache pas si les résultats pour les embryons d'huîtres s'appliquent à d'autres espèces, l'on sait que lorsque les huîtres se reproduisent bien (c'est à dire avec peu d'anomalie), les autres organismes marins aussi (Woelke 1967).

Ce type d'élevage a d'autres avantages puisque la maturation peut se faire toute l'année, et que l'élevage en laboratoire, dans de faibles volumes, n'entraîne aucun problème au niveau de la métamorphose.

De plus, cette espèce *Crassostrea gigas* est largement commercialisée (Europe, USA, Australie...).

Le test consiste à faire féconder des œufs en laboratoire, à l'aide de deux géniteurs de *Crassostrea gigas* mâle et femelle. Les embryons sont introduits dans des cuvettes contenant différentes eaux à analyser. Après 24 heures, on fixe les larves et l'on compte le nombre d'anomalies sur 100 larves recensées. On considère comme normale une larve ayant bien une forme en D.

Au vu des résultats, il est possible de dire si l'eau testée induit ou non des malformations.

Mais le test réalisé ainsi (monitoring) ne permet pas de déterminer quelles substances peuvent être mises en cause, et en quelles quantités.

C'est pourquoi le CEMAGREF (Centre National du Machinisme Agricole, du Génie Rural, des Eaux et des Forêts) complète les analyses ayant donné des résultats élevés de malformations, par une analyse chimique. En effet, le CEMAGREF, va procéder à des analyses sur une dizaine de produits phytosanitaires à partir des mêmes échantillons d'eau que ceux de l'IFREMER.

Toutefois lorsque les résultats, écotoxicologiques et chimiques concordent, il est encore impossible, pour le moment, de mettre en cause telle ou telle substance dans l'apparitions de malformations. On ne peut encore affirmer que la présence d'un herbicide à une teneur donnée, par exemple, est à l'origine d'anomalies des larves,

sauf à ne trouver que cette substance dans l'eau prélevée et en connaître les doses d'action sur les larves. Ceci a déjà été réalisé pour quelques substances (atrazine, glyphosate,...), mais l'on ne trouve jamais dans les eaux de marais un seul produit. C'est toujours un mélange des substances actives et / ou de leurs produits de dégradation, ces derniers étant parfois plus toxiques que les molécules d'origine.

La problématique du sujet est donc la qualité des eaux des marais charentais, nous allons, à présent, exposer le test mis en place pour évaluer la pollution des eaux.

II . MATERIELS ET METHODES.

1 . Choix des points de prélèvement

Quatre points de prélèvements ont été choisis par leur probabilité d'être pollués (proximité d'agriculture, chenal de rejet ...) et leur capacité à polluer les exploitations ostréicoles (par l'eau qui entre dans les claires).

Lors des premiers tests, en 1993, il y avait d'avantage de points de surveillance, mais certains ont été abandonnés. En effet, seul un préleveur automatique (toutes les heures) pouvait déceler un pic de pollution. En dehors de ce pic, les tests ne montraient aucune pollution ou très faible.

Tous les points restants se trouvent dans le marais de Moëze-Brouage, une zone où cohabitent agriculteurs et conchyliculteurs. Ce site est caractérisé par la présence d'îlots agricoles drainés où se trouvent beaucoup de cultures intensives. D'autre part, se trouve un ancien site expérimental de l'INRA qui travaillait sur l'irrigation et collaborait avec l'IFREMER pour l'étude des rejets des marais charentais. Cette collaboration a été abandonnée lorsque l'INRA a fermé ce site.

Voici la liste des quatres points de prélèvement qui sont le plus souvent utilisée pour le test.

Le point de prélèvement N° 1 : Ecluse de Montportail.

A cet endroit est rejetée l'eau issue de l'îlot agricole dit « des Berlotteries ». L'eau rejetée à marée descendante peut entrer dans un complexe de claires ostréicoles tout proche ; lors de son alimentation à marée montante.

Le point de prélèvement N°2 : Ecluse des Tannes.

Ce point se trouve à l'extrémité d'un chenal de drainage de plusieurs centaines d'hectares de marais drainés. L'eau est déversée dans le chenal conchylicole de Brouage, lequel alimente des claires ostréicoles le long des berges.

Le point de prélèvement N°3 : Havre de Brouage.

C'est ici que commence la zone conchylicole de Brouage, le long du chenal ou l'eau est prélevée pour alimenter notamment les établissements d'expédition de coquillages.

Le point de prélèvement N°4 : Ecluse de Beaugeay.

Il est le plus éloigné de la mer. C'est de là qu'arrivent les eaux douces du canal Charente-Seudre, alimentants les marais doux de Moeze en eaux venant de la Charente (750000 ha de terres agricoles, avec d'éventuels apports polluants).

La réalisation de ces prélèvements n'est pas dépendante des marées, il est juste important que le chenal (point N°3) contienne assez d'eau pour remplir la bouteille en verre brun. Il faut compter environ 2 heures pour faire tous les prélèvements et retourner à la station. Généralement ces prélèvements sont effectués le matin ou la veille au soir, afin de réaliser rapidement le test dans l'après midi ou le lendemain matin.

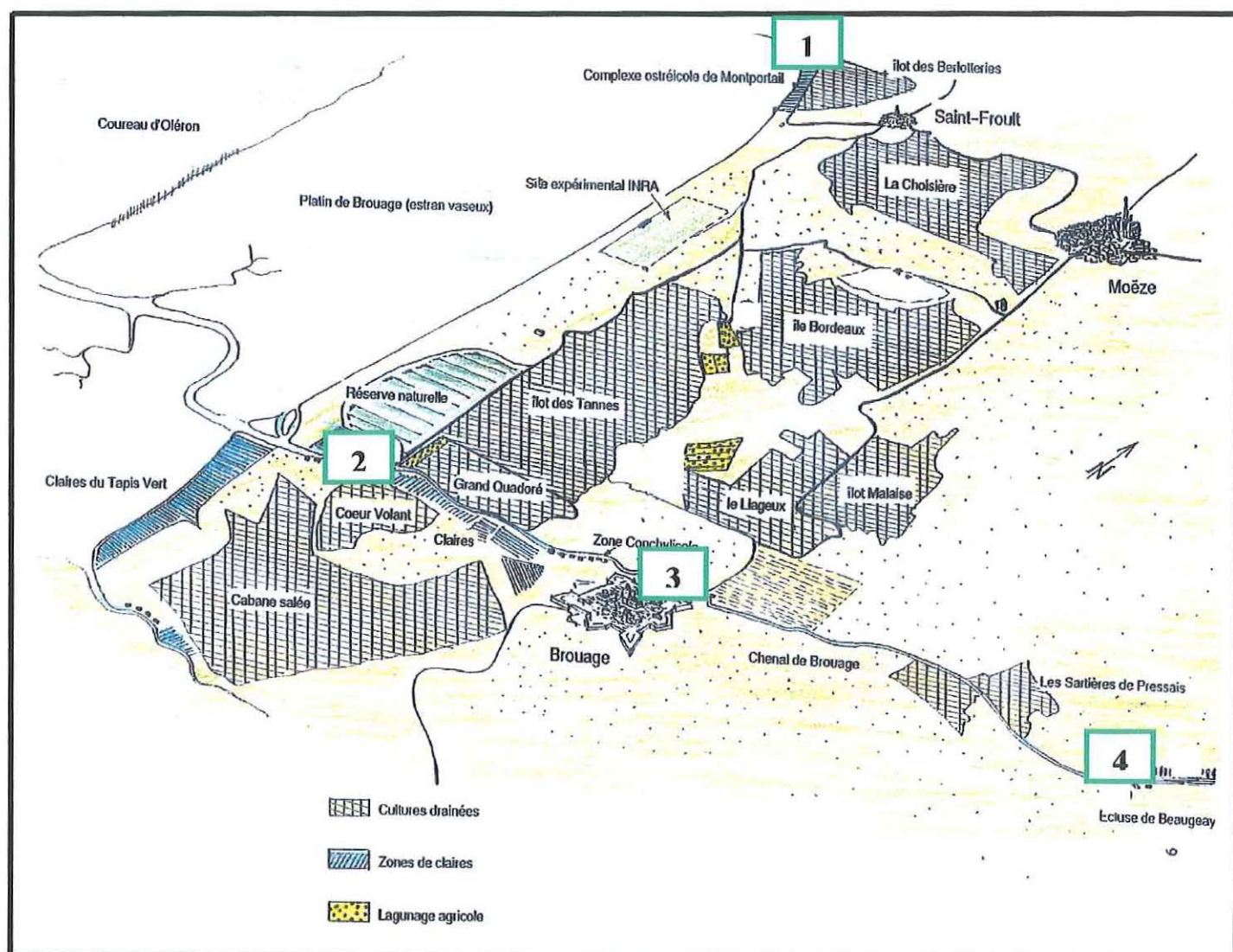


Figure 5 : Plan des points de prélèvements

Sur ce plan, se trouvent les 4 points qui ont été utilisé lors des tests.

Ce sont les points :

- 1 : Sortie de l'îlot drainé des Berlotteries
- 2 : Ecluse des Tannes
- 3 : Chenal conchylicole de Brouage
- 4 : Ecluse de Beaugeay

2 . Protocole du test « larve d'huîtres ».

Avant de mettre en place le test larve d'huître, il est bon, de rappeler quelques notions sur la reproduction de *Crassostrea gigas*.

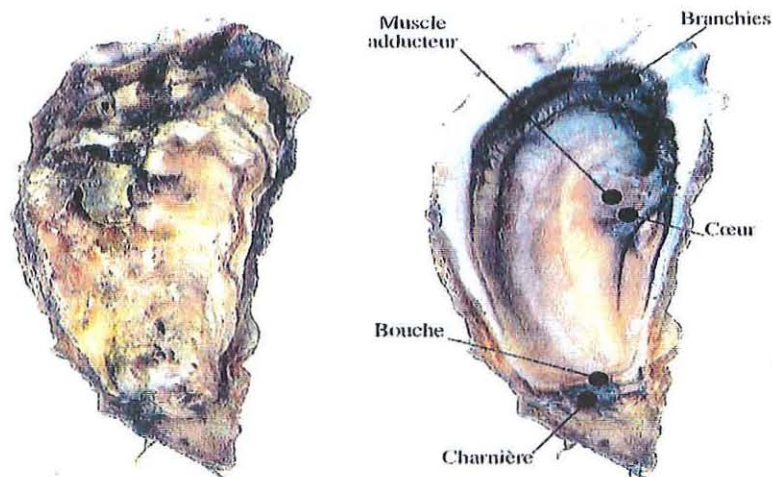


Figure 6 : Photo l'huître *Crassostrea gigas*

2 . 1 . Rappels sur la reproduction de l'huître : *Crassostrea gigas*

Crassostrea gigas est une espèce hermaphrodite avec sexualité alternative. C'est à dire que les individus sont soit en phase mâle, soit en phase femelle pour les plus âgées ,en général.

2 . 1 . 1 . Les gonades

L'appareil reproducteur est réduit aux gonades et l'absence de formations annexes facilite le changement de sexe. Ces gonades se développent par étapes et en fonction de facteurs externes. En voici trois principaux :

- La salinité ne doit jamais descendre en dessous de 25‰.
- Une température minimale favorable au déroulement de la gamétogenèse et une température minimale critique au-dessous de laquelle, les émissions de produits sexuels ne peuvent se faire.

- La nutrition joue, aussi, un rôle important ; puisqu'un jeun peut provoquer l'arrêt de phénomènes sexuels et la lyse des gamètes.

Les deux premiers facteurs sont très importants pour le bon déroulement du test larves d'huîtres et donc à bien surveiller.

La maturation artificielle de *Crassostrea gigas* est obtenue au bout de 2 mois en période hivernale, alors qu'en juin elle est de 15 jours.

2 . 1 . 2 . L'émission des gamètes et la fécondation.

Toute variation brutale du milieu déclenche l'émission des produits sexuels, la température étant un des facteurs les plus importants.

L'éjaculation des mâles se présente sous un mince filet. Pour la femelle, on observe le soulèvement puis l'abaissement brusque de la coquille ce qui entraîne l'expulsion d'un nuage d'ovocytes.

La fécondation, c'est à dire la rencontre entre le spermatozoïde et l'ovocyte et leur fusion en pleine eau, va permettre la maturation de l'œuf. On observe tout d'abord, l'émission du premier globule polaire sans fusion des pronucléi. Puis, lorsque le second globule polaire est émis, les pronucléi mâle et femelle fusionnent. Vient alors la phase embryonnaire.

2 . 1 . 3 . La phase embryonnaire

A la suite de l'émission des globules polaires, l'œuf va se diviser. Les premières divisions conduisent aux blastomères. Puis la troisième division aboutit à la formation du stade morula. Ensuite on observe un embryon cilié qui peut se déplacer en tournant, c'est la blastula. Quatre à six heures après la fécondation, a lieu la gastrulation (ébauche du système digestif). Le stade embryonnaire est alors terminé et une nouvelle phase commence.

2 . 1 . 4 . La phase larvaire

Elle comprend deux stades : la trochophore et la véligère.

La trochophore : Une glande coquillière commence à se développer et une couronne de cils (prototroche) sert d'organe nageur. Un tube digestif s'est formé.

La véligère : Ce stade a lieu 24 heures après la fécondation. De nombreux organes se sont alors formés (organe de nage bilobé, un velum cilié, un tube digestif fonctionnel) et une coquille secondaire apparaît. La jeune larve a une forme de D majuscule avec une charnière droite, facilement reconnaissable.

C'est à ce stade que l'on fixe les larves d'huîtres pour le test et que l'on peut compter les anomalies. Leur développement est donc stoppé lors du test.

Normalement vient ensuite les deux dernières phases :

La métamorphose qui représente le passage de la vie pélagique à la vie benthique (fixation sur n'importe quel support solide).

Puis la phase juvénile : le naissain ressemble à un adulte mais n'a pas de gonades, il sera mature dans un an.

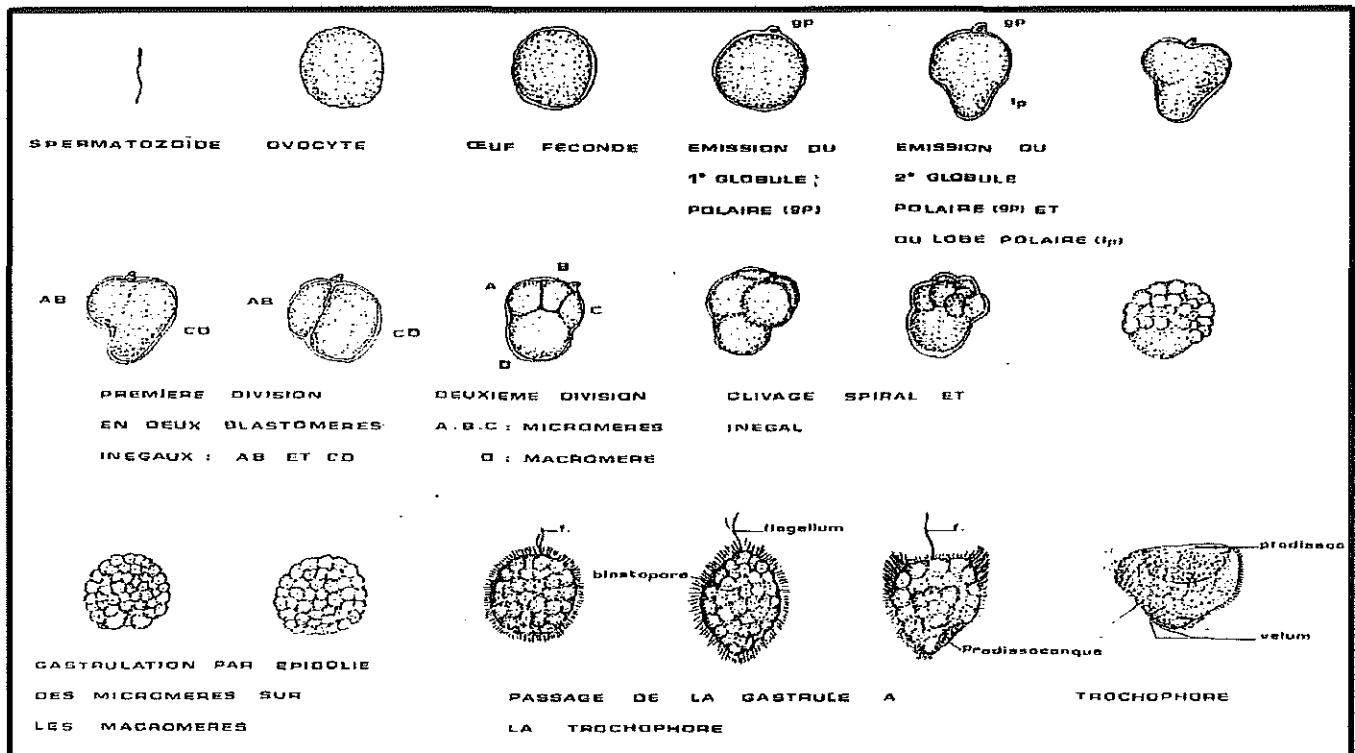


Figure 7 : Schéma des différents stades de développement de l'huître

Ce schéma présente le développement de l'huître jusqu'au stade Trochophore, le stade qui précède le stade Larve D.

2.2. Préparation des eaux pour le test:

L'eau est prélevée dans des bouteilles en verre brun stérilisées et correctement identifiées (lieu de prélèvement et heure).

Une fois au laboratoire, on mesure la salinité dans chacun des échantillons, puis on mélange un tiers de l'eau échantillonnée avec deux tiers d'eau de mer filtrée à 32 μm . On mesure de nouveau la salinité de l'eau, qui doit être de 25 ‰ environ. Dans le cas contraire on élève la salinité à l'aide de sel marin. Pour les acuvettes témoins, on utilise de l'eau de mer filtrée.

Pour chaque échantillons on a 5 acuvettes (A, B, C, D, E) contre 10 acuvettes pour le témoin.

Les acuvettes sont des petits récipients en plastique de 30 ml qui permettent une observation directe au microscope inversé sans enlever le bouchon, ni faire de transfert particulier.



Figure 8 : Les acuvettes

Problèmes rencontrés :

Lors des deux premiers tests, nous avons utilisé de l'eau distillée pour faire les témoins. Mais le comptage des anomalies était nettement supérieur à 20% pour les témoins, alors que dans certaines eaux à tester, l'on avait des résultats faibles en anomalies. La qualité des embryons n'étaient donc pas en cause.

Or nous savions, qu'une autre équipe à Arcachon, avait utilisé le même lot d'huîtres, sans avoir un taux d'anomalies supérieur à 20% pour les témoins. Aussi nous avons mis en cause l'eau distillée.

Après avoir pris des renseignements auprès des personnes s'occupant de l'écloserie, et donc pratiquant aussi des fécondations, nous avons appris que l'eau distillée était fortement déconseillée pour cet usage.

Le problème qui se pose alors, est d'utiliser une eau dépourvue de toutes pollutions. Donc nous avons utilisé de l'eau de mer filtrée, si possible, récupérée en pleine mer et « la plus saine » pour les témoins.

2.3. Préparation et ensemencement des embryons :

2.3.1. La fécondation

Pour réaliser une fécondation, on utilise une dizaine d'huîtres matures (3 à 4 ans) afin d'être sûr d'avoir mâles et femelles, et de pouvoir choisir les meilleurs géniteurs.

Pour obtenir rapidement une ponte, il est important de placer les huîtres au sec au minimum une nuit, et pour ne pas polluer la ponte, on nettoie les huîtres à la brosse, afin d'enlever les épibiontes (jeunes huîtres, balanes, serpules).

La ponte se fait dans des cuvettes en plastiques contenant de l'eau de mer filtrée. Comme on l'a vu précédemment la ponte peut être induite par des chocs thermiques. C'est de cette manière que nous allons entraîner l'émission des œufs. On ne peut pas sacrifier les huîtres et extraire le produit de leurs gonades, car on risquerait d'avoir des embryons mal formés, ce qui fausserait le test.

Le premier choc thermique se fait en chauffant l'eau, au bain-marie à 28 °C.

Au bout de 30 minutes si l'on n'observe aucune ponte, on fait un deuxième choc thermique à 18°C. Il suffit donc de vider la première eau, puis de la remplacer par de l'eau de mer filtrée à 18°C. Comme précédemment on laisse baigner les huîtres pendant 30 minutes, et s'il n'y a toujours rien, on fait un troisième choc à 28°C.

C'est l'alternance de ces chocs thermiques (18°C et 28°C), qui va stimuler la ponte.

On peut, par ailleurs, sacrifier une huître et prélever de la suspension de produits sexuels que l'on injecte à proximité du siphon inhalateur des autres huîtres. Cette suspension contient des phéromones qui induisent la ponte des autres individus, comme dans la nature.

Dés qu'une huître va se mettre à pondre, elle sera isolée dans un bocal contenant de l'eau de mer filtrée. Ce bocal est correctement identifié : heure et sexe.

C'est lors de la ponte que l'on est en mesure de reconnaître le mâle de la femelle. Le mâle éjacule un mince filet blanchâtre, alors que la femelle émet un nuage d'ovocytes.

Puis au microscope, on observe les gamètes afin de déterminer quels sont les deux meilleurs géniteurs.

Les ovocytes doivent être ovales ou en forme de poire, mais ne doivent pas être anguleux, ce qui est signe de non-maturité. Les ovocytes étant très fragiles, on ne peut les garder qu'une vingtaine de minutes en bocal, avant la fécondation.

Les spermatozoïdes doivent être vigoureux, et très mobiles. Ils sont beaucoup moins fragiles et donc peuvent rester quelques heures en bocal sans subir des dommages.

On prélève un litre d'eau (et d'œufs) du bocal de la femelle qui a été choisie, dans une éprouvette d'un litre, en filtrant avec un tamis de 100 µm. Puis on ajoute 10 ml de solution de spermatozoïdes tamisée à 32 µm, prise dans le bocal d'un mâle. Le tamisage permet d'éliminer d'éventuels œufs émis avant l'isolement du géniteur.

Cette suspension est agitée doucement de haut en bas, pendant 5 minutes.

Enfin on prélève 10 ml de cette solution que l'on met dans une éprouvette de 250 ml complétée avec de l'eau de mer filtrée. Tout en agitant, on prélève 0.1 ml, deux fois lors de la montée de l'agitateur puis deux fois lors de la descente. On dépose chacun des quatre prélèvements dans des lames creuses.

2.3.2. Remplissage des acuvettes.

On compte alors le nombre d'œufs contenus dans chaque lame creuse.
Soit N , le nombre d'œufs dans la lame creuse.

Démonstration :

- N œufs dans 0.1 ml issu de l'éprouvette de 250 ml
- $N * 250 / 0.1 = N * 250 * 10$, est le nombre d'œufs dans l'éprouvette de 250 ml.
- Or cette solution a été préparée à l'aide de 10 ml de l'éprouvette de 1 litre.

Donc on a N' œufs par ml, dans l'éprouvette de un litre.
Soit : $N' = (N * 250 * 10) / 10 = N * 250$

On veut environ 600 œufs par acuvette, or on connaît le nombre d'œufs par ml (N').

Donc on devra prélever X ml de l'éprouvette de un litre que l'on mettra dans chacune des acuvettes.

$$X = N' / 600$$

X en ml

Une fois les acuvettes remplies, on les met à incuber à 24 ° C, pendant 24 heures dans une enceinte thermostatée.

cf Annexe 6 : Liste du matériel

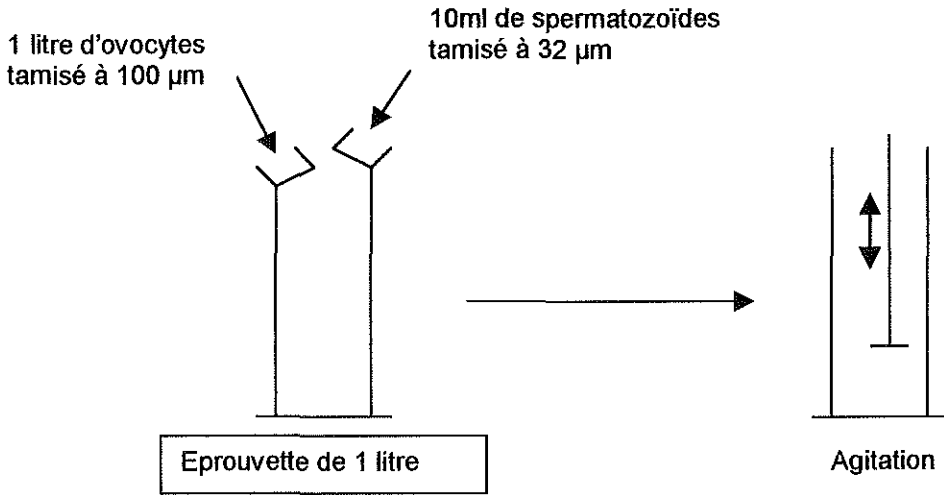
Figure 9 :
Schéma du Test larve d'huître

1.



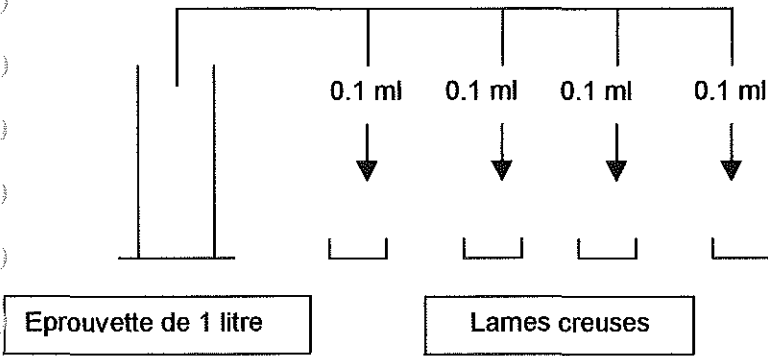
Sélection des meilleurs géniteurs

2.



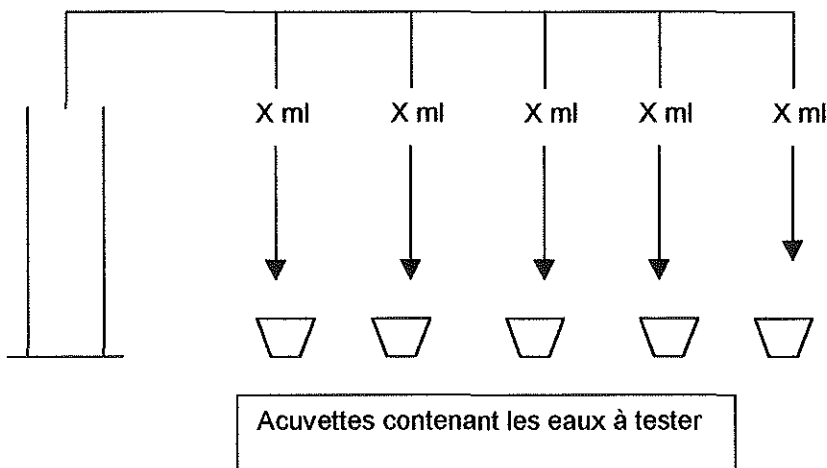
Fécondation

3.



Observation et comptage des œufs

4.



Remplissage des acvettes

2.4. Comptage des anomalies.

Après incubation de 24 heures, on fixe les larves au formol à 4 % ce qui va permettre de dénombrer les larves.

On compte sur 100 larves, le nombre de larves ayant des anomalies.

Le test sera considéré comme valable si le témoin présente moins de 20% d'anomalies.

Cette observation se fait au microscope au grossissement 100 µm.

On répertorie comme anomalies :

- Une incurvation de la véligère (type b)
- Une coquille irrégulière avec des échancrures (type c)
- Une valve non développée (type d)
- La masse viscérale qui sort de la coquille (type e)

En comparaison une larve dite normale a une belle forme de D régulier.

Voici les différents types d'observations que l'on peut faire au microscope :

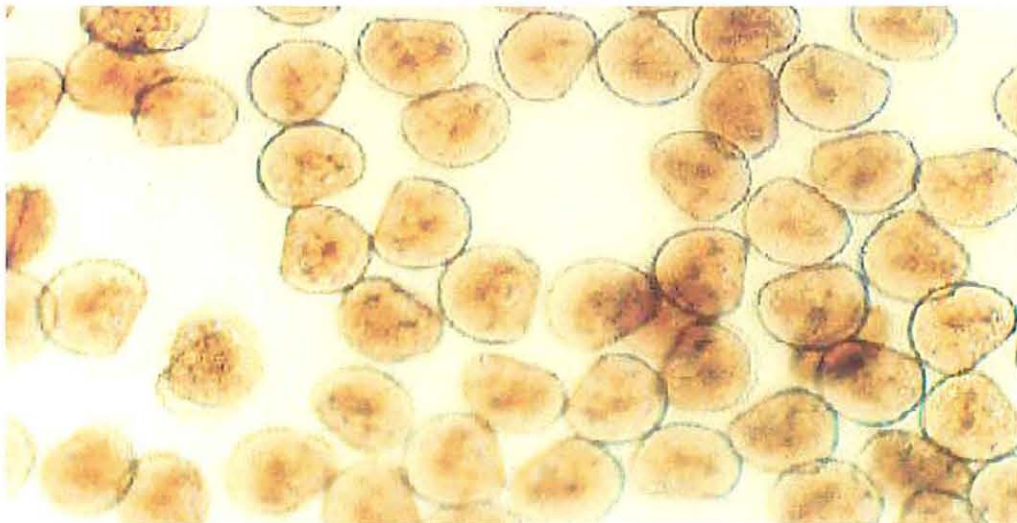


Figure 10 : Photo d'une observation d'acuvette au microscope

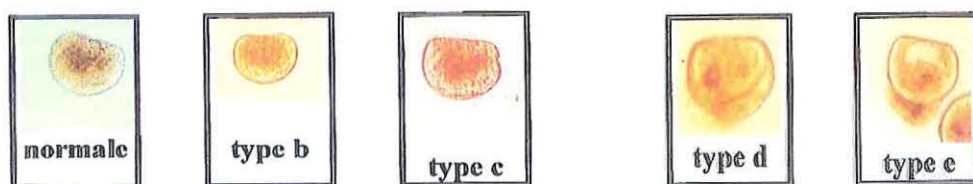


Figure 11 : Une larve D normale et les différentes anomalies observables

Problèmes rencontrés :

Pour les premiers tests nous avons utilisé du Formol Lugol pour la fixation. Or ces trois premiers tests n'étaient pas exploitables, vu le nombre d'anomalies trop grand dans le témoin.

Aussi comme le lugol entraîne une coloration orangée, nous avons pu observer que lorsque nous introduisons moins de fixateur, et donc que l'acuvette était moins orangée, le nombre d'anomalie chutait.

Forts de cette découverte, nous avons émis des doutes sur le fixateur et avons nous même préparé un fixateur ne contenant que du formol à 4 %.

Le premier test avec le nouveau fixateur a été réalisé le 29 mai et a donné de faibles taux de larves anormales faibles pour les témoins.

Nous allons donc présenter les résultats obtenus pour trois tests réalisés du 29 mai au 11 juin 2001.

III . RESULTATS ET DISCUSSION

1 . Résultats des tests et interprétations

A chacun des tests correspond une fiche qui indique les salinités, les chocs thermiques etc. Ces fiches se trouvent en Annexe 7.

Les résultats des comptages d'anomalies sont exprimés avec un intervalle de confiance (I.C) au seuil de 95 %.

1 . 1 . Test du 29 mai 2001

	A	B	C	D	E	moyenne	I.C à 95%	min < μ < max
1	7	6	4	3	8	5,6	1,8	3.8 < μ < 7.4
2	58	37	29	42	47	42,6	9,5	33.1 < μ < 52.1
3	4	6	9	10	6	7	2,1	4.9 < μ < 9.1
4	8	7	2	6	8	6,2	2,2	4 < μ < 8.4
TEMOIN	6	7	4	3	6	5,2	1,4	3.8 < μ < 6.6
TEMOIN	12	6	7	15	13	10,6	3,4	7.2 < μ < 14

μ : moyenne

Les témoins ont moins de 20 % d'anomalies, aussi le test est validé.

Les points 1, 3 et 4 ont un taux de malformations du même ordre que celui des témoins (5.6, 7 et 6.2 %), donc ils n'ont pas de toxicité pour les larves d'huîtres.

Mais le point 2 a un taux d'anomalies de 42.6 %, donc il représente un certain degré de pollution pour le milieu marin.

1.2. Test du 06 juin 2001

	A	B	C	D	E	moyenne	I.C à 95%	min < μ < max
1	100	100	100	100	100	100	0	100 < μ < 100
2	100	100	100	100	100	100	0	100 < μ < 100
3	12	13	11	13	13	12,4	0,8	11.6 < μ < 13.2
4	22	9	8	15	14	13,6	4,9	8.7 < μ < 18.5
TEMOIN	2	1	3	2	4	2,4	1	1.4 < μ < 3.4
TEMOIN	7	2	6	3	13	6,2	3,8	2.4 < μ < 10

Les témoin eau de mer filtrée ont des taux d'anomalies inférieur à 20 % (2.4% et 6.2%), donc le test est recevable.

Les points 1 et 2 ont 100% de malformations, la plupart des acuvettes contenaient des embryons monstrueux. Ces deux points présentent une qualité biologique de l'eau médiocre. C'est pourquoi les échantillons d'eau ont été envoyés au CEMAGREF pour des analyses chimiques afin d'identifier les produits qui peuvent être mis en cause. Malheureusement les délais étant trop longs les résultats ne pourront être consignés dans ce rapport.

Les points 3 et 4 ont des taux d'anomalies faibles (12.4% et 13.6%), l'eau ne présente ici aucun danger pour la vie marine.

1.3. Test du 11 juin 2001

En plus des points habituels, nous avons analysé différentes concentrations en atrazine (herbicide) à 1, 0.5, 0.25 µg / l, dans le cadre d'un sujet de DEA sur les produits phytosanitaires. Pour les dilutions, c'est l'eau de forage qui a été utilisée. Ce forage se situe sur une nappe fossile à - 300 m, utilisé couramment par l'écloserie de la station. Donc il est nécessaire de faire un témoin eau de forage, afin de s'assurer que cette eau n'entraîne pas d'anomalies.

	A	B	C	D	E	moyenne	I.C à 95%	min < µ < max
1	100	100	100	100	100	100	0	100 < µ < 100
2	100	100	100	100	100	100	0	100 < µ < 100
3	9	3	16	2	10	8	5	3 < µ < 13.
4	100	100	100	100	100	100	0	100 < µ < 100
TEMOIN	7	3	3	3	2	3,6	1,7	1.9 < µ < 5.3
TEMOIN	6	3	4	2	2	3,4	1,5	1.9 < µ < 4.9
Témoin forage	12	15	10	14	15	13,2	1,9	11.3 < µ < 15.1
Atrazine en µg / l	1	19	33	27	25	26,4	4	22.4 < µ < 30.4
	0.5	23	27	22	46	29,8	8,5	21.3 < µ < 38.3
	0.25	29	33	23	22	26,4	4,5	21.9 < µ < 30.9

Les témoins eau de forage et eau de mer filtrée ont des taux d'anomalies inférieurs à 20 % (3.4, 3.6, et 13.2 %), ce qui témoigne de la validité du test.

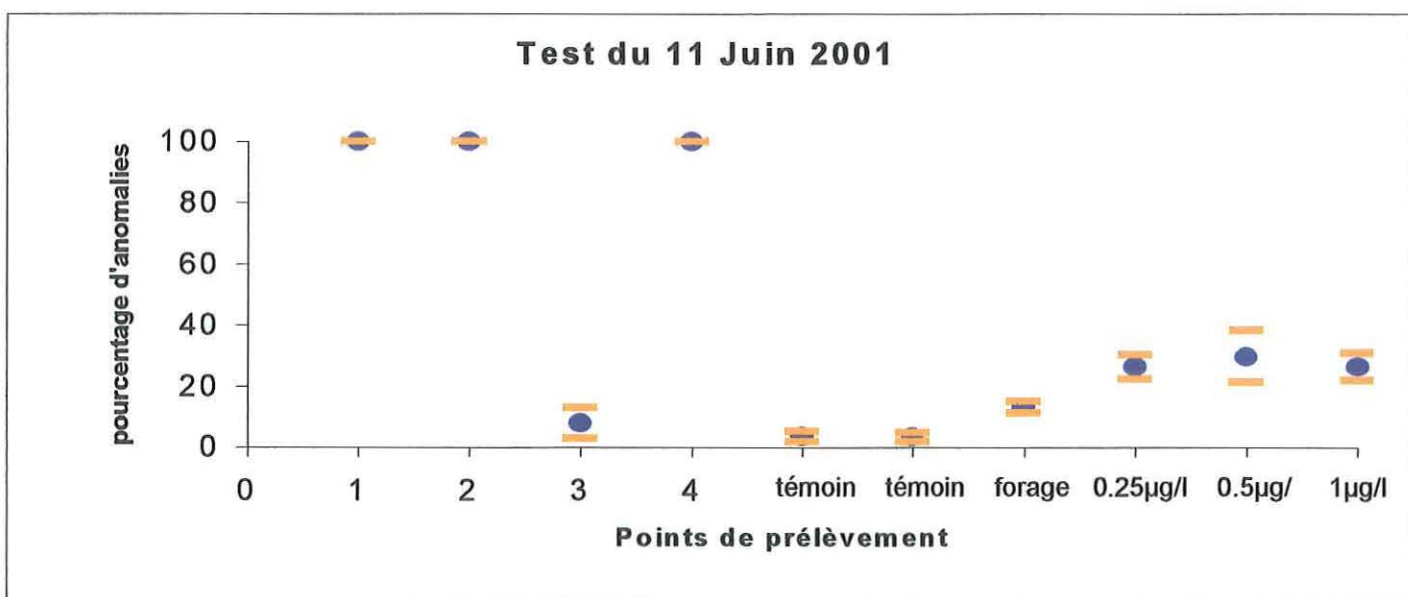
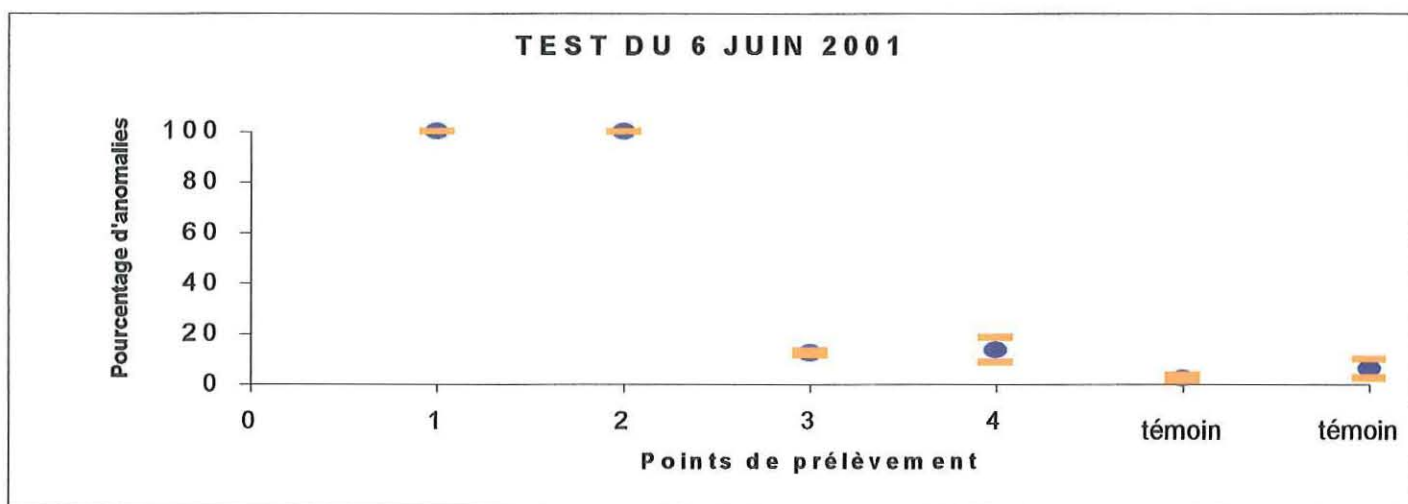
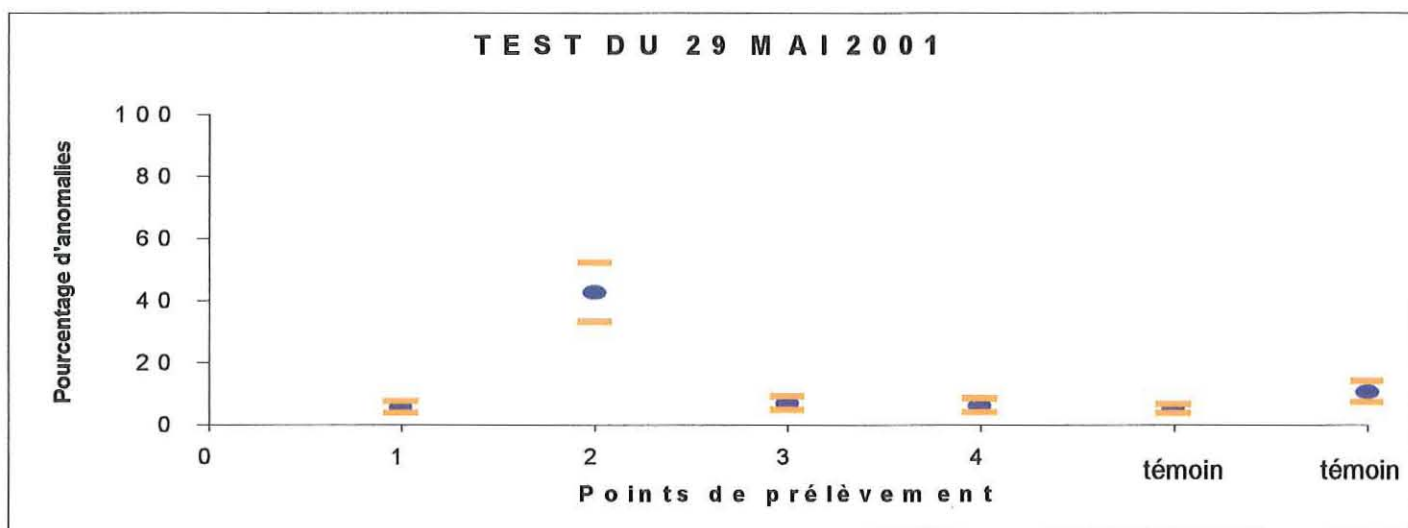
Pour trois points 1, 2 et 4, il y a 100% d'anomalies, ces eaux présentent donc une forte toxicité pour la vie marine.

Le point 3 présente un taux de malformation inférieur à 20 %, donc à cet endroit, l'eau n'entrave pas le bon développement des huîtres.

Les concentrations en atrazine testées sont semblables à celles mesurées dans le milieu naturel. Les taux d'anomalies sont du même ordre (26.4, 29.8 et 26.4 %), on ne note donc pas une corrélation entre concentration et pourcentage d'anomalies.

D'autre part, l'analyse du témoin montre que l'eau de forage semble moins adaptée que l'eau de mer filtrée pour ce type de test (3.6 et 3.4 % d'anomalies contre 13.2 %).

1.4. Graphiques des tests du 29/05/01, 06/06/01, 11/06/01



Légende :

- intervalle de confiance à 95 %
- moyenne

2 . Comparaison des résultats du 29 mai au 11 juin

Ce tableau récapitulatif permet d'observer l'évolution des eaux des marais du 29 mai au 11 juin 2001, au niveau écotoxicologique.

N° Prélèvement	Test du 29/05/01	Test du 06/ 06/01	Test du 11/06/01
1	5.6 ± 1.8	100 ± 0	100 ± 0
2	42.6 ± 9.5	100 ± 0	100 ± 0
3	7 ± 2.2	12.4 ± 0.8	8 ± 5
4	6.2 ± 2.2	13.6 ± 4.9	100 ± 0
Témoin	5.2 ± 1.4	2.4 ± 1	3,6 ± 1.7
Témoin	10.6 ± 3.4	6.2 ± 3.8	3,4 ± 1.5

Les points 1, 2 et 4 ont une évolution croissante du nombre d'anomalies, ces points atteignent jusqu'à 100% au 11 juin. Pourtant la météorologie des jours précédents les tests indiquent une pluviosité nulle. Le lessivage des terres dans les jours précédents le test, ne peut être responsable de cette qualité des eaux. Les analyses en cours au CEMAGREF sur les échantillons d'eau devraient permettre d'avoir une idée de leur degré de pollution par les produits phytosanitaires.

Le point 3, lors des trois tests, n' a montré qu'un faible taux d'anomalies. On peut conclure à cette à cette période que l'eau n'était que peu ou pas polluée pour ce point.

Les témoins présentent des taux d'anomalies très satisfaisants (de 2.4 à 10.6 %), et la constance de ces faibles taux indique que l'eau de mer filtrée est un milieu favorable au bon développement de la larve d'huître.

CONCLUSION

Les résultats obtenus ont montré qu'il existait des périodes de pollution dans le marais de Moeze-Brouage, c'est à dire que l'on observe des taux de malformations larvaires assez élevés. Les principales substances suspectées sont les produits phytosanitaires présents dans les eaux de rejets agricoles.

Les analyses du CEMAGREF sur les même eaux seront intéressantes à confronter avec les résultats d'écotoxicité, permettant ainsi de savoir si nos soupçons sur la présence et l'effet des produits phytosanitaires sont fondés.

Si ces analyses chimiques sont positives, au vu des résultats, la réglementation en matière d'homologation des produits phytosanitaires gagnera en efficacité par la pratique de tests d'écotoxicité sur la faune marine. De plus, il apparaît de plus en plus nécessaire d'imposer un traitement des rejets agricoles.

Lors de ces tests, nous nous sommes rendu compte combien il était important de s'assurer de la qualité du matériel utilisé (eau distillée, lugol-formol), car les larves sont très sensibles à la moindre pollution, et il importe d'avoir des témoins.

La lecture des anomalies exige, elle aussi, une certaine rigueur. Il peut être parfois difficile de distinguer une incurvation naturelle d'une malformation. De plus en gardant toujours le même lecteur, on risque moins de biaiser les résultats.

Ces problèmes mis à part, ce test présente un grand intérêt pour diverses raisons (résultats rapides, efficacité...), et ont pu permettre de mettre en évidence des problèmes importants de pollution de l'eau.

Sur le plan personnel, ce stage m'a donné l'occasion de travailler, pendant dix semaines, au sein de l'IFREMER. J'ai donc pu participer à des actions menées par ses différents réseaux. D'autre part la station de la Tremblade se trouve dans le bassin de Marennes-Olérons, haut lieu de l'ostréiculture. Et ainsi, j'ai pu découvrir une région bien différente de la région stéphanoise et ses terroirs.

INDEX DES ANNEXES

Annexe 1 : Profil pédologique du sol des marais

Annexe 2 : Les différentes périodes d'utilisation des produits phytosanitaires

Annexe 3 : Certains produits phytosanitaires et leurs caractéristiques

Annexe 4 : Ecotoxicité des produits phytosanitaires.

Annexe 5 : Liste des principaux produits herbicides recensés par l'IFREMER sur l'îlot des Tanne.

Annexe 6 : Liste du matériel

Annexe 7 : Fiches des tests du 29/05/01, 6/06/01, 11/06/01

Annexe 1 : Profil pédologique du sol des marais charentais

	% argile <2 μ	% Limons 2- 50 μ	% Sables >50 μ	% matière organique	C/N
0-10 cm	38.2	23.6	1.1	29.3	12.6
10-40 cm	54.2	37.6	1.4	2.4	8.1
40-80 cm	52.7	41.2	0.6	1.3	8.3
90-100cm	53.3	38.1	0.3	0.9	7.4

Annexe 2 : Les différentes périodes d'utilisation des produits phytosanitaires

Itinéraire technique idéal pour le maïs en marais, si monoculture

J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J
		labour		reprise						semis		
				atrazine				glyphosate		ala-chlore	R*	
										molluscicide		
										insecticide sol		insecticide sésamie
											engrais	

* herbicide spécifique contre les adventices résistantes aux Triazines

traitement si risque

Itinéraire technique idéal pour le tournesol en marais

J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J
				labour								
					reprise					semis		
					anti-graminées						rattra-page	
										molluscicide		
										insecticide sol		insecticide puceron
											engrais	

traitement si risque

Itinéraire technique idéal pour les céréales en marais

J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J
		labour		reprise								
				semis		anti-graminées		anti-graminées anti-dicots				
										insecticide sol		
										insecticide puceron		insecticide puceron
											fongicide	fongicide
										engrais		engrais

traitement si risque

Annexes 3 : Certains produits phytosanitaires et leurs caractéristiques

Mobilité (coefficient d'adsorption, K_{oc} exprimé en cm^3/g)	Persistence (temps de demi-vie dans le sol exprimé en jours)			
	Non persistant <5	Peu persistant 5-21	Modérément persistant 21-60	Très persistant >60
Non mobile >4000		bromoxynil ester	glyphosate sel lambda-cyhalothrine deltaméthrine	diquat
Peu mobile 500-4000	clodinafop-propargyl cloquintocet -mexyl	ioxynil	2,4 MCPA ester époconazole	difénoconazole cyproconazole lindane
Modérément mobile 75-499		métaldéhyde alachlore	carbendazime isoproturon	atrazine, simazine chlortoluron, diuron, linuron métolachlor
Mobile 15-74		2,4 D sel; 2,4 MCPA sel fluroxypyr bentazone	carbofuran mécoprop	
Très mobile <15		dicamba sel metsulfuron méthyle	clopyralid sel	

Annexe 4 : Ecotoxicité des produits phytosanitaires

Toxicité aquatique	Risque pour l'environnement aquatique	Très toxique pour les organismes aquatiques Peut entraîner à long terme des effets néfastes sur l'environnement aquatique	Très toxique pour la faune aquatique	Toxique pour les organismes aquatiques Peut entraîner à long terme des effets néfastes sur l'environnement aquatique	Nocif pour les organismes aquatiques Peut entraîner à long terme des effets néfastes sur l'environnement aquatique
96 h CL50 (poisson) ou 48 h CL50 (daphnie) ou 2 h CL50 (algues)		<p style="text-align: center;">< 1 mg/l < 1 mg/l < 1 mg/l</p> <p style="text-align: center;">et la substance ne se dégrade pas facilement ou le log K_{ow} > 3</p>	<p style="text-align: center;">< 1 mg/l < 1 mg/l < 1 mg/l</p>	<p style="text-align: center;">1 mg/l < CL50 < 10 mg/l 1 mg/l < CL50 < 10 mg/l 1 mg/l < CL50 < 10 mg/l</p> <p style="text-align: center;">et la substance ne se dégrade pas facilement ou le log K_{ow} > 3</p>	<p style="text-align: center;">10 mg/l < CL50 < 100 mg/l 10 mg/l < CL50 < 100 mg/l 10 mg/l < CL50 < 100 mg/l</p> <p style="text-align: center;">et la substance ne se dégrade pas facilement ou le log K_{ow} > 3</p>

(DABENE, MARIE, 1993)

Annexe 5 : Liste des principaux produits herbicides recensés par l'IFREMER sur l'îlot des Tannes entre 1984 et 1988

MATIERES ACTIVES	Tot. 84/88 (kg)	Toxicité sur rat (mg/kg)	Solubilité (mg/l)	Observations
HERBICIDES				
Isoproturon	300,5	1 800	70	
Chlortoluron	113	10 000	70	
Metoxuron	29	2 020	678	
Neburon	67	11 000	5	
Bromoxynil	46	260	130	p
Loxynil	58,9	110	50	p
2-4 D	30	375	600	p (si esters)
2-4 MCPA	72	700	825	p (si esters)
MCPP	161,2	930	620	
Clopyralid	2,5	5 000	1 000	
Carbetamide	105	11 000	3 500	
Flurochloridone	71,8	4 000	28	
Fluroxypyr	7,5	5 000	91	
Glyphosate	18	4 900	10 000	
L-flampropisopropyl	15	4 000	18	
FONGICIDES				
Carbendazime	84,1	15 000	5,8	
Propiconazole	26,4	1 500	110	
Fenpropimorphe	111,7	3 650	6,8	
Flutriafol	15,6	1 140	104	
Captafol	37,5	5 000	1,4	p
Mancozebe	59,4	8 000	Ins.	p
Chlorothalonil	120,6	10 000	0,6	p
INSECTICIDES				
Benfuracarbe	20	138	5	
Carbofuran	12,5	8	750	p
Pyrimicarbe	6,6	147	2,7	np
Fenvalerate	0,2	450	< 1	p
Endosulfan	12	50	Ins.	pp
Thiomethon	4	120	200	
Parathion-methyl	8	14	60	
Terbuphos	6,4	4	15	p
MOLLUSCICIDES				
Mercaptodimethur	13,4	100	Ins.	p
SUBSTANCES DE CROISSANCE				
Chlorure de chlormequat	23,7	670	740	
Chlorure de mepiquat	31,4	1 000	1 420	
Ethephon	22,2	4 229	?	
Chlorure de choline	0,7	?	?	
Imazaquin	0,2	?	?	

D'après Chevallier et Masson 1998

Annexe 6 : Liste du Matériel

Verrerie :

- Bouteilles en verre brun stériles
- Bocaux
- Lames creuses
- Eprovettes 250 ml, 500 ml, 1 litre
- Pipette 10 ml, 100 μ l

Instruments :

- Salinomètre
- Acuvettes
- Cuvettes en plastiques
- Microscope
- Agitateur
- Incubateur à 24° C

Produits :

- Eau de mer filtrée à 32 μ m
- Sel de mer
- Formol à 4 %

Annexe 7 : Fiches des tests

Test N° 1

Caractéristiques des échantillons

N° prélèvement	Date	heure	salinité
1	28/05/01	18h15	3,9
2	28/05/01	17H55	2,8
3	28/05/01	17H35	12,4
4	28/05/01	17H20	0,3

Chocs thermiques

Date : 29/05/01

Température	heure
28 °C	10H43
9,8 °C	11H20
28 °C	12H00

Comptage des lames creuses

N° lame	Nombre œufs
1	151
2	138
3	170
4	135
moyenne	148

Soit N' = 148*250 = 37 000

Donc X = 600/37 000 = 0.016 ml = 16 µl

Heure d'incubation : 12H45

TEST N° 2

Caractéristiques des échantillons

N° prélèvement	Date	heure	salinité
1	05/06/01	17H30	2.3
2	05/06/01	17H10	3.6
3	05/06/01	16H35	31.1
4	05/06/01	16H45	1.5

Chocs thermiques

Date : 06/06/01

Température	heure
28°C	11H00
9°C	11H40

Comptage des lames creuses

N° lame	Nombre œufs
1	20
2	15
3	9
4	12
moyenne	14

Soit $N' = 14 * 250 = 3\,500$

Donc $X = 600 / 3\,500 = 0.171 \text{ ml} = 171 \mu\text{l}$

Heure d'incubation : 12H43

TEST N° 3

Caractéristiques des échantillons

N° prélèvement	Date	heure	salinité
1	11/06/01	8H50	2.0
2	11/06/01	9H05	3.6
3	11/06/01	9H25	29.7
4	11/06/01	9H35	0.5

Chocs thermiques

Date : 11/06/01

Température	heure
28°C	11H00
20°C	11H35

Comptage des lames creuses

N° lame	Nombre œufs
1	65
2	86
3	70
4	73
moyenne	73.5

Soit $N' = 73.5 * 250 = 18\ 375$

Donc $X = 600 / 18\ 375 = 0.033 \text{ml} = 33 \mu\text{l}$

Heure d'incubation : 12H35

INDEX DES FIGURES

Figure 1 : Plan des points de prélèvement des réseaux Rephy, Remi, RNO

Figure 2 : Plan de situation

Figure 3 : Schéma des marais en Charente maritime

Figure 4: Photo de claires à proximité d'un champ de colza

Figure 5 : Plan des points de prélèvements

Figure 6 : Photo de l'huître *Crassostrea gigas*

Figure 7 : Schéma des différents stades de développement de l'huître

Figure 8 : Les acuvettes

Figure 9 : Schéma du Test larve d'huître

Figure 10 : Photo d'une observation d'acuvette au microscope

Figure 11 : Une larve D normale et les différentes anomalies observables

LEXIQUE

Affinage des huîtres : Amélioration de la qualité des huîtres en claire

Blastomère : Nom des cellules provenant des premières divisions de l'œuf fécondé.

Blastopore : Orifice de l'intestin embryonnaire primitif.

Blastula : Stade du développement où l'embryon est sous la forme d'une sphère à paroi épithéliale.

Conchyliculture : Elevage de coquillages.

Gastrula : Stade du développement embryonnaire suivant le stade blastula et qui correspond à l'invagination d'un des deux pôles de la Blastula.

Gonades : Ce sont les organes qui permettent la production de gamètes.

Hermaphrodite : Un être vivant qui a les organes reproducteurs de deux sexes.

Morula : C'est le premier stade du développement embryonnaire. L'embryon est sous la forme d'une sphère ayant l'aspect d'une mûre. Dans l'ordre de développement des de l'embryon, il y a, le stade morula, puis blastula et ensuite gastrula.

Produits phytosanitaires : Ce sont tous les produits qui permettent la protection des plantes cultivées.

SIGLES

CEMAGREF : Centre National du Machinisme Agricole, du Génie Rural, des Eaux et des Forêts.

CNEXO : Centre National pour l'Exploitation des Océans.

DEL : Direction Environnement Littoral.

IFREMER : Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer.

ISTPM : Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes.

REMI : Réseau de suivi Microbiologique.

REPHY : Réseau de suivi des phytoplanctons.

RNO : Réseau National d'Observation de la qualité de l'eau.

UNIMA : Union des Marais de la Charente Maritime.

BIBLIOGRAPHIE

C.Chevallier et D. Masson, 1988 Agriculture, conchyliculture et circulation des eaux de surface en Charente Maritime, état actuel des recherches, Aqua revue N°21

D.Masson, 1994 Gestion de l'eau douce et conchyliculture en Charente Maritime, Equinoxe N°51

E.His et C.Cantin, 1995 Biologie et physiologie des coquillages
R.INT.DEL/95.06/Arcachon, IFREMER.

E.His et R Robert, 1986 Utilisation des élevages larvaires de Crassostrea gigas en écotoxicologie marine, Haliotis.

P.Cadiou, 1994. « Pratiques agricoles sur les marais littoraux. Evaluation de la pollution par les pesticides des eaux issues de leur mise en culture et de l'impact sur la conchyliculture », Mémoire

D.Masson et E.His, Contribution à l'étude de la qualité des eaux de rejets agricoles dans les marais charentais, Rapport interne IFREMER, Septembre 1997

S.Giraud, L'eau douce en marais maritime : Le cas de la seudre, 1997 1998, mémoire de maîtrise, université de Poitiers.

Martinez Stéphanie, 1998 « Le réseau national d'Observation de la qualité du milieu marin sur le littoral charentais. Apports chimiques dans un milieu complexe et fragile », Mémoire, université de Lille.

Activité thématique, Gestion de l'eau dans le bassin de Marennes -Oléron, avril 1997, Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Rennes, 2^{ème} année.