

Direction de l' Environnement littoral
Station de La Tremblade
17 390 La Tremblade

Cyrielle MONTAUBIN

CONTRIBUTION à L'ETUDE ECOTOXICOLOGIQUE DES EAUX DE REJETS AGRICOLES EN MILIEU MARIN



Stage réalisé du 14 Avril au 21 Juin 2003

IUT La Rochelle
Département Génie Biologique
Analyses Biologiques et Biochimiques
15 rue François de Vaux de Foletier
17 026 La Rochelle Cedex 1

Ifremer

Année 2002-2003

Stage en vue de l'obtention
du DUT biologie



Maître de stage :

Mr. Masson D.

Tel : 05 46 36 76 07

Tuteur pédagogique :

Mr Ridoux V.

Ifremer

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier, tout particulièrement, mon maître de stage Monsieur Masson, de m'avoir enseigné son savoir faire en matière de test écotoxicologique et d'avoir été si disponible malgré son emploi du temps.

Je remercie aussi toute l'équipe de l'écloserie de m'avoir accueilli au début de mon stage.

Ainsi que Pascale pour ses bons conseils !

Enfin, le bon déroulement de ce stage s'est fait grâce à la patience et à la gentillesse de toute l'équipe de la station d'IFREMER La Tremblade

Je vous en remercie tous.

SOMMAIRE

PRESENTATION DE L'IFREMER.....	2
1) Sur le plan national.....	2
2) Station de La Tremblade.....	3
3) Le laboratoire côtier DEL.....	4
INTRODUCTION.....	5
LE PROBLEME AGRO-CONCHYLICOLE.....	7
1) Mise en culture intensive des marais côtiers.....	7
2) Vulnérabilité des cultures marines.....	7
* Les engrais et les effluents d'élevage.....	8
* Les produits phytosanitaires.....	8
3) Influence de l'apport d'eau douce sur le bassin ostréicole.....	9
RAPPELS SUR LES HUÎTRES.....	10
1) Anatomie de l'huître.....	10
2) La reproduction.....	11
* Généralités.....	11
* Emission des gamètes.....	12
* La fécondation.....	12
3) Cycle de reproduction des huîtres <i>Crassostrea gigas</i>	13
PRINCIPE DES TESTS LARVAIRES.....	17
MATERIEL ET METHODES DE L'ETUDE.....	18
1) Prélèvement des échantillons d'eau à analyser.....	18
2) Préparation des échantillons.....	18
3) Préparation du matériel biologique.....	19
4) Lecture des acuvettes.....	20
RESULTATS.....	23
1) tests du 5/05/03.....	23
2) tests du 14/05/03.....	24
3) tests du 19/05/03.....	25
4) tests du 28/05/03.....	26
5) tests du 04/06/03.....	27
DISCUSSION.....	28
1) Comparaison des différents tests.....	28
2) Comparaison des résultats avec la pluviométrie.....	29
CONCLUSION.....	31
ANNEXES.....	32
BIBLIOGRAPHIE.....	38
RESUME.....	39

PRESENTATION DE L'IFREMER

1) Sur le plan national

L'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la MER (IFREMER) est un Etablissement Public à Caractère Industriel et Commercial (EPIC), créé par le décret du 5 juin 1984. Il résulte de la fusion du Centre National d'Exploitation des Océans (CNEXO) et de l'Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes (ISTPM).

Ses effectifs sont de 1 700 cadres, chercheurs, ingénieurs, marins, techniciens et administratifs. Cet Institut est présent dans 78 laboratoires ou services de recherche, répartis dans 24 stations ou centres (Boulogne, Nantes, Brest, Toulon, Tahiti) sur le littoral métropolitain et dans les DOM-TOM.

Il dispose d'un budget annuel d'environ 152 millions d'euro, venant de subventions versées par l'Etat auxquelles s'ajoutent des ressources propres que son statut d'EPIC lui permet de développer (15%). Ses missions sont les suivantes :

- ☛ Il mène des recherches à caractère fondamental, souvent en collaboration avec les universitaires et les chercheurs des organismes publics dans les domaines suivants : géosciences, microbiologie, halieutique, chimie, toxicologie océanographie physique, biologie des organismes marins, etc.
- ☛ Il effectue des développements technologiques pour ses besoins propres ou pour le compte de la communauté scientifique et industrielle dans le but de promouvoir des techniques nouvelles dans les industries de la mer : robots, chaluts, engins sous-marins, etc.
- ☛ Il assure le suivi des ressources halieutiques (de pêches) et aquacoles. Il contrôle la qualité du milieu et des cheptels pour l'activité aquacole, il contribue à la protection de l'environnement littoral, notamment par le biais de réseaux de surveillance des polluants et des phytoplanctons toxiques. Et enfin, il met au point des techniques d'élevage et de culture d'animaux et de végétaux marins.
- ☛ Il a la charge de la construction, de la programmation et de la mise en œuvre de la flotte océanographique nationale : 8 navires de recherche hauturiers et côtiers, 2 submersibles et de nombreux équipements pour l'intervention par grands fonds ou sur le plateau continental.

2) Station de La Tremblade



La station IFREMER de La Tremblade travaille essentiellement pour améliorer les conditions d'élevage des coquillages dans le bassin de Marenne-Oléron et surveiller la qualité de l'environnement marin côtier.

Elle se compose de trois laboratoires :

☆ Le laboratoire côtier DEL (Direction de l'Environnement et de l'Aménagement du Littoral) : laboratoire dans lequel j'effectue mon stage. Il a pour mission de mettre en œuvre des réseaux de surveillance assurant aux conchyliculteurs que la qualité des eaux et des coquillages, permet ou non la consommation des coquillages cultivés. Il a aussi pour mission d'assister l'Administration et les collectivités dans son domaine de compétence.

☆ Le laboratoire côtier LCPC (Laboratoire Conchylicole de Poitou-Charentes) : étudie entre autre la croissance des coquillages, afin d'améliorer les productions du bassin.

☆ Le laboratoire GAP (Génétique, Aquaculture et pathologie), travaille sur les caractères génétiques, dans le but d'améliorer les populations de mollusques présents dans les bassins français et, contrôle aussi l'éventuelle présence d'agents pathogènes de ces mollusques.

3) Le laboratoire côtier DEL

La Direction de l'Environnement et de l'aménagement Littoral (DEL) contribue à la connaissance des écosystèmes côtiers, au développement d'outils, de méthodes et de concepts utilisables par les acteurs de l'environnement. Elle opère des réseaux d'observation et de surveillance du littoral. Elle conduit des recherches sur le devenir des masses d'eau et sur différents processus biologiques et chimiques.

La surveillance de la qualité du milieu marin s'appuie essentiellement sur trois composantes :

☆ Le Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin (RNO créée en 1974) a pour mission d'évaluer la teneur en micropolluants des huîtres et des moules.

☆ Le REseau de contrôle MIcrobiologique (REMI 1988) surveille de la qualité microbiologique des zones de production des coquillages (dénombrement des germes d'origine fécale).

☆ Le REseau de suivi du PHYtoplancton (REPHY), créé en 1984, mesure la qualité et la nature des espèces phytoplanctoniques dans le bassin de Marennes-Oléron.

Le laboratoire conduit aussi à de plus divers programmes :

- Points noirs de pollution microbiologique locale
- Ecotoxicité des eaux de rejets agricoles
- Eaux de ballast de navires vecteurs d'espèces marines nuisibles.

INTRODUCTION

La qualité des eaux de surface constitue périodiquement un sujet de controverse et de polémique entre professionnels agricoles et conchylicoles charentais.

La création croissante d'îlots de culture drainés dans les marais littoraux souvent à proximité immédiate des zones conchylicoles, suscite l'inquiétude quant à la qualité des eaux d'aval.

Aujourd'hui les marais de Charente-Maritime représentent 100 000 hectares répartis en marais mouillé (inondé lors de crues) et marais desséché. Ce dernier, protégé des submersions par des digues, est drainé par un système de canaux parfois très dense et s'écoule vers la mer par le biais d'une série d'ouvrages divers (écluses, vannes, ...).

La cohabitation : ostréiculture/agriculture, ne posait guère de problèmes jusqu'aux années 1960, puisque jusqu'alors l'agriculture en marais se composait essentiellement d'élevages extensifs sur prairie naturelle.

Depuis, les cultures intensives sur sol drainé, de céréales notamment, se sont développées.

En effet, ce type d'activité agricole, consomme de grandes quantités d'herbicides, de fongicides, d'insecticides, voire même des molluscicides, dont une partie se retrouve en milieu marin (ruissellement). De plus, les bassins versants eux aussi cultivés, participent à cette pollution en déversant leurs pesticides lors des temps de pluie et les eaux de ruissellement (et de lessivage des cultures) ramènent sur le marais une partie des produits épandus sur ces cultures.

En 1988, une concertation entre les professions agricoles et conchylicoles a abouti à l'établissement d'un protocole de gestion concertée des marais, demandant à l'INRA et IFREMER de mettre en place des programmes de recherche pour répondre à la question suivante : « Les eaux de rejets agricoles ont-elles ou non une action néfaste sur la vie marine ? »

Il n'est pas possible d'étudier ce phénomène partout à la fois : l'INRA et l'IFREMER ont alors retenu le marais de Moeze-Brouage pour l'étudier. Ce site, sur lequel cohabitent la prairie naturelle, des cultures intensives drainées, puis en aval une zone conchylicole comprenant plusieurs hectares de claires, se trouve entre Rochefort et Marennes.

Pour étudier ce phénomène, une méthode simplifiée d'Ecotoxicologie a été appliquée. Ce test est basé sur le pourcentage d'anomalies larvaires observé sur des larves d'huîtres *Crassostrea gigas* qui se sont développées au contact de l'échantillon d'eau à étudier. En effet, ces mollusques filtreurs sont susceptibles de présenter des anomalies de développement larvaires lorsqu'ils sont en présence de polluants.

Dans un premier temps, nous présenterons l'étude en étudiant la problématique agro-conchylicole, l'objectif et le principe du test.

Nous ferons ensuite un rappel sur les huîtres creuses et leur reproduction.

Puis dans une troisième partie, nous présenterons le test écotoxicologique : avec la description des tests « larves d'huîtres », ainsi que le matériel et les méthodes de l'étude.

Finalement, nous étudierons les résultats des différents tests et nous les commenterons.

LE PROBLEME AGRO-CONCHYLICOLE

1) Mise en culture intensive des marais côtiers

Le bassin versant de la Charente compte 10 000 km² (1 million d'ha dont 75% de terres agricoles) qui, d'après les données du RGA (Recensement Général de l'Agriculture) de 1980, se répartissent ainsi : céréales 40%, vignes 10%, culture fourragères 40% ; autres 10%.

2) Vulnérabilité des cultures marines

• Aux épizooties

Parmi les parasites dont la présence dans le corps de l'huître modifie l'état de santé d'une population, les uns ont une action maligne parfois réduite qui n'affecte que la condition ou la croissance du mollusque ; c'est le cas de certaines grégarines, de quelques trématodes, cestodes ou copépodes. D'autres, en revanche, sont fréquemment responsables de maladies graves, à caractère endémique ou épidémique, entraînant ici ou là, chez telle ou telle espèce, à une période donnée, des mortalités massives :

Les viroses : C'est au mois d'août 1970 que se déclara dans le bassin de Marennes-Oléron l'épizootie qui devait rapidement décimer les élevages d'huîtres portugaises sur toute la côte atlantique française. Cette situation persista jusqu'en 1973. En raison de sa résistance à la maladie : l'espèce *Crassostrea gigas*, allait rapidement remplacer l'huître portugaise.

Les champignons : Plusieurs champignons marins parasitent les huîtres, deux d'entre eux causent avec certitude des dommages importants dans les populations de ces mollusques, soit qu'ils en altèrent gravement la qualité, soit qu'ils en provoquent la mort. Ce sont, *Labyrinthomyxa marina* et *Ostracoblabe implexa* ou « maladie de la coquille ».

Les flagellés : Sous le nom d'hexamitiase, on désigne une affection provoquée par un zooflagellé du genre *Hexamita*.

Les haplosporidies : Appartenant au sous-embranchement des sporozoaires, deux haplosporidies, *Minchinia nelsoni* et *M. costalis* ont été jugées responsables de mortalités importantes chez l'huître américaine, *Crassostrea virginica*.

• A la pollution

• Les engrais et les effluents d'élevage

Il y a peu d'élevage hors sol sur le bassin versant, ce qui limite les fortes concentrations locales en azote en particulier, contrairement à la région de Bretagne par exemple.

Du fait du ruissellement et du drainage, une partie des engrais apportés sur les surfaces mises en culture est entraînée vers les cours d'eau, puis vers le bassin sous l'effet des précipitations hivernales et printanières.

En ce qui concerne l'**azote** : ce sont en premier lieu les reliquats nitriques présents dans le sol en début d'hiver qui sont en partie entraînés en Janvier-Février, notamment s'il y a drainage. Par la suite, une part des fertilisations de l'année peut être lessivée lors des épisodes pluvieux de Mars-Avril, mais en quantités moindres.

Les **nitrites** constituent l'apport minéral le plus important puisqu'on peut atteindre 200 $\mu\text{moles/L}$ dans l'estuaire de la Charente. Mais pendant les périodes d'étiages elles chutent à 3 $\mu\text{moles/L}$.

Comme on sait que les nitrates sont le principal facteur limitant le développement du phytoplancton, on peut craindre davantage une dilution en été, qu'une très forte augmentation en hiver, au moment où la faible température de l'eau ne permet pas d'en profiter.

Les **phosphates** peuvent atteindre exceptionnellement 2 $\mu\text{moles/L}$ en hiver dans le bassin et chutent au minimum en Mars-Avril avec 0,1 $\mu\text{mole/L}$. Une absorption sur les particules de vase permet la régulation de ce facteur. En revanche au sortir des parcelles agricoles on peut atteindre des concentrations de 5 mg/L.

D'autre part, sur d'autres parties du littoral, ces polluants peuvent entraîner une prolifération des micro-algues.

En revanche l'avantage dans le bassin de Marennes-Oléron, est la prolifération de phytoplancton.

• Les produits phytosanitaires

L'activité agricole consomme beaucoup de produits phytosanitaires en culture intensive. Un grand nombre de matières actives, en association ou non, sous forme de microgranulés, de bouillie ou de solution sont épandues, parfois même par voie aérienne.

Trois grandes familles sont utilisées de façon importante :

- ☆ Les herbicides
- ☆ Les fongicides
- ☆ Les insecticides

Il s'agit d'évaluer d'une part les effets directs immédiats (toxicité aiguë) ou à long terme (toxicité chronique), et d'autre part d'apprécier les effets indirects (éco-toxicologie), qui jouent sur la chaîne alimentaire (phytoplancton). Il est possible de savoir ce qui est utilisé par l'agriculture quand on connaît le type de cultures pratiquées.

A titre d'exemple, la liste et la quantité de matières actives utilisées en quatre ans sur un îlot de drainage (îlot de Tannes) s'établissaient comme suit : 15 herbicides, 7 fongicides, 8 insecticides, 1 molluscicide : soit environ 1 tonne de produit épanché en quatre ans.

Cf. annexe N° 1 page 33 : Pesticides et culture en marais

La toxicité des produits est globalement faible pour les fongicides, faible à moyenne pour les herbicides, forte à très forte pour les insecticides ; plus les agriculteurs s'engagent dans la voie de l'intensification, plus l'utilisation des fongicides et des insecticides s'accroît, donc plus les risques toxicologiques sont élevés. D'autre part, la compétence technique des agriculteurs s'améliore et la phytopharmacie est plus ciblée et les produits moins rémanents, ce qui tempère un peu le danger potentiel.

3) Influence de l'apport d'eau douce sur le bassin ostréicole.

La Charente dilue les eaux océaniques à teneur élevée en sel (supérieure à 35%) qui restent localisées au nord du Pertuis d'Antioche, même en étiage d'été.

Le mélange des eaux océaniques et continentales permet la production de phytoplanctons par la conjonction de sels nutritifs (eau douce) et d'algues (eau de mer). Toutefois, ce phénomène ne pourrait se maintenir en l'absence d'un débit suffisant de la Charente. La reproduction des huîtres et le développement larvaire sont sous la dépendance du couple température/salinité avec, semble-t-il une plus grande importance de la température. On peut donc dire que l'eau douce en elle-même, n'a pas directement d'incidence défavorable puisque la dessalure des eaux se produit en hiver et au printemps lorsque la température des eaux est faible. Mais l'apport d'eau douce joue d'une autre façon en transportant entre autres substances, les nutriments nécessaires au développement du phytoplancton, qui ne sont présents qu'en faible quantité dans les eaux océaniques et hélas en transportant aussi les polluants.

RAPPELS SUR LES HUÎTRES

1) Anatomie de l'huître

• Sa coquille

Elle est dure et irrégulière, se compose de deux parties.

L'une, plus creuse, appelée valve inférieure, contient le corps de l'animal.

L'autre, plus plate, appelée valve supérieure fait office de couvercle.

Les deux valves sont fermées par un muscle adducteur et par un ligament ou charnière, qui permet à la valve supérieure de se soulever.

Les dimensions des coquilles varient avec les espèces et leur habitat. La coloration externe des valves varie aussi selon le substrat ou l'environnement. La pigmentation peut être homogène ou présenter des rayures ou des arborisations en forme de flamules violettes ou brunes.

Cette coquille est constituée, de l'extérieur vers l'intérieur, de trois couches superposées :

☆ Le périostracum : il disparaît rapidement, usé, chez les huîtres adultes.

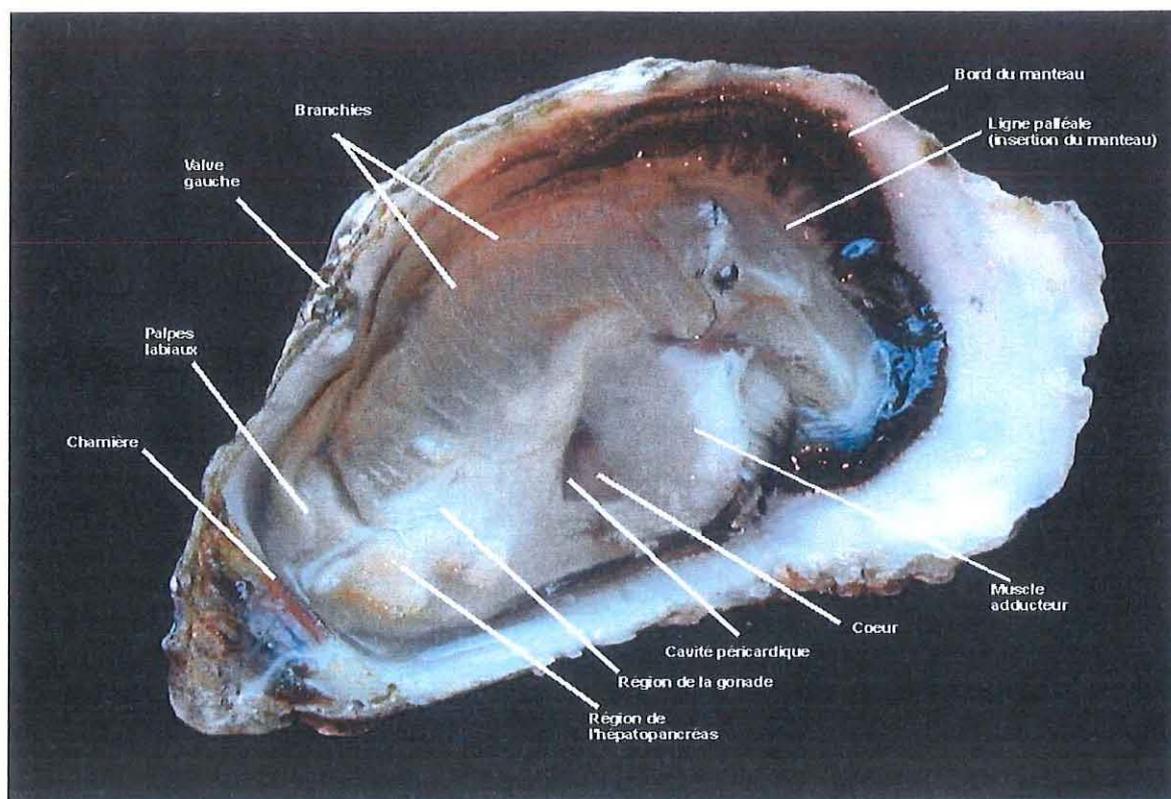
☆ La couche prismatique faite de prismes constitués de cristaux de calcite enrobés dans une matrice de conchyoline ; elle est toujours présente sur la valve plate sous forme d'écailles imbriquées.

☆ La couche lamelleuse subnacrée : c'est la partie la plus importante. Elle est formée de feuillets de lamelles de calcite entre de minces membranes de conchyoline.

•Le corps de l'huître

Il est enveloppé d'un tissu conjonctif, lui-même recouvert d'un voile très fin. Les lobes qui composent le manteau sont bordés de bourrelets. Les uns ont une activité sensorielle, les autres abritent les branchies qui, par l'activité de leurs cils, procèdent au pompage et à la filtration de l'eau de mer.

Enfin, l'huître n'a ni cerveau, ni appareil locomoteur.



Document N°1 : Anatomie de l'huître.

2) La reproduction

• Généralités

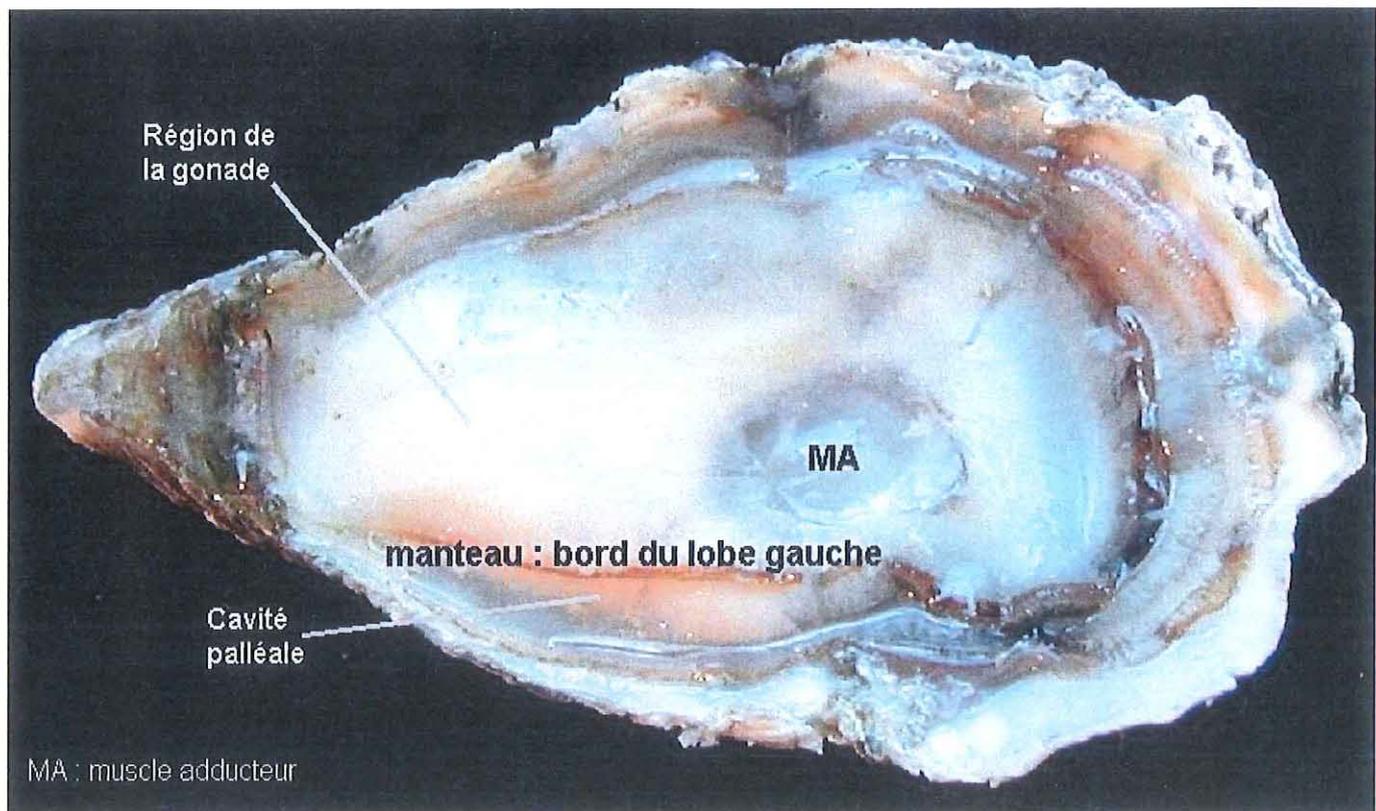
L'huître utilisée pour cette étude appartient au genre *Crassostrea gigas*. Cette espèce, d'origine pacifique (« Japonaise »), a été introduite en Europe à partir de 1970 pour remplacer la « Portugaise », victime d'une grave épizootie. Cette huître, peut changer plusieurs fois de sexe au cours de sa vie, après chaque cycle de reproduction : On parle d'« hermaphrodisme successif ». L'huître a donc comme particularité de contenir dans sa gonade, les gamètes des deux sexes. La reproduction est déclenchée par la température de l'eau et son degré de salinité. Par ailleurs, il existe une certaine protandrie, c'est à dire un fort pourcentage de mâles, atteignant 70% chez les sujets de moins de un an. Au cours de la seconde saison, la proportion entre les deux sexes est équilibrée ; Puis chez les animaux âgés, les femelles sont en plus grand nombre.

Par conséquent, cette notion est importante, car le choix d'individus jeunes, augmente les chances de disposer d'individus des deux sexes pour effectuer les fécondations nécessaires à l'obtention de larves.

• Emission des gamètes

L'huître mâle projette ses spermatozoïdes dans l'eau. Ce qui se caractérise par l'éjection d'un mince filet blanchâtre et dense, prenant la forme d'une fumée de cigarette. Le sperme contient une hormone : la diantline, qui agit sur les individus (des deux sexes), voisins.

Les femelles, à l'état "laiteux" émettent leurs ovules sous forme de petits amas blanchâtres provenant de la partie avant de l'huître. Elles peuvent pondre de 20 000 à 100 000 000 œufs entre juin et août, dans le milieu ambiant.

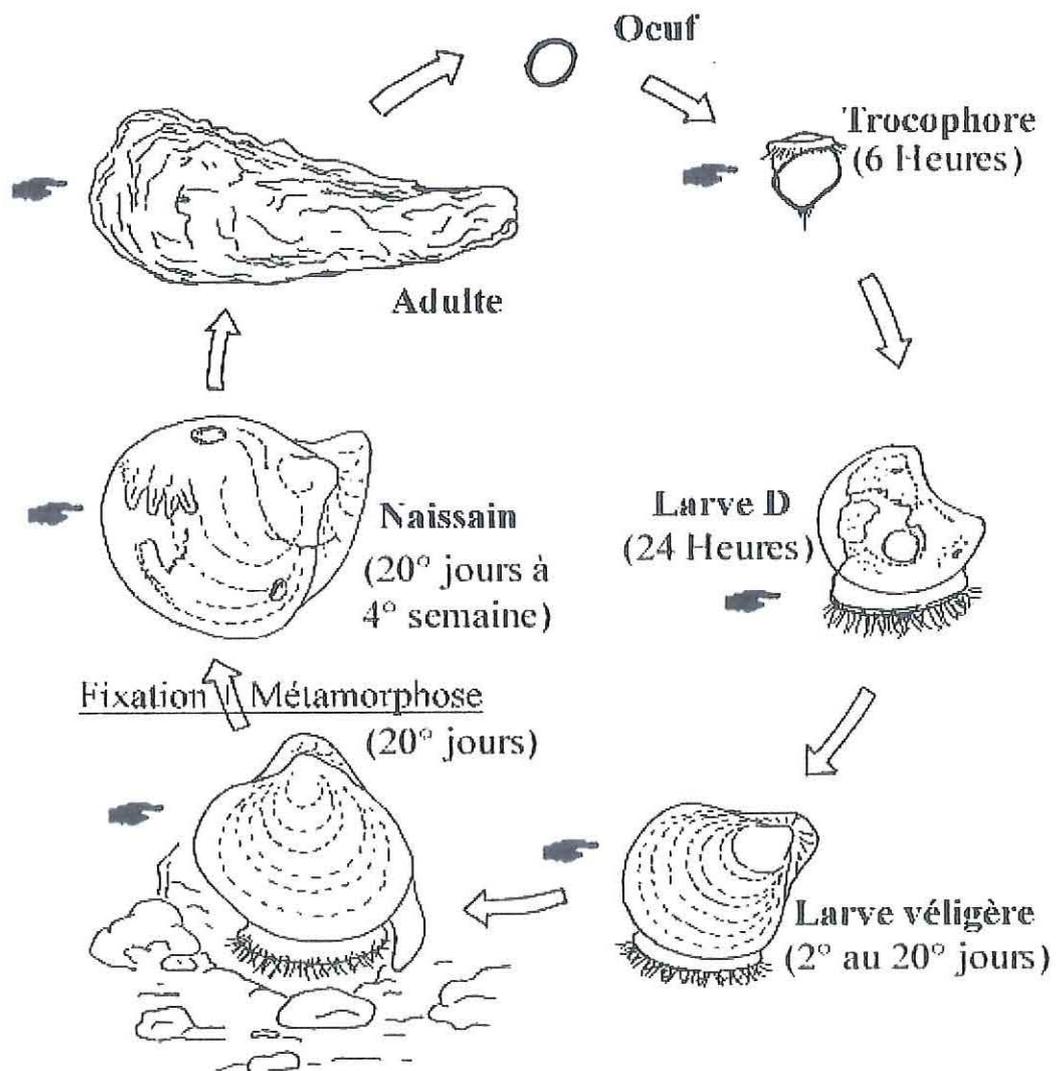


Document N°2 : Une huître en période de reproduction

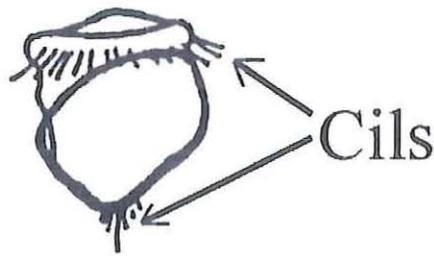
• La fécondation

La rencontre entre les œufs et la semence a lieu dans le milieu marin. L'ensemencement se fait au hasard de la nature et à la grâce des courants. 10% seulement des ovules seront ainsi fécondés et donneront naissance à une huître.

3) Cycle de reproduction des huîtres *Crassostrea gigas*

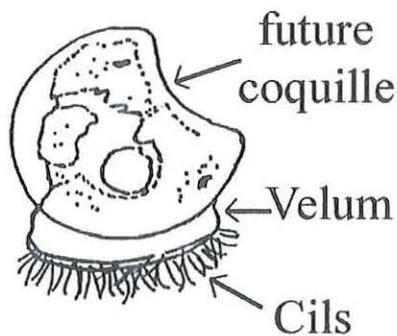


La larve Trochophore



La larve **Trochophore**, est une larve ciliée, qui se déplace en tournoyant sur elle-même. C'est la première larve de l'huître, et elle a une vie pélagique (en pleine eau).

La larve D

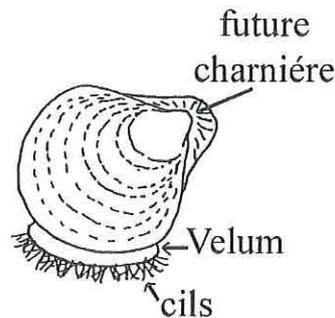


La **larve D** est appelée ainsi car elle a une forme très particulière : elle ressemble à un D.

Ce "D" correspond à la future coquille de l'huître (Ces deux valves), il va servir de guide pour la coquille qui se formera dessus.

Comme nous pouvons le voir, elle possède toujours des cils, mais elle présente aussi une autre différence par rapport à la larve trochophore : en plus de l'apparition de la future coquille, il y a apparition d'un **velum**, qui lui sert à se déplacer, au même titre que les cils. Ce **velum** sera totalement formé chez la larve véligère.

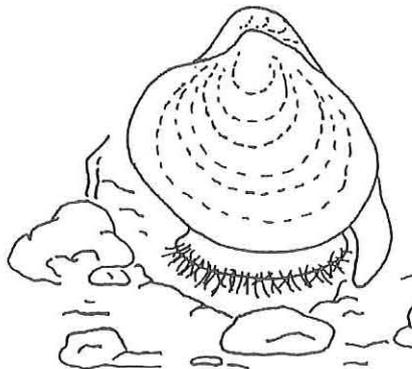
La larve véligère



La **larve véligère** est toujours pélagique, a toujours des cils qui lui permettent de se déplacer, le velum a fini de se former. C'est lui qui donne son nom à la larve.

La coquille définitive commence à se former et on peut voir l'apparition de la charnière, qui permettra à l'adulte d'ouvrir ou fermer ses valves.

La larve pédivéligère



Cette larve est toujours pélagique, et c'est la dernière étape avant la vie benthique (au fond).

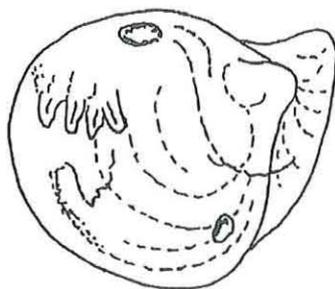
En plus du velum, il y a apparition du pied (d'où le nom **pédivéligère**) et à la taille d'environ 250 μm , on constate l'apparition d'une tache noire sur la coquille. On l'appelle alors la **larve oeuillée**. Cette tache est annonciatrice de la **métamorphose**.



La métamorphose se déroule en deux phases :

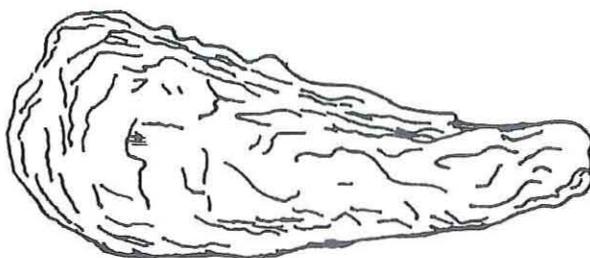
- Une phase où la larve tombe sur le fond pour chercher un support qui lui convient. Si ce site lui convient, on passe à la deuxième phase, sinon elle se remet à nager en pleine eau.
- La deuxième phase consiste en la fixation définitive de la larve sur son support. Support où elle grandira pour devenir naissain, puis l'huître.

Le naissain



Après la métamorphose, la larve devient donc une jeune huître prête à se fixer, appelée **naissain**.

L'adulte



L'huître adulte ne se présente plus ! Il faut actuellement environ trois ans pour obtenir une huître de taille commercialisable dans le bassin de Marennes-Oléron, et si nous laissons faire la nature ou si elle est placée dans une écloserie, le cycle de la reproduction de l'huître peut recommencer. La reproduction naturelle dans le milieu n'est pas maîtrisable et donc contribue à augmenter les stocks. Ceci entraîne alors une surpopulation, une baisse de la croissance et par conséquent une vulnérabilité aux épizooties.

PRINCIPE DES TESTS LARVAIRES

Le test larve d'huître a été mis en place par Monsieur Edouard His à La Station de l'IFREMER d'Arcachon en 1993 à partir des travaux de Woelke (1972) .

Il s'agit de mettre des œufs d'huître fécondés au contact d'une eau à tester. Après 24 h et selon les taux d'anomalies larvaires constatés, on peut juger de l'embryotoxicité de l'eau testée.

Pour ce test, on utilise des larves de *Crassostrea gigas*, l'huître creuse japonaise. La larve d'huître présente l'avantage d'être plus sensible aux agressions des polluants que celles des autres coquillages.

De plus, cette espèce d'huître est présente partout sur le littoral et est la seule à être commercialisée pour la consommation.

MATERIEL ET METHODES DE L'ETUDE

1) Prélèvement des échantillons d'eau à analyser

Les prélèvements s'effectuent en 4 points, sur le marais de Moëze-Brouage en Charente-Maritime.

Cf Carte des prélèvements ci-joint

Cf. annexe N° 2 page 34 : photos des sites de prélèvement

Les sites sont les suivants :

- ☆ Montportail (avant la vanne de sortie à la mer d'un marais cultivé)
- ☆ Ecluse des Tannes, entre le canal du Grand Garçon et le chenal de Brouage.
- ☆ Brouage (sur le même chenal ostréicole, en amont du point précédent) à hauteur des établissements d'expédition de coquillages.
- ☆ Ecluse de Beaugeay (avant la vanne sortie du chenal d'eau douce venant du canal Charente-Seudre, sur le précédent).

Il est très important d'identifier les échantillons qui sont récoltés dans des flacons bruns de 1 L (stérilisés à 130°C dans un four Pasteur).

La température de l'eau ainsi que la salinité sont mesurées sur place.

2) Préparation des échantillons

Cf. annexe N° 3 page 35 : Liste du matériel nécessaire à la réalisation d'un test larve d'huître.

Au contact de cette eau, nous allons faire développer les larves pour le test écotoxicologique.

Chaque échantillon provenant de ces 4 points est dilué (250 mL d'échantillon et 500 mL d'eau de mer filtrée). Puis leur salinité est ajustée à 25, car les eaux prélevées peuvent avoir des salinités insuffisantes pour le développement des larves. Cela recrée les conditions des rejets en milieu marin en même temps.

Enfin, chaque échantillon est disposé dans des séries de 5 acvettes (5 réplicats notés de A à E).

Parallèlement, une série de 5 à 10 témoins (notés de A à J) est réalisée avec de l'eau de mer filtrée.

3) Préparation du matériel biologique

• Préparation des huîtres

Nous devons d'abord sélectionner des huîtres mâles et femelles afin d'obtenir des larves après fécondation.

On prélève pour ceci une douzaine de géniteurs (dont on a déclenché la phase reproductrice en éclosion) de toutes les tailles (afin d'être sûr d'avoir des mâles et des femelles), on les nettoie de toute la vase et épibiontes, puis on les sépare les unes des autres : *c'est le détroquage*. Enfin, on les place au sec, pendant 24 heures la valve creuse vers le bas pour qu'elles ne perdent pas leur eau (par exemple dans un bac en bas du réfrigérateur).

Ainsi, les huîtres seront plus avides d'eau lors de leur immersion pendant le test.

• Déclenchement de l'émission des gamètes

La ponte des gamètes est induite par choc thermique (méthode la plus naturel) : le jour du test, on dispose les huîtres dans un bac plat et on les immerge totalement dans une eau de mer filtrée à (2 μm) à 28°C. Sortant du réfrigérateur, les huîtres subissent un choc thermique important déclenchant en principe la ponte.

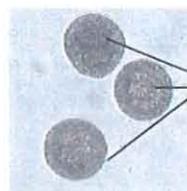
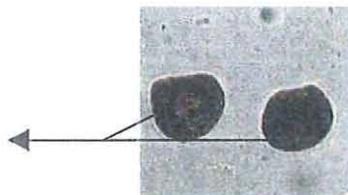
Si au bout de 30 minutes les huîtres n'ont pas pondu, on sacrifie un individu qui ne semble pas très actif et tente une stimulation chimique des autres par un broyat de ses gonades (qui contient de la diantline : phéromone ayant une action positive sur l'émission des gamètes) et on l'injecte à proximité du siphon inhalant des autres huîtres.

Si au bout de 30 minutes aucune réaction n'est visible, on immerge les huîtres à 10°C pendant 30 minutes, puis à 28°C ... et ainsi de suite jusqu'à ce qu'il y ait émission des gamètes.

• Sélection des géniteurs

Dès qu'une huître commence à émettre ses gamètes, on la place dans un bûcher contenant 1 L d'eau de mer filtrée à 2 μm si c'est une femelle, et juste de quoi l'immerger si c'est un mâle. Puis les gamètes sont observés au microscope ; ainsi les meilleurs géniteurs sont sélectionnés (spermatozoïdes les plus actifs, ovules les plus arrondis).

Ovocytes
anormaux :
membranes
déformées



Ovocytes normaux :
Membranes régulières et
centre clair (vésicule)

(Photos : Lionel Degremont)

• Fécondation

Les ovocytes sont alors tamisés à 100 μm afin d'éliminer d'éventuels débris, et remplissent une éprouvette de 1 L.

Les gamètes mâles sont tamisés à 32 μm et 10 mL afin de retirer les éventuels œufs fécondés et sont ajoutés aux ovocytes.

Il est important d'agiter les gamètes pour une meilleure fécondation, pendant 10 minutes, jusqu'à ce qu'il y ait environ 10 spermatozoïdes autour de chaque ovocyte. Sinon, on rajoute 5 ml de la solution mâle.

• Comptage des œufs

Enfin, le contenu de l'éprouvette doit être dilué afin de pouvoir compter le nombre d'œufs. Pour ceci nous introduisons dans une éprouvette d'un litre, 10 mL du contenu de l'éprouvette et 250 mL d'eau de mer filtrée.

Pour le comptage, 0,1 ml de la dilution est déposée sur une lame creuse. En tapotant sur les côtés de la lame les œufs tombent au fond de la lame, et sont par conséquent plus faciles à compter.

Le comptage est réalisé sur 4 essais.

• Détermination du nombre d'œuf dans l'éprouvette de 1l, et détermination du volume à prélever pour avoir 600 œufs par acuvette

Cf. annexe N°4 page 36 : Détail des calculs

4) Lecture des acuvettes

• Fixation des larves

Après 24 heures à 24°C, on fixe les larves avec 10 gouttes de formol dans chaque acuvette.

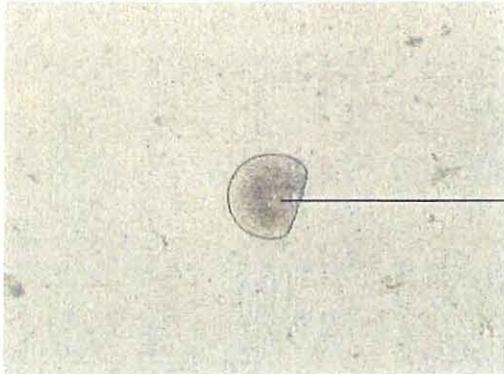
Cette solution de formol tue les larves qui vont alors tomber au fond de l'acuvette présentant ainsi une de leurs deux valves. C'est dans cette position qu'elles présentent à l'état normal, une forme de « D ».

Cette étape étant réalisée, les larves peuvent être conservées pendant longtemps, et par conséquent la lecture peut être reprise pour d'éventuelles vérifications.

• Pourcentage d'anomalie larvaire

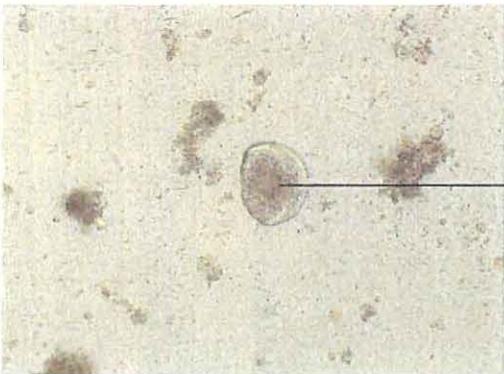
A l'aide d'un microscope inversé, les acuvettes sont observées directement sans avoir besoin de les ouvrir, ce qui est un gain de temps et évite d'endommager les larves en les manipulant.

Puis on dénombre celles présentant une anomalie sur un échantillon de 100 larves. Ce qui donne un pourcentage d'anomalie larvaire.



(Photo : Montaubin C.)

Larve normale :
Couchée elle présente une charnière droite et deux valves régulières de même taille.



(Photo : Montaubin C.)

Larve anormale :
La charnière n'est pas droite, son développement n'est pas terminé

[Cf. annexe N° 5 page 37 : autres photos d'anomalies larvaires.](#)

• Traitement des résultats

Le dénombrement étant fait, on calcule la moyenne des cinq essais pour chacun des échantillons d'eau et des témoins ; puis on mesure l'intervalle de confiance à 95% des résultats et on détermine la moyenne à un seuil de sensibilité de 5%.

Enfin, les résultats sont interprétés à partir de cette moyenne

• Interprétation des résultats

Pour considérer le test comme utilisable, les témoins doivent avoir un pourcentage d'anomalie larvaire inférieur à 20%. Ce seuil correspond au pourcentage normal. Si ce seuil est dépassé, on doit s'interroger sur la viabilité du lot de larves utilisées, et refaire le test.

Enfin, on compare les pourcentages des échantillons d'eau prélevés avec ceux des témoins ; et on se réfère à la classification d'Edouard His pour évaluer le degré de pollution de l'eau.

Classification d'Edouard His :

<u>Différence d'anomalie Larvaire avec le témoin</u>	<u>Non significative au Seuil de 95%</u>	<u>< à 25%</u>	<u>Entre 25 et 50%</u>	<u>Entre 50 et 75%</u>	<u>>à 75%</u>
<u>Milieu aquatique</u>	<u>Non pollué</u>	<u>Peu perturbé</u>	<u>Moyennement pollué</u>	<u>Très pollué</u>	<u>Massivement pollué</u>

RESULTATS

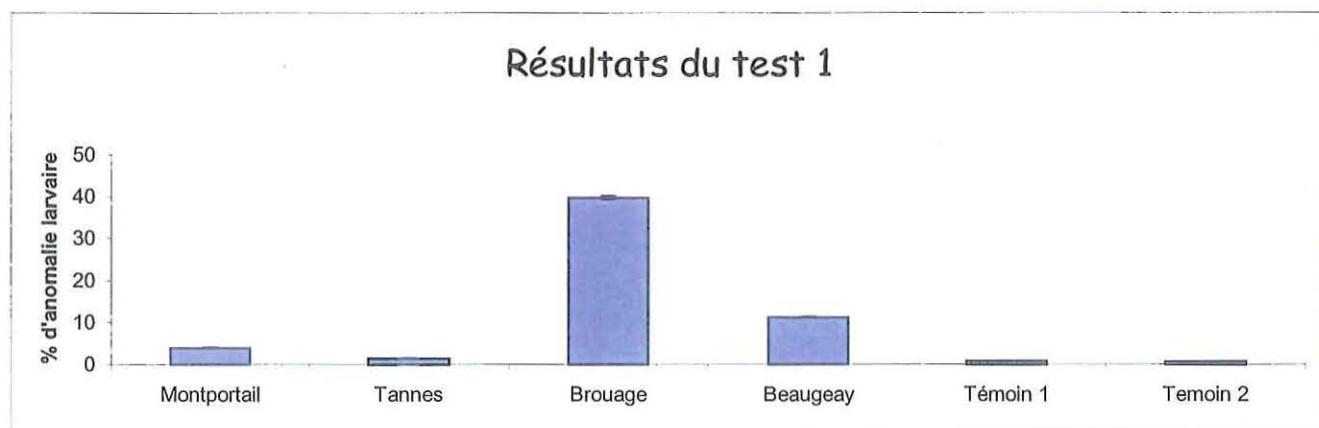
1) tests du 5/05/2003

Echantillon	Salinité (‰)	Température (°C)
1 : Montportail	1,2	16
2 : Tannes	5,5	16,1
3 : Brouage	23,5	15,5
4 : Beaugeay	0,8	16,4

Pourcentage de larves anormales (tableau N°1)

Acuvettes	Pourcentage de larves anormales					moyenne	I.C à 95%	écart type	Moyenne + IC	Moyenne - IC
	A	B	C	D	E					
site 1	4	3	4	4	5	4	0,020	0,707	4,020	3,980
site 2	1	0	1	4	1	1,4	0,043	1,517	1,443	1,358
site 3	31	39	61	38	30	39,8	0,351	12,518	40,151	39,449
site 4	7	14	10	12	13	11,2	0,078	2,775	11,278	11,122
Témoin 1	0	0	0	2	2	0,8	0,031	1,095	0,831	0,769
Témoin 2	1	0	0	1	1	0,6	0,015	0,548	0,615	0,585

Représentation graphique des résultats (graphique N°1)



Commentaires

On note un pourcentage d'anomalie larvaire pour les témoins inférieur à 20% : les résultats peuvent donc être interprétés.

On remarque par ailleurs que l'échantillon prélevé à Brouage présente une différence significative avec les témoins au seuil de 95%, donc d'après la classification d'Edouard His, le milieu aquatique est moyennement pollué (39,8% de larves anormales).

Les trois autres sites ne sont pas pollués à cette date.

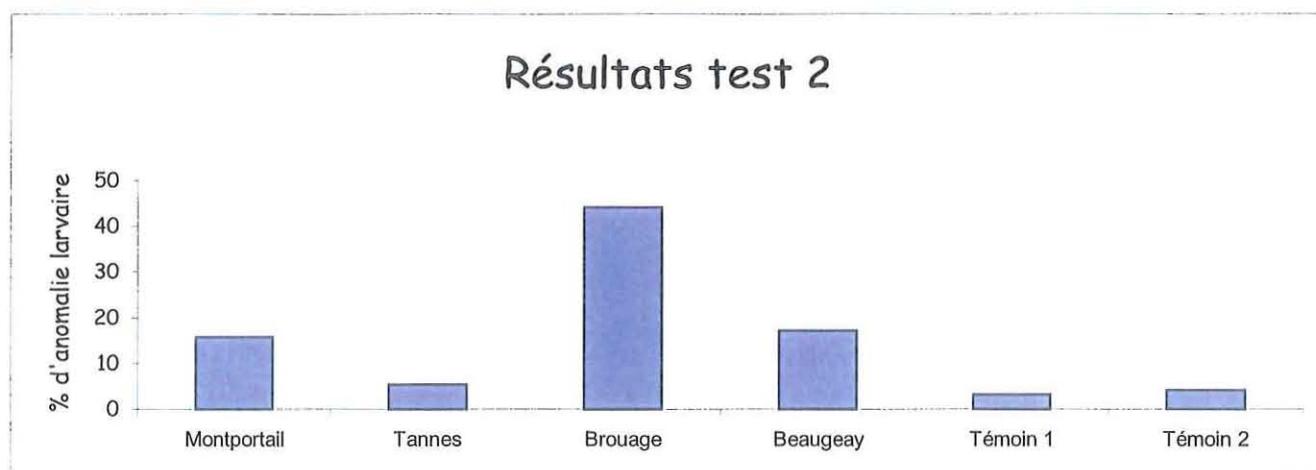
2) tests du 14/05/2003

Echantillon	Salinité (‰)	Température (°C)
1 : Montportail	1,4	17
2 : Tannes	6,3	17
3 : Brouage	14,8	16,8
4 : Beaugeay	0,5	17,9

Pourcentage de larve anormale (tableau N°2)

Acuvettes	Pourcentage de larves anormales					moyenne	I.C à 95%	écart type	Moyenne + IC	Moyenne - IC	Milieu aquatique
	A	B	C	D	E						
site 1	15	6	17	22	19	15,8	0,170	6,058	15,970	15,630	Peu perturbé
site 2	2	7	8	5	5	5,4	0,065	2,302	5,465	5,335	Non pollué
site 3	52	29	43	47	50	44,2	0,257	9,149	44,457	43,943	Moyennement pollué
site 4	19	17	16	13	21	17,2	0,085	3,033	17,285	17,115	Peu perturbé
Témoin 1	4	4	3	4	1	3,2	0,037	1,304	3,237	3,163	Interprétable
Témoin 2	5	3	3	7	3	4,2	0,050	1,789	4,250	4,150	

Représentation graphique des résultats (graphique N°2)



Commentaires

Le pourcentage d'anomalie larvaire des témoins étant inférieur à 20%, les résultats sont interprétables.

Un seul point est inquiétant ici : c'est celui de Brouage, dont le milieu aquatique est moyennement pollué (44%).

D'autre part, l'eau prélevée à la vanne des Tannes n'est pas polluée, et les prélèvements réalisés à Montportail et Beaugeay sont peu pollués.

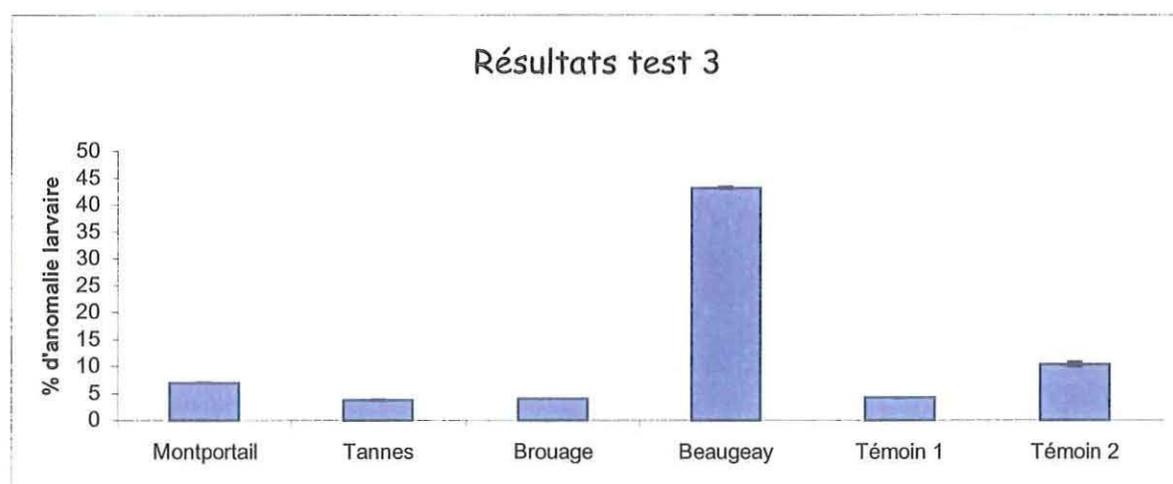
3) tests du 19/05/2003

Echantillon	Salinité (‰)	Température (°C)
1 : Montportail	2,6	19,6
2 : Tannes	9,9	19,2
3 : Brouage	12,3	20,6
4 : Beaugeay	5,5	19

Pourcentage de larve anormale (tableau N°3)

Acuvettes	Pourcentage de larves anormales					moyenne	I.C à 95%	écart type	Moyenne + IC	Moyenne - IC	Milieu aquatique
	A	B	C	D	E						
site 1	4	6	7	5	13	7	0,099	3,536	7,099	3,980	non pollué
site 2	1	4	11	2	1	3,8	0,118	4,207	3,918	1,358	non pollué
site 3	4	4	7	3	2	4	0,052	1,871	4,052	39,449	non pollué
site 4	43	35	42	46	50	43,2	0,155	5,541	43,355	11,122	moyennement pollué
Témoin 1	5	2	3	4	7	4,2	0,054	1,924	4,254	0,769	Interprétable
Témoin 2	3	37	5	2	5	10,4	0,419	14,926	10,819	0,585	Interprétable

Représentation graphique des résultats (graphique N°3)



Commentaires

Nous notons tout d'abord, l'absence d'une pollution significative à Brouage. Les points Montportail, Tannes et Brouage présentent une différence d'anomalie larvaire avec les témoins significative, mais inférieure à 25% : Le milieu aquatique était donc peu perturbé en ces points, et à cette date. Cependant, le point de Beaugeay présente une différence avec les témoins comprise entre 25 et 50% : Le milieu aquatique était donc moyennement pollué en ce point.

4) tests du 28/05/2003

Echantillon	Salinité (‰)	Température (°C)
1 : Montportail	2,9	18,6
2 : Tannes	7,4	19,8
3 : Brouage	4,4	18,5
4 : Beaugeay	0,5	19,3

Pourcentage de larve anormale (tableau N°4)

Acuvettes	Pourcentage de larves anormales					moyenne	I.C à 95%	écart type	Moyenne + IC	Moyenne - IC	Milieu aquatique
	A	B	C	D	E						
site 1	22	25	21	35	41	28,8	0,246	8,786	29,046	28,554	Moyennement pollué
site 2	15	7	19	17	15	14,6	0,128	4,561	14,728	14,472	Peu perturbé
site 3	13	14	9	15	13	12,8	0,064	2,280	12,864	12,736	Peu perturbé
site 4	16	14	18	21	20	17,8	0,080	2,864	17,880	17,720	Peu perturbé
Témoin 1	99	98	100	99	100	99,2	0,023	0,837	99,223	99,177	Ininterprétable
Témoin 2	100	97	100	100	99	99,2	0,037	1,304	99,237	99,163	

Commentaires

Les témoins présentent un pourcentage d'anomalie approchant les 100%.
 Les résultats obtenus pour les échantillons d'eau ne sont donc pas interprétables.
 Ce résultat n'est sans doute pas dû à qualité des larves (car les tests ne présentent pas 100% d'anomalies), mais peut être à la qualité de l'eau de mer filtrée utilisée pour les témoins. Ou cela peut être aussi dû à une toxicité particulière de la matière plastique des acuvettes.

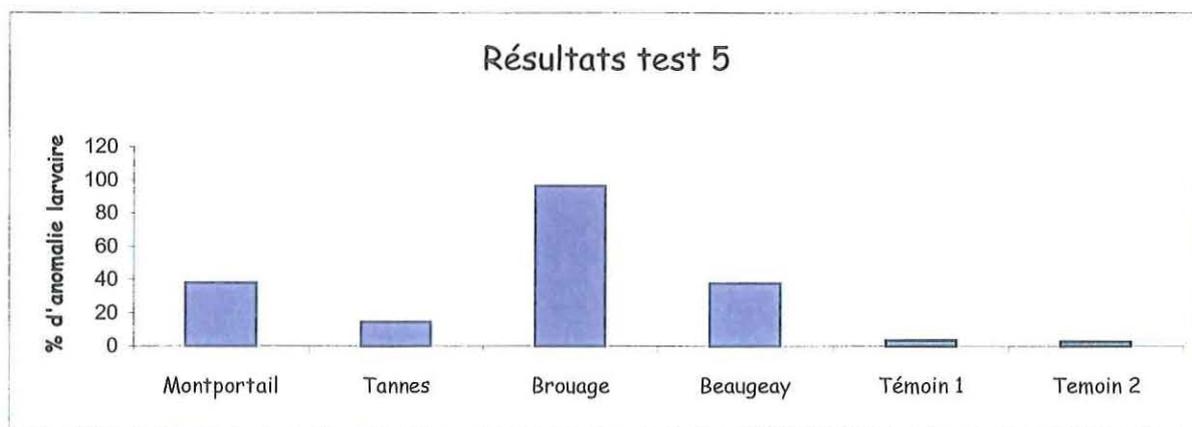
5) tests du 04/06/2003

Echantillon	Salinité (‰)	Température (°C)
1 : Montportail	2,4	21,3
2 : Tannes	7,3	22,3
3 : Brouage	18,7	20
4 : Beaugeay	0,6	21,6

Pourcentage de larve anormale (tableau N°5)

Acuvettes	Pourcentage de larves anormales					moyenne	I.C à 95%	écart type	Moyenne + IC	Moyenne - IC	Milieu aquatique
	A	B	C	D	E						
site 1	43	42	32	38	35	38	0,130	4,637	38,130	37,870	Moyennement pollué
site 2	12	10	15	25	11	14,6	0,171	6,107	14,771	14,429	Peu perturbé
site 3	84	98	100	99	100	96,2	0,193	6,870	96,393	96,007	Massivement pollué
site 4	38	35	43	45	28	37,8	0,190	6,760	37,990	37,610	Moyennement pollué
Témoin 1	4	3	5	3	3	3,6	0,025	0,894	3,625	3,575	Interprétable
Témoin 2	2	4	1	3	3	2,6	0,032	1,140	2,632	2,568	

Représentation graphique des résultats (graphique N°4)



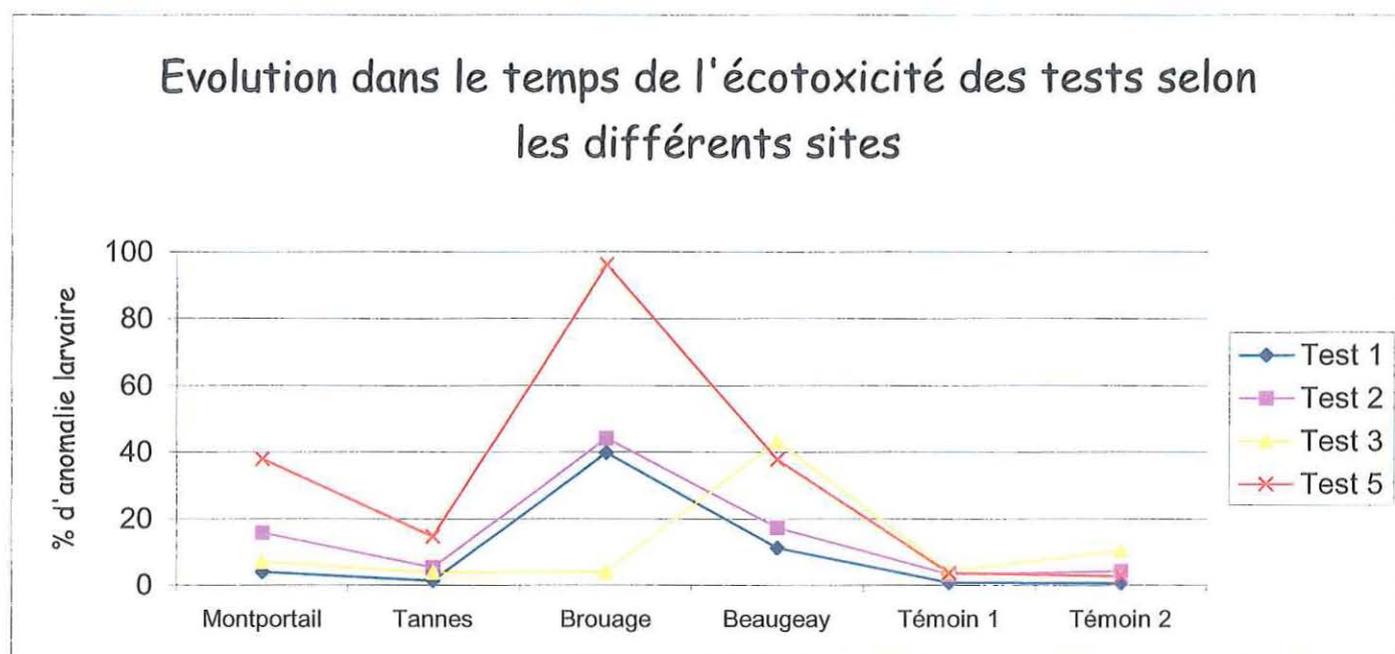
Commentaires

Le point des Tannes présente une différence significative avec les témoins, mais elle est inférieure à 25% : Le milieu aquatique était donc peu perturbé en ce point, et à cette date. Les points de Montportail et Beaugeay présentent une différence avec les témoins comprise entre 25 et 50% : Le milieu aquatique était donc moyennement pollué en ces points. Enfin, le point de Brouage correspond ce jour là, à un milieu aquatique massivement pollué.

DISCUSSION

1) Comparaison des différents tests

Voici l'évolution des résultats au cours des tests :



Cette étude a débuté le 5 mai et s'est terminée le 4 juin. Nous pouvons donc attribuer ces résultats au mois de mai 2003 : mois précédant la période susceptible de traitement des cultures.

Ces tests ont été effectués à une semaine d'intervalle, et les prélèvements effectués dans les mêmes conditions ().

A propos de la localisation des sites : le site de Montportail a été choisi comme lieu de prélèvement car il se trouve à proximité d'un complexe ostréicole.

Et en ce qui concerne les trois autres : tout d'abord Beaugeay est la zone de débouché du canal Charente/Seudre, donc susceptible d'apporter des polluants du bassin versant cultivé. Tandis que Brouage et Tannes sont des zones de clairs.

[cf. carte page N°18](#)

Cette représentation graphique illustre la dispersion des résultats.

De plus, le fait que les témoins varient de la même façon pour chaque test, montre qu'ils contiennent la même eau (eau de mer filtrée), et que les larves qu'ils contiennent proviennent d'une même population.

De façon générale, chaque site a vu son écotoxicité augmenter au cours des tests.

Les résultats les plus significatifs correspondent au site de Brouage qui est passé de 40% d'anomalie larvaire lors du premier test, à presque 100% d'anomalie lors du cinquième test : ce point semble donc être le plus pollué.

Le site le moins touché dans la période considérée paraît être la vanne des Tannes : ce dernier passe de 1,4% à 14% d'anomalie larvaire : il paraît être le moins pollué.

Cette évolution au cours du temps peut correspondre à la date de traitement des cultures (à partir du 15 avril) ou bien à la pluviométrie.

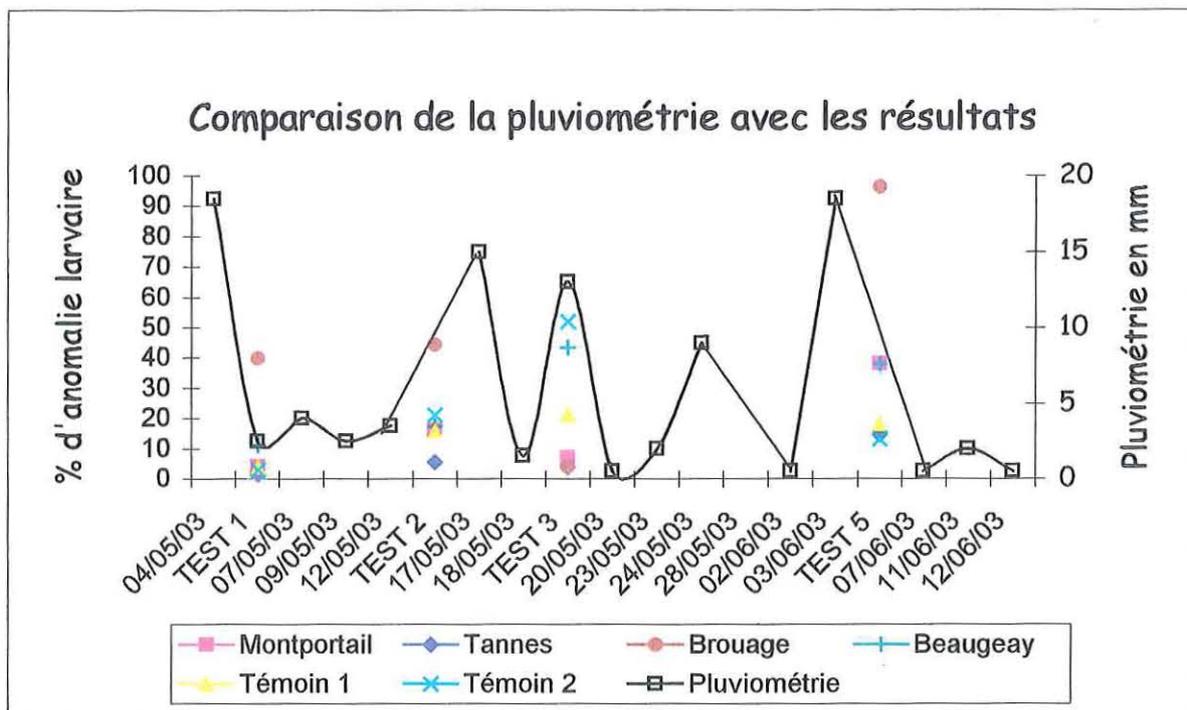
C'est pourquoi nous allons étudier ce facteur, afin d'essayer d'expliquer cette évolution.

2) Comparaison des résultats avec la pluviométrie

D'après les données pluviométriques de l'INRA à saint Laurent de la Prée.

Les échantillons d'eaux étudiés étant des eaux de rejets agricoles, leur degré de pollution sera de manière générale fonction de la qualité d'eau de drainage apportée par la pluie. La pollution peut aussi provenir de l'eau de pluie ayant transité à travers les terres hautes cultivées, et non pas seulement le marais, qui joue aussi le rôle de réceptacle.

C'est pourquoi nous allons comparer les résultats avec la pluviométrie.



Nous pouvons noter la présence de 5 pics, correspondant à des dates où il a beaucoup plu (jusqu'à 19 mm d'eau).

Le 4/05/03, la pluviométrie est de 18,5 mm et le test 1 (réalisé le lendemain) permet de mettre en évidence un point moyennement pollué (Brouage)

Le 14/05/03, la pluviométrie la veille du test est faible (3,5 mm). Ce facteur n'est donc pas mis en cause à cette date.

Le 19/05/03, la pluviométrie est de 13 mm et le test 3 (réalisé le 19/05/03) révèle un point moyennement pollué (Beaugeay).

Le 03/06/03, la pluviométrie est de 19 mm et le test 5 (réalisé le 04/06/03) met en évidence 2 points moyennement pollués et 1 point massivement pollué.

Ces tests montrent bien qu'il existe un lien entre la qualité des échantillons et la pluviométrie. Le dernier test montre qu'une importante pluviométrie entraîne une grande perturbation du milieu aquatique. (Cf. page 27 : résultats du test 5)

CONCLUSION

L'objectif fixé était d'évaluer la qualité des eaux de surface à proximité des zones conchylicoles de Moëze-Brouage. Ces dernières pouvant être polluées par les eaux de drainages des marais cultivés.

Les données écotoxicologiques obtenues à partir des prélèvements effectués sur cette zone ont permis de déterminer des eaux de mauvaise qualité biologique.

La qualité des eaux diffère selon la date des prélèvements (les traitements phytosanitaires peuvent être suspectés) et des lieux de prélèvements.

Ces résultats peuvent donc susciter l'inquiétude quant à la qualité des eaux rejetées à la mer et par conséquent la qualité des écosystèmes marins côtiers.

Ces tests ont toutefois leur limite car ils ne permettent pas de mettre en évidence la(es) cause(s) et les origines des pollutions.

Il serait également nécessaire d'aller plus loin dans l'analyse chimique des eaux pour déterminer la part de responsabilité des produits phytosanitaires dans ce phénomène.

Il faudrait certainement mettre en place un ensemble de mesures pour éviter ou diminuer la pollution vraisemblable des produits phytosanitaires dans le bassin versants de ce marais.

Ce stage m'a confirmé la nécessité d'être organisée et soignée pour effectuer un bon travail de technicienne.

Il m'a aussi ouvert les yeux sur ma capacité à entrer dans la vie active. Ce fut donc un pont entre les études et la vie professionnelle.

ANNEXES

ANNEXE N°1

PESTICIDES ET CULTURE EN MARAIS

MATIERES ACTIVES	Total 84/88 (Kg)	Toxicité sur rat (mg/Kg)	Solubilité (mg/L)
HERBICIDES			
Isoproturon	300,5	1800	70
Chlortoluron	113	10 000	70
Metoxuron	29	2020	678
Neburon	67	11 000	5
Bromoxynil	46	260	130
Loxynil	58,9	110	50
2-4 D	30	375	600
2-4 MCPA	72	700	825
MCPP	161,2	930	620
Clopyralid	2,5	5 000	1 000
Carbetamide	105	11 000	3 500
Fluorochloridone	71,8	4 000	28
Furoxypyr	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
Mancozebe	59,4	8 000	Ins
Chlorothalonil	120,6	10 000	0,6
INSECTICIDES			
Benfuracarbe	20	138	5
Carbofuran	12,5	8	750
Pyrimicarbe	6,6	147	2,7
Fenvalerate	0,2	450	<1
Endosulfan	12	50	Ins
Thiomethan	4	120	200
Parathion-methyl	8	14	60
Terbuphos	6,4	4	15
MOLLUSCICIDES			
Mercaptodimethur	13,4	100	Ins

Tableau N°1 : Exemple de l'îlot de drainage des TANNES-Bilan des apports sur 4 ans.

ANNEXE N° 2

Photos des sites de prélèvements



Ecluse de Baugeay



Brouage



Ecluse des Tannes



Montportail

ANNEXE N°3

LISTE DU MATERIEL NECESSAIRE A LA REALISATION D'UN TEST LARVE D'HUÎTRE .

NOM	FONCTION	QUANTITE
Flacon de verre brin (1L)	Echantillonnage	1 par point de prélèvement (4)
Becher de verre stérile (1L)	Préparation des échantillons Isolement des géniteurs	1 par échantillons (4) 1 par géniteur (6)
Eprouvette graduée stérile (1L)	Lieu de la fécondation	1
Eprouvette graduée stérile (250 mL)	Calcul de la concentration en œufs	1
Pipette graduée stérile (20 mL)	Remplissage des acuvettes	1
Pipette graduée stérile (10 mL)	Prélèvement des gamètes mâles	1
Micro Pipette et cônes stériles	Ensemencement des acuvettes Fixation au Lugol-Formol	1
Tamis (100 microns)	Filtration des gamètes femelles	1
Tamis (32 microns)	Filtration des gamètes mâles	1
Acuvette en Polyéthylène (25 mL)	Développement des larves	10 pour le témoin 5 par échantillon
Lame creuse	Dénombrement des œufs	4
Lame plate	Lecture des gamètes Vérification de la fécondation	Au moins 1
Bac blanc en plastique	Mise au sec des huîtres Lieu des chocs thermiques	1
Thermo-salinomètre	Mesure de température et salinité	1
Microscope inversé UtermÖL	Lecture des gamètes Lecture des larves fixées	1
Eau de mer filtrée à 2 microns	A 10 et 28°C pour les chocs thermiques Pour les témoins	30 L environ
Solution de Formol	Fixation des larves	10 gouttes par acuvette
Huîtres creuses du Japon mûres	Géniteurs des larves	Une douzaine

ANNEXE N°4

DETERMINATION DU NOMBRE D'ŒUFS DANS L'ÉPROUVETTE D'UN LITRE

Exemple de résultats	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Essai 4	Moyenne
Nombre d'œuf Par lame	26	25	30	33	28,5

Il y a 28,5 œufs dans 0,1 ml dilué :

28,5 œufs / 0,1 ml dilué

285 œufs / 1 ml dilué

$\frac{285 \times 250}{10}$ œufs / 1 ml pur

10

7125 œufs / 1 ml pur dans 1L

* Calcul du volume à prélever pour avoir 600 œufs

Dans 1 ml il y a 7125 œufs

Si nous voulons 600 œufs par acuvette (nombre suffisamment élevé pour le comptage), il faut alors prélever :

$$X = \frac{600}{7125} = 0,084 \text{ ml} = 84 \mu\text{l}$$

Il sera donc placé dans chacune des acuvettes 84 μl de la solution où a eu lieu la fécondation.

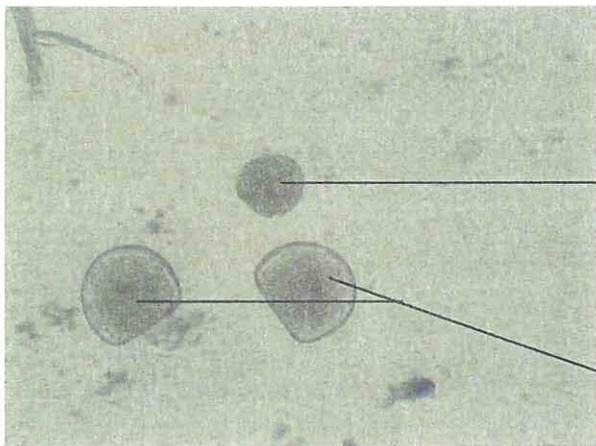
Les acuvettes sont alors placées 24 heures à 24 °C.

ANNEXE N°5

Larves anormales observées au cours des tests.
Photos prises au microscope grossissement

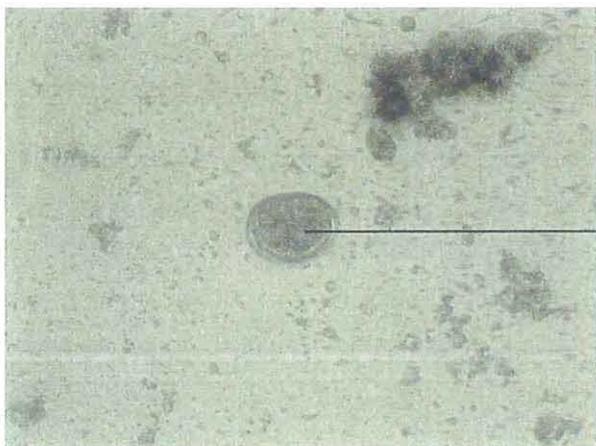


Larve ayant perdu son contenu



Œuf fécondé non-développé

Larves normales



Une des deux valves est
anormalement développée

(Photos : Montaubin C.)

BIBLIOGRAPHIE

Chevalier C., Masson D., 1988

Agriculture, conchyliculture et circulation des eaux de surface en Charente-maritime.

Aquarevue N°21, Octobre-Novembre.

Denise N., Bretaudeau J.

Les huîtres.

Edition LIBRIS

Marteil L., 1974

La conchyliculture française : 1^{ère} partie, le milieu naturelle et ses variations
: 2nd partie, biologie de l'huître et de la moule

Trav. Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes.

Barnabé G., 1980

Les bases biologiques et écologiques de l'aquaculture

Edition LAVOISIER-TEC & DOC.

Masson D., His E., Dubernet JF., Scribe P., 2000

Produits phytosanitaires et conchyliculture en Charente Maritime.

Contrat de plan Etat-Région Poitou-Charentes.