



SARL TOXEM  
UFR-ST  
25 Rue Philippe Lebon  
BP540  
76058 Le Havre cedex  
Tél : 02 32 74 43 89  
Portable : 06 19 35 73 11  
[jerome.couteau@toxem.com](mailto:jerome.couteau@toxem.com)

## ***TEST D'EMBRYOTOXICITE SUR LARVES D'HUITRES CREUSES***

**Étude N° CASAGEC-2**

**Demandeur :**

**CASAGEC Ingénierie**

***Échantillons :*** Sédiment **608450 (19)**  
Sédiment **608451 (20)**

***Demandeur :*** **CASAGEC Ingénierie**  
18 rue Maryse Bastié  
ZA Maignon  
64600 ANGLET

***Étude réalisée par :*** **TOXEM**  
UFR ST  
25, rue Philippe Lebon  
BP540  
76058 Le Havre cedex

---

***Réception des échantillons :*** 23 mai 2018

***Début d'expérimentation :*** 29 mai 2018

***Fin d'expérimentation :*** 5 juin 2018

# Introduction

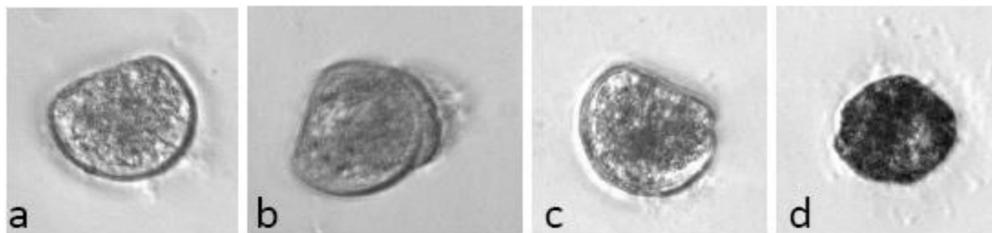
Le but de cette expérimentation est de déterminer le potentiel toxique d'un sédiment en évaluant ses capacités à perturber le développement **embryo-larvaire de l'huître creuse : *Crassostrea gigas***. Le test embryo-larvaire a été réalisé selon la norme **XP T90-382**.

## Description du test de développement larvaire

Le **test d'embryotoxicité** sur larves d'huîtres creuses est un test statique d'**écotoxicité** aquatique qui vise à déterminer l'induction d'anomalies du développement chez un certain nombre d'individus après exposition à différentes concentrations d'un **élutriat de sédiment** dont on veut évaluer la toxicité.

Les critères d'effet mesurés sur les larves sont :

- une altération de la coquille (charnière non rectiligne, valves inégales ou incomplètes)
- une hypertrophie du manteau
- le blocage à un stade embryonnaire



**Figure 1:** Différentes anomalies du développement embryonnaire de l'huître: larve "D" normale (a), anomalie du manteau (b), anomalie de la charnière (c), blocage au stade embryonnaire (d).

Les résultats de ce test permettent d'exprimer une valeur de **CE<sub>50</sub>** (Concentration efficace 50%).

## Protocole

Les géniteurs de *C. gigas* mûres proviennent de l'écloserie GUERNSEY SEA FARMS, spécialisée dans la maturation de coquillages. Cette écloserie fournit la majeure partie de l'année des huîtres prêtes à pondre et sexuellement différenciées.

Les gamètes ont été obtenus par chocs thermiques pour initier la ponte des femelles et des mâles matures. Les fécondations ont été réalisées en eau de mer de référence dans les proportions suivantes : 5 à 10 spermatozoïdes pour un ovocyte. La suspension ainsi obtenue a été maintenue à 24°C sous une légère agitation pendant deux heures afin d'éviter la polyspermie. Les œufs fécondés ont été ensuite répartis en présence des différents échantillons à tester à raison de 50 œufs/mL. Chaque concentration testée a été réalisée en 3 ou 5 réplicats.

A l'issue d'une période d'incubation de 24h à 24°C, les larves ont été fixées et les anomalies larvaires ont été dénombrées de manière aléatoire sur 100 individus en moyenne par réplicat.

Le taux résiduel d'anomalies dans le témoin eau de référence (témoin négatif) est fortement dépendant de la qualité des individus reproducteurs (donc des gamètes obtenus), il est généralement inférieur à 20%. Le test est donc considéré comme valable si plus de 80% des larves sont normales dans les récipients témoins négatifs. De même, à chaque essai et pour chaque ponte, l'embryotoxicité du sulfate de cuivre est parallèlement déterminée en tant que témoin positif pour valider les résultats obtenus.

Dans le cadre de cette étude, les larves d'huîtres ont été exposées à deux éluviats différents:

- un éluviate dont la concentration équivaut à 250 g/L de sédiment brut permettant d'analyser une gamme allant de 0 à 250 g/L de sédiment brut afin de déterminer une CE50
- un éluviate dont la concentration équivaut à 5 g/L de sédiment sec afin d'attribuer une note de risque à l'échantillon selon la norme GEODRISK.

Pour la norme GEODRISK, le pourcentage de larves anormales obtenues permet d'évaluer la toxicité des sédiments selon la grille d'évaluation suivante:

<b>Note</b>	<b>Toxicité</b>	<b>Pourcentage de larves "D" anormales</b>	<b><i>Pourcentage de larves "D" normales</i></b>
0	Négligeable	<10	>90
1	Faible	10 à 30	90 à 70
2	Moyenne	30 à 50	70 à 50
3	Forte	>50	<50
4	Très forte	Blocage du développement au stade embryon	-

Dans le cadre de cette étude, le témoin positif (CuSO<sub>4</sub>) a induit les réactions appropriées.

## **Matériels et Méthodes**

<b>1.</b>	<b>Substances d'essai</b>	
	<b>Échantillons</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 608450 (19)</li> <li>• 608451 (20)</li> </ul>
	<b>Solvant utilisé</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Eau de mer de référence</li> </ul>
	<b>Détermination de la CE50 : Quantité d'élutriat (% v/v) Équivalent g/L de sédiment brut</b>	5 / 10 / 20 / 30 / 40 / 50 / 60 / 70 / 80 / 90 / 100 12,5 / 25 / 50 / 75 / 100 / 125 / 150 / 175 / 200 / 225 / 250 (3 réplicats par quantité testée)
	<b>Détermination de la note Géodrisk:</b>	<b>Equivalent 5 g/L de sédiment sec</b> (5 réplicats par quantité testée)

<b>2.</b>	<b>Substance témoin</b>	
	<b>Témoin positif</b>	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O (N° CAS: 7758-99-8)
	<b>Concentrations testées (µg/L de Cu)</b>	0 / 20 / 30 / 40 / 50 / 60 / 80 / 100 (3 réplicats par quantité testée)

### **Références**

- [1] ASTM. 1994c. Standard guide for Conducting Static Acute Toxicity Tests Starting with Embryos of Four Species of Saltwater Bivalve Molluscs. E-724-94. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pa.
- [2] His E., Seaman M.N.L., Beiras R. 1997. A simplification of the bivalve embryogenesis larval development bioassay method for water quality assessment. Wat. Res. 31, 351-355.
- [3] Environment Agency The direct toxicity assessment of aqueous environmental samples using the oyster (*Crassostrea gigas*) embryo-larval development test (2007).

# Résultats

## Données brutes des témoins

Le pourcentage de larves normales dans les témoins négatif et positif est collecté dans les tableaux 1 et 2 page 7.

**Tableau 1:** Données concernant le pourcentage de larves normales dénombrées dans le témoin négatif (Eau de mer de référence).

Réplicat 1	Réplicat 2	Réplicat 3	Réplicat 4	Réplicat 5	Moyenne	Ecart-Type
82,1	83,6	81,6	84,0	85,3	<b>83,3</b>	1,5

**Tableau 2:** Données concernant le pourcentage de larves normales dénombrées pour les différentes concentrations de sulfate de cuivre (témoin positif).

Concentrations en cuivre (µg/L)	Nombre de larves normales (%)			Moyenne	Ecart-Type
0	81,1	83,5	76,5	<b>80,4</b>	3,6
20	73,1	86,7	82,0	<b>80,6</b>	6,9
30	82,9	90,7	83,6	<b>85,8</b>	4,3
40	76,8	81,6	80,2	<b>79,5</b>	2,5
50	73,1	65,2	66,7	<b>68,3</b>	4,2
60	49,5	50,5	48,5	<b>49,5</b>	1,0
80	10,6	11,7	14,3	<b>12,2</b>	1,9
100	0,0	0,0	0,0	<b>0,0</b>	0,0

Pour le témoin positif, la valeur de la CE<sub>50</sub> est de 63,31 µg/L de sulfate de cuivre soit **12,66 µg/L** exprimée en Cu<sup>2+</sup>. Selon la norme XP T 90-382, la sensibilité des larves est validée lorsque la CE<sub>50</sub> exprimée en Cu<sup>2+</sup> est comprise entre 6 et 16 µg/L.

## Données brutes pour la détermination de la CE50

Les données concernant la détermination de la CE<sub>50</sub> des sédiments **608450 (19)** et **608451 (20)** sont collectées dans les tableaux 3 et 4 page 8. Seules les valeurs nécessaires au calcul de la CE<sub>50</sub> ont été déterminées (*ND : Non Déterminée*).

**Tableau 3:** Données concernant le pourcentage de larves normales dénombrées pour chaque concentration d'élutriat du sédiment **608450 (19)**.

Quantité d'élutriat (%)	Équivalent sédiment (g/L)	Nombre de larves normales (%)			Moyenne	Ecart-Type
5	12,5	77,5	76,5	80,0	78,0	1,8
10	25	75,0	82,5	83,8	80,4	4,7
20	50	68,4	71,8	66,4	68,9	2,8
30	75	55,8	48,6	52,9	52,4	3,6
40	100	29,6	25,7	29,5	28,3	2,2
50	125	9,9	6,3	6,7	7,7	1,9
60	150	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
70	175	ND	ND	ND	ND	ND
80	200	ND	ND	ND	ND	ND
90	225	ND	ND	ND	ND	ND
100	250	ND	ND	ND	ND	ND

**Tableau 4:** Données concernant le pourcentage de larves normales dénombrées pour chaque concentration d'élutriat du sédiment **608451 (20)**.

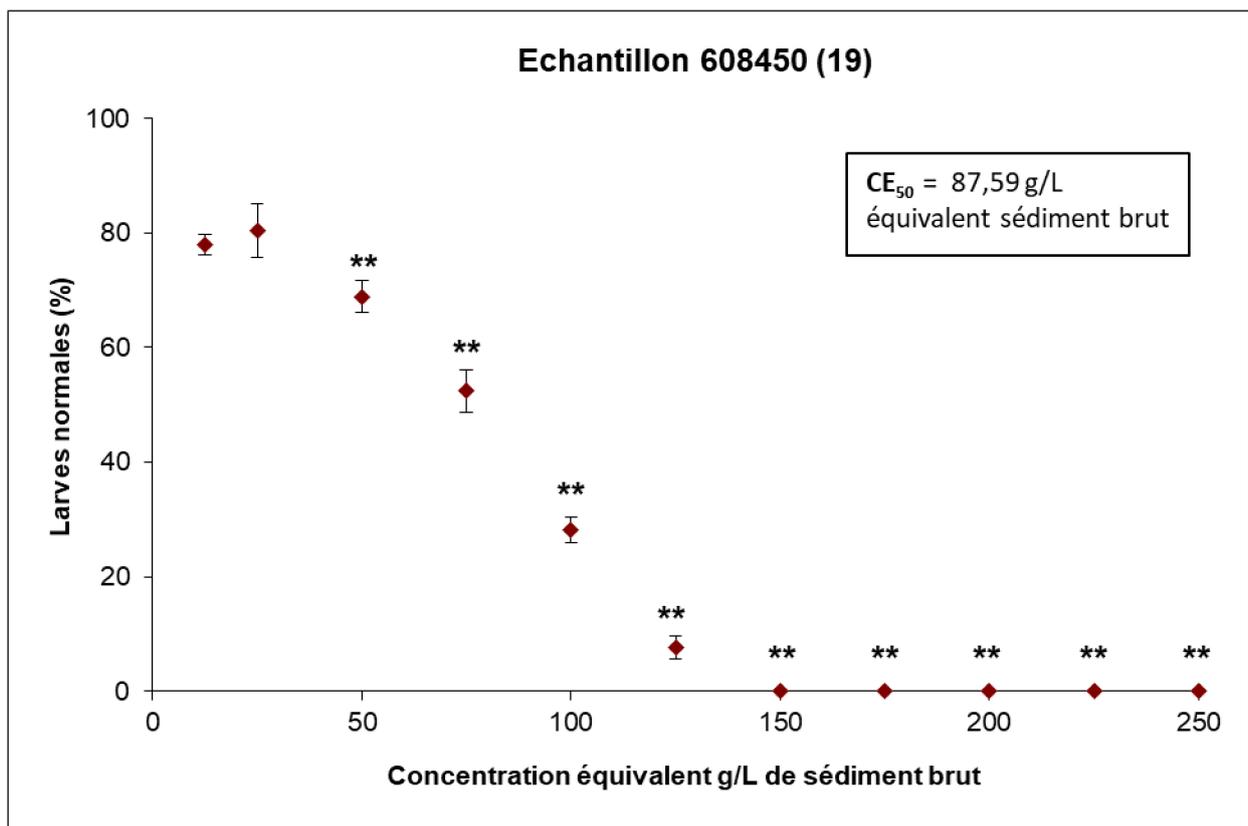
Quantité d'élutriat (%)	Équivalent sédiment (g/L)	Nombre de larves normales (%)			Moyenne	Ecart-Type
5	12,5	77,9	86,5	77,4	80,6	5,1
10	25	79,2	87,7	81,9	82,9	4,3
20	50	69,4	71,4	73,4	71,4	2,0
30	75	51,9	38,0	39,8	43,2	7,6
40	100	19,4	17,5	17,6	18,2	1,1
50	125	1,0	1,0	1,0	1,0	0,0
60	150	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
70	175	ND	ND	ND	ND	ND
80	200	ND	ND	ND	ND	ND
90	225	ND	ND	ND	ND	ND
100	250	ND	ND	ND	ND	ND

## Graphiques

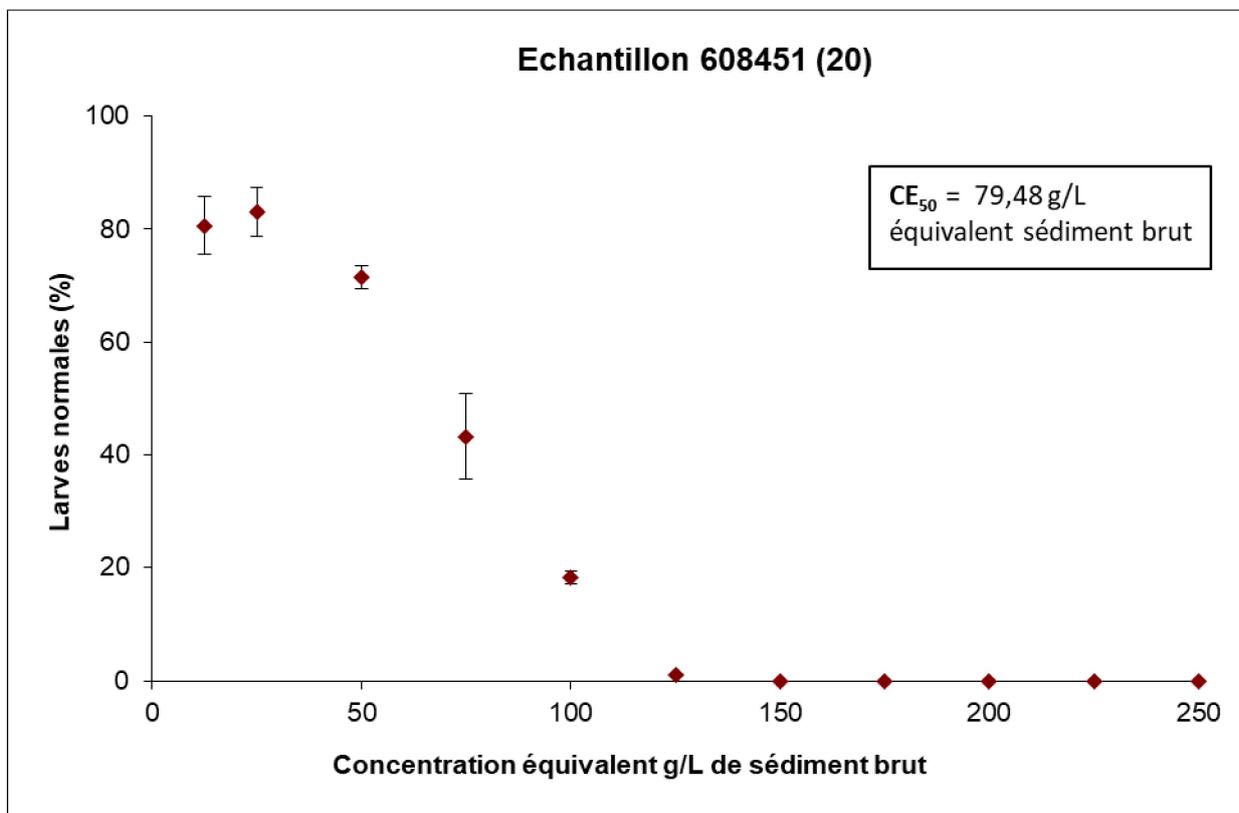
Les graphiques 1 et 2 page 9 et 10 représentent les pourcentages de larves ne présentant pas d'anomalies en fonction de la concentration testée exprimée en g de sédiment brut par litre.

Un test statistique (test de *STUDENT*) a été réalisé pour déterminer les différences significatives du nombre de larves normales pour chaque quantité testée par rapport au témoin négatif (eau de référence). Les valeurs significativement différentes au risque 0,05% et 0,01% sont annotées d'astérisques (respectivement \* et \*\*).

Lorsque que son calcul est possible, la  $CE_{50}$  est indiquée sur le graphique.



**Graphique 1:** Evolution du pourcentage de larves normales en fonction de la concentration d'élutriat à 250 g/L équivalent sédiment brut de l'échantillon 608450 (19) testée. Les valeurs significativement différentes du témoin négatif sont annotées (\*\*) pour le risque 0,01.



**Graphique 2:** Evolution du pourcentage de larves normales en fonction de la concentration d'élutriat à 250 g/L équivalent sédiment brut de l'échantillon 608451 (20) testée. Les valeurs significativement différentes du témoin négatif sont annotées (\*\*) pour le risque 0,01.

### **Données brutes pour la détermination de la note GEODRISK**

Les données permettant de déterminer la note Géodrisk de chaque échantillon sont collectées dans le tableau 5 page 10.

**Tableau 5:** Données concernant le pourcentage de larves normales dénombrées et la note Géodrisk associée pour chaque élutriat testé (5g/L équivalent sédiment sec).

Echantillon	Nombre de larves normales (%)					M	ET	Note Géodrisk
	1	2	3	4	5			
<b>608450 (19)</b>	82,5	80,9	81,9	74,6	75,9	<b>79,1</b>	3,3	<b>1-faible</b>
<b>608451 (20)</b>	69,5	71,0	71,1	75,0	69,0	<b>71,1</b>	2,1	<b>1-faible</b>

## **Conclusion**

Le test d'embryotoxicité sur larves d'huîtres creuses, selon le mode opératoire précédemment décrit, permet de déterminer **une CE<sub>50</sub> pour les deux sédiments testés** :

- **Sédiment 608450 (19) : CE<sub>50</sub> = à 87,59 g/L de sédiment brut soit 42,04 g/L en équivalent sédiment sec (siccité de 48,0%).**
- **Sédiment 608451 (20) : CE<sub>50</sub> = à 79,48 g/L de sédiment brut soit 32,66 g/L en équivalent sédiment sec (siccité de 41,1%).**

**Selon la grille de lecture Géodrisk, les sédiments 608450 (19) et 608451 (20) sont considérés comme étant faiblement toxiques.**



SARL TOXEM  
UFR-ST  
25 Rue Philippe Lebon  
BP540  
76058 Le Havre cedex  
Tél : 02 32 74 43 89  
Portable : 06 19 35 73 11  
[jerome.couteau@toxem.com](mailto:jerome.couteau@toxem.com)

## ***TEST D'EMBRYOTOXICITE SUR LARVES D'HUITRES CREUSES***

**Étude N° CASAGEC-3**  
(Bon de commande LPL N° 18-20639)

**Demandeur :**

**CASAGEC Ingénierie**

***Échantillons :***

Sédiment **655613**

***Demandeur :***

**CASAGEC Ingénierie**  
18 rue Maryse Bastié  
ZA Maignon  
64600 ANGLET

***Étude réalisée par :***

**TOXEM**  
UFR ST  
25, rue Philippe Lebon  
76600 Le Havre

---

***Réception des échantillons :***

19 décembre 2018

***Début d'expérimentation :***

19 décembre 2018

***Fin d'expérimentation :***

7 janvier 2019

# Introduction

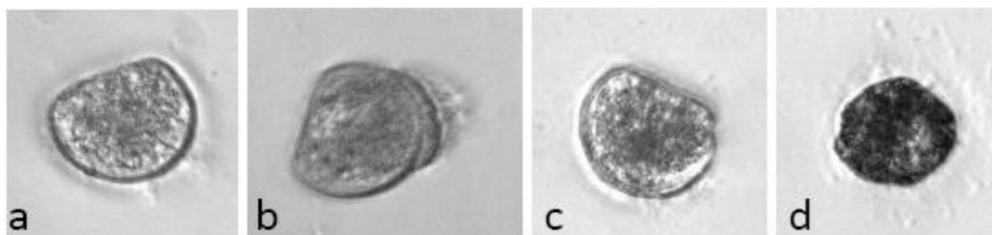
Le but de cette expérimentation est de déterminer le potentiel toxique d'un sédiment en évaluant ses capacités à perturber le développement **embryo-larvaire de l'huître creuse : *Crassostrea gigas***. Le test embryo-larvaire a été réalisé selon la norme **NF ISO 17244**.

## Description du test de développement larvaire

Le **test d'embryotoxicité** sur larves d'huîtres creuses est un test statique d'**écotoxicité** aquatique qui vise à déterminer l'induction d'anomalies du développement chez un certain nombre d'individus après exposition à différentes concentrations d'un **élutriat de sédiment** dont on veut évaluer la toxicité.

Les critères d'effet mesurés sur les larves sont :

- une altération de la coquille (charnière non rectiligne, valves inégales ou incomplètes)
- une hypertrophie du manteau
- le blocage à un stade embryonnaire



**Figure 1:** Différentes anomalies du développement embryonnaire de l'huître: larve "D" normale (a), anomalie du manteau (b), anomalie de la charnière (c), blocage au stade embryonnaire (d).

Les résultats de ce test permettent d'exprimer une valeur de **CE<sub>50</sub>** (Concentration efficace 50%).

## Protocole

Les géniteurs de *C. gigas* mûres proviennent de l'écloserie GUERNSEY SEA FARMS, spécialisée dans la maturation de coquillages. Cette écloserie fournit la majeure partie de l'année des huîtres prêtes à pondre et sexuellement différenciées.

Les gamètes ont été obtenus par chocs thermiques pour initier la ponte des femelles et des mâles matures. Les fécondations ont été réalisées en eau de mer de référence dans les proportions suivantes : 5 à 10 spermatozoïdes pour un ovocyte. La suspension ainsi obtenue a été maintenue à 24°C sous une légère agitation pendant deux heures afin d'éviter la polyspermie. Les œufs fécondés ont été ensuite répartis en présence des différents échantillons à tester à raison de 50 œufs/mL. Chaque concentration testée a été réalisée en 3 ou 5 réplicats.

A l'issue d'une période d'incubation de 24h à 24°C, les larves ont été fixées et les anomalies larvaires ont été dénombrées de manière aléatoire sur 100 individus en moyenne par réplicat.

Le taux résiduel d'anomalies dans le témoin eau de référence (témoin négatif) est fortement dépendant de la qualité des individus reproducteurs (donc des gamètes obtenus), il est généralement inférieur à 20%. Le test est donc considéré comme valable si plus de 80% des larves sont normales dans les récipients témoins négatifs. De même, à chaque essai et pour chaque ponte, l'embryotoxicité du sulfate de cuivre est parallèlement déterminée en tant que témoin positif pour valider les résultats obtenus.

Dans le cadre de cette étude, les larves d'huîtres ont été exposées à deux éluviats différents :

- un éluviate dont la concentration équivaut à 250 g/L de sédiment brut permettant d'analyser une gamme de concentrations allant de 0 à 250 g/L de sédiment brut afin de déterminer une CE50,
- un éluviate dont la concentration équivaut à 5 g/L de sédiment sec afin d'attribuer une note de risque à l'échantillon selon la norme **GEODRISK**.

Pour la norme **GEODRISK**, le pourcentage de larves anormales obtenues permet de classer la toxicité des sédiments selon la grille suivante:

<b>Note</b>	<b>Toxicité</b>	<b>Pourcentage de larves "D" anormales</b>	<b><i>Pourcentage de larves "D" normales</i></b>
0	Négligeable	<10	>90
1	Faible	10 à 30	90 à 70
2	Moyenne	30 à 50	70 à 50
3	Forte	>50	<50
4	Très forte	Blocage du développement au stade embryon	-

Dans le cadre de cette étude, le témoin positif (CuSO<sub>4</sub>) a induit les réactions appropriées.

# Matériels et Méthodes

1.	<b>Substances d'essai</b>	
	<b>Échantillon</b>	• sédiment 655613
	<b>Solvant utilisé</b>	• Eau de mer de référence
	<b>Détermination de la CE50 : Quantité d'élutriat (% v/v) Équivalent g/L de sédiment brut</b>	5 / 10 / 20 / 30 / 40 / 50 / 60 / 70 / 80 / 90 / 100 12,5 / 25 / 50 / 75 / 100 / 125 / 150 / 175 / 200 / 225 / 250 (3 réplicats par quantité testée)
	<b>Détermination de la note Géodrisk:</b>	<b>Equivalent 5 g/L de sédiment sec</b> (5 réplicats par quantité testée)

2.	<b>Substance témoin</b>	
	<b>Témoin positif</b>	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O (N° CAS: 7758-99-8)
	<b>Concentrations testées (µg/L de Cu)</b>	20 / 30 / 40 / 50 / 60 / 80 / 100 (3 réplicats par quantité testée)

## Références

- [1] NF ISO 17244 : Qualité de l'eau — Détermination de la toxicité d'échantillons aqueux sur le développement embryo-larvaire de l'huître creuse (*Crassostrea gigas*) et de la moule (*Mytilus edulis* ou *Mytilus galloprovincialis*).
- [2] His E., Seaman M.N.L., Beiras R. 1997. A simplification of the bivalve embryogenesis larval development bioassay method for water quality assessment. *Wat. Res.* 31, 351-355.
- [3] Environment Agency The direct toxicity assessment of aqueous environmental samples using the oyster (*Crassostrea gigas*) embryo-larval development test (2007).
- [4] GEODE. Suivis environnementaux des opérations de dragage et d'immersion. Annexe 4 : Méthodes de suivi – Propositions de protocoles détaillés et de liens vers d'autres sources méthodologiques. Décembre 2012.

# Résultats

## Données brutes des témoins

Le pourcentage de larves normales dans les témoins négatif et positif est collecté dans les tableaux 1 et 2 page 7.

**Tableau 1:** Données concernant le pourcentage de larves normales dénombrées dans le témoin négatif (Eau de mer de référence).

Réplicat 1	Réplicat 2	Réplicat 3	Réplicat 4	Réplicat 5	Moyenne	Ecart-Type
88,2	86,0	82,1	79,2	84,1	<b>83,9</b>	3,5

**Tableau 2:** Données concernant le pourcentage de larves normales dénombrées pour les différentes concentrations de sulfate de cuivre (témoin positif).

Concentrations en cuivre (µg/L)	Nombre de larves normales (%)			Moyenne	Ecart-Type
20	<b>45,0</b>	79,0	85,5	<b>82,3</b>	4,6
30	67,2	81,5	82,1	<b>76,9</b>	8,4
50	71,4	68,8	52,2	<b>64,1</b>	10,4
60	<b>7,1</b>	49,2	47,2	<b>48,2</b>	1,4
80	14,1	15,7	23,4	<b>17,7</b>	5,0
100	0,0	0,0	0,0	<b>0,0</b>	0,0

*Les valeurs en rouge ne sont pas prises en compte dans les calculs.*

Pour le témoin positif, la valeur de la CE<sub>50</sub> est de 61,75 µg/L de sulfate de cuivre soit **11,87 µg/L** exprimée en Cu<sup>2+</sup>. Selon la norme XP T 90-382, la sensibilité des larves est validée lorsque la CE<sub>50</sub> exprimée en Cu<sup>2+</sup> est comprise entre 6 et 16 µg/L.

## Données brutes pour la détermination de la CE50

Les données concernant la détermination de la CE<sub>50</sub> du sédiment **655613** sont collectées dans le tableau 3 page 8. Seules les valeurs nécessaires au calcul de la CE<sub>50</sub> ont été déterminées (ND : Non Déterminée).

**Tableau 3:** Données concernant le pourcentage de larves normales dénombrées pour chaque concentration d'élutriat du sédiment **655613**.

Quantité d'élutriat (%)	Équivalent sédiment (g/L)	Nombre de larves normales (%)			Moyenne	Ecart-Type
5	12,5	78,6	76,9	76,8	77,4	1,0
10	25	37,9	75,4	69,4	72,4	4,2
20	50	73,6	63,5	69,2	68,8	5,1
30	75	75,0	73,2	71,9	73,4	1,5
40	100	83,1	78,2	78,8	80,0	2,6
50	125	68,9	60,7	66,0	65,2	4,1
60	150	12,3	11,1	36,5	20,0	14,4
70	175	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
80	200	ND	ND	ND	ND	ND
90	225	ND	ND	ND	ND	ND
100	250	ND	ND	ND	ND	ND

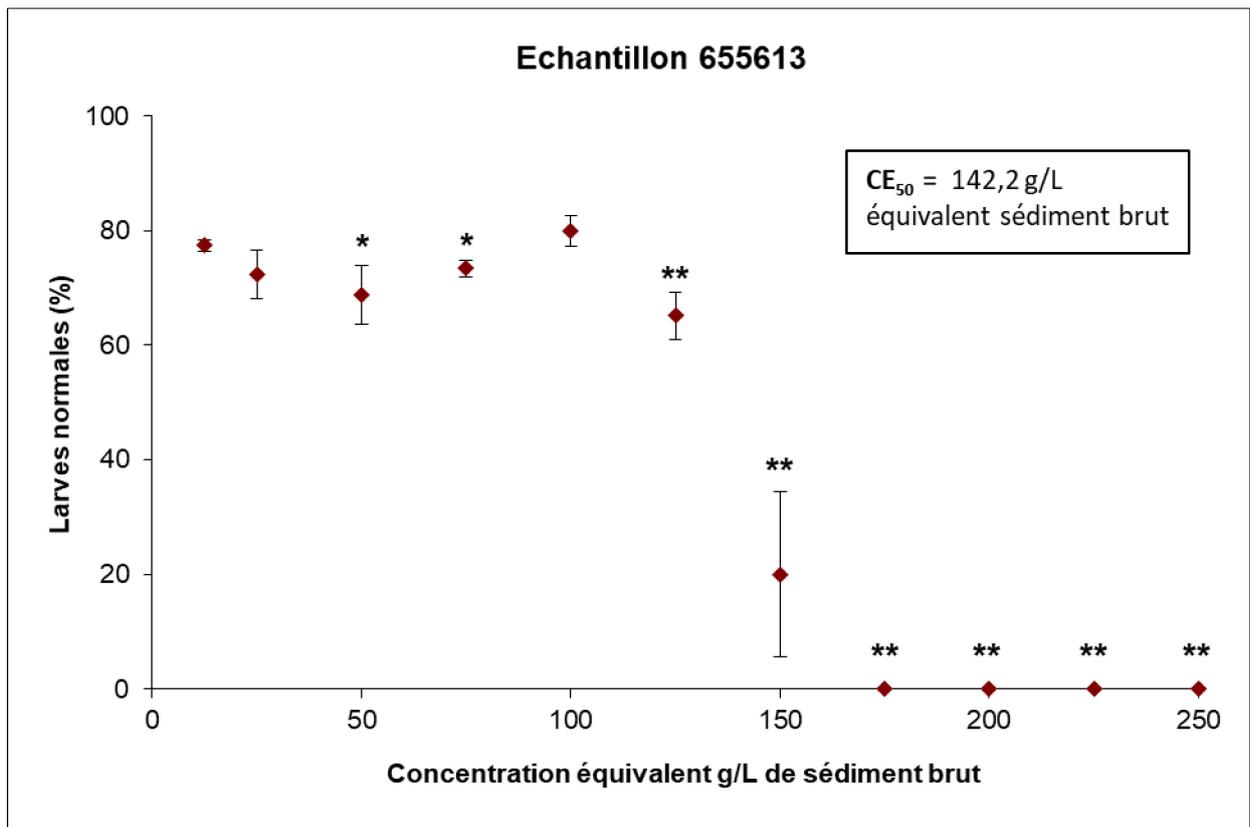
*La valeur en rouge n'est pas prise en compte dans les calculs.*

## Graphiques

Le graphique 1 page 9 représente les pourcentages de larves ne présentant pas d'anomalies en fonction de la concentration testée exprimée en g de sédiment brut par litre.

Un test statistique (test de *STUDENT*) a été réalisé pour déterminer les différences significatives du nombre de larves normales pour chaque quantité testée par rapport au témoin négatif (eau de référence). Les valeurs significativement différentes au risque 0,05% et 0,01% sont annotées d'astérisques (respectivement \* et \*\*).

Lorsque que son calcul est possible, la CE<sub>50</sub> est indiquée sur le graphique.



**Graphique 1:** Evolution du pourcentage de larves normales en fonction de la concentration d'élutriat à 250 g/L équivalent sédiment brut de l'échantillon 655613 testée. Les valeurs significativement différentes du témoin négatif sont annotées (\*\*) pour le risque 0,01 et (\*) pour le risque 0,05.

### Données brutes pour la détermination de la note GEODRISK

Les données permettant de déterminer la note **GEODRISK** de chaque échantillon sont collectées dans le tableau 4 page 10.

**Tableau 4:** Données concernant le pourcentage de larves normales dénombrées et la note **GEODRISK** associée pour chaque élutriat testé (5g/L équivalent sédiment sec).

Echantillon	Nombre de larves normales (%)					M	ET	Note Géodrisk
	70,4	69,7	70,0	76,4	72,6			
<b>655613</b>	70,4	69,7	70,0	76,4	72,6	<b>71,8</b>	2,5	<b>1-faible</b>

## **Conclusion**

Le test d'embryotoxicité sur larves d'huîtres creuses, selon le mode opératoire précédemment décrit, permet de déterminer **une CE<sub>50</sub> pour le sédiment 655613 (CE<sub>50</sub> = à 142,2 g/L de sédiment brut soit 90,297 g/L en équivalent sédiment sec / siccité de 63,5%).**

**Selon la grille de lecture GEODRISK, le sédiment 655613 est considéré comme étant « Faiblement toxique ».**