



IUT de SAINT-ETIENNE
Département GENIE BIOLOGIQUE
Option Génie de l'environnement

JOUGNOT Damien

RAPPORT DE STAGE DE FIN D'ETUDE

Du 15 avril au 22 juin 2002

Application du test écotoxicologique

« larve de bivalve »

au monitoring des eaux de rejet agricoles



IFREMER
17390 La Tremblade
Maître de stage : Daniel MASSON
Tel : 05.46.36.76.07.

Ifremer

SOMMAIRE

Avant propos.....	2
Remerciement.....	3
Présentation de l'IFREMER.....	4
- sur le plan national	
- la station de La Tremblade	
- la D.E.L.	
Introduction.....	6
I- Présentation de l'étude	7
A-Le problème agro-conchylicole.....	7
B-Objectif du test.....	9
C-Principe du test.....	9
II- Rappel sur <i>Crassostrea gigas</i> et son mode de reproduction	10
A-Généralités sur <i>Crassostrea gigas</i>	10
B-Sexualité de <i>Crassostrea gigas</i>	11
C-Production et émission de gamètes.....	11
D-De la fécondation à l'individu adulte.....	12
III-Matériel et méthode	14
A-Prélèvement des échantillons d'eau à tester.....	14
B-Préparation des échantillons.....	14
C-Préparation du matériel biologique.....	14
D-Lecture et interprétation.....	16
IV- Résultats et commentaires	19
A- Résultats des différents tests.....	19
B- Discussion.....	25
C- Remarques.....	27
Conclusion.....	28
Bibliographie.....	29
Lexique.....	30
Annexes.....	31
I- Liste des produits phytosanitaires.....	32
II- Liste du matériel	34
III- Calcul de concentration en œufs	35
IV- La sécurité à l'IFREMER.....	36

AVANT-PROPOS

Le travail présenté dans ce mémoire a été effectué au laboratoire de la Direction de l'Environnement et de l'aménagement Littoral (DEL) de la station IFREMER de La Tremblade.

Il constitue le rapport de mon stage de fin d'étude à l'Institut Universitaire de Technologie de Saint Etienne.

Ce stage s'est déroulé sur 10 semaines entre le 15 avril et le 22 juin 2002 sous la direction Daniel Masson, mon maître de stage.

REMERCIEMENTS :

Je tiens à remercier toutes les personnes de la station IFREMER de La Tremblade pour leur accueil chaleureux et leur aide durant de mon stage.

Parmi eux, je témoigne toute ma reconnaissance à mon maître de stage Daniel Masson pour son accueil, sa disponibilité et son savoir-faire, à Roger Kantin pour son accueil ainsi qu'à tout le laboratoire de la DEL pour son soutien et la bonne ambiance dans le travail.

Je tiens à saluer tous les stagiaires que j'ai rencontrés, tout particulièrement mes colocataires de la maison des stagiaires de l'IFREMER pour leur amitié, leur sympathie et leurs talents culinaires.

Enfin, je tiens à remercier mon tuteur de stage pour ses conseils.

L'IFREMER

Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la MER

1/ Sur le plan national

L'IFREMER est un Etablissement Public à caractère Industriel et Commercial. Il a été fondé par décret le 5 juin 1984 et résulte de la fusion entre le CNEXO (Centre National pour l'Exploitation de l'Océan) et l'ISTPM (Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes).

L'IFREMER est sous la tutelle conjointe des ministères chargés :

- de la Recherche
- de l'Agriculture et de la Pêche
- de l'Équipement
- des Transports et du Logement
- de l'Environnement

Son budget annuel est de 150 millions d'euros qui proviennent à la fois des subventions accordées par l'état (dû à son caractère semi-public) et de ses ressources propres. L'IFREMER emploie 1380 salariés.

Il est constitué en 5 centres (Boulogne-sur-mer, Brest, Nantes, Toulon, Tahiti) et 72 laboratoires ou services de recherche, répartis dans 24 stations sur tout le littoral métropolitain et dans les DOM TOM.

L'organisation :

Son Président Directeur Général est Jean François Minster.

L'IFREMER est organisé en 5 grandes directions opérationnelles :

- La DEL : Direction de l'Environnement et de l'aménagement Littoral
- La DRV : Direction des Ressources Vivantes
- La DRO : Direction des Recherches Océanique
- La TMSI : direction de la Technologie Marine et des Systèmes Informatiques
- La DNIS : Direction des Navires océanographiques et de l'Intervention Sous-marine

2/La station de La Tremblade



La station Ifremer de La Tremblade est spécialisée dans les domaines de la conchyliculture et de la surveillance de l'environnement littoral.

C'est même la station de référence européenne pour la pathologie des mollusques.

Elle se décompose en 2 directions, la DEL et la DRV.

Une cinquantaine de salariés y travaille de façon permanente.

Directeur de la station : Philippe GOULLETQUER

Chef du laboratoire de la DEL : Roger KANTIN (à mon arrivée) puis Daniel MASSON (à partir du 3 juin 2002).

3/Mon service : la DEL

La DEL est la direction chargée des missions de surveillance de l'environnement littoral. Cette surveillance s'effectue à travers différents réseaux :

- RNO : Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin
- REPHY : Réseau de suivi du Phytoplancton en qualité et en quantité
- REMI : Réseau de suivi Microbiologique

Ce laboratoire et ses réseaux fonctionnent en majorité sous assurance qualité et le laboratoire de microbiologie des coquillages est sous accréditation (COFRAC).

INTRODUCTION

L'IFREMER, parmi ses nombreuses attributions, s'est vu confier la surveillance du littoral français.

Le laboratoire DEL de l'IFREMER à La Tremblade effectue une surveillance du littoral bordant la plus grande zone de conchyliculture française, le bassin de Marenne-Oléron.

Depuis le début des années soixante, une partie de cette activité est mise en danger par une autre activité, l'agriculture intensive.

L'ancien marais salant de Moëze-Brouage abrite ces deux activités. De cette proximité est née la problématique agro-conchylicole. Il s'agira de savoir si les eaux rejetées par l'activité agricole peuvent être dommageables pour la conchyliculture.

Pour le savoir, il s'agira de déterminer la qualité biologique des eaux de rejets agricoles en appliquant le test écotoxicologique dit « larve de bivalves ».

Ce travail est donc une initiation au test « larve de bivalve » appliqué aux huîtres creuse du japon *Crassostrea gigas*.

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 global de l'huître creuse et de sa reproduction.

Dans une troisième partie, nous présenterons le test, son déroulement et le matériel qui y est nécessaire.

Enfin, nous étudierons les résultats des différents tests, et nous les commenterons pour pouvoir donner les conclusions de cette pré-étude.

I. PRESENTATION DE L'ETUDE

A-Le problème agro-conchylicole

1/ localisation du problème

Le littoral des Charente-Maritime est composé de nombreux marais (anciennement marais salants) qui servent depuis le 19^e siècle à la conchyliculture (la culture de coquillage) et principalement à l'ostréiculture (culture des huîtres).

Depuis le début des années soixante, on voit s'implanter la culture intensive (le maïs, le blé dur, l'orge, le tournesol) sur les marais doux.

Le problème se situe à l'interface entre les zones des marais qui voient se développer une culture intensive et celles qui servent à la conchyliculture.

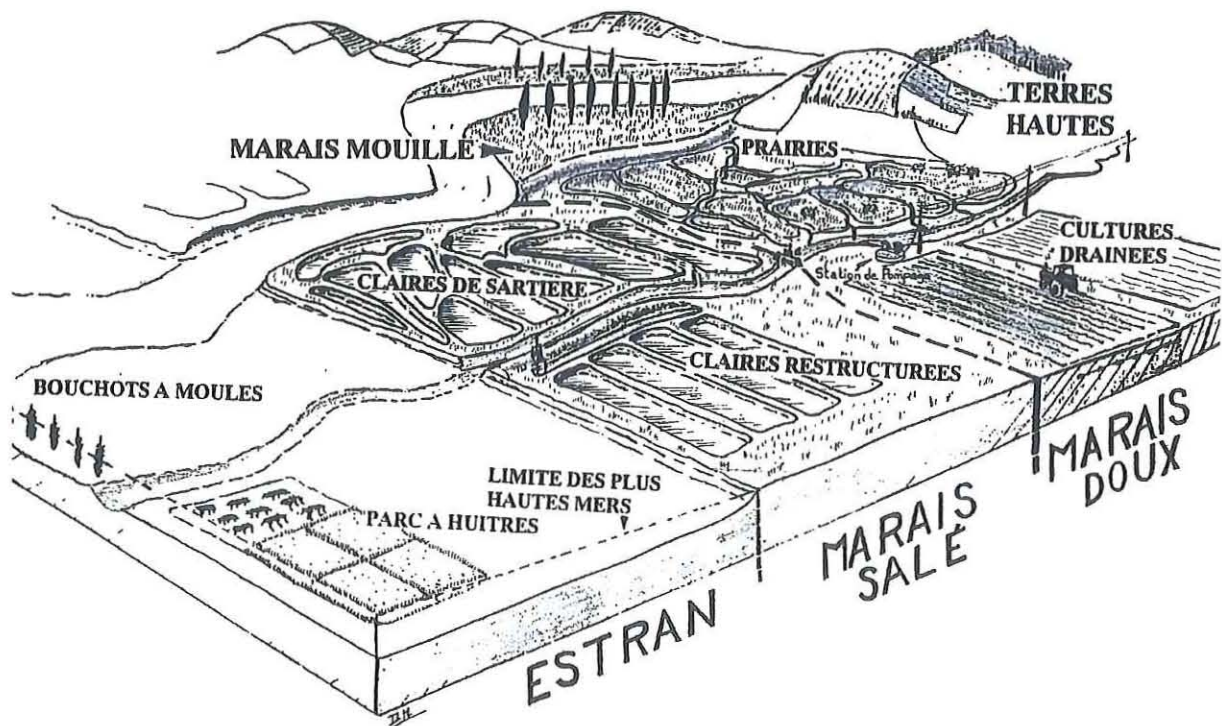


Figure 1 : schéma du marais (D. Masson)

2/ Les problèmes des agriculteurs :

Le sol des marais peut être argilo-sodique ou argilo-calcaïque (notamment s'il a été traité par gypsage pour le rendre plus fertile). Quel qu'il soit, il est totalement imperméable lorsqu'il est humide, ce qui génère différents problèmes :

- il faut évacuer l'eau des surfaces agricoles utiles en période de pluies :

Un réseau de fossés et de chenaux drainant avec station de pompage a été mis en place : ce système est très rectiligne et accélère l'arrivée d'eau douce à la mer, contrairement au chevelu (l'ancien système de drainage du marais traditionnel en prairie humide qui est très contourné)

-il faut maintenir un niveau en eau suffisant dans les fossés pour servir d'abreuvoir et de clôture pour les bêtes et afin d'éviter que les berges ne s'écroulent :

Des vannes ont été prévues pour gérer les niveaux d'eau

-il faut exploiter le marais pour qu'il soit le plus rentable possible :

Les traditionnels creux et bosses ont été aplanis, et l'utilisation des produits phytosanitaires sur les cultures est de plus en plus importante

Pour gérer les niveaux et éviter la submersion des cultures, les agriculteurs évacuent l'eau du système de drainage dans la mer par l'intermédiaire de canaux collecteurs. Ces canaux sont donc susceptibles de contenir des résidus de produits phytosanitaires qui pourraient être dommageable à la conchyliculture (voir en annexe II la liste des produits sanitaire et leurs périodes d'épandage).

3/ Les problèmes des conchyliculteurs

Le bassin de Marenne-Oléron est la première zone ostréicole européenne. Elle commercialise 45% des huîtres creuses consommées en France : environ 50000 tonnes par an. La culture des huîtres se fait en deux parties, l'une en mer (sur l'estran) pour la majeure partie de la croissance et l'autre en claire (plans d'eau de faibles profondeurs situés sur la partie salée du marais) pour l'affinage.

Les claires sont alimentées en eau par des chenaux dont l'embouchure peut se situer à proximité des canaux de rejet d'eau douce des agriculteurs. Les zones de l'estran servant à l'ostréiculture se trouvent donc à proximité de ces mêmes canaux.

Or cette eau peut poser plusieurs problèmes :

-la dilution de l'eau de mer :

La reproduction de l'huître et le développement de la larve dépend de la salinité de l'eau et de la température.

La température est prépondérante, et la dessalure intervient surtout en hiver, donc ce n'est pas le principal problème.

-l'apport d'engrais épandu sur les îlots de culture :

L'apport de nitrates permet la croissance du phytoplancton qui nourrit les huîtres, ce qui n'est pas un problème local.

L'apport de phosphate et de tout autre minéral est régulé par l'équilibre hydro-minéral (phénomènes de dilutions et échanges eau-sédiments).

-l'apport de produits phytosanitaires :

Ces produits étant utilisés en très grande quantité en culture intensive, ils peuvent poser problème à la conchyliculture. C'est ainsi qu'une grande quantité de matière active est épanchée et parfois même par voie aérienne (pulvérisation d'aérosols)

Parmi la liste des produits utilisés, on compte des herbicides, des fongicides, des insecticides et même des molluscicides (voir annexe II).

C'est donc sur les eaux susceptibles de véhiculer les produits phytosanitaires que porteront nos tests.

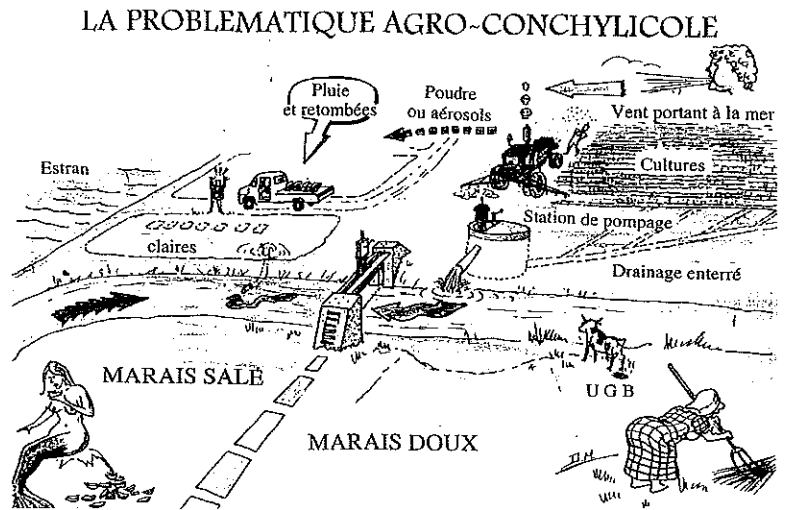


Figure 2 : La problématique agro-conchylicole (D. Masson)

B-Objectif du test larve d'huître

C'est de vérifier si les eaux rejetées par les zones agricoles sont susceptibles d'être dommageables pour l'activité conchylicole du bassin : que ce soit par une altération de la qualité ou de la quantité de coquillages produit.

Le test visera donc à étudier de la qualité des eaux à la sortie des canaux de rejet agricole.

Cette étude est en cours depuis 1994. Elle vise à constituer une base de donnée qui permettra à l'IFREMER d'obtenir un financement pour réaliser une étude plus complète et aboutir à des préconisations d'emploi plus respectueuses de l'environnement.

C-Principe du test

Le test larve d'huître a été développé par le scientifique 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 en présence d'une eau ou d'une substance à tester.

Après 24h et selon les taux d'anomalie larvaire constatés, on peut juger de l'embryotoxicité du produit.

Pour ce test, on utilise les larves de *Crassostrea gigas*, l'huître creuse japonaise.

Les larves d'huîtres présentent l'avantage d'être plus sensibles aux agressions que celles des autres coquillages.

De plus, *Crassostrea gigas* est présente partout sur le littoral et c'est la pratiquement la seule espèce commercialisée pour la consommation.

II. Rappel sur les huîtres et leur reproduction

A-Généralité sur les huîtres

1/Systématique de l'huître creuse japonaise

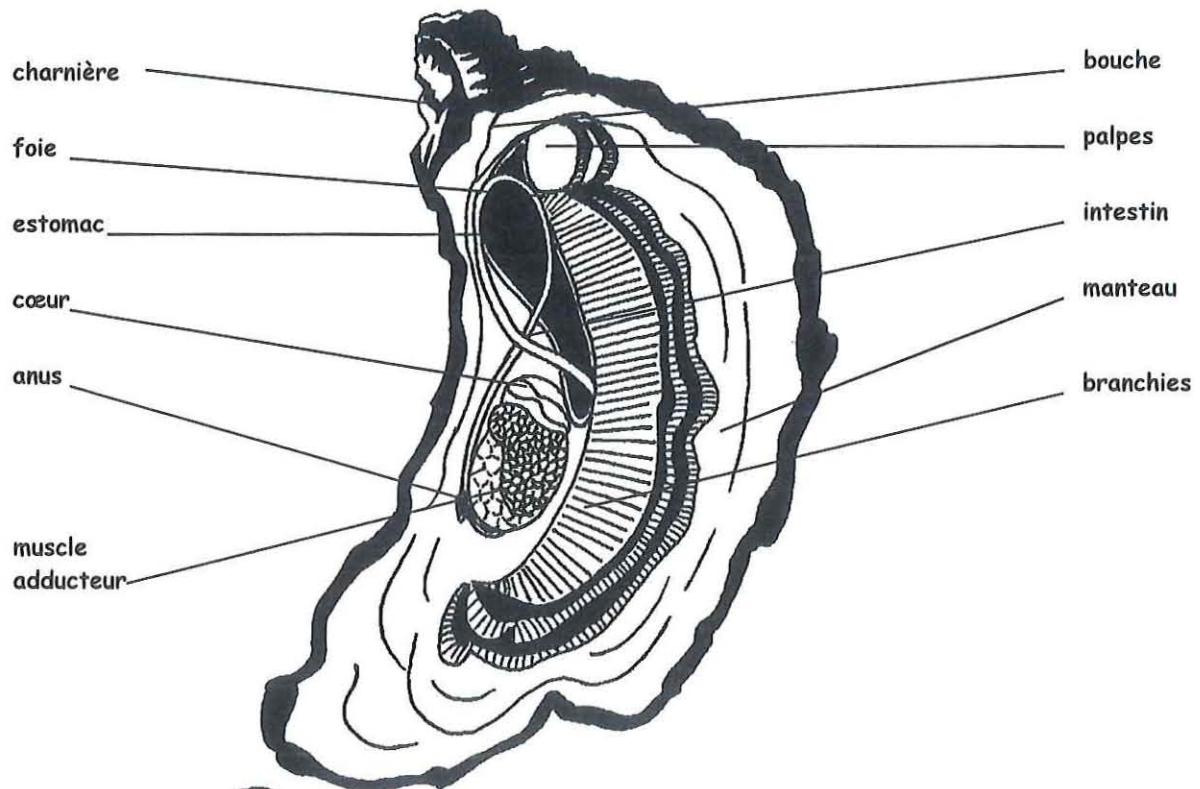
L'huître est un mollusque de la classe des bivalves qui fait partie de la famille des Ostréidae. Cette famille comprend trois espèces classées sous deux genres :

-le genre *Ostrea* : avec *Ostrea edulis* qui est l'huître plate, c'était celle qui existait naturellement en France et qui se trouve peu.

-le genre *Crassostrea* : avec *Crassostrea angulata* qui est l'huître creuse portugaise, et *Crassostrea gigas* qui est l'huître creuse japonaise (c'est celle qui est maintenant en culture en France pour la dégustation).

2/Anatomie de *Crassostrea gigas*

Elle possède une coquille allongée, irrégulière et sans dents.
Ses valves sont très inégales, la gauche est creuse et la droite operculaire.
Il n'existe qu'une seule impression musculaire.



Crassostrea gigas

Figure 1 : Huître creuse dont la valve droite à été enlevée (D. Jougnot)

3/Nutrition de *Crassostrea gigas*

Les huîtres sont des animaux planctonophages. Elles filtrent le milieu pour trouver ce phytoplancton, leur activité de pompage se nomme débit palléal, et les huîtres filtrent une partie de cette eau. Chez *Crassostrea gigas* ce débit peut être égal à 30 litres par heure à 20°C et dans des conditions optimales, et le taux de filtration de cette eau est d'environ 6,5 L/h .

B-La sexualité chez les huîtres creuses

Les huîtres sont des animaux hermaphrodites à sexualité alternative irrégulière. Les individus sont soit en phase mâle, soit en phase femelle pendant de longues périodes et avec possibilité de retour en arrière. Ces inversions du sexe peuvent avoir lieu au cours d'une même saison ou au cours de saisons successives. Durant leur première année, les huîtres présentent une certaine protandrie (environ 70% de mâles). Puis, pendant la deuxième année, il y a environ autant de mâles que de femelles. Enfin, jusqu'à la fin de leur vie, les femelles sont en plus grand nombre.

C- Production et émission de gamètes

La période naturelle de reproduction des huîtres creuses est située entre la mi-juin et les premiers jours de septembre.

1/La maturation

Une huître est arrivée à maturation quand sa gamétogenèse est terminée. La gamétogenèse est influencée par trois facteurs :

- la température de l'eau :
le réchauffement estival déclenche cette maturation
- la salinité de l'eau :
elle ne doit pas être inférieure à 25 pour mille
- la nutrition :
le jeûne provoque l'arrêt des phénomènes sexuels et la lyse des gamètes.

Dans le milieu naturel, les huîtres arrivent à maturation autour du mois de mai juin.

2/L'émission des gamètes

L'émission se fait à la suite de chocs thermiques (passage de 18°C à 28°C) répétés, dans un sens ou dans l'autre. Ce sont les phénomènes de marée en été qui déclenchent ces émissions à l'état naturel, couplés avec un changement de température. Le mâle y est plus sensible et émet son sperme en premier. Cette éjaculation se présente comme jet blanc et dense plus ou moins régulier qu'on pourrait comparer au filet de la fumée d'une cigarette.

Dans le sperme est présente une phéromone, la diantline, qui provoque la relaxation du muscle adducteur et donc la ponte chez la femelle. La ponte de la femelle se fait par émission irrégulière de petits amas d'œufs comparables à des nuages blancs. L'huître s'ouvre et se referme brusquement (on dit qu'elle «claque») et expulse ainsi ces œufs.

La femelle émet plusieurs dizaines de millions d'œufs à chaque ponte.

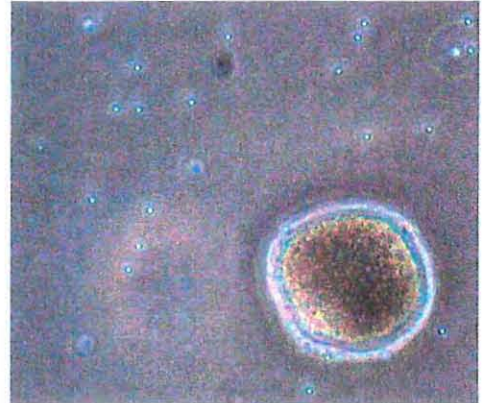
D- Fécondation et développement

1/La fécondation

Contrairement aux huîtres plates (*Ostrea edulis*) qui sont larvipares, les huîtres creuses réalisent une fécondation externe.

C'est cette fécondation qui déclenche la maturation des ovocytes.

Il y a donc émission des deux premiers globules polaires.



Photographie 1 : Fécondation d'un ovocyte d'huître par des spermatozoïdes (D.Jougnot)

2/La phase embryonnaire

C'est une succession de division qui démarre 50 à 80 minutes après la fécondation durant laquelle il n'y a pas d'augmentation du volume.

La première division conduit à la formation de 2 blastomères inégaux.

Puis, la deuxième forme deux pôles, un pôle animal et un végétal.



Photographie 2 (D.Jougnot)

A partir de la troisième division, les divisions se font à angle droit et aboutissent au stade Morula, puis Blastula : clivages spiral et inégal (photographies 2 et 3).

C'est le début de la ciliation, l'embryon peut se déplacer en tournant

Le stade Gastrula intervient 4 à 6 heures après la fécondation : l'embryon est entièrement cilié avec une touffe de cils plus importante au pôle végétatif.



Photographie 3 (D.Jougnot)

3/La phase larvaire

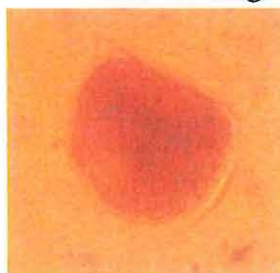
La larve passe par deux états successifs :

-On a tout d'abord la trochophore :

12 heures après la fécondation, la larve est en forme de toupie et se déplace à l'aide de ses cils et de ses flagelles.

Le tube digestif, la bouche et l'anus sont formés.

-Puis la véligère :



Photographie 4 : larve D (D.Jougnot)

Après 24 heures, la jeune larve a la forme d'un « D » majuscule (d'où le nom larve D).

Ce D est formé par les deux valves qui entourent sa masse viscérale et par sa charnière droite.

La larve se déplace grâce à son velum cilié.

Son tube digestif est fonctionnel, elle peut donc se nourrir et passe du stade endotrophe au stade exotrophe.

La larve continue de se développer forme d'autres organes :

L'umbo : un crochet (larve umbonée), puis une coquille secondaire et enfin son pied (larve œillée).

Grâce à son pied, elle se fixera sur un support, puis subira une métamorphose.

A la fin de sa métamorphose, la jeune huître (naissain) est semblable à l'adulte, tous ses organes sont en place.

III. Matériel et méthodes

A- Prélèvement des échantillons d'eau à tester

La zone de l'étude est le marais de Moëze-Brouage, en Charente-Maritime (voir carte).

Depuis 1994 les prélèvements y sont fait en 4 points :

- Montportail(avant la vanne de sortie à la mer d'un marais cultivé)
- Tannes(avant la vanne de sortie d'un chenal de marais doux dans un chenal ostréicole)
- Brouage(sur le même chenal ostréicole, en amont du point précédent)
- Baugeay(avant la vanne de sortie d'un chenal d'eau douce sur le précédent)

Les prélèvements se font dans des flacons bruns de 1 litre stérilisés à 130°C dans un four Pasteur.

On mesure sur place la température de l'eau prélevée et sa salinité.

Les échantillons sont identifiés.

B- Préparation des échantillons

C'est dans ces eaux que se développeront les larves pour le test, il faut donc préparer ces échantillons.

Tout d'abord, on dilue les échantillons d'eau.

Dans des béciers de 1 litre, on verse 250 mL d'échantillon et 500mL d'eau de mer filtrée à 2µm.

Puis on ajuste leur salinité à une valeur comprise entre 25 et 35 pour mille, car les eaux prélevées peuvent avoir des salinités insuffisantes pour le développement des larves.

On obtient les échantillons dont on se servira pour le reste la manipulation.

On prépare ensuite les acuvettes (bécher en polyéthylène de 25 mL avec bouchons) : deux séries de cinq réplicats pour les témoins, et une série de cinq réplicats pour chaque échantillon.

Elles sont identifiées par le numéro de l'échantillon et par celui du réplikat (exemple : pour le 2^e réplikat de l'échantillon du point 3, l'acuvette sera identifiée 3B).

Dans les acuvettes témoins, on place 20mL d'eau de mer filtrée à 2µm.

Dans les autres, on place 20mL de l'échantillon à tester.

C'est dans ces acuvettes qu'on déposera les œufs fécondés pour qu'ils s'y développent.

C- Préparation du matériel biologique

1/Mise en condition des huîtres

L'objectif de cette partie du test est d'obtenir des gamètes mâles et femelles pour enfin obtenir des larves.

La station de La Tremblade contient une salle de maturation grâce à laquelle on peut obtenir des huîtres à maturité sexuelle presque toute l'année.

En une semaine, on les fait passer de 10°C environ (milieu naturel) à 20°C, puis on les nourrit en quantité en leur apportant du phytoplancton jusqu'à ce qu'elles arrivent à maturation.

Cette étape peut durer entre 1,5 et 3 mois selon la saison.

On prélève donc une douzaine de géniteurs de toutes les tailles (pour avoir à coup sûr mâles et femelles), on les nettoie de toute vase, de tout épibionte, en particulier des jeunes huîtres, on les sépare les unes des autres (détrouage). Puis on les place au sec (dans le bas d'un réfrigérateur éventuellement) pendant 24 heures la valve gauche creuse vers le bas pour éviter qu'elles ne perdent leur eau.

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

2/Déclenchement de l'émission des gamètes

La ponte des huîtres est induite par choc thermique.

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 28-30°C, (sortant du réfrigérateur), les huîtres subissent un choc thermique important qui déclenche les pontes.

Si au bout de 15 minutes, les huîtres n'ont pas pondu, on sacrifie un individu qui ne semble pas être 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 qu'on l'injecte à proximité des autres huîtres, à hauteur du siphon inhalant.

Si au bout de 30 minutes on n'a aucune réaction, on les immerge à 18°C pendant 30 minutes, puis à 28°C... et ainsi de suite jusqu'à ce qu'il y ait émission des gamètes.

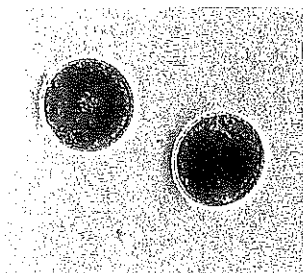
3/Sélection des géniteurs

Dès qu'une huître commence à émettre, on la sépare des autres. On la place dans un bécher contenant 1 L d'eau de mer filtrée à 2µm, si c'est une femelle, et juste de quoi l'immerger si c'est un mâle.

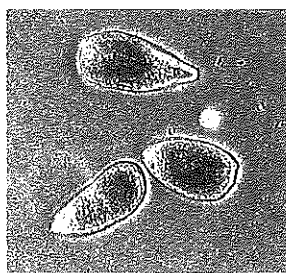
On laisse l'huître émettre tous ses gamètes, et on procède à la sélection des deux meilleurs géniteurs :

-Pour un mâle, ces spermatozoïdes doivent être nombreux et très mobiles

-Pour une femelle, ces ovocytes doivent être ronds, réguliers et abondants (*photos D. Jougnot*)



Ovocytes ronds et réguliers



Ovocytes pointus

Une fois sélectionnés, ces géniteurs vont nous servir pour la fécondation.

4/La fécondation

On filtre à 100 µm la solution d'ovocytes sélectionnée et on la transfère dans une éprouvette graduée de 1 L.

Puis on prélève 10 mL de solution de sperme du mâle qu'on filtre à 32 µm (élimination d'éventuels œufs fécondés) et qu'on place dans cette même éprouvette. On ne prend que 10 mL pour éviter les fécondations multiples.

On mélange ces deux solutions lentement et délicatement pendant 5 minutes de telle façon que tous les ovocytes soient fécondés.

Puis on vérifie au microscope que la fécondation a bien lieu (émission des globules polaires), si ce n'est pas le cas, on rajoute du sperme.

5/Détermination de la concentration en œufs

On recherche le volume nécessaire de la solution d'œufs pour avoir 600 œufs dans chacune des acuvettes.

On prélève 10 mL de la suspension mère de 1 L d'œufs fécondés qu'on dilue dans 250 mL d'eau de mer filtrée à 2 μ m.

A partir de ces 250 mL, on prélève 4 fois 0,1 mL de la suspension d'œufs qu'on dépose dans 4 lames creuses afin de les compter.

La forme des lames permet de regrouper les œufs en leur centre et de les dénombrer ainsi rapidement et facilement.

En faisant une moyenne, on trouve donc le nombre d'œufs pour 0,1 mL, ainsi, l'on détermine la concentration en œufs de la suspension mère. Grâce à cette concentration, on obtient le volume contenant 600 œufs. Le détail de ce calcul est présenté en annexe III.

6/Ensemencement des acuvettes

On place le volume de suspension mère nécessaire pour obtenir 600 œufs dans chacune des acuvettes.

Le comptage se fait sur 100 œufs, mais le fait d'en placer le volume correspondant à 600 est une marge qui permet à coup sûr la présence de 100 larves.

Puis, on place les larves à l'étuve pendant 24h à 24°C.

D-Lecture et interprétation

1/Fixation des larves

Au bout de 24 heures on fixe les larves avec une solution de Lugol-Formol.

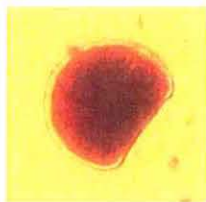
On place 0,50 mL de cette solution dans chacune des acuvettes.

Les larves sont tuées, et tombent au fond de l'acuvette, présentant ainsi une de leurs deux valves à l'observateur. C'est ainsi « couchée » sur une valve qu'elles présentent, du moins pour les larves normales, une forme en D. Une fois fixées, les larves peuvent être conservées pendant une très longue durée, et la lecture peut ainsi être différée ou reprise pour d'éventuelles vérifications.

2/Lecture du pourcentage d'anomalie larvaire

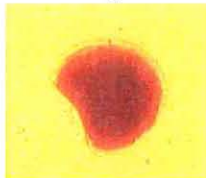
Les lectures sont faites à l'aide d'un microscope inversé Utermöhl au grossissement de 100. Ce microscope est dit inversé, car la source lumineuse est située au-dessus de l'échantillon à observer et les lentilles en dessous. Il permet de lire des cuves entières, comme les acuvettes, directement sans avoir à les manipuler d'avantage (ce qui pourrait modifier les résultats en abîmant les larves), ni les ouvrir (ce qui est un gain de temps).

On dénombre les larves présentant une anomalie sur un échantillon de 100 larves. Ce qui nous donne un pourcentage d'anomalie larvaire.



La larve D normale (dite de type a) couchée présente une charnière droite et deux valves régulières de même taille.
(photo D. Jougnot)

Il existe plusieurs sortes d'anomalies :



-la charnière concave (type b) : au lieu d'être droite, la charnière est incurvée vers l'intérieur de la larve
(photo D. Jougnot)



-une échancrure à la commissure des valves (type c) : une des deux valves présente une ou plusieurs échancrures
(photo DEL/PC-Arcachon)



-une des deux valves anormalement développée (type d) :
(photo DEL/PC-Arcachon)



-un velum qui ne se rétracte pas totalement quand la larve est fermée (type e) : La masse viscérale de la larve n'est pas entièrement contenue par la coquille, la larve est dite « baveuse ».
(photo D. Jougnot)



-les œufs fécondés non-développés (n'ayant pas atteint le stade véligère)
(photo D. Jougnot)



-les embryons monstrueux
(photo D. Jougnot)

4/Traitement des résultats

Une fois les résultats obtenus, on calcule la moyenne des cinq réplicats pour chacun des échantillons et des témoins.

Puis on mesure l'intervalle de confiance à 95% de ces résultats et on donne la moyenne à un seuil de sensibilité de 5%.

C'est à partir de cette moyenne qu'on va pouvoir interpréter les résultats des différents tests.

5/Interprétations

Tout d'abord, il faut vérifier la recevabilité du test.

Pour que le test soit recevable, il faut que le pourcentage d'anomalie larvaire dans les témoins soit inférieur à 20%. Ce seuil correspond au pourcentage « normal », s'il est dépassé, on est en droit de s'interroger sur la viabilité du lot de larves utilisé (mauvaise qualité des gamètes, de l'eau filtrée...).

Puis on compare les pourcentages des échantillons d'eau prélevés et les pourcentages des témoins.

Par souci de classification, nous utiliserons l'échelle mise au point par Edouard His :

-Différence d'anomalie larvaire avec le témoin non significative au seuil de 95% :

Milieu aquatique non pollué.

-Différence d'anomalie larvaire avec le témoin inférieur à 25% :

Milieu aquatique peu perturbé.

-Différence d'anomalie larvaire avec le témoin comprise entre 25 et 50% :

Milieu aquatique moyennement pollué.

-Différence d'anomalie larvaire avec le témoin comprise entre 50 et 75% :

Milieu aquatique très pollué.

-Différence d'anomalie larvaire avec le témoin supérieur à 75% :

Milieu aquatique massivement pollué.

IV- Résultats et commentaires

A- Résultats des différents tests

Je vais reprendre chacun des tests un par un afin de les interpréter séparément.

1/Test n°1

Les échantillons ont été prélevés le 25 avril 2002 aux 4 points de la zone d'étude : Montportail, Tannes, Brouage et Beaugeay.

Lieu de prélèvement	Montportail	Tannes	Brouage	Beaugeay
Température (en °C)	22,1	22	22	21,9
Salinité (en ‰)	0,2	7,5	31,6	4,1

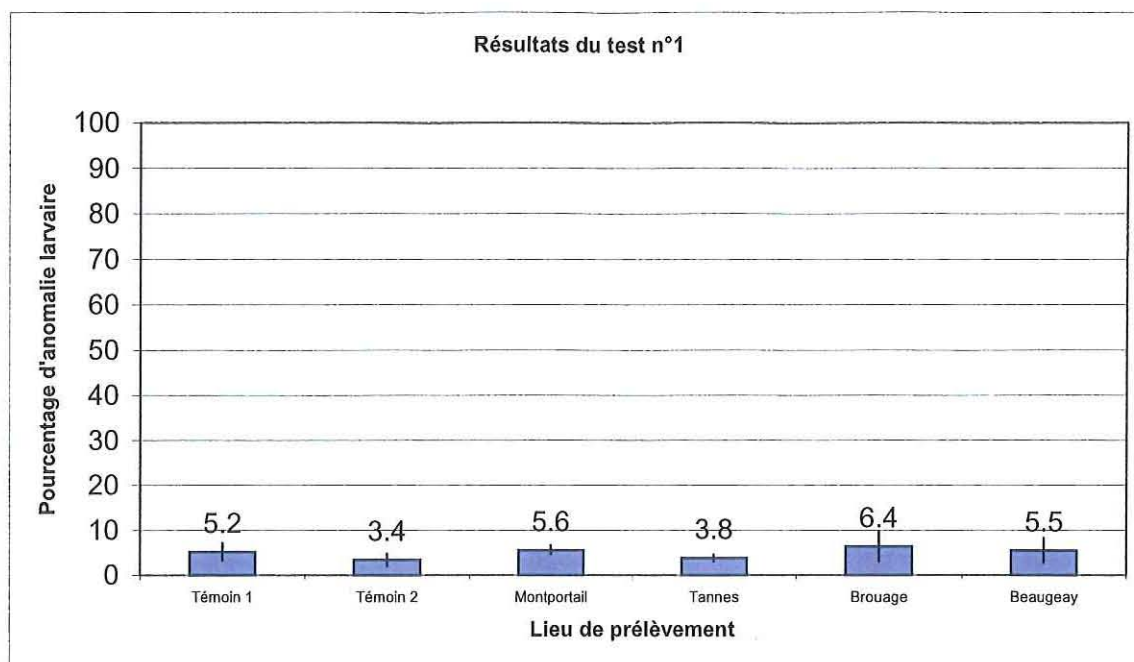
Résultats du test larves d'huitres n°1

25/04/2002

	A	B	C	D	E	Moyenne	I.C. à 95%	Moyenne+I.C.	Moyenne-I.C.
Témoin 1	9	5	4	4	4	5.2	1.90	7.10	3.30
Témoin 2	3	2	3	6	3	3.4	1.33	4.73	2.07
Montportail	4	5	6	6	7	5.6	1.00	6.60	4.60
Tannes	3	4	3	4	5	3.8	0.73	4.53	3.07
Brouage	4	10	3	11	4	6.4	3.31	9.71	3.09
Beaugeay		4	2	9	7	5.5	2.73	8.23	2.77

Le réplicat Beaugeay A est inexploitable car il a subi une erreur de manipulation ; on n'en tiendra donc pas compte pour le traitement des résultats.

On peut faire une représentation graphique de ces résultats.



On remarque qu'il n'y a pas de différence significative entre les témoins et les échantillons prélevés au seuil de 95%.

On peut donc dire qu'à cette date le milieu aquatique n'était pas pollué.

2/Test n°2

Les échantillons ont été prélevés le 3 mai 2002 aux 4 points de la zone d'étude : Montportail, Tannes, Brouage et Beaugeay.

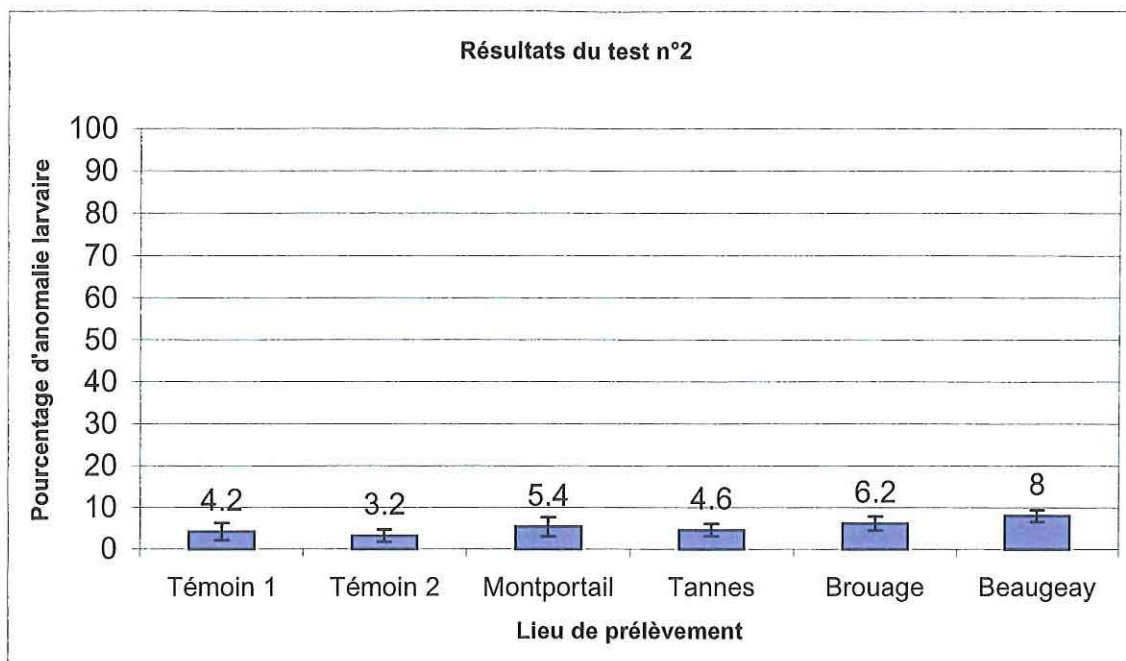
Lieu de prélèvement	Montportail	Tannes	Brouage	Beaugeay
Température (en °C)	14,1	13,8	13,3	15,0
Salinité (en ‰)	3,8	11,4	31,5	0,9

Résultats du test larves d'huitres n°2

03/05/2002

	A	B	C	D	E	Moyenne	I.C. à 95%	Moyenne+I.C.	Moyenne-I.C.
Témoin 1	2	8	3	3	5	4.2	2.09	6.29	2.11
Témoin 2	4	2	1	5	4	3.2	1.44	4.64	1.76
Montportail	7	3	5	3	9	5.4	2.29	7.69	3.11
Tannes	3	7	5	5	3	4.6	1.47	6.07	3.13
Brouage	7	7	8	6	3	6.2	1.69	7.89	4.51
Beaugeay	7	9	8	6	10	8	1.39	9.39	6.61

On peut faire une représentation graphique de ces résultats.



On remarque qu'il n'y a pas de différence significative entre les témoins et 3 des échantillons prélevés (Montportail, Tannes et Brouage) au seuil de 95%.

On peut donc dire qu'à cette date le milieu aquatique aux points Montportail, Tannes et Brouage n'était pas pollué.

Mais, l'échantillon Beaugeay présente une différence avec le témoin significative au seuil de 95% : le milieu aquatique y était peu perturbé.

Pour déterminer que l'échantillon de Beaugeay présente une différence significative à 95% avec le témoin, on utilise les intervalles de confiance calculés sous Excel :

si la moyenne de l'échantillon se situe hors de l'intervalle de confiance à 95% du témoins, alors la différence est significative.

3/Test n°3

Les échantillons ont été prélevés le 14 mai 2002 aux 4 points de la zone d'étude : Montportail, Tannes, Brouage et Beaugeay.

Lieu de prélèvement	Montportail	Tannes	Brouage	Beaugeay
Température (en °C)	15,6	16,1	15,2	16,7
Salinité (en ‰)	3,1	3,0	27,6	0,8

Résultats du test larves d'huitres n°3

15/05/2002

	A	B	C	D	E	Moyenne	I.C. à 95%	Moyenne+I.C.	Moyenne-I.C.
Témoin 1	67	89	93	47	54	70	17.98	87.98	52.02
Témoin 2	14	28	30	49	82	40.6	23.04	63.64	17.56
Montportail	38	12	85	74	94	60.6	30.25	90.85	30.35
Tannes	45	41	22	20	21	29.8	10.65	40.45	19.15
Brouage	79	90	94	52	70	77	14.77	91.77	62.23
Beaugeay	39	46	49	54	48	47.2	4.78	51.98	42.42

On remarque que les pourcentages d'anomalie larvaire des témoins sont supérieurs à 20% ; les tests sont donc inexploitable.

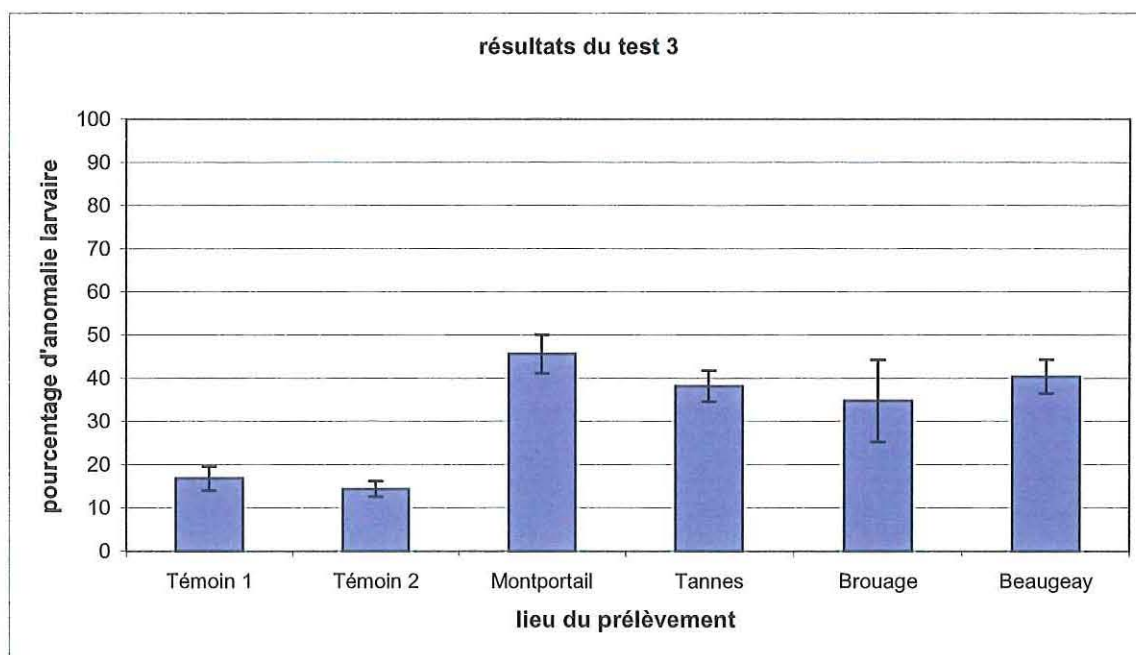
Les échantillons ont donc été conservés en chambre froide, puis ils ont été réutilisés lors du test n°4 la semaine suivante pour en déterminer le degré de pollution éventuelle. Les témoins sont donc ceux du test n°4.

Test refait lors du test n°4

23/05/2002

	A	B	C	D	E	Moyenne	I.C. à 95%	Moyenne+I.C.	Moyenne-I.C.
Témoin 1	19	17	20	12	16	16.8	2.73	19.53	14.07
Témoin 2	14	16	17	13	12	14.4	1.82	16.22	12.58
Montportail	45	53	48	40	42	45.6	4.50	50.10	41.10
Tannes	34	43	39	34	41	38.2	3.58	41.78	34.62
Brouage	43	47	35	29	20	34.8	9.49	44.29	25.31
Beaugeay	44	44	36	43	35	40.4	3.95	44.35	36.45

On peut faire une représentation graphique de ces résultats.



On remarque que les points Tannes, Brouage et Beaugeay présentent une différence avec le témoin significative mais inférieure à 25%.

A cette date, le milieu aquatique était peu perturbé en ces différents points.

Par contre, le point Montportail présente une différence d'anomalie larvaire avec le témoin supérieur à 25% mais inférieur à 50% : le point y était donc moyennement pollué.

4/Test n°4

Les échantillons ont été prélevés le 21 mai 2002 aux 4 points de la zone d'étude : Montportail, Tannes, Brouage et Beaugeay.

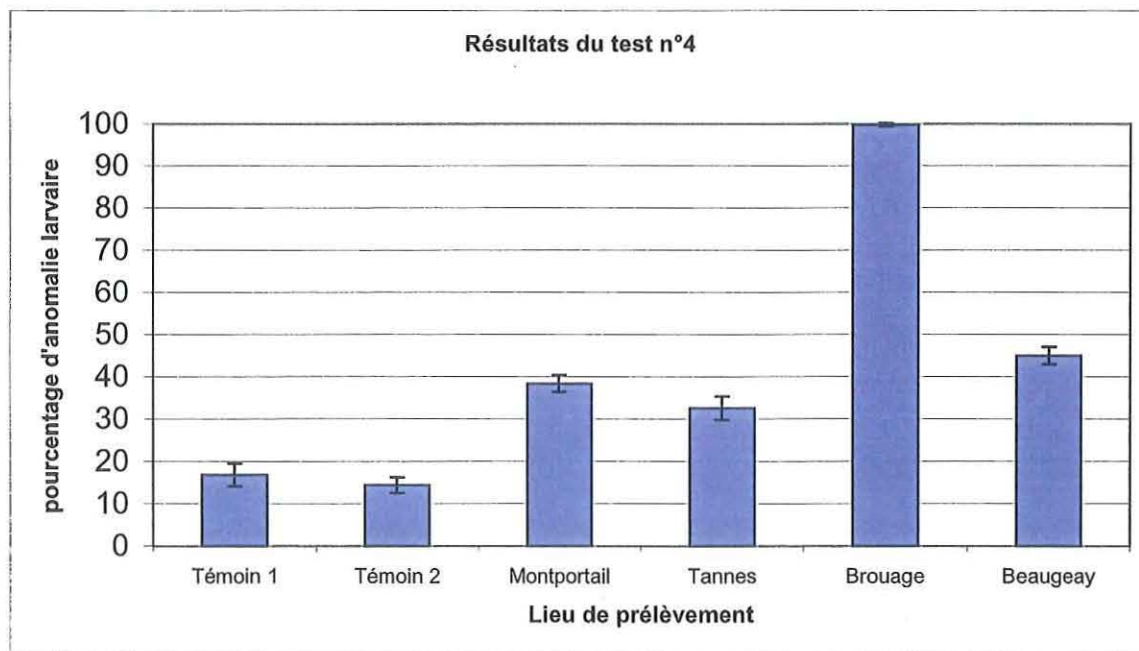
Lieu de prélèvement	Montportail	Tannes	Brouage	Beaugeay
Température (en °C)	18,4	18,6	18,0	19,3
Salinité (en ‰)	1,5	3,5	10,6	0,6

Résultats du test larves d'huitres n°4

21/05/2002

	A	B	C	D	E	Moyenne	I.C. à 95%	Moyenne+I.C.	Moyenne-I.C.
Témoin 1	19	17	20	12	16	16.8	2.73	19.53	14.07
Témoin 2	14	16	17	13	12	14.4	1.82	16.22	12.58
Montportail	36	38	39	42	37	38.4	2.02	40.42	36.38
Tannes	35	33	36	28	31	32.6	2.81	35.41	29.79
Brouage	99	100	100	100	100	99.8	0.39	100.19	99.41
Beaugeay	45	47	46	46	41	45	2.06	47.06	42.94

On peut faire une représentation graphique de ces résultats.



Les points Montportail et Tannes présentent une différence d'anomalie larvaire avec le témoin significative, mais inférieure à 25% : le milieu aquatique y était donc peu perturbé à cette date. Le point Beaugeay présente une différence avec le témoin comprise entre 25 et 50% : le milieu aquatique y était donc moyennement pollué. Mais le point de Brouage présente une différence supérieure à 75% : le milieu aquatique était donc massivement pollué le 21 mai 2002 au point de prélèvement de Brouage.

5/Test n°5

Les échantillons ont été prélevés le 28 mai 2002 aux 4 points de la zone d'étude : Montportail, Tannes, Brouage et Beaugeay.

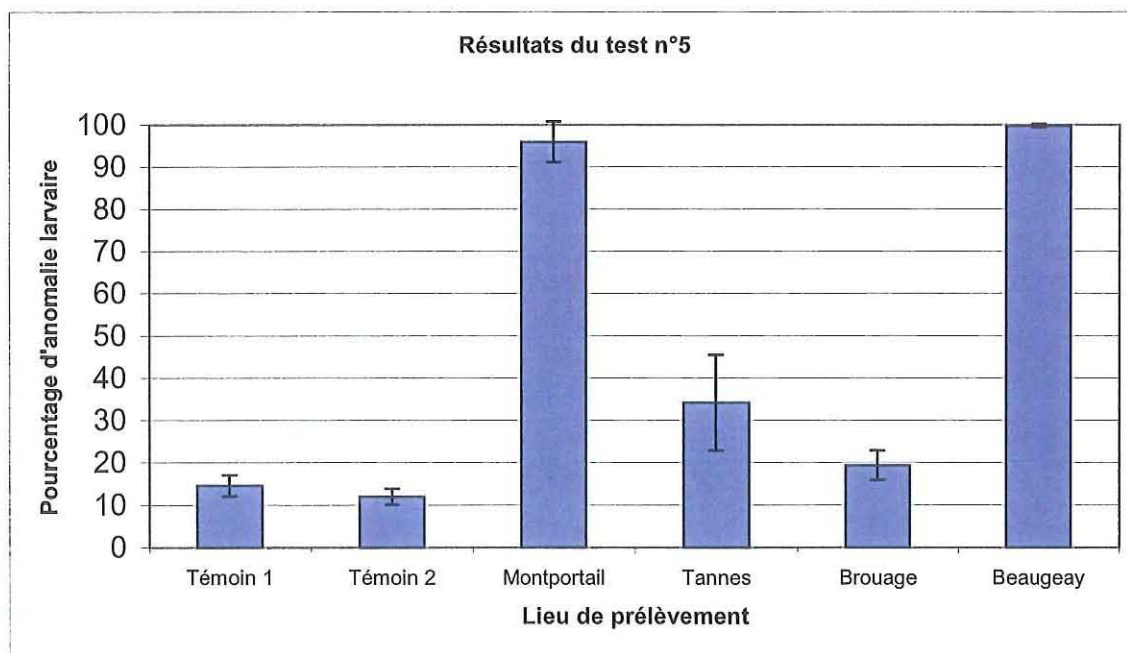
Lieu de prélèvement	Montportail	Tannes	Brouage	Beaugeay
Température (en °C)	15,5	16,1	15,5	16,8
Salinité (en ‰)	1,6	8,6	33,2	1,9

Résultats du test larves d'huitres n°5

29/05/2002

	A	B	C	D	E	Moyenne	I.C. à 95%	Moyenne+I.C.	Moyenne-I.C.
Témoin 1	18	14	17	13	11	14.6	2.53	17.13	12.07
Témoin 2	9	12	15	12	12	12	1.86	13.86	10.14
Montportail	91	89	100	100	100	96	4.84	100.84	91.16
Tannes	34	29	22	56	30	34.2	11.33	45.53	22.87
Brouage	16	26	20	18	17	19.4	3.48	22.88	15.92
Beaugeay	99	100	100	100	100	99.8	0.39	100.19	99.41

On peut faire une représentation graphique de ces résultats.

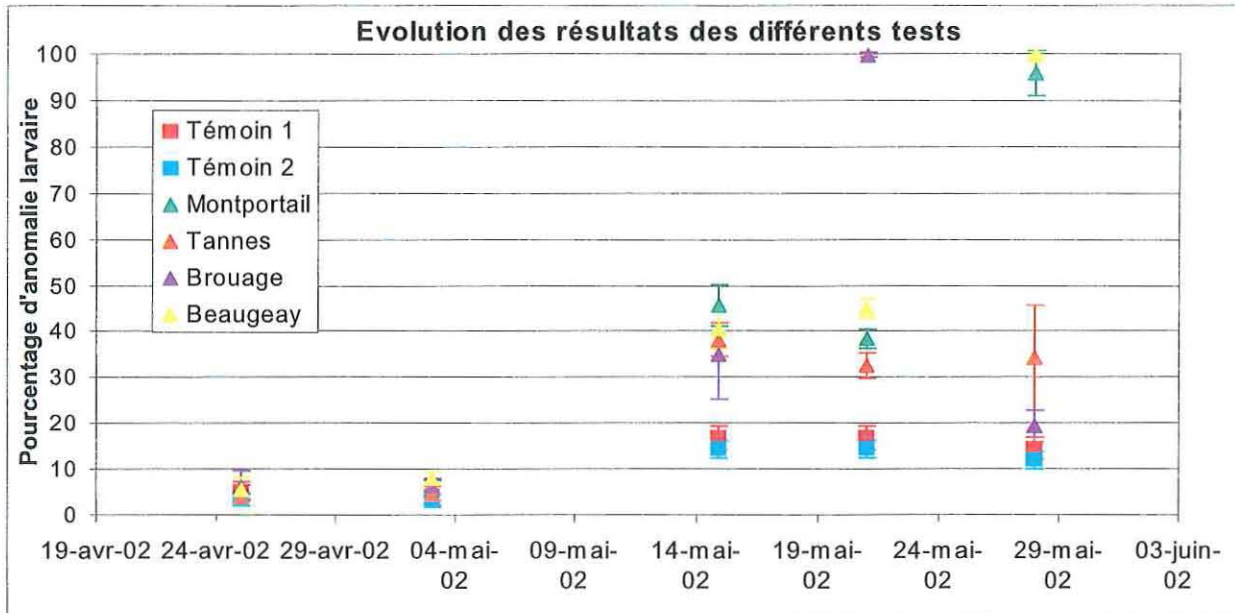


Les points Tannes et Brouage présentent une différence d'anomalie larvaire significative avec le témoin, mais inférieure à 25% : le milieu aquatique y était donc peu perturbé à cette date. Les points Montportail et Beaugeay présentent une différence avec le témoin supérieure à 75% : le milieu aquatique était donc massivement pollué le 21 mai 2002 au point de prélèvement de Montportail et de Brouage.

B- Discussion

1/Comparaison des différents tests

On peut représenter graphiquement l'évolution des différents résultats au cours de cette campagne de tests :



Cette représentation graphique met en évidence la dispersion des résultats obtenus.

Les témoins varient de la même façon pour chaque test : ce qui s'explique par le fait qu'ils contiennent la même eau (eau de mer filtrée à 2 μ m) et que les larves qui y sont proviennent de la même population.

On remarque néanmoins une évolution de leur pourcentage d'anomalie larvaire entre les deux premiers et les trois derniers tests. Cette variation peut s'expliquer par l'utilisation d'un autre lot de géniteurs pour les trois derniers tests (le lot utilisé au début étant épuisé).

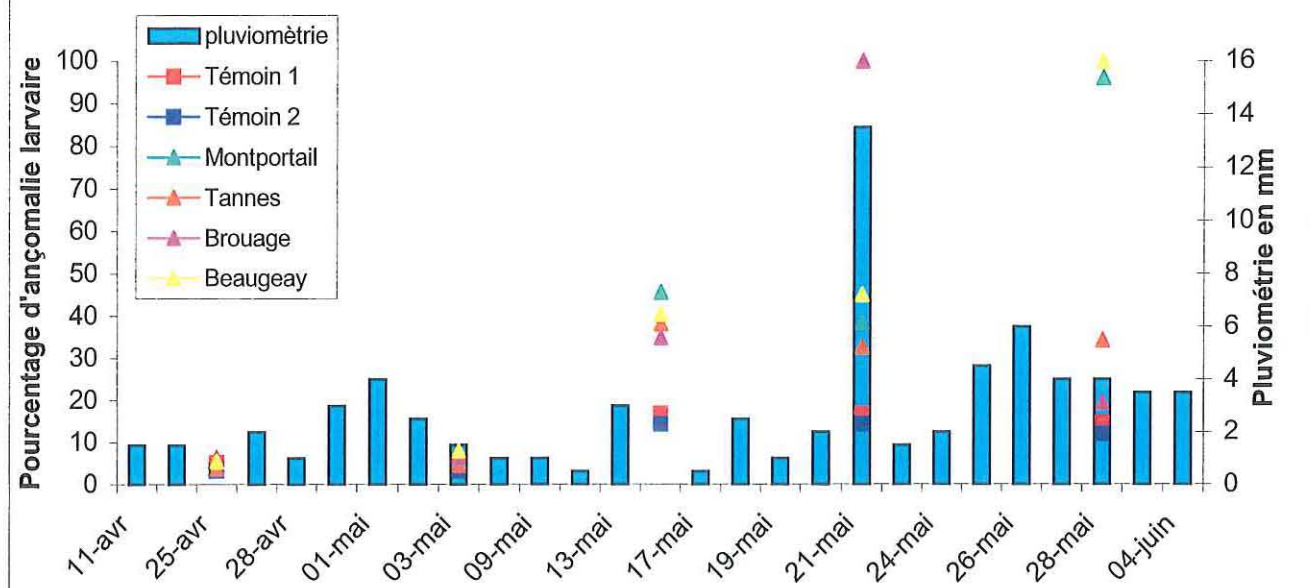
Les échantillons varient de façon plus aléatoire au cours des différents tests. Pour tenter d'expliquer ses variations, on va étudier le facteur pluviométrie.

2/Comparaison de la pluviométrie et des résultats des tests

L'eau étudiée par les tests est une eau de rejet des zones agricoles, il est donc possible que la pluviométrie ait une influence sur la qualité de ces eaux.

On va donc étudier l'évolution conjointe de la pluviométrie et des résultats obtenus lors des tests et la représenter graphiquement.

Comparaison de la pluviométrie et résultats des tests



(données pluviométriques de l'INRA de St Laurent de la Prée)

L'eau que l'on teste est une eau qui provient à la fois des eaux qui transitent dans le marais et des eaux de pluie qui ont percolé à travers les terres cultivées (et qui pourrait ainsi être chargées de pesticides).

La pluviométrie sur cette période peut se diviser en trois ensembles.

Du 11 avril au 20 mai, la pluviométrie est en moyenne de 0.71 mm par jour.

Les deux premiers tests (le 25 avril et le 3 mai) mettent en évidence une eau pas polluée (sauf un point peu perturbé).

Mais lors du troisième test, on voit une faible perturbation du milieu aquatique pour trois des points et une pollution moyenne pour le quatrième.

Le 21 mai, la pluviométrie est très importante (13,5 mm) et le test n°4 révèle :

- un point peu perturbé (Tannes)
- deux points moyennement pollués (Montportail et Beaugeay)
- un point massivement pollué (le chenal ostréicole de Brouage)

Puis la pluviométrie devient plus importante du 22 au 28 mai (2,7 mm par jour en moyenne) et le test n°5 révèle :

- deux points peu perturbés (Tannes et Brouage)
- deux points massivement pollués (Montportail et Beaugeay)

On peut penser que la pluviométrie a une influence sur la qualité des eaux. : plus la pluviométrie est importante, plus l'on retrouve des eaux de mauvaise qualité. Ce qui pourrait signifier que les eaux qui percolent à travers les terres cultivées se chargent en matières actives, qui sont ensuite rejetées par les drains des zones agricoles.

Cependant, la pluviométrie ne doit pas être le seul facteur qui rentre en jeu dans la qualité du milieu. Le troisième test présente des résultats qui ne sont pas liés à la pluviométrie. Ils

peuvent peut-être s'expliquer par des épandages aériens, ou par l'accumulation dans les différents points d'eaux de ruissellement.

Pour s'en assurer, il faudrait effectuer un suivi analytique et d'autres types de test écotoxicologiques. Malheureusement, Le laboratoire de l'IFREMER/DEL de La Tremblade n'a pas encore obtenu de financement.

3/Bilan des tests

L'objectif de ces tests est de déterminer si la qualité des eaux de rejets des zones agricoles peut être dommageable pour la conchyliculture.

A la lecture des résultats des différents tests, on remarque que la qualité des eaux de rejet agricole est variable dans l'espace et le temps.

On trouve des pics de pollution surtout après des périodes de forte pluviométrie. La qualité de l'eau lors de ces pics est très mauvaise et ces eaux sont donc susceptibles d'avoir un effet néfaste sur les zones de conchylicultures voisines.

Ce test est imparfait car il ne permet que de constater une mauvaise qualité des eaux sans pouvoir en définir la cause. Néanmoins, ce test montre la nécessité d'effectuer une étude plus approfondie.

Cette étude reprendrait les tests larves d'huître et les mettrait en relation avec des méthodes d'analyse chimiques poussées.

Ces analyses des eaux devraient permettre de définir l'origine de la pollution et ainsi de vérifier notre hypothèse sur la participation des produits phytosanitaires épandus.

C- Remarques

Le test larve de Bivalve n'est pas limité à l'étude du problème agro-conchylicole, il est très facilement adaptable.

Tout d'abord, il peut se faire avec divers organismes (les moules, les oursins) suivant les critères de pollution à déceler et l'impact supposé de ces pollutions.

Puis, il peut s'appliquer à différents échantillons à analyser, diverses études ont déjà été effectuées :

- sur la qualité biologique des eaux de mer
- sur la qualité biologique de sédiments littoraux (mais dans ce cas, une préparation des sédiments est nécessaire)
- sur l'efficacité de produits phytosanitaires ou autres produits chimiques (j'ai testé l'efficacité et la dégradation d'un produit visant à traiter les eaux de ballasts de navires en parallèle avec mes manipulations sur les eaux de rejets agricoles)

Ce test écotoxicologique offre un intérêt évident pour effectuer des études préliminaires ou de routine sur la qualité biologique de milieux ou de produits. Il est peu onéreux et peut s'effectuer rapidement et avec un matériel limité (voir liste du matériel en Annexe III). Le facteur limitant est l'obtention de géniteurs matures ; il est néanmoins possible d'en acheter et à n'importe quel moment de l'année dans des éclosiers spécialisés.

CONCLUSION

Au cours de mon stage à l'IFREMER, je n'ai eu le temps d'étudier qu'une petite partie des possibilités de ce test écotoxicologique qui peut être fait sur d'autres bivalves mais aussi à partir d'autres échantillons.

Certains des résultats obtenus au cours de la campagne de prélèvements ont révélé des eaux de mauvaise qualité biologique. Cette qualité est variable selon les points et les dates de prélèvement. Elle peut toutefois être dommageable pour la conchyliculture située à proximité des zones cultivées. Il serait donc nécessaire d'obtenir des financements pour réaliser des études plus approfondies et ainsi vérifier la part de responsabilité des épandages de produits phytosanitaires sur les zones agricoles littorales de la région. Si cette responsabilité s'avérait importante, il faudrait réfléchir à une gestion plus raisonnée des traitements phytosanitaires dans le bassin versant de ce marais.

L'étude et l'application de ce test à la problématique agro-conchylicole ont été une très bonne formation à l'écotoxicologie appliquée : faisant appel à de nombreux savoirs théorique vus, au moins en partie, en cours et à des applications concrètes et techniques faisant appel à des méthodes de prélèvements et de manipulations utilisables pour d'autres applications dans le domaine de l'écotoxicologie.

Ce stage m'a beaucoup apporté sur le plan de l'organisation et de la réalisation du travail de technicien. L'on ne peut que souhaiter que l'IFREMER obtienne rapidement les financements escomptés pour permettre l'arbitrage du conflit entre agriculteurs et conchyliculteurs, et pour préserver la richesse que constitue le bassin conchylicole de Marennes-Oléron.

Bibliographie

His Edouard et Robert René, Utilisation des élevages larvaires de *Crassostrea gigas* en écotoxicologie marine, 1986, édition IFREMER

Masson Daniel et Chevalier Claude, Agriculture, conchyliculture et circulation des eaux de surface en Charente-Maritime Aqua revue n°21, octobre-novembre 1988, édition Aqua Presse

Masson Daniel, Gestion de l'eau douce et conchyliculture en Charente-Maritime Equinoxe n°51, août-septembre 1994, édition IFREMER

Migaud Cédric, Surveillance de l'environnement littoral par une méthode biologique à l'aide des embryons et des larves de *Crassostrea gigas*, septembre 1994, édition IFREMER

His Edouard et Cantin Christian, Biologie et physiologie des coquillages, juin 1995, éditions IFREMER

Mazoyer Valérie, Classification des risques phytosanitaires pour la conchyliculture du littoral charentais, juillet 1998, éditions IFREMER et INRA

Masson Daniel, Edouard His, Dubernet Jean-françois et Scribe Pierre, Produits phytosanitaires et conchyliculture en Charente Maritime, octobre 2000, édition IFREMER

Lexique

Blastula :

Stade du développement de l'embryon, qui se présente sous la forme d'une sphère à paroi épithéliale (se situ entre le stade Morula et le stade Gastrula)

Conchyliculture :

Culture des coquillages

Chevelu :

Ancien réseau de drainage dense (500m par hectare)

Embryotoxicité :

Toxicité effective sur un embryon

Gastrula :

Stade du développement embryonnaire où l'un des deux pôles de la Blastula s'invagine

Morula :

Premier stade du développement de l'embryon, il se présente sous la forme d'une sphère dont la surface à l'aspect d'une mûre

Protandrie :

Pour une population, c'est le fait de comporter plus de mâle que de femelles

Annexes

I- Principales périodes d'application des substances actives :

II- Liste du matériel nécessaire à la réalisation d'un test larve d'huître :

III- Calcul de concentration en œufs :

IV- La sécurité à l'IFREMER

I- Principales périodes d'application des substances actives

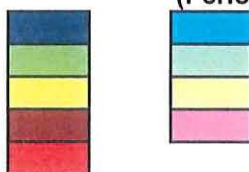
(Travail effectué par Valérie Mazoyer en 1998)

LISTE DES SUBSTANCES ACTIVES	jan	février	mars	avril	mai	juin	juillet	août	sept	oct	nov	déc
Aclonifen												
Alachlore												
Aminotriazole												
Arsenic de l'arsenite de sodium												
Atrazine												
Bacillus Thuringiensis serotype 3												
Bentazone												
Bifenox												
Bromoxynil (toutes formes)												
Captane												
Carbendazime												
Carbetamide												
Carbofuran												
Chlorate de sodium												
Chlormequat chlorure												
Chlorothalonil												
Chlorotoluron												
Cuivre												
Cyproconazole												
2,4-D (sels)												
1,3- Dichloropropene												
Dichloroprop P												
Dicofol												
Diflufenicanil												
Dimethomorphe												
Dinocap												
Diuron												
Epoxiconazole												
Fenbutatin oxyde												
Fenpropimorphe												
Flurochloridone												
Flusilazole												
Folpel												
Fosetyl aluminium												
Glyphosate												
Hexaconazole												
Huiles minérales												
Imazamethabenz												
Ioxynil (ester,sel)												
Isoproturon												
Lindane												
Linuron												
Mancozebe												
Manebe												
2,4-MCPA (sels)												

LISTE DES SUBSTANCES ACTIVES	jan	février	mars	avril	mai	juin	juillet	août	sept	oct	nov	déc
Mecoprop (toutes formes)												
Mecoprop P												
Metaldehyde												
Metazachlore												
Metolachlore												
Neburon												
Nicosulfuron												
Oryzalin												
Paraquat												
Pendimethaline												
Polyoxyethylene amine												
Prochloraze												
Propargite												
Pyridate												
Pyrimethanil												
Pyrimicarbe												
Simazine												
Soufre												
Soufre micronisé												
Soufre sublime												
Sulfate de fer												
Sulfosate												
Tebuconazole												
Tebutame												
Terbutylazine												
Thiocyanate d'ammonium												
Trifluraline												

(Période d'épandage inconnue)

Divers
Herbicide
Fongicide
Insecticide
Nématicide



II- Liste du matériel nécessaire à la réalisation d'un test larve d'huître

Nomenclature	Fonction	Quantité
Flacon de verre brun stérile (1L)	Echantillonnage	1 par point de prélèvement (4)
Bécher de verre stérile (1L)	Préparation des échantillons	1 par échantillon (4)
	Isolation des géniteurs	1 par géniteur (6 suffisent)
Eprouvette graduée stérile (1L)	Lieu de la fécondation	1
Eprouvette graduée stérile (250mL)	Calcul de concentration en œufs	1
Pipette graduée stérile (20mL)	Remplissage des acuvettes	1
Pipette graduée stérile (10mL)	Prélèvement des gamètes mâles	1
Micro Pipette (et cônes stériles)	Ensemencement des acuvette	1
	Fixation au lugol-formol	
Tamis (100µm)	Filtration des gamètes femelle	1
Tamis (32µm)	Filtration des gamètes mâles	1
Acuvette en polyéthylène (25mL)	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 par demi-douzaine d'huître (2)
Thermo-salinomètre	Mesure de température et de salinité	1
Microscope inversé Utermöl	Lecture des gamètes	1
	Lecture des larves fixées	
Eau de mer filtrée à 2µm	A 18 et 28°C pour les chocs thermiques Pour les témoins	30L environ
Solution de Lugol-Formol	Fixation des larves	500µL par acuvette
Huître creuses du japon matures	Géniteurs des larves	Une douzaine

III- Calcul de concentration en œufs

Ce calcul est réalisé durant la manipulation pour déterminer le volume de la suspension d'œufs à déposer dans chacune des acuvettes.

Par soucis de clarté, j'utiliserais comme exemple le calcul que nous avons effectué lors du test n°4 :

-Calcul de la concentration en œufs de la suspension mère :

On a réalisé la fécondation dans l'éprouvette graduée de 1 L (suspension mère) et on désire en connaître la concentration en œufs pour avoir 600 œufs par acuvette.

Pour cela on prélève 10 mL de la suspension mère qu'on place dans une éprouvette graduée de 250 mL et on ajuste avec de l'eau de mer filtrée à 2 μm : On obtient une suspension fille. Puis, tout en homogénéisant la suspension à l'aide d'agitateur, on prélève quatre fois 0,1 mL dans des lames creuses.

Puis on dénombre les œufs qui s'y trouvent.

On trouve respectivement dans les 4 lames creuses : 53, 50, 50 et 54 œufs.

On fait la moyenne du nombre d'œufs contenue dans 0,1 mL de la suspension fille.

Ce qui fait une moyenne de 52 œufs environ par 0,1 mL, d'où une concentration de 520 œufs par mL dans la suspension fille.

On en déduit que la suspension fille contient :

$$250 \times 520 = 130\,000 \text{ œufs dans l'ensemble de la suspension fille de 250 mL}$$

Or ces œufs proviennent des 10mL prélevées de la suspension mère, on peut en déduire la concentration de suspension mère :

$$130\,000 / 10 = 13\,000 \text{ œufs par mL}$$

-Calcul du volume à déposer par acuvette :

On sait que la suspension mère est concentrée à 13 000 œufs par mL et il faut 600 œufs par acuvette, on va donc déposer :

$$600 / 13\,000 = 0,0461 \text{ mL soit } 46 \mu\text{L par acuvette à l'aide d'une micropipette.}$$

IV- La sécurité à l'IFREMER

L'IFREMER présente des activités très diversifiées, et donc des risques multiples.
Pour simplifier, je restreindrais cette présentation aux risques de la station de La Tremblade.
Responsable sécurité à l'IFREMER : Philippe LE BRAS
Responsable sécurité à la station : Pascal PHELIPOT

Les principaux risques dans la station sont encore très nombreux, mais des mesures de prévention sont appliquées

- l'incendie :
 - des extincteurs et des consignes « en cas d'incendie » sont disposés dans toute la station
- les produits chimiques et toxiques :
 - présents en quantité raisonnable, ils sont étiquetés (symboles explicites, précautions d'usage, de stockage) et stockés à l'écart de la station dans une cabane qui leur est réservée
 - leur manipulation se fait avec des protections individuelles adaptées et avec une hygiène soignée
- les installations électriques :
 - elles sont protégées et régulièrement vérifiées par une entreprise extérieure spécialisée
 - les salles où la manipulation massive d'eau est nécessaire, les installations sont situées à l'extérieur
 - seul les personnes habilitées peuvent intervenir sur les installations
- le travail en laboratoire :
 - il se fait suivant des protocoles établis et les protections qu'il nécessite (port de la blouse, propipettes, ...)
- les sorties de prélèvements en bateau :
 - il existe de nombreuses règles de sécurité spécifiques au bateau et à la plongée qui sont précisés dans différents manuels à disposition à l'IFREMER

A mon arrivée à l'IFREMER, on a mis à ma disposition les principales informations concernant la sécurité par le biais de l'intranet où elles sont accessibles à tous.

L'activité que j'ai menée ne présentait pas tous ces risques :

- les prélèvements d'eau auxquels j'ai participé se sont fait en voiture et à deux personnes au bord des points
- La préparation des huîtres pour le test (manipulation d'un couteau à huître) s'est fait avec des protections individuelles adaptées (gant de sécurité épais, tablier) et suivant une méthode particulière
- Le travail en laboratoire et la manipulation de produits toxique s'est déroulé avec les équipement de protection individuelle adapté (une blouse 100% coton, des gants en latex) et suivant un protocole établi
- La lecture des tests s'est faite de façon sécurisée sur un microscope après avoir réglé tous les paramètres (luminosité, écartement des oculaires)

Je pense que la sécurité concernant ma manipulation est suffisamment développée. Elle comprend très peu de manipulations dangereuses, et celle qui pourraient l'être sont protégées.