

CONTRIBUTION A L'ETUDE  
ECOTOXICOLOGIQUE  
DES EAUX DE REJETS AGRICOLES EN MILIEU  
MARIN :  
TESTS LARVAIRES SUR L'HUITRE  
CRASSOSTREA GIGAS



Stage du 13 avril au 19 juin 2004

IUT Génie Biologique de La Rochelle  
Option Analyses Biologiques et Biochimiques  
15 rue François de Vaux de Folletier  
17 026 La Rochelle cedex 1



Ifremer

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier, toute l'équipe du laboratoire LERPC de la station IFREMER de La Tremblade pour son accueil chaleureux leur aide et leurs précieux conseils durant toute la durée de mon stage.

Je remercie, tout particulièrement, mon maître de stage monsieur Masson pour sa disponibilité, son aide pour mettre en place la manipulation, son savoir-faire en matière de test écotoxicologique ainsi que pour son aide pour la rédaction de ce rapport de stage.

Un grand merci pour Véronique qui m'a appris à réaliser la manipulation nécessaire, qui m'a épaulée au cours du suivi des résultats et sans qui ce stage n'aurait pas été le même.

Je remercie toute l'équipe de l'écloserie pour m'avoir accueilli et m'avoir fait découvrir et participer à leur travail.

Enfin le bon déroulement de ce stage n'aurait pas été possible sans la patience, la gentillesse et la bonne humeur de toute l'équipe de la station IFREMER de La Tremblade. Merci à tous.

# SOMMAIRE

PRÉSENTATION DE LA STATION IFREMER DE LA TREMBLADE.....	3
INTRODUCTION .....	5
LE CONFLIT AGRO-CONCHYLICOLE ET LA SENSIBILITÉ DES CULTURES D'HUÎTRES. ....	7
1. LE CONFLIT AGRO-CONCHYLICOLE :.....	7
2. SENSIBILITÉ DES CULTURES D'HUÎTRES : .....	9
RAPPELS SUR LES HUITRES :.....	11
1. GÉNÉRALITÉS SUR L'HUÎTRE : .....	11
2. REPRODUCTION DE L'HUÎTRE : .....	13
➤ Gamétogenèse et ponte :.....	13
➤ Fécondation :.....	13
➤ Développement embryonnaire :.....	14
➤ Développement larvaire :.....	15
OBJECTIFS ET PRINCIPE DU TEST LARVAIRE D'HUÎTRE :.....	19
1. OBJECTIFS DU TEST LARVAIRE :.....	19
2. PRINCIPE DU TEST LARVAIRE :.....	19
MATÉRIEL UTILISÉ POUR UN TEST LARVAIRE D'HUÎTRE :.....	20
1. CHOIX DES POINTS DE PRÉLÈVEMENT (VOIR SCHÉMA DE SITUATION ET ANNEXE 1) :.....	20
➤ Point de prélèvement n°1 : Vanne de Montportail : (photo en annexe 3).....	20
➤ Point de prélèvement n°2 : Vanne des Tannes. : (photo en annexe 3).....	20
➤ Point de prélèvement n°3 : Havre de Brouage : (photo en annexe 3).....	20
➤ Point de prélèvement n°4 : Ecluse de Beaugeay : (photo en annexe 3).....	21
2. LISTE DU MATÉRIEL NÉCESSAIRE À LA RÉALISATION D'UN TEST LARVAIRE D'HUÎTRE :.....	21
PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL : .....	22
1. PREMIER JOUR DU TEST : .....	22
➤ Préparation des huîtres pour le test : .....	22
➤ Prélèvements :.....	22
➤ Préparation de l'eau de mer filtrée à 2µm : .....	22
2. DEUXIÈME JOUR DU TEST : .....	23
➤ Préparation des échantillons :.....	23
➤ Déclenchement de l'émission des gamètes :.....	23
➤ Sélection des meilleurs géniteurs pour la fécondation : .....	23
➤ Fécondation :.....	24
➤ Numération des œufs et calcul du volume à prélever : .....	25
3. TROISIÈME JOUR DU TEST : LECTURE ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS :.....	25
➤ Echelle d'Edouard His : .....	26
RÉSULTATS.....	27
1. TEST LARVAIRE D'HUÎTRE SUR LES PRÉLÈVEMENTS DU 6 MAI 2004 : .....	27
➤ Température et salinité des échantillons : .....	27
➤ Tableau des résultats : .....	27
Représentation graphique des résultats : .....	27
➤ Commentaires :.....	27
2. TEST LARVAIRE D'HUÎTRE SUR LES PRÉLÈVEMENTS DU 11 MAI 2004 : .....	28

➤	<i>Température et salinité des échantillons :</i>	28
➤	<i>Tableau des résultats :</i>	28
	<i>Représentation graphique des résultats :</i>	28
➤	<i>Commentaires :</i>	28
3.	TEST LARVAIRE D'HUÎTRE SUR LES PRÉLÈVEMENTS DU 17 MAI 2004 :	29
➤	<i>Température et salinité des échantillons :</i>	29
➤	<i>Tableau des résultats :</i>	29
	<i>Représentation graphique des résultats :</i>	29
➤	<i>Commentaires :</i>	29
4.	TEST LARVAIRE D'HUÎTRE SUR LES PRÉLÈVEMENTS DU 24 MAI 2004 :	30
➤	<i>Température et salinité des échantillons :</i>	30
➤	<i>Tableau des résultats :</i>	30
	<i>Représentation graphique des résultats :</i>	30
➤	<i>Commentaires :</i>	30
5.	TEST LARVAIRE D'HUÎTRE SUR LES PRÉLÈVEMENTS DU 1 JUIN 2004 :	31
➤	<i>Température et salinité des échantillons :</i>	31
➤	<i>Tableau des résultats :</i>	31
	<i>Représentation graphique des résultats :</i>	31
➤	<i>Commentaires :</i>	31
6.	TEST LARVAIRE D'HUÎTRE SUR LES PRÉLÈVEMENTS DU 2 JUIN 2004 :	32
➤	<i>Température et salinité des échantillons :</i>	32
➤	<i>Tableau des résultats :</i>	32
	<i>Représentation graphique des résultats :</i>	32
➤	<i>Commentaires :</i>	32
	DISCUSSION SUR LES RÉSULTATS	33
1.	EVOLUTION DE POURCENTAGE D'ANOMALIES LARVAIRES SELON LES SITES :	33
2.	COMPARAISON DES RÉSULTATS AVEC LA PLUVIOMÉTRIE :	34
	CONCLUSION	35
	BIBLIOGRAPHIE	36
	ANNEXES	36

## PRESENTATION DE LA STATION IFREMER DE LA TREMBLADE

L'IFREMER : Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la MER, est un établissement public à caractère industriel et commercial. Il a été fondé par le décret du 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 de différents ministères :

- ✓ Le ministère de la recherche.
- ✓ Le ministère de l'agriculture et de la pêche.
- ✓ Le ministère de l'équipement.
- ✓ Le ministère des transports et du logement.
- ✓ Le ministère de l'environnement.

Il est composé de 1 700 cadres, chercheurs, ingénieurs, marins, techniciens et administratifs. Cet institut dispose de 78 laboratoires, répartis en 24 stations ou centres (Boulogne, Nantes, Brest, Toulon, Tahiti) sur le littoral métropolitain et dans les DOM-TOM.

Son budget annuel est de 150 millions d'euros (soit environ 1 milliard de francs) provenant des subventions accordées par l'état et de ses ressources propres (15%).

La station IFREMER de La Tremblade est spécialisée dans les domaines de la conchyliculture (du fait de sa position géographique au centre du bassin Marennes-Oléron) et de la surveillance du littoral. Son travail essentiel consiste à améliorer les conditions d'élevage des coquillages.

La station IFREMER de La Tremblade Comprend deux laboratoires :

✓ Le Laboratoire Environnement -Ressources Poitou Charentes (LERPC) : c'est le laboratoire où j'effectue mon stage. Il assure notamment une surveillance de la qualité des eaux et des coquillages, de manière à ce qu'ils soient propres à la consommation.

Trois réseaux de surveillance nationaux sont mis en œuvre dans les stations côtières :

➤ Le Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin (RNO) qui étudie la teneur en micropolluants des coquillages.

➤ Le Réseau de contrôle Microbiologique (REMI) qui surveille la qualité microbiologique des mollusques exploités dans les zones de production conchylicole.

➤ Le Réseau de suivi du Phytoplancton (REPHY) surveille l'apparition des espèces toxiques de phytoplanctons dans le bassin de Marennes-Oléron.

D'autres programmes sont suivis par le laboratoire : Eaux de ballasts de navires vecteurs d'espèces marines nuisibles, écotoxicologie des eaux de rejets agricoles (projet prévu sur trois ans dans lequel je travaille).

✓ Le laboratoire L.G.P (Laboratoire Génétique et Pathologie) : qui travaille sur les caractères génétiques pour améliorer la résistance des coquillages du bassin aux maladies (épizooties), ainsi que étudie la croissance des coquillages pour en améliorer leur production.

## INTRODUCTION

L'intensification de l'agriculture et la multiplication des zones de cultures au cours de ces dernières années dans le marais littoral Charentais à proximité de zones conchylicoles suscite l'inquiétude des ostréiculteurs quant à la qualité des eaux de drainage évacuées des marais vers la mer.

Jusque dans les années 1980 la cohabitation entre ostréiculteurs et agriculteurs ne posait pas de problèmes, en effet la qualité du produit était préférée à sa quantité : l'activité agricole était essentiellement composée d'élevages extensifs (ovins, bovins) sur des prairies naturelles, occupant les anciens marais salants.

Le problème est apparu avec les cultures céréalières intensives sur sol drainé consommant une grande quantité de produits phytosanitaires : herbicides, insecticides et molluscicides. Une partie des produits épandus se retrouve dans les systèmes de drainage. En cas de fortes pluies l'eau stagnante est évacuée vers la mer afin d'éviter l'inondation. C'est ainsi que les molécules (herbicides, insecticides et molluscicides, **(annexe 2)**) peuvent se retrouver dans le milieu marin à proximité des exploitations conchylicoles, et dans le marais salé (claires).

En 1988, un accord entre les agriculteurs et les ostréiculteurs a été trouvé pour la gestion quantitative des rejets (baisses de salinité néfastes aux coquillages). Il était également prévu que l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) et l'IFREMER (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la MER) mettent en place un programme de recherche pouvant répondre à la question suivante : « Les eaux de rejets agricoles ont-elles ou non une action néfaste sur la vie marine ? »

La zone de production ostréicole la plus importante au contact de cultures intensives drainées est en effet le bassin de Marennes-Oléron et plus particulièrement le marais de Moeze-Brouage choisi par ailleurs comme site atelier.

Le premier outil mis en œuvre pour répondre à cette question est un test écotoxicologique basé sur les malformations pouvant être produites par les molécules phytosanitaires sur les larves de l'huître *Crassostrea gigas* (espèce cultivée dans le bassin de Marennes-Oléron), induisant la mort assurée de la larve. Dans un écosystème marin en équilibre, la reproduction des mollusques se fait sans incident, ce qui fait de ce test un témoin du bon état écologique du milieu. L'huître filtrant l'eau de mer pour se nourrir est également susceptible d'accumuler des résidus de pesticides rejetés par le marais.

La première partie, présentera de manière plus détaillée le problème qui motive ce sujet d'étude : le conflit agro-conchylicole.

La deuxième partie, permettra faire un rappel sur la biologie de l'huître creuse : *Crassostrea gigas*.

La troisième partie sera développement sur le test écotoxicologique larves d'huîtres : but, principe, matériel, protocole expérimental.

Enfin, l'étude sera clôturée par les résultats avec leur analyse.

# LE CONFLIT AGRO-CONCHYLICOLE ET LA SENSIBILITE DES CULTURES D'HUITRES.

## 1. Le conflit agro-conchylicole :

Le littoral de Charente-Maritime est composé de nombreux marais salés (anciens marais salants) qui depuis le XIX<sup>ème</sup> siècle servent à la conchyliculture (culture de coquillages) et principalement à l'ostréiculture (culture de l'huître) qui est la principale activité conchylicole du département.

Avec l'implantation des cultures intensives (blé, maïs, orge, tournesol...) des années 1980 sur le marais doux, le problème s'est intensifié.

Le bassin versant de la Charente compte 10 000 km<sup>2</sup> (1 million d'ha dont 75% de terres agricoles), d'après les données du Recensement Général de l'Agriculture (R.G.A) de 1980, ces terres agricoles se répartissent de la manière suivante : céréales 40%, vigne 10%, cultures fourragères 40%, autres 10%. (annexe 1)

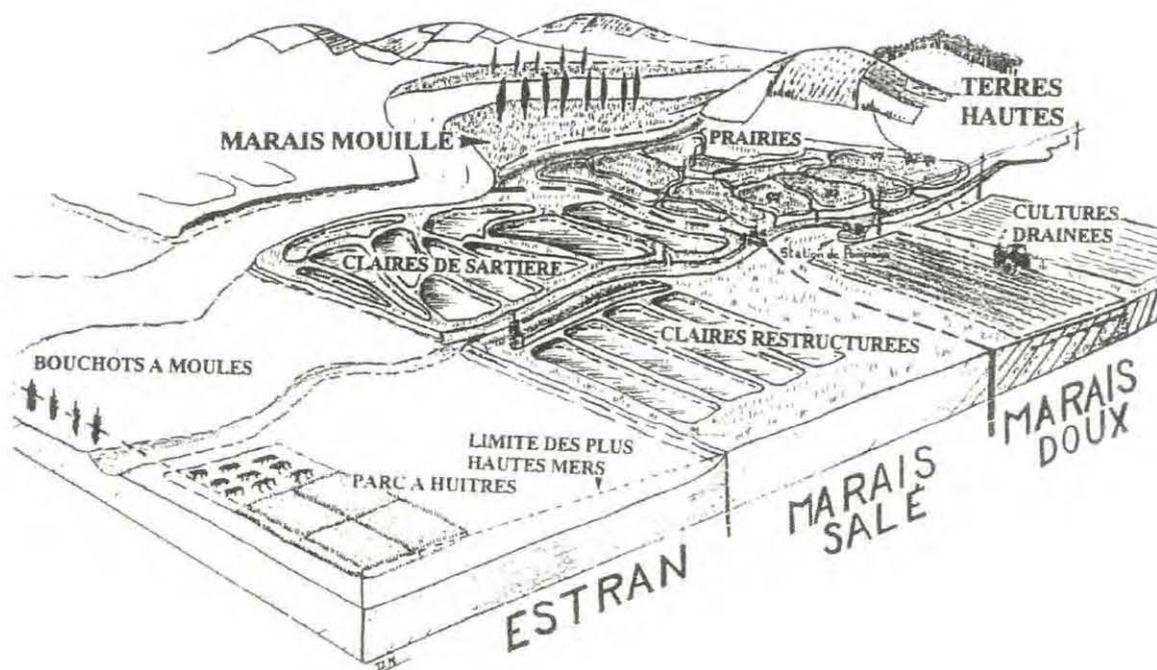


Schéma du marais, cohabitation agro-conchylicole (D.Masson)

- Le point de vue des agriculteurs :

Dans les marais doux littoraux charentais, le sol est imperméable ce qui oblige les agriculteurs à créer des drains pour évacuer l'eau des cultures et obtenir une terre arable.

➤ En été, il faut maintenir un niveau d'eau suffisant pour servir de clôture et d'abreuvoir aux bovins du marais.

➤ En hiver, il faut évacuer l'eau des terres cultivées, pour éviter l'asphyxie racinaire des plantes.

- Le point de vue des conchyliculteurs :

Le bassin de Marennes-Oléron est la première zone ostréicole européenne : 50% des huîtres creuses consommées en France sont expédiées vers le secteur commercial (environ 60 000 tonnes par an). La culture des huîtres se fait en deux phases :

⇒ La croissance : qui se fait sur l'estran (**schéma du marais**).

⇒ L'affinage se fait en claire (plan d'eau situé sur la partie salée du marais).

Les claires sont alimentées en eau salée par des chenaux dont l'embouchure peut se situer à proximité des canaux de rejet d'eau douce ou en constituer le prolongement. Ces canaux contiennent les eaux de drainage acheminées depuis les exploitations agricoles voisines et sont susceptibles de contenir des résidus de produits phytosanitaires qui pourraient être dangereux pour les productions conchylicoles. De plus les zones d'estran servant à la conchyliculture se trouvent souvent à proximité de la sortie de ces canaux vers la mer, contrôlée par des vannes.

En cas de forte pluie d'automne, le ruissellement des terres hautes joint à la nécessité d'ouvrir les vannes du marais doux pour ne pas noyer les cultures : une baisse de salinité du marais salé, pouvant provoquer des mortalités d'huîtres (stockées en marais ou en réservoir) par choc osmotique.

La reproduction estivale des huîtres nécessite :

- Soit une température élevée de l'eau si la salinité est élevée (été sec).
- Soit une salinité plus faible si la température de l'eau est basse (été frais)

Si l'été est frais et sec : mauvaise reproduction (survie problématique des larves).

L'eau peut également contenir des nitrates ou des phosphates apportés par l'engrais épandu sur les îlots de culture ainsi que des produits phytosanitaires :

- Les produits phytosanitaires : (**annexe 2**)

L'activité agricole consomme beaucoup de produits phytosanitaires, surtout pour les cultures intensives.

Les plus utilisés sont : ⇒ Les herbicides (désherbant total puis sélectif).

⇒ Les fongicides.

⇒ Les insecticides.

La toxicité des produits est globalement faible pour les fongicides, faible à moyenne pour les herbicides, forte à très forte pour les insecticides. Plus les agriculteurs s'engagent dans la voie de l'intensification, plus l'utilisation des produits phytosanitaires s'accroît, et donc plus les risques toxicologiques sont élevés.

D'une manière générale, il est important de noter les très grands progrès effectués par l'industrie phytosanitaire en matière de sélectivité et de dégradation des produits.

Les produits phytosanitaires ont divers impacts néfastes sur l'environnement :

➤ Sur les mollusques cultivés : la toxicité de ces produits phytosanitaires, provoque des malformations au niveau larvaire sur les mollusques tels que les huîtres.

➤ Sur le phytoplancton : les désherbants peuvent se retrouver en solution dans l'eau et détruisent ainsi le phytoplancton qui est la principale source de nourriture pour les mollusques filtreurs.

La présence de produits phytosanitaires est dangereuse pour l'équilibre des écosystèmes marins côtiers.

L'évaluation des risques de résidus de pesticides sur des mollusques aquatiques filtreurs (larves et adultes) implique la disponibilité de données toxicologiques précises. Il s'agit d'évaluer d'une part la toxicité directe (toxicité aiguë) ou à long terme (toxicité chronique) et d'autre part d'apprécier les effets indirects qui jouent sur la chaîne alimentaire (phytoplancton).

Enfin il faut savoir qu'il n'y a pas de tests sur les organismes marins avant la délivrance de l'AMM (autorisation de mise sur le marché) d'un produit phytosanitaire.

## 2. Sensibilité des cultures d'huîtres :

Les chercheurs redoublent de vigilance afin d'assurer aux cheptels français en élevage une protection satisfaisante face aux risques d'épidémies. A cet égard, depuis le début des années 90, un réseau spécialisé dans la surveillance zoosanitaire a été créé par l'IFREMER (LE REPAMO).

Le corps de l'huître peut abriter des parasites bénins ou dangereux pour sa santé. Ainsi certains trématodes, cestodes, copépodes et certaines grégarines diminuent la croissance du mollusque. Cependant il existe d'autres microorganismes capables de déclencher des maladies graves à caractère endémique (maladies qui ne s'observent que dans un secteur géographique particulier et nulle part ailleurs) ou épidémiques (maladies qui se propagent au sein d'une espèce sans tenir compte des barrières géographiques) entraînant une mortalité massive :

### Les champignons :

*Labyrinthomyxa marina* provoque une maladie à conséquences économiques : dans certains cas la mortalité a atteint 95 % de la population.

*Ostracoblabe implexa* est responsable de « la maladie de la coquille » : c'est une malformation des valves du coquillage qui entraîne la mort de l'individu.

### Les virus :

En août 1970 une grave maladie se déclare dans le bassin de Marennes-Oléron : les huîtres portugaises (*Crassostrea angulata*) sont atteintes par un virus qui les décime. Cette maladie s'étend sur toute la côte atlantique française, les conséquences économiques pour le secteur ostréicole sont sans précédent. Cette situation persista jusqu'en 1973, date à laquelle fut introduite *Crassostrea gigas* également appelée huître du pacifique : « l'huître japonaise ».

### Les flagellés :

*Hexamita* est responsable d'une infection mortelle pour l'huître.

### Les halosporidioses :

Cette maladie est due à deux protistes du phylum des Haplosporidia : *Minchinia nelsoni* et *Milchinia costalis Minchinia nelsoni*. Cette infection se produit en été, et provoque une destruction graduelle de l'épithélium des tubules digestifs.

Les facteurs environnementaux : la chaleur, une baisse de la salinité, une nutrition insuffisante ou des erreurs de zootechnie (manipulation des coquillages en période critique comme la reproduction), augmentent également les risques de mortalité pour les huîtres.

## RAPPELS SUR LES HUITRES :

### 1. Généralités sur l'huître :

L'huître utilisée pour cette étude appartient à l'espèce : *Crassostrea gigas*. Cette espèce est d'origine pacifique (« japonaise »), elle a été introduite à la suite de l'épizootie de 1970, comme espèce de remplacement, *Crassostrea angulata* (l'huître portugaise élevée jusque à) ayant disparu. *Ostrea edulis* l'espèce indigène a elle aussi été victime d'épizooties.

Règne :	Animal
Embranchement :	Mollusque
Classe :	Bivalve
Ordre :	Filibranchia
Sous ordre :	Anisomyaria
Famille :	Ostreidae
Genres :	Pycnodonta, Crassostrea, Ostrea
Espèces :	Pycnodonta : hyotis, cohlear, numisma... Crassostrea : virginica, gigas, angulata, margaritacea, glomerata, rhizophorae, guyanensis, cucullata... Ostrea : edulis, sinuata, lurida, denselamellosa, chilensis, puelchana, stentina...

Carte d'identité de huître.

Les *Crassostrea* sont des huîtres de l'estran (partie du littoral découvrant à chaque marée). La reproduction a lieu à l'extérieur de l'animal, au hasard des rencontres entre ovules et spermatozoïdes.

Le genre *Ostrea* vit dans les zones toujours immergées ou ne se découvrant qu'occasionnellement a un mode de reproduction différent : la fécondation se fait à l'intérieur de la coquille, puis les larves sont rejetées vers le monde extérieur.

L'huître se nourrit de phytoplancton : elle est planctonophage, et se compose de deux parties principales : - la coquille.  
- le corps.

La coquille est composée de deux valves. La valve la plus creuse est appelée valve inférieure, elle contient le corps de l'animal. L'autre valve plus plate, appelée valve supérieure permet de fermer la coquille lorsque l'huître n'a plus besoin de filtrer l'eau

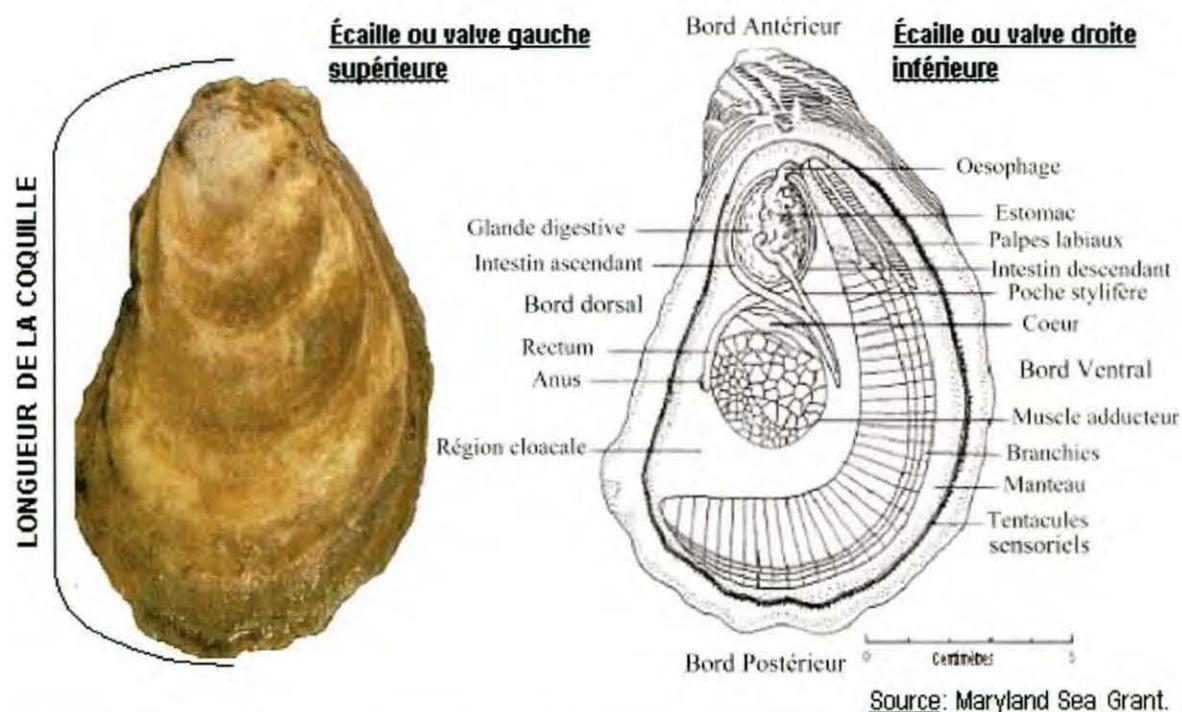
pour se nourrir. La charnière commande l'ouverture tandis que le muscle adducteur donne la possibilité à l'huître de la maintenir fermée.

Le rôle du manteau : Ce fin voile de chair assure la croissance et le développement de la coquille du mollusque. Il contribue aussi à la fabrication de la nacre qui en recouvre l'intérieur.

Les branchies : Elles ont deux rôles bien distincts : la respiration et l'apport des matières nutritives jusqu'à la bouche de l'huître.

Si une huître est bien ouverte, il arrive qu'on voie encore battre le cœur de l'huître qui se situe juste au-dessus du muscle adducteur. Le sang de l'huître est incolore.

L'appareil reproducteur : l'anatomie de son appareil reproducteur est simple. Il est constitué de tubules qui se développent progressivement lors de la gamétogenèse.



Anatomie de l'huître *Crassostrea gigas*.

## 2. Reproduction de l'huître :

### ➤ Gamétogenèse et ponte :

La sexualité de l'huître est particulière : l'huître fait preuve d'hermaphroditisme successif dans le sens où son sexe change suivant l'âge (une première année elle sera mâle puis deviendra femelle la seconde année). La gamétogenèse dépend de plusieurs facteurs environnementaux, essentiellement la température et la nourriture mais également des facteurs internes (hormonaux). L'huître prépare ses gamètes au printemps, dès que la température dépasse les 10°C. A la fin de la gamétogenèse, la maturation des gamètes intervient ; cette étape ne peut être discernée ni macroscopiquement, ni microscopiquement. Ensuite, elle attend les conditions favorables à l'émission de ses gamètes : une eau assez chaude (18°C au moins) et une bonne salinité. Un état particulier (appelé la « phase instable ») est atteint : l'application d'un ou plusieurs stimuli provoque la ponte ou l'éjaculation (chocs thermiques, variations de la salinité, différence de pression). C'est souvent par un temps orageux ou instable que l'huître libère ses gamètes.

L'émission des gamètes mâles (éjaculation) se produit sous la forme d'un mince filet continu blanc, sans mouvements valvaires spécifiques, bien que l'amplitude d'ouverture soit plus importante qu'en temps normal.

A l'inverse, la ponte s'accompagne d'une activité valvaire particulière qui s'observe durant toute l'émission avec un rythme remarquable. La valve droite operculaire se soulève lentement avec une amplitude inhabituelle, puis marque un léger palier et enfin s'abaisse brutalement pour provoquer l'expulsion des ovocytes, on dit qu'elle « claque », par contagion, l'émission des gamètes provoque celle des individus voisins.

Il arrive alors que la mer elle-même prenne une teinte blanchâtre tant les émissions sont importantes. Une seule huître rejette entre 20 et 100 millions d'ovules et encore plus de spermatozoïdes. Les gamètes se rencontrent au hasard des courants dans le milieu marin. Sur les milliards de larves ainsi formées, seules 10% survivent.

### ➤ Fécondation :

La fécondation, externe, intervient quelques minutes après la rencontre des gamètes mâles et femelles, qui a lieu dans le milieu marin.

➤ Développement embryonnaire :

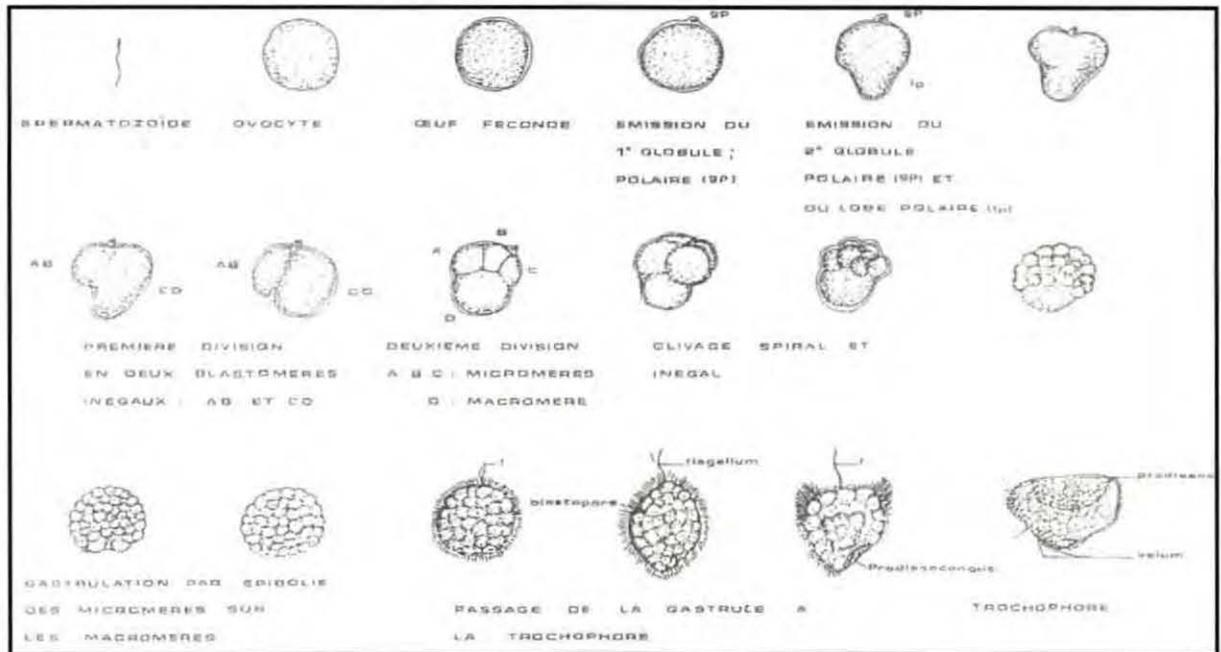
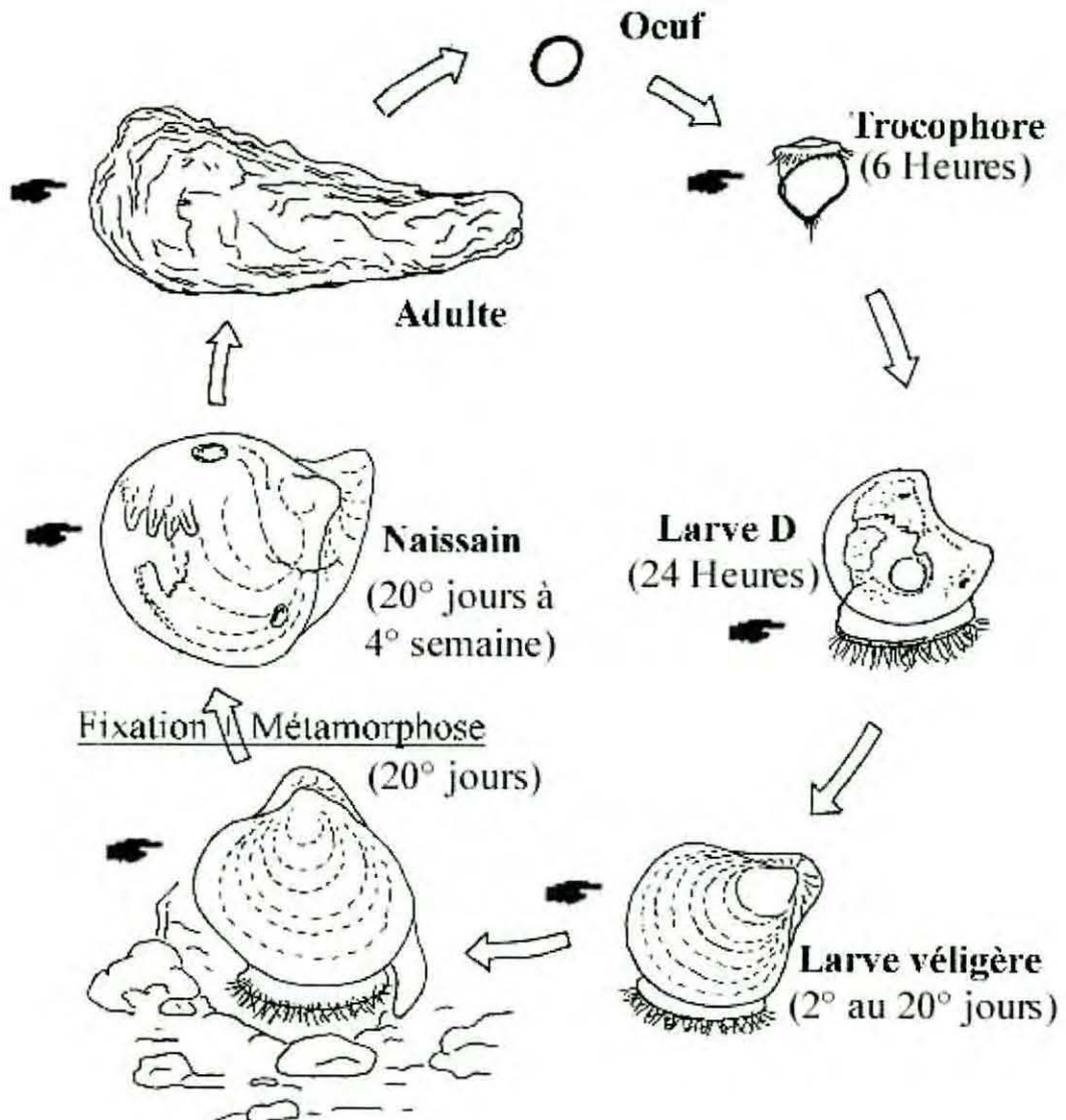


Schéma des différents stades de développement embryonnaires.

Ce schéma représente le développement embryonnaire de l'huître jusqu'au stade trochophore qui est considéré comme le dernier stade embryonnaire, ou le premier stade larvaire.

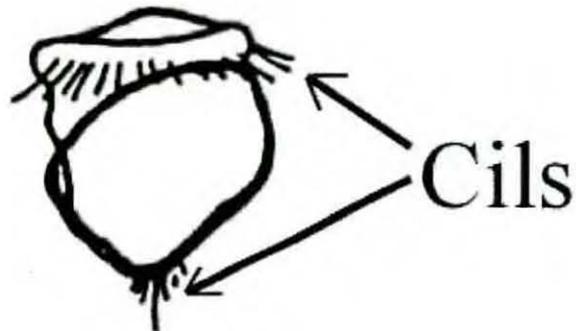
A la suite de l'émission des globules polaires, l'œuf va se diviser. La segmentation de type spiral (divisions successives à angles droits), aboutit à la formation du stade morula (c'est le premier stade de développement de l'embryon, il précède la blastula). La division des micromères (au pôle animal) est plus rapide que celle des macromères (au pôle végétatif), finissant par envelopper celui-ci. A ce stade c'est la blastula (stade développement de l'embryon, qui correspond aux divisions de segmentation précédant la gastrulation) qui est entièrement ciliée et qui gagne la colonne d'eau. La gastrulation (étape du développement de l'embryon au cours de laquelle la blastula devient la gastrula : des cellules se déplacent à partir de la région où se formera le blastopore et se dirigent vers l'intérieur pour former une deuxième couche qui est l'endoderme) se fait par épibolie (recouvrement) des micromères sur les macromères et par une invagination qui donne l'endoderme, communiquant avec l'extérieur par un petit blastopore.

➤ Développement larvaire :



Cycle du développement larvaire de *Crassostrea gigas*

A) LA LARVE TROCHOPHORE :



Le premier stade larvaire est la trochophore, elle apparaît 12 heures après la fécondation et se caractérise par une couronne de cils au pôle apical. Cette larve a une vie pélagique (en pleine mer) et se déplace en tournoyant grâce au prototroche.

B) LA LARVE D :

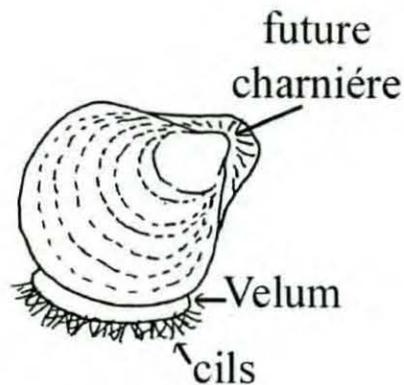


Photo S.Fraigneau

Elle est ainsi nommée à cause de sa forme caractéristique en forme de D majuscule. Elle mesure en moyenne 60 $\mu$ m et est obtenue en 24h à 24°C.

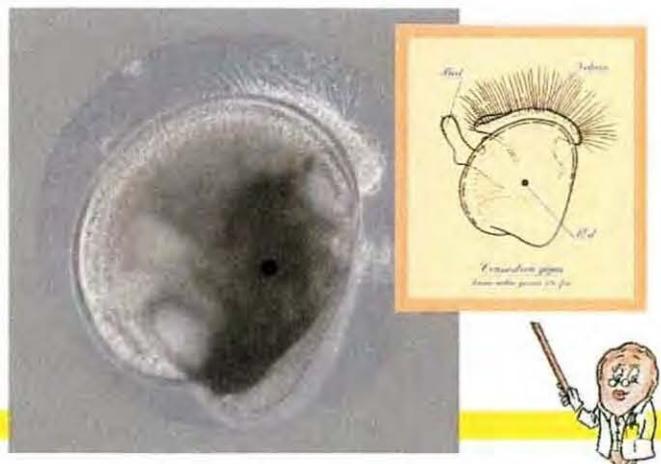
Ce D est le guide de la future coquille de l'huître, c'est la forme de la larve la mieux adaptée pour observer les déformations larvaires, ce qui en fait un sujet d'étude privilégié pour les tests écotoxicologiques, cette larve a également une vie pélagique.

### C) LA LARVE VELIGERE :



Elle est ainsi appelée à cause de son vélum, organe cilié en forme de voile, qui lui permet de nager et de capturer des particules alimentaires. La coquille définitive commence à se former à partir de ce stade.

### D) LA LARVE PEDIVELIGERE :

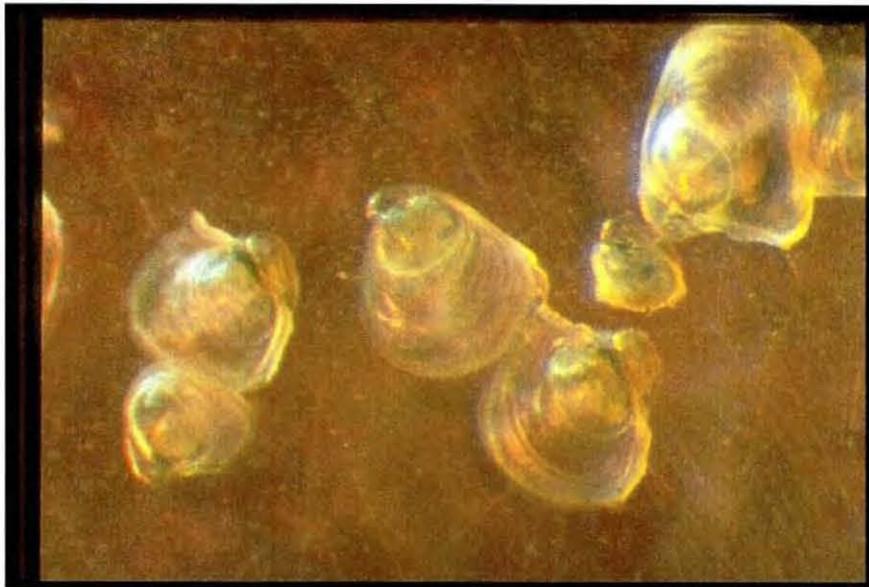


Source : fiches pratiques IFREMER

Elle mesure 250 $\mu$ m et apparaît vers le 15<sup>ème</sup> jour, elle se caractérise par la présence simultanée d'un pied, d'un vélum et de la tache oculaire (organe sensoriel). Elle devient compétente à la métamorphose. Son pied lui permet de ramper et de choisir un support. Elle se fixe alors grâce à un ciment (substance fluide) sécrété par la glande située à la base de son pied. Elle subit la métamorphose pour devenir un naissain avec sécrétion de la coquille définitive. Si le support ne lui convient pas, la pédiveligère redevient pélagique, la métamorphose peut être ainsi être différée de plusieurs jours.

La métamorphose peut être induite chez les larves « compétentes », par l'action d'un médiateur chimique tel que l'épinéphrine-adrénaline.

### E) LE NAISSAIN



La métamorphose s'accompagne de profondes modifications anatomiques : le vélum et le pied disparaissent ; les branchies permettent dorénavant la capture de la nourriture et la respiration ; l'animal à l'état naturel, vit fixé sur son support ; il sécrète la coquille définitive.

### F) L'ADULTE :



Il faut en moyenne trois ans pour obtenir une huître de taille commercialisable (cela dépend des conditions de milieu), dans son milieu naturel ou en écloserie, l'huître est capable de se reproduire à grande échelle grâce au cycle de reproduction représenté ci-dessus.

# OBJECTIFS ET PRINCIPE DU TEST LARVAIRE D'HUITRE :

## 1. Objectifs du test larvaire :

Le but de cette manipulation est de déterminer l'embryotoxicité d'une eau prélevée sur des larves d'huître, de *Crassostrea gigas*. La reproduction correcte des huîtres est un bon témoin de la santé de l'écosystème côtier.

## 2. Principe du test larvaire :

Ce test a été réalisé pour la première fois par le docteur Edouard His en 1993 à la station IFREMER d'Arcachon à partir des travaux de Woelke (1972).

Le principe de ce test est basé sur le dénombrement d'anomalies recensées dans une population de larves d'huîtres connue, après les avoir mis en contact avec une eau à tester au cours de leur développement (depuis la fécondation : phase embryonnaire). On peut ainsi juger l'embryotoxicité de cette eau.

L'huître utilisée pour réaliser ce test est *Crassostrea gigas*, l'huître creuse japonaise introduite dans le bassin de Marennes-Oléron en 1970. La larve de cette espèce est très sensible à la pollution, ce qui permet d'avoir une réponse maximale pour cette expérience. C'est également l'huître la plus cultivée dans le monde.

## MATERIEL UTILISE POUR UN TEST LARVAIRE D'HUITRE :

### 1. Choix des points de prélèvement (voir schéma de situation et annexe 1) :

Le choix des points de prélèvement, a été fait en fonction de la position géographique (proximité de cultures intensives, chenal de rejet...) et du risque de pollution pour les exploitations ostréicoles contiguës (par l'eau qui entre dans les claires). Quatre points de prélèvement ont ainsi été définis.

Lors des premiers tests en 1993, il y avait davantage de points de prélèvement, mais certains ont été abandonnés. En effet, seul un appareil de prélèvement automatique pouvait y déceler un pic de pollution (toutes les heures), la pollution était très faible en dehors de ce pic.

Tous les points restants se situent dans le marais de Moëze-Brouage, zone où cohabitent agriculteurs et conchyliculteurs. Ce site est caractérisé par la présence d'îlots agricoles drainés où se trouvent beaucoup de cultures intensives.

Les points de prélèvements qui ont été conservés sont les suivants (photos en annexe) :

➤ Point de prélèvement n°1 : Vanne de Montportail : (photo en annexe3)

L'eau issue de l'îlot agricole dit « des Berlotteries » se jette à cet endroit. L'eau rejetée à marée descendante peut entrer dans le système d'alimentation en eau de mer du complexe ostréicole se trouvant à proximité (lors du remplissage des claires à marée montante).

➤ Point de prélèvement n°2 : Vanne des Tannes. : (photo en annexe 3)

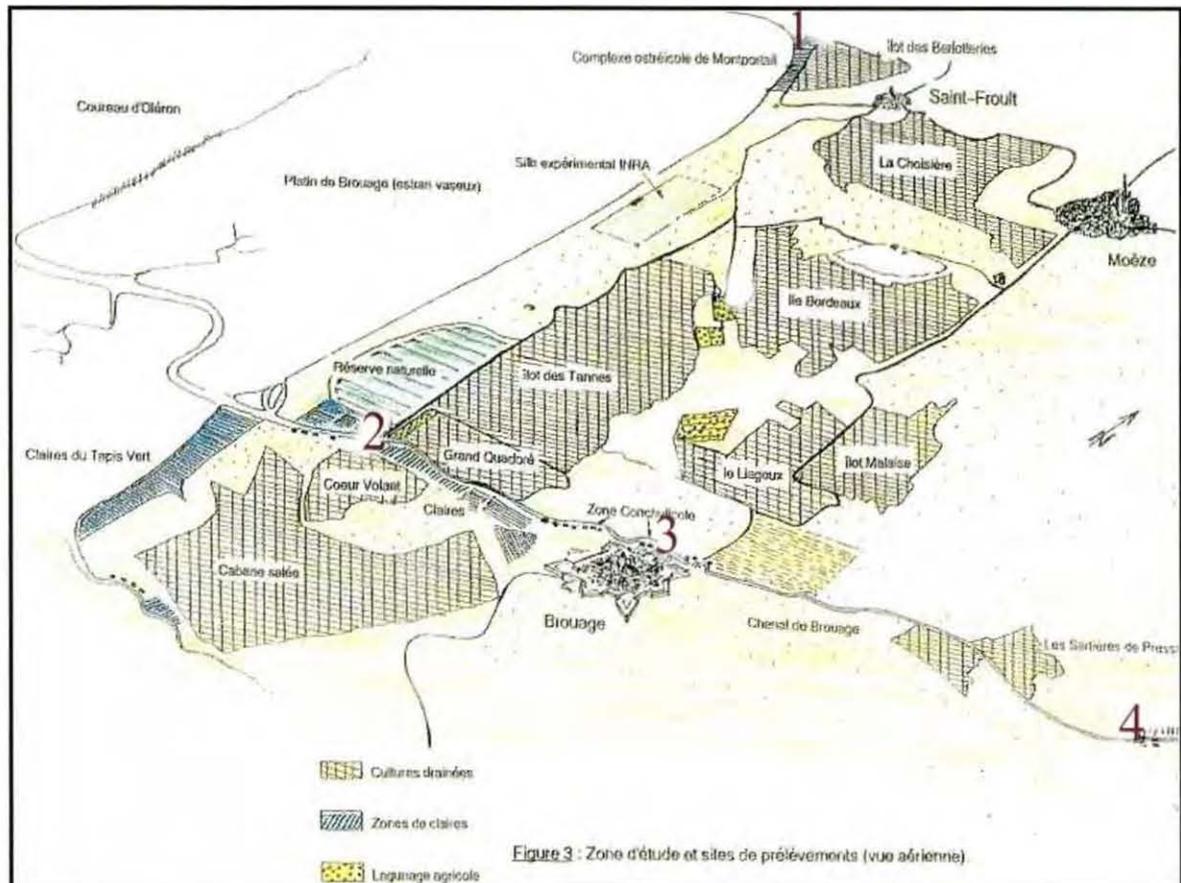
Ce point se trouve à l'extrémité d'un chenal de drainage de plusieurs centaines d'hectares de marais drainés. L'eau est déversée dans le chenal conchylicole de Brouage, qui alimente à marée haute des claires ostréicoles le long des berges.

➤ Point de prélèvement n°3 : Havre de Brouage : (photo en annexe 3)

La zone conchylicole de Brouage commence à cet endroit, l'eau est prélevée dans le chenal, en amont des établissements d'expédition de coquillages.

➤ Point de prélèvement n°4 : Ecluse de Beaugeay : (photo en annexe 3)

C'est le point de prélèvement le plus reculé dans les terres, où convergent les canaux d'eaux douces provenant du canal Charente-Seudre, alimentant les marais doux de Moëze-Brouage en eaux venant de la Charente, de l'Arnould (cultures maraîchères) et qui s'écoule dans le chenal de Brouage (lorsque la vanne précédant l'écluse est ouverte).



Situation des différents points de prélèvement sur le marais de Moëze-Brouage.

- 1 : Vanne de Montportail.
- 2 : Vanne de Tannes.
- 3 : Havre de Brouage.
- 4 : Ecluse de Beaugeay.

La réalisation de ces prélèvements n'est pas dépendante des marées, mais il faut que le chenal contienne assez d'eau pour pouvoir remplir les bouteilles en verre (sinon la densité du sédiment rend l'échantillon inexploitable).

2. Liste du matériel nécessaire à la réalisation d'un test larvaire d'huître :

(Annexe 6)

# PROTCOLE EXPERIMENTAL :

(schéma de la manipulation en annexe 4)

## 1. Premier jour du test :

### ➤ Préparation des huîtres pour le test :

Pour cela il faut sélectionner 10 à 12 huîtres de tailles différentes, afin d'avoir des mâles et des femelles pour la fécondation. Les huîtres femelles sont en général plus grosses que les huîtres mâles : ces géniteurs sélectionnés sont nettoyés pour enlever la vase et les organismes fixés dessus, y compris les petites huîtres fixées dessus afin qu'il n'y ait pas d'interférences entre les gamètes. On les sépare ensuite les unes des autres dans deux bacs en plastique (6 huîtres dans chaque bac). Enfin, on laisse les huîtres au sec 24 heures à température ambiante, la valve creuse de l'huître en dessous pour qu'elle ne perde pas toute son eau. Cette étape permet de préparer les géniteurs à l'émission de gamètes pour le test du lendemain.

### ➤ Prélèvements :

Pendant ce temps, il est recommandé de faire les prélèvements d'eaux aux différents points de prélèvements avec des bouteilles en verre stérilisées ( $1^H$  à  $130^{\circ}C$ ). L'heure, le lieu, la température de l'eau et la date du prélèvement sont notés sur des étiquettes au cours de chaque prélèvement (annexe 3). Les échantillons sont entreposés dans une chambre froide à  $10^{\circ}C$ , sauf si les tests sont réalisés le même jour.

### ➤ Préparation de l'eau de mer filtrée à $2\mu m$ :

L'eau de mer filtrée à  $2\mu m$  peut également être conservée en chambre froide, obtenue à l'écloserie (élevage larvaire).

## 2. Deuxième jour du test :

### ➤ Préparation des échantillons :

Chaque échantillon est dilué dans de l'eau de mer filtrée à 2 $\mu$ m pour que sa salinité avoisine 25‰, car l'eau prélevée est saumâtre (voire douce) et insuffisamment salée pour le développement des larves. On dilue donc dans des béchers en verre stériles 250 mL d'échantillon dans 500mL d'eau de mer filtrée, on ajuste la salinité à 25‰ avec du sel de mer (si elle est toujours insuffisante). On obtient ainsi des conditions de développement équivalentes à celles du milieu marin naturel.

Enfin, on verse 20 mL de chaque échantillon dans une série de 5 acuvettes notées de A à E. On procède de la même manière pour les témoins, mais on dispose 20 mL d'eau de mer filtrée à 2 $\mu$ m au lieu de l'échantillon dilué dans deux séries de 5 acuvettes (2 témoins) notées de A à J, ce qui améliore la sécurité de lecture des témoins.

### ➤ Déclenchement de l'émission des gamètes :

Cette étape se fait par choc thermique (c'est le procédé le plus naturel) : on fait chauffer de d'eau de mer (filtrée à 2  $\mu$ m) à 28°C, dans laquelle on immerge les huîtres qui subissent un premier choc thermique (choc chaud), lequel peut induire l'émission des gamètes. Le surplus d'eau chaude est vidé dans des bocal, on met 1L pour les femelles et juste de quoi les immerger pour les mâles.

Si au bout de 30 minutes les huîtres n'ont pas pondu, on vide l'eau et on immerge les huîtres dans de l'eau de mer filtrée à 18°C, ce qui provoque un choc froid.

Si les huîtres n'émettent toujours pas leurs gamètes, on fait une stimulation à la dianthaline : on sacrifie un individu qui semble peu actif, puis par dissection de la gonade une phéromone est libérée, c'est la dianthaline qui a la capacité d'induire la ponte chez les autres huîtres. On injecte donc le contenu de la gonade ainsi dilacérée et diluée à proximité du siphon inhalant des autres huîtres.

S'il n'y a toujours pas de réaction au bout de 30 minutes, on refait un choc thermique chaud, puis un choc thermique froid... jusqu'à ce que plusieurs huîtres aient émis leurs gamètes.

On isole les huîtres qui pondent déjà dans ces bocal préparés préalablement, pour être sûr que les gamètes obtenus dans le bocal soient bien ceux que l'on voulait, puis on les laisse émettre leurs gamètes.

### ➤ Sélection des meilleurs géniteurs pour la fécondation :

Une fois l'huître isolée, on contrôle la qualité et la quantité des gamètes émis par observation microscopique. L'huître femelle ayant les ovules les plus nombreux et les plus arrondis, et l'huître mâle ayant les spermatozoïdes les plus nombreux et les plus mobiles sont conservés pour la fécondation. On laisse les huîtres émettre leurs gamètes

pendant environ 30 minutes pour qu'il y en ait suffisamment (la quantité doit être suffisante pour réussir le test : le nombre d'œufs par acuvette devra être de plusieurs centaines).



Ovocyte normal (photo S.Fraineau)  
Grossissement X 200



Ovocyte anormal (photo S.Fraineau)  
Grossissement X 200



Spermatozoïdes (photo S.Fraineau)  
Grossissement X 200



Ovocytes normaux et anormaux  
(Photo S.Fraineau) Grossissement X 100

### ➤ Fécondation :

On fait une fécondation in vitro dans une éprouvette de 1 l : on filtre tout d'abord les ovocytes avec un filtre de 100  $\mu\text{m}$  dans une éprouvette graduée de 1 l, afin d'éliminer les débris. Si il n'y a pas 1 l il faut compléter avec de l'eau de mer filtrée. Ensuite on ajoute 10 ml de spermatozoïdes que l'on filtre à 32  $\mu\text{m}$  pour enlever les œufs fécondés éventuels. Il ne faut pas mettre plus de 10 ml de sperme pour éviter la double fécondation (la polyspermie est génératrice d'anomalies).

On agite la suspension pendant les 5 minutes nécessaires à la fécondation, puis on observe celle-ci au microscope. Pour que la fécondation soit validée il faut qu'il y ai 10 spermatozoïdes en moyenne autour d'un ovocyte. Si la fécondation ne paraît pas suffisante, on rajoute 5 ml de spermatozoïdes supplémentaires.

➤ Numération des œufs et calcul du volume à prélever :

Pour compter les œufs il faut diluer la suspension mère : on met 10 ml de suspension mère dans une éprouvette graduée et l'on complète à 250 ml avec de l'eau de mer filtrée.

On prélève 100 µl de solution diluée sur une lame creuse, et l'on compte le nombre d'œufs sur toute la lame. Il faut réaliser 4 essais de la sorte et faire une moyenne.

Ensuite, on détermine la concentration en œufs dans l'éprouvette de 1 l, puis on calcule le volume à prélever pour avoir environ 600 œufs par acuvette.

Exemple de calcul :

	Lame 1	Lame 2	Lame 3	Lame 4	Moyenne
Nombre d'œufs par lame	58	48	52	47	52,5

Il y a 52,25 œufs dans 0,1 ml de suspension diluée :

52,5 œufs / 0,1ml dilué

**525 œufs / 1 ml dilué**

$\frac{525 \times 250}{10}$  œufs / 1 ml mère

soit **13125 œufs / 1 ml suspension mère**

Volume à prélever pour avoir 600 œufs :

1 ml de suspension mère → 13125 œufs.

X ml → 600 œufs.

$$X = \frac{600}{13125} = 0,046 \text{ ml} = \mathbf{46 \mu\text{l}}$$

Il fautensemencer les acuvettes avec 46 µl de suspension mère (éprouvette de 1 l).

Enfin on incube les acuvettesensemencées dans une étuve à 24°C pendant 24 heures, pour que les larves se développent. On peut simplifier ces étapes par un unique calcul :

$$\mathbf{V = 600 / (Nx250)}$$

Où V est le volume à prélever en ml, et N le nombre moyen d'œufs par lame.

### 3. Troisième jour du test : lecture et interprétation des résultats :

On observe tout d'abord la mobilité des larves au microscope inversé, pour avoir une idée de la vitalité des larves.

Enfin on fixe les larves au formol : cette étape permet de tuer les larves et donc des les faire tomber au fond de l'acuvette, pour qu'elles soient plus faciles à observer. De

plus, grâce au formol, on peut conserver les échantillons durant plusieurs mois si des vérifications de résultats sont nécessaires.

Une fois fixées on compte le nombre de larves déformées sur 100 larves à l'aide d'un microscope inversé. Les acuvettes sont directement observables ce qui évite d'avoir à les ouvrir (gain de temps). Les déformation larvaires sont facilement observables ce qui permet de donner rapidement un résultat.

(schéma récapitulatif de la manipulation en annexe 4 et exemples d'anomalies larvaires en annexe 5)



Larve D normale (photo S.Fraineau)  
Grossissement X 200

Une fois le dénombrement terminé on compare les pourcentages d'anomalies larvaires à l'échelle de HIS. Le test est considéré comme interprétable lorsque le pourcentage d'anomalies larvaires dans les témoins est inférieur à 20%, c'est le pourcentage d'anomalie maximum toléré dans la nature. Si le chiffre obtenu pour les témoins est supérieur alors les résultats sont ininterprétables.

➤ Echelle d'Edouard His :

Différence d'anomalies larvaires avec le témoin	Non significative au seuil de 95%	< à 25%	Entre 25 et 50%	Entre 50 et 75%	> à 75%
Milieu aquatique	non pollué	peu perturbé	Moyennement pollué	Très pollué	Massivement pollué

## RESULTATS

### 1. Test larvaire d'huître sur les prélèvements du 6 mai 2004 :

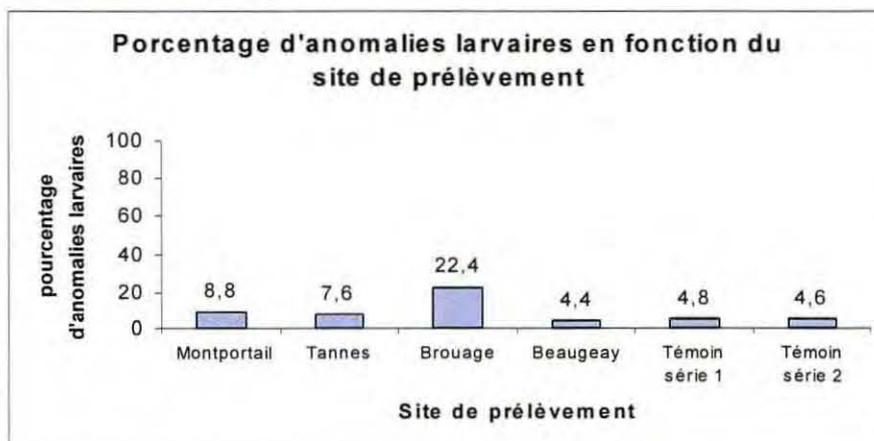
➤ Température et salinité des échantillons :

Numéro d'échantillon	Température (°C)	Salinité (‰)
1 : Montportail	11,9	1,4
2 : Tannes	12,4	7,9
3 : Brouage	11,9	29
4 : Beaugeay	13,1	2

➤ Tableau des résultats :

Numéro acuvette	A	B	C	D	E	moyenne	écart type	IC à 95%	moyenne-IC	moyenne+IC	milieu aquatique
Montportail	11	4	12	8	9	8,8	3,11	0,09	8,71	8,89	non pollué
Tannes	7	6	7	9	9	7,6	1,34	0,04	7,56	7,64	non pollué
Brouage	24	21	24	20	23	22,4	1,82	0,05	22,35	22,45	peu perturbé
Beaugeay	4	8	3	4	3	4,4	2,07	0,06	4,34	4,46	non pollué
Témoin série 1	4	6	5	4	5	4,8	0,82	0,02	4,78	4,82	interprétable
Témoin série 2	6	4	5	4	4	4,6	0,89	0,02	4,58	4,62	

➤ Représentation graphique des résultats :



➤ Commentaires :

Le pourcentage d'anomalies larvaires pour les témoins est inférieur à 20%, les résultats sont donc interprétables.

Aucun des points de prélèvement ne présente de réelle différences significatives avec les témoins, on peut donc dire que l'eau prélevée à ce jour ne présente pas de réel danger pour les exploitations à proximité.

## 2. Test larvaire d'huître sur les prélèvements du 11 mai 2004 :

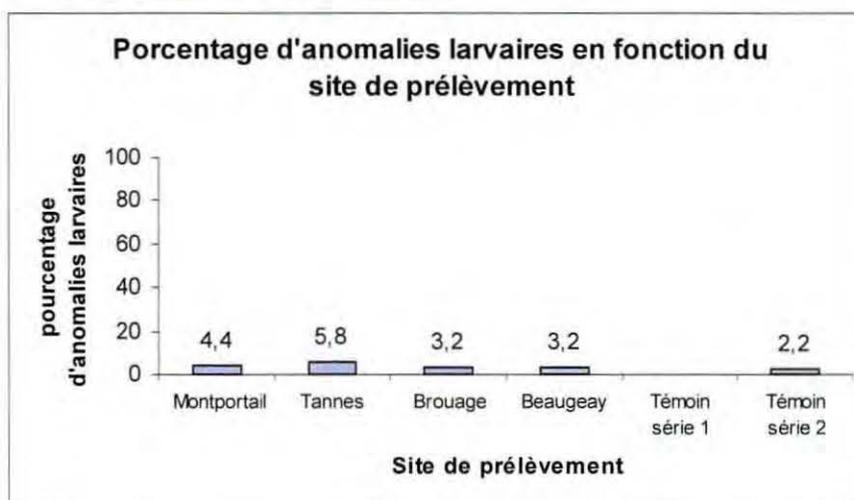
### ➤ Température et salinité des échantillons :

Numéro d'échantillon	Température (°C)	Salinité (‰)
1 : Montportail	15,8	1,4
2 : Tannes	16,1	7,9
3 : Brouage	16,3	15,3
4 : Beaugeay	1,1	2,4

### ➤ Tableau des résultats :

Numéro acuvette	A	B	C	D	E	moyenne	écart type	IC à 95%	moyenne-IC	moyenne+IC	milieu aquatique
Montportail	3	4	6	4	5	4,4	1,14	0,03	4,37	4,43	non pollué
Tannes	4	6	8	5	6	5,8	1,48	0,04	5,76	5,84	non pollué
Brouage	3	4	3	3	3	3,2	0,45	0,01	3,19	3,21	non pollué
Beaugeay	2	2	3	2	7	3,2	2,17	0,06	3,14	3,26	non pollué
Témoin série 1											interprétable
Témoin série 2	4	2	3	1	1	2,2	1,3	0,04	2,16	2,24	

### ➤ Représentation graphique des résultats :



### ➤ Commentaires :

Le pourcentage d'anomalies larvaires dans les témoins est inférieur à 20%, les résultats sont donc interprétables.

Il faut noter que la première série de témoin a été supprimée du test en raison d'un problème de maturation observé dans les acuvettes. Ce problème peut être lié à la toxicité des acuvettes en plastique vis à vis des larves d'huîtres plus sensibles. Tous les sites sont toujours non pollués.

### 3. Test larvaire d'huître sur les prélèvements du 17 mai 2004 :

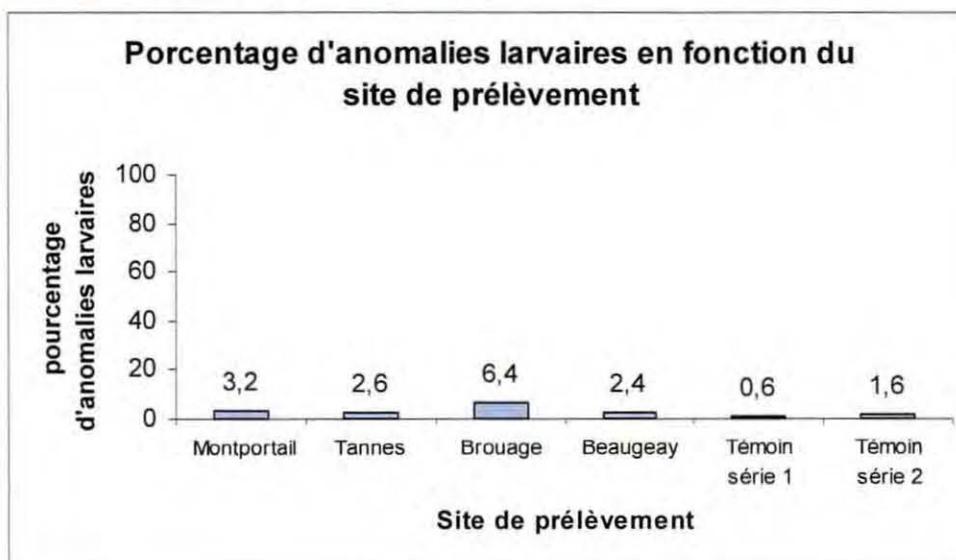
➤ Température et salinité des échantillons :

Numéro d'échantillon	Température (°C)	Salinité (‰)
1 : Montportail	23,2	15,6
2 : Tannes	22,3	7,6
3 : Brouage	21,7	30,2
4 : Beaugeay	23	1

➤ Tableau des résultats :

Numéro acuvette	A	B	C	D	E	moyenne	écart type	IC à 95%	moyenne-IC	moyenne+IC	milieu aquatique
Montportail	4	1	3	5	3	3,2	1,48	0,04	3,16	3,24	non pollué
Tannes	2	4	3	3	1	2,6	1,14	0,03	2,57	2,63	non pollué
Brouage	5	5	9	8	5	6,4	1,95	0,05	6,35	6,45	non pollué
Beaugeay	2	4	2	2	2	2,4	0,89	0,02	2,38	2,42	non pollué
Témoin série 1	1	0	0	0	2	0,6	0,89	0,02	0,58	0,62	interprétable
Témoin série 2	2	2	0	1	3	1,6	1,14	0,03	1,57	1,63	interprétable

➤ Représentation graphique des résultats :



➤ Commentaires :

Le pourcentage d'anomalies larvaires pour les témoins est inférieur à 20%, les résultats sont donc interprétables.

Aucun des points de prélèvement ne présente de réelle différences significatives avec les témoins, on peut donc dire que l'eau prélevée ce jour à ne présente pas de réel danger pour les exploitations à proximité.

#### 4. Test larvaire d'huître sur les prélèvements du 24 mai 2004 :

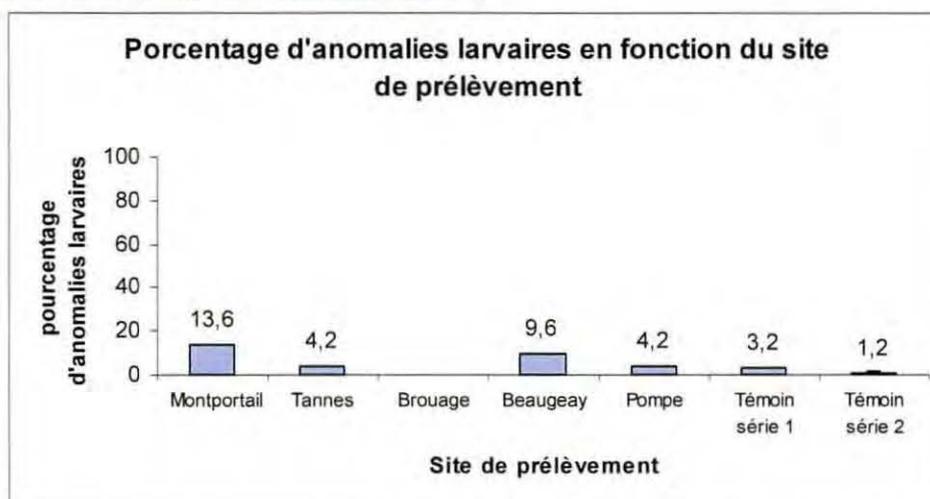
➤ Température et salinité des échantillons :

Numéro d'échantillon	Température (°C)	Salinité (‰)
1 : Montportail	11,9	1,4
2 : Tannes	12,4	7,9
3 : Brouage	11,9	29
4 : Beaugeay	13,1	2
5 : Pompe	14,8	3

➤ Tableau des résultats :

Numéro acuvette	A	B	C	D	E	moyenne	écart type	IC à 95%	moyenne-IC	moyenne+IC	milieu aquatique
Montportail	14	17	17	12	8	13,6	3,78	0,11	13,49	13,71	non pollué
Tannes	3	5	4	4	5	4,2	0,84	0,02	4,18	4,22	non pollué
Brouage											
Beaugeay	12	9	10	7	10	9,6	1,82	0,05	9,55	9,65	non pollué
Pompe	4	3	4	1	9	4,2	2,95	0,08	4,12	4,28	non pollué
Témoin série 1	3	3	3	2	5	3,2	1,48	0,04	3,16	3,24	interprétable
Témoin série 2	1	3	0	1	1	1,2	1,1	0,03	1,17	1,23	interprétable

➤ Représentation graphique des résultats :



➤ Commentaires :

Les résultats sont interprétables, et on note une absence de pollution dans tous les points de prélèvement. La lecture des résultats de Brouage est impossible en raison d'une forte accumulation de sédiments ne laissant pas passer la lumière.

Un point a été rajouté, il s'agit d'un puits abritant une de drainage (dénommé : « pompe ») dans laquelle nous supposons que les produits phytosanitaires se sont accumulés car elle n'a pas été vidée après les épisodes secs de ses derniers temps.

## 5. Test larvaire d'huître sur les prélèvements du 1 juin 2004 :

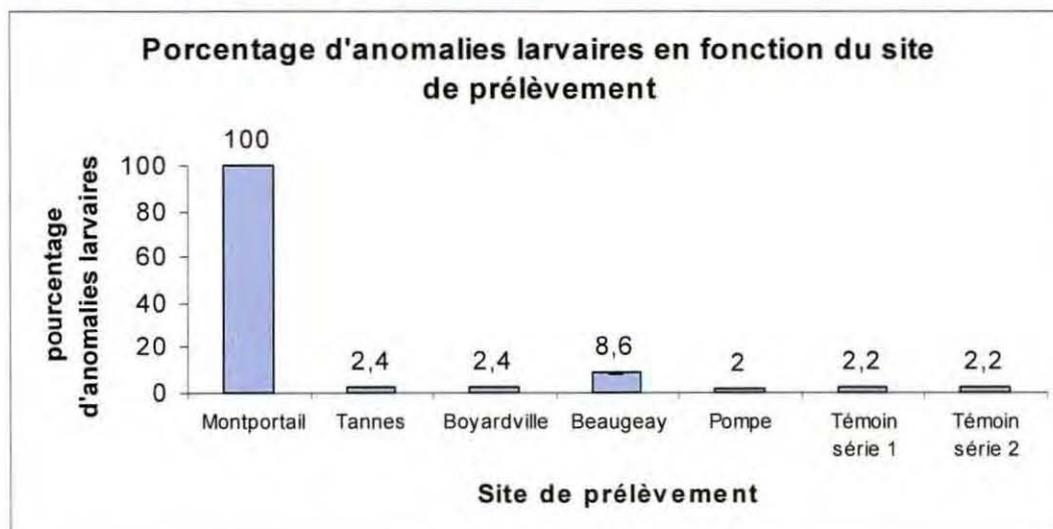
### ➤ Température et salinité des échantillons :

Numéro d'échantillon	Température (°C)	Salinité (‰)
1 : Montportail	18	1,7
2 : Tannes	18,9	9,3
3 : Boyardville	18,4	3,4
4 : Beaugeay	18,8	.6
5 : Pompe	15,8	3,2

### ➤ Tableau des résultats :

Numéro acuvette	A	B	C	D	E	moyenne	écart type	IC à 95%	moyenne-IC	moyenne+IC	milieu aquatique
Montportail	100	100	100	100	100	100	0	0	100	100	massivement pollué
Tannes	1	5	1	2	3	2,4	1,67	0,05	2,35	2,45	non pollué
Boyardville	3	2	5	0	2	2,4	1,82	0,05	2,35	2,45	non pollué
Beaugeay	11	8	12	9	3	8,6	3,51	0,1	8,5	8,7	non pollué
Pompe	3	1	3	2	1	2	1	0,03	1,97	2,03	non pollué
Témoin série 1	1	1	3	4	2	2,2	1,03	0,03	2,17	2,23	interprétable
Témoin série 2	2	3	1	3	2	2,2	0,84	0,02	2,18	2,22	interprétable

### ➤ Représentation graphique des résultats :



### ➤ Commentaires :

Le point de Montportail est massivement pollué alors que les autres points dont la pompe de drainage de Montportail sont non pollués. Le point de Boyardville a été ajouté : il s'agit d'un prélèvement effectué dans le port, il pourrait contenir des métaux lourds.

## 6. Test larvaire d'huître sur les prélèvements du 2 juin 2004 :

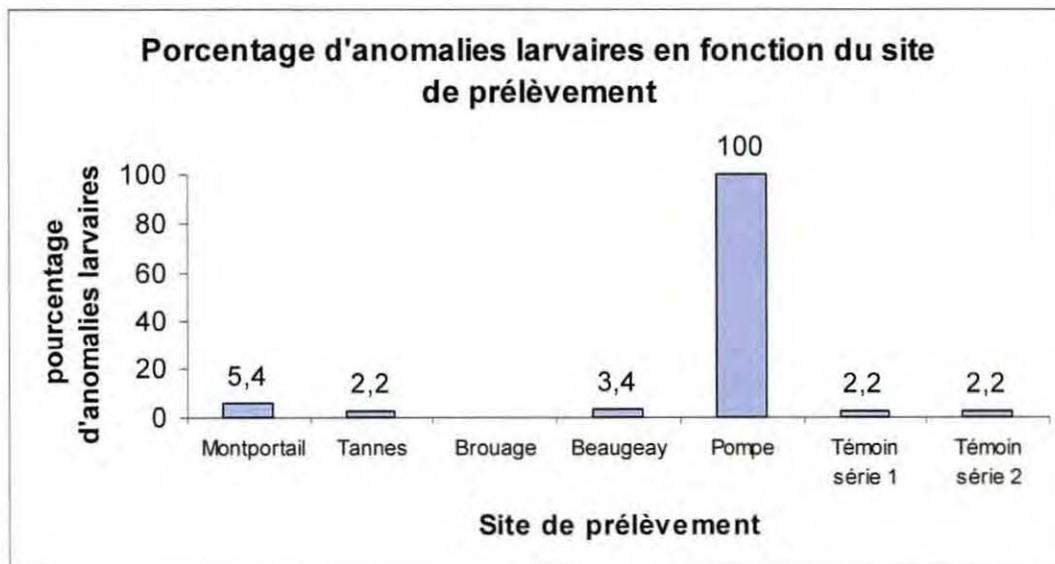
### ➤ Température et salinité des échantillons :

Numéro d'échantillon	Température (°C)	Salinité (‰)
1 : Montportail	18	1,6
2 : Tannes	17,9	9,3
3 : Brouage		
4 : Beaugeay	19,2	0,9
5 : Pompe	15,2	3

### ➤ Tableau des résultats :

Numéro acuvette	A	B	C	D	E	moyenne	écart type	IC à 95%	moyenne-IC	moyenne+IC	milieu aquatique
Montportail	4	6	8	2	7	5,4	2,41	0,07	5,33	5,47	non pollué
Tannes	1	3	2	3	2	2,2	0,84	0,02	2,18	2,22	non pollué
Brouage											
Beaugeay	1	5	2	5	4	3,4	1,82	0,05	3,35	3,45	non pollué
Pompe	100	100	100	100	100	100	0	0	100	100	massivement pollué
Témoin série 1	1	1	3	4	2	2,2	1,03	0,03	2,17	2,23	interprétable
Témoin série 2	2	3	1	3	2	2,2	0,84	0,02	2,18	2,22	interprétable

### ➤ Représentation graphique des résultats :

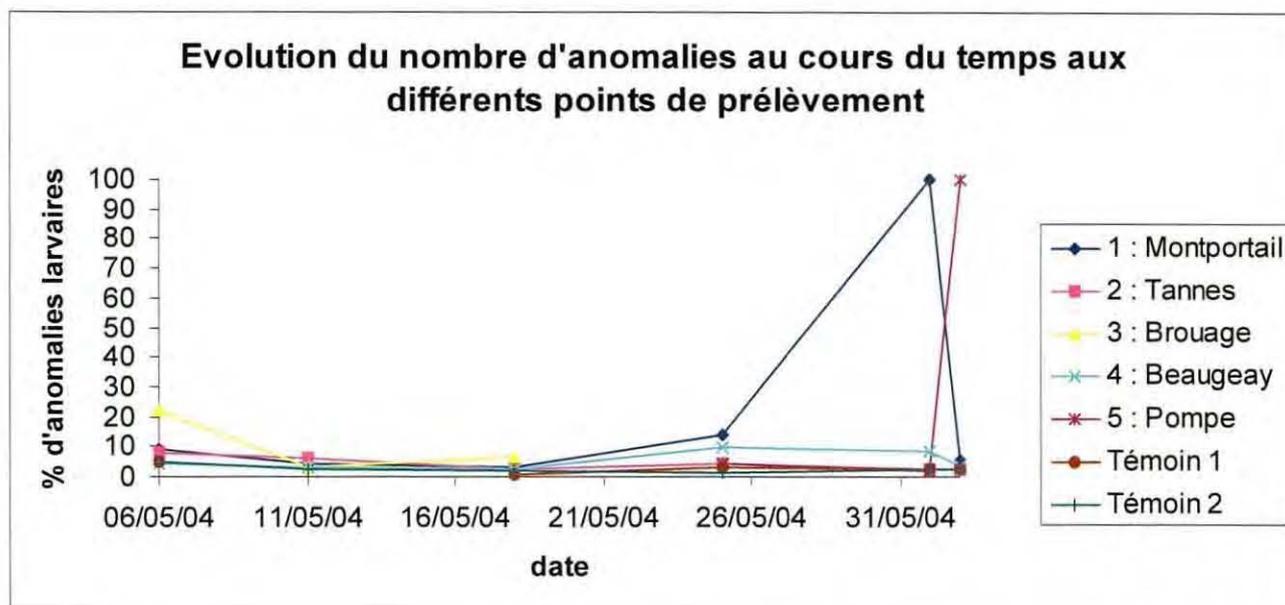


### ➤ Commentaires :

L'eau du puits de drainage de Montportail est massivement polluée tandis que tous les autres points sont non pollués. De plus le prélèvement n'a pas pu être effectué à Brouage car la marée était trop basse et il n'y avait pas d'eau.

## DISCUSSION SUR LES RESULTATS

### 1. Evolution de pourcentage d'anomalies larvaires selon les sites :



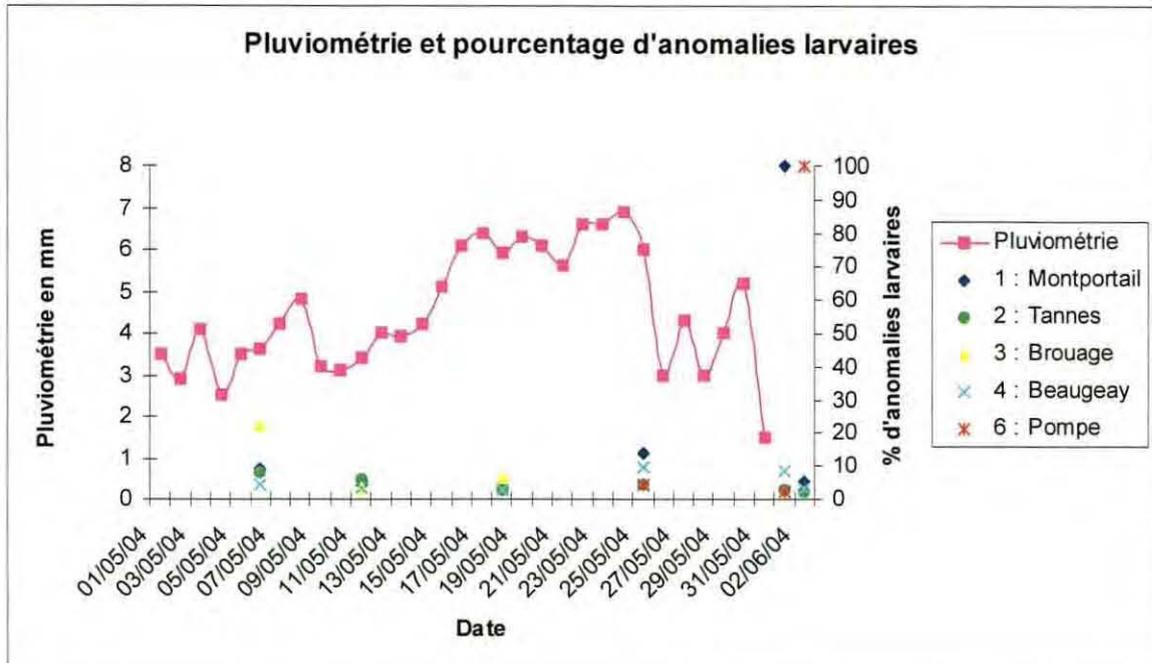
L'étude s'est déroulée du 6 mai 2004 au 2 juin 2004, on peut donc l'assimiler au mois de mai 2004. Le graphique (ci-dessus) représente l'évolution des pourcentages d'anomalies larvaires en fonction du temps. Tout d'abord, il faut remarquer que le pourcentage d'anomalies larvaires concernant les témoins est toujours resté inférieur à 10%, ceci signifie que les résultats ont toujours été interprétables.

D'après le graphique la qualité de l'eau est bonne puisque jusqu'au 31 mai 2004 les résultats se sont avérés négatifs pour tous les points de prélèvement. En revanche le premier juin 2004 a vu apparaître un pic de pollution important à l'écluse de Montportail, puisqu'on y relève 100% d'anomalies larvaires, ce qui signifie que l'eau est massivement polluée. De plus le lendemain la qualité de l'eau de la pompe de drainage de Montportail s'est nettement détériorée puisqu'on déplore un pourcentage d'anomalies larvaires de 100%. D'après cette observation on peut penser qu'il y a peut être eu d'autres pics de pollution au cours du mois de mai 2004 mais ils n'ont pas été détectés par le test car il se trouvaient en dehors des moments de prélèvement. Ceci montre à quel point il est difficile de quantifier un problème de pollution car le moment des prélèvements est stratégique.

Cette évolution au cours du temps peut correspondre à la date de traitement des cultures, mais elle dépend aussi de la pluviométrie car les produits phytosanitaires sont acheminés jusqu'aux drains par les eaux de ruissellement et les agriculteurs n'ouvrent les drains qu'en période de forte pluie afin que les exploitations ne soient pas noyées.

## 2. Comparaison des résultats avec la pluviométrie :

Les données pluviométriques ont été fournies par la station météorologique de l'INRA à Saint Laurent de la Prée.



Comme le montre le graphique ci dessus le mois de mai a été très sec, et lors des rares épisodes pluvieux du 17 mai au 26 mai, il n'est tombé que très peu d'eau (6.mm pour le maximum) les pluies ont été disparates durant cette période. Elles n'ont en rien soulagé le déficit d'eau qui s'est accru par la suite.

Ainsi on peut penser que la pluie n'a pas été suffisante pour lessiver le sol et emporter dans les drains les produits phytosanitaires épandus par les agriculteurs, ou bien ils ont été transportés en trop faible quantité pour être toxique et dangereux vis à vis des larves d'huîtres. De plus la pluie étant trop faible les agriculteurs n'ont pas jugé nécessaire de vider les drains de l'eau afin de prévenir un éventuelle sécheresse.

Cependant on note la présence d'un pic de pollution le premier juin 2004 à la vanne de Montportail ; ce pic pourrait être du à la sécheresse qui a augmenté la concentration des produits phytosanitaires puisque les produits même en faible quantité se sont retrouvés dans un très faible volume d'eau.

Le pic de pollution observé à la pompe de drainage le lendemain peut être la conséquence de l'accumulation des eaux de pluie du 17 au 30 mai.

Il est donc très difficile de quantifier et de localiser un problème de pollution car les facteurs environnementaux sont multiples et empêchent la détermination précise d'un phénomène de pollution.

En effet, les résultats analytiques ne sont pas encore disponibles à la fin du stage (analyses menées pas le CEMAGREF).

## CONCLUSION

L'objectif fixé pour cette étude était d'évaluer la toxicité des eaux de rejets agricoles en milieu marin et plus particulièrement sur les larves de *Crassostrea gigas*.

Tout d'abord, il faut noter que les tests du mois de mai 2004 ont été correctement menés, en effet le pourcentage d'anomalies larvaires présent dans les témoins a toujours été inférieur à 20%. C'est à dire que les résultats ont toujours été interprétable en ce qui concerne la qualité de la manipulation.

On note la présence de quelques mauvais résultats après un épisode pluvieux qui se manifestent par la présence de pics de pollution. Ainsi on peut logiquement penser que ces pics pourraient être dus à un lessivage des terres agricoles, mais il faudrait les résultats d'analyses chimiques de l'eau afin de pouvoir l'affirmer.

Enfin, cette étude montre l'importance de mener une campagne ultérieure en période pluvieuse (en automne par exemple) correspondant au stockage et à l'affinage des huîtres dans le marais salé.

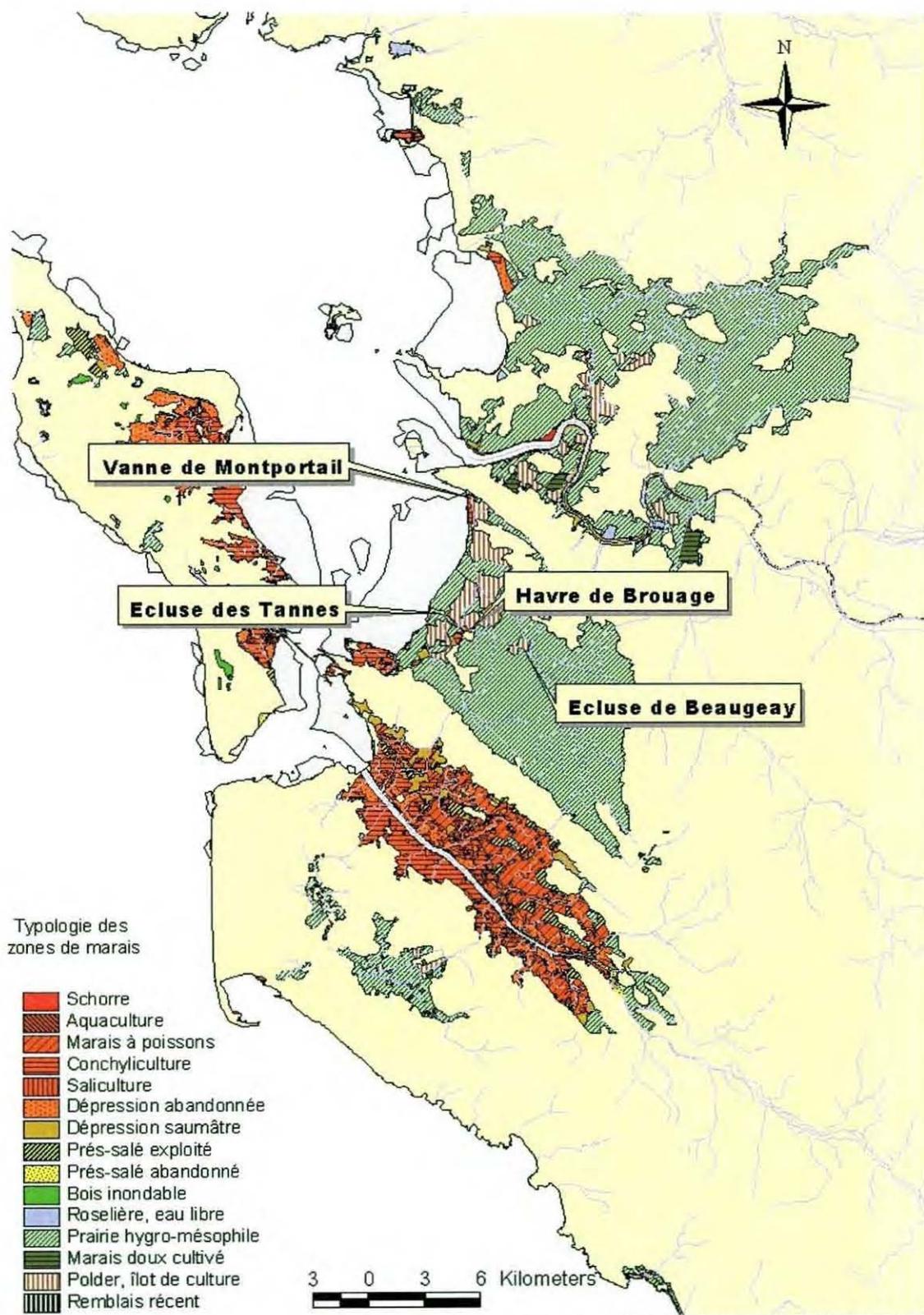
Sur un plan plus personnel, ce stage m'a donné l'occasion de découvrir le milieu de la recherche. J'ai participé à différents travaux menés sur la protection de l'environnement et la détection de polluants, de micropolluants ou de microorganismes pouvant mettre en danger les écosystèmes côtiers.

## **BIBLIOGRAPHIE**

- CHEVALLIER C., MASSON D. (1988). Agriculture, conchyliculture et circulation des eaux de surface en Charente-Maritime. *Aqua revue*, **21**, 27-33.
- HIS E., CONSTANTIN C., 1996  
Biologie et physiologie des coquillages.  
Publication IFREMER DEL/ARCACHON.
- MASSON D., HIS E., DUBERNET J-F., SCRIBE P., OCTOBRE 2000  
Produits phytosanitaires et conchyliculture en Charente Maritime  
Publication IFREMER.
- ALZIEU C., BOCQUENE G., DELESMONT G., DHAINAULT-COURTOIS N., EMPIS A., FORGET J., GLEMAREC M., PAVILLON J-F., PRUVOT C., QUINIOU F., (2003). Evaluation des risques liés à l'immersion des boues de dragage des ports maritimes, Ifremer, Issy les Moulineaux, 14p.
- BAL A.(2001). *Ecotoxicologie d'eaux de rejets agricoles dans le milieu marin*. Rapport d'IUT, Saint-Étienne, 42p.
- BELIAEFF B., BOCQUENE G, FORGET J. (2002). Acetylcholinesterase activity in copepods (*Tigriopus brevicornis*) from the Vilaine River estuary, France, as a biomarker of neurotoxic contaminants. *Aquatic Toxicology*, **00**, 1-10.
- MAZOYER V.(1998).Classification des risques phytosanitaires pour la conchyliculture du littoral Charentais. Editions IFREMER/INRA.

# Annexes

# Annexe 1 : Situation des points de prélèvement.



Sources : SHOM, BD CARTHAGE, IFREMER

## Annexe 2 liste de produits phytosanitaires épanchés sur un îlot drainé

MATIERES ACTIVES	tot,84/88 (kg)	Toxicité sur rat (mg/kg)	Solubilité (mg/L)	Observations
Herbicides				
Isoproturon	300,5	1800	70	
Chlortoluron	113	10000	70	
Metoxuron	29	2020	678	
Neburon	67	11000	5	
Bromoxynil	46	260	130	p
Loxynil	58,9	110	50	p
2-4 D	30	375	600	p (si esters)
2-4 MCPA	72	700	825	p (si esters)
MCPPP	161,2	930	620	
Clopyralid	2,5	5000	1000	
Carbetamide	105	11000	3500	
Flurochloridone	71,8	4000	28	
Fluroxypyr	7,5	5000	91	
Glyphosate	18	49000	10000	
L-flampropisopropyl	15	4000	18	
Fongicides				
Carbendazime	84,1	15000	5,8	
Propiconazole	26,4	1500	110	
Fenpropimorphe	111,7	3650	6,8	
Flutriafol	15,6	1140	104	
Captafol	37,5	5000	1,4	p
Mancozebe	59,4	8000	Ins	p
Chlorothalonil	120,6	10000	0,6	p
Insecticides				
Benfuracarbe	20	138	5	
Carbofuran	12,5	8	750	p
Pyrimicarbe	6,6	147	2,7	np
Fenvalerate	0,2	450	<1	p
Endosulfan	12	50	Ins	pp
Thiomethon	4	120	200	
Parathion-methyl	8	14	60	
Terbuphos	6,4	4	15	p
Moluscicides				
Mercaptodimethur	13,4	100	Ins	p
Substances de croissance				
Chlorure de chlormequat	23,7	670	740	
Chlorure de mepiquat	31,4	1000	1420	
Ethephon	22,2	4229	?	
Chlorure de choline	0,7	?	?	
Imazaquin	0,2	?	?	

Exemple de l'îlot de drainage des Tannes - Bilan sur les apports sur 4 ans.

Source : AQUA REVUE n°21.

## Annexe 3 : Photos des sites de prélèvement et exemple de fiche d'identification du prélèvement.



Vanne de Montportail (photo S.Fraineau)



Vue de la mer depuis la vanne de Montportail  
(Photo S.Fraineau)



Vue des champs de colza depuis la vanne  
de Montportail (photo S.Fraineau)



Pompe de drainage de Montportail  
(photo S.Fraineau)



Vanne des Tannes (photo S.Fraineau)



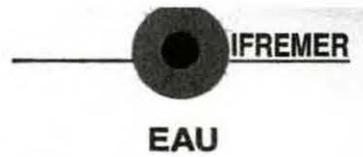
Vue des champs depuis la vanne des Tannes  
(photo S.Fraineau)



Havre de Brouage (photo S. Fraineau)



Chenal de Brouage menant vers la mer (photo S.Fraineau)



PROGRAMME : .....

LABO/AGENT : .....

Date .....

Heure ..... Heure PM .....

Code du POINT : .....

Nom du POINT : .....

ENGIN de prélèvement : .....

N° inventaire : .....

SONDE ..... m

IMMERSION ..... m

NIVEAU .....

**Mesures in situ :**

TEMPÉRATURE .....

SALINITÉ .....

OXYGÈNE .....

ÉVÈNEMENT / OBSERVATIONS : .....

.....

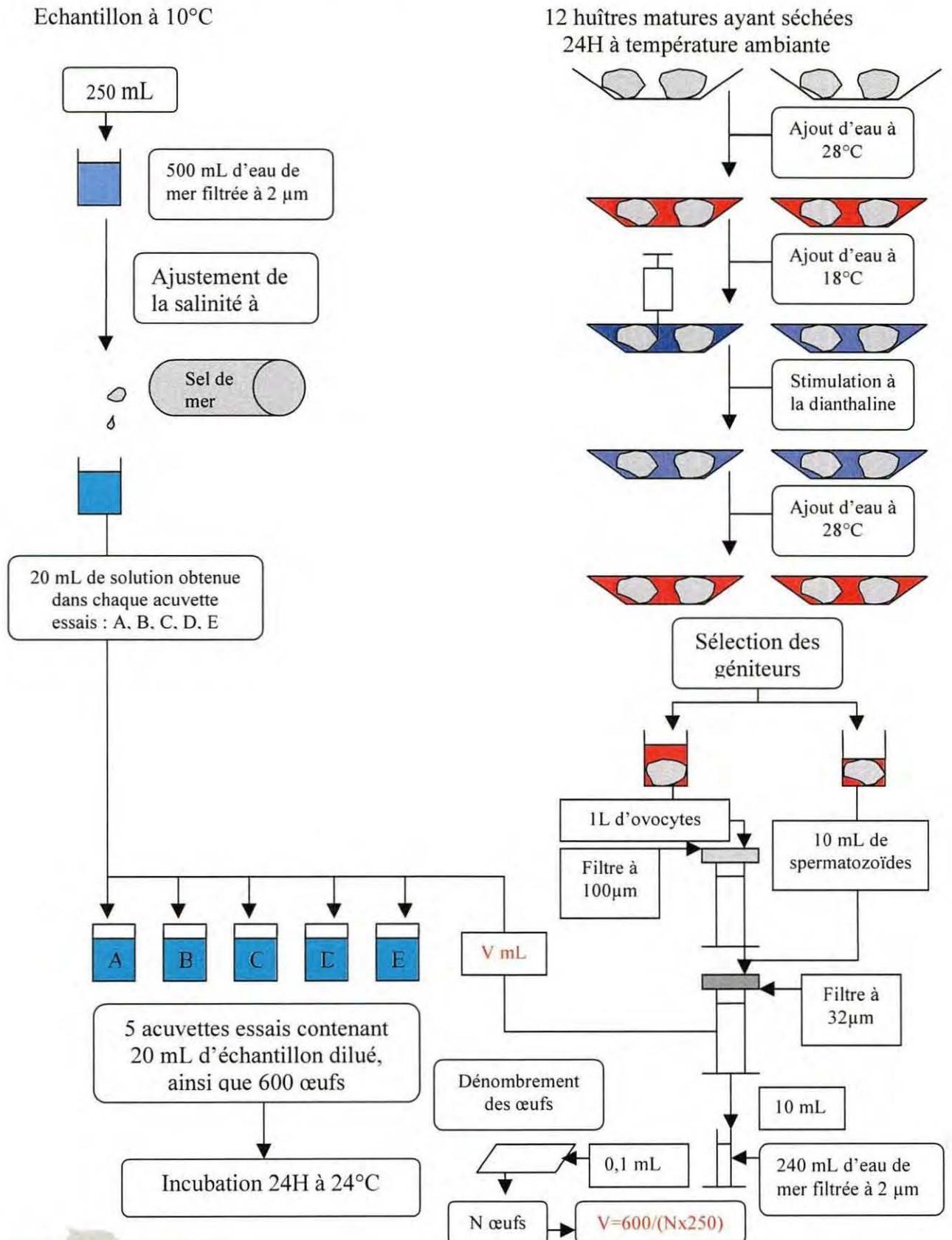
N° D'ENREGISTREMENT : .....

Fiche d'identification du prélèvement.



Ecluse de Beaugeay (photo S.Fraineau)

# Annexe 4 : Test larve d'huître : Schéma du mode opératoire.



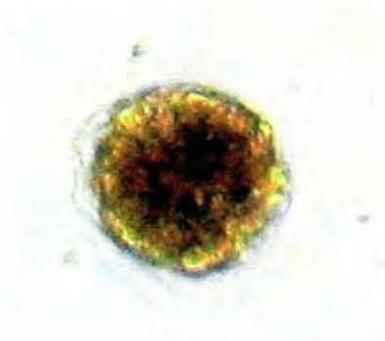
## Annexe 5 : Exemples d'anomalies larvaires.



Vélum non rétracté (photo S.Fraiveau)  
Grossissement X 200



Echancrure dans la coquille (photo S.Fraiveau)  
Grossissement X 200



Embryon de *Crassostrea gigas* (photo S.Fraiveau)  
(larve D non développée)  
Grossissement X 200



Charnière concave (photo S.Fraiveau)  
Grossissement X 200

## Annexe 6 : Liste du matériel nécessaire à la réalisation d'un test larvaire d'huître.

Nom	Fonction	Quantité nécessaire
Bouteille de verre de 1L	Échantillonnage	4 (un par échantillon)
Becher de verre stérile	Préparation des échantillons	4 (un par échantillon)
Bocaux de 2L	Isolement des géniteurs	6 (un par géniteur)
Eprouvette gradée stérile de 1L	Lieu de la fécondation	1
Eprouvette gradée stérile de 250 mL	Calcul de la concentration en œufs	1
Pipette graduée stérile de 10mL	Prélèvement de gamètes mâles	1
Pipetman Gilson et boîte de cônes stériles	Ensemencement des acuvettes Fixation au Formol	1
Tamis (100 µm)	Filtration des gamètes femelles	1
Tamis (32 µm)	Filtration des gamètes mâles	1
Acuvette en polyéthylène (25mL)	Développement des larves	10 pour le témoin 5 par échantillon
Lames creuses	Dénombrement des œufs	4
Lame plate	Observation des gamètes	Au moins 1
Bacs en plastique	Lieu des chocs thermiques	2
Thermo-salinomètre	Mesure de la température et de la salinité	1
Microscope inversé d'UtermöL	Observation des gamètes Comptage des larves fixées	1
Eau de mer filtrée à 2µm	Chocs thermiques Réalisation des témoins	30 L
Formol	Fixation des larves	100µl par acuvette
<i>Crassostrea gigas</i> (huître)	Géniteurs des larves	10 à 12