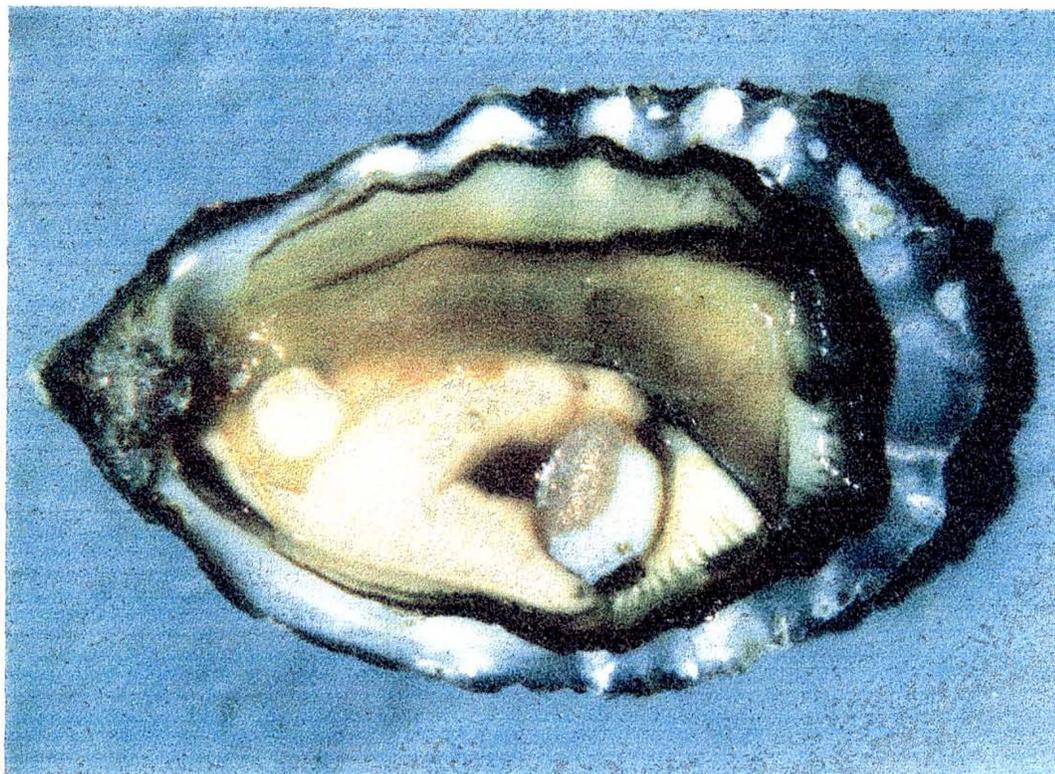


L.E.G.T.A de Melle (Deux-Sèvres)
BREVET TECHNICIEN SUPERIEUR EN AGRICULTURE
Analyses Agricoles Biologiques et Biotechnologies

**SURVEILLANCE DE L'ENVIRONNEMENT LITTORAL PAR UNE
METHODE BIOLOGIQUE A L'AIDE DES EMBRYONS ET DES
LARVES DE *Crassostrea gigas***

par Cédric MIGAUD



Maître de stage : Mr E. His Docteur ès sciences

du 14 Juin au 2 Septembre 1993
et du 10 Juillet au 2 Septembre 1994



SOMMAIRE

AVANT PROPOS.....	1
RESUME.....	2
ABSTRACT.....	3
PRESENTATION IFREMER.....	4
I - Sur le plan national.....	4
II - Station d'Arcachon.....	5
1 - Missions du laboratoire côtier d'Arcachon.....	5
1 - 1 Observatoire du littoral.....	5
1 - 2 Soutien à la conchyliculture.....	5
1 - 3 Pôle de compétence.....	5
1 - 4 Ecotoxicologie des larves de Bivalves.....	6
2 - Organisation et fonctionnement.....	6
2 - 1 Limites territoriales d'intervention et implantation géographique.....	6
2 - 2 Organisme simplifié.....	6
2 - 3 Moyens humains.....	7
2 - 4 Equipements.....	7
II - Typographie.....	8
1 - Situation géographique.....	8
2 - L'ostréiculture.....	8

INTRODUCTION	11
---------------------------	-----------

PREMIERE PARTIE

RAPPELS CONCERNANT LA REPRODUCTION DES HUITRES

(<i>Crassostrea gigas</i>)	15
-----------------------------------------	-----------

I - Sexualité.....	15
--------------------	----

II - Maturation des huîtres et phase instable.....	15
----------------------------------------------------	----

1 - Anatomie de l'appareil génital.....	15
-----------------------------------------	----

2 - Evolution de la gonade.....	16
---------------------------------	----

3 - Maturation dans le milieu naturel.....	17
--------------------------------------------	----

3.1 - Facteurs externes.....	17
------------------------------	----

3.2 - Facteurs internes.....	18
------------------------------	----

4 - Maturation en milieu contrôlé ou "conditionnement".....	18
-------------------------------------------------------------	----

III - Le frai.....	18
--------------------	----

1 - Emission des spermatozoïdes.....	19
--------------------------------------	----

2 - La ponte.....	19
-------------------	----

IV - La fécondation.....	20
--------------------------	----

V - La phase embryonnaire.....	20
--------------------------------	----

VI - La phase larvaire.....	21
-----------------------------	----

1 - La trochophore.....	21
-------------------------	----

2 - La véligère.....	21
----------------------	----

MATERIELS ET METHODE	25
-----------------------------------	-----------

I - "Microméthode" en acuvettes.....	25
--------------------------------------	----

1 - Description.....	25
----------------------	----

2 - Lecture des acuvettes.....	26
--------------------------------	----

I - Préparation du matériel biologique	26
1 - Le déclenchement des pontes, et des spermations.....	26
2 - Fécondations	28

SECONDE PARTIE

ETUDE EXPERIMENTALE SUR L'EAU DE MER DE SYNTHESE.....30

I - Matériels et méthodes	30
1 - L'eau de mer	30
2 - L'eau de mer de synthèse.....	31
II - Résultats et interprétation.....	32

TROISIEME PARTIE

QUALITE BIOLOGIQUE DE L'EAU DE LA BAIE DE LA ROCHELLE34

I - Qualité biologique des eaux douces.....	34
II - Les eaux du bassin conchylicole de La Rochelle.....	34
III - Résultats et interprétation.....	36

QUATRIEME PARTIE

ETUDE DE LA QUALITE BIOLOGIQUE DE SEDIMENTS MEDITERRANEENS....39

I - Préparation des sédiments	39
II -Lieux de prélèvements	40
III - Résultats et interprétation.....	41

CONCLUSION.....43

BIBLIOGRAPHIE 44

LEXIQUE 46

«L'IFREMER a pour mission de conduire et de promouvoir des recherches fondamentales et appliquées, et des actions de développement technologique et industriel destinées à connaître, évaluer et mettre en valeur les ressources des océans et à rationaliser leur exploitation, à améliorer la connaissance et les méthodes de protection et de mise en valeur de l'environnement marin et à favoriser le développement socio-économique du monde maritime.»

AVANT-PROPOS

Le travail présenté dans ce mémoire a été effectué au laboratoire de la Direction et de l'Aménagement du Littoral et d'Ecotoxicologie (DEL/EX) de la station IFREMER d'Arcachon, ainsi que la station IFREMER de la Tremblade. Je tiens à remercier mon maître de stage, le Docteur Edouard His (station Arcachon), responsable du laboratoire pour son accueil, la grande patience et la disponibilité dont il a fait preuve à mon égard au cours de ces 2 stages.

Je remercie également Mr Masson, pour ses conseils, ainsi que la station de la Tremblade, je leur exprime ma gratitude pour leurs conseils.

Enfin, je témoigne toute ma reconnaissance à Mme Françoise Samson, qui a bien voulu m'aider pour la réalisation de mon mémoire.

RESUME

L'étude consignée dans ce mémoire porte sur l'évaluation de la qualité biologique d'une eau de mer de synthèse, des eaux du bassin de La Rochelle et de sédiments marins pollués.

Pour cela, une méthode simplifiée mise au point au laboratoire d'Ecotoxicologie de la station IFREMER Arcachon 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 dans l'échantillon à étudier.

L'étude de la qualité de l'eau de mer de synthèse a permis de montrer qu'elle peut être utilisée pour la réalisation des tests d'écotoxicologie marine.

L'étude de la qualité biologique des eaux de la baie de La Rochelle donne des résultats alarmants : toutes les eaux douces testées se déversant dans la baie sont très polluées. Cette pollution n'est pas ressentie dans la partie centrale de la baie mais une surveillance régulière devrait avoir lieu, ce site étant un endroit privilégié pour la production des coquillages.

L'étude de la qualité biologique des sédiments littoraux méditerranéens a permis de mettre en évidence que les sédiments prélevés sont pour la plupart non toxiques : seul 5 sédiments sur 20 exercent une action et sur ces 5 sédiments, 1 seul est très pollué et devrait faire l'objet d'études plus approfondies.

ABSTRACT

The study recaded in this memorandum concerns the assessment on the biological quality of a synthetised water, of La Rochelle's water pod and the polluted sediments of the sea.

For that reason, a simplified method perfected by the ecotoxicology laboratory of the Arcachon IFREMER resort has been applied. This work is based on the percentage of the *Crassostrea gigas* oysters larvae anomalies, which are developed in the studied sample.

The study of the synthetised sea water quality is allowed to show that it may be used for the work on marine ecotoxicology's tests.

The study on the biological quality of the waters of La Rochelle's bay shows alarming results : all the freshwaters tested, which flow into the bay, are polluted. The pollution effects are still undetected in the central part of the bay but a regular survey should take place, this site being a privileged place for the shellfish production.

The study on the biological quality of the mediterranean seaboards sediments led to the conclusion that most of the taken sediments are not toxic : five samples on the twenty have an action, one of them only, very polluted, shoud support further studies.

PRESENTATION DE L'IFREMER

I - 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) issu de la fusion du Centre National pour l'Exploitation des Océans (CNEXO) et de l'Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes (ISTPM). Son décret constitutif (n° 84428 du 5 juin 1984) le place sous la tutelle du Ministère chargé de la Recherche et le Ministère chargé de la Mer.

Il dispose d'un budget d'environ 940 millions de francs qui provient en majeure partie de la subvention que lui verse l'Etat et à laquelle s'ajoutent des ressources propres que son statut d'EPIC lui permet de développer, leur évolution constitue chaque année une priorité de l'établissement.

1200 ingénieurs, chercheurs, techniciens et administratifs participent aux multiples missions de l'IFREMER. Ces personnes travaillent, outre le siège social à Issy-les-Moulineaux, dans 5 centres (Boulogne, Nantes, Brest, Toulon, Tahiti), 5 délégations outre-mer, 15 stations et plusieurs postes isolés repartis le long du littoral français.

A ce groupe de 1200 personnes, il faut ajouter environ 600 personnes qui travaillent dans des filiales pour valoriser la politique de recherche de l'institut notamment auprès des professionnels de la mer, et gérer les moyens de la flotte océanographique. Ce personnel a en commun de travailler exclusivement dans le domaine marin pour accomplir des missions essentielles :

- Il mène des recherches à caractère fondamentale (le plus souvent en collaboration avec les universitaires et les chercheurs des organismes public) dans des disciplines aussi variées que les géosciences, la microbiologie, l'halieutique, la chimie, la toxicologie, l'océanographie physiques, la biologie des organismes marins, etc.

- Il réalise des travaux dans les technologies de base (acoustique, hydrodynamique, matériaux, etc.) nécessaires à sa mission. Il effectue des développements technologiques pour ses besoins propres ou pour le compte de la communauté scientifique et industrielle. Le but de ceci est de promouvoir des techniques nouvelles dans les industries de la mer : robots, chaluts, engin sous-marins, capteurs, images acoustiques, etc.

- Il assure le suivi des ressources halieutiques (de pêches) et aquacoles, il établit un diagnostic de l'état des principaux stocks exploitables par les flottes de la pêche française. Il contrôle la qualité du milieu et des cheptels pour l'activité aquacole, il contribue à la protection de l'environnement littoral grâce à trois réseaux de surveillance et enfin met au point des techniques d'élevages et de culture d'animaux et de végétaux marins.

- Il a la charge de la construction, de la programmation et de la mise en oeuvre de la flotte océanographique : 8 navires de recherche hauturiers (dont L'Atalante) et côtiers, 2 submersibles (dont le Nautille -6000m) et de nombreux équipements pour l'intervention par grands fonds ou sur le plateau continental.

II - Station d'Arcachon :

1 - Missions du laboratoire côtier d'Arcachon :

1 - 1 Observatoire du littoral :

- Réseaux de surveillance,
- études de salubrité de zones particulières,
- avis aux Administrations, Collectivité territoriales, Professions maritimes.

1 - 2 Soutien à la conchyliculture :

Chaque été, le laboratoire effectue un suivi de la reproduction et des émissions larvaires. De plus, en l'absence de laboratoire DRV (Direction des Ressources Vivantes), le laboratoire DEL/AR (Direction de l'Environnement Littoral / Arcachon) est appelé à mener des actions diverses de soutien à la conchyliculture (filères mytilicoles, mortalités anormales, suivi de l'élevage).

1 - 3 Pole de compétence : étude intégrée du Bassin d'Arcachon :

Le laboratoire rassemble, analyse, synthétise et met en relation les données caractérisant les évolutions simultanées du milieu et des activités économiques ainsi que leurs interactions.

Il met en application ses résultats dans l'élaboration du Schéma de Mise en Valeur de la Mer.

1 - 4 Ecotoxicologie des larves de Bivalves :

Les travaux du laboratoire permettent d'évaluer la toxicité potentielle d'un altéragène sur le milieu principalement à l'aide d'embryons et de larves de Bivalves d'intérêt commercial (Huîtres, Moules) ex : TBT (tributylétain) sur le Bassin d'Arcachon (His.).

2 - Organisation et fonctionnement :

2 - 1 Limites territoriales d'intervention et implantation géographique :

Le territoire d'intervention comprend le littoral aquitain, de la Pointe de Grave jusqu'à la frontière espagnole, trois départements littoraux sont ainsi surveillés:

- la Gironde avec l'estuaire, la rive gauche de la Gironde, et Le Bassin d'Arcachon où est implanté le laboratoire,
- les Landes avec le site de Hossegor, Cap-Breton,
- les Pyrénées Atlantique avec les trois estuaires de l'Adour, la Nivelle et le Bidassoa.

2 - 2 Organisme simplifié :

En ce qui concerne le laboratoire côtier de la DEL :

- Dépendance hiérarchique directe de la DEL/D
- Dépendance thématique de trois services de la DEL: AA (Avis Aménagement), QR (Qualité des Ressources), et QM (Qualité Milieu).

2 - 3 Moyens humains :

Le personnel de la station d'Arcachon se compose de 18 personnes placées sous l'autorité d'un chef de station (J.P Dreno). Le personnel se répartit en :

- Un laboratoire côtier de la DEL (6 cadres, 6 techniciens),
- un laboratoire d'écotoxicologie représenté par un Directeur de Recherche, Dr. His, placé sous l'autorité d'un chef de laboratoire à Nantes,
- deux techniciens relevant de la direction des ressources vivantes,
- deux secrétaires.

2 - 4 Equipements :

- Embarcations:
 - La Caprelle 8,20 m, cabine, moteur HB 150 CV
 - La Véligère 6,20m, cabine, moteur HB 90 CV
- Micro - ordinateurs
- Modèle hydrodynamique 2 dimensions du Bassin d'Arcachon
- Malthus
- Système d'information géographique Arc - Inf.
- Véhicules
 - Renault 19 D
 - Renault Clio D
 - Renault Express D
 - Renault Super 5 Société D
 - Bassins de stockage (310 m3) alimentés en eau de mer.

III - Typographie :

1 - Situation géographique :

La côte des Landes de Gascogne s'étend de l'estuaire de la Gironde à l'embouchure de l'Adour. Uniforme et rectiligne, elle n'est interrompue que par quelques étroits exutoires et par l'échancrure du Bassin d'Arcachon.

La totalité du Bassin s'inscrit entre 44° 39 et 44° 45 de la latitude Nord et entre 1° 02 et 1° 14 de latitude Ouest. Ses contours le font apparaître sous la forme d'un triangle. Les côtes Sud, Est, et Ouest atteignent respectivement une longueur de 20, 19, 18 km. Véritable mer intérieure d'une superficie de 155 km², dont les deux tiers sont découverts à marée basse, l'entrée et la sortie des eaux du Bassin s'effectuent par les passes. On estime que 370 millions de mètres cubes sont introduits par une marée de vives eaux et 130 par une marée de mortes eaux.

Le Bassin de Marennes - Oléron, quant à lui est délimité par l'embouchure de la Garonne, Pointe de la Coubre, et s'étend jusqu'à l'embouchure de la Charente. Ce site privilégié, formé par l'île d'Oléron est propice au bon développement et la reproduction des huîtres, et protège enfin des fortes mers et des nombreuses intempéries.

Mais le département de la Charente - Maritime possède un autre centre ostréicole de moindre envergure, mais qui conte néanmoins dans la production nationale. Il est délimité par de l'embouchure de la Charente et suit la côte jusqu'à la Pointe de l'Aiguillon (Vendée), il aussi constitué de l'île de Ré, qui amène une longue expérience en matière d'ostréiculture. On y trouve un des grands ports français, le port de la Rochelle.

2 - L'ostréiculture :

Le développement progressif de l'ostréiculture coïncidait avec la décadence des marais salants, qui jusqu'au début du 17^{ème} siècle avaient fait la fortune du pays. La lourdeur des impôts, la concession de nouvelles salines en plusieurs points du royaume, le retrait de la mer, le mauvais entretien des canaux et nombre d'autres facteurs économiques et politiques se conjuguèrent pour accélérer l'inexorable ruine de l'industrie du sel. Lorsque l'effondrement ne fit plus de doute, les terrains furent récupérés pour l'ostréiculture qui allait maintenir dans la région une activité tout aussi lucrative. L'essor, désormais libre, de l'ostréiculture saintongeaise entraîna, parallèlement au " remodelage " du marais.

Dans le même temps les éleveurs d'huîtres, appelés huîtres, se trouvèrent confrontés à un problème vital, celui de l'approvisionnement en petites huîtres pour garnir les parcs et les claires. Jusqu'à là les gisements naturels avaient été l'unique et facile mode de production. Sous l'action combinée des gelées et de l'avidité des hommes, ces ressources n'avaient pas tardé à montrer des signes d'épuisements et, en 1767, l'Amirauté de Marennes avait dû décréter des mesures énergiques.

Une véritable ostréiculture s'implanta en 1865 avec l'apparition du collecteur de type tuile chaulée.

La France entière ainsi que certains pays étrangers souffraient d'une même pénurie. Dans chaque région furent édictés des règlements très stricts allant jusqu'à l'interdiction totale de la pêche pendant plusieurs années consécutives. Renouvelées à des intervalles très variables, ces périodes de répit permettaient effectivement aux bancs naturels de se repeupler mais, dès la levée des interdictions, l'exploitation intensive devenait plus menaçante. Le potentiel de reproduction s'affaiblissait peu à peu, et, sous peine d'assister à la disparition de ces coquillages, disparition qui eut entraîné de graves conséquences sociales, force fut de trouver un moyen d'obtenir des petites huîtres autre que la pêche sur les gisements naturels, laquelle s'accompagnait d'une grande perte d'huîtres mères. Les efforts portèrent dans deux directions : reconstitution des gisements et captage artificiel.

L'heureuse destinée de l'ostréiculture moderne allait être brutalement mise à l'épreuve durant les années 1920 - 1921. Sur toutes les côtes occidentales d'Europe, l'huître plate (*Ostrea edulis*), la seule espèce d'huîtres que l'on avait cultivée en France jusqu'au 20ème siècle fut soudain frappée par une maladie si mystérieuse que son origine échappe encore aux chercheurs. Les huîtres mouraient en grand nombre, aussi bien dans les parcs que sur les gisements naturels.

Elle fut remplacée par l'huître creuse portugaise, *Crassostrea angulata* jusqu'au début des années 1970. A cette époque, le cheptel d'huîtres plates restant fut anéanti par une parasitose *Marteilia refringens*, et le stock d'huîtres creuses disparut à 80 % à cause d'une épizootie d'origine virale (maladie des branchies). L'huître creuse, *Crassostrea angulata*, a aujourd'hui complètement disparu.

La production fut relancée grâce à l'importation de l'huître japonaise, *Crassostrea gigas*.

L'huître creuse *Crassostrea gigas*, a été introduite dans le Bassin de Marennes - Oléron et dans la Baie de la Rochelle sous deux formes :

- du naissain à partir des centres conchylicoles japonais (Baie de Sendai) et de Colombie Britannique (Pendrell Sound),
- d'individus adultes qualifiés d'huîtres mères (Pendrell Sound)

Dans le premier cas les importations sont passées de centaines de kilogrammes (1968 à 1970) à plusieurs centaines de tonnes par an (1971 à 1976). Il s'agissait essentiellement de jeunes individus fixés sur coquilles collectrices d'huîtres.

Dans le second cas, à la suite des mortalités de masse qui avaient affecté les populations de *Crassostrea angulata*, la décision avait été prise de renforcer le stock de *Crassostrea gigas* afin d'assurer une récolte de naissain et de permettre la reconstitution des gisements naturels anéantis. C'est ainsi que 52 puis 60 tonnes d'adultes avaient été immergés dans différents secteurs du Bassin. A la fin du printemps de 1971 et 1972, les huîtres étaient proches de leur stade de maturité sexuelle lors de leur immersion et devaient effectivement frayer dans la baie quelques semaines plus tard participant de façon non négligeable à la production du naissain.

De 1977 à 1981, les activités ostréicoles furent de nouveau fortement perturbés par l'action des peintures antisalissures pour bateaux, à base de TBT. Les perturbations de la reproduction (manque de naissain) et les anomalies de la calcification des coquilles dépréciant la qualité commerciale des huîtres furent responsable de la disparition de nombreuses entreprises ostréicoles, accompagné d'une diminution des surfaces exploitées.

A l'heure actuelle, on dénombre de nombreuses entreprises essentiellement dans le Bassin de Marennes - Oléron, dans la Baie de la Rochelle et enfin dans l'île de Ré.

Le Bassin de Marennes - Oléron et, avec celui d'Arcachon, les principaux centres ostréicoles pour le captage du naissain d'huîtres, et des essais de captage de naissain de moules sont en cours. Enfin une véritable vénériculture très marginale dans les Bassins, ne concerne qu'une dizaine d'exploitants.

INTRODUCTION

Les activités portuaires industrielles, agricoles et les centres urbains côtiers polluent le milieu marin par des produits chimiques et bactéries provenant d'évacuation d'eaux usées, de sédiments, de sulfates, de nitrates, échappant aux dispositifs d'épuration existants.

Les milieux estuariens sont très sensibles à l'action des altéragènes. Certains organismes vivant dans ces milieux réagissent fortement à la présence de contaminants même en quantité infime. C'est le cas de l'huître creuse *Crassostrea gigas*, et plus particulièrement de ses stades embryonnaires et larvaires, qui intègrent l'ensemble des micropolluants à des concentrations très faibles.

Les méthodes analytiques ne permettent pas à elles seules de pouvoir prédire l'action des micropolluants sur les populations naturelles ou sur les organismes ; ceux-ci peuvent réagir à des concentrations situées, en dessous du seuil de détection analytique. A titre d'exemple, les expériences d'écotoxicologie ont permis de situer le seuil d'action du TBT (acétate de tributylétain) des peintures antisalissure au niveau du nanogramme dès 1983 (His et *al.*), alors que ce produit n'a pu être dosé en eau de mer que quelques années plus tard.

Les études écotoxicologiques permettent donc de mettre en évidence d'éventuelles perturbations du milieu naturel.

Les organismes utilisés doivent répondre à des critères précis que l'on rencontre en particulier chez les oeufs et les larves d'huîtres, au niveau des zones littorales:

- Leur mode de reproduction est parfaitement connu. Sa maîtrise en laboratoire permet de travailler sur les embryons et les larves qui sont sensibles à l'action des altéragènes.

- L'obtention de sujets matures, tout au long de l'année, est possible par "conditionnement" en milieu contrôlé. On peut donc disposer d'embryons et de larves en dehors de la période de reproduction naturelle.

- Une répartition très large de l'espèce permet la réalisation d'observations sur un plan mondial.

- Les huîtres possèdent un intérêt économique certain (ostréiculture).

Les instances internationales, considérant ces différents critères, ont retenu les embryons et les larves d'huîtres *Crassostrea gigas* comme "organisme sentinelle" et préconisent leur utilisation pour la réalisation des tests d'écotoxicologie marine (Stebbing et al., 1980).

Pour être reconnu sur le plan international, un test doit pouvoir être réalisé en **eau de mer de synthèse**. En effet, tous les laboratoires côtiers ne disposent pas d'une eau de mer d'une qualité biologique suffisante pour pouvoir mener à bien ces tests et obtenir d'excellents résultats dans les témoins. C'est la raison pour laquelle la mise au point d'une eau de synthèse utilisable par les différents laboratoires s'est avérée nécessaire. Zaarogian et al. (1969) ont réalisés une telle eau, qu'ils considèrent comme propice à l'embryogenèse et au développement des larves de *Crassostrea gigas*, contrairement à Thain (1991).

C'est donc dans un but de détection rapide des différents agents potentiellement responsables des perturbations, que les tests d'écotoxicologie doivent être réalisés ouvrant la voie aux recherches analytiques.

Les huîtres sont des organismes euryhalins qui peuvent supporter de fortes variations de salinité, ils vivent généralement dans des estuaires où ils sont soumis à des déssalures fréquentes. Mais de nombreuses nuisances anthropiques sont véhiculées par les eaux douces.

Des expériences préalables ont montré que les larves de *Crassostrea gigas* pouvaient se développer tout à fait normalement pour des salinités comprises entre 20 et 35 pour mille, l'optimum se situant à 25 pour mille (His et Robert, 1989). Afin de tester la qualité biologique des eaux de ruissellement qui peuvent véhiculer des micropolluants, il est possible de recréer une déssalure artificielle en ajoutant de l'eau douce à de l'eau de mer prélevée en zone océanique. Cette particularité permet de tester la qualité biologique des eaux douces en recherchant d'éventuelles pollutions d'origine tellurique.

Enfin, si l'on excepte les activités de plaisance, les micropolluants sont véhiculés vers les zones estuariennes par les eaux de ruissellement, par les apports fluviaux. De nombreux travaux ont montré qu'il existe des phénomènes d'absorption au niveau des particules en suspension dans l'eau. Les sédiments deviennent donc de véritables pièges à contaminants qu'ils peuvent relarguer lors de leur remise en suspension (forte marée, tempête).

Ainsi, dans les études de surveillance préventive du littoral, il faut prendre à la fois en compte la "qualité biologique" de l'eau mais aussi le rôle possible des sédiments dans le relargage des altéragènes.

Les études de surveillance de l'environnement naturel impliquent la recherche de méthodes simples, rapides, fiables et peu coûteuses. Une telle méthode a été mise au point à la station IFREMER d'Arcachon. Il s'agit d'un test simplifié, inspiré des travaux de Woelke (1967) ; il est basé sur l'observation des larves, la qualité biologique de l'échantillon étant déterminée par le pourcentage de larves anormales.

Cette année, trois études plus concrètes ont été réalisées. Elles concernent l'évaluation de la qualité biologique d'une eau de mer de synthèse, de l'eau de la Baie de La Rochelle, et enfin de sédiments du pourtour méditerranéens.

La méthode mise au point permet, grâce à l'adjonction de formol neutre dans les échantillons (0,1 ml par acuvettes à l'issue de la période d'incubation), de différer les lectures de plusieurs semaines, voire plusieurs mois.

Dans le cadre de ce stage j'ai participé à la conduite d'expériences (de l'induction des pontes à la fixation des échantillons) et j'ai effectué les lectures sur les acuvettes d'expériences antérieures ; parmi celle-ci, les études concernant la "qualité biologique" des eaux du Bassin conchylicole de la Rochelle, et les études concernant la toxicité potentielle des sédiments méditerranéens.

L'utilisation d'un organisme en écotoxicologie n'est possible que lorsqu'on connaît ses caractéristiques biologiques. Ce test est basé sur l'étude des larves d'huîtres, ce qui implique une parfaite connaissance du mode de reproduction de l'espèce.

La première partie du mémoire présente donc les modalités de reproduction de *Crassostrea gigas*, ainsi que la présentation des méthodes utilisées.

La seconde partie rend compte de l'étude expérimentale réalisée au cours de ce stage sur l'eau de synthèse et l'eau du Bassin d'Arcachon, des résultats obtenus et de leurs interprétations.

La troisième partie rend compte de l'étude expérimentale de la "qualité biologique" de l'eau de la Baie de La Rochelle, sur des larves de *Crassostrea gigas*.

Dans la quatrième partie, on va étudier les effets de sédiments méditerranéens sur les larves de *Crassostrea gigas*.

1 ÈRE PARTIE

RAPPELS CONCERNANT LA REPRODUCTION

DES HUITRES

I - Sexualité :

Les huîtres de l'espèce *Crassostrea gigas* sont hermaphrodites, d'où une certaine complexité dans la détermination du sexe.

Il y a hermaphrodisme alternatif irrégulier, on rencontre des individus qui sont soit mâle, soit femelle pendant de longues périodes, avec seulement 0.25% d'individus à hermaphrodisme simultané.

Par ailleurs, il existe une certaine protandrie (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 plus nombreuses. Il peut y avoir inversion du sexe soit au cours d'une même saison, soit au cours de saisons consécutives.

Ceci est important pour mener à bien les tests utilisés ici : le choix d'individus jeunes augmente les chances de disposer d'individus des deux sexes pour pouvoir effectuer les fécondations nécessaires.

II - Maturation des huîtres :

1 - Anatomie de l'appareil génital :

Les glandes génitales paires sont formées de nombreux acinis. Elles sont diffuses et entourent la masse viscérale. Leurs canaux se rejoignent pour former des canaux plus importants qui s'unissent pour former un gonoducte de chaque côté du corps. Les deux gonoductes se réunissent pour déboucher dans le conduit urogénital.

L'appareil reproducteur est réduit aux gonades. Il n'existe aucune formation annexe. La simplicité de l'appareil reproducteur des huîtres facilite le changement de sexe des individus.

2 - Evolution de la gonade :

La gonade évolue au cours du temps en fonction de différents facteurs selon un cycle sexuel. Une échelle pratique a été adoptée qui caractérise les différents stades de la gamétogenèse :

- stade 0 : gonade vide, correspondant au repos sexuel ou à la fin d'expulsion des gamètes.
- stade 1 : début de la gamétogenèse, multiplication des gonies.
- stade 2 : gonades bien développées mais la dissociation des gamètes reste difficile.
- stade 3 P : état moyen de réplétion, gamètes abondants et facilement dissociables.
- stade 3 H : état maximum de réplétion, gonade hypertrophiée. Une épaisse couche blanc crème entoure la masse viscérale. Les gamètes sont abondants et obtenus par faible pression.
- stade 4 : stade d'émission des gamètes. Il y a régression du volume de la gonade dont la coloration devient jaunâtre. Les gamètes sont moins abondants.
- stade 5 : déplétion presque totale, l'animal est d'apparence maigre (stade 0).

Lorsqu'un lot de géniteurs est prélevé dans le milieu naturel en été, le choix s'effectue par l'utilisation de cette échelle macroscopique en sacrifiant quelques individus.

3 - Maturation dans le milieu naturel :

Au cours d'observations réalisées de 1970 à 1974, les grandes lignes de l'évolution de la maturation sexuelle et de la ponte de l'huître japonaise dans le Bassin d'Arcachon ont été dégagées (His, 1973, 1975, 1976). Les études du cycle sexuel chez les lamellibranches comportent des observations sur l'évolution de la gonade dans le but de déterminer les "dates probables de pontes". Sur le plan de la gamétogenèse, les premiers stades apparaissent au cours du processus printanier en Mars et Avril. La maturité est suivie de l'émission des gamètes qui peut être partielle ou totale. Puis la gonade est le siège de phénomènes de restauration qui précèdent les nouvelles périodes de frai pendant la saison estivale. A l'automne les huîtres entrent en phase de repos sexuel.

Les cycles sexuels sont sous l'influence de facteurs climatiques, hydrologiques et nutritionnels ; des facteurs internes génétique, nerveux, endocriniens et métaboliques commandent ces phénomènes.

3.1 - Facteurs externes :

Leur action est très importante sur la vitesse de l'élaboration des gamètes, de leur maturation et de la fréquence des pontes.

Les trois principaux facteurs externes sont :

- le facteur thermique : il existe une température minimale favorable au déroulement de la gamétogenèse (15 ° C).
- le facteur hydrologique : une légère déssalure favorise la maturation.
- le facteur nutritionnel : il joue un rôle très important sur le commencement et la durée de la gamétogenèse. La quantité de nourriture doit être suffisamment importante pour subvenir aux besoins vitaux et à élaboration des gamètes. Le jeûne provoque l'arrêt des phénomènes sexuels et la lyse des gamètes.

3.2 - Facteurs internes :

Ils commandent et contrôlent les différents phénomènes lors du cycle sexuel. Les deux principaux organes responsables de cette régulation sont :

- Les ganglions cérébroïdes et viscéraux : ils exercent un contrôle important sur l'initiation et le déroulement de la gamétogenèse par la sécrétion d'hormones.
- Le système nerveux : les récepteurs sensoriels sont excitables par les facteurs externes.

4 - Maturation en milieu contrôlé ou "conditionnement":

De nombreux Bivalves peuvent être "maturés artificiellement" en dehors de leur période normale de reproduction dans le milieu naturel : c'est le conditionnement découvert par Loosanoff (1945).

Lorsqu'il est impossible de se procurer des huîtres mures (en période hivernale où les différents facteurs influençant la gamétogénèse sont défavorables), on provoque la maturation en milieu contrôlé (écloserie). Les huîtres sont placées dans des conditions optimales : la température de l'eau est maintenue à 20 ° C et on apporte régulièrement une nourriture nanoplanctonique variée. Ceci permet aux huîtres d'effectuer leur maturation sexuelle.

La maturation de *Crassostrea gigas* est généralement obtenue en 2 mois à la fin de l'hiver (Février, Mars), alors qu'elle est atteinte en 1 mois en Mai et 15 jours en Juin, les huîtres approchant alors de l'état de maturité dans le milieu naturel. Enfin pendant les mois d'été, il est possible de se procurer des géniteurs à Arcachon, ou dans les autres centres conchylicoles du littoral Atlantique.

III - Le frai :

Chez les huîtres creuses *Crassostrea gigas*, la fécondation est externe. Les huîtres libèrent leurs gamètes dans l'eau, la fécondation a lieu par la suite. Le frai est un phénomène collectif, ce qui permet la rencontre des gamètes.

Dans le bassin d'Arcachon, les pontes les plus importantes ont lieu au mois de Juillet, lors du réchauffement des eaux, avec une fréquence plus importante en période de vives eaux. Ceci peut être expliqué par une plus grande instabilité du milieu : les différences de température, de pression, de salinité sont très grandes. La variation de ces différents paramètres stimule les individus en phase instable qui émettront leurs gamètes.

Cette particularité est mise à profit pour déclencher l'émission des gamètes au cours des expériences d'écotoxicologie.

1 - Emission des spermatozoïdes :

En général, les mâles fraient les premiers, car ils sont plus sensibles aux stimuli que les femelles.

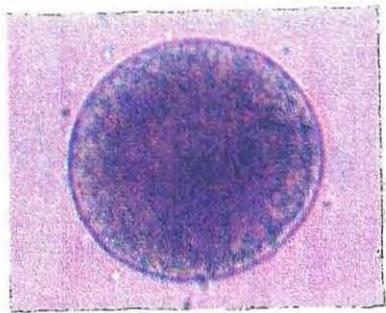
L'éjaculation se fait par éjection d'un jet blanchâtre et dense, plus ou moins continu qui prend la forme d'une fumée de cigarette. L'émission des spermatozoïdes se produit sans mouvements valvaires particuliers, l'amplitude du bâillement est simplement plus importante.

Le sperme contient une hormone, la diantline, qui agit sur les individus des deux sexes. Les premiers individus qui fraient stimulent les individus voisins mâles et femelles. Ceci permet d'expliquer le phénomène collectif du frai.

2 - La ponte :

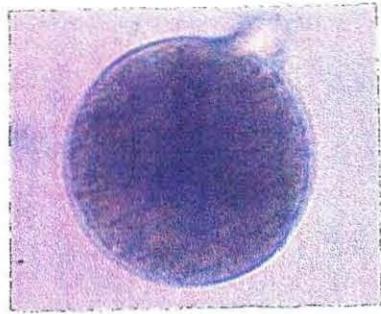
Pour les femelles, l'émission des gamètes se fait sous forme de petits amas blanchâtres provenant de la partie avant de l'huîtres, qui se désagrègent après l'éjection.

Sous l'action des différents stimuli et de la diantline, les femelles libèrent leurs oeufs. Contrairement aux mâles, l'émission des gamètes s'accompagne d'une activité valvaire particulièrement importante. La diantline joue un rôle relaxateur sur la muscle adducteur ce qui permet à la valve droite de se soulever avec une amplitude inhabituelle. Puis elle s'abaisse, brutalement pour évacuer un important nuage d'oeufs.



a

Oeuf fécondé
et spermatozoïdes



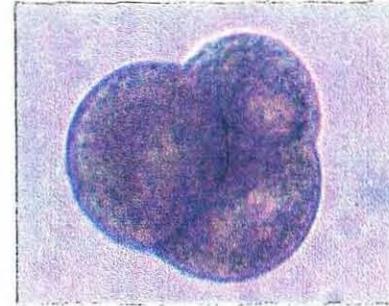
b

Emission du premier globule polaire



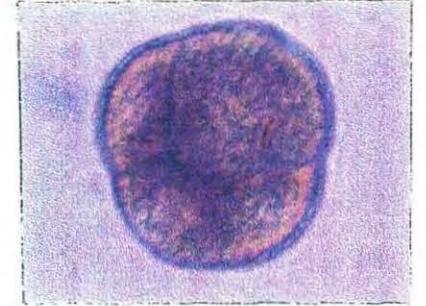
c

Emission du second globule polaire

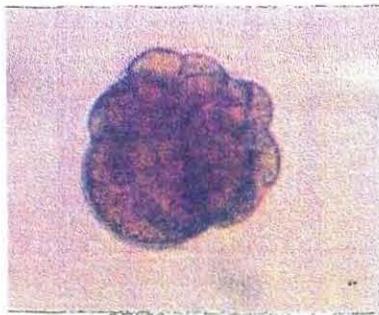


d

Deuxième division : formation du
macromère et des micromères



e



f

Clivage spiral
et inégal



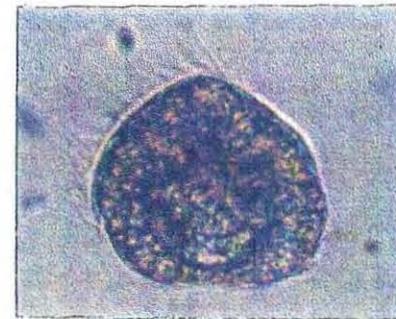
g

Gastrulation par epibolie des micromères sur le macromère



h

Trochophore

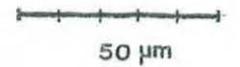


i



j

Larve D



50 µm

Figures 2 : De l'oeuf fécondé à la formation de la larve D chez *Crassostrea gigas*
(manque la première division)

IV - La fécondation :

La fécondation se produit quelques instants après la libération des gamètes, dès les premières minutes après la mise en contact de l'ovocyte et du spermatozoïde. L'oeuf (ovocyte fécondé) se caractérise par une forme parfaitement sphérique, et par une membrane de fécondation bien visible (**figure 2 a**).

C'est à l'issue de la fécondation que se réalise la maturation des ovocytes, contrairement aux spermatozoïdes.

Chez les mâles, la spermatogenèse s'effectue selon le processus habituel : cellules mères de gonies, spermatogonies, spermatocyte 1^{er} ordre, spermatocyte 2nd ordre, spermatide, spermatozoïde. La réduction chromosomique s'effectue lors du passage du spermatocyte 1^{er} ordre au spermatocyte 2nd ordre (division maturation réductionnelle).

Au contraire, chez les femelles, les cellules germinales restent au stade d'ovocyte 1^{er} ordre à 2 n chromosomes jusqu'à la ponte. C'est la fécondation qui déclenche la maturation des ovocytes. Cette maturation se traduit par l'émission de deux globules polaires : le premier est émis lors d'une division hétérotypique (**figure 2 b**), le second lors d'une division homotypique (**figure 2 c**).

C'est une fois seulement les deux globules polaires émis (**figure 2 c**), lorsque l'ovocyte est mature, que la fusion des noyaux mâle et femelle se réalise.

V - La phase embryonnaire :

Elle est caractérisée par une succession de divisions (**figure 1 et 2**).

La première a lieu 50 à 80 minutes après la fécondation et aboutit à la formation de deux blastomères inégaux (**figure 1**).

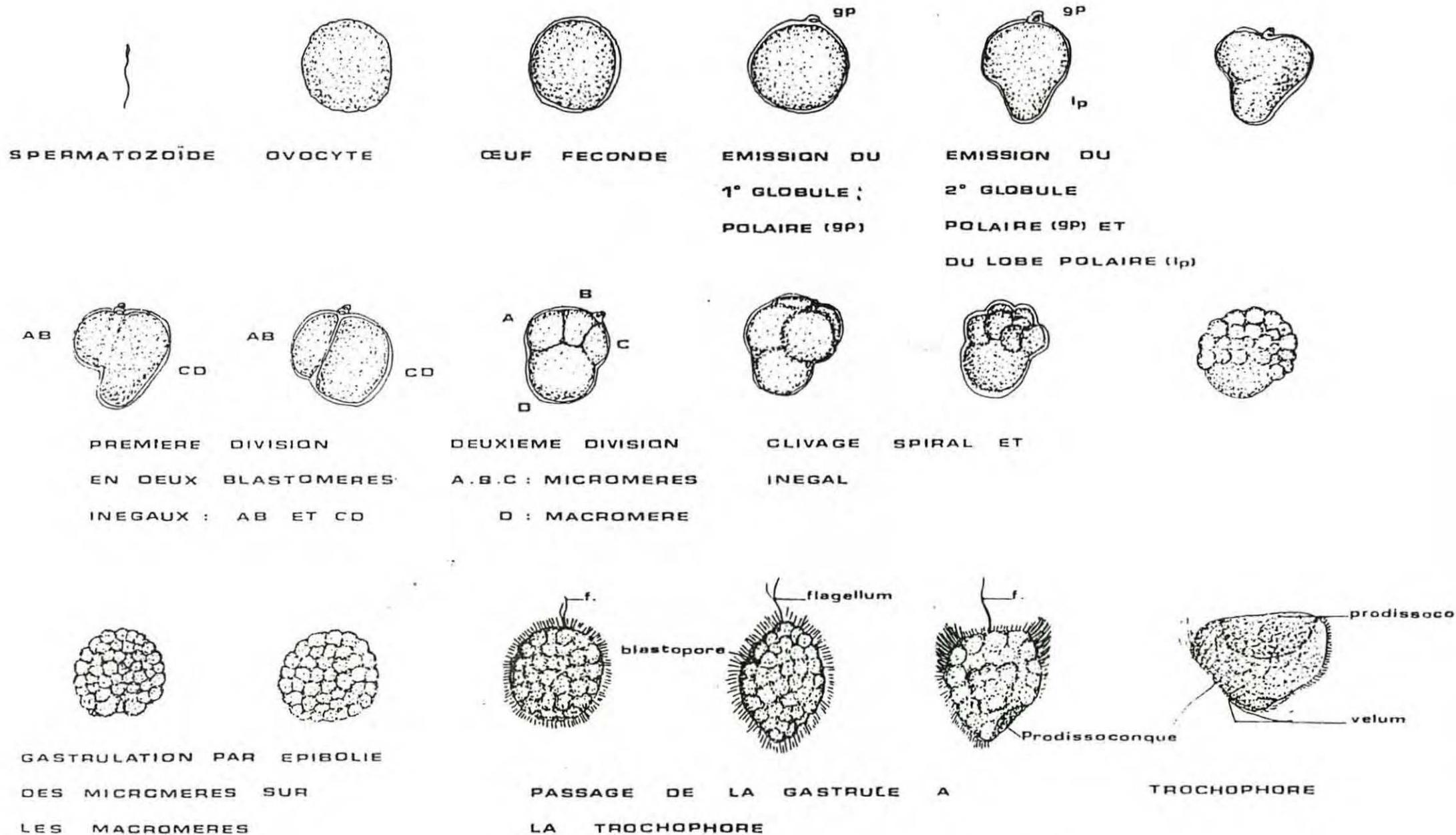


Figure 1 : morphologie et anatomie des oeufs et des embryons de *Crassostrea gigas*.

La seconde division (**figure 2 d et 2 e**) donne naissance à deux pôles : un pôle animal et un pôle végétatif. Le pôle animal comporte 3 micromères, le pôle végétatif un macromère.

A partir de la troisième division le clivage est inégal et de type spiral (divisions successives à angle droit). Le clivage abouti au stade morula (**figure 2 f**). La division des micromères devient alors plus rapide que celle du macromère. Le pôle végétatif est progressivement recouvert par les micromères (**figure 2 g**). Il s'agit du stade blastula (**figure 2 h**) qui est caractérisé par l'apparition de cils qui permettent le déplacement de l'embryon.

La gastrulation a lieu 4 à 6 heures après la fécondation. Les micromères recouvrent totalement le macromère. La gastrula est entièrement ciliée et on peut distinguer une touffe de cils plus volumineux au pôle végétatif. Il s'agit du dernier stade embryonnaire.

VI - La phase larvaire :

1 - La trochophore :

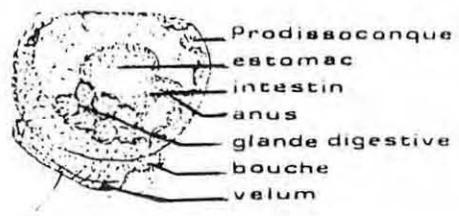
Il s'agit du premier stade larvaire. Il est atteint 12 heures après la fécondation dans des conditions favorables. La larve a la forme d'une toupie et se déplace grâce aux cils et au flagelle apical qui jouent le rôle d'organes nageurs (**figure 1 et 2 i**).

2 - La véligère :

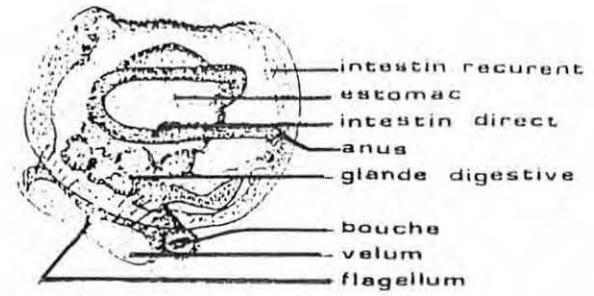
Ce stade est atteint 24 heures après la fécondation.

Il se caractérise par la formation du vélum, qui est rétractable dans la coquille. Le vélum permet la capture de la nourriture, la nage, et la respiration.

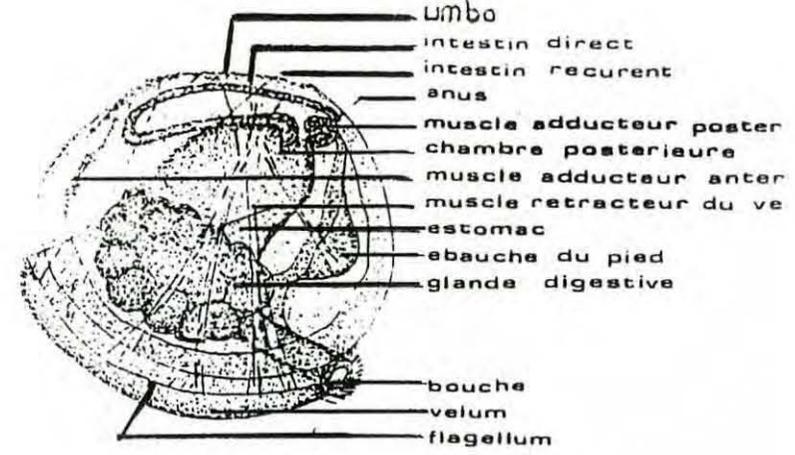
La coquille est formée de deux valves égales ; la charnière est droite, conférant à la jeune larve une forme générale de D majuscule d'où l'appellation de larve D (**figure 2 j et 3**). Pour la réalisation des tests écotoxicologiques durant le stage, la formation de ce stade larvaire est observée.



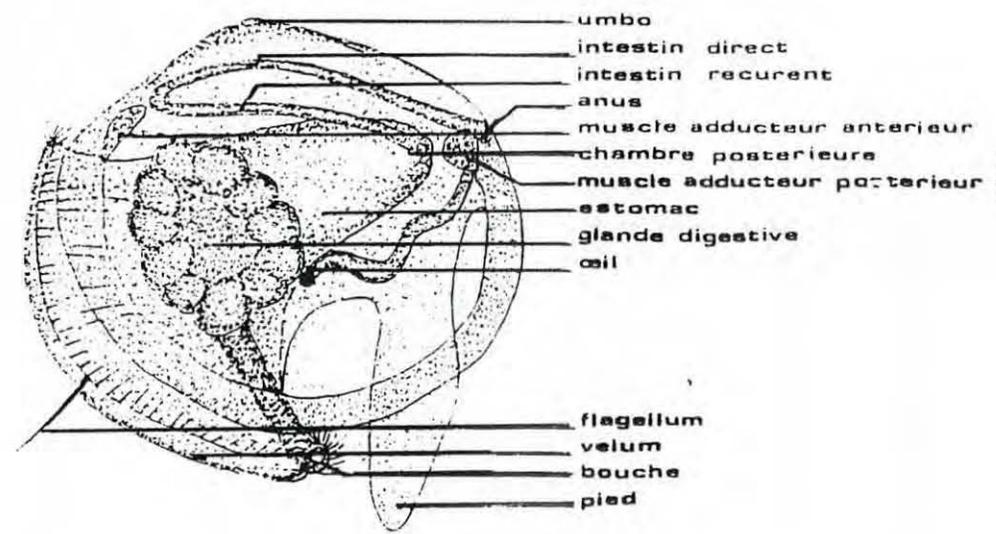
LARVE "D"



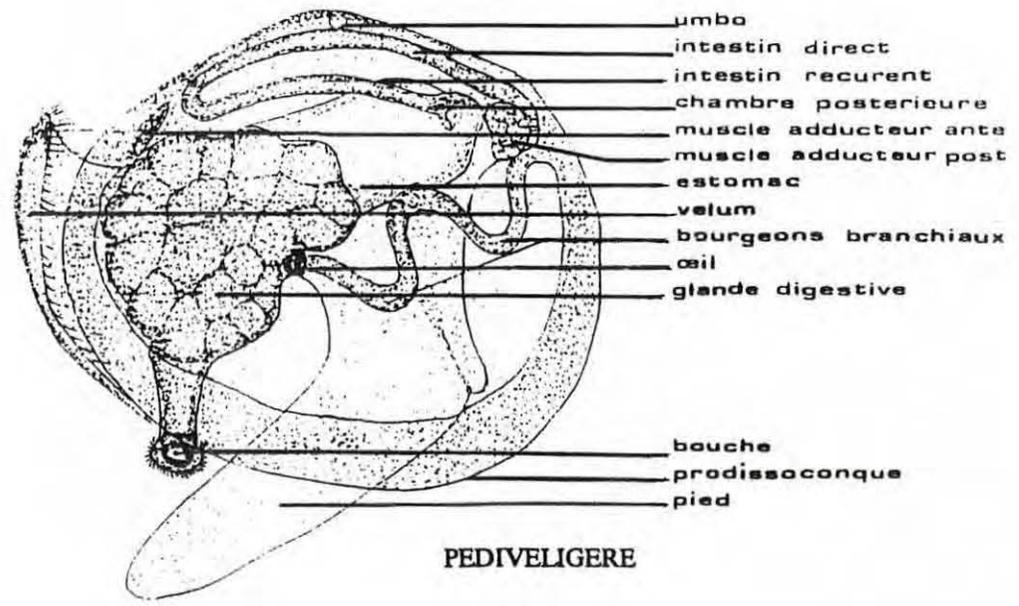
LARVE "D"



VELIGERE A UMBO



VELIGERE OÛILLÉE



PEDIVELIGERE

Figure 3 : morphologie et anatomie des larves de *Crassostrea gigas*.

La larve se développe et d'autres organes se forment :

- l'umbo (larve umbonée),
- puis le pied (véligère ocellée) (**figure 3 et 6**).

La pédivéligère est le dernier stade de la phase pélagique. La larve peut à la fois nager grâce à son vélum ou ramper grâce au pied. Elle cherche un support approprié pour se fixer et subir la métamorphose (disparition du vélum, du pied, développement des branchies et des palpes labiaux) afin de prendre la configuration d'adulte (**figure 4 et 5**).

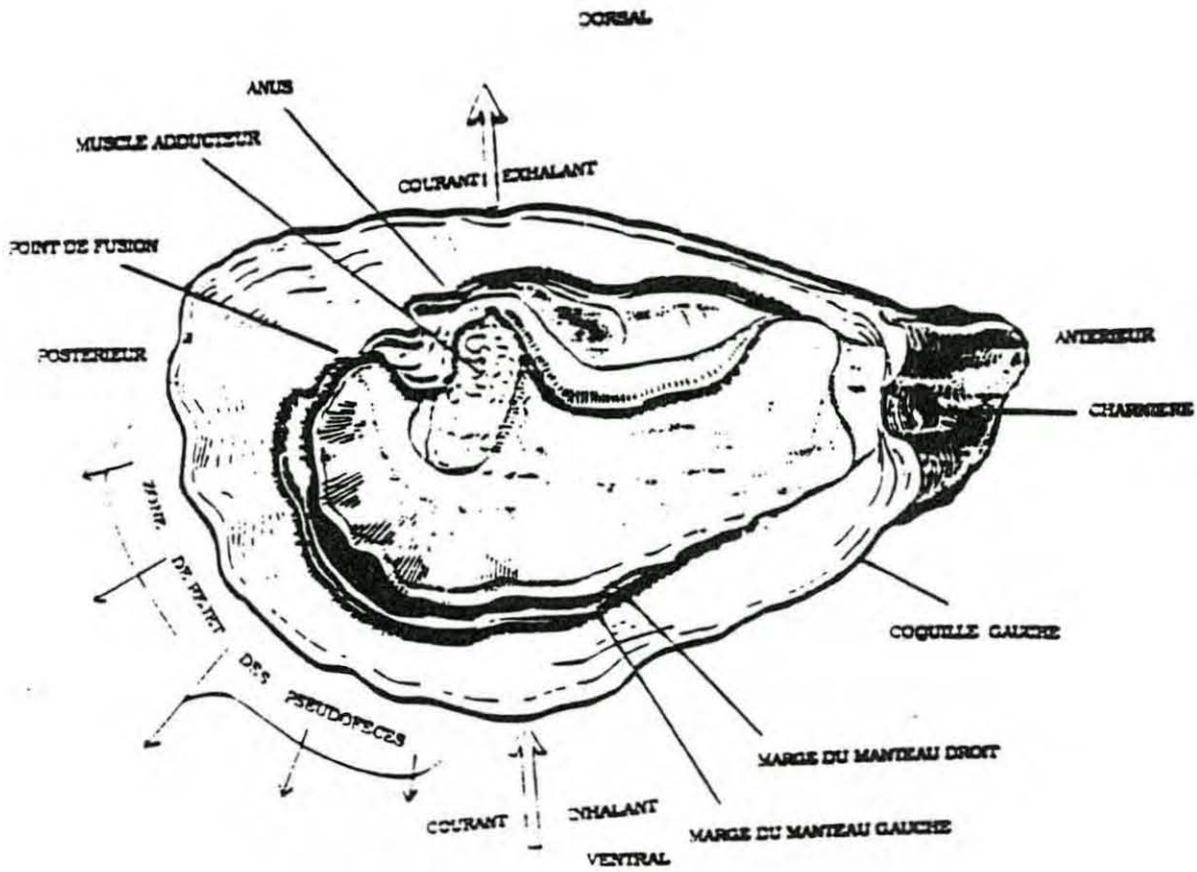
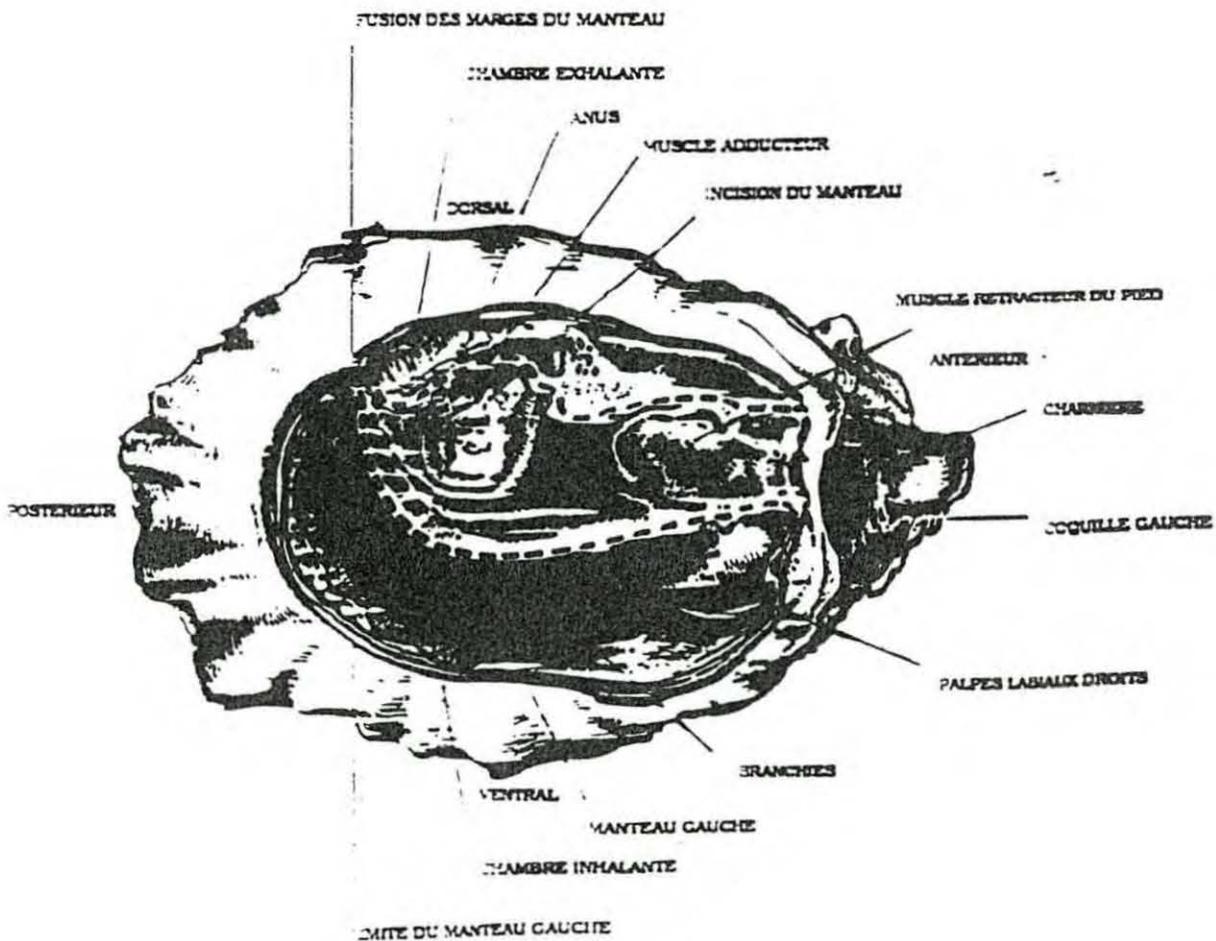


Figure 4 : planche anatomique de *Crassostrea gigas*



HUITRE CREUSE

CRASSOSTREA GIGAS

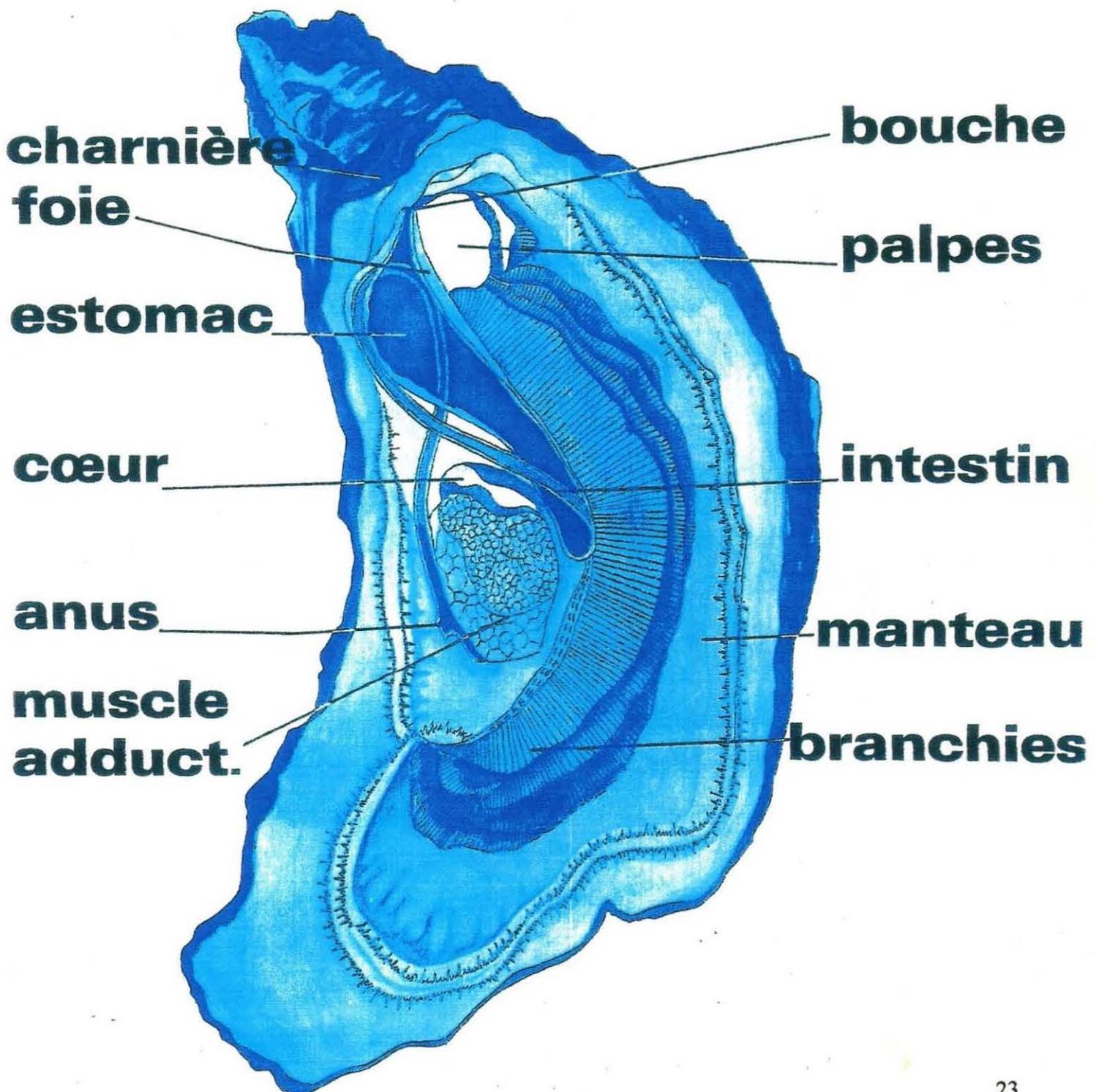


PHOTO 1 : Larves D (Archives IFREMER)

PHOTO 2 et 3 : Larves ocellées

1 - Oeil

2 - Pied

3 - Velum

4 - Charnière

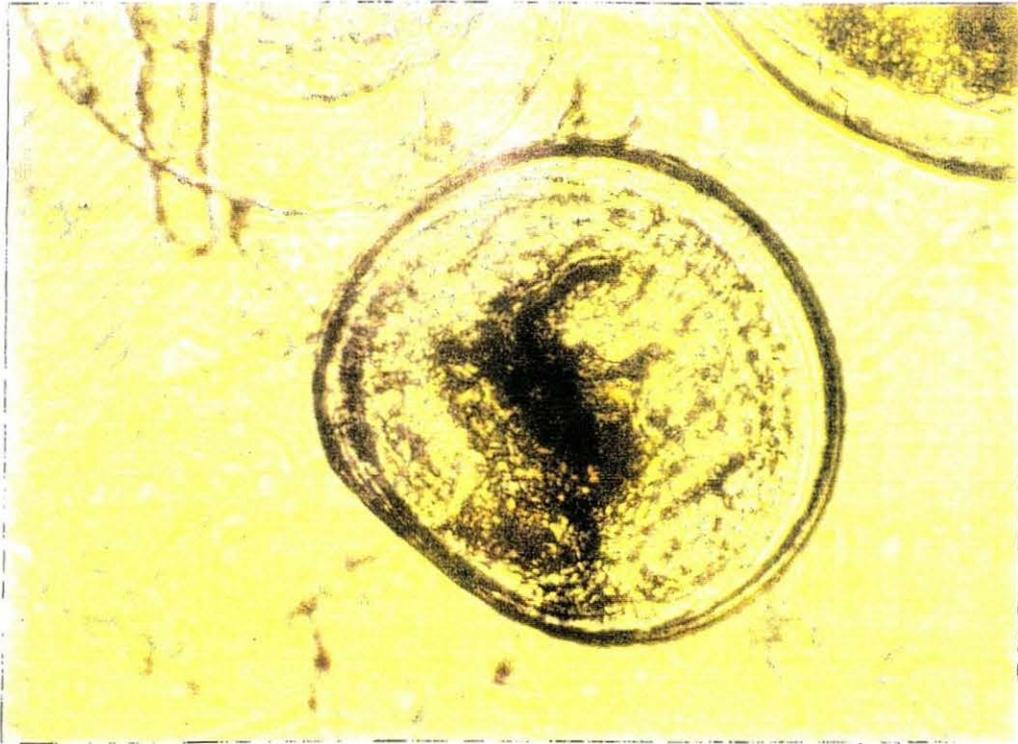


photo 1 : larve "D"

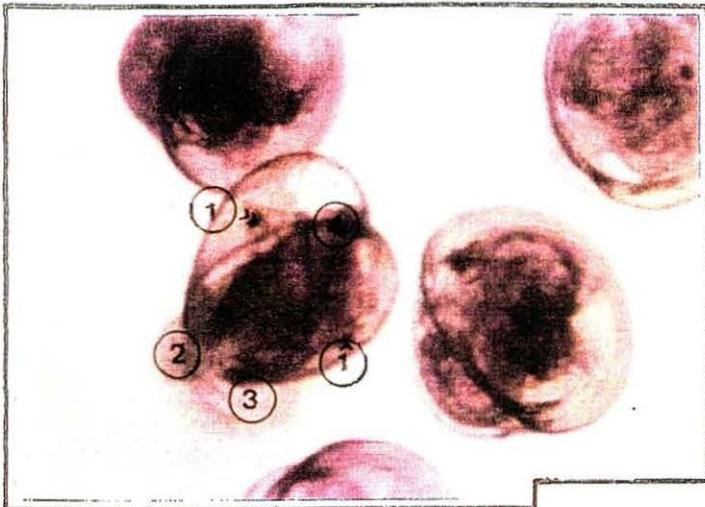


photo 2 : larves "oeillées"

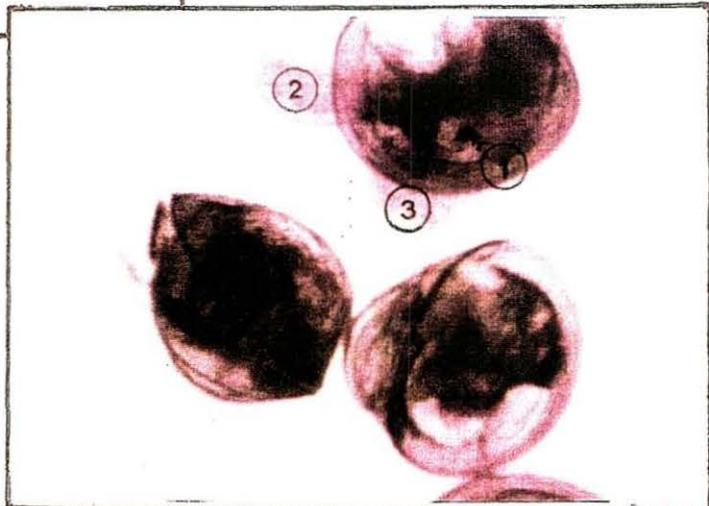


photo 3 : larves "oeillées"

FIGURE 6 : Observation au microscope de larves de *Crassostrea gigas*.

MATERIELS ET METHODE

I - "Microméthode" en acuvettes :

1 - Description :

Les acuvettes sont des récipients en matière plastique (polyéthylène) d'un volume de 30 ml. Elles présentent l'avantage de permettre l'observation directe du matériel biologique au microscope inversé, sans manipulation particulière. En effet, le tamisage est indispensable pour l'observation des oeufs ou des embryons lorsque les élevages sont conduits dans des béciers ; or au cours du tamisage, des oeufs ou des embryons en cours de lyse peuvent passer à travers le tamis, ce qui fausse les données statistiques.

Trois à cinq acuvettes sont préparés par échantillon à tester. Une série supplémentaires de 5 acuvettes témoins seront utilisées. C'est ainsi qu'une série de 60 acuvettes, après comptage de 100 larves, ne prendra pas plus de 2 jours, tout en ayant fourni ou réfuté l'hypothèse de départ. Bien sûr pour être fixé il faudra faire un élevage de larves pendant 3, 4 jours, voire 2 semaines. Mais on a ainsi un point de départ à une manipulation de plus grande envergure.

Leur prix de revient sera donc très faible compte - tenu du nombre peu important d'acuvettes nécessaire pour ce type d'expérience.

On les utilise aussi pour leur petit volume, qui permet ainsi de les entreposer plus facilement, dans des endroits frais et sec. C'est une méthode adaptée à tester :

- La "qualité biologique" de l'eau,
- La capacité de résistance à divers micropolluants, etc.

2 - Lectures des acuvettes :

Les lectures sont directement réalisées dans les acuvettes au grossissement de 100 à l'aide d'un microscope inversé d'Utermöl. L'avantage de la lecture directe réside dans le fait qu'il n'y a pas de perte ou de détérioration du matériel biologique, provoquées lors de manipulations, et qui pourraient modifier les résultats.

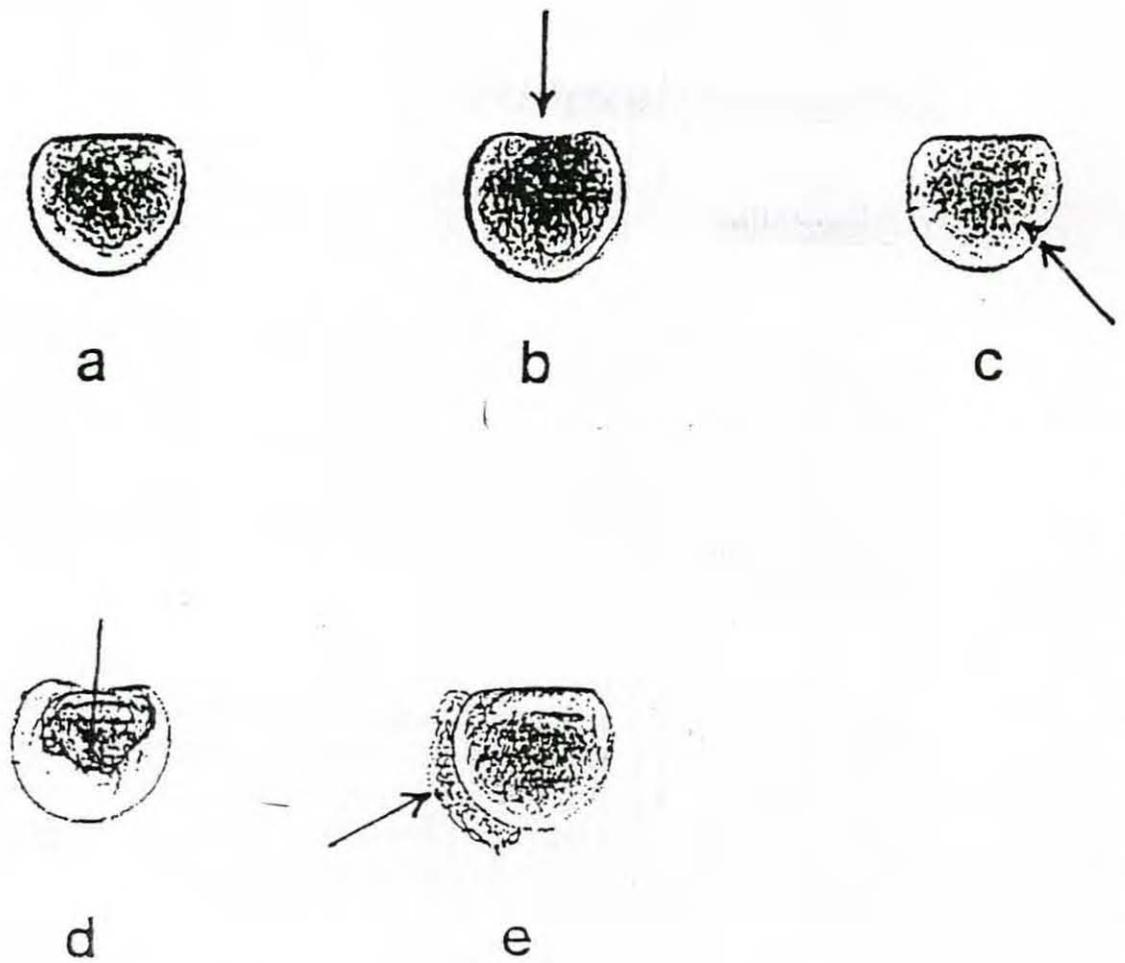


Figure 4: les anomalies larvaires observées chez *Crassostrea gigas*:

a: larve D normale

b: charnière convexe

c: échancrure à la commissure des valves

d: une des valves est anormalement développée

e: le vélum ne se rétracte pas totalement quand la larve est fermée

Les anomalies larvaires dénombrées sur un échantillon de 100 larves prises au hasard dans chaque acuvette concernent:

- Les oeufs fécondés non segmentés ; les embryons au développement incomplet ou anormal.
- Les larves D présentant une des anomalies suivantes (**figure 4**) :
 - ☐ Anomalie de la charnière : La charnière qui est normalement droite est incurvée vers l'intérieur de la véligère.
 - ☐ Anomalie de la coquille : la coquille qui est normalement régulière présente des échancrures.
 - ☐ Anomalie des valves : une des valves ne s'est pas développée.
 - ☐ Anomalie de la masse viscérale : La masse viscérale n'est pas entièrement contenue dans la coquille (larve baveuse).

Pour qu'une expérience soit exploitable, les pourcentages d'anomalies des témoins doivent être inférieurs à 20 %. Dans le cas contraire, l'expérience a été réalisée dans de mauvaises conditions (mauvaise qualité des gamètes ou de l'eau de mer utilisée). On ne peut donc pas comparer les résultats obtenus avec les échantillons et ceux obtenus avec les témoins.

II - Préparation du matériel biologique :

1 - Le déclenchement des pontes, et des spermatations :

L'appareil reproducteur atteint son plein développement l'été, en période de maturité sexuelle. La gonade atteint alors la moitié du volume total de la masse viscérale.

Les géniteurs, prélevés dans le milieu naturel dans une population dont l'état d'engraissement est élevé (manteau et palpes labiaux épais, blanchâtres) ou maturés en circuit fermé (conditionnement), sont soigneusement brossés et lavés avec de l'eau de mer de façon à les débarrasser de leur épibiontes. Ils sont placés dans des bacs en matière plastique fraîchement ébouillantés et contenant environ 10 litres d'eau de mer de bonne qualité, à la température de $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, obtenue à l'aide d'une résistance chauffante thermostatée. Au bout de 45 mn, ils sont transférés dans un bac identique à la température de $15^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 30 à 45 mn. Les chocs thermiques successifs peuvent à eux seuls déclencher l'émission des gamètes dès le premier retour à $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Néanmoins, il est parfois nécessaire de procéder à une stimulation chimique à l'aide de suspensions en eau de mer filtrée de produits sexuels de sujets qui ont été sacrifiés, et qui contiennent des substances excitatrices.

Cette double stimulation se poursuit jusqu'à l'émission des gamètes. Le temps de réponse à la stimulation thermique a été estimé par Lucas et al. (1976) entre 1 et 5 heures pour *Crassostrea gigas*. Celui-ci est généralement de l'ordre de 2 à 3 heures, les mâles émettant leurs produits les premiers, stimule les femelles. Le comportement des géniteurs, en début de stimulation (environ 1/2 heure), permet d'évaluer le temps de réponse. Au delà de 3 heures, si aucune émission n'est observée, le lot est sacrifié et l'expérience est arrêtée.

Généralement les mâles, plus sensibles, fraient les premiers, ce qui déclenchent les pontes. Quand les géniteurs commencent à émettre leurs produits, ils sont isolés dans des béciers stériles de 2 litres contenant de l'eau de mer filtrée à 0.2 μm , à une température de $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Afin d'éliminer la présence éventuelle d'oeufs fécondés, la femelle en cours d'émission est préalablement lavée à l'eau de mer filtrée avant son transfert du bac de fécondation dans le bécier. Puis la femelle en cours de ponte est de nouveau lavée et transférée dans un deuxième bécier, où les oeufs sont tamisés et éventuellement utilisés après examen.

On rencontre alors 2 cas :

- L'émission de spermatozoïdes : afin de vérifier si les gamètes sont de bonne qualité, un examen attentif est effectué. Les spermatozoïdes doivent être très mobiles. Si ce n'est le cas, les gamètes sont considérés de mauvaise qualité : l'individu n'est pas retenu comme géniteur.

- Pour les femelles : émission d'ovocytes, dont il est important de vérifier leur forme, ils doivent être sphériques réguliers et abondants. On ne doit pas avoir formation d'agrégats.

2 -Fécondations :

Les fécondations doivent être réalisées dans la demi-heure après l'émission des gamètes. On laisse frayer les deux individus retenus jusqu'à l'obtention une solution dense en gamètes. Les deux géniteurs sont alors retirés des bécchers.

Le sperme est recueilli après passage sur un tamis stérile de 32 µm de vide de maille, afin d'éliminer les fèces, les débris de coquille et les éventuels oeufs introduits dans le béccher lors des stimulations.

Le contenu du béccher avec les ovocytes fraîchement émis est homogénéisé à l'aide d'un agitateur en matière plastique (disque de Plexiglas percé d'orifices et monté sur une tige) qui est mis en mouvement de bas en haut, lentement et régulièrement.

Tout en poursuivant l'agitation, on procède aux fécondations par adjonction de 20 ml de la suspension de sperme tamisé. Au bout de 5 minutes, un prélèvement est effectué pour vérifier le bon déroulement des fécondations : chaque ovocyte doit être entouré de 10 à 20 spermatozoïdes, observables en plaque équatoriale. Dans le cas contraire, 10 à 20 ml de la suspension dense de sperme sont rajoutés.

Par ailleurs, 20 ml de la solution d'ovocytes sont prélevés et déversés dans une éprouvette graduée de 250 ml, remplie d'eau de mer filtrée à 0,2 µm. Après homogénéisation, on prélève quatre fois 0,1 ml à la pipette automatique. Chaque prélèvement est placé sur une lame à puits, pour comptage au microscope. Le nombre moyen N d'ovocytes présent dans 0,1 ml est calculé.

Le nombre total d'ovocytes dans le béccher de deux litres est donc égal à : $(10*N*250*2000)/20$.

La répartition des oeufs est réalisée à raison de 600 oeufs au maximum par récipient d'élevage (acuvettes), préalablement rempli de l'échantillon à analyser.

Chaque acuvette estensemencée à l'aide d'une pipette automatique avec $(1200/250N)$ ml de la suspension d'ovocytes fécondés.

Puis les acuvettes sont placées à $24^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$ pendant 24 heures (conditions nécessaires à l'obtention de larves D). Après cette période d'incubation, le contenu de chaque acuvette est fixé au formol neutre afin d'effectuer les observations qui pourront ainsi être différées de plusieurs semaines.

2 ÉME PARTIE

ETUDE EXPERIMENTALE SUR L'EAU DE MER

DE SYNTHESE

I - Matériel et méthodes :

1 - L'eau de mer :

Les huîtres se reproduisent normalement dans le Bassin d'Arcachon durant la période estivale à l'état naturel. Ceci indique que dans cette baie la qualité biologique de l'eau est suffisante pour permettre la réalisation des tests en utilisant cette eau pour la réalisation des contrôles.

Cette eau est prélevée dans le chenal du Teychan, un des principaux chenaux du Bassin d'Arcachon. Ce prélèvement a lieu à marée montante, loin de toute activité portuaire intense, au maximum 48 heures avant le début des expériences. L'eau est stockée dans des bonbonnes de 20 litres, à l'abri de la lumière.

Son utilisation peut se faire à l'état brut pour le conditionnement ou pour induire le frai des géniteurs. Toutefois, pour la récupération des gamètes et la réalisation d'élevages, elle est filtrée à 0,2 μm à l'aide d'une membrane de type Whatman GF/C (diamètre 4,7 mm) en microfibres de verre pour les petites quantités, ou sur des membranes Sartorius de 0,2 μm lorsque des volumes plus importants sont requis.

La qualité biologique de l'eau de mer peut être directement évaluée lorsque celle-ci a une salinité comprise entre 20 et 35 pour mille, valeurs compatibles avec l'embryogenèse et le développement larvaire de *Crassostrea gigas*. On rencontre généralement de telles eaux au niveau des zones littorales, sur l'ensemble des bassins conchylicoles où se reproduisent les bivalves. Elles sont utilisées sans modification de la salinité et subissent simplement une filtration à 0,2 μm pour la conduite des élevages. On peut tester ainsi la présence ou non d'éléments dissous susceptibles de perturber le développement embryonnaire et larvaire.

Comparaison de pourcentages d'anomalies larvaires obtenus en eau de mer naturelle et en eau de mer de synthèse

	EAU NATURELLE								EAU DE SYNTHÈSE											
	A	B	C	D	E	Moyenne	I.C à 95 %	min.	$<\mu <$	max.	A	B	C	D	E	Moyenne	I.C à 95 %	min.	$<\mu <$	max.
Femelle 1	6	3	4	3	11	5,4	4,18	1,22	$<\mu <$	9,58	11	10	13	7	11	10,4	2,72	7,68	$<\mu <$	13,12
Femelle 2	7	4	7	10	8	7,2	2,70	4,50	$<\mu <$	9,90	6	4	9	5	7	6,2	2,39	3,81	$<\mu <$	8,59
Femelle 3	4	12	8	9	5	7,6	3,99	3,61	$<\mu <$	11,59	7	6	11	6	7	7,4	2,58	4,82	$<\mu <$	9,98
Femelle 4	1	3	6	3	3	3,2	2,22	0,98	$<\mu <$	5,42	3	6	11	10	3	6,6	4,70	1,90	$<\mu <$	11,30
Femelle 5	2	4	2	1	3	2,4	1,42	0,98	$<\mu <$	3,82	3	11	7	6	11	7,6	4,27	3,33	$<\mu <$	11,87
Femelle 6	5	5	8	6	6	6	1,52	4,48	$<\mu <$	7,52	4	9	5	6	6	6	2,33	3,67	$<\mu <$	8,33
Femelle 7	5	6	9	5	6	6,2	2,04	4,16	$<\mu <$	8,24	7	6	6	8	7	6,8	1,04	5,76	$<\mu <$	7,84
Femelle 8	11	3	7	4	14	7,8	5,79	2,01	$<\mu <$	13,59	11	15	11	17	15	13,8	3,34	10,46	$<\mu <$	17,14
Femelle 9	18	15	10	12	15	14	3,83	10,17	$<\mu <$	17,83	7	8	16	10	3	8,8	5,92	2,88	$<\mu <$	14,72
Femelle 10	14	9	12	16	8	11,8	4,16	7,64	$<\mu <$	15,96	6	4	7	15	9	8,2	5,23	2,97	$<\mu <$	13,43
	Moyenne générale					7,16	1,19	5,97	$<\mu <$	8,35	Moyenne générale					8,18	1	7,18	$<\mu <$	9,18

TABLEAU 1 : Qualité biologique d'une eau de synthèse.

2 - L'eau de mer de synthèse :

Une formule a été proposée par Zaarogian et *al.* en 1969 qui la préconisent en écotoxicologie pour l'application des tests à l'aide des embryons et des larves de *Crassostrea gigas*. Cependant, Thain la déclare impropre à l'application des méthodes écotoxicologiques classiques (Thain, 1991). Une expérience est réalisée afin de déterminer si cette eau de mer synthétique peut être effectivement utilisée pour l'accomplissement des tests simplifiés mis au point dans le laboratoire.

La composition de l'eau de mer de synthèse est la suivante:

NaF	3 mg
SrCl ₂ , 6H ₂ O	20 mg
H ₃ BO ₃	30 mg
KBr	100 mg
KCl	700 mg
CaCl ₂ , 2H ₂ O	1470 mg
Na ₂ SO ₄	4000 mg
MgCl ₂ , 6H ₂ O	10,78 g
NaCl	23,5 g
Na ₂ SiO ₃ , 2H ₂ O	20 mg
NaHCO ₃	200 mg

Chaque produit chimique (qualité pour analyse) doit être dissous dans l'ordre, avant l'adjonction du suivant, dans 890 ml d'eau distillée.

Dix essais ont été conduits au total avec *Crassostrea gigas* en utilisant les oeufs de 10 femelles et le sperme de 10 mâles différents. Chaque essai est réalisé en 5 exemplaires (A, B, C, D, E) dans un but de traitement statistique. La qualité biologique de cette eau est évaluée par comparaison entre les pourcentages d'anomalie larvaires obtenus en eau de mer de synthèse et en eau du Bassin d'Arcachon, avec un même couple parental (**tableau 1**).

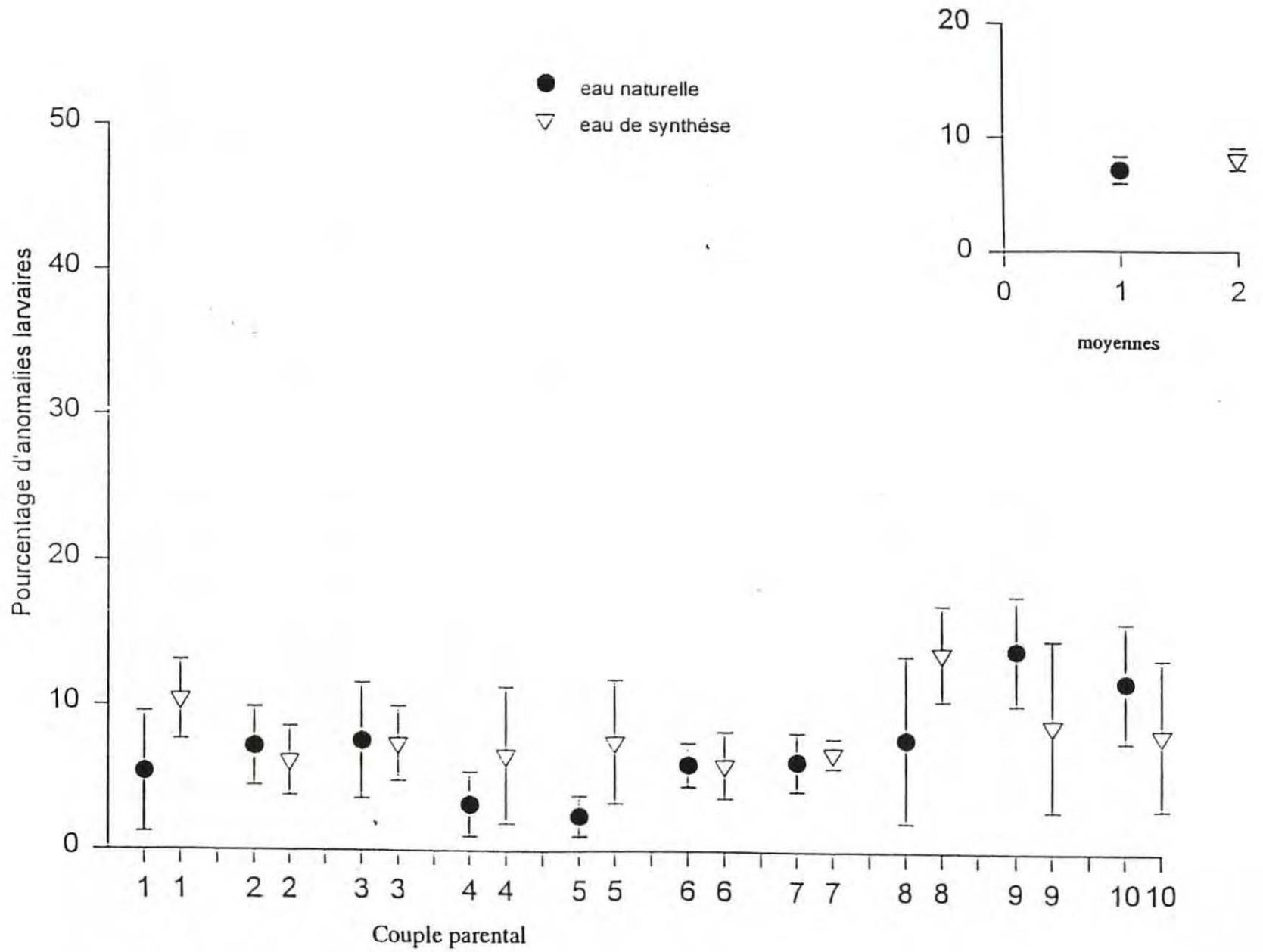


Figure 5 : Qualité d'une eau de mer de synthèse
 Comparaison des pourcentages d'anomalies larvaires obtenus en eau de mer naturelle et en eau de mer de synthèse pour un couple parental

II - Résultats et interprétation :

Le pourcentage moyen d'anomalies larvaires obtenu pour 5 essais est comparé avec celui obtenu pour 5 témoins réalisés avec de l'eau du Bassin d'Arcachon. Cette comparaison est effectuée par le calcul des intervalles de confiance au seuil de 95 % (I.C. à 95 %) pour les pourcentages obtenus. Si une partie de l'intervalle de confiance de l'échantillon testé est commune à celui du témoin, on est sûr à 95 % qu'il n'y a pas de différence entre le témoin et l'échantillon.

Les pourcentages d'anomalies larvaires sont faibles dans les élevages témoins réalisés avec de l'eau de mer du bassin d'Arcachon ($7,16 \pm 1,19$). Le test a donc été réalisé dans de bonnes conditions, avec de l'eau de mer non polluée et des gamètes de bonne qualité.

Le traitement statistique permet de vérifier si les essais réalisés avec l'eau de mer naturelle et avec de l'eau de mer de synthèse sont différents.

Les pourcentages d'anomalie larvaires des élevages réalisés avec de l'eau de mer de synthèse sont de manière générale plus élevés que les témoins ($8,18 \pm 1$). Pour savoir si cette différence de moyenne est significative au seuil de confiance de 95 %, il est nécessaire de vérifier si les intervalles de confiance se superposent. Ceci est effectivement le cas dans l'étude présente (**figure 5**). On peut conclure au fait que la différence des moyennes n'est pas significative au seuil de 95 % et que l'eau de mer de mer de synthèse permet de réaliser les tests simplifiés, si une eau de mer de bonne qualité n'est pas disponible.

L'étude réalisée sur l'eau de synthèse a donné de faibles pourcentages d'anomalies larvaires. Cette eau de synthèse, formulée en 1969 par Zaarogian, est donc propice au développement et à l'embryogenèse des huîtres *Crassostrea gigas*. Le résultat de cette expérience confirme donc les données de Zaarogian et va à l'encontre de celles de Thain (1991) qui déclare cette eau de mer impropre à la réalisation des tests d'écotoxicologie marine à l'aide des embryons et des larves d'huîtres creuses.

Cette mise en évidence est très importante à plusieurs titres :

- L'eau de synthèse pourra être utilisée pour la réalisation des tests d'écotoxicologie marine dans le cas où l'on ne dispose pas d'eau de mer de bonne qualité biologique ou encore dans le cas où l'on désire effectuer ces tests dans des zones non littorales où un approvisionnement régulier d'eau de mer naturelle est impossible.

- Cette eau de synthèse peut permettre la mise en place de programmes écotoxicologiques internationaux. Tous les tests peuvent être réalisés à l'aide de cette eau ; les expériences effectuées dans différents pays seront alors réalisées dans les mêmes conditions et avec les mêmes témoins.

3 ÉME PARTIE

QUALITE BIOLOGIQUE DE L'EAU DE LA BAIE DE LA ROCHELLE

I - Qualité biologique des eaux douces :

Les différences de salinité importantes que peuvent supporter les huîtres permettent de tester la qualité biologique des eaux douces en créant une désalure artificielle. Dans ce cas, on prend de l'eau de mer du Bassin d'Arcachon dont la salinité est généralement comprise entre 25 et 30 pour mille. Cette salinité est ramenée à 35 pour mille à l'aide de sel marin puis environ un tiers d'eau douce à étudier est rajoutée de façon à faire descendre la salinité à une valeur de 25 pour mille. Ceci permet de déceler la présence d'éventuels micropolluants dans les eaux douces qui se déversent dans les baies et les estuaires.

II - Les eaux du bassin conchylicole de la Rochelle :

Cette étude a deux buts principaux :

- vérifier la qualité biologique de l'eau dans la partie centrale du bassin de La Rochelle.
- rechercher la présence éventuelle de micropolluants dans les eaux douces qui se déversent dans le bassin.

Les différents prélèvements concernent donc des eaux de salinité relativement élevées, des eaux saumâtres et des eaux douces. Celles dont la salinité est supérieure à 20 pour mille ont été utilisées à l'état brut. Pour les eaux douces ou très faiblement saumâtres, la salinité a été ramenée à 25 pour mille environ par la méthode décrite précédemment.

Comme pour l'expérience précédente, chaque eau est testée en 5 exemplaires (A, B, C, D, E).



La liste des différents points et de leur salinité d'origine est rapportée dans le tableau 2. Les points marqués de (*) correspondent à des eaux douces qui se déversent dans ce bassin et qui sont susceptibles de véhiculer des altéragènes ; les autres sont situés dans la baie de La Rochelle, là où les huîtres se reproduisent. La visualisation géographique des lieux de prélèvements est présentée par la carte (page de gauche).

		Salinité (p. mille)
	Témoin	25
1	Le Lay *	0.5
2	Pont du Braud *	0.3
3	Chenal du Curé *	0.4
4	Esnandes / sortie pompe drainage récent *	7.1
5	Esnandes / lagune drainage récent *	2.3
6	Esnandes / sortie pompe drainage ancien *	4.5
7	Esnandes / lagune drainage ancien *	0.6
8	Chenal de lauzières *	6
9	La Rochelle / bassin des chalutiers	23.8
10	Aytré / sortie marais	29.1
11	Chatellaillon / sortie du marais *	0.4
12	Rochefort / école de voile *	0.4
13	Filières moules	31.1
14	Pas de Tranchais	30.6
15	Pointe de L'Aiguillon	29.6
16	La Carrelère	27.5
17	Fier d'Ars	30.8
18	Fosse de Loix / sortie élevage poissons	28.7
19	Chauveau	30.2
20	Fouras / Pointe de la Fumée	28.1

Tableau 2 : liste des différents lieux de prélèvement et de la salinité.

Pourcentages d'anomalies larvaires obtenus au cours de l'étude des différents lieux de prélèvement

		A	B	C	D	E	Moyenne	I.C à 95%	min. <μ< max.
	Témoin	0	1	0	1	0	0,4	0,68	-0,28 <μ< 1,08
1	Le Lay	95	98	97	96	98	96,8	1,62	95,18 <μ< 98,42
2	Pont du Braud	86	94	87	89	90	89,2	3,87	85,33 <μ< 93,07
3	Chenal du Curé	78	82	80	90	86	83,2	5,99	77,21 <μ< 89,19
4	Esnandes / sortie pompe drainage récent	32	43	34	33	32	34,8	5,79	29,01 <μ< 40,59
5	Esnandes / lagune drainage récent	35	33	38	30	47	36,6	8,09	28,51 <μ< 44,69
6	Esnandes / sortie pompe drainage ancien	59	62	51	50	53	55	6,52	48,48 <μ< 61,52
7	Esnandes / lagune drainage ancien	98	88	91	89	81	89,4	7,59	81,81 <μ< 96,99
8	Chenal de Lauzières	72	75	73	73	73	73,2	1,36	71,84 <μ< 74,56
9	La Rochelle / bassin des chalutiers	53	42	50	40	58	48,6	9,37	39,23 <μ< 57,97
10	Aytré / sortie de marais	1	1	0	1	2	1	0,88	0,12 <μ< 1,88
11	Chatellailon / sortie de marais	94	89	92	90	95	92	3,17	88,83 <μ< 95,17
12	Rochefort / école de voile	57	47	64	53	56	55,4	7,69	47,71 <μ< 63,09
13	Filières moules	6	1	5	2	5	3,8	2,7	1,10 <μ< 6,50
14	Pas de Tranchais	1	1	2	1	2	1,4	0,68	0,72 <μ< 2,08
15	Pointe de l'Aiguillon	0	1	1	2	2	1,2	1,04	0,16 <μ< 2,24
16	La Carrelère	2	1	1	2	0	1,2	1,04	0,16 <μ< 2,24
17	Fier d'Ars	23	7	8	15	30	16,6	12,26	4,34 <μ< 28,86
18	Fosse de Loix / sortie élevage poissons	100	100	100	99	99	99,6	0,68	98,92 <μ< 100,3
19	Chauveau	4	3	5	0	2	2,8	2,39	0,41 <μ< 5,19
20	Fouras / Pointe de la fumée	3	0	1	1	2	1,40	1,42	-0,02 <μ< 2,82

TABLEAU 3 : Qualité biologique des eaux du Bassin conchylicole de la Rochelle.

III - Résultats et interprétation :

Pour que cette expérience soit valide, il est nécessaire que le pourcentage d'erreurs des acuvettes témoins soit inférieur à 20%. Le pourcentage moyen d'anomalies larvaires obtenu pour 5 essais ne pouvant être sûr à 100%, il est nécessaire d'effectuer un calcul statistique nous permettant de pouvoir borner nos résultats. C'est pourquoi on détermine des intervalles de confiance au seuil de 95 % (I.C. à 95 %), c'est à dire que nous sommes sûrs à 95% que notre comptage de larves est bon, c'est ainsi que l'on a des bornes qui délimitent le pourcentage d'erreurs qui aurait pu être commis lors du comptage.

Cette méthode sera aussi utilisée pour les deux expériences suivantes.

Le pourcentage d'anomalies larvaires dans les témoins est très faible ($0,4 \pm 0,68$), le test a donc été réalisé dans de bonnes conditions (**tableau 3** et **figure 7**).

En ce qui concerne les eaux prélevées dans le bassin conchylicole lui-même (prélèvements 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, et 20), on constate que les pourcentages d'anomalies larvaires varient de $1 \pm 0,88$ (prélèvement 10) à $99,6 \pm 0,68$ (prélèvement 18). Globalement, les eaux océaniques du bassin sont de bonne qualité, seuls les prélèvements 11 et 18 sont affectés d'une pollution notable (les pourcentages d'anomalies étant respectivement de $92 \pm 3,17$ et de $99,6 \pm 0,68$), les prélèvements 13 et 17 rendent compte d'une perturbation plus modérée (respectivement $3,8 \pm 2,7$ et $16,6 \pm 12,26$), les prélèvements 10, 14, 15, 16, 19, et 20 se révèlent identiques au témoin et ne sont affectés par aucune perturbation.

Inversement, les résultats obtenus montrent une très forte perturbation au niveau des eaux douces ou saumâtres (prélèvements 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 et 12) : les pourcentages d'anomalies larvaires varient de $34,8 \pm 5,79$ (prélèvement 4) à $96,8 \pm 1,62$ (prélèvement 1). Tous ces lieux de prélèvements sont affectés d'une pollution forte et massive.

L'évaluation de la qualité biologique de l'eau de la baie de La Rochelle donne des résultats inquiétants. Tous les cours d'eau étudiés se déversant dans le bassin sont fortement pollués. Cependant, l'eau de la partie centrale du bassin est d'une qualité biologique satisfaisante. Ce site parvient donc pour le moment à absorber la pollution, son ouverture océanique étant importante.

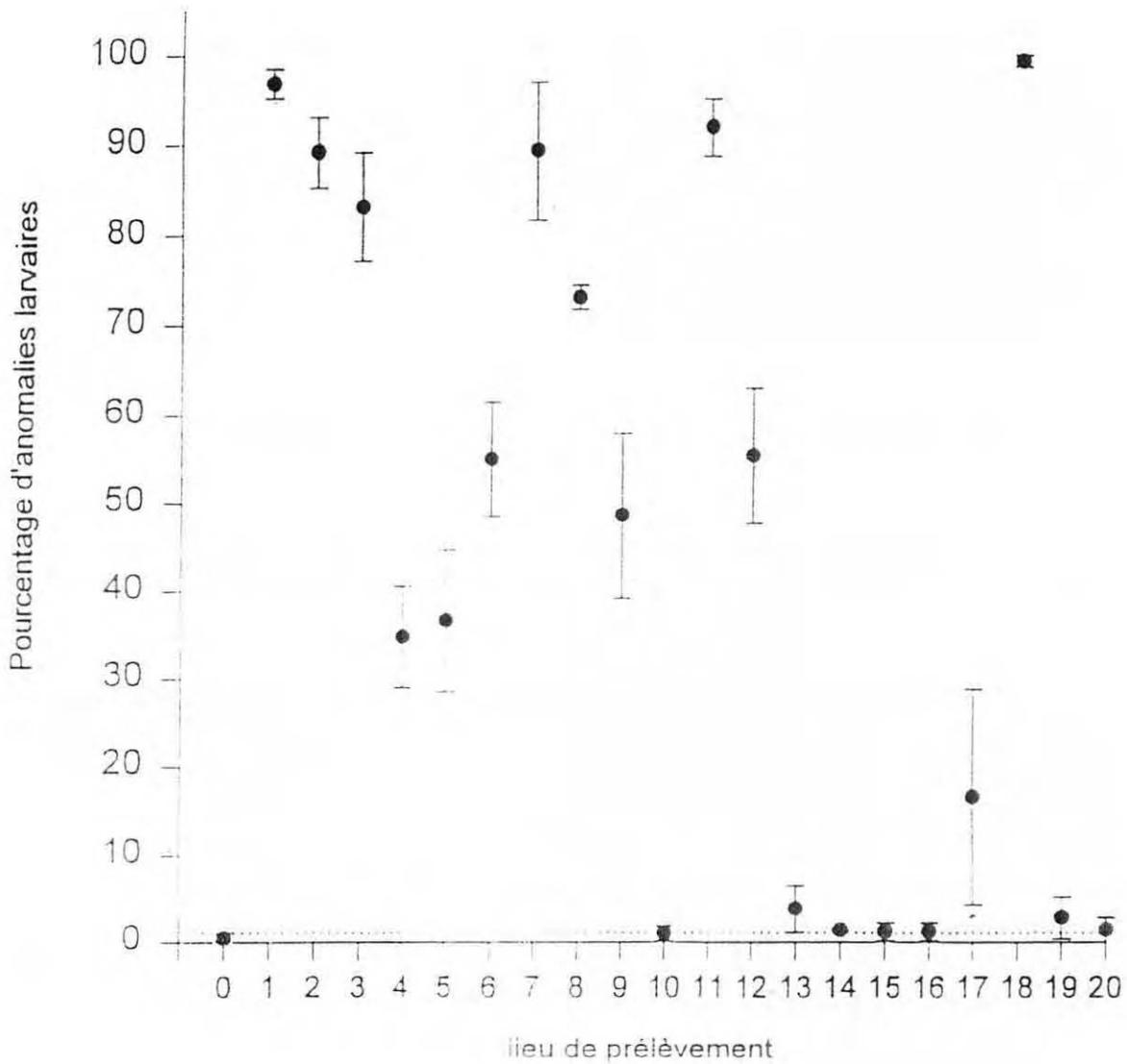


Figure 7 : Qualité biologique des eaux du bassin de La Rochelle
 Pourcentages d'anomalies larvaires et intervalles de confiances à 95 %
 () : Témoin
 : Borne supérieure de l'intervalle de confiance

Les résultats obtenus sont très différents selon les lieux de prélèvement. Dans un but de classification, une échelle a été adoptée:

- Milieu aquatique non pollué : la différence d'anomalie larvaire avec le témoin n'est pas significative au seuil de 95%.

- Milieu aquatique peu perturbé : la différence d'anomalie larvaire avec le témoin est inférieure à 25%.

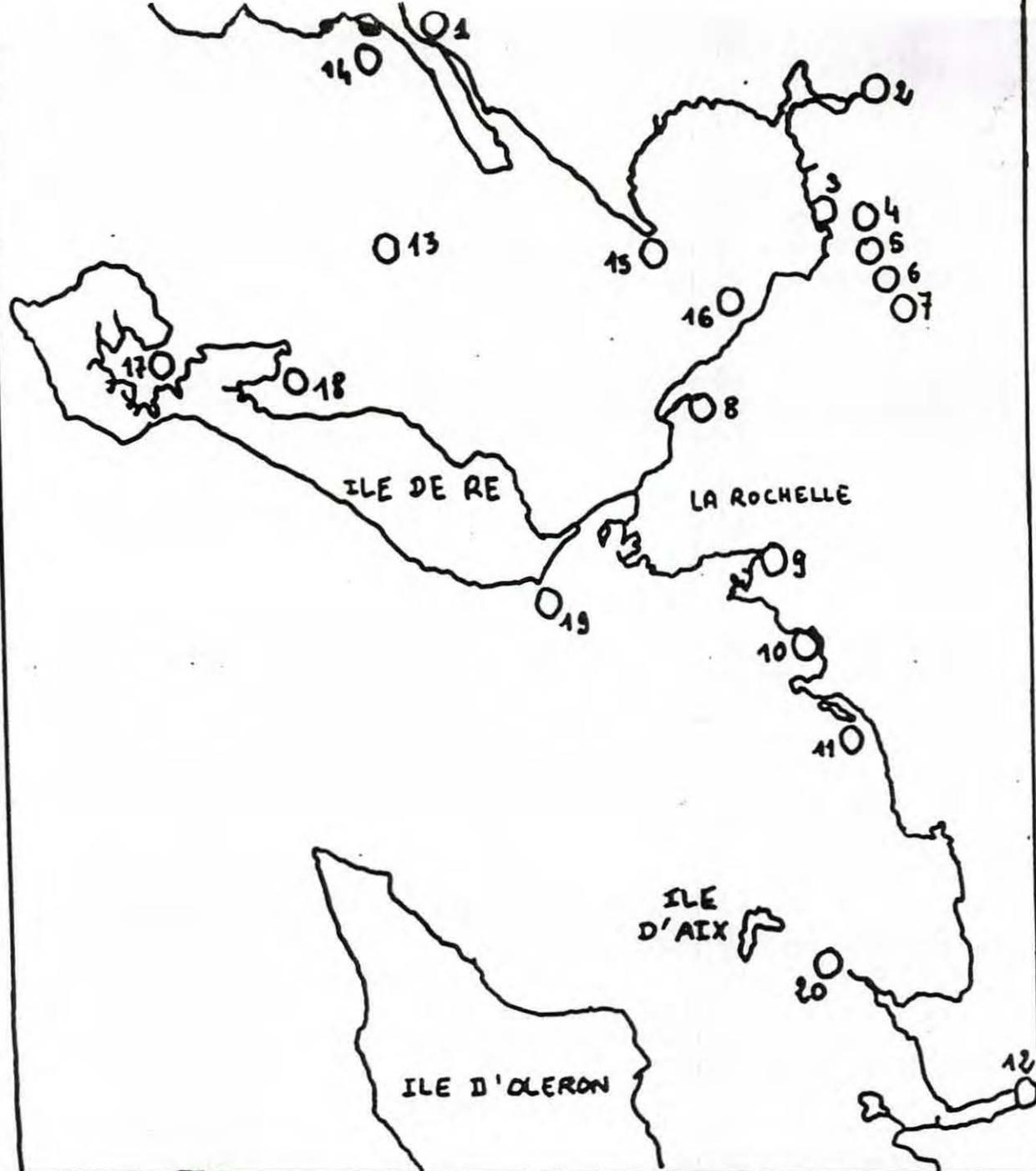
- Milieu aquatique moyennement pollué : la différence d'anomalie larvaire avec le témoin est comprise entre 25 et 50%.

- Milieu aquatique très pollué : la différence d'anomalie larvaire avec le témoin est comprise entre 50 et 75%.

- Milieu aquatique massivement pollué : la différence d'anomalie avec le témoin est supérieure à 75 %.

La visualisation du niveau de pollution des différents lieux de prélèvement est possible avec le **tableau 6**.

Cette baie constitue un site privilégié pour la production d'huîtres et le captage de naissain. Il paraît important de le surveiller régulièrement sur sa totalité afin de déterminer les fluctuations de ces apports au cours du temps. Il semble aussi nécessaire de savoir si cette pollution apportée par les cours d'eau est permanente ou occasionnelle et d'en déterminer la provenance. Compte tenu de la période pendant laquelle cette étude a été réalisée, on peut supposer qu'une fraction importante de cette pollution est due à l'activité agricole, les apports en engrais étant importants durant le printemps, ainsi que les précipitations qui lessivent les sols. Si cette supposition s'avérait exacte, cet apport massif de produits chimiques dans la baie se produirait tous les ans quelques semaines seulement avant le début de la reproduction des huîtres qui pourrait être alors menacée.



- Milieu aquatique non pollué (identique au témoin).
- Milieu aquatique peu perturbé (jusqu'à 25 % d'anomalies larvaires).
- Milieu aquatique moyennement pollué (entre 25 et 50 % d'anomalies larvaires).
- Milieu aquatique très pollué entre 50 et 75 % d'anomalies larvaires).
- Milieu aquatique massivement pollué (entre 75 et 100 % d'anomalies larvaires).

<p align="center">EAU NON POLLUEE (identique au témoin)</p>	<p>10 – Aytré 14 – Pas de Tranchais 15 – Pointe de l’aiguillon 16 – La Carrlière 19 – Chauveau 20 – Fouras / Pointe de la Fumée</p>
<p align="center">EAUX POLLUEES (differentes au témoin)</p>	
<p>Milieu aquatique peu perturbé (jusqu’a 25% d’anomalies larvaires)</p>	<p>13 – Filière à moules 17 – Fier d’Ars</p>
<p>Milieu aquatique moyennement pollué (entre 25 et 50% d’anomalies larvaires)</p>	<p>4 – Esnandes / sortie pompe drainage récent 5 – Esnandes / lagune drainage récent 9 – La Rochelle bassin des chalutiers</p>
<p>Milieu aquatique très pollué (entre 50 et 75% d’anomalies larvaires)</p>	<p>6 – Esnandes / sortie pompe drainage ancien 8 – Chenal de Lauzières 12 – Rochefort / école de voile</p>
<p>Milieu aquatique massivement pollué (entre 75 et 100% d’anomalies larvaires)</p>	<p>1 – Le Lay 2 – Pont du Braud 3 – Chenal du Curé 7 – Esnandes / lagune drainage ancien 11 – Chatellaillon / Sortie du marais 18 – Fosse de Loix / élevage de poisson</p>

TABLEAU 6 : Classification de la qualité biologique des eaux du Bassin conchylicole de La Rochelle

4 ÈME PARTIE

ETUDE DE LA QUALITE BIOLOGIQUE DE SEDIMENTS MEDITERRANEENS

I - Préparation des sédiments :

Les sédiments littoraux étudiés proviennent du pourtour ouest du Bassin Méditerranéen. Ils ont été acheminés après prélèvement à une température de 4 ° C et ont été maintenus 4 semaines à cette température avant la réalisation des tests. Il s'agit de prélèvements effectués au cours de la campagne préliminaire METROMED, destinée à rechercher les zones perturbées sur le pourtour du bassin Méditerranéen, qui s'est déroulée du 31 mars au 30 avril 1994.

Après homogénéisation de l'échantillon, 5 g de chaque sédiment est prélevé et mis en suspension dans 500 ml d'eau de mer filtrée à 0,2 µm par agitation magnétique pendant un dizaine de minutes, à température ambiante (20° C environ). Après arrêt de l'agitation magnétique, une fraction homogène de la solution est prélevée afin de préparer les différentes concentrations.

Pour chaque sédiment 4 valeurs différentes ont été testées :

- 10 g l⁻¹ (solution mère : 5 g de sédiment dans 500 ml d'eau filtrée)
- 5 g l⁻¹ (100 ml de solution mère dans 100 ml litre d'eau filtrée)
- 2 g l⁻¹ (40 ml de solution mère dans 200 ml litre d'eau filtrée)
- 1 g l⁻¹ (25 ml de solution mère dans 250 ml litre d'eau filtrée)

Le choix de ces concentrations a été réalisé afin d'obtenir une réponse : les sédiments étant supposés peu pollués, les différentes valeurs sont relativement élevées.

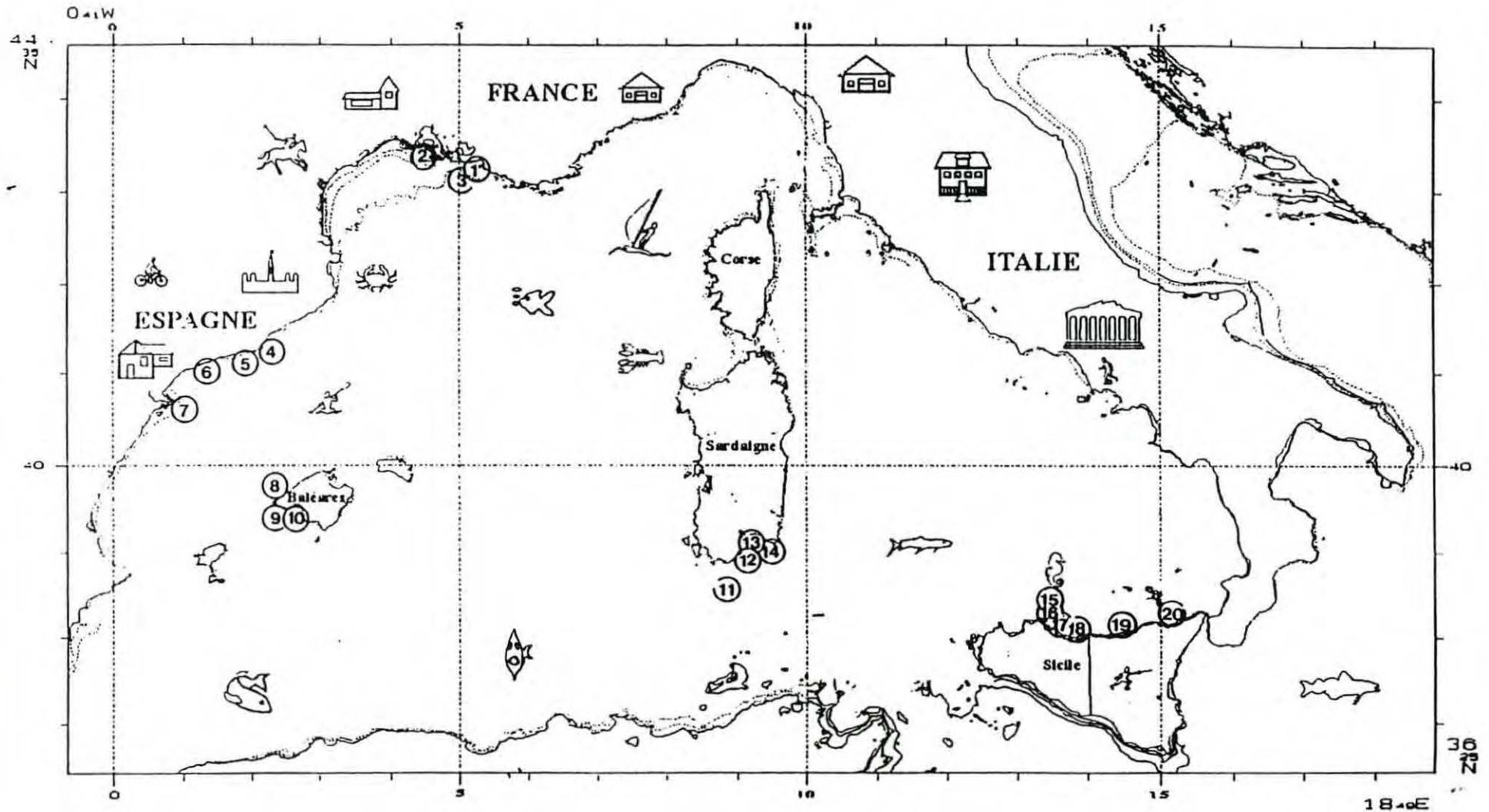


Figure 8 : Localisation des différents lieux de prélèvement des sédiments.

Cortiou (1) – Fos sur mer (2) – Marseille large (3) – Barcelone (4) – Vilanova (5) – Tarragone (6) – Ebre (7) – Baléares (8) – Palma (9) – Palma est (10) – Sardaigne sud (11) – Cagliari (12) – Cagliari (13) – Cagliari raffinerie (14) – Palerme (15) – Palerme (16) – Palerme cote (17) – Castel d'Accio (18) – Cap Finale (19) – Milazzo (20).

II - Lieux de prélèvements :

1	Cortiou
2	Fos sur Mer
3	Marseille large
4	Barcelone
5	Vilanova
6	Tarragone
7	Ebre
8	Balçares
9	Palma
10	Palma est
11	Sardaigne sud
12	Cagliari
13	Cagliari
14	Cagliari / raffinerie
15	Palerme
16	Palerme
17	Palerme cote
18	Castel d'Accio
19	Cap Finale
20	Milazzo

Les résultats obtenus sont portés dans le **tableau 5** et les **figures 9, 10, 11, et 12**. Pour des raisons pratiques de lecture et d'exploitation des résultats, seuls figurent dans le tableau les moyennes, les intervalles de confiance à 95 %, ainsi que les bornes.

Pourcentage d'anomalies larvaires obtenus avec le témoin et les différents sédiments.

	Moyenne	I.C à 95%	min. μ	max.
Témoin	2,8	2,39	0,41 μ	5,19

	1 g/l				2 g/l				5 g/l				10 g/l			
	Moyenne	I.C à 95%	min. μ	max.	Moyenne	I.C à 95%	min. μ	max.	Moyenne	I.C à 95%	min. μ	max.	Moyenne	I.C à 95%	min. μ	max.
1	3,2	2,04	1,16 μ	5,24	10,8	5,92	4,88 μ	16,7	20	5,2	14,8 μ	25,2	22,8	7,98	14,82 μ	30,8
2	3,2	1,36	1,84 μ	4,56	7	1,76	5,24 μ	8,76	18,4	4,94	13,5 μ	23,3	10,8	5,16	5,64 μ	16
3	4,8	2,22	2,58 μ	7,02	5	2,78	2,22 μ	7,78	3,8	2,22	1,58 μ	6,02	4,4	1,11	3,29 μ	5,51
4	1,6	1,42	0,18 μ	3,02	1,2	1,36	-0,16 μ	2,56	3	2,64	0,36 μ	5,64	2,2	1,04	1,16 μ	3,24
5	1,	0,88	0,12 μ	1,88	1,8	1,04	0,76 μ	2,84	1,8	1,04	0,76 μ	2,84	3	1,97	1,03 μ	4,97
6	4	1,52	2,48 μ	5,52	5,4	2,58	2,82 μ	7,98	3,6	1,42	2,18 μ	5,02	2,6	1,11	1,49 μ	3,71
7	2,4	1,11	1,29 μ	3,51	3,2	1,62	1,58 μ	4,82	2,4	0,68	1,72 μ	3,08	3,4	1,89	1,51 μ	5,29
8	1	1,52	-0,52 μ	2,52	3,2	1,62	1,58 μ	4,82	5,4	2,99	2,41 μ	8,39	5	2,49	2,51 μ	7,49
9	3,4	2,08	1,32 μ	5,48	3	1,52	1,48 μ	4,52	1,4	1,11	0,29 μ	2,51	3,2	1,62	1,58 μ	4,82
10	2,8	1,62	1,18 μ	4,42	2,6	0,68	1,92 μ	3,28	2	1,52	0,48 μ	3,52	2,6	1,42	1,18 μ	4,02
11	1,4	2,42	-1,02 μ	3,82	1,4	0,68	0,72 μ	2,08	2	1,76	0,24 μ	3,76	2	1,24	0,76 μ	3,24
12	1,6	1,89	-0,29 μ	3,49	3	2,49	0,51 μ	5,49	2,4	1,42	0,98 μ	3,82	1,4	1,11	0,29 μ	2,51
13	2,4	0,68	1,72 μ	3,08	2,4	1,89	0,51 μ	4,29	2	1,24	0,76 μ	3,24	1,4	1,89	-0,49 μ	3,29
14	1,6	1,11	0,49 μ	2,71	2,4	1,11	1,29 μ	3,51	12,2	5,3	6,9 μ	17,5	8,5	2,41	6,09 μ	10,9
15	1,4	0,68	0,72 μ	2,08	2,8	2,39	0,41 μ	5,19	2,4	1,42	0,98 μ	3,82	2,8	1,04	1,76 μ	3,84
16	1,2	1,62	-0,42 μ	2,82	2,4	0,68	1,72 μ	3,08	2,8	1,84	0,96 μ	4,64	4	1,97	2,03 μ	5,97
17	1,4	1,11	0,29 μ	2,51	3,8	3,56	0,24 μ	7,36	10,8	6,54	4,26 μ	17,3	10,8	5,38	5,42 μ	16,2
18	4,8	2,55	2,25 μ	7,35	1,8	1,04	0,76 μ	2,84	3,4	1,11	2,29 μ	4,51	5,6	2,26	3,34 μ	7,86
19	3,2	2,39	0,81 μ	5,59	16,4	9,08	7,32 μ	25,5	98,4	4,45	94 μ	103	99,8	0,56	99,24 μ	100,4
20	4,8	0,56	4,24 μ	5,36	3	1,24	1,76 μ	4,24	2	1,76	0,24 μ	3,76	4	1,52	2,48 μ	5,52

1 – Cortiou 2 – Fos sur mer 3 – Marseille large 4 – Barcelone 5 – Vilanova 6 – Tarragone 7 – Ebre 8 – Baléares 9 – Palma 10 – Palma est 11 – Sardaigne sud 12 – Cagliari 13 – Cagliari 14 – Cagliari / raffinerie 15 – Palerme 16 – Palerme 17 – Palerme côte 18 – Castel d'Accio 19 – Cap Finale 20 – Milazzo

TABLEAU 5 : Qualité biologique de sédiments méditerranéens.

III - Résultats et interprétation :

Le pourcentage d'anomalies dans les témoins est très faible ($2,8 \pm 2,39$). L'expérience a donc été réalisée dans de bonnes conditions et peut être exploitée.

Les pourcentages d'anomalies larvaires obtenus pour des concentrations en sédiments de 1 g/l varient de $1 \pm 0,88$ (sédiment 5) à $4,8 \pm 2,55$ (sédiment 18). Ces valeurs sont très faibles et très proches du témoin. Pour chacun des sédiments testés, la différence avec le témoin n'est pas significative au seuil de 95 %, aucun sédiment n'exerce une action sur le développement des embryons et des larves d'huîtres pour cette concentration.

Les pourcentages d'anomalies larvaires obtenus pour des concentrations en sédiment de 2 g/l varient de $1,2 \pm 1,36$ (sédiment 4) à $16,4 \pm 9,08$ (sédiment 19). De manière générale, les pourcentages d'anomalies sont très faibles. Seuls deux sédiments sont différents du témoin et exercent une action sur le développement des embryons et des larves. Il s'agit des sédiments 2 et 19 (respectivement $7 \pm 1,67$ et $16,4 \pm 9,08$).

Les tests réalisés avec des concentrations de 5 g/l donnent des résultats qui varient de $1,4 \pm 1,11$ (sédiment 9) à $98,4 \pm 4,45$ (sédiment 19). L'action des sédiments 2 et 19 se confirme avec des pourcentages d'anomalies respectivement égaux à $18,4 \pm 4,94$ et à $98,4 \pm 4,45$. Deux nouveaux sédiments exercent une action sur l'embryogenèse et le développement des larves. Il s'agit des sédiments 1 et 14 avec des pourcentages d'anomalies larvaires respectivement égaux à $20 \pm 5,2$ et $12,2 \pm 5,3$. Les autres sédiments sont identiques au témoin et n'exercent toujours pas d'action sur le développement embryonnaire et larvaire des huîtres.

L'étude de l'action des sédiments à une concentration de 10 g/l confirme l'action des sédiments 1, 2, 14, et 19. Le sédiment 17 exerce à partir de cette concentration une très légère action, le pourcentage d'anomalies larvaires observé étant de $10,8 \pm 5,38$. Les autres sédiments sont comparables au témoin et ne contiennent donc pas d'altéragènes.

Seuls 5 sédiments exercent une action sur l'embryogenèse et le développement des larves. Il s'agit des sédiments 1, 2, 14, 17, et 19.

L'étude de la qualité biologique des sédiments méditerranéens donne des résultats satisfaisants puisque seuls 5 prélèvements sur 20 s'avèrent toxiques. Au cours d'une étude réalisée lors du stage de l'année dernière, il a été mis en évidence que des sédiments portuaires fortement pollués inhibaient totalement l'embryogenèse et le développement des larves d'huîtres dès la concentration de 5 g/l. Sur ces 5 sédiments, seul le prélèvement 19 (Cap Finale) produit une telle action et se révèle donc extrêmement pollué. Les 4 autres sont affectés d'une pollution beaucoup plus faible : le sédiment 3 exerce une action à partir de la concentration de 2 g/l, les sédiments 1, 14, sont moins toxiques et exercent une action à partir de 5 g/l, le sédiment 17 qui n'agit que faiblement à 10 g/l est très légèrement toxique.

Le sédiment 19 est le plus toxique avec une inhibition totale du développement embryonnaire dès 5 g/l. Vient ensuite le sédiment 3 puis le 1. Les sédiments 14 et 17 exercent une action très légère et ne sont pas entièrement dépourvus de toute toxicité. Enfin tous les autres sédiments n'exercent aucune perturbation sur l'embryogenèse et le développement des larves quelle que soit la concentration testée.

Cette étude de détection des milieux pollués n'a permis de mettre en évidence qu'un seul site atteint d'une pollution massive. Sur les 20 lieux de prélèvement, seul la zone littorale de Cap Finale (sédiment 19) devrait faire l'objet d'une étude plus approfondie.

CONCLUSION

CONCLUSION

Au cours de cet stage à l'IFREMER, je n'ai effectué qu'une mince partie des possibilités des études écotoxicologiques, on peut ainsi les appliquer aussi bien aux moules, qu'aux oursins de mer, qu'aux palourdes, etc. Cette richesse nous permet alors d'observer de nouveaux phénomènes quand à la micropollution des organismes aquatiques. C'est ainsi que l'on peut déceler, intervenir, et répondre aux problèmes importants par des moyens simples mais néanmoins efficaces.

Mais une étude plus poussée doit être effectuée, afin de pouvoir observer les effets, et la nature du micropolluants, mes travaux sont donc les précurseurs d'une expérience de type européen, où là, des élevages de larves seront observés, nourris, analysés, etc.

La station de l'IFREMER d'Arcachon est la pionnière en matières d'élevages de larves de bivalves, grâce essentiellement à Mr E. HIS qui a su adapter aux anciennes méthodes d'analyses, des moyens techniques nouveaux efficaces et simples. On peut ainsi faire vivre des larves d'huîtres en laboratoire de 4 à 6 mois, et observer les effets des micropolluants à long terme.

Ces nouvelles méthodes font l'intérêt de nombreuses personnes, c'est ainsi qu'une commission européenne met des capitaux à "disposition" aux nombres croissants de nouveaux chercheurs, qui s'intéressent à ses recherches.

J'espère que les résultats vont être pris en compte, et que des mesures préventives puis définitives vont être prises, afin que le milieu aquatique conserve son charme.

BIBLIOGRAPHIE

Calabrese A. et Davis H.C., 1967. Effects of "soft" detergents on embryos and larvae of the American oyster (*Crassostrea virginica*). *Proc.Natn. Shellfish. Ass.*, **57**, 11-16.

Calabrese A. et Davis H.C., 1970. Tolerances and required of embryos and larvae of bivalve molluscs. *Helgoländer Meeresunters*, **20**, 553-564.

Carriker M.R., 1961. Interrelation of functional morphology, behavior, and autecology in early stages of the bivalve *Mercenaria mercenaria*. *J. Elisha Mitchell scient.Soc.*, **77**, 167-241.

Fujita T., 1929. On the early development of the common Japanese oyster. *Japan. J. Zool.*, **2(3)**, 353-358.

Fujita T., 1934. Note on the Japanese oyster larva. *In Proceedings of the Fifth Pacific Sciences Congress, Canada 1933*, **5**, 4111-4117.

Geller S., 1979, Abrège de Statistique. Edition Masson, Paris, 222p.

Gérard A., 1978. Recherches sur la variabilité de diverses populations de *Ruditapes decussatus* et *Ruditapes philippinarum* (Veneridae, Bivalvia). Thèse 3ème cycle, 23 septembre 1978, Fac. Sci. Brest, 147p.

His E., 1973. La reproduction de *Crassostrea gigas* Thunberg dans le Bassin d'Arcachon : bilan de deux années d'observations. *C.I.E.M.*, CM/K : 17, 9p.

His E., 1975. La détection des pontes dans le milieu naturel : application de l'ostréographie à l'étude de la reproduction des huîtres. *Haliotis*, **5**, 206-213.

His E., 1976. Contribution à l'étude biologique de l'huître dans le Bassin d'Arcachon, activité valvaire de *Crassostrea angulata* et *Crassostrea gigas* ; application à l'étude de la reproduction de l'huître japonaise. Thèse pour l'obtention du titre de Docteur en Sciences Biologiques, Bordeaux I, 63p.

His E., 1990. Biologie et écotoxicologie des véligères de *Crassostrea gigas* (Thunberg) dans le Bassin d'Arcachon. Thèse pour obtenir le titre de Docteur d'Etat Ès Sciences, Bordeaux I, 200p.

Loosanoff V.L., 1945. Precocious gonad development in oyster induced in mid winter by high temperature. *Science*, **102**, 124-125.

Stebbing A.R.D., Akesson B., Calabrese A., Gentile J.H., Jensen A. et Lloyd R., 1980. The role of bioassays in marine pollution. *Rapp. P. V. Réun. Cons. Int. Explor. Mer*, **179**, 322-332.

Woelke C.E., 1967. Measurement of water quality with the Pacific oyster embryo bioassay. *Water Quality Criteria*, ASTM STP **416**, Am. Soc. Testing Mats, 112-120.

Woelke C.E., 1972. Development of a receiving water quality criterion based on the 48 hours Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) embryo. *Washington Departement of Fisheries, Technical Rep.*, **9**, 1-93.

LEXIQUE

Acinus : Masse arrondie de quelques cellules sécrétrices, autour l'extrémité en cul-de-sac du canal d'une glande.

Altérage : Agent extérieur qui provoque une, des altérations dans les cellules vivantes.

Anthropiques : Dont la formation résulte essentiellement de l'action humaine, en parlant d'un organisme marin, d'un sol, etc.

Blastomère : Nom des cellules provenant des premières divisions de l'oeuf fécondés (blastula, morula).

Blastopore : Orifice de l'intestin embryonnaire primitif (ou archentéron).

Blastula : Stade du développement de l'embryon, qui se présente sous la forme d'une sphère à paroi épithéliale. La blastula succède à la morula et précède la gastrula.

Euryhalins : Qui supporte de grandes différences de salinité, en parlant d'un organisme marin.

Gastrula : Stade du développement embryonnaire caractérisé par l'invagination de l'un des 2 pôles de la blastula sous forme d'un sac à 2 ou 3 feuillets (ectoderme, et endoderme, ou ectoderme, mésoderme, et endoderme).

Hermaphrodites : Dit d'un être vivant où sont présents les organes reproducteurs des deux sexes.

Hormone : Substances sécrétée par une glande endocrine ou élaborée par un tissu, exerçant une action biologique spécifique sur le fonctionnement d'un organe ou sur un processus biochimique.

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