



*Programme*

“Evaluation et réduction des risques liés à l’utilisation des pesticides”

*Projet*

“Impact des Pesticides sur l’Environnement Marin”

IPEM



Convention de Recherche n°12-C/2003,  
Référence accord n° CV 03000104.

Rapport final 2007





**Participants au projet :**



Gaël Durand, Christiane Videau,  
Dorothee Hureau, Gwendolina Limon,  
IDHESA Bretagne océane/Pôle Analytique des Eaux  
Technopôle Brest-Iroise  
B.P. 52  
120 avenue Alexis de Rochon  
29 280 Plouzané



Geneviève Arzul, Françoise Quiniou,  
IFREMER Brest  
Département Biogéochimie et Ecotoxicologie, Laboratoire Ecotoxicologie  
B.P. 70  
29 280 Plouzané Cedex



Annick Hourmant,  
Université de Bretagne Occidentale –UBO  
Laboratoire de biotechnologie et physiologie végétales (BPV)  
6 Avenue Victor Le Gorgeu  
B.P. 809  
29 285 Brest Cedex

Denis de la Broise, Sabine Stachowski  
Université de Bretagne Occidentale -UBO  
LUMAQ  
Pôle Universitaire P.J. Helias  
29 000 Quimper Cedex



# Sommaire

## Résumé-bilan

<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>1 Les pesticides dans les différents milieux naturels</b> .....	<b>3</b>
<b>1.1 Résultats d'analyses sur le site de la RADE de BREST :</b> .....	<b>4</b>
1.1.1 Résultats d'analyses en RADE de BREST : .....	4
1.1.2 Résultats d'analyses sur le BASSIN VERSANT de la rade de Brest : .....	5
<b>1.2 Résultats d'analyses sur le site de PENZE :</b> .....	<b>5</b>
<b>1.3 Résultats d'analyses sur le site de RIEC sur BELON :</b> .....	<b>5</b>
<b>1.4 Résultats d'analyses sur le site des GLENAN</b> .....	<b>6</b>
<b>2 Réponse des communautés naturelles</b> .....	<b>7</b>
<b>2.1 Effets à moyen terme (7-8 jours) sur communautés naturelles</b> .....	<b>7</b>
2.1.1 Impact des pesticides sur la croissance des populations phytoplanctoniques naturelles des 4 sites.7	
2.1.1.1 Protocole expérimental .....	7
2.1.1.1.1 Prélèvements et mise en culture.....	7
2.1.1.1.2 Protocoles d'analyses .....	9
2.1.1.2 Résultats de la première année de l'estuaire de la Penzé et celui de l'Elorn .....	9
2.1.1.2.1 Estuaire de la Penzé (Pont de la Corde).....	9
2.1.1.2.2 Estuaire de l'Elorn (Le Relecq-Kerhuon) .....	23
2.1.1.2.3 Discussion.....	35
2.1.1.3 Résultats de la deuxième année : Les Glénan et la rivière du Bélon .....	39
2.1.1.3.1 Site de référence : les Glénan.....	39
2.1.1.3.2 Estuaire du Bélon.....	53
2.1.1.3.3 Discussion.....	67
2.1.2 Analyses spécifiques de phytoplancton.....	73
<b>2.2 Tolérance induite des communautés phytoplanctoniques</b> .....	<b>78</b>
2.2.1 Caractéristiques des prélèvements.....	79
2.2.2 Tests de production primaire.....	83
2.2.3 Discussions.....	85
<b>2.3 Etude en mésocosme <i>in situ</i></b> .....	<b>85</b>
2.3.1 Protocole des microcosmes <i>in situ</i> .....	85
2.3.2 Récapitulatif des expériences effectuées durant les 3 années : .....	87
2.3.3 Pesticides testés : .....	87
2.3.4 Techniques d'analyse des communautés microbiennes planctoniques : .....	89
2.3.5 Résultats des analyses des profils pigmentaires par HPLC : .....	89
2.3.5.1 Représentativité des microcosmes évaluée par la comparaison des profils pigmentaires:...	90
2.3.5.2 Evaluation de l'impact des pesticides par comparaison des profils pigmentaires.....	92
2.3.6 Résultats des analyses des empreintes génétiques des communautés par TTGE .....	93
2.3.6.1 Analyse des communautés exposées à 100 µg/L de chlorpyrifos-éthyl : .....	93
2.3.7 Analyse des communautés exposées à 1, 10 et 100 µg/L d'époxiconazole: Epoxiconazole 1 µg/L .	
.....	94
2.3.7.1 Analyse des communautés exposées à 1, 10 et 100 µg/L de glyphosate : .....	97
2.3.7.2 Conclusion sur les analyses des empreintes moléculaires par TTGE : .....	98
2.3.8 Analyse par cytométrie de flux : .....	98
2.3.9 Synthèse des résultats des tests d'impact sur les microcosmes <i>in situ</i> .....	99
2.3.9.1 Herbicides.....	99
2.3.9.2 Insecticide.....	104
2.3.9.3 Fongicide .....	105
2.3.10 Conclusions sur les expérimentations en microcosmes <i>in situ</i> .....	106

<b>3</b>	<b><i>La réponse des microalgues en cultures monospécifiques</i></b> .....	<b>107</b>
<b>3.1</b>	<b>Comparaison de la sensibilité de trois espèces phytoplanctoniques compétitrices présentes en estuaire de Penzé, au mélange de pesticides</b> .....	<b>107</b>
3.1.1	Matériel et méthode.....	107
3.1.2	Résultats .....	107
<b>3.2</b>	<b>Etude de l'effet des pesticides sur la cyanobactérie <i>Synechococcus sp.</i>, RCC 752, (WH7803),</b> .....	<b>110</b>
<b>3.3</b>	<b>Comparaison des caractéristiques écotoxicologiques des pesticides</b> .....	<b>115</b>
3.3.1	Etudes sur cultures monospécifiques de microalgues : .....	115
3.3.1.1	Caractéristiques écotoxicologiques des substances étudiées .....	115
<b>3.4</b>	<b>Discussions</b> .....	<b>125</b>
<b>4</b>	<b><i>Modifications cellulaires induites par les pesticides</i></b> .....	<b>127</b>
<b>4.1</b>	<b>Effets physiologiques</b> .....	<b>127</b>
4.1.1	Matériel et Méthodes.....	127
4.1.1.1	Matériel.....	127
4.1.1.2	Dosage des pigments .....	127
4.1.1.3	Détermination de l'ATP .....	127
4.1.1.4	Mesure de la respiration et de la photosynthèse .....	128
4.1.1.5	Peroxydation des lipides .....	128
4.1.1.6	Résultats .....	128
4.1.2	Discussion .....	134
<b>4.2</b>	<b>Etude de l'effet de la bentazone sur <i>Chaetoceros gracilis</i> en turbidostat de type « carboxystat »</b> .....	<b>134</b>
<b>4.3</b>	<b>Altérations génétiques</b> .....	<b>137</b>
<b>5</b>	<b><i>Conclusions générales et perspectives</i></b> .....	<b>143</b>
<b>6</b>	<b><i>Valorisation, Communications et diffusion des résultats</i></b> .....	<b>147</b>
<b>6.1</b>	<b>Publications</b> .....	<b>147</b>
<b>6.2</b>	<b>Congrès</b> .....	<b>148</b>
6.2.1	PRIMO .....	148
6.2.2	SETAC .....	148
6.2.3	Groupe Français des Pesticides .....	148
6.2.4	Premier Congrès Méditerranéen d'Océanologie .....	149
6.2.5	31ème congrès de l'Union des Océanographes de France .....	150
6.2.6	Seminar AquaLife .....	150
6.2.7	UOF Forum des jeunes océanographes - EMECS 7, Environmental Management of Enclosed Coastal Areas.....	150
6.2.8	8th International Conference on Shellfish Restoration, ICSR.....	151
6.2.9	Forum des doctorants, 10 mars 2005.....	153
6.2.10	Congrès SETAC Europe 14th Annual Meeting.....	153
6.2.11	21e Forum des jeunes océanographes – 1er Forum européen des jeunes océanographes .....	154
6.2.12	Congrès de Bordeaux : 9 <sup>th</sup> FECS Conference on Chemistry and the Environment and 2 <sup>nd</sup> SFC Meeting on Environmental Chemistry Behaviour of Chemicals in the Environment .....	155
6.2.13	ISME .....	155
<b>6.3</b>	<b>Information et sensibilisation</b> .....	<b>155</b>
<b>6.4</b>	<b>Formation</b> .....	<b>156</b>
<b>6.5</b>	<b>Site Internet</b> .....	<b>157</b>
<b>7</b>	<b><i>Bibliographie</i></b> .....	<b>159</b>
<b>8</b>	<b><i>Annexes</i> :</b> .....	<b>165</b>

<b>8.1</b>	<b>Annexe 1 : Méthodes d'analyses des pesticides .....</b>	<b>165</b>
8.1.1	Protocole pour l'analyse des solutions « en directe » : .....	165
8.1.1.1	Matériel et produits.....	165
8.1.1.2	Préparation des réactifs et des solutions étalons .....	165
8.1.1.3	Conditions d'analyses et limites de détection .....	166
8.1.2	Méthodologie pour l'analyse des pesticides acides et des produits de dégradation : .....	167
8.1.2.1	Matériel et produits.....	167
8.1.2.2	Protocole d'analyse .....	168
<b>8.2</b>	<b>Annexe 2 : synthèse des résultats d'analyses .....</b>	<b>171</b>
8.2.1	Résultats d'analyses sur le site de la RADE de BREST : .....	171
8.2.1.1	Résultats d'analyses en RADE de BREST : .....	171
8.2.1.2	Résultats d'analyses sur le BASSIN VERSANT de la rade de Brest : .....	172
8.2.2	Résultats d'analyses sur le site de PENZE : .....	173
8.2.3	Résultats d'analyses sur le site de RIEC sur BELON : .....	175
8.2.4	Résultats d'analyses sur le site des GLENAN : .....	176
<b>8.3</b>	<b>Annexe 3 : Composition des mélanges testés et concentrations en pesticides retrouvés dans les microcosmes en début et en fin de cultures .....</b>	<b>179</b>
<b>8.4</b>	<b>Annexe 4 : Pigment message taxonomique .....</b>	<b>185</b>

## Figures :

Figure 1 : Sites des prélèvements.....	2
Figure 2 : Evolution de la biomasse chlorophyllienne dans les différents milieux.....	10
Figure 3 : Pourcentage de chlorophylle dans les différents pics.....	11
Figure 4 : Courbes de croissance des principales diatomées.....	13
Figure 5 : courbes de croissance des principales diatomées.....	14
Figure 6 : Courbes de croissance des dinoflagellés.....	15
Figure 7 : Pourcentages par rapport au témoin des taux de croissance obtenus dans les différents milieux.....	17
Figure 8 : Pourcentages par rapport au témoin des taux de croissance obtenus en présence d'un fongicide.....	18
Figure 9 : Pourcentages par rapport au témoin des taux de croissance obtenus en présence d'un insecticide.....	18
Figure 10 : Pourcentages par rapport au témoin des densités cellulaires finales obtenues après apport d'herbicides.....	20
Figure 11 : Pourcentages par rapport au témoin des densités cellulaires finales obtenues en présence d'un fongicide et d'un insecticide.....	21
Figure 12 : Evolution de la biomasse chlorophyllienne dans les différents milieux.....	24
Figure 13 : Pourcentage de chlorophylle en phase exponentielle et en fin de croissance.....	24
Figure 14 : Courbes de croissance des principales diatomées.....	27
Figure 15 : Courbes de croissance des principales diatomées.....	28
Figure 16 : Pourcentages par rapport au témoin du taux de croissance après apport d'herbicides.....	30
Figure 17 : Pourcentages par rapport au témoin du taux de croissance en présence d'un fongicide et d'un insecticide.....	31
Figure 18 : Pourcentages par rapport au témoin de la densité cellulaire finale après apports d'herbicides.....	33
Figure 19 : Pourcentages par rapport au témoin de la densité cellulaire finale après apport de fongicide et d'insecticide.....	34
Figure 20 : Evolution de la chlorophylle dans les différents milieux (Glénan).....	41
Figure 21 : Pourcentages de chlorophylle en phase exponentielle et en fin de croissance.....	41
Figure 22 : Courbes de croissance des différentes espèces de phytoplancton.....	45
Figure 23 : Effet des différents pesticides sur le taux de croissance $\mu j^{-1}$ des principales espèces de diatomées recensées dans l'eau des Glénan.....	48
Figure 24 : Effet des différents pesticides sur la densité cellulaire maximale des principales espèces de diatomées recensées dans l'eau des Glénan.....	52
Figure 26 : Pourcentages de chlorophylle en phase exponentielle (J2) et au maximum de biomasse.....	55
Figure 27 : Courbes de croissance des différentes espèces de phytoplancton.....	59
Figure 28 : Effet des différents pesticides sur le taux de croissance $\mu j^{-1}$ des principales espèces recensées dans la rivière de Belon.....	62
Figure 29 : Effet des pesticides sur la densité cellulaire maximale des différentes espèces de phytoplancton.....	66
Figure 30 : Effet des contaminants (molécules actives seules) sur la sélection des microalgues sur le site de référence Glénan.....	74
Figure 31 : Effet des contaminants (molécules actives seules) sur la sélection des microalgues sur l'estuaire de Penzé après 128h de contamination.....	75

Figure 32 : Effet des contaminants (molécules actives seules) sur la sélection des microalgues sur l'estuaire d'Elorn au cours de l'expérience de contamination. ....	76
Figure 33 : Effet des contaminants (molécules actives seules) sur la sélection des microalgues sur l'estuaire du Bélon au cours de l'expérience de contamination. ....	77
Figure 34 : Variation de production primaire (PP) dans les quatre prélèvements étudiés, et concentration du mélange de pesticides produisant 50 % d'atténuation de PP. ....	84
Figure 35 : Variations des CE50 et des concentrations cumulées en pesticides analysés dans les prélèvements de quatre sites. ....	85
Figure 36 : Localisation des sites expérimentaux .....	86
Figure 37 : Schémas de la structure en position dans le milieu .....	87
Figure 38 : Profils pigmentaires des eaux de surface et des témoins de l'expérience D. ....	91
Figure 39 : Profils pigmentaires des eaux de surface et des témoins des expériences D et E. ....	91
Figure 40 : Profils pigmentaires des microcosmes, Témoins et traités au basamaïs pendant l'expérience J.....	92
Figure 41 : Gel 16S et dendrogramme (T : témoins ; C : chlorpyriphos 100 µg/L ; Syn : souche de <i>Synechococcus sp.</i> ).....	93
Figure 42 : Gel 18S (T : témoins ; C : chlorpyriphos 100 µg/L) .....	94
Figure 43 : Gel 16S (T : témoins ; E1 : époxiconazole 1 µg/L ; Syn : souche de <i>Synechococcus sp.</i> ).....	95
Figure 44 : Gel 18S (T : témoins ; E1 : époxiconazole 1 µg/L).....	95
Figure 45 : Gel 16S (T : témoins ; E10 : époxiconazole 10 µg/L E100 : époxiconazole 100 µg/L ; Syn : souche de <i>Synechococcus sp.</i> ).....	96
Figure 46 : Gel 18S (T : témoins ; E10 : époxiconazole 10 µg/L ; E100 : époxiconazole 100 µg/L).....	96
Figure 47 : Gel 16S (T : témoins ; G1 : glyphosate 1 µg/L ; G10 : glyphosate 10 µg/L ; Syn : souche de <i>Synechococcus sp.</i> ).....	97
Figure 48 : Gel 18S (T : témoins ; G1 : glyphosate 1 µg/L ; G10 : glyphosate 10 µg/L).....	98
Figure 49 : Cytogrammes de microcosmes Témoins et exposés à 100 µg/L d'Opus (R1 : eucaryotes, R2 : prasinophycées, R3 : <i>Synechococcus</i> ).....	99
Figure 50 : Influence d'un mélange de 5 pesticides sur la production primaire d' <i>A.minutum</i> .....	107
Figure 51 : calcul de la CE50 pour la production primaire .....	108
Figure 52 : influence dun mélange de 5 pesticides sur la production primaire d' <i>H.triquetra</i> .....	108
Figure 53 : calcul de la CE50 pour la production primaire .....	108
Figure 54 : influence dun mélange de 5 pesticides sur la production primaire de <i>S.trochoidea</i> .....	109
Figure 55 : calcul de la CE50 pour la production primaire .....	109
Figure 56 : Cultures de <i>Synechococcus</i> (4 répliquats) en lumière naturelle exposées au Milagro (nicosulfuron) ; les barres représentent les intervalles de confiance au seuil 95 % .....	110
Figure 57 : Cultures de <i>Synechococcus</i> (4 répliquats) en lumière naturelle exposées au Basamaïs (Bentazone); les barres représentent les intervalles de confiances au seuil 95 % .....	110
Figure 58 : Cultures de <i>Synechococcus</i> (4 répliquats) en lumière naturelle exposées au Dursban (Chlorpyriphos) ; les barres représentent les intervalles de confiances au seuil 95 %.....	111
Figure 59 : Cultures de <i>Synechococcus</i> (4 répliquats) en lumière naturelle exposées à l'Opus (Epoxiconazole); les barres représentent les intervalles de confiance au seuil 95 % .....	111
Figure 60 : Cultures de <i>Synechococcus</i> (4 répliquats) en lumière naturelle exposées au Frontière (Diméthénamide); les barres représentent les intervalles de confiances au seuil 95 %.....	112
Figure 61 : Cultures de <i>Synechococcus</i> (4 répliquats) en lumière naturelle exposées au Round-up (Glyphosate); les barres représentent les intervalles de confiances au seuil 95 %.....	112

Figure 62 : Cultures de <i>Synechococcus</i> (4 réplicats) en lumière naturelle exposées au Round-up (Glyphosate); les barres représentent les intervalles de confiances au seuil 95 %.....	113
Figure 63 : Cultures de <i>Synechococcus</i> (4 réplicats) en lumière artificielle exposées au Round-up (Glyphosate); les barres représentent les intervalles de confiances au seuil 95 %.....	113
Figure 64 : Cultures de <i>Synechococcus</i> (4 réplicats) en lumière artificielle exposées à l'Opus (Epoxyconazole); les barres représentent les intervalles de confiances au seuil 95 %.....	114
Figure 65 : Comparaison des toxicités des molécules herbicides, pures et en formulations.	120
Figure 66 : Comparaison des toxicités des molécules fongicide (époxyconazole) et insecticide (chlorpyriphos-éthyl), pures et en formulations. ....	121
Figure 67 : Variations des CE50 obtenues dans les différents milieux de culture pour <i>A. minutum</i> , en présence de bentazone (Basamaïs) et de nicosulfuron (Milagro).....	122
Figure 68 : Comparaison de la toxicité chronique définie à partir des CSEO chez les herbicides en formulation. ....	124
Figure 69 : Comparaison de la toxicité chronique définie à partir des CSEO chez le fongicide et l'insecticide en formulation. ....	124
Figure 70 : Effet au cours du temps de la bentazone sur la croissance de <i>C. gracilis</i> .....	131
Figure 71 : Effet de la bentazone (100 µg/L) sur la taille des cellules de <i>C. gracilis</i> après 3j de culture. Témoin : n = 118 ; bentazone : n = 127.....	131
Figure 72 : Influence de la bentazone (50 µg/L) sur la teneur en pigments de <i>C. gracilis</i> cultivée en milieu post hivernal. Résultats exprimés en ng/million de cellules ± ES.....	132
Figure 73 : Influence de la bentazone (50 et 100 µg/L) sur l'évolution de la teneur en ATP de <i>C. gracilis</i> cultivée en milieu post hivernal. Moyennes de 4 expériences indépendantes ± SD .....	133
Figure 74 : Impact de l'ajout de Basamaïs sur la culture de <i>Chaetoceros gracilis</i> en carboxystat. ....	136
Figure 75 : Influence de la bentazone sur la croissance de <i>C. gracilis</i> .....	137
Figure 76 : Diatomée <i>Chaetoceros gracilis</i> (4 µm environ) .....	138
Figure 77 : Photos du noyau de <i>Karenia mikimotoi</i> .....	139
Figure 78 : Effet de l'exposition à l'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sur le niveau de cassures de brins de l'ADN de <i>Karenia mikimotoi</i> .....	139
Figure 79 : Effet de l'exposition à 3 pesticides sur le niveau de cassures de brins de l'ADN de <i>Karenia mikimotoi</i> .....	140

## Tableaux :

Tableau 1 : Concentrations au temps t0 des éléments ajoutés aux différents milieux utilisés dans les cultures. ....	8
Tableau 2 : Espèces phytoplanctoniques dénombrées dans l'eau de l'estuaire de la Penzé avant la mise en culture. ....	12
Tableau 3 : Taux de croissance µ j <sup>-1</sup> des espèces phytoplanctoniques dans le milieu témoin .	16
Tableau 4 : Espèces phytoplanctoniques dénombrées dans l'eau de l'estuaire de l'Elorn avant la mise en culture.....	25
Tableau 5 : Taux de croissance µ j <sup>-1</sup> des espèces phytoplanctoniques dans le milieu témoin.	29
Tableau 6 : Récapitulatif de l'impact des pesticides sur le taux de croissance µ j <sup>-1</sup> de différentes espèces de phytoplancton naturel.....	37
Tableau 7 : Récapitulatif de l'impact des pesticides sur la densité cellulaire maximale D <sub>mx</sub> de différentes espèces de phytoplancton naturel.....	38
Tableau 8 : Espèces phytoplanctoniques dénombrées dans l'eau des Glénan avant la mise en culture.....	40

Tableau 9 : Taux de croissance $\mu j^{-1}$ des principales diatomées dans le milieu témoin (Glénan).	45
Tableau 10 : Concentrations (ng/L) des pesticides mesurées dans les différents milieux le jour de la mise en culture (J0) et après 7 jours de croissance (J7).	53
Tableau 11 : Espèces phytoplanctoniques dénombrées dans l'eau de l'estuaire du Bélon.	54
Tableau 12 : taux de croissance $\mu j^{-1}$ des espèces phytoplanctoniques dans le milieu témoin de l'estuaire du Bélon	60
Tableau 13 : Récapitulatif de l'impact des pesticides sur le taux de croissance $\mu j^{-1}$ de différentes espèces de phytoplancton naturel.	69
Tableau 14: Récapitulatif de l'impact des pesticides sur la densité cellulaire maximale Dmx de différentes espèces de phytoplancton naturel.	70
Tableau 15 : Résultats des analyses chimiques de contaminants à Glénan.	80
Tableau 16 : Résultat des analyses chimiques en estuaire d'Elorn.	80
Tableau 17 : Résultat des analyses chimiques en estuaire de Penzé.	81
Tableau 18 : Résultat des analyses chimiques dans le Bélon.	82
Tableau 19 : formulations commerciales	83
Tableau 20 : Résumé des calculs de CE50 et des concentrations de pesticides totaux.	84
Tableau 21 : Résumé des expériences de terrain en microcosme	87
Tableau 22 : nombre de bouteilles testées pour chaque pesticide, par concentration	88
Tableau 23 : Pigments détectés dans l'ensemble des expériences et abréviations utilisées dans le texte, figures et tableaux.	89
Tableau 24 : Effets du Basamaïs sur les communautés phytoplanctoniques naturelles : populations et pigments.	100
Tableau 25 : Effets du Round'up sur les communautés microbiennes naturelles : empreintes génétiques, populations et pigments.	101
Tableau 26 : Effets du Milagro sur les communautés phytoplanctoniques : pigments.	102
Tableau 27 : Effets du Frontière sur les communautés phytoplanctoniques : pigments	103
Tableau 28 : Effets du Dursban sur les communautés microbiennes naturelles : empreintes génétiques, populations et pigments.	104
Tableau 29 : Effets de l'Opus sur les communautés microbiennes naturelles : empreintes génétiques, populations et pigments.	105
Tableau 30 : récapitulatif des CSEO et CE50	109
Tableau 31 : Synthèse des résultats obtenus sur la croissance de <i>Synechococcus sp.</i> Exposée à divers pesticides.	114
Tableau 32 : Tableau récapitulatif des gammes de concentrations testées pour les différentes substances.	115
Tableau 33 : Composition nutritive des différents milieux traités. Les concentrations approchées des différents inocula sont mentionnées en $cell L^{-1}$ pour <i>Chaetoceros gracilis</i> et <i>Alexandrium minutum</i> .	116
Tableau 34 : Résumé des résultats écotoxicologiques obtenus.	117
Tableau 35 : Comparaison des CE50 en mg/L données dans Agritox pour <i>Chlorella fusca</i> ©, <i>Ankistrodesmus bibriainus</i> (A), <i>Scenedesmus suspicatus</i> (S).	119
Tableau 36 : Effet stimulateur des faibles doses des pesticides testés : SA (« pure ») et formulations	123
Tableau 37 : Effet des herbicides (formulation commerciale) sur la teneur en ATP, en pigments et la densité cellulaire de <i>Chaetoceros gracilis</i> après 3 j de culture en milieu post hivernal.	129
Tableau 38 : Effet du chlorpyrifos-éthyl et de l'époxiconazole (formulations commerciales) sur la teneur en ATP, en pigments et la densité cellulaire de <i>Chaetoceros gracilis</i> après 3 j de culture en milieu post hivernal.	130

Tableau 39 : Influence de 50 µg/L de bentazone (Basamaïs) sur les teneurs en pigments et en ATP de <i>C. gracilis</i> cultivée pendant 1 et 2 jours dans un milieu f/2. ....	132
Tableau 40 : Vitesses de respiration et de photosynthèse de <i>C. gracilis</i> exposée à différentes concentrations de bentazone après 3 jours de culture en milieu post hivernal.....	133
Tableau 41 : Modification des TBARS après 2 j d'exposition à la bentazone (50 µg/L) de <i>C. gracilis</i> cultivée en milieu f/2.....	133

## Résumé - Bilan

**L'objectif principal du projet IPeM était de déterminer si la contamination en pesticides détectés dans le milieu marin est de nature à modifier les communautés phytoplanctoniques.**

**A l'issue de ce travail, il apparaît clair que dans les zones estuariennes et côtières polluées ayant servi de référence à l'étude, la communauté phytoplanctonique est actuellement modifiée par la présence des pesticides. Il est raisonnable de penser que cette affirmation peut être généralisée aux sites similaires.**

Pour cela nous avons recherché l'effet, à court et moyen terme sur cultures monospécifiques d'une part, et communautés naturelles d'autre part. Celles-ci provenaient de quatre sites différemment impactés par les pesticides : l'estuaire de Penzé sur la côte Nord-Finistère, l'estuaire d'Elorn se déversant en rade de Brest, l'estuaire de Bélon sur la côte Sud-Finistère, et le site de référence car peu ou pas impacté : l'archipel des Glénan.

Les pesticides choisis : 4 herbicides : **nicosulfuron**, **sulcotrione**, **diméthénamide**, **bentazone**, un fongicide : **époxyconazole** et un insecticide : **chlorpyrifos-éthyl**, étaient sélectionnés pour leur fréquence de détection dans les eaux côtières et estuariennes, et la diversité de leurs modes d'actions. Les analyses dans le milieu naturel ont montré que pour ces molécules les concentrations détectées les plus élevées concernaient le nicosulfuron (0,125 µg/L), le diméthénamide (0,105 µg/L) et le bentazone (0,200 µg/L). Les analyses chimiques de ces molécules ont été également réalisées dans les milieux expérimentaux des bioessais.

Les bioessais ont été faits sur deux espèces phytoplanctoniques, en cultures monospécifiques : la diatomée *Chaetoceros gracilis* (4-6 µm) et le dinoflagellé *Alexandrium minutum* (20-30 µm). Les expériences étaient basées sur le suivi de leur croissance, et les résultats ont montré que,

- les pesticides ont une toxicité beaucoup plus élevée en formulation qu'en substance active seule,
- parmi les paramètres saisonniers, la teneur en sels nutritifs joue un rôle important dans la sensibilité,
- la sensibilité varie selon les espèces phytoplanctoniques.

Les expériences sur cultures monospécifiques ont montré également une modification de quelques paramètres physiologiques des cellules,

- augmentation de la taille,
- élévation de la consommation d'oxygène,
- accroissement de la teneur en pigments chlorophylliens,
- élévation de la teneur en ATP en phase de stress aigu.

De plus, des altérations génétiques ont été mises en évidence avec le test des comètes, chez une autre espèce rencontrée dans les eaux côtières : *Karenia mikimotoi* en présence de l'insecticide chlorpyrifos-éthyl en formulation.

Les mesures de production primaire chez les communautés naturelles des quatre sites sélectionnés, ont montré des réponses différentes à la contamination aiguë par les pesticides.

La réduction de la production primaire à court terme (2 heures) est perceptible dès 0,5 µg/L de pesticide, sauf pour le site le plus contaminé. Une relation a pu être établie entre les concentrations cumulées en pesticides dans le milieu naturel et la tolérance des communautés

phytoplanctoniques aux pesticides, la contamination chronique entraînant une plus grande tolérance des espèces phytoplanctoniques, soit par adaptation ou sélection des espèces.

L'évaluation de l'effet des pesticides sur les communautés était basée sur l'utilisation de microcosmes *in situ*, afin de respecter au mieux les conditions naturelles tout en permettant des tests et répétitions multiples. Les modifications de la communauté de micro-algues et de bactéries des microcosmes ont été recherchées par 3 méthodes :

- analyse des profils pigmentaires,
- comparaison des empreintes moléculaires,
- cytométrie en flux.

Elles ont démontré leur pertinence pour les études de toxicité environnementale et permis de mettre en évidence une évolution des paramètres observés, différente de celle des milieux témoins.

Les principaux points qui ressortent de cette étude sont :

- La perturbation des **communautés** à **court terme** est détectée dès 0,5 µg/L de pesticides en mélange (mesure de production primaire sur 2 heures).
- La perturbation des **communautés** à **moyen terme** est détectée dès 1 µg/L pour plusieurs des pesticides testés individuellement (microcosmes sur 12-14 jours).
- Les **milieux naturels** soumis à une pollution récurrente présentent une sensibilité modifiée aux pesticides, ce qui démontre une perturbation des communautés phytoplanctoniques (PICT).
- L'insecticide et le fongicide testés ont des effets sur le phytoplancton (cible inattendue).
- Les CE50 sont plus basses (toxicités plus élevées):
  - Avec les formulations qu'avec les molécules actives,
  - Pour les communautés que pour **les cultures monospécifiques**.

Ces résultats contribuent à une meilleure connaissance des effets des pesticides sur les producteurs primaires en milieu marin, et sont utiles pour orienter les futures études.

Les méthodes d'évaluation des risques de toxicité environnementale appliquées actuellement pourraient être améliorées sur les aspects suivants :

- pour l'évaluation de la toxicité des produits :
  - travailler en formulations et/ou en mélanges,
  - réaliser les tests sur cultures monospécifiques, mais également sur plusieurs souches de micro-algues et bactéries, et dans différents milieux,
  - confirmer le cas échéant l'innocuité des produits par des tests de production primaire et/ou en microcosmes.
- pour la surveillance du milieu :
  - les tests PICT semblent adaptés, la définition des conditions et modalités nécessite des travaux complémentaires notamment sur l'utilisation des mélanges de formulations.

## **Introduction**

Les réseaux de surveillance de la qualité de l'eau, en Bretagne, montrent une contamination chronique par les pesticides dans de nombreuses rivières. L'arrivée des eaux douces en estuaires et leur dilution dans les eaux côtières contribuent à la dispersion des molécules de pesticides, et à leur rencontre avec des organismes non ciblés initialement, parmi lesquels les microalgues et cyanobactéries. Considérant l'abondance des eaux de ruissellement en Bretagne, la richesse des eaux côtières et l'importance des organismes phytoplanctoniques comme premier maillon de la chaîne alimentaire, il apparaît nécessaire de déterminer l'impact des pesticides sur le développement de ces derniers et en particulier pour les espèces toxiques qui posent de nombreux problèmes au niveau de la contamination des coquillages marins.

Le choix des pesticides à tester a été réalisé dès l'obtention du projet par rapport à la problématique nationale et régionale, qui évoluait régulièrement depuis 1998 (Arrêté n°98-1198 du 15 juillet 1998), (Avis du Ministère de l'Agriculture du 27 novembre 2001), (Journal Officiel du 15 février 1998).

Cependant le Finistère dispose de nombreuses analyses de pesticides dans les eaux superficielles, souterraines et marines : analyses DDASS, Agence de l'Eau Loire-Bretagne, CORPEP, contrat de baie de la rade de Brest, contrat de baie de Morlaix, qui ont aussi orienté le choix, ainsi que les préconisations des prescripteurs.

Ces données ont permis de déterminer les concentrations à tester sur les cultures de phytoplancton, de façon à bien représenter un risque potentiel.

Les pesticides ont été choisis,

- soit en raison leur utilisation croissante au vu de l'interdiction de l'atrazine et aux orientations des préconisations pour une substitution (Sur les parcelles à risques d'autres molécules remplaçaient déjà l'atrazine, comme le nicosulfuron, la sulcotrione, le diméthénamide),
- soit parce qu'ils ont été retrouvés dans les eaux,
- soit à cause de leur toxicité et leur possible bioaccumulation.

Ils ont été sélectionnés dans des familles différentes et présentant un risque potentiel pour le phytoplancton :

Le nicosulfuron, la sulcotrione, le diméthénamide, la bentazone (herbicides), l'époxiconazole (fongicide) et le chlorpyrifos-éthyl (insecticide).

L'objectif a été de connaître les concentrations en biocides (pures ou en formulation) tolérées par les organismes marins, de les comparer aux valeurs trouvées dans les analyses in situ, et d'en connaître les effets sur les assemblages phytoplanctoniques :

- sur souches pures,
- sur des prélèvements naturels,
- sur des communautés phytoplanctoniques naturelles,
- dans des mésocosmes in situ de communautés naturelles.

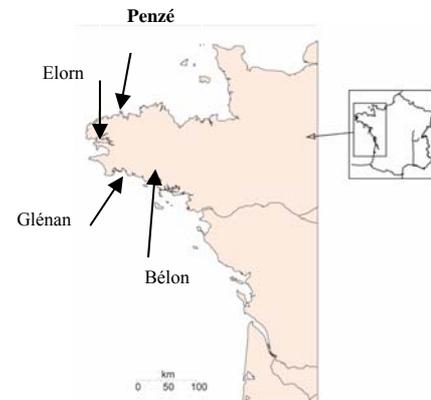
Les sites retenus pour les prélèvements d'eau avec phytoplancton étaient les suivants :

-les îles de Glénan considérées comme non impactées par les pesticides agricoles

-l'estuaire de Penzé qui reçoit les eaux drainant une zone à forte activité agricole

-l'estuaire de l'Elorn en de rade de Brest, dont le bassin versant présente des zones urbaines et agricoles

-l'estuaire du Bélon, avec des activités de tourisme, conchyliculture, agriculture, nautisme.



**Figure 1 : Sites des prélèvements.**

## **1 Les pesticides dans les différents milieux naturels**

Afin de mieux connaître les concentrations de pesticides présentes dans le milieu marin des produits phytosanitaires ont été recherchés dans les prélèvements des expérimentations pendant le programme IPEM sur les différents sites choisis pour le projet, et une synthèse des données disponibles sur les sites d'étude a été réalisée s'ils bénéficiaient d'un suivi dans le cadre d'un programme d'environnement.

Les molécules retenues pour le projet IPEM sont : quatre herbicides (1), un insecticide (2) et un fongicide (3) :

- Bentazone (1)
- Chlorpyriphos (2)
- Diméthénamide (1)
- Epoxiconazole (3)
- Nicosulfuron (1)
- Sulcotrione (1)

Leurs usages sont principalement agricoles :

- Désherbants maïs : nicosulfuron, sulcotrione, diméthénamide (+ gazons de graminées) et bentazone (+ céréales, légumineuses) (ces molécules sont utilisées en remplacement de l'atrazine, interdite depuis octobre 2003 avis JO 27/11/01).
- Fongicide céréales et maïs : époxiconazole
- Insecticide traitement des sols toutes cultures, et traitement aériens vigne, vergers : chlorpyriphos éthyl.

Pour les expérimentations, des formulations de ces molécules ont été obtenues auprès des professionnels utilisateurs :

- la bentazone : Basamais,
- le nicosulfuron : Milagro,
- la sulcotrione : Mikado,
- le diméthénamide : Frontière
- l'époxiconazole : Opus
- le chlorpyriphos-éthyl : Dursban.

Des matières actives supplémentaires ont été analysées lorsque les volumes d'eau prélevés l'ont permis : quarante neuf molécules :

- Acétochlore (1)
- Amidosulfuron (1)
- AMPA (4)
- Atrazine (1)
- Bensulfuron-Methyl (1)
- Carbendazime (3)
- Carbofuran (2)
- Chlorfenvinphos (2)
- Chlorprophame (1)
- Dichlofluanide (3)
- Dichlorvos (2)
- Diuron (1)
- Glyphosate (1)
- Iprodione (1)
- Irgarol (1)
- Isophenphos (2)
- Isoproturon (1)
- Lambda-cyhalothrine (2)
- Parathion-méthyl (2)
- Pencycuron (3)
- Perméthrine (2)
- Propachlore (1)
- Pyrimicarbe (2)
- Quizalofop-éthyl (1)
- Rimsulfuron (1)
- Simazine (1)
- TCMTB Busan (3)

- Chlorothalonil (3)
- Cymoxanil (3)
- Cyperméthrine (2)
- DCA (4)
- DCPMU (4)
- DCPU (4)
- DEA (4)
- Deltaméthrine (2)
- Linuron (1)
- Métazachlore (1)
- Métobromuron (1)
- Métoxuron (1)
- Metsulfuron-Methyl (1)
- Mévinphos (2)
- Monoliuron (1)
- Oxadixyl (3)
- Thifensulfuron (1)
- Thiophanate-méthyl (3)
- Thiram (3)
- Triasulfuron (1)
- Trifluraline (1)
- ZnPT (3)

Les analyses ont portées sur le milieu naturel mais aussi sur :

- les solutions testées qui ont été préparées dans des eaux de mer stérilisées et analysées afin de vérifier la concentration au début des expériences.
- Pour les effets, moyen et long terme, des analyses en fin expérimentation.

Les méthodes d'analyses sont présentées en annexe 1.

### 1.1 Résultats d'analyses sur le site de la RADE de BREST :

Dans le cadre du « Contrat de Baie de la rade de Brest », des analyses sont réalisées **en rade**, d'avril à septembre, tous les ans depuis 1993 ; et sur son **bassin versant** de la même façon, depuis 1996. Il y a quinze points de prélèvements en rade et vingt et un sur le bassin versant. Pour la présentation des résultats nous avons pris en compte toutes les données de 2003 à 2006. Les molécules recherchées sont les mêmes en rade et sur le bassin versant.

*Quarante sept molécules sont recherchées, quatre font partie des six étudiées et quinze des quarante neuf supplémentaires.*

La synthèse des résultats pour les molécules retenues pour l'étude est présentée ci-dessous et pour les autres matières actives les résultats sont présentés en annexe 2

#### 1.1.1 Résultats d'analyses en RADE de BREST :

Le tableau ci après présente le nombre d'analyses, le pourcentage de détection et l'ordre de grandeur des concentrations décelées en rade, pour les quatre molécules étudiées. La sulcotrione n'est détectée sur aucun point à aucune date, elle n'est donc pas présentée dans le tableau.

Résultats d'analyses (µg/L) en Rade de Brest (molécules étudiées)

	BENTAZONE				DIMETHENAMIDE			
	2003	2004	2005	2006	2003	2004	2005	2006
Nb analyses	-	20	65	66	-	66	65	66
% de détection	-	30	9	0	-	10	11	14
Ordre de grandeur	-	0,013 à 0,083	0,011 à 0,047	-	-	0,003 à 0,006	0,003 à 0,098	0,003 à <b>0,170</b>
	NICOSULFURON							
	2003	2004	2005	2006				
Nb analyses		66	65	66				
% de détection	-	1,5	11	1,5				
Ordre de grandeur	-	0,014	0,008 à 0,030	0,006				

Les concentrations sont assez faibles, on notera tout de même des valeurs un peu plus fortes pour le diméthénamide.

### 1.1.2 Résultats d'analyses sur le BASSIN VERSANT de la rade de Brest :

Le tableau suivant présente les résultats d'analyses pour les quatre molécules étudiées.

**Résultats d'analyses (µg/L) sur le bassin versant de la Rade de Brest (molécules étudiées)**

	<b>BENTAZONE</b>				<b>DIMETHENAMIDE</b>			
	2003	2004	2005	2006	2003	2004	2005	2006
Nb analyses	-	20	120	120	-	120	120	120
% de détection	-	5	6	0	-	31	22,5	20
Ordre de grandeur	-	0,200	0,016 à 0,063	-	-	0,003 à 0,037	0,003 à <b>0,103</b>	0,003 à 0,064
	<b>NICOSULFURON</b>							
	2003	2004	2005	2006				
Nb analyses	-	120	120	120				
% de détection	-	5	19	10				
Ordre de grandeur	-	0,010 à <b>0,124</b>	0,006 à 0,022	0,007 à 0,073				

Les valeurs décelées sont plus élevées qu'en rade, notamment celles du nicosulfuron. Par ailleurs, le pourcentage de détection est plus fort pour le diméthénamide.

### 1.2 Résultats d'analyses sur le site de PENZE :

Deux prélèvements ont été réalisés dans le cadre de l'étude, en juin 2003 et en juin 2006.

En 2003 les six molécules étudiées ont été recherchées, les concentrations retrouvées ne dépassaient pas le seuil de détection.

En 2006, 68 molécules ont été recherchées, et le nicosulfuron atteignait 0.116 µg/L.

La concentration la plus élevée : 0,976 µg/L était due au dicamba 5. hydroxy.

La synthèse des résultats pour les autres matières est présentée en annexe 2

### 1.3 Résultats d'analyses sur le site de RIEC sur BELON :

Deux prélèvements ont été réalisés spécialement pour l'étude, le 15/06/04. Seules les six molécules du programme ont été recherchées et uniquement du diméthénamide a été décelé : **0,004 µg/L**.

Sur ce site d'autres données sont disponibles, à différentes dates de 2003 à 2005. En effet les cinquante cinq molécules (six molécules étudiées et quarante neuf supplémentaires) préalablement citées ont été recherchées dans les eaux du port du Bélon, dans le cadre du programme « CONCHPOL : Protection des installations conchylicoles contre les pollutions accidentelles », labellisé RITMER et RITEAU.

Le tableau suivant récapitule le nombre d'analyses, la fréquence de détection et la valeur maximale ( $\mu\text{g/L}$ ) retrouvées pour les six molécules étudiées.

**Résultats d'analyses ( $\mu\text{g/L}$ ) sur le site de Bélon (molécules étudiées)**

	<b>Bentazone</b>			<b>Diméthénamide</b>		
	<i>2003</i>	<i>2004</i>	<i>2005</i>	<i>2003</i>	<i>2004</i>	<i>2005</i>
Nb d'analyse	5	-	8	-	18	8
Nb de détection	0		1		4	2
Valeur maximale			<0,001		0,002	0,003
	<b>Chlorpyriphos</b>			<b>Epoxiconazole</b>		
	<i>2003</i>	<i>2004</i>	<i>2005</i>	<i>2003</i>	<i>2004</i>	<i>2005</i>
Nb d'analyse	-	-	8	-	-	8
Nb de détection			0			5
Valeur maximale						0,002
	<b>Nicosulfuron</b>			<b>Sulcotrione</b>		
	<i>2003</i>	<i>2004</i>	<i>2005</i>	<i>2003</i>	<i>2004</i>	<i>2005</i>
Nb d'analyse	-	18	8	-	-	8
Nb de détection		3	1			0
Valeur maximale		0,007	0,003			<0,001

Le diméthénamide, l'époxiconazole et le nicosulfuron sont décelés, en faibles concentrations.

- D'autres analyses réalisées en eau douce plus en amont dans la rivière montrent des concentrations nettement plus élevées :
  - o 0,25  $\mu\text{g/L}$  de nicosulfuron (désherbant maïs)
  - o 0,2  $\mu\text{g/L}$  de rimsulfuron (désherbant maïs).

#### **1.4 Résultats d'analyses sur le site des GLENAN**

Huit échantillons ont été prélevés dans le milieu, six en 2004 et deux en 2005. Sur chacun les six molécules du programme ont été recherchées et sur un les quarante neuf matières actives supplémentaires ont été analysées.

Une seule des six molécules du programme a été décelée : **0,016  $\mu\text{g/L}$**  de nicosulfuron, le 08/09/04.

La synthèse des résultats pour les autres matières est présentée en annexe 2

## **2 Réponse des communautés naturelles**

### **2.1 Effets à moyen terme (7-8 jours) sur communautés naturelles**

Les prélèvements ont été réalisés à mi-marée descendante en période de coefficient moyen à faible, en sub-surface. L'eau était filtrée sur une soie de 200 µm pour éliminer les plus gros organismes du zooplancton afin de réduire l'élimination du phytoplancton par broutage, tout en conservant les cellules en chaîne du phytoplancton, puis conservée jusqu'au laboratoire en bidon opaque.

#### **2.1.1 Impact des pesticides sur la croissance des populations phytoplanctoniques naturelles des 4 sites.**

Pour étudier l'impact de différents pesticides sur le phytoplancton marin, des bioessais ont été effectués en laboratoire sur des communautés phytoplanctoniques naturelles prélevées :

- en juin 2003 dans l'estuaire de la Penzé au Pont de la Corde (Baie de Morlaix) et dans l'estuaire de l'Elorn au passage du Relecq-Kerhuon (Rade de Brest).
- en mai dans les eaux de l'archipel des Glénan et en juin 2004 dans l'estuaire de la rivière de Bélon (Finistère)

Plusieurs pesticides ont été testés :

- trois herbicides : le nicosulfuron (190 ng/L), le diméthénamide (123 ng/L), le bentazone (106 ng/L)
- un mélange de nicosulfuron et de bentazone (190 et 106 ng/L, respectivement)
- un fongicide, l'époxiconazole (164 ng/L)
- un insecticide, le chlorpyrifos-éthyl (36 ng/L).

L'action de ces pesticides sur la croissance a été étudiée sur les principales espèces de diatomées et de dinoflagellés présentes dans le milieu.

Les essais ont été réalisés en grands volumes permettant un suivi qualitatif et représentatif du milieu naturel, mais sans replication pour des raisons logistiques et financières (limites en espaces d'incubation et coût élevé pour le comptage et les déterminations spécifiques des espèces).

##### **2.1.1.1 Protocole expérimental**

###### **2.1.1.1.1 Prélèvements et mise en culture**

Le protocole est identique à celui utilisé dans les précédents bioessais (Durand *et al.*, 2000). 80 litres d'eau de mer, à chaque point, ont été prélevés et filtrés sur une soie de 200 µm, transvasés et conservés dans des bidons opaques jusqu'au retour au laboratoire, puis répartis, à raison de 10 L, dans des bonbonnes en polycarbonate transparent de 12,5 L.

Chaque série de 8 sous-échantillons a été mise en culture dans les mêmes conditions nutritives, le jour même du prélèvement (J0). Pour assurer la croissance phytoplanctonique, aux concentrations naturelles des différents éléments nutritifs sont ajoutés :

- des macroéléments (N, P),

- des oligoéléments (traces métalliques et vitamines)  
 - et un agent complexant, l'EDTA (acide éthylène diamine tétracétique),  
 permettant l'assimilation par les cellules des sels ferriques (Maestrini *et al.*, 1984) (Tableau 1).  
 Compte-tenu de l'enrichissement en nitrates des eaux de l'estuaire de la Penzé, cet élément n'a pas été ajouté dans les cultures concernant ces eaux.

Les cultures sont effectuées dans les conditions les plus proches des conditions naturelles en chambre thermostatée (température ajustée à celle du milieu au moment du prélèvement). Au jour J0, des apports de pesticides (valeurs théoriques proches de celles mesurées *in situ*) ont été effectués dans chaque série de bioessais de la manière suivante:

- sans apport (témoin pour chaque site)

- avec apport :

soit de nicosulfuron (100 ng/L)

soit de sulcotrione (100 ng/L)

soit de diméthénamide (100 ng/L)

soit de bentazone (100 ng/L)

soit d'époxiconazole (100 ng/L)

soit de chlorpyrifos-éthyl (100 ng/L)

soit de nicosulfuron (100 ng/L) et de bentazone (100 ng /L) pour tester l'effet

synergique de ces deux molécules.

Pour suivre l'évolution des différentes cultures, des mesures quotidiennes de chlorophylle a ont été effectuées. Tous les jours également, des prélèvements ont été réalisés pour l'examen de la composition floristique et le suivi des principales espèces. Les cultures ont été poursuivies jusqu'au déclin des populations phytoplanctoniques.

**Tableau 1 : Concentrations au temps t0 des éléments ajoutés aux différents milieux utilisés dans les cultures.**

<u>Macroéléments</u>	
Na NO <sub>3</sub>	25 μM - N
Na H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 2 H <sub>2</sub> O	1,7 μM - P
<u>Métaux traces</u>	
Cu SO <sub>4</sub> , 5 H <sub>2</sub> O	0,003 μM - Cu
Zn SO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	0,06 μM - Zn
Co Cl <sub>2</sub> , 6 H <sub>2</sub> O	0,0015 μM - Co
Mn Cl <sub>2</sub> , 4 H <sub>2</sub> O	0,03 μM - Mn
Na <sub>2</sub> Mo O <sub>4</sub> , 2 H <sub>2</sub> O	0,03 μM - Mo
Fe Cl <sub>3</sub> , 6 H <sub>2</sub> O	0,06 μM - Fe
<u>Chélateur</u>	
Na <sub>2</sub> EDTA	0,36 μM - EDTA
<u>Vitamines</u>	
Biotine	1,2. 10 <sup>-4</sup> μM - biotine
Cyanacobolamine (Vit B <sub>12</sub> )	4 10 <sup>-5</sup> μM - cyanacobolamine
Thiamine (Vit B <sub>1</sub> )	0,044 μM - thiamine

### **2.1.1.1.2 Protocoles d'analyses**

#### **2.1.1.1.2.1 Dosage des sels nutritifs**

Les nitrates, nitrites, phosphates et silicates et ammonium ont été dosés (IFREMER) en analyse automatique sur un Autoanalyzer II Technicon selon la procédure de Tréguer et Le Corre (1975).

#### **2.1.1.1.2.2 Dosage des pigments chlorophylliens**

Les pigments ont été dosés selon la méthode de Lorenzen (1967). Ils sont extraits dans 10 mL d'acétone à 90% et l'absorbance à 665 nm et 750 nm est mesurée avant et après acidification (HCl 0,1N) sur un spectrophotomètre. Les concentrations en chlorophylle a et phéophytine a sont calculées selon les équations de Lorenzen (1967).

#### **2.1.1.1.2.3 Analyse de la composition floristique**

Les cellules phytoplanctoniques contenues dans environ 100 mL d'eau de mer sont fixées par une solution de lugol acétique et conservées à l'abri de la lumière. Les cellules sont concentrées par sédimentation dans des cuves de 10 à 35 mL et dénombrées par microscopie inversée (Utermöhl, 1931).

### **2.1.1.2 Résultats de la première année de l'estuaire de la Penzé et celui de l'Elorn**

#### **2.1.1.2.1 Estuaire de la Penzé (Pont de la Corde)**

Les prélèvements d'eau de mer ont été effectués le 12 juin 2003 au Pont de la Corde sur l'estuaire de la Penzé à BM+3 (Coefficient de marée = 80). La température de l'eau de mer était de 15°C et la salinité de 32. Le milieu naturel est enrichi en sels nutritifs par les apports de la rivière (91  $\mu\text{moles}$  de N-  $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ , 0,2  $\mu\text{moles}$  de N- $\text{NH}_4^+$  et de 0,19  $\mu\text{moles}$  de P- $\text{PO}_4^{3-}$ ).

Le phytoplancton est mis à incuber à une température de  $15 \pm 1^\circ\text{C}$  sous un éclairage de 110  $\mu\text{moles}$  de photons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  et une photopériode J/N de 16/8.

#### **2.1.1.2.1.1 Apport de pesticides**

Les ajouts de pesticides ont été calculés d'après les concentrations contenues et dosées dans les solutions-mères soit :

- 190 ng/L de nicosulfuron
- 123 ng/L de diméthénamide
- 106 ng/L de bentazone

- 164 ng/L d'époxiconazole
- 36 ng /L de chlorpyrifos-éthyl

Aucune trace de sulcotrione n'a été retrouvée dans les différentes dilutions de la solution-mère. Les résultats obtenus dans ce flacon n'ont pas été pris en compte.

### 2.1.1.2.1.2 Action des pesticides sur l'évolution des cultures

#### Evolution de la biomasse chlorophyllienne

La biomasse chlorophyllienne au moment de la mise en culture est relativement faible variant de 0,5 µg/L dans le milieu témoin et celui enrichi en diméthénamide à environ 4 µg/L dans les autres milieux (Figure 2). L'évolution de la concentration en chlorophylle des différents milieux se fait en trois phases correspondant au développement successif des principales espèces phytoplanctoniques présentes dans les milieux (voir ci-dessous). Au cours des deux premiers jours, la biomasse chlorophyllienne est supérieure dans tous les milieux dopés y compris ceux à faible concentration initiale de chlorophylle (diméthénamide, bentazone et époxiconazole).

Au 4ème jour, seuls les milieux contenant le mélange nicosulfuron + bentazone et l'époxiconazole présentent une biomasse supérieure à celle du témoin. Au 6ème jour, le maximum de chlorophylle est atteint dans tous les milieux avec une concentration de 25 µg/L dans le milieu témoin, valeur atteinte dans les milieux enrichis en diméthénamide, bentazone, époxiconazole et chlorpyrifos-éthyl.

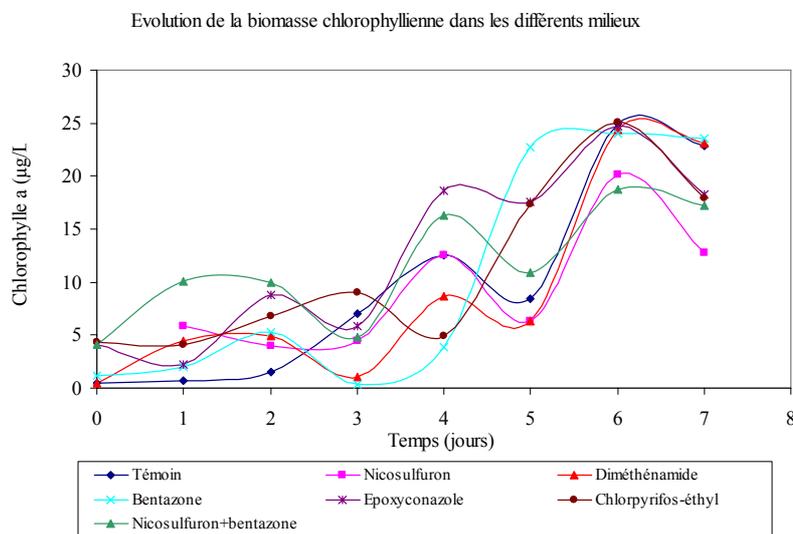


Figure 2 : Evolution de la biomasse chlorophyllienne dans les différents milieux

La biomasse chlorophyllienne de chaque milieu dopé a été exprimée en pourcentage du témoin aux différents moments précités de la culture (2ème, 4ème et 6ème jour). Les histogrammes obtenus (Figure 3) mettent en évidence une forte augmentation de la concentration en chlorophylle dans tous les milieux enrichis en pesticides au bout de deux

jours de contact. De l'ordre de 300% dans les milieux enrichis en herbicides, cette augmentation atteint 600% en présence du fongicide et de l'insecticide.

Au cours de l'évolution des cultures, les variations de biomasse chlorophyllienne s'atténuent. On remarque, cependant, une nette diminution de la chlorophylle dans les milieux enrichis en diméthénamide (69% du témoin) et plus particulièrement en présence de bentazone (31%) et de chlorpyrifos-éthyl (40%). La seule augmentation alors observée concerne le milieu enrichi en époxiconazole (150% du témoin). En fin de culture, seuls les milieux contenant du nicosulfuron ou le mélange nicosulfuron et bentazone présentent une légère baisse de la biomasse chlorophyllienne (20 à 25%).

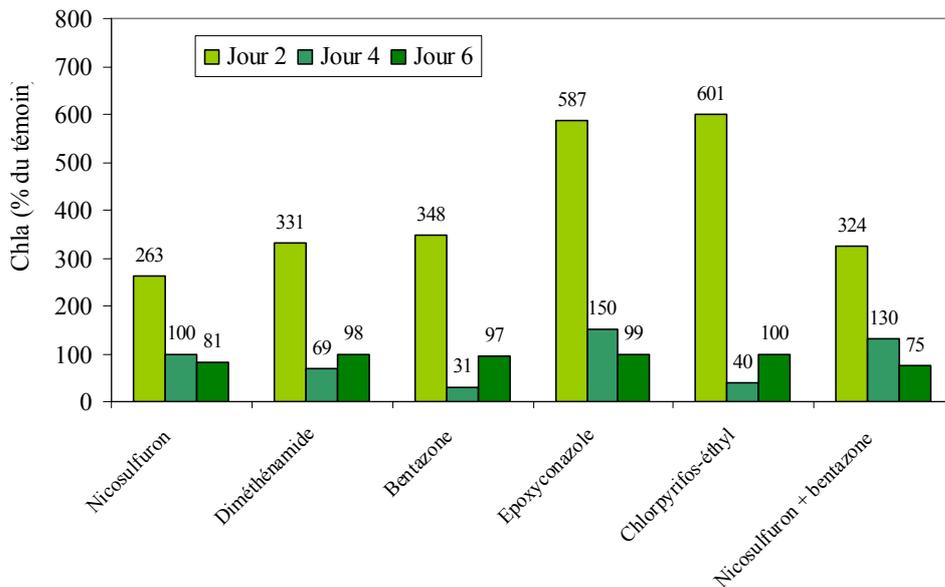


Figure 3 : Pourcentage de chlorophylle dans les différents pics

### Composition spécifique du phytoplancton

L'analyse des espèces (Tableau 2) montre qu'à l'époque du prélèvement, la population phytoplanctonique était composée à 56 % de dinoflagellés dont l'espèce dominante était *Alexandrium minutum* (40% des dinoflagellés) accompagné entre autres d'*Heterocapsa triquetra* (16 %) et de *Scrippsiella trochoïdea* (8 %). Au stade initial de la croissance, les diatomées sont représentées essentiellement par une espèce de grande taille, *Guinardia flaccida* (24 % des diatomées) et deux espèces de petite taille aux cellules en chaîne, *Skeletonema costatum* (20 %) et *Thalassiosira fallax* (15 %). D'autres diatomées comme *Lauderia borealis*, *Rhizosolenia delicatula* et *Leptocylindrus danicus* peu représentées au moment du prélèvement se développeront au cours de l'incubation et seront prises en considération dans l'étude. La croissance de ces six diatomées a été suivie dans chaque milieu parallèlement à la croissance d'*Alexandrium minutum* et *Heterocapsa triquetra*. Le développement de *Scrippsiella trochoïdea* a été trop faible pour être fiable.

**Tableau 2 : Espèces phytoplanctoniques dénombrées dans l'eau de l'estuaire de la Penzé avant la mise en culture.**

<u>Diatomées</u>	Nombre de cellules/L	<u>Dinoflagellés</u>	Nombre de cellules/L
<i>Guinardia flaccida</i>	11065	<i>Alexandrium minutum</i>	28500
<i>Skeletonema costatum</i>	9500	<i>Heterocapsa triquetra</i>	9270
<i>Thalassiosira fallax</i>	6814	<i>Scrippsiella trochoidea</i>	4800
<i>Chaetoceros</i> sp.	5300	Autres péridiniens (3 espèces)	9300
<i>Leptocylindrus danicus</i>	2225	Gymnodinés	7950
<i>Rhizosolenia delicatula</i>	1960		
<i>Lauderia borealis</i>	970		
Autres diatomées (3 espèces)	9270		

### Croissance du phytoplancton

Deux paramètres de la croissance ont été pris en considération :

- le taux de croissance spécifique de l'espèce  $\mu \text{ j}^{-1}$  défini par la pente de la courbe en phase exponentielle et calculé comme suit :

$$\bullet \quad \mu \text{ j}^{-1} = \ln (d_2 - d_1) / (t_2 - t_1)$$

où  $d_2$  et  $d_1$  sont les nombres de cellules comptées respectivement aux temps  $t_2$  et  $t_1$ .

- La densité cellulaire maximale  $d_{\text{max}}$  obtenue dans le milieu sachant que l'apport de sels nutritifs est identique dans chaque culture.

### Taux de croissance

Les courbes de croissance (Figure 4 et Figure 5) des différentes espèces, étudiées obtenues dans le milieu témoin permettent de calculer le taux de croissance de chacune de ces espèces (Tableau 3). On notera que la phase de croissance exponentielle des diatomées comme celle des dinoflagellés n'est pas synchrone. Chez les diatomées, on assiste successivement au développement de *Guinardia flaccida* dans les deux premiers jours de la culture, de *Leptocylindrus danicus* et de *Rhizosolenia delicatula* qui atteignent un maximum de densité cellulaire au 4ème jour et enfin, des petites diatomées *Skeletonema costatum*, de *Chaetoceros* sp. et de *Thalassiosira fallax* en fin de culture. La croissance d'*Alexandrium minutum* est limitée au premier jour de culture, le nombre de cellules diminuant ensuite régulièrement (Figure 6). Ceci est lié vraisemblablement à l'âge de la population (voir ci-dessous). Inversement, la croissance d'*Heterocapsa triquetra* présente une phase de latence de 2 jours avant le début de la phase exponentielle. Le maximum de cellules sera atteint au 8ème jour de culture.

Cette succession dans le développement des diatomées explique les trois pics observés dans les concentrations de chlorophylle, le premier pic correspondant au maximum de cellules de *Guinardia flaccida*, le deuxième à celui de *Leptocylindrus danicus* et *Rhizosolenia delicatula* et le troisième à celui des petites diatomées (*S. costatum*, *Chaetoceros* et *T. fallax*).

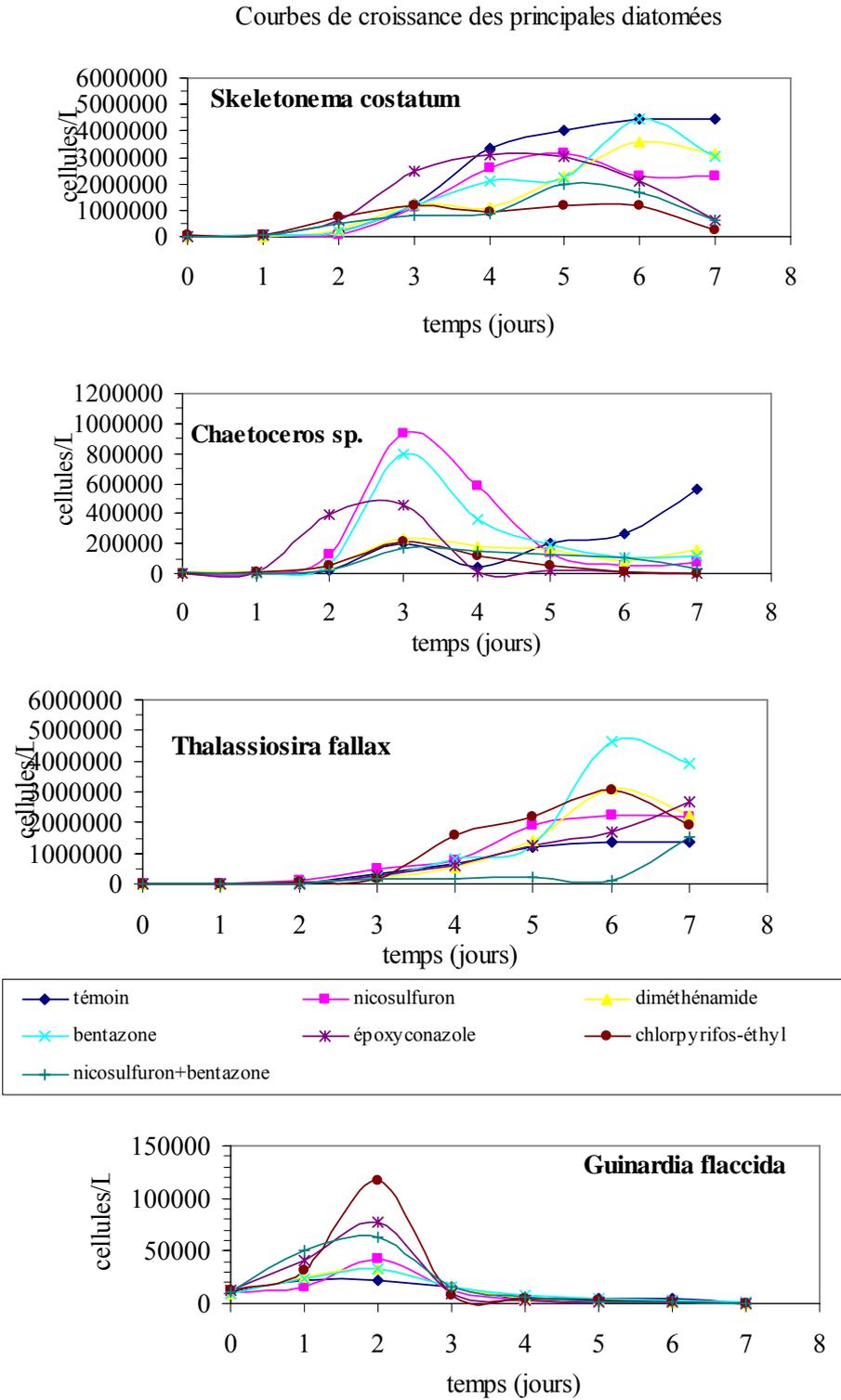


Figure 4 : Courbes de croissance des principales diatomées

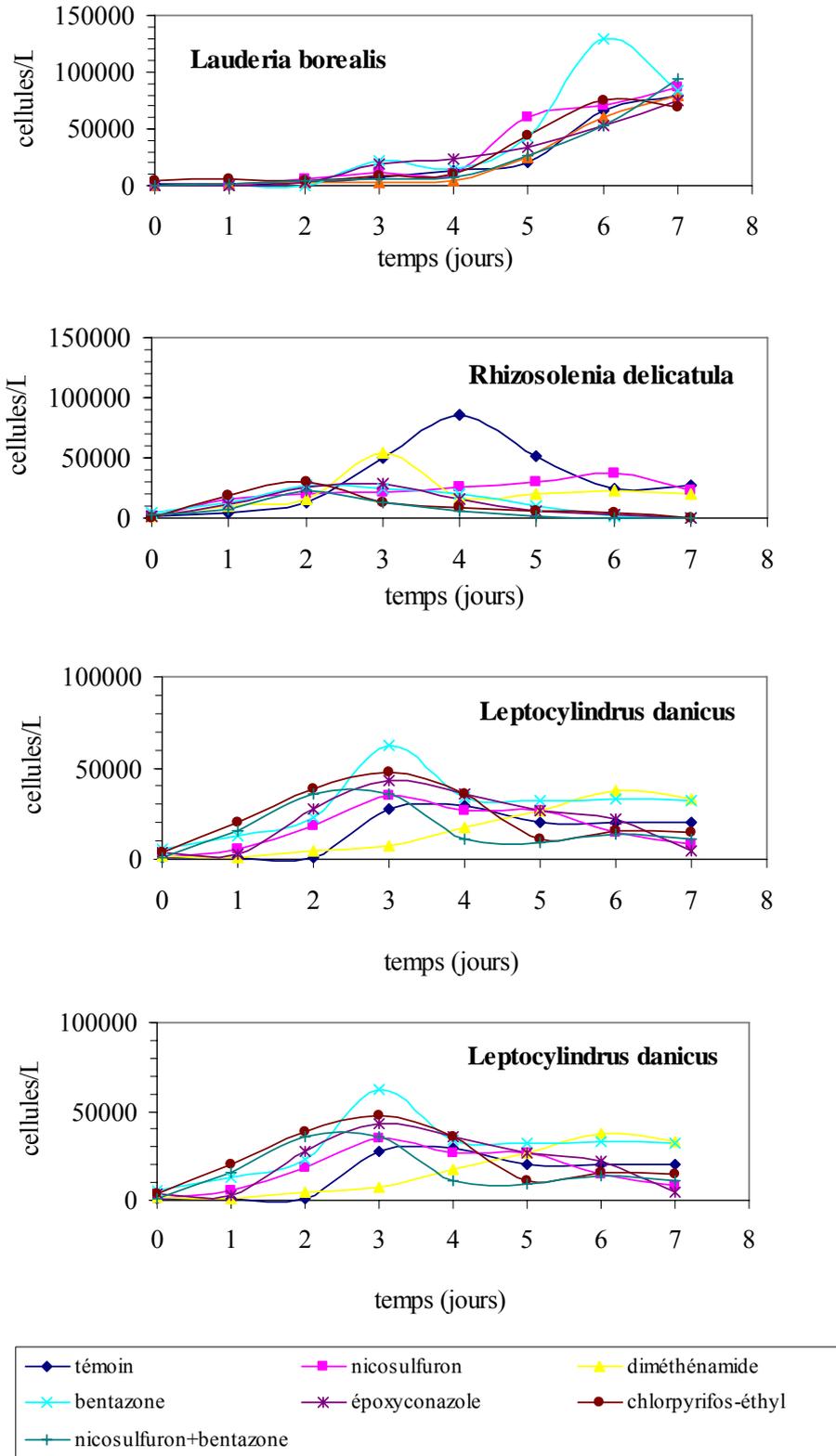


Figure 5 : courbes de croissance des principales diatomées

## Courbes de croissance des dinoflagellés

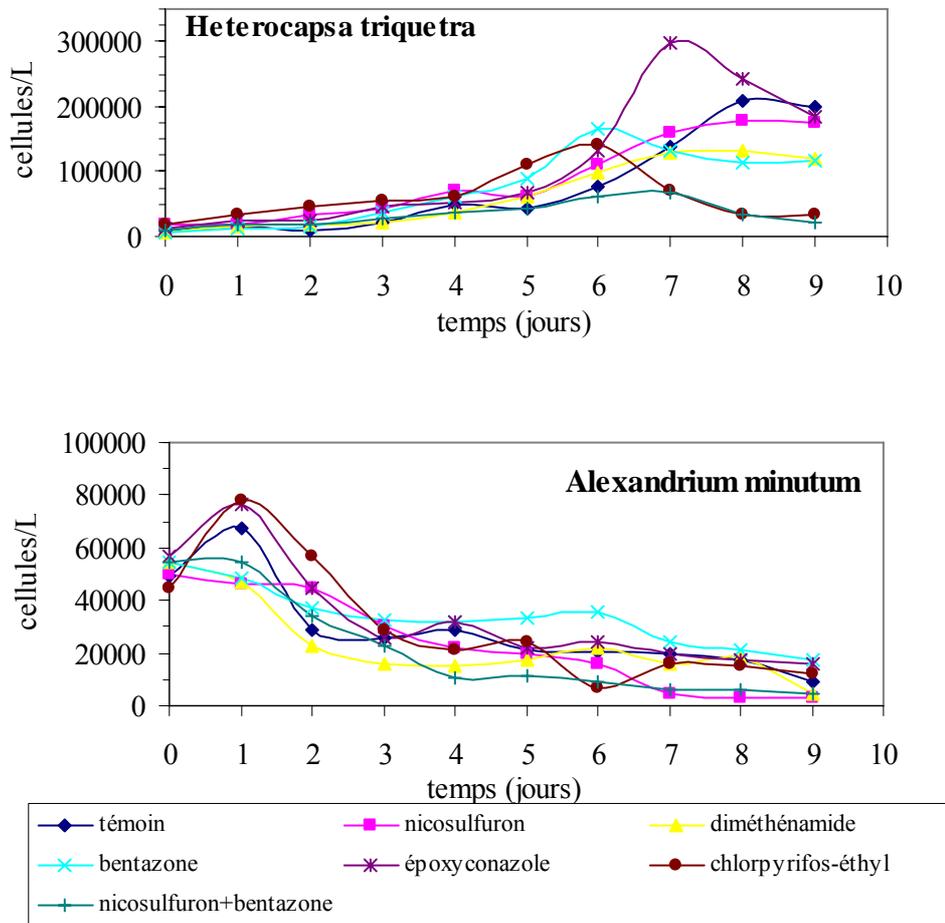


Figure 6 : Courbes de croissance des dinoflagellés

Le taux de croissance, dans le milieu témoin, des différentes diatomées varie de  $0,7 \text{ j}^{-1}$  pour les espèces de grande taille que sont *Guinardia flaccida* et *Lauderia borealis* à  $3 \text{ j}^{-1}$  pour *Leptocylindrus danicus* et *Rhizosolenia delicatula* qui sont à cette époque de l'année en plein développement dans la Baie de Morlaix. *Alexandrium minutum* présente un taux de croissance relativement faible en comparaison de ce qui avait été mesuré en 1999 en début de bloom (Durand *et al.*, 2000). Or, les prélèvements ont été effectués pour cette étude à la fin d'une phase de prolifération (Tableau 3).

L'action des différents pesticides a été déterminée à partir des courbes de croissance des espèces sélectionnées. Le taux de croissance de chaque espèce soumise à un pesticide a été exprimé en pourcentage par rapport à son témoin. Compte-tenu des résultats obtenus en 1999 (Durand *et al.*, 2000) laissant apparaître une possible relation entre la toxicité d'un polluant et le taux de croissance du phytoplancton, les diatomées ont été classées en 3 groupes : les espèces à faible taux de croissance ( $\mu \text{ j}^{-1} \leq 0,7$ ), *G. flaccida* et *L. borealis*, les espèces à taux de croissance voisin de 2, *S. costatum* et *Chaetoceros sp.* et les espèces à taux de croissance élevé, *R. delicatula*, *T. fallax* et *L. danicus*.

**Tableau 3 : Taux de croissance  $\mu j^{-1}$  des espèces phytoplanctoniques dans le milieu témoin**

<u>Diatomées</u>	$\mu j^{-1}$	<u>Dinoflagellés</u>	$\mu j^{-1}$
<i>Guinardia flaccida</i>	0,67	<i>Alexandrium minutum</i>	0,36
<i>Lauderia borealis</i>	0,75	<i>Heterocapsa triquetra</i>	0,52
<i>Skeletonema costatum</i>	2,01		
<i>Thalassiosira fallax</i>	3,0		
<i>Chaetoceros</i> sp.	2,2		
<i>Leptocylindrus danicus</i>	3,06		
<i>Rhizosolenia delicatula</i>	3,05		
<i>Lauderia borealis</i>	0,75		

Le développement des espèces à taux de croissance faible est, dans tous les cas, stimulé que ce soit par le nicosulfuron, le diméthénamide ou la bentazone (Figure 7). Le taux de croissance peut même être doublé en présence de diméthénamide chez *L. borealis*. L'apport simultané de nicosulfuron et de bentazone accroît encore la stimulation observée sous l'action de l'un ou l'autre d'entre eux entraînant un quasi doublement du taux de croissance.

Chez les espèces dont le taux de croissance est voisin de 2, on n'observe aucun effet significatif quelque soit l'herbicide utilisé même en synergie.

En revanche, on observe une sensibilité différente aux herbicides chez les espèces à fort taux de croissance. Aux doses utilisées, *R. delicatula* est peu sensible au nicosulfuron alors que le diméthénamide et la bentazone réduisent le taux de croissance de plus de 60 %. Le taux de croissance de *T. fallax* est réduit de 40 à 50 % en présence de ces 3 molécules.

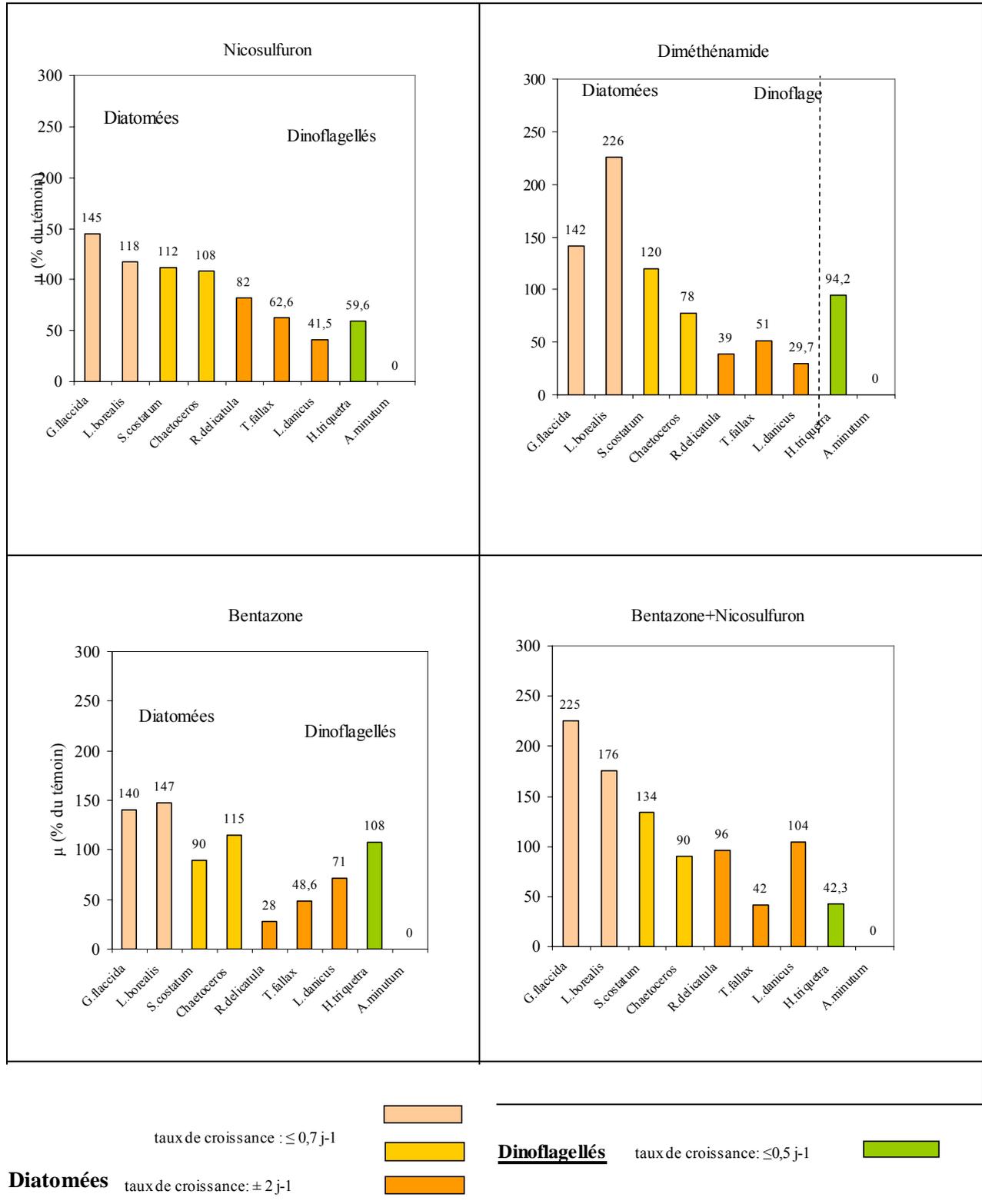


Figure 7 : Pourcentages par rapport au témoin des taux de croissance obtenus dans les différents milieux

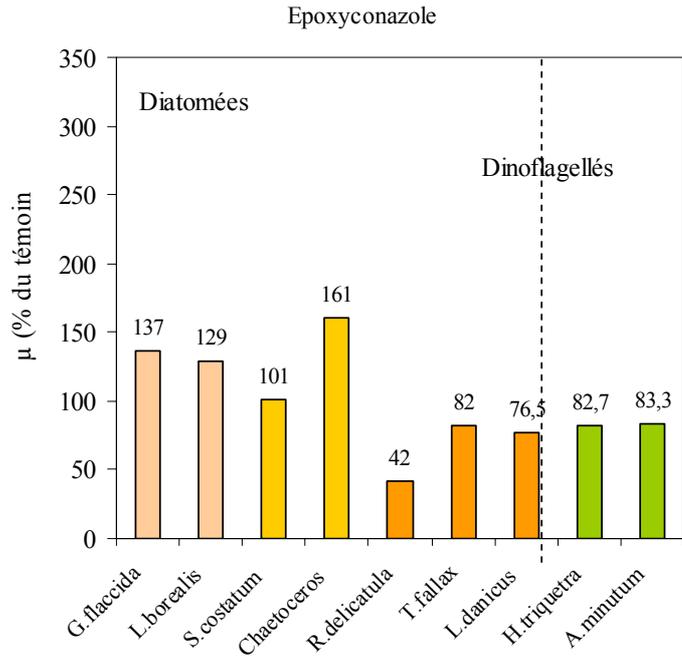


Figure 8 : Pourcentages par rapport au témoin des taux de croissance obtenus en présence d'un fongicide

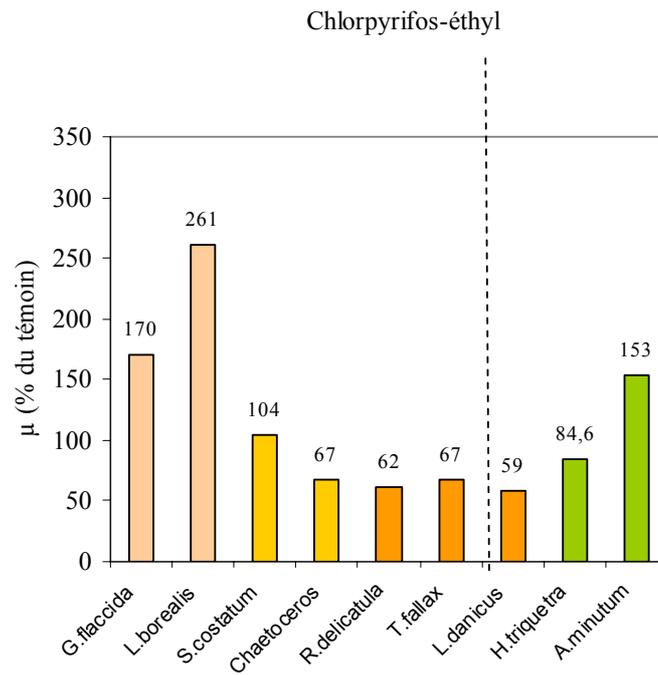


Figure 9 : Pourcentages par rapport au témoin des taux de croissance obtenus en présence d'un insecticide

Seule la bentazone a peu d'effet sur *L. danicus* dont le taux de croissance est réduit de 60 à 70 % par le nicosulfuron et le diméthénamide, respectivement. Lorsque bentazone et nicosulfuron sont ajoutés simultanément dans la culture, leur action combinée annihile l'effet inhibiteur de l'un ou de l'autre sauf pour *T. fallax* qui subit l'effet cumulé des deux inhibitions (Figure 7).

Parmi les dinoflagellés, *Alexandrium minutum* est complètement inhibé par l'apport d'herbicide quel qu'il soit alors qu'*Heterocapsa triquetra* ne subit pas de modification de croissance en présence de diméthénamide ou de bentazone. Seul le nicosulfuron affecte fortement sa croissance, effet qui l'emporte sur celui de la bentazone quand les deux polluants sont associés.

L'action de l'époxiconazole (Figure 8) est comparable à celle de la bentazone avec des effets plus atténués chez les diatomées : stimulation plus ou moins importante chez les espèces à taux de croissance faible ou moyen, inhibition peu marquée chez les espèces à taux élevé sauf pour *R. delicatula* qui en présence du fongicide subit une réduction de 60 % de son taux de croissance. Aucun des deux dinoflagellés n'est sensible à cette molécule. Le chlorpyrifos-éthyl, bien qu'utilisé en très faible concentration (36 ng /L), induit une très forte stimulation de croissance chez les diatomées de grande taille et faible, ainsi que chez *Alexandrium minutum* dont le taux de croissance augmente de 50 % (Figure 9).

### Densité cellulaire maximale

Il est intéressant de constater (Figure 10 et Figure 11) que la variation du taux de croissance n'induit pas forcément une variation dans le même sens de la densité cellulaire maximum obtenue dans les différentes cultures. On observe ainsi trois situations en ce qui concerne l'impact des herbicides sur les diatomées.

Lorsque le taux de croissance de l'espèce est faible, la densité cellulaire maximum obtenue est relativement proportionnelle à l'augmentation du taux de croissance malgré l'exception de *Lauderia borealis* dont le doublement de  $\mu$  après ajout de diméthénamide ou du mélange bentazone et nicosulfuron ne modifie pas la densité cellulaire finale. On notera également que le doublement du taux de croissance de *G. flaccida* entraîne le triplement de la densité cellulaire maximale.

Pour les espèces au taux de croissance voisin de  $2 \text{ j}^{-1}$  (*Skeletonema costatum* et *Chaetoceros sp.*) si l'on observe peu de variation du taux de croissance après ajout des différents herbicides, on constate que seule la bentazone a peu d'action sur la densité cellulaire maximale de ces deux espèces.

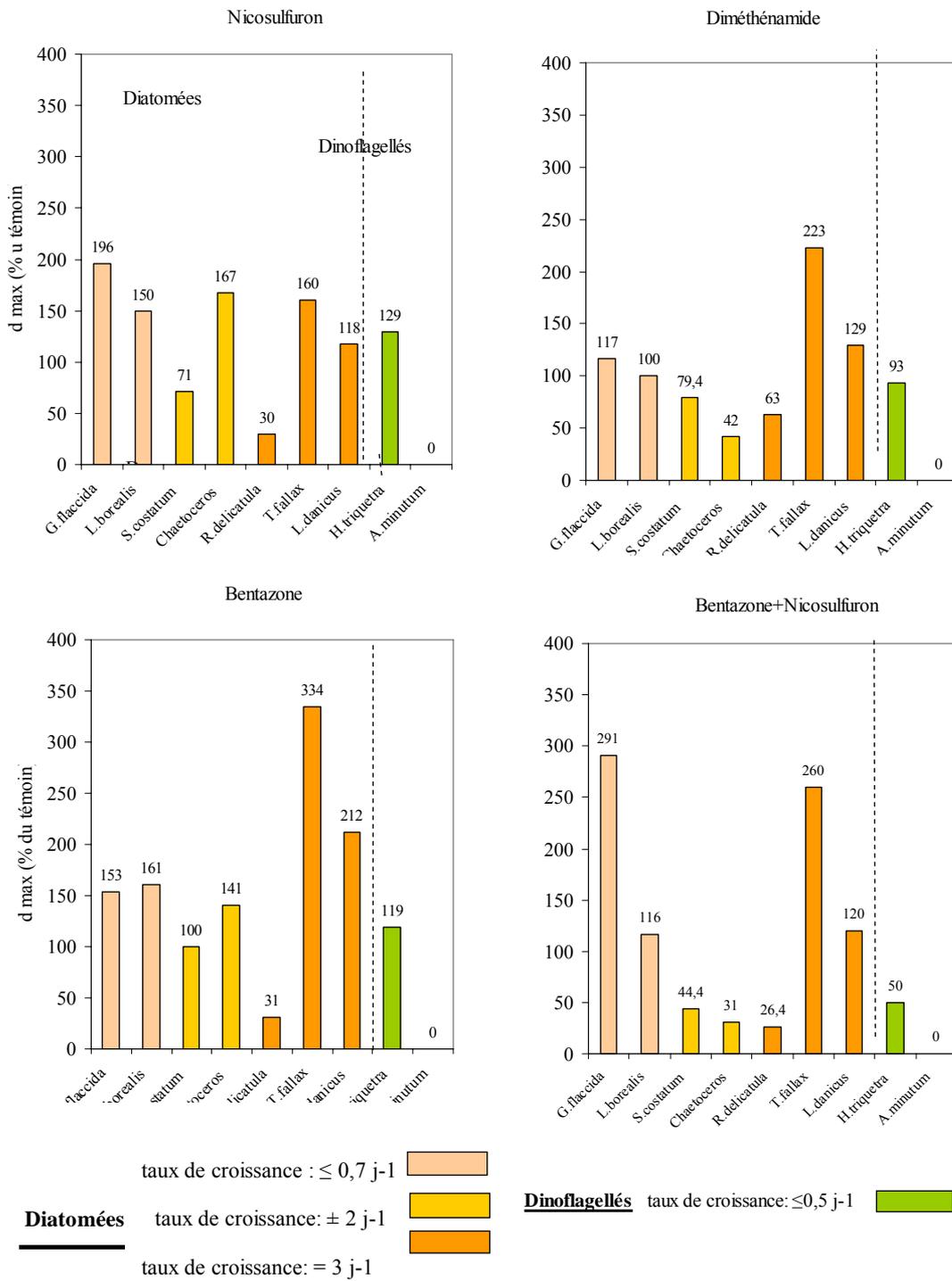


Figure 10 : Pourcentages par rapport au témoin des densités cellulaires finales obtenues après apport d'herbicides

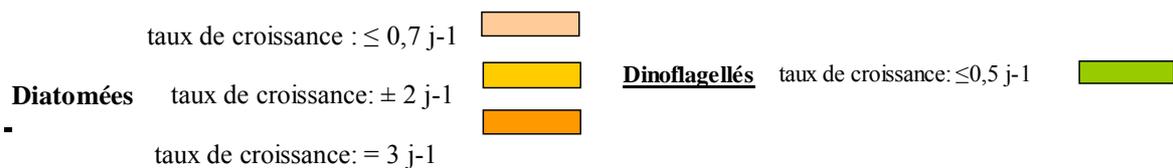
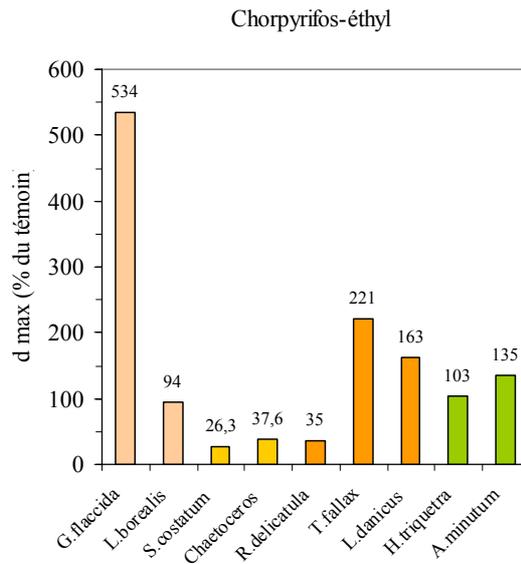
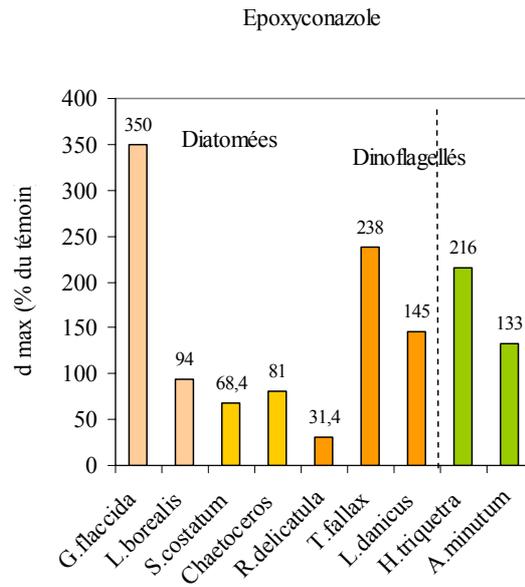


Figure 11 : Pourcentages par rapport au témoin des densités cellulaires finales obtenues en présence d'un fongicide et d'un insecticide

Le diméthénamide ainsi que le mélange bentazone et nicosulfuron induisent une diminution significative de la densité cellulaire maximale des deux espèces (de 20 à 70 % du témoin). Quant au nicosulfuron utilisé seul, il entraîne une forte augmentation du nombre de cellules de *Chaetoceros sp.* (70 %) et une réduction de la densité cellulaire de *S. costatum* (30 %).

Ce découplage entre taux de croissance et densité cellulaire maximale est particulièrement évident chez les espèces à taux de croissance élevé comme *T. fallax* et *L. danicus* en présence d'un des trois herbicides testés. La forte réduction de  $\mu$  (40 à 60 % du témoin) dans tous les milieux pollués entraîne une variation spectaculaire de la densité cellulaire qui augmente de 1,5 à 3 fois dans les milieux dopés pour *T. fallax* et dans une moindre mesure de 1,5 à 2 fois pour *L. danicus*. Ainsi, par exemple, la bentazone réduit de 50 % le taux de croissance de *T. fallax* alors qu'elle induit un triplement de sa densité cellulaire maximale. *Rhizosolenia delicatula* réagit différemment puisque dans tous les cas la densité cellulaire maximale est diminuée de 75 à 40 % que le taux de croissance soit peu affecté (nicosulfuron ; mélange nicosulfuron et bentazone) ou très réduit (60 à 70 %) dans le cas de le diméthénamide ou de la bentazone.

Chez les dinoflagellés, *Alexandrium minutum* n'a pu maintenir sa croissance en présence d'herbicide. Pour *Heterocapsa triquetra*, on observe comme chez les diatomées trois situations dépendant de l'herbicide :

- le taux de croissance et la densité cellulaire maximum sont corrélés : cas du diméthénamide et de la bentazone,
- le taux de croissance est réduit et la densité cellulaire augmentée dans une faible mesure : cas du nicosulfuron,
- le taux de croissance et la densité cellulaire sont également diminués : cas du mélange nicosulfuron et bentazone.

On retrouve ce découplage entre taux de croissance et densité cellulaire maximale aussi bien en présence du fongicide que de l'insecticide avec des amplitudes souvent beaucoup plus élevées (Figure 11). Si l'époxiconazole a des effets peu marqués sur le taux de croissance des diatomées (sauf *R. delicatula*) et des dinoflagellés, on observe ici aussi trois situations :

- la densité cellulaire est légèrement réduite chez *S. costatum* et *Chaetoceros sp.* (20 à 30 %),
- la densité cellulaire est réduite proportionnellement au taux de croissance chez *R. delicatula*,
- la densité cellulaire augmente de 1,3 à 3,5 fois chez les autres espèces, notamment chez *H. triquetra* et *A. minutum*.

Le chlorpyrifos-éthyl a un effet comparable au fongicide avec des réductions ou des augmentations encore plus spectaculaires avec aux extrêmes une densité cellulaire 6 fois plus élevée chez *G. flaccida* alors que le taux de croissance n'était que doublé et des réductions de 75 à 65 % du nombre de cellules pour *S. costatum*, *Chaetoceros sp.* et *R. delicatula*. Il est à noter que la densité cellulaire d'*A. minutum* est, comme dans le cas du fongicide, augmentée de 30 %, alors que la croissance est totalement inhibée en présence des herbicides.

Parmi les diatomées étudiées, il apparaît que les cellules de grande taille et à faible taux de croissance ( $\mu j^{-1} \leq 0,7$ ) que sont *Guinardia flaccida* et *Lauderia borealis* sont totalement bénéficiaires des apports des différents pesticides testés dans cette étude. Non seulement leur

taux de croissance est fortement augmenté (de 40 à 125 % pour *G. flaccida* ; de 20 à 160 % pour *L. borealis*) mais leur densité cellulaire finale est toujours au moins égale à celle du témoin et dans de nombreux cas très supérieure.

A l'opposé, les espèces qui s'avèrent être les plus sensibles à l'ensemble des pesticides sont *Skeletonema costatum* et *Rhizosolenia delicatula*. Si le taux de croissance de *S. costatum* est peu modifié, sa densité cellulaire maximale est toujours inférieure à celle du témoin quel que soit le pesticide testé. Seuls le nicosulfuron et le mélange nicosulfuron et bentazone ne modifient pas le taux de croissance de *R. delicatula*. Tous les autres pesticides ont un effet fortement inhibiteur puisqu'ils réduisent le taux de croissance de 40 à 70 %. En outre, quelle que soit la molécule utilisée, le nombre maximal de cellules est réduit de 40 à 75 %. Parmi ces espèces sensibles, on peut citer également *Chaetoceros sp.* bien que l'impact des polluants varie d'une molécule à l'autre. Ainsi, le taux de croissance est peu modifié pour les herbicides, augmenté fortement (60 %) par le fongicide et diminué par l'insecticide (33 %). En revanche, la densité cellulaire maximale est diminuée de 20 % en présence d'époxiconazole, de 60 à 70 % pour le diméthénamide, le mélange nicosulfuron/bentazone et le chlorpyrifos-éthyl alors que le nicosulfuron et la bentazone utilisés seuls augmente de 40 à 70 % le nombre maximal de cellules.

Enfin, deux espèces de diatomées se comportent encore différemment, *Thalassiosira fallax* et *Leptocylindrus danicus*. En effet, dans ces deux cas, le taux de croissance est toujours diminué de 20 à 60 % pour *T. fallax* et de 25 à 70 % pour *L. danicus* (sauf pour le mélange qui n'a pas d'action). En revanche, la densité cellulaire finale est toujours supérieure à celle du témoin variant de plus 60 à plus 230 % chez *T. fallax* et de 20 à 112 % chez *L. danicus*.

#### 2.1.1.2.2 Estuaire de l'Elorn (Le Relecq-Kerhuon)

Les prélèvements ont été effectués à la cale du Passage du Relecq-Kerhuon le 27 juin à PM+3 (Coefficient de marée de 58). La température de l'eau de mer était de 18,1 °C et la salinité de 33,6. Les concentrations en sels nutritifs du milieu naturel étaient de 4,93 µmoles de N- ( $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ ), 1,91 µmoles de N- $\text{NH}_4^+$  et de 0,43 µmoles de P- $\text{PO}_4^{3-}$ .

Les cultures ont été effectuées à  $18 \pm 1^\circ\text{C}$  sous un éclaircissement de 110 µmoles de photons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  et une photopériode J/N de 16/8.

##### 2.1.1.2.2.1 Apport de pesticides

Les ajouts de pesticides sont identiques à ceux utilisés dans l'eau de l'estuaire de la Penzé.

##### 2.1.1.2.2.2 Action des pesticides sur l'évolution des cultures

#### Evolution de la biomasse chlorophyllienne

La concentration initiale en chlorophylle varie de 1,2 µg/L dans le milieu témoin à 4,3 µg/L dans le milieu dopé en diméthénamide (Figure 12). L'évolution de la biomasse chlorophyllienne présente ici deux pics ; le premier pic apparaît au 3<sup>ème</sup> jour dans la plupart des cultures, au 4<sup>ème</sup> jour dans le milieu enrichi en bentazone et même au 5<sup>ème</sup> jour dans le mélange d'herbicides. Ce pic de chlorophylle atteint 6,35 µg/L chez le témoin et 10,8 µg/L

dans le milieu dopé en époxiconazole. Le deuxième pic apparaît au 9<sup>ème</sup> jour de la culture dans tous les milieux à l'exception du milieu enrichi en nicosulfuron (8<sup>ème</sup> jour). La concentration maximale de chlorophylle est ici de 7,3 µg/L chez le témoin ; la plus faible est obtenue en présence de nicosulfuron et de bentazone (5 µg/L) alors que la plus forte biomasse est produite dans le milieu contenant le mélange nicosulfuron+bentazone (13 µg/L). Comparés au témoin, les maximums de chlorophylle obtenus au cours du premier pic dans les milieux dopés en diméthénamide, chlorpyrifos et avec le mélange nicosulfuron+bentazone sont très voisins de celui du milieu témoin (Figure 13).

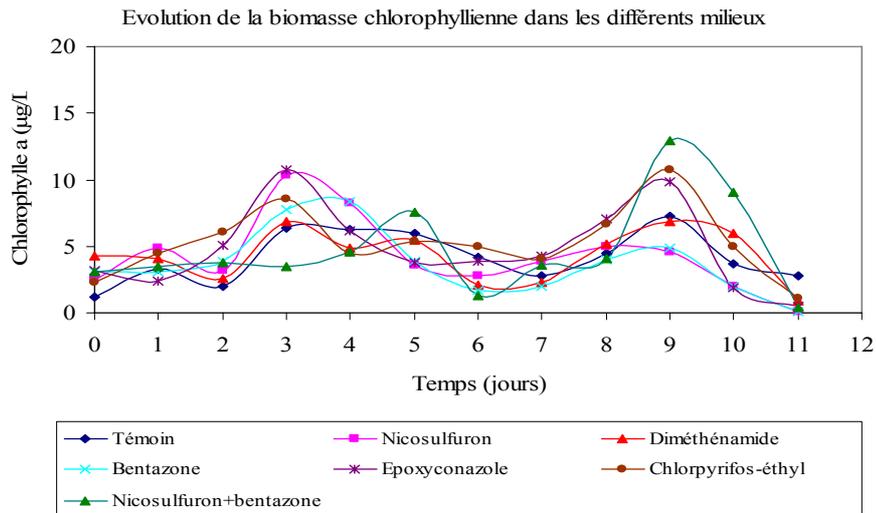


Figure 12 : Evolution de la biomasse chlorophyllienne dans les différents milieux

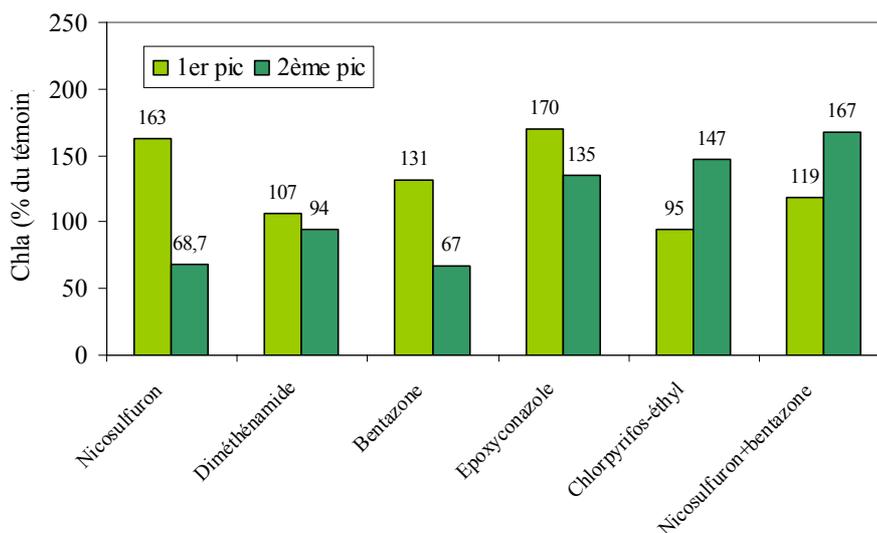


Figure 13 : Pourcentage de chlorophylle en phase exponentielle et en fin de croissance

Dans les autres milieux, on observe une augmentation de la biomasse chlorophyllienne variant de 30 % en présence de bentazone à 70 % en présence de nicosulfuron et d'époxiconazole. Dans la seconde phase de croissance, les dosages de chlorophylle mettent en évidence une inversion de tendance dans certains milieux avec une diminution de biomasse dans les milieux enrichis en nicosulfuron et en bentazone (68 % du témoin) et inversement une augmentation de la concentration chlorophyllienne en présence de chlorpyrifos-éthyl et du mélange nicosulfuron+bentazone (50 à 70 % de plus que chez le témoin). L'époxiconazole provoque encore une augmentation de la concentration en chlorophylle bien qu'inférieure à celle du premier pic (+ 35 %). Seule le diméthénamide n'a pas d'effet que ce soit au cours de première phase ou de la seconde.

### **Composition spécifique du phytoplancton**

Dans le milieu naturel (Tableau 4), le phytoplancton est représenté à 97 % par des diatomées dont les espèces majoritaires sont *Skeletonema costatum* (57 % des diatomées) et *Chaetoceros sp.* (40 %). Les autres espèces représentent chacune moins de 2 % de la population des diatomées. Cependant, les deux espèces, *Nitzschia longissima* et *Thalassionema nitzschoïdes*, peu représentées initialement, se développeront abondamment au cours de la culture. Seules ces 4 espèces citées seront prises en considération au cours de cette étude.

Les dinoflagellés sont peu nombreux (7000 cellules/L) dominés par *Prorocentrum micans* (28 %) et *Scrippsiella trochoïdea* (21 %). Toutefois, le comptage de cette dernière espèce au cours du temps présente, comme en Penzé, des valeurs si erratiques que son développement n'a pu être étudié. En revanche, *Katodinium glaucum* et *Gymnodinium sp.* (Gymnodinés) peu représentés initialement (< 700 cellules/L) se multiplieront en fin de culture et seront suivis. Il est à noter la présence de *Dinophysis acuminata* et surtout de *Phaeocystis pouchetii* (caractéristique des eaux de la Manche orientale) dans l'eau de la Rade de Brest. *D. acuminata* ne s'est développée dans aucun milieu ; en revanche, *P. pouchetii*, qui n'a pas été observée dans le milieu témoin tout au long de la culture, est devenue plus abondante à partir du 7<sup>ième</sup> jour dans les milieux enrichis en nicosulfuron, diméthénamide, bentazone et à moindre degré en présence du mélange nicosulfuron+bentazone. Le comptage exact n'a pu être déterminé car si des colonies ont pu être observées, de très nombreuses cellules isolées étaient également présentes.

**Tableau 4 : Espèces phytoplanctoniques dénombrées dans l'eau de l'estuaire de l'Elorn avant la mise en culture.**

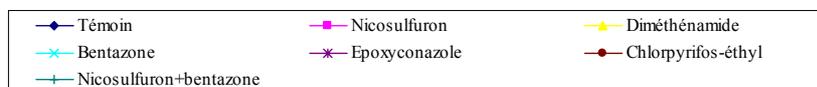
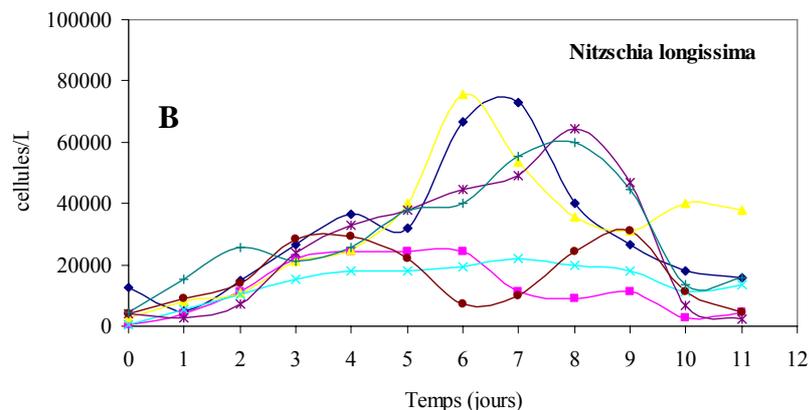
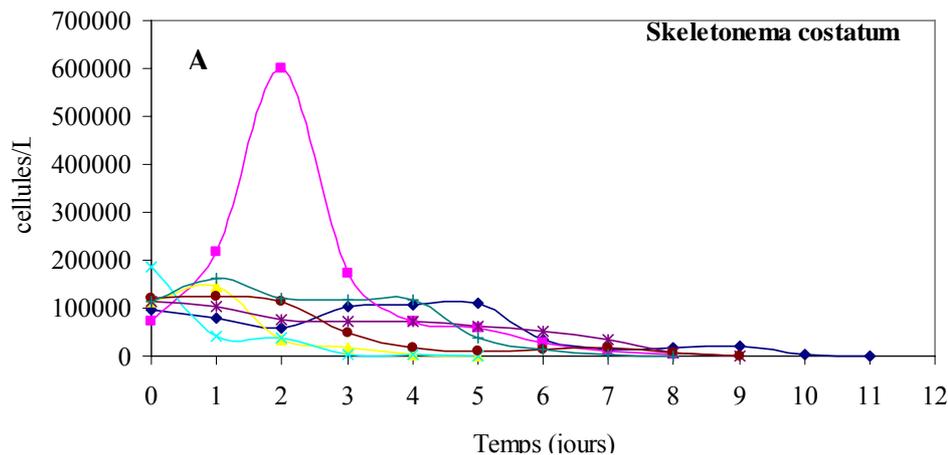
<u>Diatomées</u>	Nombre de cellules/L	<u>Dinoflagellés</u>	Nombre de cellules/L
<i>Skeletonema costatum</i>	116500	<i>Prorocentrum micans</i>	2000
<i>Nitzschia longissima</i>	4000	<i>Gymnodinium sp.</i>	700
<i>Thalassionema nitzschoïdes</i>	1380	<i>Katodinium glaucum</i>	330
<i>Chaetoceros sp.</i>	81900	<i>Scrippsiella trochoïdea</i>	1470
Autres diatomées (4 espèces)	1270	Autres péridiniens	300
		Autres gymnodinés	1900
		<i>Dinophysis acuminata</i>	320
		<i>Phaeocystis pouchetii</i>	présente

## Croissance du phytoplancton

### Taux de croissance

Comme précédemment dans l'estuaire de la Penzé, on constate que la croissance des microalgues n'est pas synchrone (Figure 14). Les courbes de croissance des diatomées dans les milieux témoins mettent en évidence la faible croissance de *Skeletonema costatum* (Figure 14A) dont la courbe ne présente pas de pic majeur. Chez *N. longissima*, le maximum de densité cellulaire est atteint au 6<sup>ème</sup> jour de la culture (Figure 14 B), au 4<sup>ème</sup> jour chez *Chaetoceros sp.* (Figure 14 D) et au 10<sup>ème</sup> jour pour *T. nitzschoïdes* (Figure 14 C). La croissance des dinoflagellés est également asynchrone avec le développement maximum de *P. micans* (Figure 15 E) et de *Gymnodinium sp.* (Figure 15 F) au 5<sup>ème</sup>/6<sup>ème</sup> jour de la culture, puis en finale celui de *K. glaucum* au 11<sup>ème</sup> jour (Figure 15 G). La succession des différents pics est moins nette, notamment en début de culture, que dans le cas du phytoplancton de la Penzé et de ce fait, induit dans le milieu témoin non pas un pic de chlorophylle mais un plateau qui s'étend du 3<sup>ème</sup> au 5<sup>ème</sup> jour de la culture et qui représente les différents stades de croissance des diatomées.

Dans le milieu témoin, le taux spécifique de croissance  $\mu j^{-1}$  des diatomées varie de 0,6 (*S. costatum*, *N. longissima*) à 2,2 (*Chaetoceros sp.*) soit de 1 à 3 divisions par jour (Tableau 5).



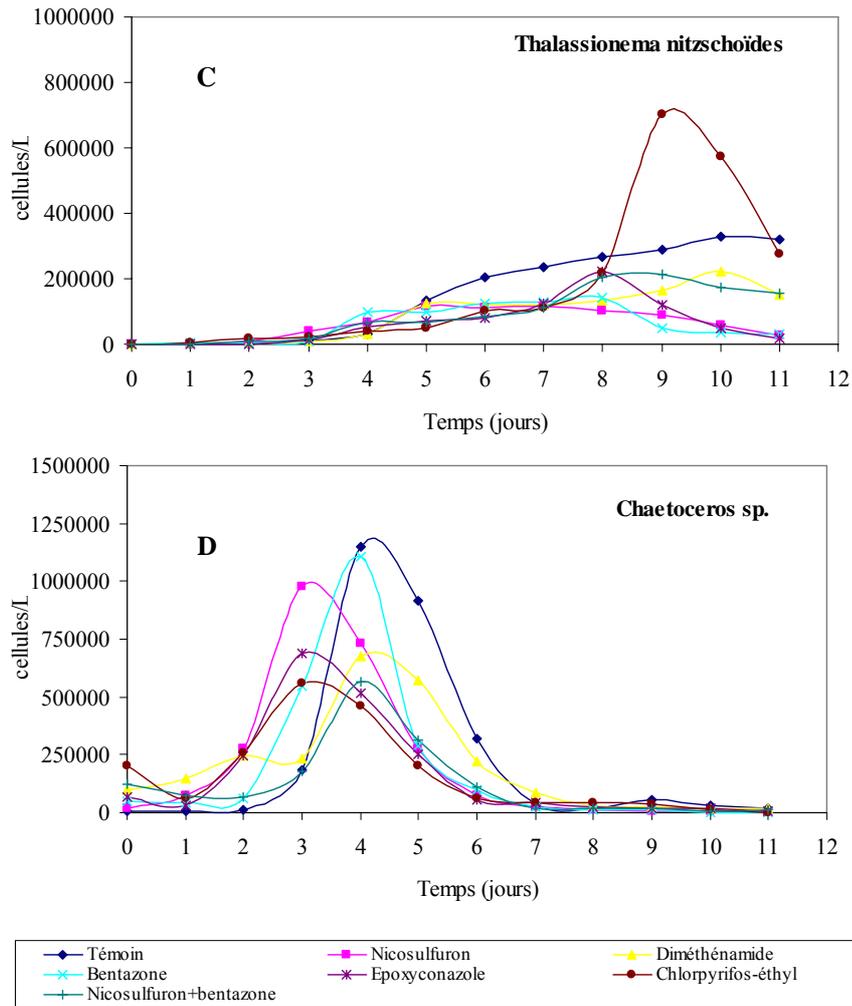


Figure 14 : Courbes de croissance des principales diatomées

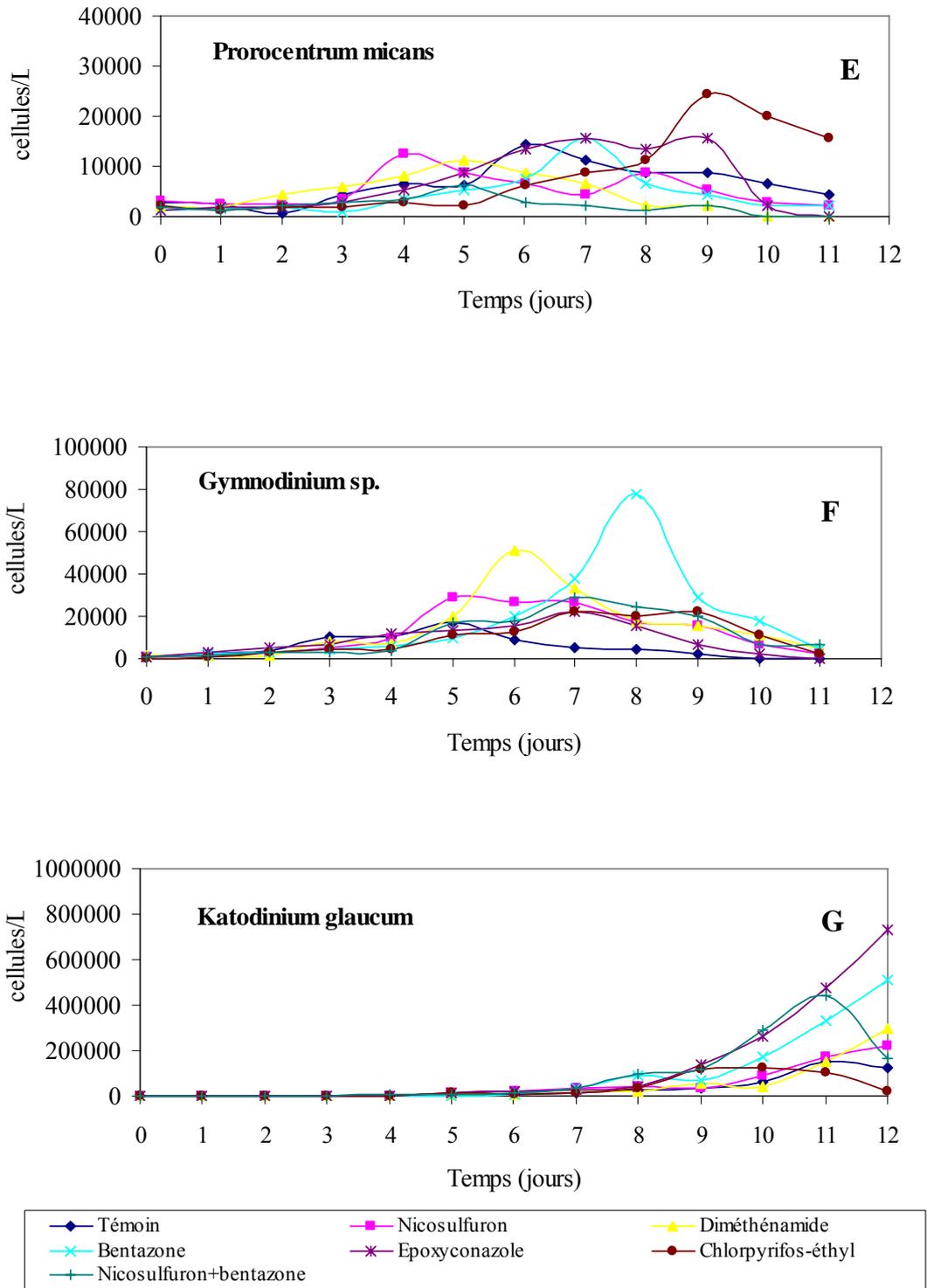


Figure 15 : Courbes de croissance des principales diatomées

Le taux de croissance des dinoflagellés est relativement élevé pour ces espèces variant de 0,64  $j^{-1}$  chez *K. glaucum* à 1  $j^{-1}$  pour *Gymnodinium sp.* soit 1 à 1,5 division par jour.

**Tableau 5 : Taux de croissance  $\mu j^{-1}$  des espèces phytoplanctoniques dans le milieu témoin.**

<u>Diatomées</u>	LT en j	$\mu j^{-1}$	<u>Dinoflagellés</u>	LT en j	$\mu j^{-1}$
<i>Skeletonema costatum</i>	2-3	0,58	<i>Prorocentrum micans</i>	5-6	0,82
<i>Nitzschia longissima</i>	5-6	0,65	<i>Gymnodinium sp.</i>	2-3	1,0
<i>Thalassionema nitzschoïdes</i>	5-6	1,24	<i>Katodinium glaucum</i>	10-11	0,64
<i>Chaetoceros sp.</i>	3-4	2,2			

LT : limite temporelle de la phase exponentielle de croissance utilisée pour calculer  $\mu$

Le taux de croissance des différentes espèces phytoplanctoniques soumises aux apports de pesticides a été, comme précédemment, exprimé en pourcentage par rapport à leur taux de croissance respectif dans le milieu témoin.

### Action des herbicides

#### *Diatomées*

Les diatomées ont également été classées en 3 groupes : les espèces à faible croissance (*S. costatum*, *N. longissima*), à taux de croissance moyen (*T. nitzschoïdes*) et à taux de croissance élevé (*Chaetoceros sp.*). On ne trouve pas ici la corrélation, observée dans les populations de la Penzé, entre l'impact des herbicides et la valeur du taux de croissance (Figure 16). Seul l'effet du nicosulfuron semble lié la vitesse de division des espèces induisant une forte stimulation de la croissance (+ 40 à 80 %) pour les taux spécifiques  $\leq 1,2 j^{-1}$  et une forte inhibition quand  $\mu$  est élevé (- 40 %). La présence de diméthénamide réduit la croissance des diatomées de 30 à 70 % à l'exception de *T. nitzschoïdes*. La bentazone n'agit que sur *S. costatum* en inhibant totalement sa croissance.

Alors que la croissance était presque deux fois plus forte en présence de nicosulfuron, l'action synergique du mélange nicosulfuron + bentazone est évident chez cette espèce dont la croissance n'est réduite que de 40 % en sa présence.

L'effet simultané de la bentazone et du nicosulfuron se traduit par une forte stimulation de la croissance de *N. longissima* (+ 86 %) et un effet inhibiteur chez *T. nitzschoïdes* et *Chaetoceros* (- 50 %).

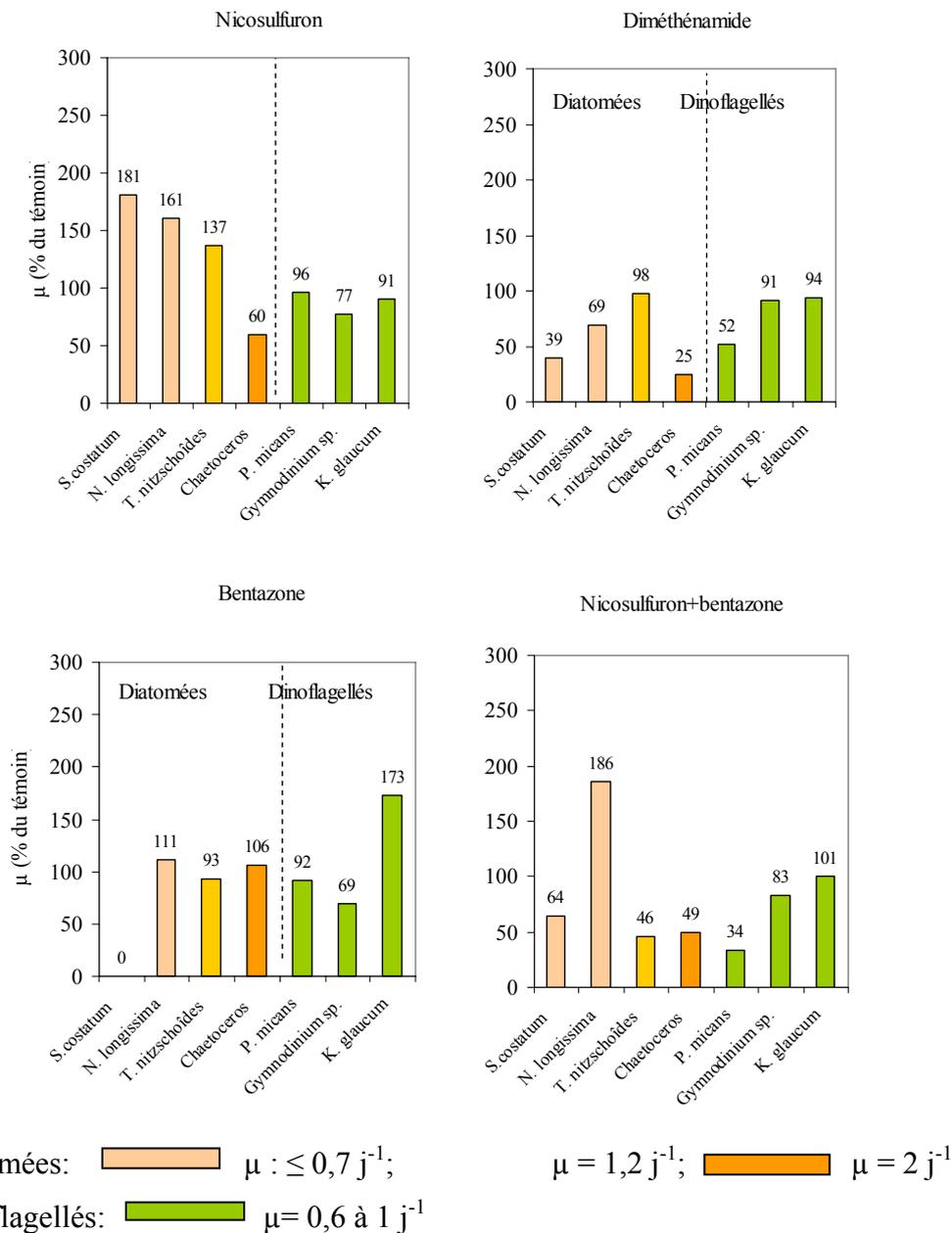


Figure 16 : Pourcentages par rapport au témoin du taux de croissance après apport d'herbicides

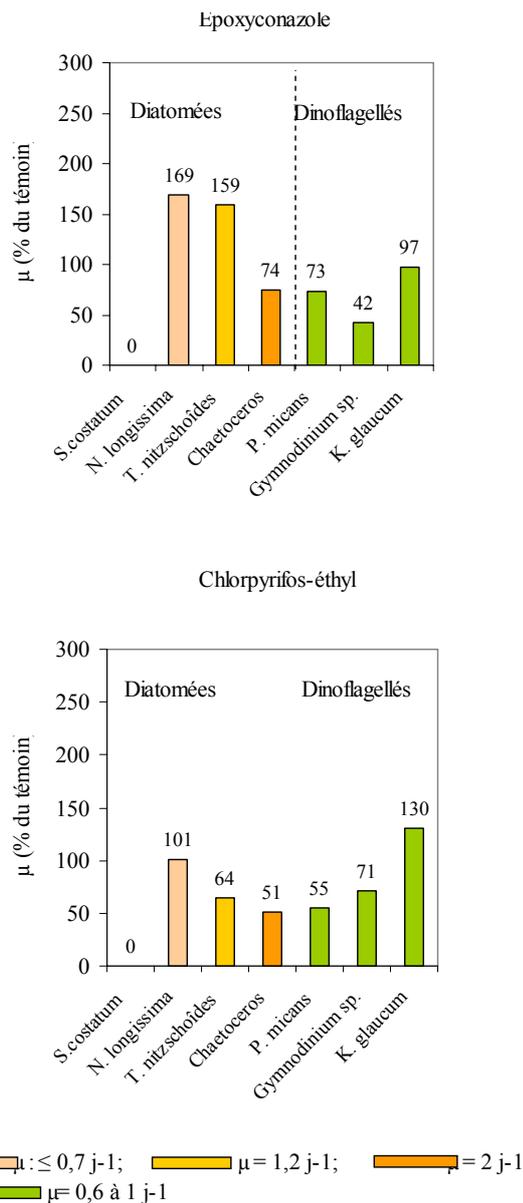
### Dinoflagellés

La croissance de *P. micans* n'est pas affectée par la présence de nicosulfuron ou de bentazone mais le mélange de ces deux herbicides réduit sa croissance de 65 %. Le diméthénamide provoque également une forte réduction de croissance chez cette espèce (50 %). On n'observe pas d'effet cumulatif du nicosulfuron et de la bentazone chez *Gymnodinium sp.* puisque chaque herbicide seul ou cumulé n'induit qu'une légère diminution de sa croissance (20 à 30 %). Le seul effet observé sur la croissance de *Katodinium glaucum* est celui de la bentazone qui augmente de 75 % le taux de croissance de cette espèce.

Autres pesticides

*Diatomées*

Le développement de *S. costatum* est totalement inhibé en présence d'époxiconazole ou de chlorpyrifos-éthyl. La présence de fongicide dans le milieu provoque une forte augmentation du taux de croissance de *N. longissima* (+ 70 %) et de *T. nitzschoïdes* (+ 60 %) et une légère diminution de la croissance de *Chaetoceros* (- 25 %) alors que l'insecticide n'a pas d'effet sur *N. longissima* et réduit de 35 à 50 % le taux de croissance de *T. nitzschoïdes* et de *Chaetoceros*, respectivement (Figure 17).



**Figure 17 : Pourcentages par rapport au témoin du taux de croissance en présence d'un fongicide et d'un insecticide**

### *Dinoflagellés*

Seul le taux de croissance de *K. glaucum* n'est pas affecté en présence d'époxiconazole voire augmenté (+30 %) en présence de chlorpyrifos-éthyl. Les deux autres dinoflagellés étudiés, *P. micans* et *Gymnodinium sp.*, ont leur taux de croissance réduit de 30 à 60 % sous l'action de l'un ou l'autre pesticide (Figure 17).

### **Densité cellulaire maximale**

#### Action des herbicides

De façon générale, l'apport d'herbicide tend à diminuer la densité cellulaire maximale des diatomées et d'un des dinoflagellés, *P. micans*, quel que soit le sens de variation de  $\mu$  (Figure 18) avec toutefois des exceptions. C'est le cas, notamment, de *S. costatum* dont le taux de croissance lorsqu'il n'est pas nul (en présence de bentazone) peut être fortement augmenté (nicosulfuron) ou diminué (diméthénamide et mélange nicosulfuron+bentazone) mais la densité cellulaire maximale est toujours supérieure à celle du témoin. On notera que l'augmentation de 80 % de  $\mu$  induit une augmentation de la biomasse de plus de 400 % en présence de nicosulfuron.

Autre exception, celle de *N. longissima* pour laquelle l'apport de nicosulfuron et de bentazone simultanément provoque une augmentation du taux de croissance (85 %) et également de la densité cellulaire maximale (50 %). Dans certains cas, la densité cellulaire maximale est égale à celle du témoin ; il en est ainsi pour *N. longissima* en présence de diméthénamide, de *Chaetoceros sp.* et de *P. micans* en présence de bentazone.

Les Gymnodinés tels que *Gymnodinium sp.* et *K. glaucum* ont un comportement différent puisque, dans tous les cas, leur densité maximale est supérieure à celle du témoin. Même si le taux de croissance est diminué, le nombre maximal de cellules est triplé voire quadruplé chez *Gymnodinium sp.* en présence de diméthénamide et de bentazone, respectivement. *K. glaucum* présente une augmentation de sa densité plus modeste mais qui peut atteindre 200 % après apport du mélange nicosulfuron+bentazone.

#### Action des autres pesticides

Comme les herbicides, l'époxiconazole entraîne une diminution de la densité cellulaire maximale de toutes les diatomées même si le taux de croissance est plus élevé que celui des témoins (Figure 19). Le nombre maximum de cellules de *P. micans* n'est pas modifié malgré la baisse de son taux de croissance alors que celui de *Gymnodinium sp.* augmente de 30 % et celui de *K. glaucum* est 4 fois plus élevé que dans le milieu non pollué.

Le chlorpyrifos-éthyl a une action plus complexe car on n'observe pas de tendance générale (Figure 19). L'ajout de cet insecticide entraîne une forte réduction de la densité cellulaire de *N. longissima* (- 60 %), de *Chaetoceros sp.* (-50 %) et plus faiblement de *K. glaucum* (-20 %). Inversement, il produit une augmentation de 75 % du nombre de cellules de *T. nitzschoïdes* et de *P. micans* et de 30 % du nombre de *K. glaucum*.

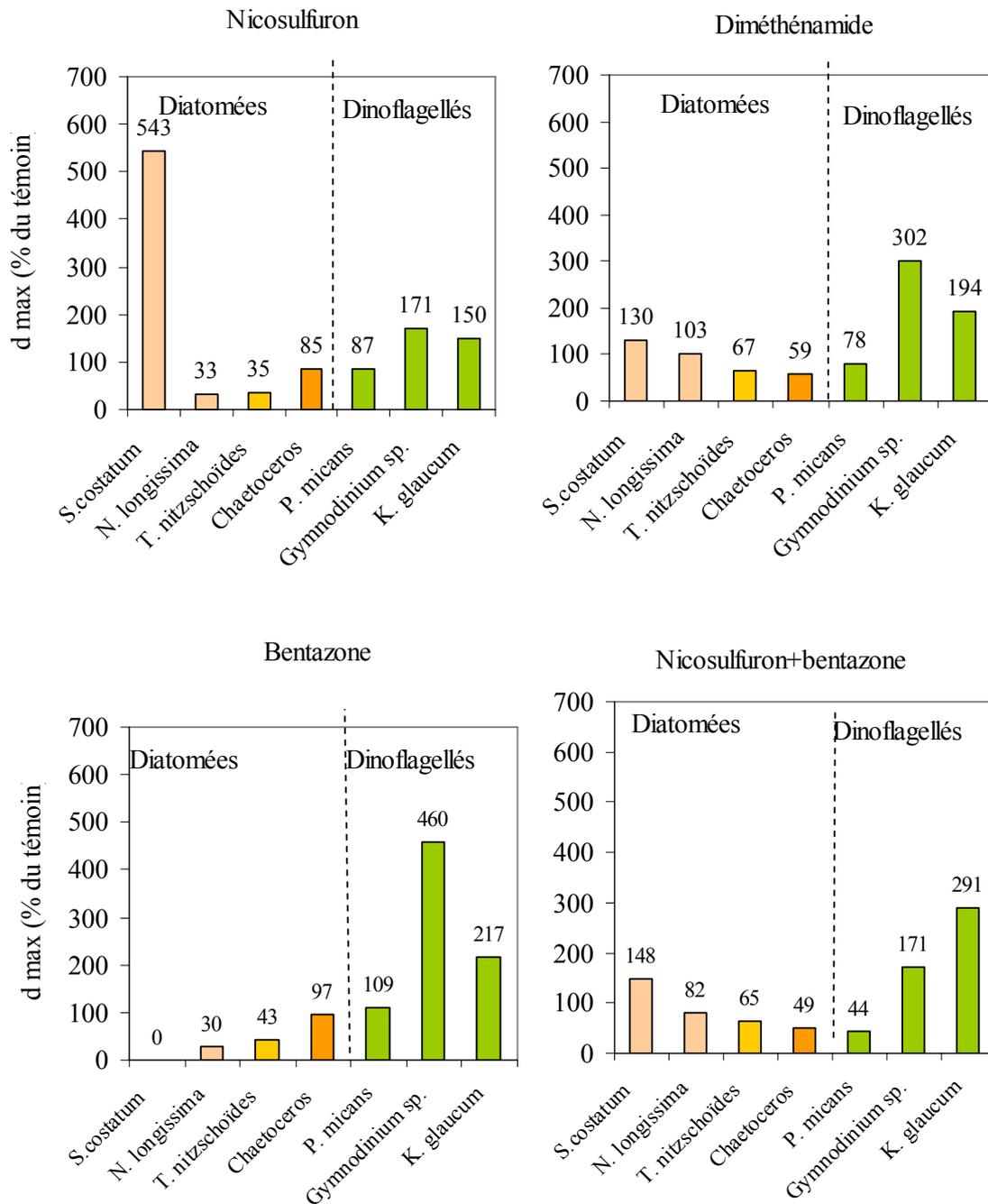


Figure 18 : Pourcentages par rapport au témoin de la densité cellulaire finale après apports d'herbicides.

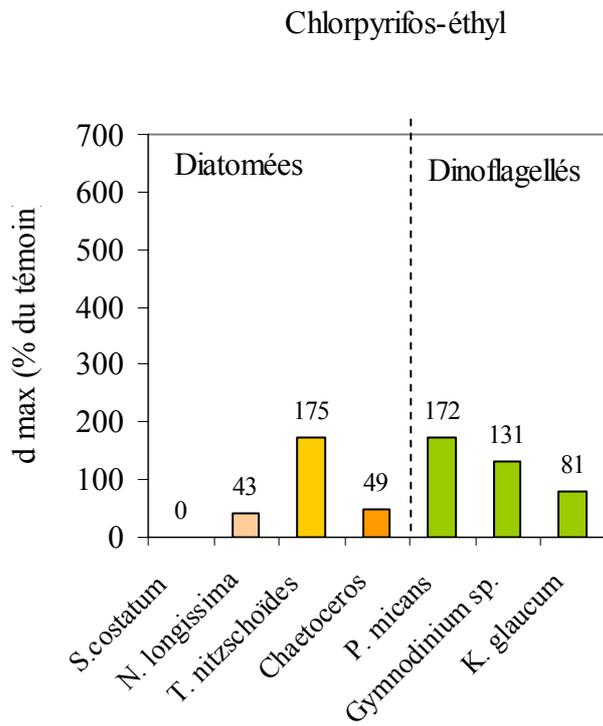
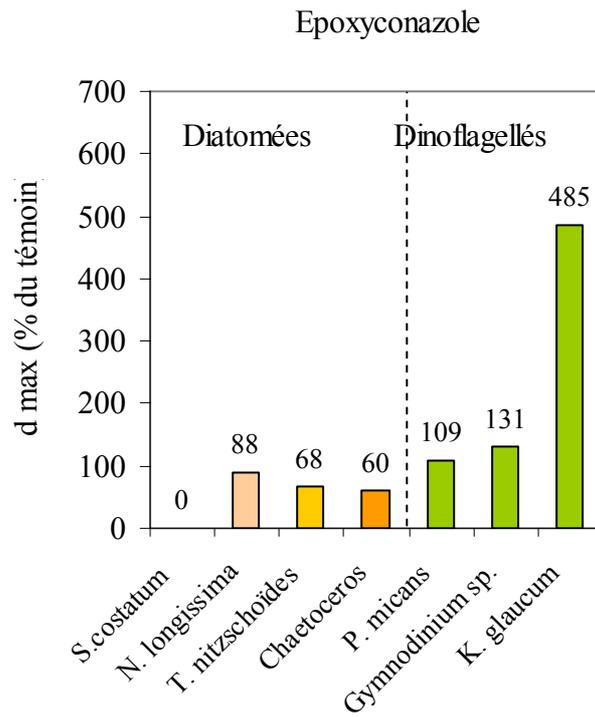


Figure 19 : Pourcentages par rapport au témoin de la densité cellulaire finale après apport de fongicide et d'insecticide

### 2.1.1.2.3 Discussion

Les deux communautés phytoplanctoniques étudiées présentent des stades de développement différents. En Penzé, les prélèvements ont été effectués en fin de bloom d'*Alexandrium minutum*. Bien qu'encore majoritaires, les dinoflagellés ont un taux de croissance faible ; malgré la présence de sels nutritifs abondants, leur développement est limité par leur incapacité à soutenir une croissance prolongée puisque celle-ci s'arrête au bout de 24 h de culture. Parallèlement, les diatomées qui sont représentées par des espèces caractéristiques de la période de prélèvement montrent pour la plupart des taux de croissance élevés voire très élevés (Tableau 5) et fournissent quasiment toute la biomasse chlorophyllienne.

Dans l'estuaire de l'Elorn, la communauté phytoplanctonique est composée essentiellement de petites diatomées ubiquistes à faible taux de croissance. Seule la population de *Chaetoceros* présente un taux de croissance élevé. Les dinoflagellés sont en très faible quantité mais avec un taux de croissance élevé. Cette situation reflète une période de transition correspondant à la fin de la floraison printanière des diatomées d'une part, et au début de l'installation d'une flore estivale dominée par les dinoflagellés, d'autre part.

L'évolution de la biomasse chlorophyllienne en contact avec les polluants est un bon reflet de l'impact de ceux-ci. On peut noter que, dans tous les cas (Figure 2 et Figure 12), il y a, dans un premier temps (2 à 3 jours) augmentation de la concentration en chlorophylle dans les cultures dopées. Cette augmentation peut être fortement multipliée puisqu'en Penzé, elle est trois fois supérieure dans les milieux enrichis en herbicides et jusqu'à 6 fois plus élevée en présence du fongicide et de l'insecticide.

A un degré moindre, on retrouve cette tendance dans les cultures de l'Elorn. L'effet des pesticides sur les variations de biomasse s'atténue au cours de la culture. Ce « dopage » initial peut correspondre à la réduction du temps de latence des cultures enrichies en pesticides, réduction visible sur la plupart des courbes de croissance. De ce fait, la multiplication des cellules débutant plus tôt dans les milieux pollués que dans le milieu témoin, on aboutit rapidement à une augmentation de biomasse et l'effet s'estompe quand les cellules du milieu propre entament leur multiplication.

De l'ensemble de ces premiers résultats, il ressort que l'impact des pesticides sur les différentes espèces phytoplanctoniques présentes dans le milieu marin est différent selon que l'on considère le taux de croissance spécifique et la densité cellulaire maximale. Dans le cadre de cette étude, quel paramètre  $\mu$  ou  $d_{max}$  reflète-t-il le mieux l'impact des pesticides sur le phytoplancton naturel ?

Pour tenter de résoudre ce problème, un récapitulatif des résultats a été effectué en considérant l'impact de chaque pesticide sur le taux de croissance et sur la densité cellulaire maximale pour toutes les espèces testées (Tableau 6 et Tableau 7).

Les espèces ont été répertoriées selon 6 critères : le taux de croissance augmente, diminue ou varie peu ( $\pm 15\%$ ) ou pas du tout ; la densité maximale des cellules augmente, diminue varie peu ( $\pm 15\%$ ) ou pas du tout.

Sont considérées comme stimulées les espèces dont les deux paramètres augmentent en présence d'un pesticide donné (leurs noms sont écrits en vert dans les tableaux). Dans cette catégorie, on trouve, principalement, parmi les diatomées, les espèces présentes en Penzé. Les grosses cellules de *Guinardia flaccida* (Rhizosoleniaceae) sont fortement stimulées par tous les pesticides alors que les cellules de *Lauderia borealis* (Thalassiosiraceae) ne le sont qu'en

présence de nicosulfuron, de diméthénamide et du mélange nicosulfuron et bentazone (où seul le nicosulfuron semble agir). Dans ce milieu, la croissance de *Chaetoceros sp.* n'est stimulée que par l'apport de bentazone. Dans l'Elorn, les diatomées ne sont généralement pas stimulées par l'apport de pesticides si ce n'est *Skeletonema costatum* par le nicosulfuron et *N. longissima* par le mélange nicosulfuron + bentazone.

Selon le critère choisi ( $\mu$  augmente,  $d_{max}$  augmente), l'apport de pesticides intervient peu sur la croissance des dinoflagellés à l'exception d'*Alexandrium minutum* en présence de chlorpyrifos-éthyl et de *Katodinium glaucum* en présence de bentazone.

Parmi les espèces fortement inhibées avec un taux de croissance et une densité cellulaire finale qui diminuent (en rouge dans les tableaux), se trouvent deux espèces de l'estuaire de la Penzé, *Rhizosolenia delicatula* et *Alexandrium minutum*. Cette diatomée et ce dinoflagellé n'ont aucune chance de survie en présence de la plupart des pesticides. Seul le mélange nicosulfuron+bentazone a une action moins drastique sur *R. delicatula* dont il ne modifie pas le taux de croissance mais diminue fortement la densité cellulaire maximale (- 75 %).

L'effet du mélange dépendra donc de la durée d'exposition. Pour *A. minutum*, tous les herbicides sont fortement toxiques en inhibant totalement la multiplication des cellules. L'époxiconazole a peu d'effet sur cette espèce dont il diminue légèrement  $\mu$  (- 17 %) mais augmente la densité cellulaire (+ 33 %).

Certaines espèces ne sont inhibées que par un pesticide ; c'est le cas de *Skeletonema costatum* (Elorn) en présence de bentazone, de *Heterocapsa triquetra* et de *Prorocentrum micans* en présence du mélange nicosulfuron + bentazone. Les populations de *Chaetoceros* présentent une forte sensibilité au diméthénamide et au chlorpyrifos-éthyl. Le mélange chlorpyrifos-éthyl ne réduit drastiquement que la population issue de l'Elorn.

**Tableau 6 : Récapitulatif de l'impact des pesticides sur le taux de croissance  $\mu j^{-1}$  de différentes espèces de phytoplancton naturel.**

	Nicosulfuron (190 ng/L)	Diméthénamide (123 ng/L)	Bentazone (106 ng/L)	Nicosulfuron + bentazone	Epoxiconazole (164 ng/L)	Chlorpyrifos -éthyl (36 ng/L)
<u><math>\mu</math> augmente</u>	<i>G.flaccida</i> <i>L. borealis</i> <i>S. costatum</i> 2 <i>N. longissima</i> <i>T.nitzschoïdes</i>	<i>G.flaccida</i> <i>L. borealis</i> <i>S. costatum</i> 1	<i>G.flaccida</i> <i>L. borealis</i>  <i>Chaetoceros</i> 1  <i>K. glaucum</i>	<i>G.flaccida</i> <i>L. borealis</i> <i>S. costatum</i> 1  <i>N. longissima</i>	<i>G.flaccida</i> <i>L. borealis</i>  <i>N. longissima</i> <i>Chaetoceros</i> 1 <i>T.nitzschoïdes</i>	<i>G.flaccida</i> <i>L. borealis</i>    <i>A. minutum</i> <i>K. glaucum</i>
<u><math>\mu</math> diminue</u>	<i>R. delicatula</i> <i>T. fallax</i> <i>L. danicus</i> <i>Chaetoceros</i> 2   <i>H. triquetra</i> <i>A. minutum</i> <i>Gymnodinium</i>	<i>R. delicatula</i> <i>T. fallax</i> <i>L. danicus</i> <i>Chaet</i> 1 et 2 <i>S. costatum</i> 2 <i>N. longissima</i>   <i>A. minutum</i>  <i>P. micans</i>	<i>R. delicatula</i> <i>T. fallax</i> <i>L. danicus</i>   <i>S. costatum</i> 2   <i>A. minutum</i> <i>Gymnodinium</i>	<i>T. fallax</i>   <i>Chaetoceros</i> 2 <i>S. costatum</i> 2   <i>T.nitzschoïdes</i> <i>H. triquetra</i> <i>A. minutum</i> <i>Gymnodinium</i> <i>P. micans</i>	<i>R. delicatula</i> <i>T. fallax</i> <i>L. danicus</i> <i>Chaetoceros</i> 2 <i>S. costatum</i> 2   <i>H. triquetra</i> <i>A. minutum</i> <i>Gymnodinium</i> <i>P. micans</i>	<i>R. delicatula</i> <i>T. fallax</i> <i>L. danicus</i> <i>Chaet</i> 1 et 2 <i>S. costatum</i> 2   <i>T.nitzschoïdes</i> <i>H. triquetra</i> <i>Gymnodinium</i> <i>P. micans</i>
$\mu$ varie peu ou pas du tout	<i>S. costatum</i> 1 <i>Chaetoceros</i> 1      <i>P. micans</i> <i>K. glaucum</i>	   <i>T.nitzschoïdes</i> <i>H. triquetra</i> <i>Gymnodinium</i>   <i>K. glaucum</i>	<i>S. costatum</i> 1 <i>Chaet</i> 1 + 2  <i>T.nitzschoïdes</i> <i>H. triquetra</i>  <i>P. micans</i>	<i>R. delicatula</i>  <i>Chaetoceros</i> 1 <i>L. danicus</i>     <i>K. glaucum</i>	<i>S. costatum</i> 1        <i>K. glaucum</i>	<i>S. costatum</i> 1        <i>H. triquetra</i>

NB : *S. costatum* 1 et *Chaetoceros* 1, prélevés dans l'estuaire de la Penzé,  
*S. costatum* 2 et *Chaetoceros* 2, prélevés dans l'estuaire de l'Elorn

Le nom complet des espèces se trouve dans le Tableau 3 et le Tableau 4. Les noms écrits en vert correspondent aux espèces stimulées par les pesticides, en rouge aux espèces inhibées, en bleu les espèces sur lesquelles le pesticide n'a pas d'action (voir texte).



On observe parfois une diminution de  $\mu$  et une augmentation de  $d_{max}$  ; c'est le cas pour deux diatomées dans la Penzé, *Thalassiosira fallax* et *Leptocylindrus danicus* et un dinoflagellé dinoflagellé, *Heterocapsa triquetra*, dans la Penzé, et d'un autre dinoflagellé, *Gymnodinium sp.*, dans l'Elorn. Ce paradoxe s'explique pour les trois premières espèces citées par l'absence de temps de latence sous l'action des pesticides. Le taux de croissance est plus faible dans ces milieux contaminés que dans le milieu non enrichi mais la multiplication qui s'ensuit, conduit à un plus grand nombre de cellules.

La courbe de croissance de *L. danicus* montre clairement ce phénomène. Le taux de croissance de *Gymnodinium sp.* diminue en présence de tous les pesticides à l'exception du diméthénamide alors que la densité maximale augmente dans tous les cas. Pour cette espèce, l'action des pesticides se traduit d'abord par un ralentissement de croissance puisque la phase exponentielle en absence de contaminant intervient entre le 2<sup>ième</sup> et le 3<sup>ième</sup> jour de la culture alors qu'en présence de pesticide elle ne se produit qu'après le 4<sup>ième</sup> jour (Figure 15 F). La reprise de croissance qui s'effectue alors avec un taux inférieur à celui du témoin dure plus longtemps et conduit à des concentrations cellulaires très supérieures (jusqu'à 5 fois plus en présence de bentazone) à celle obtenue dans le milieu non enrichi. On peut donc considérer que la croissance de *Gymnodinium sp.*, maintenu en milieu pollué, sera stimulée par les pesticides.

Lorsque, ni le taux de croissance ni la densité cellulaire d'une espèce ne sont modifiés par l'apport de pesticides, on peut considérer qu'elle est insensible à ces polluants (en bleu dans les tableaux). Dans ce cas, se trouve la diatomée issue de la Penzé, *Skeletonema costatum*, uniquement en présence de bentazone. Deux dinoflagellés *Heterocapsa triquetra* (Penzé) et *Prorocentrum micans* (Elorn) résistent également, le premier à l'apport de diméthénamide, de bentazone et de chlorpyrifos et le second à l'apport de nicosulfuron et de bentazone.

**En conclusion**, il apparaît que les espèces testées dans cette étude, très représentatives de nombreux milieux estuariens, s'avèrent être particulièrement sensibles à ces nouveaux pesticides utilisés ici à des concentrations variant de 36 ng/L pour le chlorpyrifos-éthyl à 190 ng/L pour le nicosulfuron. Une relation a pu être établie entre impact des pesticides et taux de croissance des espèces phytoplanctoniques dans l'estuaire de la Penzé. Le ralentissement de croissance induit par l'apport des pesticides est d'autant plus fort que le taux de croissance est élevé, corroborant ainsi ce qui avait été remarqué précédemment (Durand *et al.*, 2000). Cette relation n'a pu être mise clairement en évidence dans les populations de l'estuaire de l'Elorn si ce n'est en présence de nicosulfuron. Toutefois cette relation reste valable si on excepte *Skeletonema costatum*. Cette espèce, en effet, était en fin de croissance avec un faible taux et une densité cellulaire relativement élevée donc dans des conditions de développement très différentes des autres espèces.

### 2.1.1.3 Résultats de la deuxième année : Les Glénan et la rivière du Bélon

#### 2.1.1.3.1 Site de référence : les Glénan

Les prélèvements d'eau de mer ont été effectués en surface le 13 mai 2004 à 300 m de la côte de l'île Saint-Nicolas (site d'étude de Denis de la Broise) à PM+3. La profondeur de la colonne d'eau était de 7 m, la température de l'eau était de 13,3°C et la salinité de 34,4. A cette époque de l'année, après la floraison des diatomées, le stock hivernal de sels nutritifs

est quasiment épuisé et le milieu est pauvre avec 1,47  $\mu\text{moles}$  de N- ( $\text{NO}_2 + \text{NO}_3$ ), 1,36  $\mu\text{moles}$  de  $\text{N-NH}_4^+$  et de 0,14  $\mu\text{moles}$  de  $\text{P-PO}_4^{3-}$ .

De retour au laboratoire, le phytoplancton est mis en culture à  $13 \pm 1^\circ\text{C}$  sous un éclairage de 110  $\mu\text{moles}$  de photons  $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$  et une photopériode J/N de 15/9.

### 2.1.1.3.1.1 Apport de pesticides

Les concentrations des différents pesticides ont été mesurées dans les milieux de culture soit :

- 41,8 ng/L de nicosulfuron
- 129,3 ng/L de sulcotrione
- 70,8 ng/L de diméthénamide
- 50,7 ng/L de bentazone
- 114,8 ng/L d'époxiconazole
- non déterminé pour le chlorpyrifos-éthyl
- 37,8 ng/L de nicosulfuron et 82,2 ng/L de bentazone dans le mélange.

Quoique différentes des valeurs théoriques, ces concentrations demeurent proches des valeurs dosées dans le milieu naturel.

### 2.1.1.3.1.2 Composition spécifique du phytoplancton

Lors du prélèvement, le phytoplancton est peu abondant. La diversité spécifique est élevée puisque l'on dénombre 13 espèces de diatomées et 11 espèces de dinoflagellés, chacune de ces espèces étant peu représentée (Tableau 8). Au cours des incubations, seules les espèces de diatomées les plus représentées initialement se développeront en abondance ; on n'observera aucune croissance significative chez les dinoflagellés.

**Tableau 8 : Espèces phytoplanctoniques dénombrées dans l'eau des Glénan avant la mise en culture.**

<u>Diatomées</u>	Nombre de cellules/L	<u>Dinoflagellés</u>	Nombre de cellules/L
<i>Leptocylindrus danicus</i>	3500	<i>Peridinium steinii</i>	520
<i>Rhizosolenia delicatula</i>	2600	<i>Scrippsiella trochoïdea</i>	300
<i>Rhizosolenia setigera</i>	1500	<i>Prorocentrum micans</i>	120
<i>Nitzschia delicatissima</i> .	1850	<i>Dinophysis acuminata</i>	120
<i>Thalassiosira levanderi</i>	500	<i>Peridinium</i> sp.	60
<i>Schræderella schræderi</i>	200	<i>Gymnodinium</i> sp.	930
<i>Chaetoceros curvisetus</i>	200	Autres gymnodinés (5 espèces)	990
Autres diatomées (6 espèces)	1970		

### 2.1.1.3.1.3 Action des pesticides sur l'évolution des cultures

#### Évolution de la biomasse chlorophyllienne

La concentration en chlorophylle initiale est très faible (0,8 µg/L) ; de ce fait, la phase de latence initiale se prolonge pendant 3 jours. Le maximum de biomasse est obtenu au 8<sup>ième</sup> jour de culture dans le milieu témoin, au 7<sup>ième</sup> jour dans les cultures contaminées à l'exception du milieu dopé en bentazone où le maximum de chlorophylle est atteint plus tardivement au 9<sup>ième</sup> jour de culture (Figure 20).

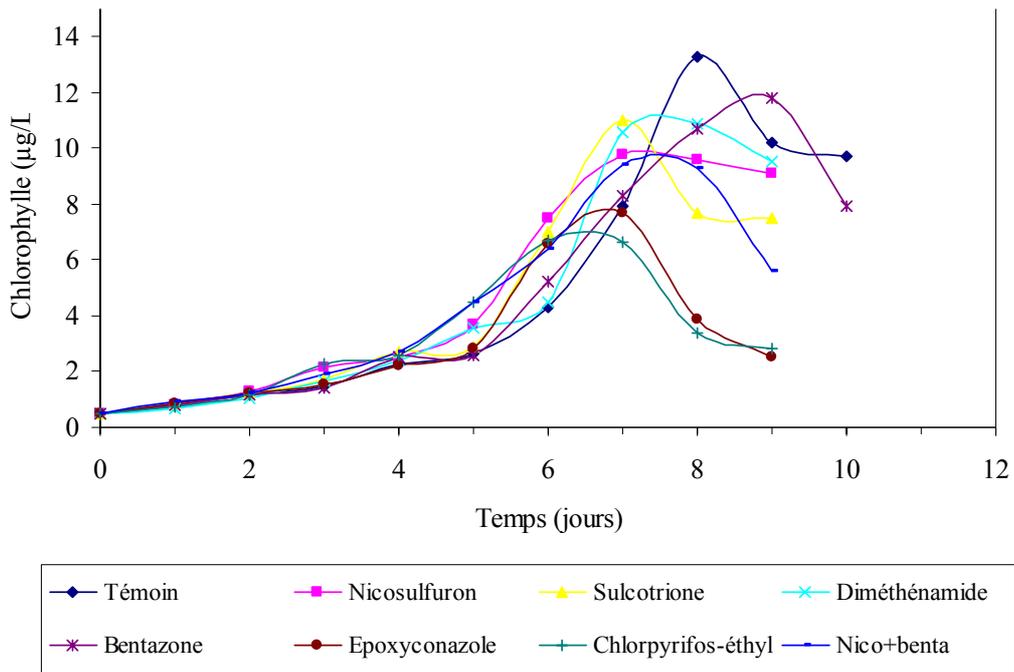


Figure 20 : Evolution de la chlorophylle dans les différents milieux (Glénan)

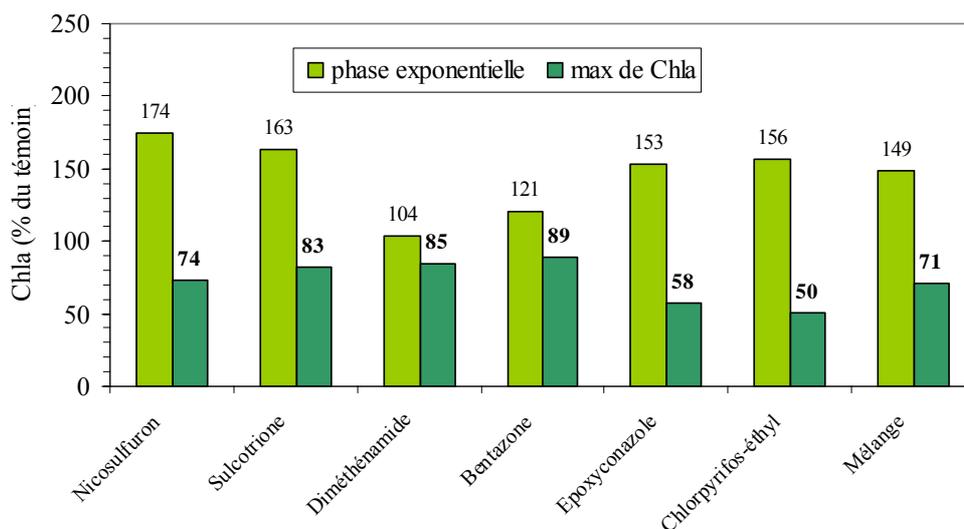


Figure 21 : Pourcentages de chlorophylle en phase exponentielle et en fin de croissance

Les pourcentages de chlorophylle exprimés par rapport au témoin montrent que la biomasse chlorophyllienne est toujours supérieure à celle du témoin au cours de la phase exponentielle de croissance, à l'exception du milieu dopé en bentazone. En revanche, le maximum de chlorophylle obtenu en fin de croissance traduit une perte significative de la biomasse dans les milieux contaminés (Figure 21).

### **Croissance du phytoplancton**

Comme précédemment deux paramètres de la croissance ont été pris en considération :

- le taux de croissance spécifique de l'espèce  $\mu \text{ j}^{-1}$  défini par la pente de la courbe en phase exponentielle et calculé comme suit :

$$\bullet \quad \mu \text{ j}^{-1} = \ln (d_2 - d_1) / (t_2 - t_1)$$

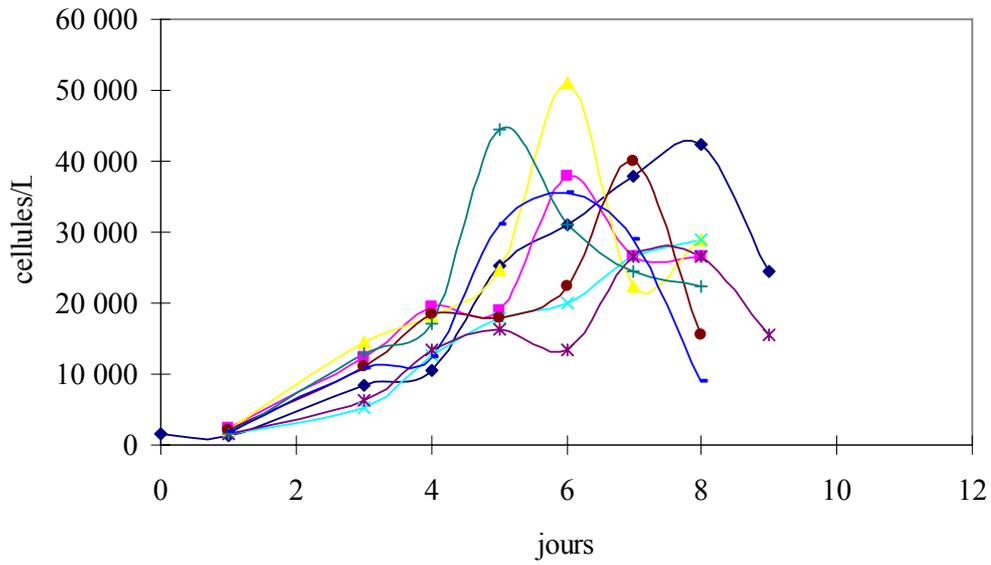
où  $d_2$  et  $d_1$  sont les nombres de cellules comptées respectivement aux temps  $t_2$  et  $t_1$ .

- la densité cellulaire maximale  $d_{\text{max}}$  obtenue dans le milieu sachant que l'apport de sels nutritifs est identique dans chaque culture.

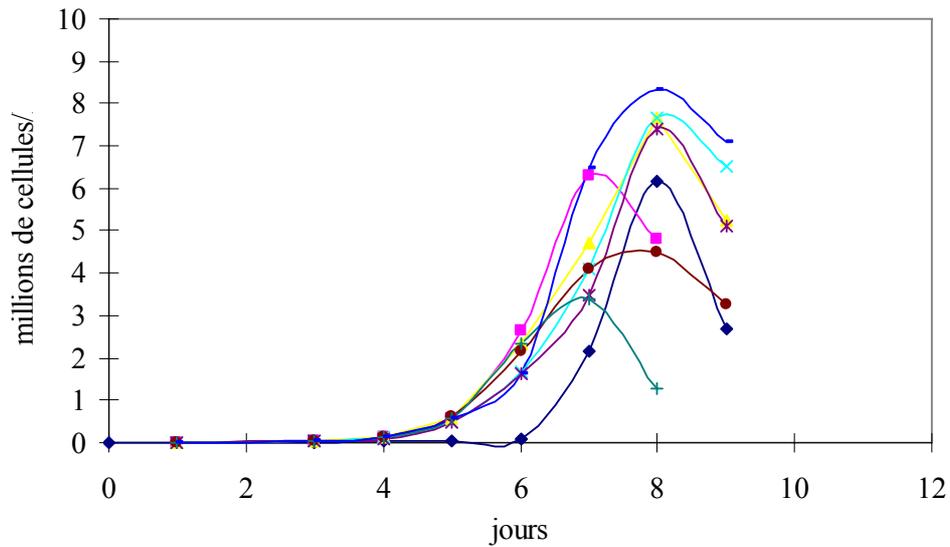
### **Taux de croissance du phytoplancton**

L'évolution de la croissance a été suivie sur les 7 espèces de diatomées précédemment citées dans le Tableau 8. En raison de la faible densité cellulaire initiale de chacune de ces espèces, la durée du temps de latence précédant la phase exponentielle de croissance est relativement longue puisque la phase exponentielle débute au 4<sup>ième</sup> ou 5<sup>ième</sup> jour de la culture pour la plupart des espèces et selon les milieux, voire au 6<sup>ième</sup> ou 7<sup>ième</sup> jour pour *Nitzschia delicatissima*, *Schröderella schröderii* et *Chaeteceros curvisetus* (Figure 22). Cette phase est brève et varie selon les espèces et les milieux de 1 à 3 jours.

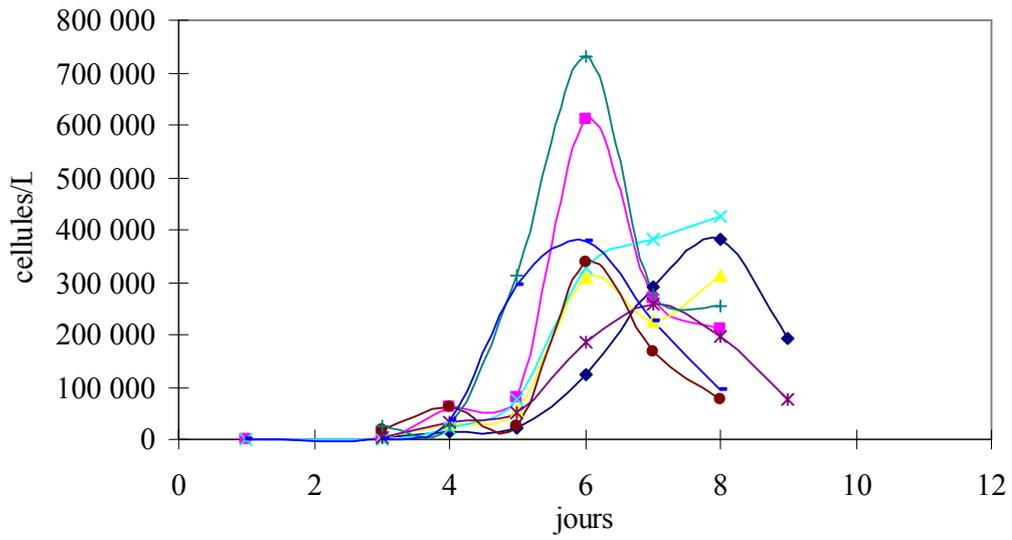
*Rhizosolenia setigera*



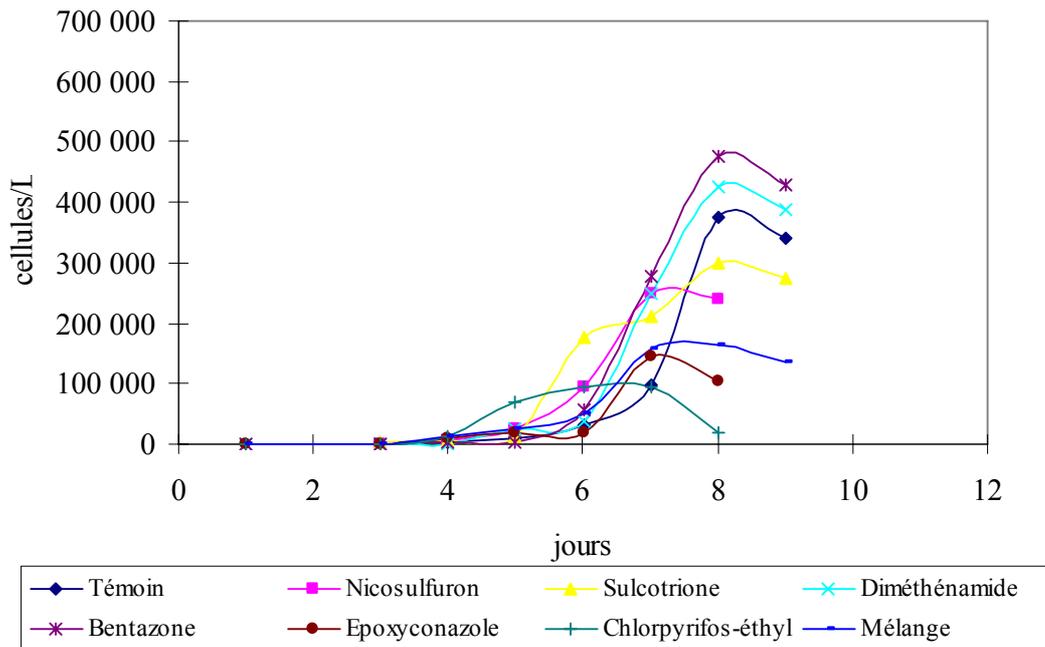
*Nitzschia delicatissima*



*Thalassiosira levanderi*



*Schroederella schroederii*



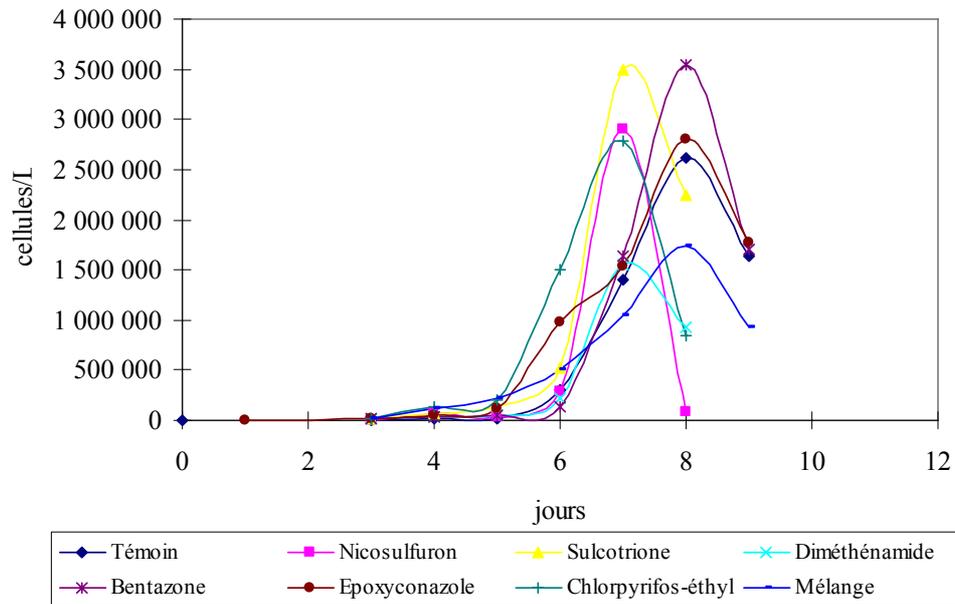
*Chaetoceros curvisetus*

Figure 22 : Courbes de croissance des différentes espèces de phytoplancton

Les taux de croissance des différentes diatomées déterminés dans le milieu témoin est faible variant de  $0,46 \text{ j}^{-1}$  pour *Leptocylindrus danicus* à  $1,54 \text{ j}^{-1}$  pour *Chaetoceros curvisetus*, (Tableau 9).

Tableau 9 : Taux de croissance  $\mu \text{ j}^{-1}$  des principales diatomées dans le milieu témoin (Glénan).

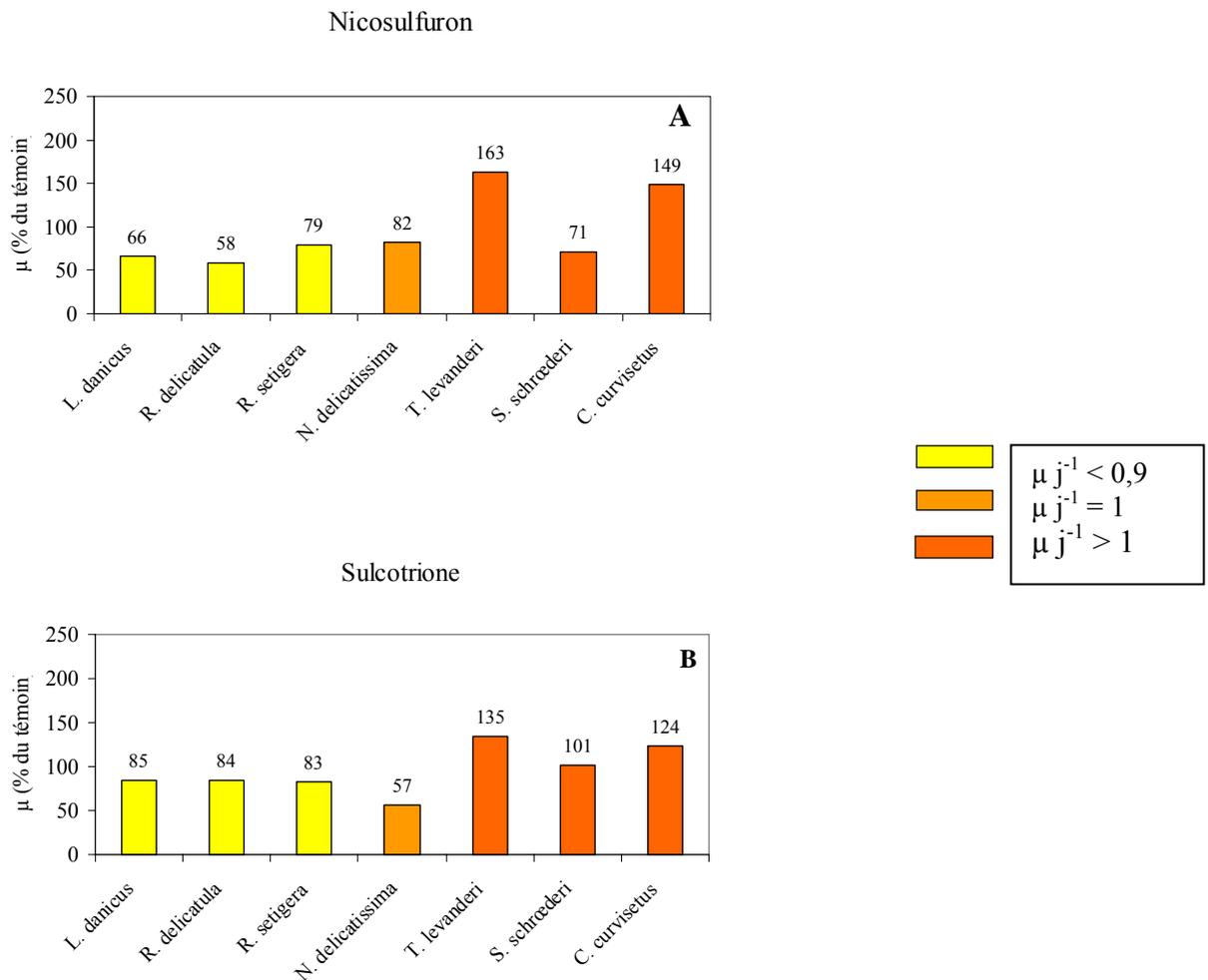
Diatomées	$\mu \text{ j}^{-1}$
<i>Leptocylindrus danicus</i>	0,46
<i>Rhizosolenia delicatula</i>	0,69
<i>Rhizosolenia setigera</i>	0,87
<i>Nitzschia delicatissima</i>	1,06
<i>Thalassiosira levanderi</i>	1,26
<i>Schröderella schröderii</i>	1,34
<i>Chaetoceros curvisetus</i>	1,54

L'action des différents pesticides a été déterminée à partir des courbes de croissance des espèces sélectionnées. Le taux de croissance de chaque espèce soumise à un pesticide a été exprimé en pourcentage par rapport à son témoin. Les résultats obtenus en 1999 (Durand *et al.*, 2000) ont laissé apparaître une possible relation entre la toxicité d'un polluant et le taux de croissance initial du phytoplancton.

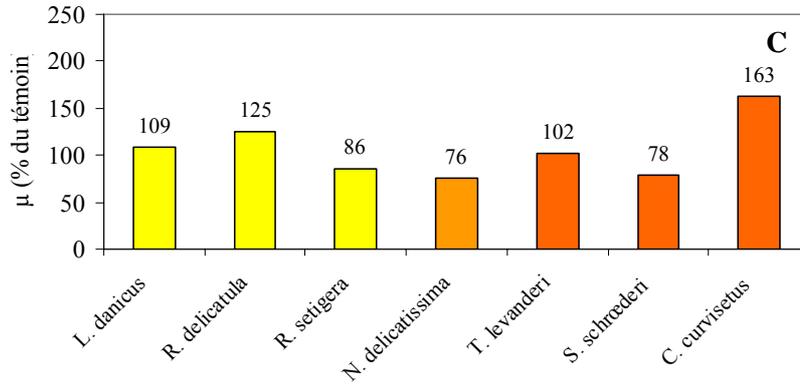
Dans l'étude de 2003 portant sur les sites de Penzé et de l'Elorn, cette tendance n'est apparue clairement que dans les résultats provenant de l'estuaire de la Penzé. Dans le même

esprit, bien que les taux de croissance ne soient pas très différents, les diatomées ont été classées ici par ordre croissant de leur taux de croissance avec des espèces à faible taux de croissance ( $\mu \text{ j}^{-1} \leq 0,9$ ), *L. danicus*, *R. delicatula* et *R. setigera* ; à taux de croissance moyen ( $\mu \text{ j}^{-1} = 1$ ), *N. delicatissima* et à taux de croissance plus élevé ( $\mu \text{ j}^{-1} > 1$ ), *T. levanderi*, *S. schröderii* et *C. curvisetus*.

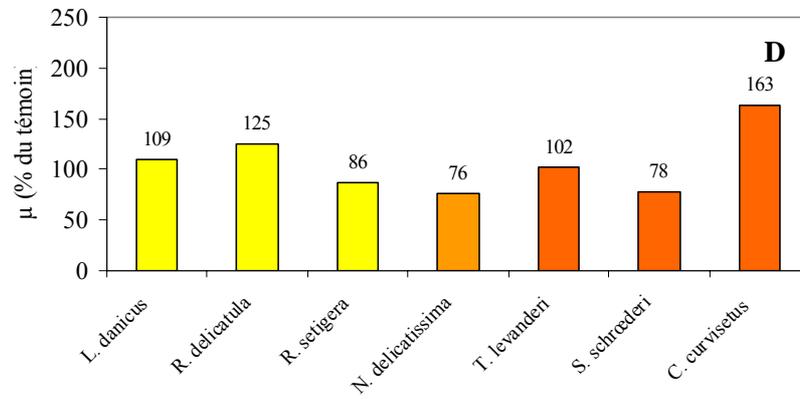
A la concentration utilisée (48 ng/L), le nicosulfuron réduit significativement le taux de croissance des diatomées à taux de croissance faible, *L. danicus* et *R. delicatula* et dans une moindre mesure celui de *R. setigera* et de *N. delicatissima* (Figure 23 A). En revanche, le nicosulfuron augmente fortement le taux de croissance des espèces à taux de croissance élevé comme celui des petites cellules de *T. levanderi* et de *C. curvisetus* mais diminue le taux de croissance des « grosses » cellules de *S. schröderii*. Le sulcotrione (129 ng/L) n'a d'effet significatif qu'en réduisant de 43 % le taux de croissance de *N. delicatissima* et en augmentant de 35 % celui de *T. levanderi* (Figure 23 B). A raison de 71 ng/L, le diméthénamide (Figure 23 C) n'agit que sur les espèces à faible taux de croissance soit en réduisant celui-ci (*R. delicatula*, *R. setigera* et *N. delicatissima*) soit en l'augmentant (*L. danicus*).



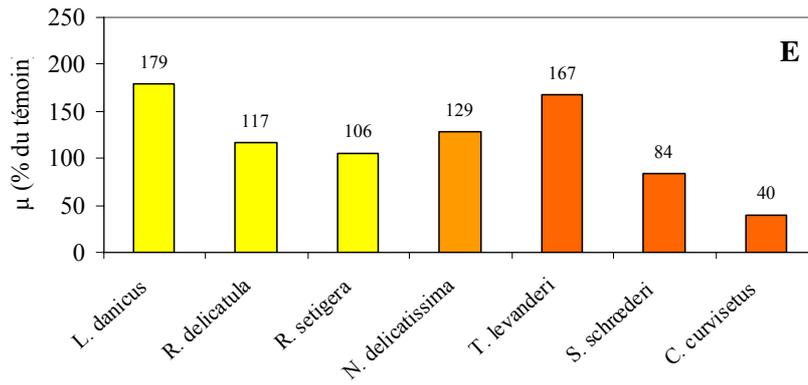
Diméthénamide

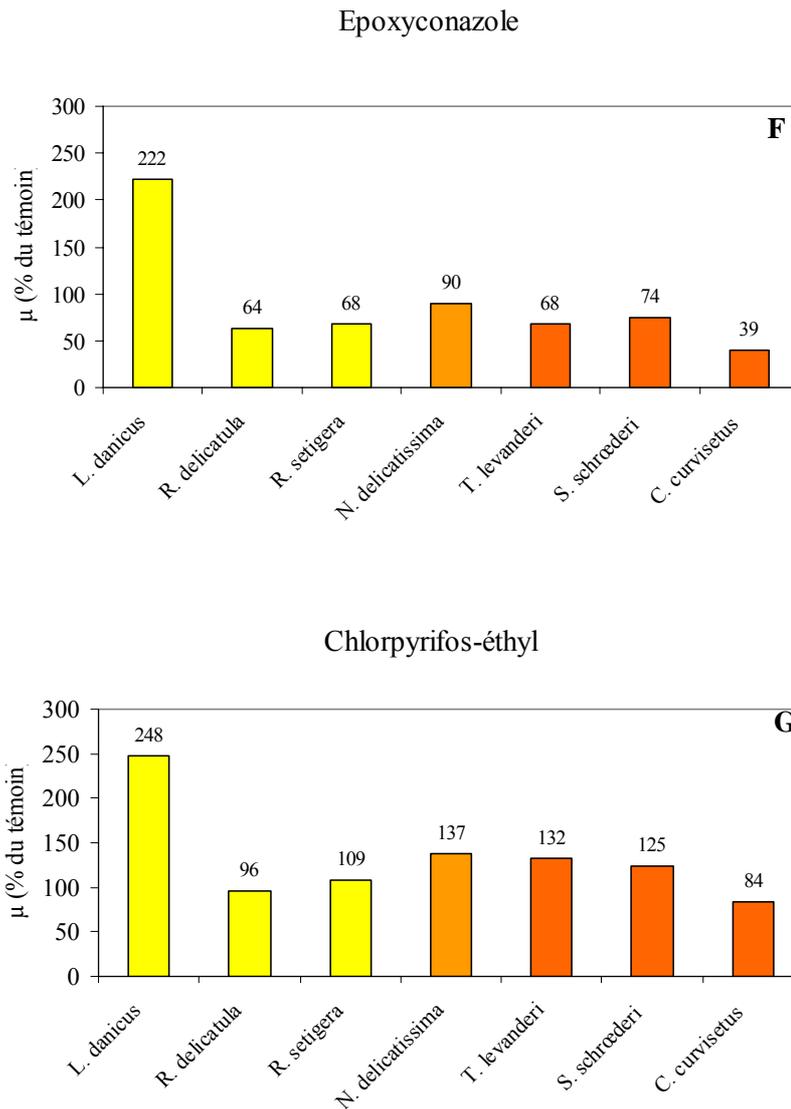


Bentazone



Bentazone+Nicosulfuron





**Figure 23 : Effet des différents pesticides sur le taux de croissance  $\mu \text{ j}^{-1}$  des principales espèces de diatomées recensées dans l'eau des Glénan**

La bentazone à cette concentration (51 ng/L) n'a que peu d'effet sur l'ensemble des diatomées à l'exception de *C. curvisetus* dont il augmente le taux de croissance de 63 % (Figure 23 D). L'action simultanée du bentazone et du nicosulfuron induit une forte augmentation du taux de croissance de *L. danicus* et de *T. levanderi* (70 à 80 %) et une forte diminution de ce taux (60 %) chez *C. curvisetus*, les autres espèces étant peu sensibles au mélange (Figure 23 E).

En résumé, l'impact des herbicides étudiés aux concentrations utilisées apparaît faible sur l'ensemble des espèces de diatomées présentes dans le milieu de référence que constituent les eaux des Glénan. L'inhibition la plus forte est observée chez *Rhizosolenia setigera* et chez *Chaetoceros curvisetus* avec, respectivement, une réduction de 70 % du taux de croissance en présence de diméthénamide et de 60 % en présence du mélange bentazone et nicosulfuron. Inversement, les plus fortes stimulations du taux de croissance sont observées chez *Leptocylindrus danicus* avec une augmentation de 80 % du taux de croissance en présence de diméthénamide et du mélange bentazone et nicosulfuron et chez *Thalassiosira levanderi* avec une augmentation de 70 % du taux en présence de

nicosulfuron et du mélange. Cette espèce n'est par ailleurs jamais inhibée quel que soit l'herbicide utilisé.

Qu'il s'agisse de l'époxiconazole ou du chlorpyrifos-éthyl, l'action de ces pesticides est particulièrement marquée chez *Leptocylindrus danicus* dont le taux de croissance est plus que doublé en leur présence. Pour les autres espèces, le fongicide entraîne une diminution sensible du taux de croissance allant de 60 % (*C. curvisetus*) à 25 % (*S. schræderii*). Seule, *Thalassiosira levanderi* paraît insensible à la présence d'époxiconazole (Figure 23 F). Le chlorpyrifos-éthyl n'a pas d'impact sur la plupart des espèces, son action lorsqu'elle est mise en évidence, allant dans le sens d'une augmentation du taux de croissance ; en effet, hormis celui de *Leptocylindrus danicus* seul le taux de croissance de *Nitzschia delicatissima* et de *Thalassiosira levanderi* est augmenté (35 %) en présence de l'insecticide (Figure 23 G)

### Densités cellulaires maximales

La densité cellulaire maximale est atteinte au 8<sup>ième</sup> jour de la culture dans le milieu témoin (voir Figure 22), Dans les milieux pollués, la densité cellulaire maximale peut être atteinte en même temps que dans le milieu témoin. Mais, sous l'action des différents pesticides, elle peut également être atteinte avant le 8<sup>ième</sup> jour (à partir du 5<sup>ième</sup> jour selon le polluant et l'espèce). Ceci explique la non synchronisation des pics de chlorophylle observés précédemment (Figure 20).

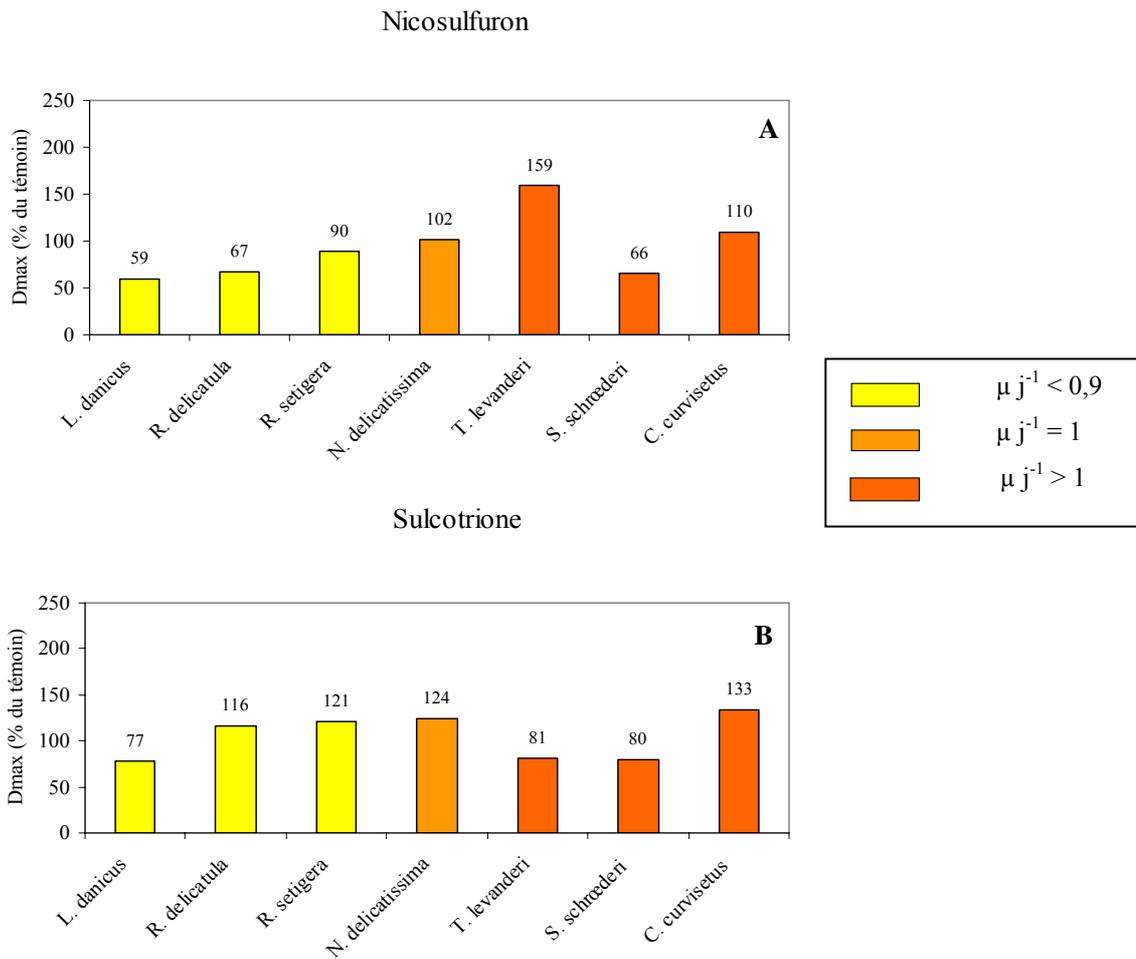
Dans cette série de tests, la densité cellulaire n'est fortement augmentée que dans le cas de *Thalassiosira levanderi* en présence de nicosulfuron et de chlorpyrifos-éthyl (Figure 24 A et G). Aucune règle générale n'émerge de ces résultats. Tout au plus, peut-on remarquer que le sulcotrione modifie peu la densité cellulaire maximale de chaque espèce (Figure 24 B) alors que l'époxiconazole induit les plus fortes réductions de biomasse (Figure 24 F). De façon générale, les variations de densités cellulaires maximales évoluent *grosso modo* de la même manière que le taux de croissance ; ainsi, quelle que soit l'espèce, le nicosulfuron modifie de la même façon taux de croissance et densité cellulaire maximale avec une diminution importante de ces deux paramètres pour *Leptocylindrus danicus*, *Rhizosolenia delicatula* et *Schræderella schræderi*. Il y a, cependant, quelques exceptions :

- *Diminution du taux de croissance et augmentation de la densité cellulaire maximale* : c'est le cas de la sulcotrione qui réduit de 40 % le taux de croissance de *Nitzschia delicatissima* alors que la densité maximale est augmentée de 25 %. On observe le même effet du diméthénamide sur *Rhizosolenia delicatula* (Figure 24 C). La bentazone agit également dans ce sens sur *N. delicatissima* et dans une moindre mesure sur *S. schræderi* (Figure 24 D).

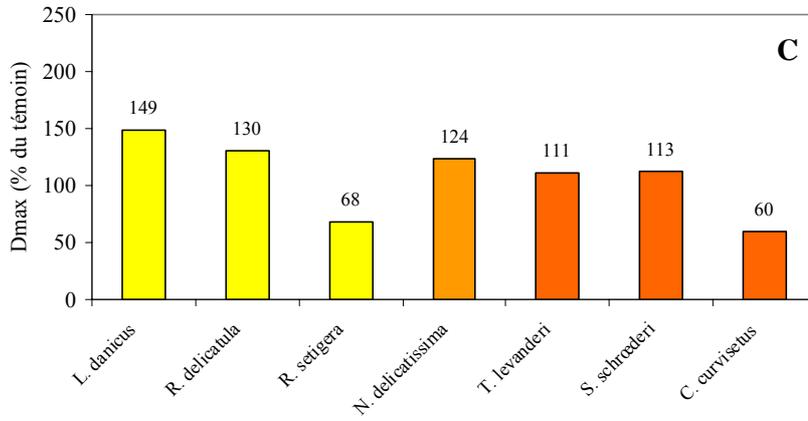
- *Augmentation du taux de croissance et diminution de la densité cellulaire maximale* : c'est le cas le plus fréquent quand les paramètres n'évoluent pas dans le même sens. Ainsi, le sulcotrione réduit de 40 % le taux de croissance de *N. delicatissima* en augmentant sa biomasse maximale de 25 %. Le diméthénamide a le même effet sur *Chaetoceros curvisetus*. Le mélange bentazone et nicosulfuron induit une augmentation du taux de croissance, parfois très élevée (80 % chez *L. danicus* et *T. levanderi*) sur toutes les espèces (Figure 24 E), à l'exception de *C. curvisetus*, tout en réduisant fortement la densité maximale (de 30 à 65 % chez *L. danicus*, *R. delicatula* et *S. schræderi*). En présence d'époxiconazole et de chlorpyrifos-éthyl, le taux de croissance de *L. danicus* est plus que doublé alors que parallèlement la densité cellulaire maximale est réduite de moitié (Figure 24 F et G).

- *Variation d'un paramètre sans modification de l'autre* : C'est le cas de l'époxiconazole qui entraîne une diminution du taux de croissance sans modification de la densité cellulaire maximale de *Rhizosolenia delicatula* et de *Chaetoceros curvisetus*. A l'inverse, le chlorpyrifos-éthyl induit peu de variation du taux de croissance (à l'exception de *L. danicus*) des espèces testées mais réduit fortement (50 à 75 %) le nombre de cellules de *R. delicatula*, *N. delicatissima* et de *S. schræderi* en fin de croissance.

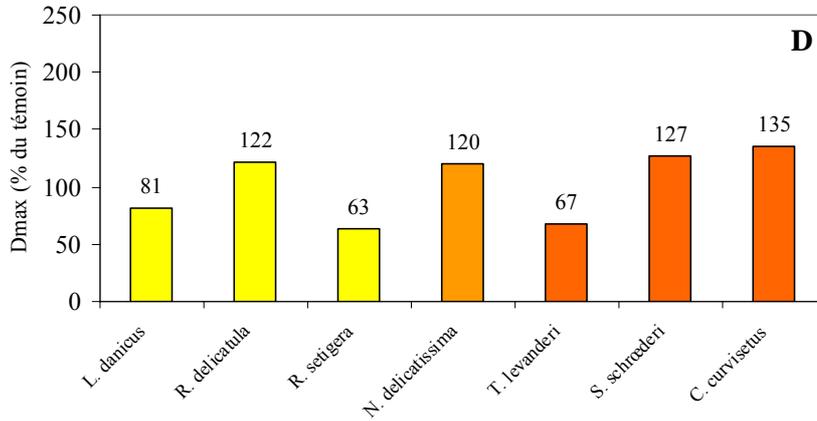
Les taux de croissance des différentes espèces phytoplanctoniques ne sont pas suffisamment différents pour que l'on puisse mettre en évidence une quelconque relation entre taux de croissance et sensibilité aux polluants.



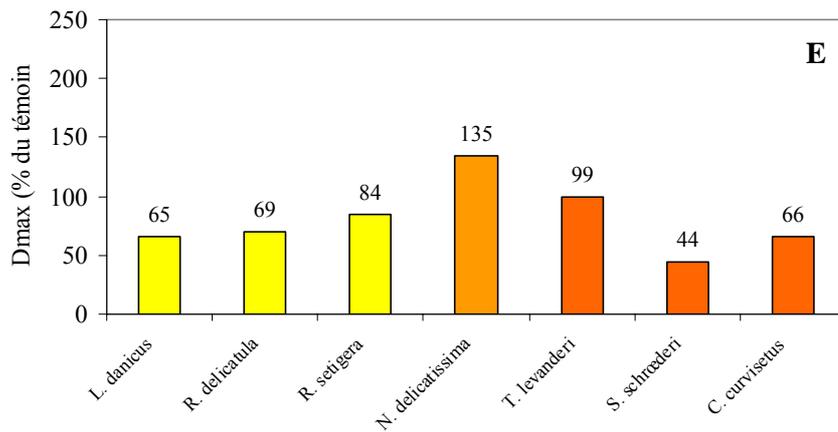
Diméthénamide

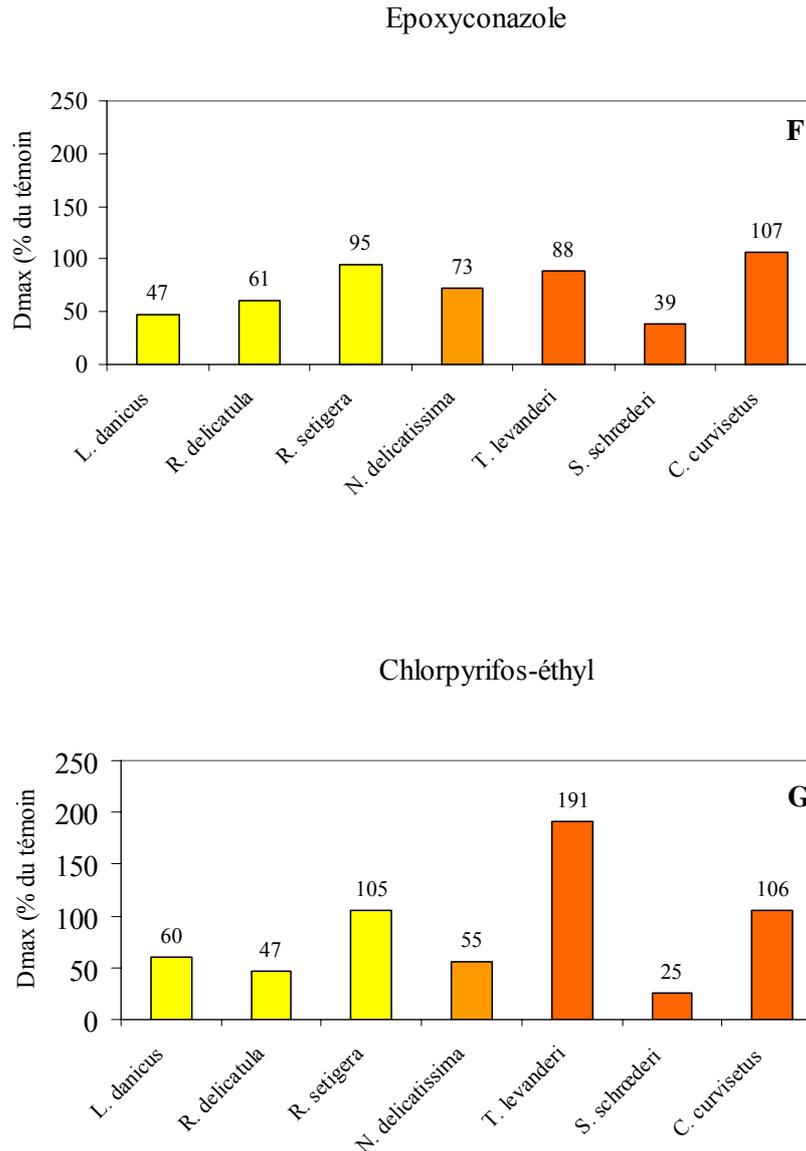


Bentazone



Bentazone+Nicosulfuron





**Figure 24 : Effet des différents pesticides sur la densité cellulaire maximale des principales espèces de diatomées recensées dans l'eau des Glénan**

Ce sont les petites cellules de diatomées comme *T. levanderi*, *N. delicatissima* et *C. curvisetus* qui sont les plus résistantes à la plupart des polluants, notamment *T. levanderi* dont au moins un des paramètres de croissance est augmenté par l'apport de pesticide à l'exception de la bentazone et de l'époxyconazole.

Parmi les plus fragiles, on trouve essentiellement *L. danicus* dont un ralentissement de croissance est observé en présence de tous les pesticides à l'exception du diméthénamide qui au contraire stimule fortement la croissance. On notera également la grande sensibilité de *S. schroederi* et de *R. delicatula* au nicosulfuron, seul ou en mélange, à l'époxyconazole et au chlorpyrifos-éthyl. Résistant à ces pesticides, *R. setigera* se distingue en étant plus particulièrement sensible aux autres polluants que sont le diméthénamide et la bentazone.

En résumé, dans cette population phytoplanctonique prélevée dans un milieu propre, les polluants les plus toxiques sont le nicosulfuron seul ou en mélange, l'époxyconazole et le chlorpyrifos-éthyl.

### 2.1.1.3.2 Estuaire du Bélon

Les prélèvements ont été effectués à la cale Nord de Bélon le 14 juin à basse mer (Coefficient de marée de 58) au moment de la renverse. L'eau était trouble et chargée de particules organiques. La température de l'eau de mer était de 19,7 °C et la salinité de 30,9. Les concentrations en sels nutritifs du milieu naturel étaient de 28,6 µmoles de N- ( $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ ), 171 µmoles de N- $\text{NH}_4^+$  et de 1,47 µmoles de P- $\text{PO}_4^{3-}$ . Ces fortes concentrations en nitrate et phosphate témoignent d'un apport terrigène. La concentration particulièrement élevée d'ammonium est anormale et correspond vraisemblablement à une forte dégradation biologique au sein de l'estuaire dont l'origine est probablement exogène.

Les cultures ont été effectuées à  $18 \pm 1^\circ\text{C}$  sous un éclairage de 110 µmoles de photons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  et une photopériode J/N de 16/8.

#### 2.1.1.3.2.1 Apport de pesticides

Les ajouts théoriques de pesticides sont identiques à ceux utilisés dans l'eau des Gléan. Les concentrations des différents pesticides ont été mesurées dans les milieux de culture avant et après la croissance du phytoplancton (Tableau 10).

On remarquera la présence de diméthénamide (3,9 ng/L) dans les eaux de l'estuaire. Toutes les concentrations mesurées sont inférieures aux concentrations théoriques (100 ng/L) mais correspondent aux ajouts effectués dans les eaux des Gléan à l'exception de l'époxiconazole dont la concentration est ici deux fois plus faible. Pour un ajout identique à celui des Gléan, la sulcotrione n'a pu être ici décelé alors que précédemment la concentration mesurée était de 129 ng/L. Par ailleurs, compte-tenu de la précision des dosages, on peut observer une bonne stabilité des produits.

**Tableau 10 : Concentrations (ng/L) des pesticides mesurées dans les différents milieux le jour de la mise en culture (J0) et après 7 jours de croissance (J7).**

Milieu : eau du Bélon	J <sub>0</sub>	J <sub>7</sub>
sans ajout (témoin)	Diméthénamide : 3,9	nd
+ nicosulfuron	46,19	51,21
+ sulcotrione	nd	nd
+ diméthénamide	73,18	65,64
+ bentazone	54,37	41,16
+ époxiconazole	67,74	75,73
+ chlorpyrifos-éthyl	nd	nd
+ nicosulfuron et bentazone	Nicosulfuron : 39,84 Bentazone : 65,81	Nicosulfuron : 38,89 Bentazone : 32,79

### 2.1.1.3.2.2 Composition phytoplanctonique

La communauté phytoplanctonique des eaux estuariennes du Bélon est constituée de nombreuses espèces de diatomées et de dinoflagellés (Tableau 11). Les diatomées sont largement majoritaires puisqu'elles représentent 85 % du phytoplancton. L'espèce dominante est une diatomée pennée, *Nitzschia delicatissima*, déjà étudiée dans les tests précédents. Elle est accompagnée de nombreuses autres diatomées pennées caractéristiques des eaux côtières. Les diatomées centriques sont représentées essentiellement par le genre *Chaetoceros* (4 espèces différentes) dont l'espèce dominante *Chaetoceros* sp. n'a pu être précisée. Une autre espèce, *Chaetoceros curvisetus* (étudiée dans les eaux des Glénan) est également abondante accompagnée de *Chaetoceros diadema* dont les cellules sont de grande taille. Peu nombreuses initialement, ces cellules se développeront abondamment au cours des cultures. On note également la présence de *Leptocylindrus danicus* et de *Rhizosolenia setigera* étudiés dans les eaux des Glénan mais au cours des bioessais suivants, aucune croissance significative ne sera observée.

Parmi, les dinoflagellés observés dans ce milieu, le petit péridinien *Peridinium steinii* est le plus abondant initialement mais seuls *Prorocentrum micans* et *Alexandrium minutum* se développeront suffisamment dans les cultures pour permettre de déterminer leurs paramètres de croissance.

L'étude de la croissance phytoplanctonique portera donc sur 4 espèces de diatomées *Chaetoceros curvisetus*, *Chaetoceros* sp., *Chaetoceros diadema* et *Nitzschia delicatissima* et sur deux dinoflagellés, *Prorocentrum micans* et *Alexandrium minutum*.

**Tableau 11 : Espèces phytoplanctoniques dénombrées dans l'eau de l'estuaire du Bélon**

<u>Diatomées</u>	cellules/L	<u>Dinoflagellés</u>	cellules/L
<u>Centrales</u>		<u>Péridiniens</u>	
<i>Chaetoceros</i> sp.	54650	<i>Peridinium steinii</i>	10400
<i>Chaetoceros curvisetus</i>	44900	<i>Prorocentrum micans</i>	7150
<i>Leptocylindrus danicus</i>	10400	<i>Alexandrium minutum</i> .	7150
<i>Rhizosolenia setigera</i> .	5800	<i>Scrippsiella trochoïdea</i>	5850
<i>Chaetoceros diadema</i>	2600	<i>Dinophysis acuminata</i>	650
Autres Centrales (2 espèces)	5800	Autres (2 espèces.)	3900
<u>Pennales</u>		<u>Gymnodinés</u>	3900
<i>Nitzschia delicatissima</i>	74170		
<i>Navicula</i> sp.	9160		
Autres Pennales (5 espèces)	17610		
<b>Total</b>	<b>212600</b>	<b>Total</b>	<b>39000</b>

### 2.1.1.3.2.3 Action des pesticides sur l'évolution des cultures

#### Evolution de la biomasse chlorophyllienne

La concentration initiale de chlorophylle est de 1 µg/L et atteint 34 µg/L dans la culture témoin. Dans ce milieu estuarien, le développement des populations phytoplanctoniques est rapide puisque le début de l'augmentation de la biomasse chlorophyllienne intervient dès le premier jour de la mise en culture (Figure 25). Dans ce milieu, un seul pic de chlorophylle est observé mais présente un décalage selon le milieu concerné. Ainsi, le maximum de biomasse est atteint au 4<sup>ème</sup> jour dans le milieu témoin mais dès le 3<sup>ème</sup> jour dans les milieux enrichis en nicosulfuron, sulcotrione, diméthénamide, époxiconazole. Seul, le milieu contenant de la bentazone présente un retard de développement puisque le maximum de chlorophylle est atteint au 5<sup>ème</sup> jour de la culture.

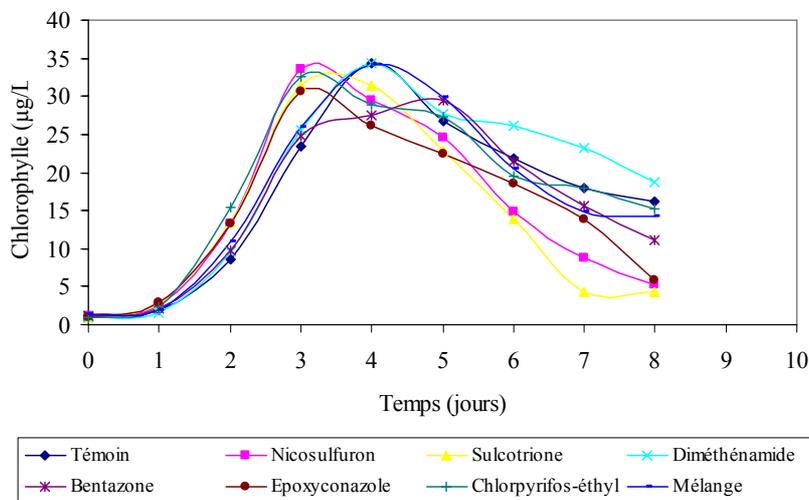


Figure 25 : Evolution de la chlorophylle dans les différents milieux (Bélon)

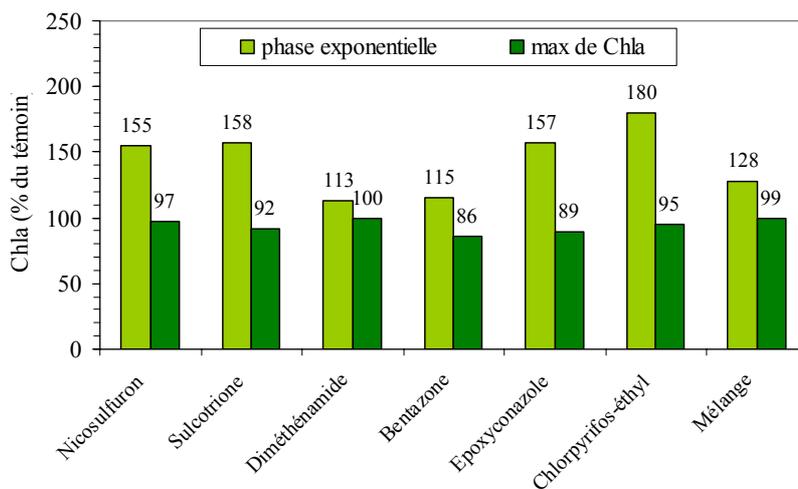


Figure 26 : Pourcentages de chlorophylle en phase exponentielle (J2) et au maximum de biomasse

Comme dans les expériences précédentes, le pourcentage de chlorophylle obtenu dans les milieux pollués par rapport au milieu témoin varie selon le stade de croissance. Au maximum du développement, les concentrations chlorophylliennes dans les milieux pollués ne sont pas significativement différentes de celle du milieu témoin (Figure 26).

En revanche, au cours de la phase exponentielle de croissance, on voit apparaître une augmentation significative (de 55 à 80 %) de la biomasse chlorophyllienne dans les milieux enrichis en nicosulfuron, sulcotrione, époxiconazole et chlorpyrifos-éthyl. Le diméthénamide et la bentazone n'ont pas d'effet sur la biomasse globale des populations que ce soit en cours ou en fin de croissance (Figure 26).

## Croissance du phytoplancton

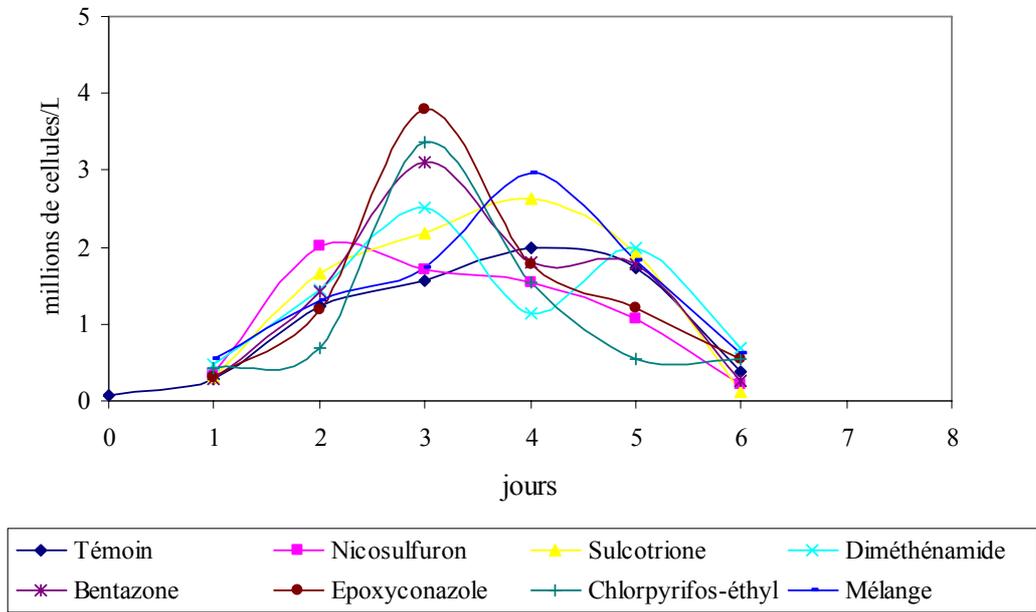
### Taux de croissance

La croissance a été suivie sur les espèces les plus abondantes c'est-à-dire en ce qui concerne les diatomées, *Nitzschia delicatissima*, *Chaetoceros curvisetus*, *Chaetoceros* sp. et *Chaetoceros diadema* ; le développement le plus significatif parmi les dinoflagellés a été observé sur *Prorocentrum micans* et *Alexandrium minutum*. Pour les quatre diatomées, la phase exponentielle débute dès le premier jour de la culture et dure 1 à 2 jours dans le milieu témoin, le maximum de cellules étant atteint au 4<sup>ième</sup> jour de la culture et au 3<sup>ième</sup> jour chez *Chaetoceros diadema* (Figure 27) ce qui induit le pic de chlorophylle observé précédemment. La croissance des dinoflagellés débute après le début du déclin des diatomées soit au 3<sup>ième</sup> jour pour *Prorocentrum micans* et au 4<sup>ième</sup> jour pour *Alexandrium minutum*.

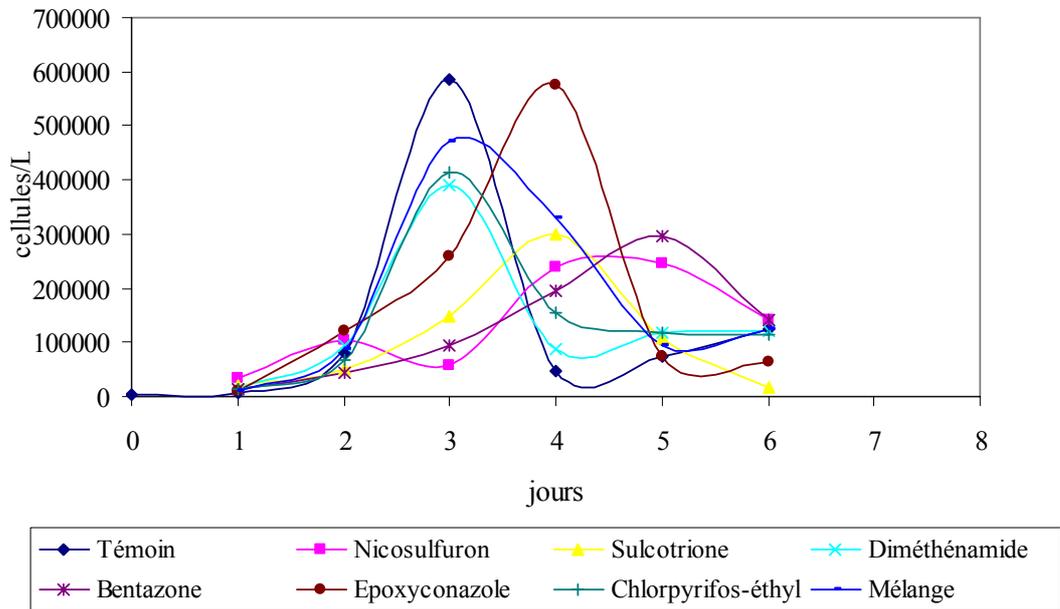
Le taux de croissance des diatomées varie de 1,32 pour *C. curvisetus* à 2,74 pour *C. diadema* (Tableau 12). Le taux de croissance de *C. curvisetus* est voisin de celui mesuré chez cette espèce dans les eaux des Glénan alors que celui de *N. delicatissima* ( $\mu j^{-1} = 1,42$ ) est ici un peu supérieur ( $\mu j^{-1} = 1,06$  aux Glénan). Comme précédemment, les résultats seront regroupés par valeur du taux de croissance du témoin soit d'une part, les diatomées dont le taux de croissance est voisin de 1,4 (*C. curvisetus*, *Chaetoceros* sp. et *N. delicatissima*) soit, par opposition *C. diadema* à fort taux de croissance ( $\mu j^{-1} = 2,7$ ).

Le taux de croissance des deux dinoflagellés est élevé que ce soit pour *P. micans* ( $\mu j^{-1} = 1,07$ ) ou notamment pour *A. minutum* ( $\mu j^{-1} = 0,91$ ) dont le taux de croissance était de 0,36 en rivière de Penzé (Videau, 2003).

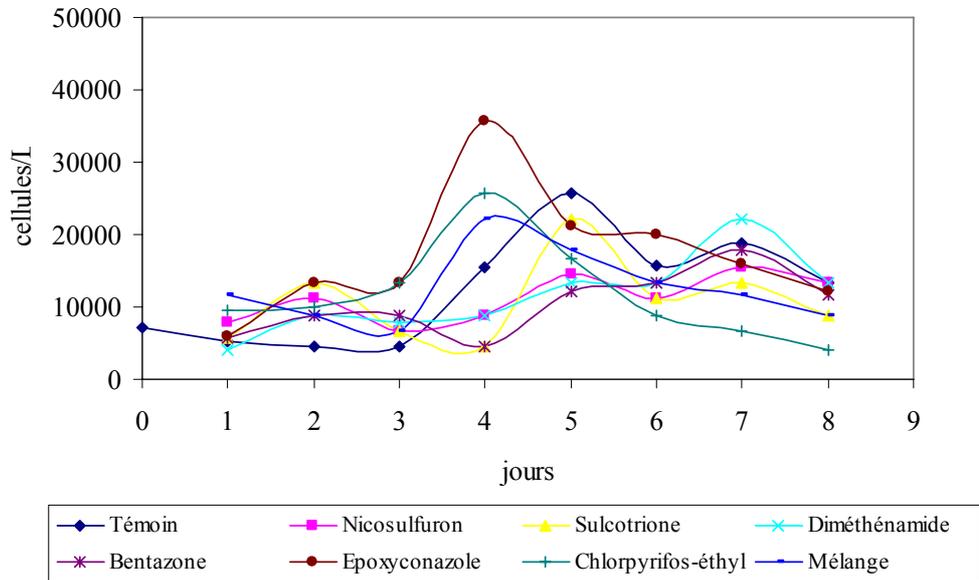
*Nitzschia delicatissima*



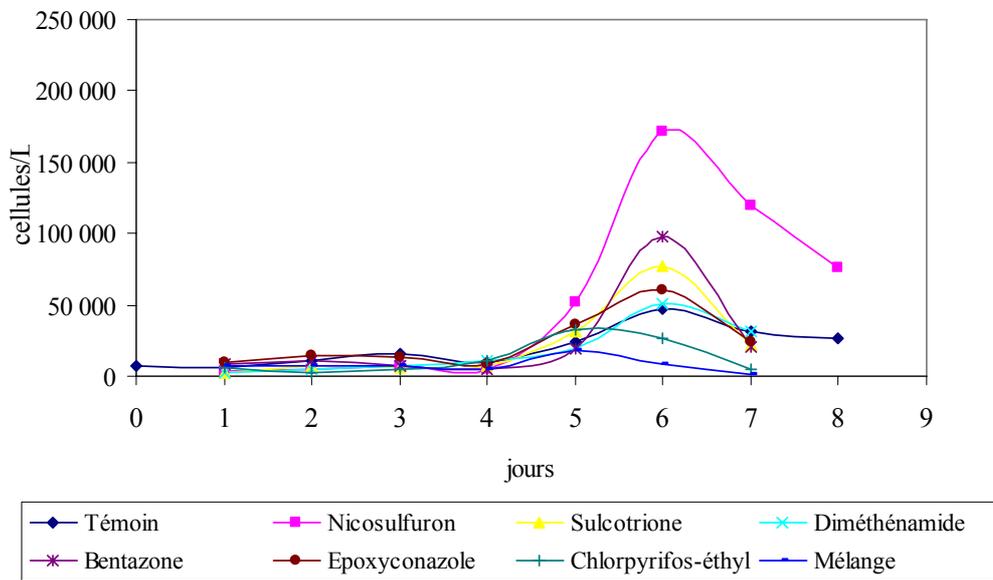
*Chaetoceros diadema*



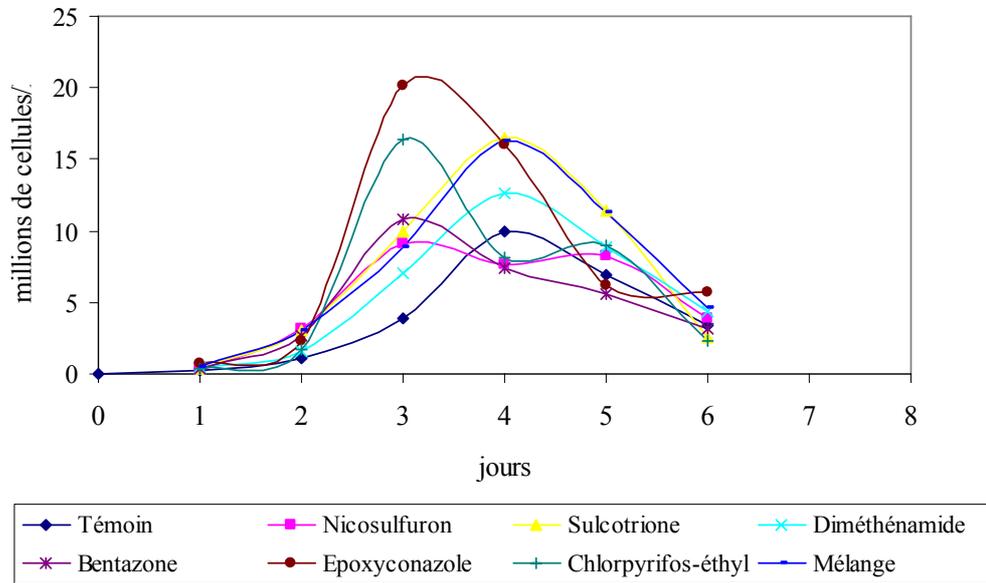
*Prorocentrum micans*



*Alexandrium minutum*



*Chaetoceros curvisetus*



*Chaetoceros sp.*

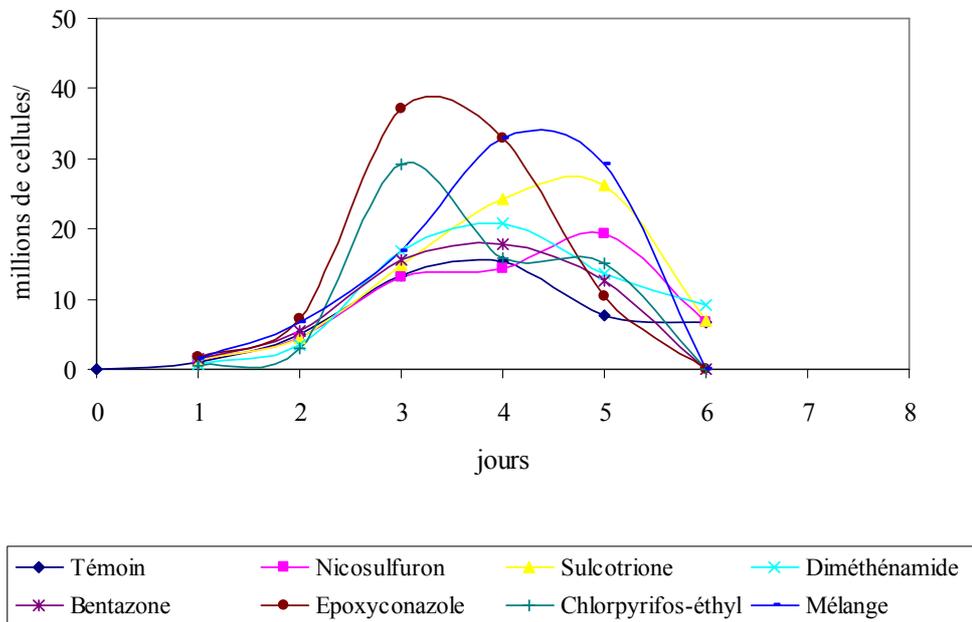


Figure 27 : Courbes de croissance des différentes espèces de phytoplancton

L'action des pesticides sur le taux de croissance des différentes espèces testées est comme précédemment exprimée en pourcentage de leur taux respectif par rapport au taux de croissance des témoins.

**Tableau 12 : taux de croissance  $\mu j^{-1}$  des espèces phytoplanctoniques dans le milieu témoin de l'estuaire du Bélon**

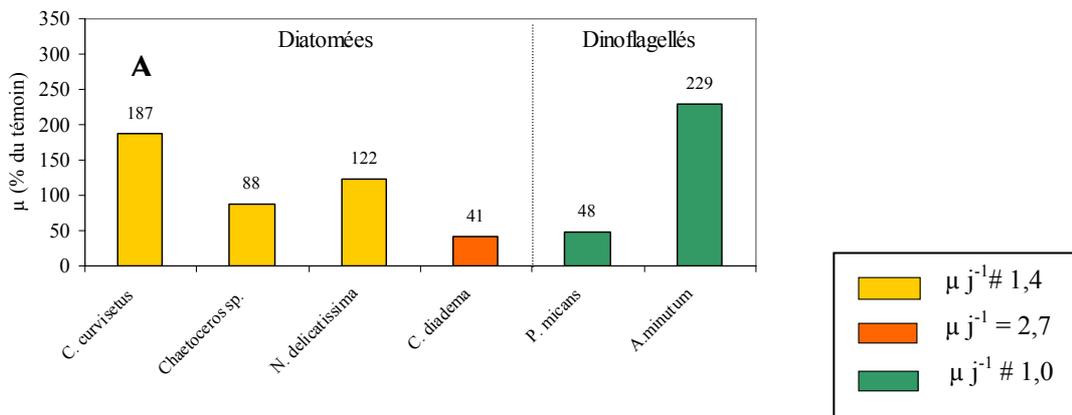
<u>Diatomées</u>	$\mu j^{-1}$	<u>Dinoflagellés</u>	$\mu j^{-1}$
<i>Chaetoceros curvisetus</i>	1,32	<i>Alexandrium minutum</i>	0,91
<i>Chaetoceros</i> sp.	1,52	<i>Prorocentrum micans</i>	1,07
<i>Nitzschia delicatissima</i>	1,42		
<i>Chaetoceros diadema</i>	2,74		

Action des herbicides

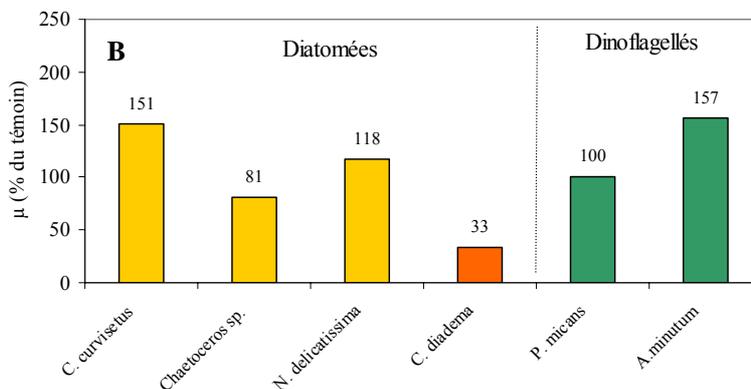
*Diatomées*

L'apport de nicosulfuron et de sulcotrione entraîne une forte augmentation du taux de croissance (87 % et 51 %, respectivement) de *Chaetoceros curvisetus*, espèce à faible taux de croissance alors qu'il réduit d'autant le taux de croissance de *Chaetoceros diadema* (59 % et 67 %, respectivement), espèce à taux de croissance élevé (Figure 28 A et B)). Seules *Chaetoceros* sp. et *Nitzschia delicatissima* ne sont que faiblement affectées par ces apports.

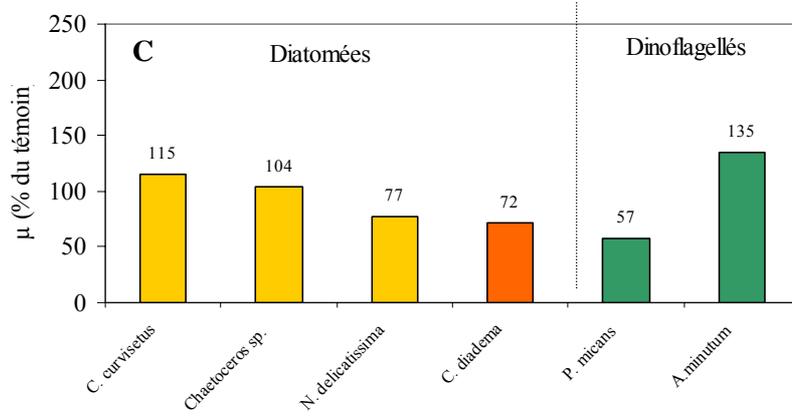
Nicosulfuron



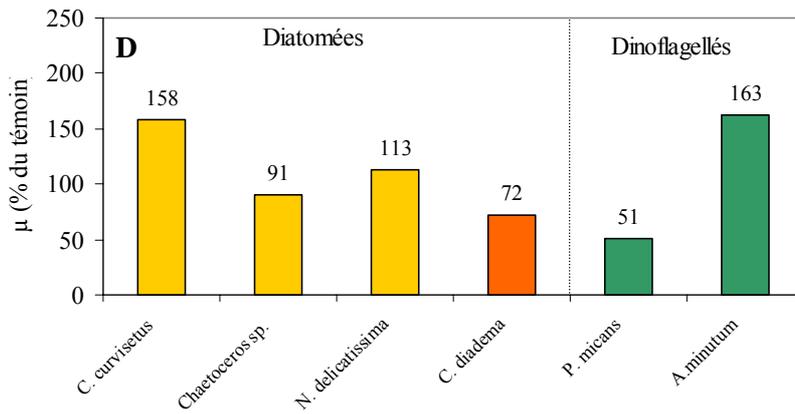
Sulcotrione



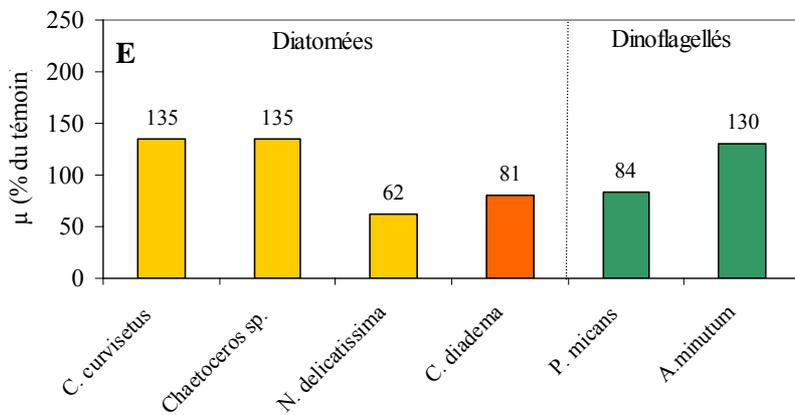
Diméthénamide

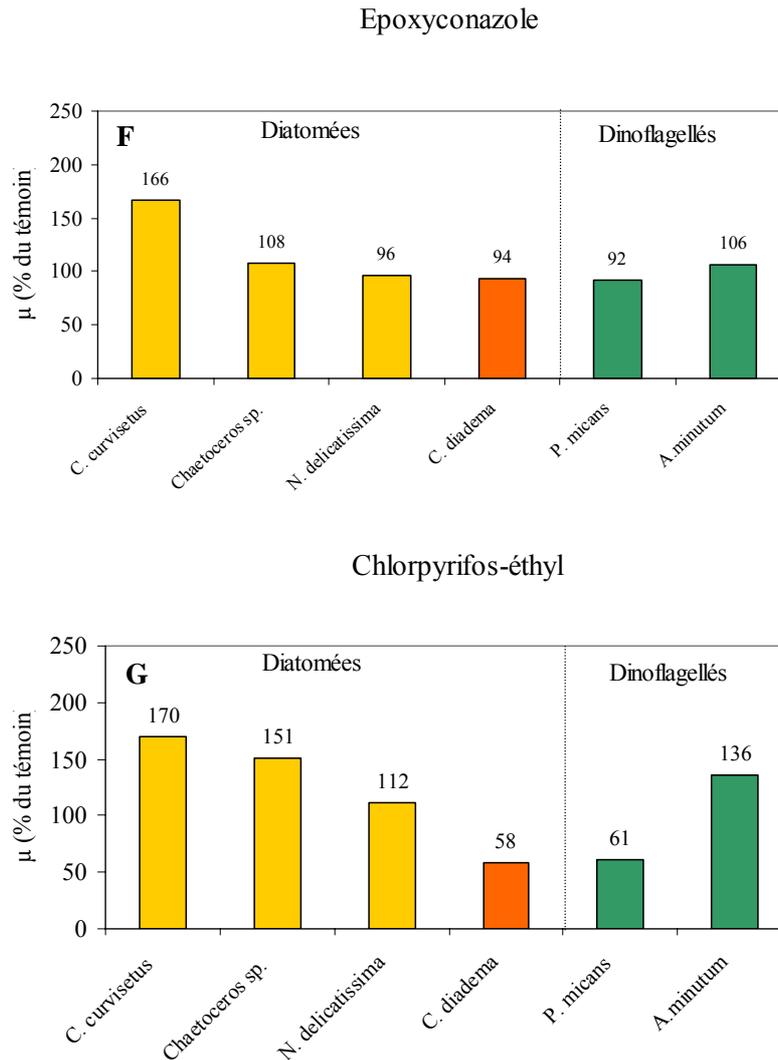


Bentazone



Bentazone+Nicosulfuron





**Figure 28 : Effet des différents pesticides sur le taux de croissance  $\mu$ J-1 des principales espèces recensées dans la rivière de Belon**

L'action du diméthénamide est moins marquée puisque l'on n'observe une légère diminution du taux de croissance (25 % environ) que chez *N. delicatissima* et *C. diadema* (Figure 28 C) On retrouve avec la bentazone une action similaire bien qu'atténuée à celle du nicosulfuron et du sulcotrione avec une augmentation de croissance chez *C. curvisetus* (58 %) et une diminution (28 %) chez *C. diadema* (Figure 28 D). Bien que nicosulfuron et bentazone agissent dans le même sens sur les diatomées, on n'observe pas d'action synergique hormis chez *N. delicatissima* dont le taux de croissance diminue de 38 % (Figure 28 E).

### Dinoflagellés

Le taux de croissance de *Prorocentrum micans* est fortement réduit en présence de nicosulfuron. Comme chez les diatomées, on n'observe pas d'action synergique en présence du mélange nicosulfuron et bentazone puisque le taux de croissance n'est pas réduit significativement (16 %).

Chez *Alexandrium minutum*, tous les herbicides induisent une augmentation du taux de croissance. Cette augmentation est plus ou moins élevée selon l'herbicide considéré : l'action

la plus stimulatrice est celle du nicosulfuron (+ 129 %), du sulcotrione (+ 57 %) et de la bentazone (+ 63 %). Le diméthénamide et le mélange agissent moins fortement (+ 30 à 35 %).

### Action des autres pesticides

#### *Diatomées*

L'époxiconazole ne modifie que le taux de croissance de *C. curvisetus* qui est augmenté de 66 %. En revanche, quand les diatomées sont soumises à un apport de chlorpyrifos-éthyl, on observe nettement une augmentation de la division cellulaire chez les espèces à faible taux de croissance (70 % chez *C. curvisetus* ; 51 % chez *Chaetoceros* sp.) alors que la croissance est fortement ralentie chez *C. diadema* (- 42 %) (Figure 28).

#### *Dinoflagellés*

Comme chez les diatomées, l'époxiconazole n'a pas d'effet sur les dinoflagellés testés. Le chlorpyrifos-éthyl entraîne une forte diminution du taux de croissance de *P. micans*. Que ce soit en présence de l'insecticide comme des herbicides, le taux de croissance d'*A. minutum* est augmenté (+ 36 %) (Figure 28).

### **Densité cellulaire maximale**

#### *Diatomées*

Les diatomées à faible taux de croissance atteignent des densités maximales très élevées. Ainsi, dans les cultures témoins, la densité maximale est voisine de  $10 \cdot 10^6$  cellules/L pour *C. curvisetus* et de  $15 \cdot 10^6$  cellules/L pour *Chaetoceros* sp. (Figure 27 et Figure 29). Les densités maximales de *N. delicatissima* et de *C. diadema* sont plus faibles ( $2 \cdot 10^6$  cellules/L et  $6 \cdot 10^5$  cellules/L, respectivement). Dans le milieu non contaminé, le pic de cellules est atteint au 4<sup>ème</sup> jour de la culture pour *C. curvisetus*, *Chaetoceros* sp. et *N. delicatissima* et plus précocement, au 3<sup>ème</sup> jour, pour *C. diadema* au taux de croissance plus élevé.

### Action des herbicides

L'apport d'herbicides peut modifier la date d'apparition du pic (Figure 27) :

- en l'avancant : c'est le cas du nicosulfuron et de la bentazone pour *C. curvisetus*, de ces mêmes molécules ainsi que du diméthénamide pour *N. delicatissima*, de tous les herbicides sauf le diméthénamide pour *C. diadema*. Le chlorpyrifos-éthyl et l'époxiconazole accélèrent l'apparition du pic de cellules de *C. curvisetus*, *Chaetoceros* sp. et de *N. delicatissima*.
- ou en le retardant : l'apport de nicosulfuron et de sulcotrione retarde l'apparition du pic de cellules de *Chaetoceros* sp. et de *C. diadema*. Pour *C. diadema*, la date d'apparition du maximum de cellules n'est pas modifiée en présence de chlorpyrifos-éthyl mais est retardée d'un jour en présence d'époxiconazole.

Une augmentation de la densité cellulaire maximale est observée en présence de sulcotrione chez *C. curvisetus* (+ 65 %) et à un moindre degré chez *N. delicatissima* (+ 32 %) (Figure 29 B). Le mélange nicosulfuron et bentazone entraîne également une augmentation plus importante du nombre de cellules de *C. curvisetus* (+ 64 %), de *Chaetoceros* sp. (+ 115

%) et de *N. delicatissima* (+ 48 %). La densité cellulaire ne diminue significativement que chez *C. diadema* quel que soit l'herbicide considéré. Seul le mélange a peu d'effet sur la densité maximale de cette espèce (Figure 29 E).

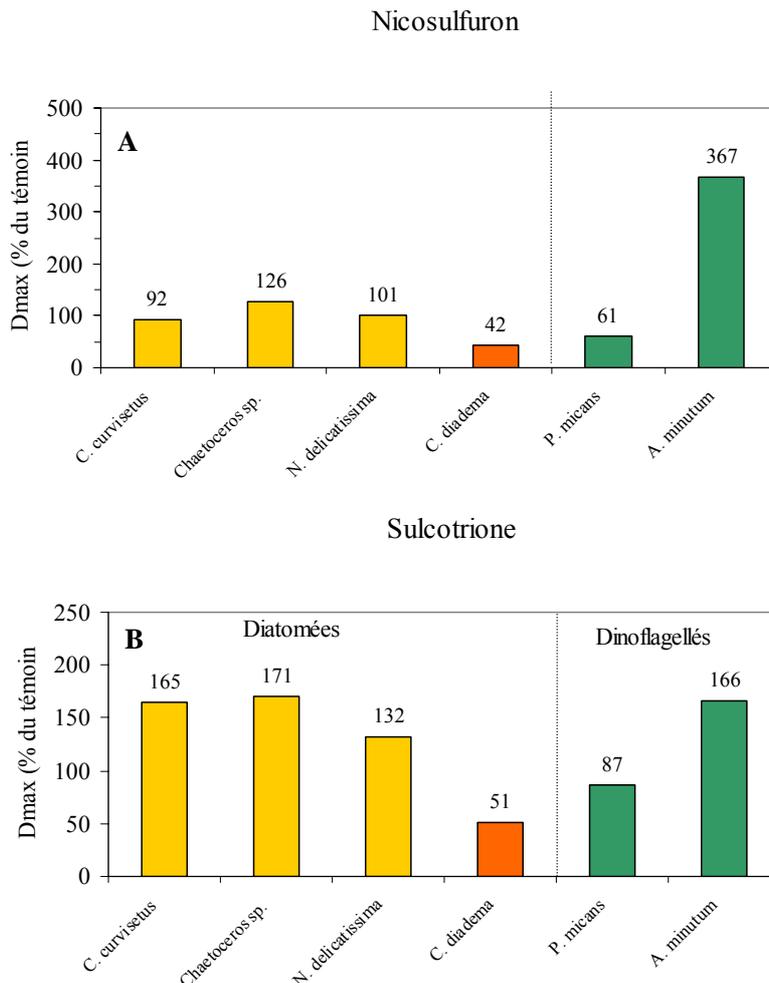
L'impact des herbicides sur le maximum de cellules obtenues peut être identique à celui observé sur le taux de croissance :

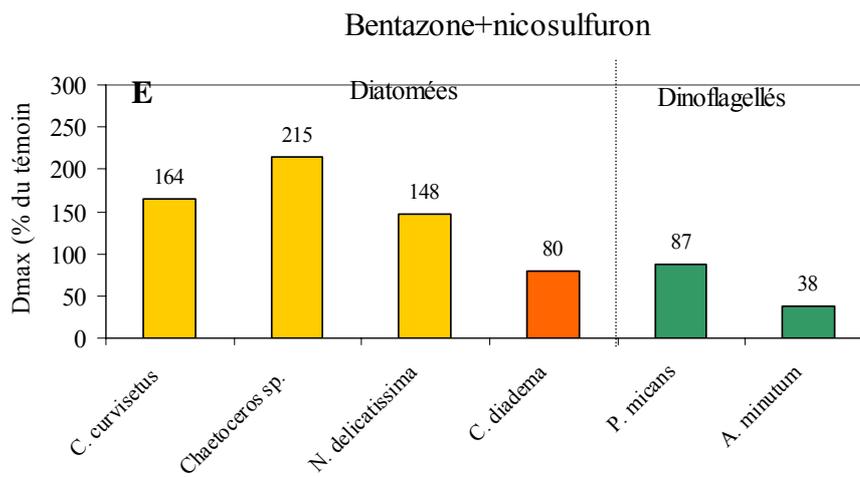
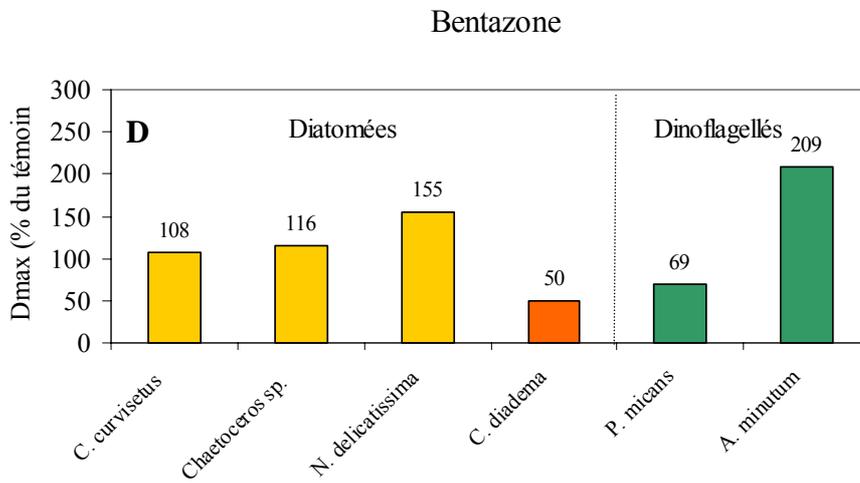
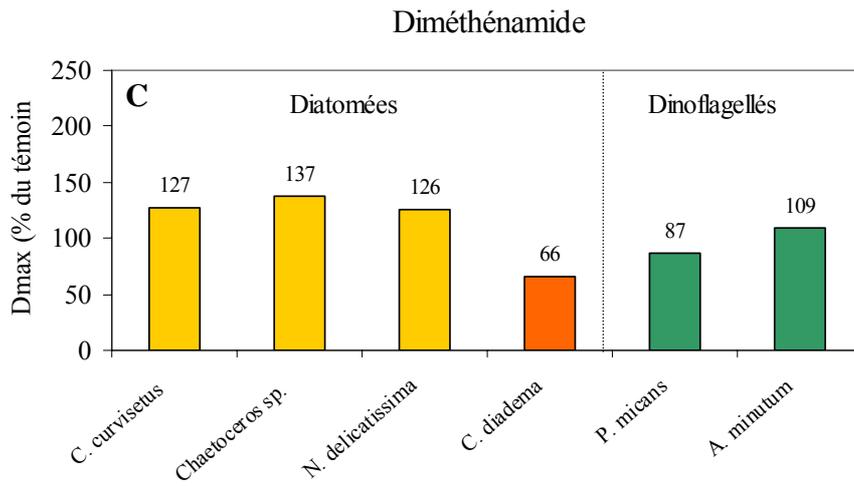
- soit il n'y a pas de variation des deux paramètres par rapport au témoin. C'est le cas de *Chaetoceros sp.* en présence de diméthénamide et de bentazone et de *N. delicatissima* en présence de nicosulfuron et de bentazone. Ces algues seront donc considérées comme insensibles à ces polluants.

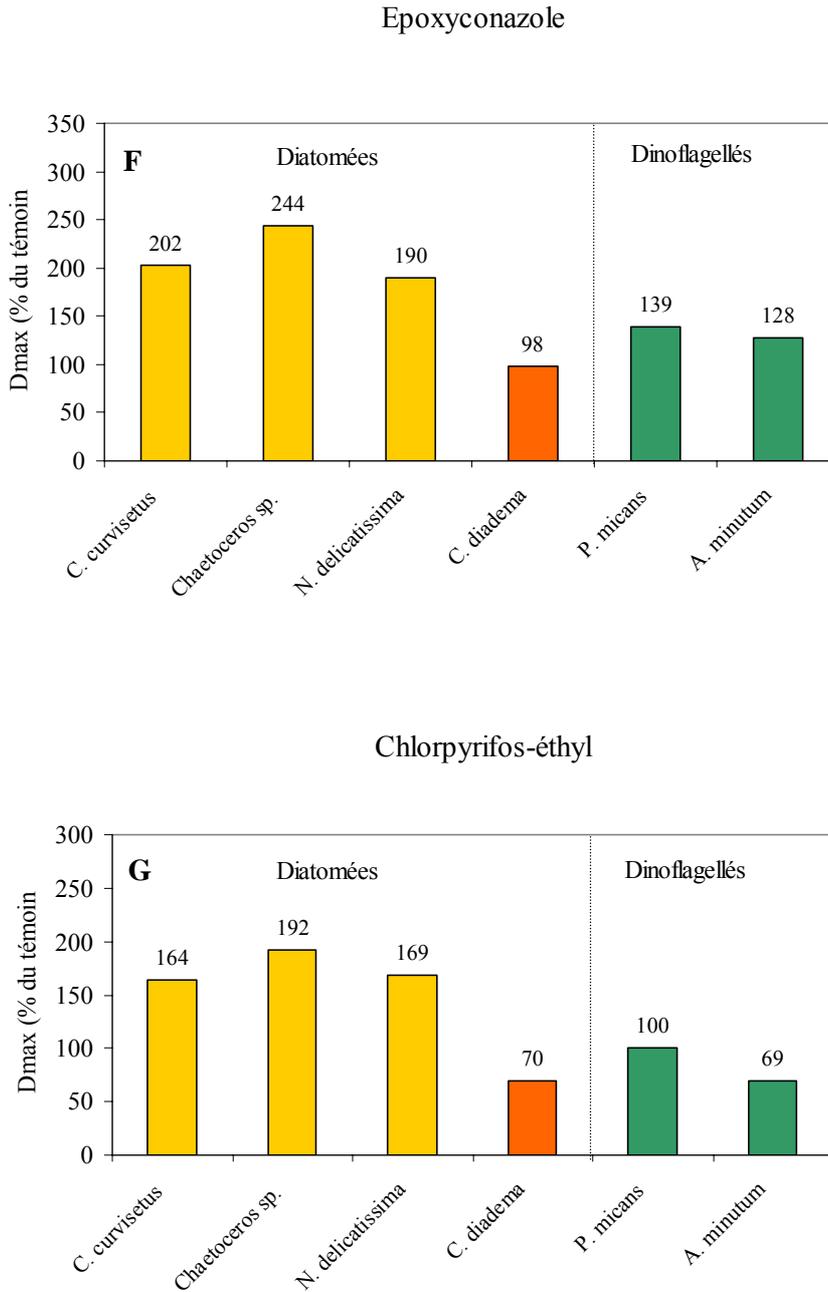
- soit il y a une diminution simultanée des deux paramètres. C'est le cas pour *C. diadema* dont taux de croissance et densité cellulaire maximale sont fortement réduits en présence de nicosulfuron, sulcotrione et bentazone (- 58 %, - 49 % et - 50 %, respectivement) et à un moindre degré par le diméthénamide et le mélange (- 34 % et - 20 %, respectivement). Cette espèce apparaît donc particulièrement sensible à l'ensemble des herbicides testés.

- soit il y a une augmentation simultanée des deux paramètres de croissance. Cet effet est observé pour *C. curvisetus* et à un moindre degré *N. delicatissima* après apport de sulcotrione, pour *C. curvisetus* et *Chaetoceros sp.* en présence du mélange nicosulfuron et bentazone. Il y a donc clairement une stimulation de la croissance de ces espèces en présence de ces herbicides.

On notera un seul cas, celui de *N. delicatissima* après apport du mélange, où le taux de croissance diminue et la densité cellulaire augmente (+ 48 %) (Figure 29 E).







**Figure 29 : Effet des pesticides sur la densité cellulaire maximale des différentes espèces de phytoplancton**

#### Action des autres pesticides

Alors que l'époxyconazole n'augmente que le taux de croissance de *C. curvisetus*, il augmente fortement la densité cellulaire non seulement de cette espèce (+ 102 %) mais aussi de *Chaetoceros sp.* (+ 144 %) et de *N. delicatissima* (+ 90 %). Seule *C. diadema* n'est pas affectée par le fongicide (Figure 29 F).

Par ailleurs, le chlorpyrifos-éthyl augmente fortement la densité maximale de *C. curvisetus* (+ 64 %) et de *Chaetoceros sp.* (+ 92 %), mais il diminue celle de *C. diadema* (- 30 %) parallèlement, dans les deux cas, aux taux de croissance, L'effet de l'insecticide sur *N. delicatissima* se traduit par une forte augmentation du nombre de cellules (+ 70 %) alors que le taux de croissance reste voisin de celui du témoin (Figure 29 G).

### *Dinoflagellés*

Chez *Prorocentrum micans*, la densité cellulaire maximale est atteinte au 5<sup>ème</sup> jour de la culture dans le milieu témoin ainsi que dans le milieu dopé en sulcotrione (voir Figure 27). En raison du raccourcissement de la phase exponentielle, l'apparition des pics cellulaires est plus précoce (4<sup>ème</sup> jour) dans la culture contenant le mélange nicosulfuron et bentazone ainsi que dans les milieux contenant de l'époxiconazole et du chlorpyrifos-éthyl. Inversement, on observe un retard de croissance dans les milieux enrichis en bentazone et en diméthénamide.

La croissance d'*Alexandrium minutum* présentant une phase de latence prolongée, le maximum de cellules est atteint au 6<sup>ème</sup> jour seulement de la mise en culture que ce soit chez le témoin ou dans la plupart des milieux pollués ; seuls les milieux contenant du chlorpyrifos-éthyl et le mélange, où le développement de cette espèce est particulièrement limité, présentent de faibles pics plus précoces.

#### Action des herbicides

La réponse des deux dinoflagellés étudiés apparaît contrastée. Chez *P. micans*, l'apport séparé de nicosulfuron et de bentazone entraîne une réduction de croissance qui se traduit par une diminution simultanée des deux paramètres, taux de croissance et densité maximale (Figure 28 et Figure 29).

En revanche, l'apport simultané de ces deux herbicides modifie peu ces paramètres. Il en est de même pour le sulcotrione. Si le diméthénamide réduit fortement le taux de croissance, en finale la densité cellulaire de cette espèce est peu affectée.

Alors que les herbicides quand ils agissent tendent à réduire la croissance de *P. micans*, leur action sur *A. minutum* se traduit toujours par une augmentation plus ou moins élevée du nombre de ses cellules selon l'herbicide testé. L'effet du nicosulfuron est particulièrement spectaculaire puisque non seulement il triple le taux de croissance mais il induit également une densité cellulaire maximale 4 fois plus élevée que celle du témoin (Figure 29 A). A un degré moindre, sulcotrione et bentazone agissent également dans ce sens en doublant taux de croissance et densité cellulaire maximale. Comme pour *P. micans*, le diméthénamide n'a pas d'action sur la croissance d'*A. minutum*. En revanche, sur cette espèce, la seule diminution de densité cellulaire est observée en présence du mélange qui réduit de 60 %, le nombre de cellules en fin de culture alors que le taux de croissance augmente.

#### Autres pesticides

Si l'époxiconazole ne modifie pas le taux de croissance des deux dinoflagellés, il tend à en augmenter la biomasse finale puisque dans les deux cas, la densité cellulaire maximale est augmentée d'environ 30 % (Figure 29 F). Le chlorpyrifos-éthyl a un effet opposé sur la croissance des deux dinoflagellés. Chez *P. micans*, il diminue le taux de croissance sans augmenter le nombre de cellules en fin de culture alors qu'il augmente le taux de croissance d'*A. minutum* tout en diminuant la biomasse finale (Figure 29 G).

#### **2.1.1.3.3 Discussion**

Les concentrations de nicosulfuron, de diméthénamide et de bentazone utilisées dans les deux séries de tests sont identiques ; les résultats obtenus seront donc tout à fait comparables. La sulcotrione n'a pu être dosée que dans le milieu provenant des Glénan (129 ng/L) ; l'ajout fait dans l'eau de l'estuaire du Bélon a été réalisé avec le même volume de solution-mère ; on

considérera que la concentration en sulcotrione est identique dans les deux milieux. Les concentrations d'époxiconazole mesurées dans les deux cultures varient du simple au double (115 et 68 ng/L dans l'eau des Glénan et de l'estuaire, respectivement). Ces valeurs seront prises en compte dans les résultats. Bien que le chlorpyrifos-éthyl n'ait pas été dosé dans les suspensions algales, il est clair qu'il y a un effet marqué. Un volume identique de la même solution-mère, que celle utilisée en 2003, a été ajouté dans chacune des cultures. On peut supposer que l'ajout effectué est comparable à celui de 2003, c'est-à-dire voisin de 40 ng/L.

Les deux communautés phytoplanctoniques observées dans le cadre de cette étude sont composées d'espèces de diatomées et de dinoflagellés qui diffèrent essentiellement par leur densité cellulaire. Dans les comparaisons des fractions témoin et traitées de chaque site on observe des évolutions très différentes. En effet, les eaux du large prélevées aux Glénan en mai sont épuisées en sels nutritifs après le développement des diatomées printanières et ne peuvent soutenir la croissance des diatomées présentes. La communauté phytoplanctonique est bien diversifiée mais le nombre de cellules de chaque espèce est faible ce qui induit une faible biomasse chlorophyllienne. Inversement, dans l'estuaire du Bélon, les eaux sont enrichies en azote (notamment en ammonium) et en phosphore ce qui permet une croissance phytoplanctonique active. Cette différence nutritionnelle se traduit par une différence physiologique qui se reflète dans l'évolution de la biomasse chlorophyllienne, lente dans les eaux des Glénan, rapide dans les eaux de l'estuaire. Toutefois, l'impact des pesticides sur les variations de la biomasse chlorophyllienne apparaît identique sur les deux communautés au cours de la phase exponentielle : dans les deux cas, il y a augmentation de la biomasse (de 30 à 80 %) en présence de chacun des pesticides à l'exception du diméthénamide et de la bentazone qui modifient peu la concentration en chlorophylle du milieu. En revanche, en fin de croissance, si la biomasse chlorophyllienne maximale apparaît peu affectée dans le milieu estuarien, elle peut être fortement réduite dans les eaux des Glénan, notamment par l'époxiconazole et le chlorpyrifos-éthyl. En ce qui concerne ces deux pesticides, leur action se traduit par une forte diminution des densités cellulaires finales de presque toutes les diatomées testées dans l'eau océanique; inversement, ils induisent une forte augmentation du nombre final des diatomées dans l'estuaire. C'est la différence la plus visible dans les réponses des deux types de communautés. Ces essais de type qualitatif ont été complétés par des tests quantitatifs *in situ* (4-6 répliquats en microcosmes). Dans cette expérimentation le comptage et la détermination d'espèces ont été remplacés par des analyses (pigments (HPLC), empreinte moléculaire (TTGE) et cellules (cytométrie de flux). (cf. chapitre 2.3-).

Cette nouvelle série de bioessais montre une fois encore l'extrême diversité de réponse du phytoplancton selon l'espèce et le pesticide utilisé. Comme nous l'avions suggéré précédemment (Videau, 2003), le critère de choix du paramètre de croissance, taux de croissance et/ou densité cellulaire maximale, définira l'impact des polluants sur le développement d'une espèce phytoplanctonique. *A priori*, le taux de croissance de l'espèce semble le plus approprié pour déterminer cet impact. En effet, on peut considérer que dans le milieu naturel, les cellules phytoplanctoniques entraînées par les courants se trouveront entraînées, progressivement par effet de dilution, dans un milieu de moins en moins contaminé. Les cellules survivantes seront alors aptes à reprendre leur croissance normale si l'environnement physico-chimique est convenable. Le taux de croissance de l'espèce définit alors au mieux l'impact du polluant à court terme sur cette espèce. Mais, on peut aussi supposer, que par le jeu des courants de marée montant et descendant, notamment en période de morte-eau, ces mêmes cellules se trouvent « bloquées » dans le milieu pollué auquel cas, la variation du taux de croissance mais aussi de leur biomasse finale devra être prise en compte.



l'espèce est considérée comme insensible au polluant testé (en bleu). Enfin, il arrive que l'un des deux paramètres ne varie pas ou que les deux paramètres varient en sens inverse (nom de l'espèce en noir) : les effets à court et à long terme seront alors différents. En outre, l'origine des espèces phytoplanctoniques est désignée par une représentation différente : les populations provenant de l'eau des Glénan sont mentionnées sans surlignage ; celles récoltées dans l'estuaire du Bélon sont surlignées en jaune. Sont soulignées les espèces identiques (*Nitzschia delicatissima* et *Chaetoceros curvisetus*) qui, quoique d'origine différente, répondent de la même façon à l'apport de polluant.

**Tableau 14: Récapitulatif de l'impact des pesticides sur la densité cellulaire maximale Dmx de différentes espèces de phytoplancton naturel.**

	Nicosulfuron (42-46 ng/L)	Sulcotrione (129 ng/L)	Diméthénamide (71-73 ng/L)	Bentazone (51-54 ng/L)	Nicosulfuron + bentazone	Epoxyconazole (115-68 ng/L)	Chlorpyrifos- éthyl (36 ng/L)
<u>Dmx</u> augmente	<i>T.levanderi</i> <i>Chaetoceros</i>         <i>A.minutum</i>	<i>C.curvisetus</i> <i>N.delicatissima</i>    <i>N.delicatissima</i> <i>Chaetoceros</i>  <i>A.minutum</i>	<i>L.danicus</i> <i>C. curvisetus</i>  <i>R.delicatula</i> <i>N. delicatissima</i> <i>Chaetoceros</i>	<i>R.delicatula</i> <i>C.curvisetus</i> <i>N.delicatissima</i>  <i>N.delicatissima</i> <i>S. schröderii</i>  <i>A.minutum</i>	<i>N.delicatissima</i> <i>C.curvisetus</i> <i>Chaetoceros</i>  <i>R.setigera</i>   <i>P. micans</i>	<i>C. curvisetus</i>     <i>N.delicatissima</i> <i>Chaetoceros</i> <i>P. micans</i> <i>A.minutum</i>	<i>T. levanderi</i> <i>C. curvisetus</i> <i>Chaetoceros</i> <i>N.delicatissima</i>
<u>Dmx</u> diminue	<i>L.danicus</i> <i>R.delicatula</i> <i>S.schröderii</i> <i>C.diadema</i>     <i>P.micans</i>	<i>C.diadema</i> <i>L.danicus</i>	<i>R.setigera</i> <i>C.diadema</i> <i>C. curvisetus</i>	<i>R. setigera</i> <i>C. diadema</i> <i>T.levanderi</i>     <i>P. micans</i>	<i>C. curvisetus</i> <i>C. diadema</i> <i>L.danicus</i> <i>R. delicatula</i> <i>S.schröderii</i>   <i>A.minutum</i>	<i>R.delicatula</i> <i>T. levanderi</i> <i>S.schröderii</i> <i>L. danicus</i> <i>N. delicatissima</i>	<i>C. diadema</i> <i>L. danicus</i> <i>R.delicatula</i> <i>N. delicatissima</i> <i>S.schröderii</i>   <i>A.minutum</i>
Dmx varie peu ou pas du tout	<i>N. delicatissima</i> <i>R. setigera</i> <i>C. curvisetus</i>	<i>R. delicatula</i> <i>S. schröderii</i> <i>R. setigera</i> <i>T. levanderi</i> <i>P. micans</i>	<i>T. levanderi</i> <i>S. schröderii</i>      <i>P. micans</i> <i>A. minutum</i>	<i>Chaetoceros</i> <i>L. danicus</i> <i>C. curvisetus</i>	<i>T. levanderi</i>        <i>P. micans</i>	<i>C. diadema</i> <i>R. setigera</i> <i>C. curvisetus</i>	<i>R. setigera</i> <i>C. curvisetus</i>      <i>P. micans</i>

Le nom complet des espèces se trouve dans le Tableau 9 et le Tableau 11. Les noms écrits en vert correspondent aux espèces stimulées par les pesticides, en rouge aux espèces inhibées, en bleu les espèces sur lesquelles le pesticide n'a pas d'action et en noir, les espèces dont les deux paramètres  $\mu j^1$  et dmx varient en sens inverse (voir texte). Non surligné : eaux des Glénan ; surligné en jaune : estuaire du Bélon ; souligné : réponse identique dans les deux zones.

### Action à court terme

L'action à court terme (variation du taux de croissance) de l'ensemble des herbicides se traduit essentiellement par une augmentation ou une faible variation du taux de croissance de la plupart des espèces de diatomées de petite taille (*Thalassiosira levanderi*, *Chaetoceros* sp., *Chaetoceros curvisetus*, *Nitzschia delicatissima*). Seules deux espèces de plus grande taille (*L. danicus* et *R. delicatula*) présentent un taux de croissance plus élevé au contact du diméthénamide et de la bentazone. L'apport simultané de nicosulfuron et de bentazone favorise la croissance de *Chaetoceros* sp. et de *L. danicus* alors qu'individuellement, ils ne modifient pas voire ils diminuent le taux de croissance de ces espèces. Le nicosulfuron agit de la même façon sur les deux populations communes aux deux sites, les concentrations utilisées étant très voisines (42 - 46 ng/L). Dans les deux cas, *C. curvisetus* subit une augmentation de son taux de croissance alors que celui de *N. delicatissima* ne subit que de faibles variations ( $\pm 20\%$ )

A l'inverse, quand il y a variation du taux de croissance en présence des divers herbicides, ce sont les diatomées de grande taille (*Leptocylindrus danicus*, *Rhizosolenia delicatula*, *Rhizosolenia setigera*, *Schröderella schröderii*, *Chaetoceros diadema*) qui subissent une réduction de ce taux à l'exception, cependant, de *N. delicatissima* dont le taux de croissance diminue en présence de sulcotrione, de diméthénamide, de bentazone et du mélange nicosulfuron et bentazone.

Les deux autres pesticides testés ont un effet nettement opposé. Indépendamment de la taille des cellules, il est clair que l'effet de l'époxiconazole dépend de l'origine de la population. Seules les espèces de diatomées issues de l'estuaire présentent une faible variation du taux de croissance à l'exception de *C. curvisetus* dont le taux augmente fortement en présence du fongicide. En revanche, toutes les espèces provenant de l'eau des Glénan, à l'exception de *L. danicus*, subissent une forte réduction de leur taux de croissance. Cette différence marquée entre les deux communautés est peut-être liée effectivement à leur origine mais plus vraisemblablement aux concentrations d'époxiconazole utilisées dans les deux séries de tests. L'apport est, en effet, deux fois plus faible dans le milieu estuarien (68 ng/L) que dans le milieu de référence (118 ng/L). Hormis *Chaetoceros diadema*, le chlorpyrifos-éthyl tend à augmenter le taux de croissance de toutes les diatomées.

En ce qui concerne les dinoflagellés, à l'exception de l'époxiconazole, le taux de croissance d'*Alexandrium minutum* est augmenté au contact de tous les pesticides parfois dans des proportions très élevées. C'est le cas notamment du nicosulfuron (120 %) et dans une moindre mesure de la sulcotrione et de la bentazone (60 %). Par ailleurs, le nicosulfuron, le diméthénamide, la bentazone et le chlorpyrifos-éthyl réduisent le taux de croissance de *Prorocentrum micans*, les autres pesticides n'ayant pas d'action sur ce taux.

### Action à long terme

Dans de nombreux cas, l'effet des pesticides observé sur le taux de croissance se maintient pendant toute la durée de l'exposition que ce soit dans le sens d'une augmentation ou d'une diminution du nombre de cellules. La densité cellulaire maximale évolue alors comme le taux de croissance.

Ainsi, la plupart des espèces dont le taux de croissance augmente après apport de pesticide, atteint également un nombre de cellules supérieur à celui du témoin. C'est le cas essentiellement des diatomées prélevées dans l'estuaire du Bélon, *Chaetoceros curvisetus*, quel que soit le pesticide utilisé et *Nitzschia delicatissima* après apport de sulcotrione, de bentazone, du mélange nicosulfuron et bentazone et du chlorpyrifos-éthyl. A l'exception du

nicosulfuron, on constate que la plupart des pesticides agissent plutôt à long terme. De nombreuses espèces, en effet, malgré une diminution ou une stabilité de leur taux de croissance, à court terme, atteignent ainsi des densités finales supérieures à celle du témoin. Parmi elles, *Chaetoceros* sp. est stimulée à long terme par tous les pesticides testés bien que l'action de la bentazone soit moins marquée. On notera également l'effet très contrasté de l'époxiconazole sur les différentes espèces d'origine estuarienne, y compris les dinoflagellés, entre le court terme (peu d'action sur le taux de croissance) et le long terme (augmentation des densités).

Inversement, à la diminution du taux de croissance, peut correspondre une diminution de la densité cellulaire maximale. L'action à long terme prolonge l'action à court terme réduisant considérablement le développement de la population. C'est le cas, notamment des diatomées de grande taille comme *L. danicus*, *R. delicatula*, *S. schræderii* et *C. diadema* et du dinoflagellé *P. micans* en présence de nicosulfuron. Le développement de *Chaetoceros diadema* est aussi fortement réduit par tous les polluants à l'exception de l'époxiconazole qui n'a aucun effet sur cette espèce. L'action à long terme peut également se traduire par une diminution de la biomasse maximale après une augmentation du taux de croissance. Cet effet est particulièrement marqué sur la plupart des diatomées de grande taille en présence du mélange nicosulfuron et bentazone ou du chlorpyrifos-éthyl.

Enfin, quelques espèces résistent à certains pesticides. Les deux paramètres de croissance ne subissent alors que de faibles variations. C'est le cas de *N. delicatissima*, quelle que soit son origine, en présence de nicosulfuron, de *R. setigera* en présence de nicosulfuron, de sulcotrione ou de chlorpyrifos-éthyl, de *S. schræderii* en présence de sulcotrione ou de diméthénamide, de *T. levanderi* en présence de diméthénamide, de *Chaetoceros* sp. et de *L. danicus* en présence de bentazone ou enfin de *C. curvisetus* en présence de chlorpyrifos-éthyl. C'est le cas, également, de *P. micans* en présence de sulcotrione, de diméthénamide et du mélange ; ce dinoflagellé s'avère donc être insensible à ces polluants.

Une attention particulière doit être apportée à *Alexandrium minutum* présent ici dans l'estuaire du Bélon. On constate que le taux de croissance est toujours plus élevé quand les cellules sont au contact d'un pesticide (de 30 à 130 %). Seul l'époxiconazole n'a pas d'effet sur le taux de croissance de cette espèce. Les densités cellulaires maximales sont également très fortement augmentées notamment en présence du nicosulfuron (270 %). Les seules exceptions observées concernent le nombre de cellules maximum qui est réduit au contact du mélange nicosulfuron et bentazone (62 %) et du chlorpyrifos-éthyl (31 %) alors que le taux de croissance augmente de 30 % à 36 %, respectivement. Si on compare ces résultats à ceux obtenus en 2003, dans l'estuaire de la Penzé, on s'aperçoit qu'ils peuvent être très différents. En effet, en Penzé, la croissance d'*A. minutum* est totalement inhibée en présence de chacun des herbicides et la population ne peut se maintenir. En revanche, l'apport d'époxiconazole ne modifie pas le taux de croissance mais augmente la densité cellulaire maximale de 33 %. Ces résultats sont identiques à ceux obtenus dans l'estuaire du Bélon. Le chlorpyrifos-éthyl agit aussi de la même façon sur le taux de croissance des deux populations en l'augmentant de 30 %. Cependant, l'action à long terme est différente puisqu'en Penzé, le nombre de cellules maximum est augmenté de 30 % mais diminué d'autant dans l'estuaire du Bélon.

La différence de réponse entre les deux populations peut être attribuée à la différence d'état physiologique. En effet, la population issue de la Penzé était en fin de croissance après le bloom observé auparavant. Inversement, dans l'estuaire du Bélon, la population présentait un fort taux de croissance. Les cellules en mauvais état physiologique seraient donc plus

sensibles à l'impact des herbicides. Ceux-ci agiraient donc comme inhibiteurs de la croissance des cellules fragilisées et au contraire comme stimulateurs sur les cellules en plein développement. Mais, selon E. Erard (comm. pers.), les deux souches sont différentes génétiquement ce qui peut également expliquer cette différence de sensibilité aux différents herbicides.

L'hypothèse d'une relation entre le degré d'impact des pesticides et le taux de croissance des diatomées n'a pu être vérifiée dans cette étude. En effet, dans l'eau des Glénan, les différentes espèces de diatomées avaient un taux de croissance très voisin ; dans l'estuaire du Bélon, une seule espèce, *Chaetoceros diadema*, avait un taux de croissance deux fois supérieur à celui des autres espèces. Cependant, la plus grande sensibilité de cette algue à l'ensemble des pesticides peut être aussi bien liée à son fort taux de croissance qu'à sa plus grande taille, la surface de contact avec le milieu contaminé étant plus importante.

**En conclusion**, la réponse des espèces phytoplanctoniques aux apports de pesticides peut être constante tout au long de l'exposition des algues aux polluants. L'effet se traduit alors par une variation identique du taux de croissance et de la densité cellulaire maximale. La diminution simultanée des deux paramètres induit une forte perte de biomasse : le cas le plus significatif est l'impact du nicosulfuron sur les diatomées de grande taille. Inversement, l'augmentation du taux de croissance et du nombre de cellules maximum traduit une stimulation de la population, le cas le plus représentatif étant la forte stimulation du développement d'*A. minutum* sous l'effet du nicosulfuron, du sulcotrione et de la bentazone. Le stade de développement de la population semble jouer un rôle déterminant dans la sensibilité vis-à-vis des pesticides (en préparation : Arzul *et al.*, «Role of the development stage in the response of microalgae to pesticide toxicity. »). Mais les réponses peuvent être transitoires avec en un premier temps une diminution ou une augmentation du taux de croissance (action à court terme) suivie respectivement d'une augmentation ou d'une diminution de la densité cellulaire maximale. Ainsi, selon la durée de l'exposition, l'impact d'un pesticide sur une espèce donnée peut apparaître contradictoire. L'étude de l'impact des pesticides sur le développement des espèces phytoplanctoniques devra donc prendre en compte de nombreux paramètres qu'ils soient physico-chimiques ou physiologiques.

### 2.1.2 Analyses spécifiques de phytoplancton

Ces résultats ont donné lieu à une étude dont l'objectif est de comparer les concentrations de certaines espèces d'intérêt nutritionnel, ou moins utilisées par les organismes filtreurs, ou encore présentant un danger potentiel pour les consommateurs de coquillages. D'après Parrish *et al.* (1997), Soudant *et al.* (1998), D'Souza et Loneragan (1999), Ceballos et Ianora (2003), les espèces appartenant aux genres *Chaetoceros* et *Prorocentrum* sont favorables à la reproduction des copépodes et au développement larvaire des filtreurs. Les pourcentages comparés de ces deux espèces dans les milieux incubés en présence de contaminants ont montré que les réponses des populations phytoplanctoniques varient beaucoup selon les sites et la durée de contact avec les contaminants.

Sur le site de Glénan ces genres sont en général favorisés jusqu'à 72 h en présence de contaminants, à l'exception du nicosulfuron, puis défavorisés à 168 h en présence de diméthénamide, bentazone et époxiconazole, et du mélange nicosulfuron + bentazone (Figure 30).

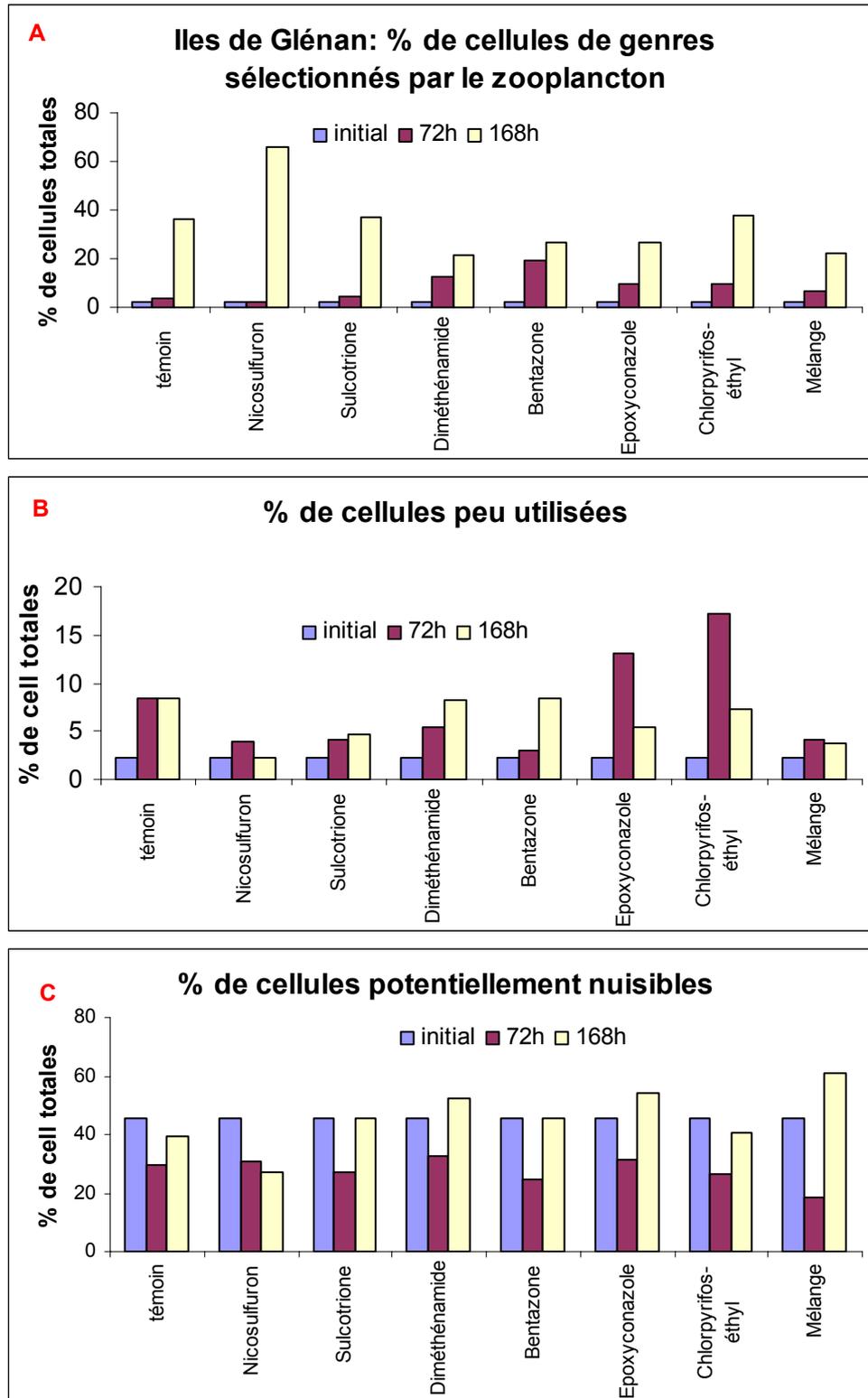


Figure 30 : Effet des contaminants (molécules actives seules) sur la sélection des microalgues sur le site de référence Glénan.

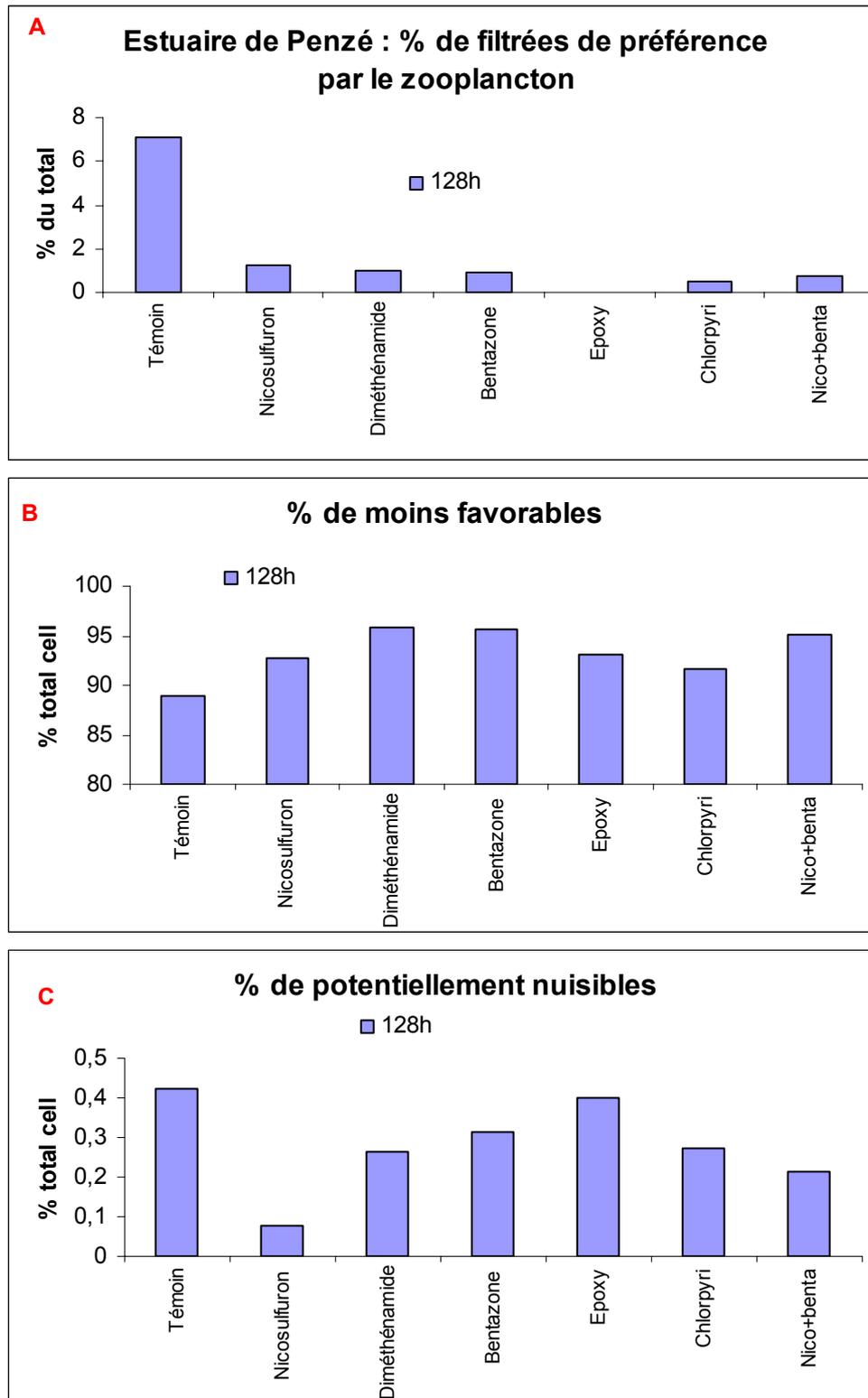


Figure 31 : Effet des contaminants (molécules actives seules) sur la sélection des microalgues sur l'estuaire de Penzé après 128h de contamination.

Sur le prélèvement de Penzé après 128 h de contact, l'ensemble des contaminants testés est particulièrement défavorable aux genres *Chaetoceros* et *Prorocentrum* (Figure 31 A). Un effet inverse est observé sur le prélèvement d'Elorn, avec un effet favorable (jusqu'à 27 % de

plus) sur ces genres dans la première partie du test (72 h) et un effet défavorable en fin d'expérience (216 h) (Figure 32 A).

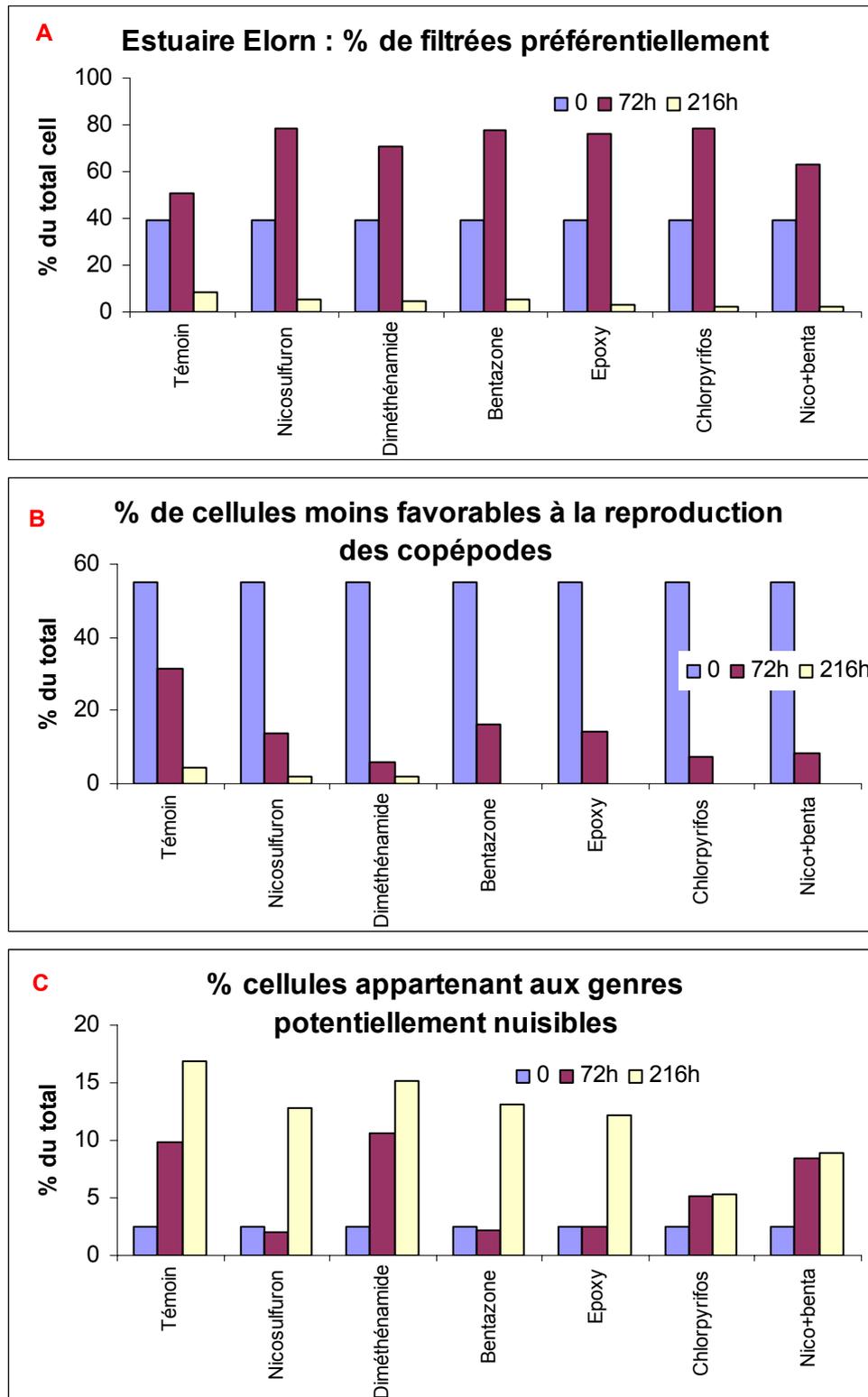


Figure 32 : Effet des contaminants (molécules actives seules) sur la sélection des microalgues sur l'estuaire d'Elorn au cours de l'expérience de contamination.

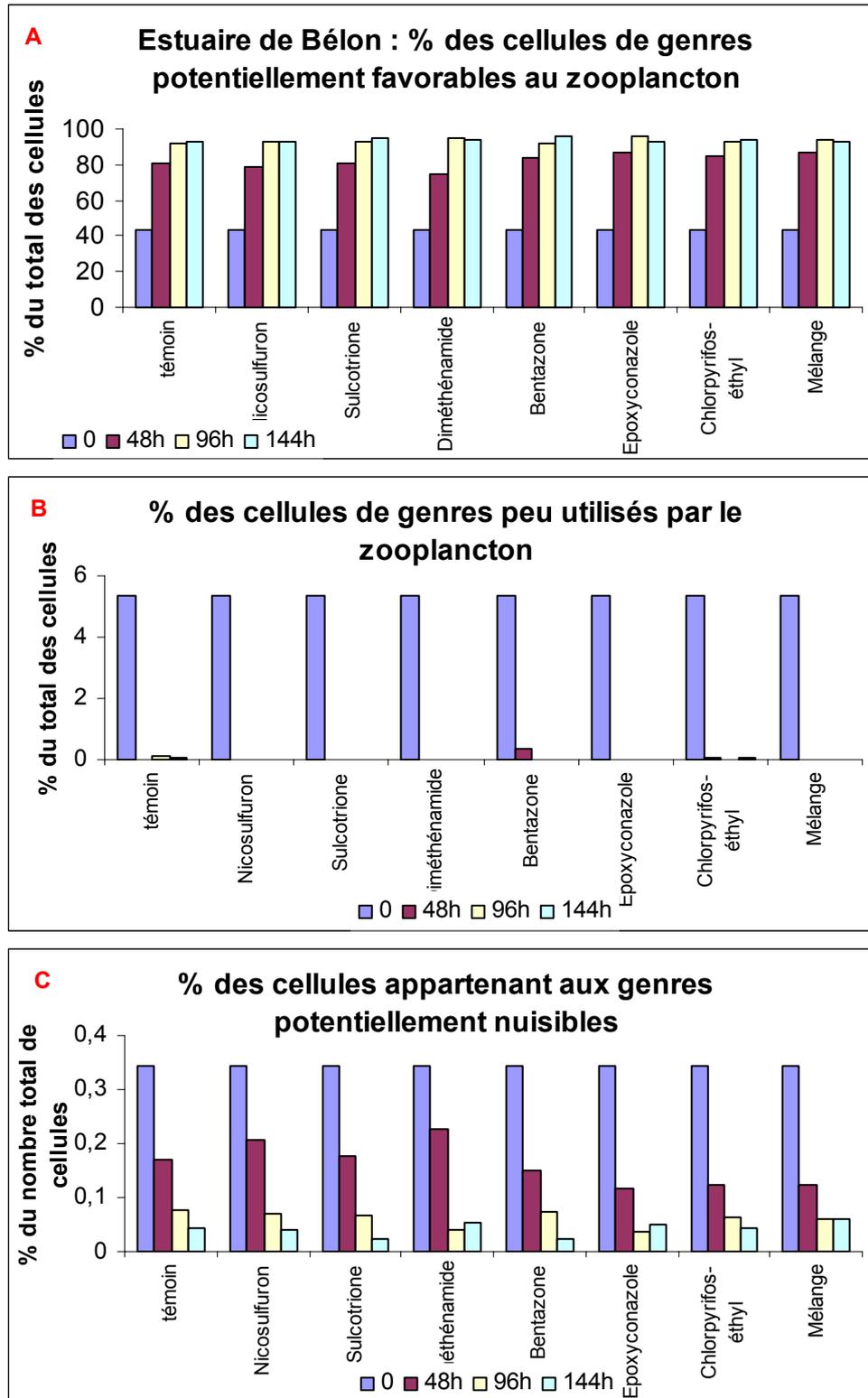


Figure 33 : Effet des contaminants (molécules actives seules) sur la sélection des microalgues sur l'estuaire du Bélon au cours de l'expérience de contamination.

Dans le prélèvement de Bélon les effets sont plus fluctuants (Figure 33 A).

Les expériences de Ceballos et Ianora (2003) ont également montré que l'alimentation du copépode *Temora stylifera* par les diatomées appartenant aux genres *Skeletonema*, *Thalassiosira* et *Navicula* entraîne une réduction d'éclosion des œufs chez cet organisme. Comme pour *Chaetoceros* et *Prorocentrum*, les réponses de *Skeletonema*, *Thalassiosira* et *Navicula* varient selon les sites mais d'une façon générale ces genres sont sensibles à l'effet toxique des pesticides, et sont moins représentés après contact (les 4 figures B). Cette diminution atteint 20 % dans le prélèvement d'Elorn en présence de diméthénamide. Cependant ces genres sont particulièrement tolérants dans le prélèvement de Penzé et le % cellulaire correspondant est plus élevé que dans le témoin (jusqu'à 7 % en présence de diméthénamide et bentazone). Hormis les variations dans le prélèvement d'Elorn, ces variations sont faibles.

Enfin, les genres potentiellement nuisibles, tels que *Alexandrium* (incluent les espèces productrices de toxine paralysante), *Dinophysis* (espèces productrices de toxine diarrhéique), *Pseudonitzschia* (espèces productrices de toxine amnésiante), et les genres potentiellement ichtyotoxiques: *Karenia* (ex-*Gymnodinium*), *Heterosigma*, *Distephanus*, sont également comparés dans le témoin et les milieux contaminés (les 4 figures C). L'effet des pesticides est insignifiant sur ces genres dans le prélèvement de Bélon et de Penzé (moins de 1 % de différence avec le témoin). Dans le prélèvement d'Elorn ces genres sont en général assez fortement inhibés (jusqu'à 10 % en présence de chlorpyrifos éthyl). Dans le prélèvement de Glénan ces genres sont particulièrement favorisés en fin d'expérience, en présence du mélange nicosulfuron+bentazone (jusqu'à 20 % de plus que dans le témoin) bien que chaque constituant du mélange testé seul ne présente d'effet aussi marqué.

Ces résultats confirment que les populations phytoplanctoniques rencontrées sur les différents sites présentent des sensibilités variables vis-à-vis des pesticides susceptibles d'être présents dans le milieu. Le fonctionnement de l'écosystème étant basé sur l'utilisation du phytoplancton par le zooplancton, la réponse des populations algales est à prendre en compte dans les études sur certains dysfonctionnements. En effet, les mortalités estivales de mollusques dans certaines zones côtières pourraient être au moins partiellement expliquées par les changements dans les structures de populations phytoplanctoniques, en présence de contaminations chroniques faibles (ng/L). Le prélèvement en estuaire de Penzé illustre cet exemple : les genres favorables au zooplancton se développent moins en présence de contaminants tandis que ceux qui présentent un intérêt moindre pour certains copépodes sont favorisés. Une étude similaire réalisée sur le phytoplancton de la côte Charentaise (Ronce-les-Bains) et de la côte Atlantique (Estuaire de rivière d'Auray) dans le projet MOREST (financement Région et Ifremer) a montré des résultats comparables (Arzul *et al.*, 2005).

## 2.2 Tolérance induite des communautés phytoplanctoniques

Comparaison de la sensibilité des populations phytoplanctoniques à un mélange de pesticides en formulation, sur les quatre sites sélectionnés.

Le test est basé sur l'hypothèse que la contamination chronique induit une tolérance à la contamination aiguë chez les populations phytoplanctoniques (Blanck *et al.*, 1988). La mesure de la production primaire chez le phytoplancton naturel prélevé en zones différemment impactées peut être utilisée pour estimer le degré d'impact chronique par les pesticides (Bérard *et al.*, 2002). En comparant la sensibilité des populations à partir des CE50 des

contaminants, aux concentrations de pesticides mesurées dans les prélèvements des sites étudiés, nous tenterons de valider le test PICT comme outil pour estimer les effets des pesticides (Molander et Blanck, 1992 ; Dorigo *et al.*, 2004).

Cependant il eut été intéressant de ne prendre en compte que les molécules du milieu naturel dont le mode d'action est identique à celui des molécules présentes dans le mélange pour réaliser les tests, cependant les modes d'action décrits pour toutes les molécules ne sont pas exhaustifs et d'autre part les molécules du projet IPEM affectent plusieurs processus métaboliques.

### 2.2.1 Caractéristiques des prélèvements

#### **Glénan : 4 juillet 2005**

Salinité 35 ; chlorophylle (sonde SeaPoint calibrée) 0,4 µg/L

Espèces phytoplanctoniques observées :

Principalement des diatomées des genres *Nitzschia* (*Pseudonitzschia*), *Rhizosolenia* et *Chaetoceros*, également cryptophycés et petits péridiniens. Nombre total de cellules : 54 150 cell/L.

L'analyse chimique des contaminants a révélé une eau sans contamination (6 contaminants recherchés) (Tableau 15).

#### **Elorn : 6 juillet 2005**

Salinité 33,6 ; chlorophylle 5 µg/L.

Espèces phytoplanctoniques observées :

Petites cellules en chaînes (diatomées), quelques dinoflagellés, et nombreuses petites cellules indéterminées. Total : 416 700 cell/L

L'analyse chimique des contaminants a porté sur 55 molécules actives (Tableau 16), 8 ont été mesurées à des concentrations supérieures à la limite de détection. La concentration totale des contaminants était de 0,031 µg/L.

#### **Penzé : 13 juillet 2006**

Salinité 33,8 ; chlorophylle 1,5 µg/L

Espèces phytoplanctoniques observées :

Prédominance de diatomées : *Skeletonema*, *Leptocylindrus*, *Thalassionema*, *Thalassiosira*, *Melosira*, dinoflagellés divers, cryptophycés, ciliés. Total : 126 000 cell/L.

L'analyse chimique des contaminants sur 70 molécules actives, a permis de mesurer 30 dont la concentration dépassait le seuil de détection. La concentration totale en pesticides était de 2,102 µg/L (Tableau 17).

#### **Bélon : 24 juillet 2006**

Salinité 34,5 ; chlorophylle 1 µg/L

Espèces phytoplanctoniques observées :

Diatomées : *Leptocylindrus*, *Coscinodiscus*, *Chaetoceros*, *Skeletonema*, dinoflagellés dont petits *Gymnodinium*, cellules petites non identifiées, ciliés. Total : 148 400 cell/L

L'analyse chimique des contaminants comme pour Penzé, a montré la présence de 30 molécules actives dont la concentration totale s'élevait à 1,211 µg/L (Tableau 18).

**Tableau 15 : Résultats des analyses chimiques de contaminants à Glénan.**

		Les Glénans					
Date de prélèvement		04/07/2005					
RESULTATS: µg/L	Bentazone	Dimethenamide	Epoxiconazole	Nicosulfuron	Chlorpyrifos	Sulcotrione	Glyphosate
Eau libre	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.05	< 0.01	< 0.05

**Tableau 16 : Résultat des analyses chimiques en estuaire d'Elorn.**

RESULTATS: µg/L	Référence de l'échantillon	Elorn			
	Limites de quantification	06/07/2005			
Dimethenamide	< 0,005	< 0,005	Rimsulfuron	< 0,005	< 0,005
Acetochlore	< 0,005	< 0,005	Thifensulfuron	< 0,005	< 0,005
Metazachlore	< 0,005	< 0,005	Triasulfuron	< 0,005	< 0,005
Sulcotrione	< 0,02	< 0,02	Bensulfuron-Me	< 0,005	< 0,005
Bentazone	< 0,005	< 0,005	Carbendazime	< 0,005	< 0,005
Epoxiconazole	< 0,005	< 0,005	Carbofuran	< 0,005	< 0,005
Chlorpyrifos éthyl	< 0,005	< 0,005	Chlorfenvinphos	< 0,005	< 0,005
Atrazine	< 0,005	0,003	Chlorothalonil	< 0,005	< 0,005
DEA	< 0,005	< 0,005	Chlorprophame	< 0,005	< 0,005
Simazine	< 0,005	< 0,005	Cymoxanil	< 0,005	< 0,005
<b>Diuron</b>	<b>&lt; 0,005</b>	<b>0,022</b>	Cyperméthrine	< 0,005	< 0,005
DCPU	< 0,005	< 0,005	Deltaméthrine	< 0,005	< 0,005
DCPMU	< 0,005	0,002	Permethrine	< 0,005	< 0,005
DCA	< 0,005	< 0,005	Dichlorvos	< 0,005	< 0,005
Linuron	< 0,005	< 0,005	Iprodione	< 0,005	< 0,005
Métobromuron	< 0,005	< 0,005	Isophenphos	< 0,005	< 0,005
Métoxuron	< 0,005	< 0,005	Isoproturon	< 0,005	< 0,005
Monolinuron	< 0,005	< 0,005	Lambda-Cyhalothrine	< 0,005	< 0,005
Irgarol	< 0,005	< 0,005	Oxadixyl	< 0,005	< 0,005
Dichlofluanid	< 0,005	< 0,005	Parathion-méthyl	< 0,005	< 0,005
Thiram	< 0,005	< 0,005	Pencycuron	< 0,005	< 0,005
ZnPt	< 0,005	< 0,005	Mévinphos	< 0,005	< 0,005
TCMTB Busan	< 0,005	< 0,005	Pyrimicarbe	< 0,005	< 0,005
Amidosulfuron	< 0,005	< 0,005	Propachlore	< 0,005	< 0,005
Metsulfuron-Me	< 0,005	< 0,005	Quizalofop éthyl	< 0,005	< 0,005
Nicosulfuron	< 0,005	< 0,005	Thiophanate méthyl	< 0,005	< 0,005
			Trifluraline	< 0,005	< 0,005

**Tableau 17 : Résultat des analyses chimiques en estuaire de Penzé.**

RESULTATS: µg/L	Référence de l'échantillon	Penzé			
	Limites de quantification				
Bentazone	< 0,005	0,006	Quizalofop-éthyl	< 0,005	< 0,005
Dimethenamide	< 0,005	< 0,005	Simazine	< 0,005	< 0,005
Epoxiconazole	< 0,005	0,007	Thiophanate-méthyl	< 0,005	< 0,005
Chlorpyrifos	< 0,005	< 0,005	Trifluraline	< 0,005	< 0,005
Sulcotrione	< 0,01	< 0,01	Irgarol	< 0,005	0,003
Glyphosate	< 0,05	< 0,05	DCPU	< 0,005	< 0,005
AMPA	< 0,05	< 0,05	Dichlofuanid	< 0,005	< 0,005
Atrazine	< 0,005	0,004	Thiram	< 0,005	< 0,005
Carbendazime	< 0,005	< 0,005	DCPMU	< 0,005	0,004
Carbofuran	< 0,005	< 0,005	DCA	< 0,005	< 0,005
Chlorfenvinphos	< 0,005	< 0,005	ZnPT	< 0,005	< 0,005
<b>Chlorothalonil</b>	<b>&lt; 0,005</b>	<b>0,362</b>	TCMTB Busan	< 0,005	< 0,005
Chlorprophame	< 0,005	< 0,005	Amidosulfuron	< 0,005	< 0,005
Cymoxanil	< 0,005	< 0,005	Metsulfuron-Me	< 0,005	< 0,005
Cyperméthrine	< 0,005	< 0,005	<b>Nicosulfuron</b>	<b>&lt; 0,005</b>	<b>0,116</b>
DEA	< 0,005	< 0,005	Rimsulfuron	< 0,005	< 0,005
Deltaméthrine	< 0,005	< 0,005	Thifensulfuron	< 0,005	< 0,005
Dichlorvos	< 0,005	< 0,005	Triasulfuron	< 0,005	< 0,005
Diuron	< 0,005	0,024	<b>Bensulfuron-Me</b>	<b>&lt; 0,005</b>	<b>0,448</b>
Iprodione	< 0,005	< 0,005	Acetochlore	< 0,005	< 0,005
Isophenphos	< 0,005	0,003	Metazachlore	< 0,005	< 0,005
Isoproturon	< 0,005	0,003	2, 4D	< 0,01	0,006
Lambda-Cyhalothrine	< 0,005	< 0,005	2,4 DB	< 0,01	< 0,01
Linuron	< 0,005	0,001	2,4 dichlorophenol	< 0,01	< 0,01
Métobromuron	< 0,005	< 0,005	4-chloro-2-methyl-phenol	< 0,01	< 0,01
Métoxuron	< 0,005	< 0,005	<b>Dicamba</b>	<b>&lt; 0,01</b>	<b>0,116</b>
Mévinphos	< 0,005	< 0,005	Diclofop	< 0,01	< 0,01
Monolinuron	< 0,005	0,004	Diclofop-méthyl	< 0,01	< 0,01
Oxadixyl	< 0,005	0,004	Dichlorpop	< 0,01	< 0,01
Parathion-méthyl	< 0,005	< 0,005	MCPA	< 0,01	< 0,01
Pencycuron	< 0,005	0,003	Mecoprop	< 0,01	< 0,01
Perméthrine	< 0,005	< 0,005	MCPB	< 0,01	< 0,01
Pyrimicarbe	< 0,005	0,003	Bentazone-8-hydroxy	< 0,01	< 0,01
Propachlore	< 0,005	0,001	<b>Dicamba 5-hydroxy</b>	<b>&lt; 0,01</b>	<b>0,976</b>

**Tableau 18 : Résultat des analyses chimiques dans le Bélon.**

RESULTATS: µg/L	Référence de l'échantillon			Bélon	
	Limites de quantification				
Bentazone	< 0,005	0,006	Quizalofop-éthyl	< 0,005	0,021
Dimethenamide	< 0,005	< 0,005	Simazine	< 0,005	< 0,005
Epoxiconazole	< 0,005	0,012	Thiophanate-méthyl	< 0,005	< 0,005
Chlorpyriphos	< 0,005	< 0,005	Trifluraline	< 0,005	< 0,005
Sulcotrione	<0.01	<0.01	Irgarol	< 0,005	0,006
Glyphosate	<0,05	<0.01	DCPU	< 0,005	< 0,005
AMPA	<0,05	<0,05	Dichlofluanid	< 0,005	< 0,005
Atrazine	< 0,005	0,005	Thiram	< 0,005	< 0,005
Carbendazime	< 0,005	< 0,005	DCPMU	< 0,005	0,006
Carbofuran	< 0,005	0,002	DCA	< 0,005	< 0,005
Chlorfenvinphos	< 0,005	0,009	ZnPT	< 0,005	< 0,005
Chlorothalonil	< 0,005	0,119	TCMTB Busan	< 0,005	< 0,005
Chlorprophame	< 0,005	< 0,005	Amidosulfuron	< 0,005	0,001
Cymoxanil	< 0,005	< 0,005	Metsulfuron-Me	< 0,005	0,001
Cyperméthrine	< 0,005	< 0,005	Nicosulfuron	< 0,005	0,080
DEA	< 0,005	< 0,005	Rimsulfuron	< 0,005	< 0,005
Deltaméthrine	< 0,005	< 0,005	Thifensulfuron	< 0,005	0,001
Dichlorvos	< 0,005	< 0,005	Triasulfuron	< 0,005	0,002
Diuron	< 0,005	0,040	Bensulfuron-Me	< 0,005	0,315
Iprodione	< 0,005	< 0,005	Acetochlore	< 0,005	0,003
Isophenphos	< 0,005	0,029	Metazachlore	< 0,005	0,003
Isoproturon	< 0,005	0,004	2, 4D	< 0,01	0,005
Lambda-Cyhalothrine	< 0,005	< 0,005	2, 4 DB	< 0,01	< 0,01
Linuron	< 0,005	0,004	2, 4 dichlorophenol	< 0,01	< 0,01
Métobromuron	< 0,005	< 0,005	4-chloro-2-methyl-phenol	< 0,01	< 0,01
Métoxuron	< 0,005	< 0,005	Dicamba	< 0,01	0,055
Mévinphos	< 0,005	< 0,005	Diclofop	< 0,01	< 0,01
Monolinuron	< 0,005	0,005	Diclofop-méthyl	< 0,01	< 0,01
Oxadixyl	< 0,005	0,003	Dichlorpop	< 0,01	< 0,01
Parathion-méthyl	< 0,005	< 0,005	MCPA	< 0,01	< 0,01
Pencycuron	< 0,005	0,0243	Mecoprop	< 0,01	< 0,01
Perméthrine	< 0,005	< 0,005	MCPB	< 0,01	< 0,01
Pyrimicarbe	< 0,005	0,0034	Bentazone-8-hydroxy	< 0,01	< 0,01
Propachlore	< 0,005	0,0007	Dicamba 5--hydroxy	< 0,01	0,447

### 2.2.2 Tests de production primaire

Le principe du test PICT repose sur des mesures de production primaire (PP) en présence de contaminants apportés à doses variables. La relation  $PP = f(\text{pesticides})$  présente une pente négative qui permet de définir une CE50 des pesticides. Une valeur élevée de CE50 révèle une population plus tolérante à la contamination aigue par les pesticides, qu'une faible CE50.

Le protocole appliqué pour mesurer la PP est appliqué à de petits volumes du prélèvement à étudier, contaminés artificiellement par les pesticides. L'incubation se fait en conditions contrôlées de température (18°C) et de lumière (60  $\mu\text{mol quanta/m}^2/\text{s}$ ) et après 60 minutes le carbonate  $^{14}\text{C}$  est ajouté (20  $\mu\text{Ci}$ ), et l'incubation poursuivie encore deux heures. La réaction est arrêtée par introduction d'acide acétique concentré, et le carbonate non fixé est transformé en  $\text{CO}_2$  et éliminé sous la hotte aspirante, les échantillons étant agités pendant une heure.

La production bactérienne (échantillons à l'obscurité) est retranchée, les contrôles de blanc des témoins (sans contamination) sont également pris en compte dans les calculs.

Le mélange de contaminants apportés en formulations commerciales est présenté dans le Tableau 19 suivant :

**Tableau 19 : formulations commerciales**

Molécule active	formulation	Concentrations nominales en solution-mère	Concentration mesurée mg/L
bentazone	Bazamais*	2 mg/L	3,572
diméthénamide	Frontière	2 mg/L	2,516
sulcotrione	Mikado	2 mg/L	0,017
nicosulfuron	Milagro	2 mg/L	0,473
époxyconazole	Opus*	2 mg/L	2,037

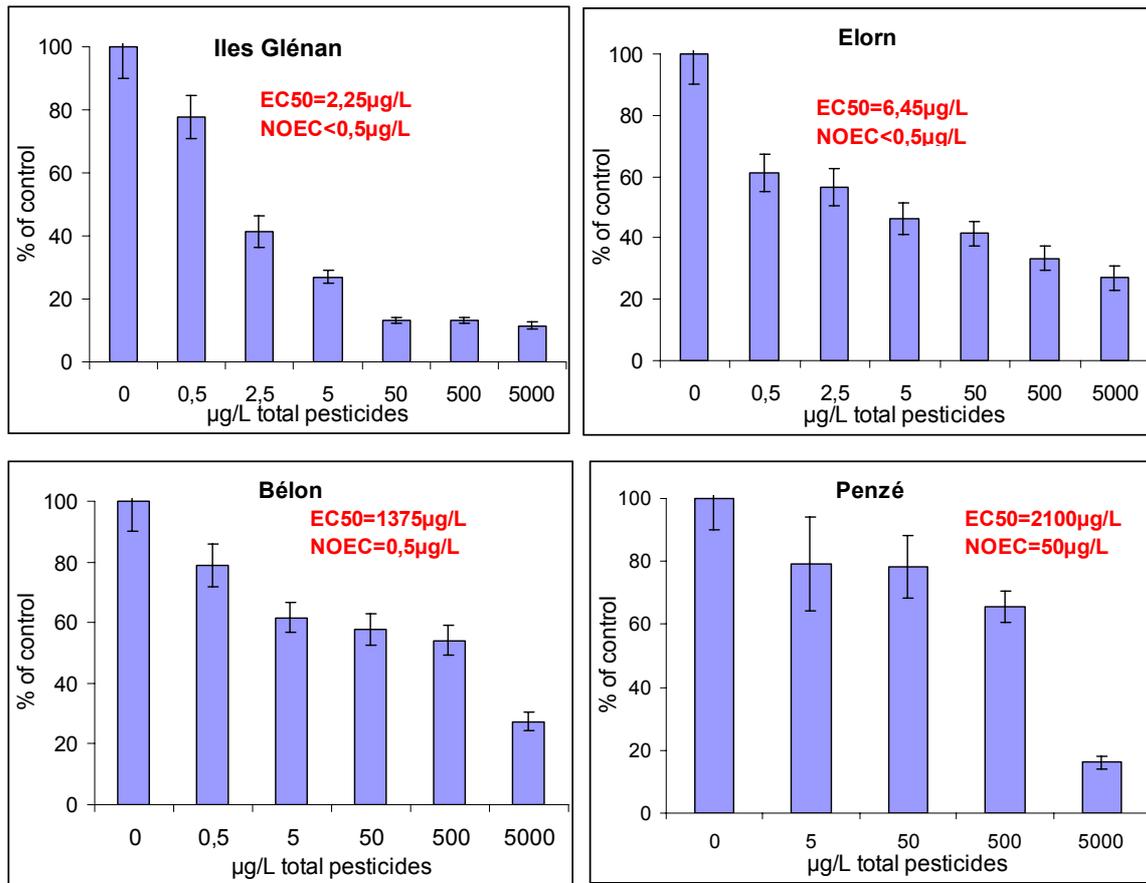
\*à partir de solutions préalablement préparées. Toutes sont préparées dans l'eau de mer autoclavée.

La concentration totale de pesticides dans la solution mère est de 8,615 mg/L, inférieure à la concentration théorique attendue. Ceci résulte probablement de la perte de molécules actives peu hydrosolubles sur le filtre Stérvex (0,22  $\mu\text{m}$ ) lors de la stérilisation.

Les calculs et les valeurs des concentrations présentées correspondent aux concentrations totales.

Les résultats de PP sont présentés en pourcentages par rapport aux témoins, et les barres d'erreurs correspondent aux déviations standards, des triplicats analysés (Figure 34).

Les CE50 sont calculées en chaque site. La plus faible CE50 est obtenue pour le site de référence de Glénan, 2,25  $\mu\text{g/L}$  du mélange de pesticides, et la plus élevée en estuaire de Penzé, 2 100  $\mu\text{g/L}$ . La concentration la plus élevée ne produisant pas d'effet est également déterminée (NOEC) et varie de <0,5 à 50  $\mu\text{g/L}$  des pesticides en mélange (Figure 35).



**Figure 34 : Variation de production primaire (PP) dans les quatre prélèvements étudiés, et concentration du mélange de pesticides produisant 50 % d'atténuation de PP.**

Les concentrations en pesticides totaux analysés dans les prélèvements naturels de chaque site sont comparées aux CE50 et NOEC dans le Tableau 20. Les sensibilités élevées des populations phytoplanctoniques du site de référence Glénan et de l'estuaire Elorn correspondent aux faibles doses de contaminants présents dans les prélèvements. Il faut également remarquer le nombre élevé de molécules présentes simultanément à concentrations supérieures à la limite détectable (5 ng/L) dans les prélèvements de Penzé et Bélon, estuaires particulièrement contaminés et dont les populations phytoplanctoniques se montrent tolérantes (Figure 35).

**Tableau 20 : Résumé des calculs de CE50 et des concentrations de pesticides totaux.**

Sites salinités	Glénan 35	Elorn 33,6	Bélon 34,5	Penzé 33,8
CE50 µg/L	<b>2,25</b>	<b>6,5</b>	<b>1 375</b>	<b>2 100</b>
CSEO µg/L	<0,5	<0,5	0,5	50
Nb de pesticides détectés	0	7	30	30
concentrations cumulées µg/L	<b>0</b>	<b>0,031</b>	<b>1,211</b>	<b>2,102</b>

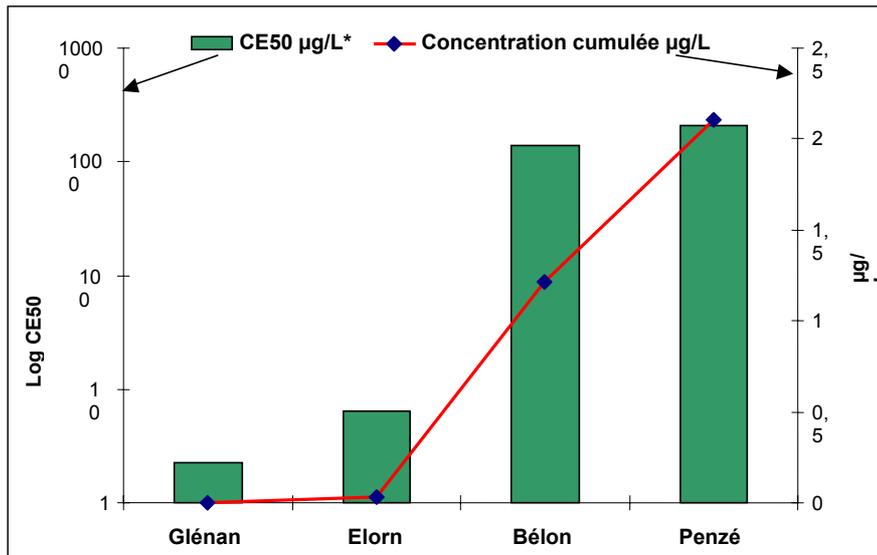


Figure 35 : Variations des CE50 et des concentrations cumulées en pesticides analysés dans les prélèvements de quatre sites.

### 2.2.3 Discussions

Le test PICT basé sur la production primaire mesurée en prélèvements naturels soumis au stress de contamination aiguë, constitue donc une méthode intéressante pour mettre en évidence les milieux impactés par les pesticides. Les molécules du mélange testé affectent différents systèmes métaboliques, tout comme les molécules du prélèvement naturel, dont les modes d'actions sont peu ou pas précisés (Agritox). La compilation des effets en toxicité aiguë est donc comparable à la compilation des molécules détectées dans le milieu.

La réponse des assemblages naturels de phytoplancton au stress aigu appliqué expérimentalement est un outil intéressant, mesurable à l'aide de nouvelles méthodologies telles que la mesure de fluorescence (Kashino *et al.*, 2002; Bengtson Nasha, *et al.*, 2005).

## 2.3 Etude en mésocosme *in situ*

Trois séries d'expériences en microcosmes *in situ* ont été réalisées, en 2004 et 2005 sur l'archipel des Glénan, et en 2006 dans la baie de Port-la-forêt (commune de Fouesnant).

### 2.3.1 Protocole des microcosmes *in situ*

(Protocole adapté d'après de la Broise et Palenik 2007):

Le but de ces expériences était d'évaluer l'impact des pesticides sur le phytoplancton en conditions naturelles (eau de mer contenant le phytoplancton naturel, lumière et température naturelles). Les microcosmes étaient constitués de bouteilles de 2,3 L remplies avec 2 L d'eau de mer filtrée sur 200 µm et environ 300 mL d'air.

Au cours de ces expériences, une partie du milieu était renouvelée tous les 2 à 4 jours, à raison de 5 % du volume total (2 L) par jour. Cela dans le but de maintenir une composition des microcosmes proche de celle du milieu naturel.

Les bouteilles étaient fixées sur des structures en inox de 3 m de diamètre. Nous avions 3 structures qui nous permettaient de travailler sur 108 bouteilles simultanément.

Saisons 2004 et 2005 : les structures étaient mises en place sur le site des îles Glénan, (environ 10 milles au sud de Concarneau), à environ 1 km au nord de l'île Saint-Nicolas (voir Figure 36). L'ensemble était ainsi relativement protégé de la houle du large. Le système était conçu de manière à maintenir les bouteilles immergées à 4 m de la surface, quelles que soient les conditions de marnage.

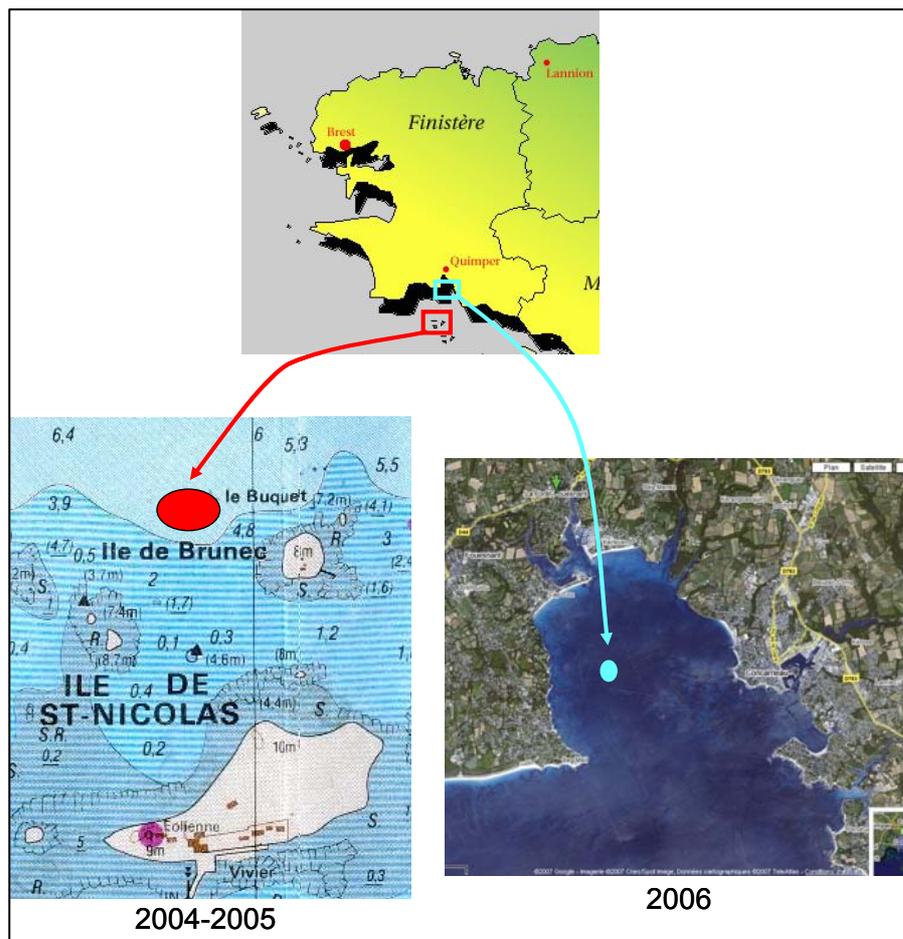


Figure 36 : Localisation des sites expérimentaux

Cette profondeur nous permettait de limiter les effets de la photo-inhibition due aux rayonnements solaires. Les structures telles qu'elles étaient installées en 2004, présentaient des problèmes de manipulation et de positionnement dans la colonne d'eau, c'est pourquoi le modèle initial avait été modifié en 2005 (voir Figure 37).

Saison 2006 : les structures étaient mises en place dans la baie de Port-la-Forêt, dans la partie sud d'une ancienne concession ostréicole ( $47^{\circ}52'12''N$ ,  $03^{\circ}58'35''W$ , voir carte). A la demande des affaires maritimes, les bouteilles étaient maintenues non pas à 4 m mais à 6 m de la surface, et le volume des bouées de surface augmenté.

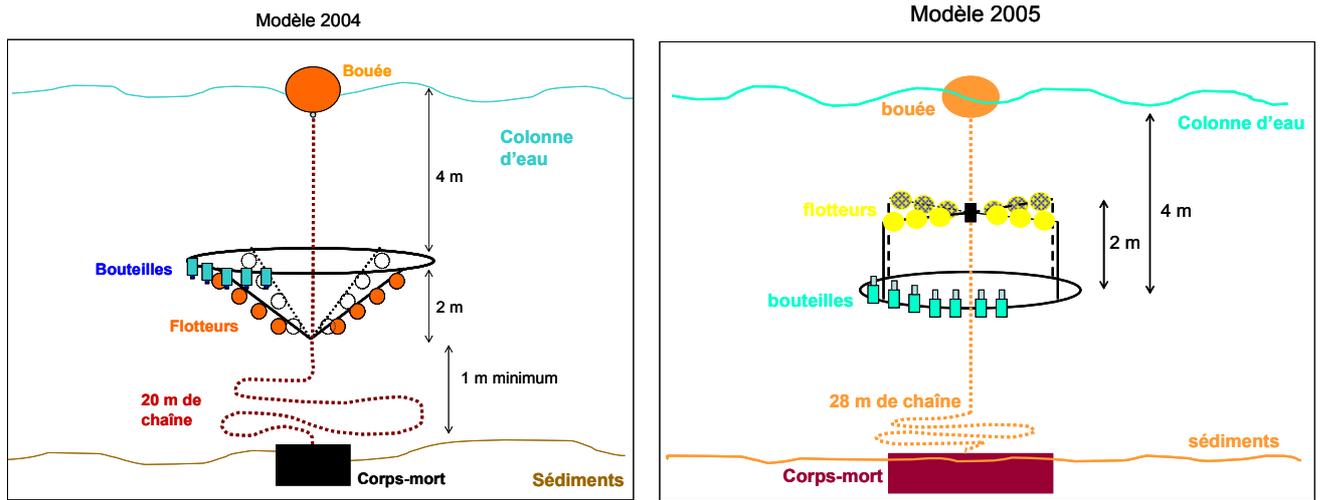


Figure 37 : Schémas de la structure en position dans le milieu

### 2.3.2 Récapitulatif des expériences effectuées durant les 3 années :

Dix expériences de terrain ont donc été menées entre juin 2004 et août 2006, avec des durées allant de 8 à 14 jours (selon les contraintes météorologiques).

Tableau 21 : Résumé des expériences de terrain en microcosme

Année	Site	Expérience	Période	Durée
2004	Glénan	A	mi-juin	14 jours
		B	début juillet	14 jours
		C	début août	8 jours
		D	mi-septembre	14 jours
2005	Glénan	E	début juin	12 jours
		F	fin juin-début juillet	14 jours
		G	mi-août	12 jours
		H	début septembre	13 jours
2006	Port-la-Forêt	I	fin juin	13 jours
		J	fin juillet-début août	9 jours

*Remarque :* En 2006, seules 2 expériences ont pu être réalisées, les structures alors fortement fragilisées ayant ensuite dû être démontées.

### 2.3.3 Pesticides testés :

Nous avons toujours travaillé avec les formulations commerciales, les concentrations étant exprimées en équivalent substance active (Tableau 22).

**Tableau 22 : nombre de bouteilles testées pour chaque pesticide, par concentration**

Année	Concentration (µg/L)	Expérience	Herbicides					Fongicide	Insecticide	Mélange
			Basamaïs	Frontier	Round'up	Milagro	Mikado	Opus	Dursban	
			Bentazone	Diméthénamide	Glyphosate	Nicosulfuron	Sulcotrione	Epoxiconazole	Chlorpyrifos-éthyl	
2004	0,1	A	12	12		12			12	
		B	12	12	12	12	12		12	12
		C	12	12	12	12	12	12	12	12
		D	12	12	12	12	12	12	12	12
2005	0,1	E	6		6	6	6			6
		F	6	6	6	6	6	6	6	6
		G	6	6	6	6	6	6	6	6
		H	6	6		6			6	6
	1	F	6	6	6	6	6	6	6	6
		G	6	6	6	6	6	6	6	6
		H	6	6	6	6	6	6	6	6
2006	1	I		5				5		
		J	5		5	5			5	
	10	I		5				5		
		J	5		5	5			5	
	100	I		5				5		
		J	5		5	5			5	

*Remarques :*

- En 2004 chaque test était réalisé sur 12 bouteilles car des analyses étaient faites sur des prélèvements intermédiaires à 4 et 8 jours d'expérience. Les premières analyses ont montré que ces points intermédiaires ne présentaient pas de différence par rapport aux témoins, nous avons donc décidé de comparer par la suite uniquement les communautés microbiennes en fin d'expérience, c'est pourquoi en 2005 et 2006 nous avons testé 5 à 6 bouteilles par condition.

- La sulcotrione n'a plus été testée en 2006, car cette substance présentait d'importants problèmes expérimentaux liés au dosage (Une part importante n'est pas retrouvée lors des analyses de contrôle après dilution), de telle sorte qu'on ne pouvait savoir à quelle concentration les populations phytoplanctoniques étaient réellement exposées.

**L'ensemble des résultats des analyses de concentrations en pesticides en début et fin d'expériences, ainsi que les compositions des mélanges sont présentés en annexe 3**

Les valeurs de concentrations en pesticides retrouvées par analyse en fin d'expériences sont généralement inférieures aux quantités ajoutées au début de l'expérience. Ceci peut s'expliquer au moins pour partie par la procédure de renouvellement, qui amène la concentration en pesticide à environ 50 % de sa valeur en 14 jours.

Les valeurs observées sont parfois nettement inférieures à 50 %, ceci pourrait s'expliquer par des mécanismes de piégeages des molécules actives dans la matière organique vivante ou inerte contenue dans l'eau de mer, et sur les parois de verre des bouteilles, ainsi que par une biodégradation des molécules actives.

Toutefois les demi-vies connues en eau douce (source Agritox) sont largement supérieures à 15 jours donc l'hypothèse d'une biodégradation est peu probable (annexe 3).

### 2.3.4 Techniques d'analyse des communautés microbiennes planctoniques :

Les échantillons de l'ensemble de la communauté microbienne de ces microcosmes ont été analysés par 3 méthodes :

- l'HPLC (Chromatographie Liquide Haute Performance) qui permet d'étudier le profil pigmentaire des communautés phytoplanctoniques en fonction des traitements appliqués.
- La TTGE (Temporal Thermal Gradient Gel Electrophoresis) qui est une électrophorèse dénaturante de produits PCR. Cette méthode vise à comparer les empreintes génétiques des communautés microbiennes planctoniques procaryotes et eucaryotes, lorsqu'elles sont soumises ou non à un ou plusieurs contaminants.
- La cytométrie en flux qui permet de caractériser certaines populations de cellules de la communauté, ainsi que leur abondance.

Les 2 premières méthodes ont été mises en place et testées au laboratoire, les analyses en cytométrie de flux ont été réalisées à la station biologique de Roscoff (UMR phytoplancton).

### 2.3.5 Résultats des analyses des profils pigmentaires par HPLC :

A partir des chromatogrammes obtenus à 440 nm et pour chaque échantillon, l'aire de chaque pigment a été rapportée à l'aire de la Chlorophylle *a*.

**Tableau 23 : Pigments détectés dans l'ensemble des expériences et abréviations utilisées dans le texte, figures et tableaux**

Noms des pigments	Abbréviations
19'-Butanoyloxyfucoxanthine	Hex-fuco
19'-Hexanoyloxyfucoxanthine	But-fuco
Chlorophylle <i>a</i>	Chl <i>a</i>
Chlorophylle <i>b</i>	Chl <i>b</i>
Chlorophylle <i>c</i> <sub>1</sub>	Chl <i>c</i> <sub>1</sub>
Chlorophylle <i>c</i> <sub>2</sub>	Chl <i>c</i> <sub>2</sub>
Chlorophylle <i>c</i> <sub>3</sub>	Chl <i>c</i> <sub>3</sub>
Chlorophyllide <i>a</i>	Chlide <i>a</i>
Diadinochrome	Diadchr
Diadinoxanthine	Diadino
Diatoxanthine	Diato
Dinoxanthine	Dino
Fucoxanthine	Fuco
Lutéine	Lut
Mg-2,4-divinyl phéoporphyrine <i>a</i> <sub>5</sub> monométhyle ester	Mg DVP
Monovinyl chlorophylle <i>c</i> <sub>3</sub>	MV Chl <i>c</i> <sub>3</sub>
Néoxanthine	Neo
Péridinine	Perid
Prasinoxanthine	Pras
Violaxanthine	Viola
Zéaxanthine	Zea

La majeure partie des données ne permettant pas une analyse de type ANOVA (non respect des conditions d'homogénéité des variances ou de normalité), les données ont été soumises à un test statistique non paramétrique de comparaison des médianes (Kruskall-Wallis, puis le cas échéant, Mann-Whitney).

La liste des pigments détectés lors des différentes expériences est présentée dans le Tableau 23.

### **2.3.5.1 Représentativité des microcosmes évaluée par la comparaison des profils pigmentaires:**

L'un des objectifs du travail en microcosmes était de réaliser l'expérimentation sur une communauté phytoplanctonique représentative de celle du milieu naturel environnant. C'est pourquoi un suivi des eaux de surface a été réalisé durant chaque expérience, avec 6 échantillons prélevés à chaque date correspondant à la préparation ou au renouvellement des microcosmes. On a ainsi pu vérifier si les témoins en microcosmes en fin d'expérience avaient une composition comparable à l'eau qui avait servi à remplir les bouteilles le premier jour de l'expérience et à les renouveler partiellement tous les 2 à 4 jours.

Les résultats sont présentés ici pour des conditions de début et fin de saison lors des expériences D (septembre 2004), et E (Juin 2005).

On peut constater (Figure 38, Figure 39) que les eaux de surface sur le site des Glénan présentent des variations importantes de leur composition pigmentaire sur les 12 ou 14 jours des expériences : ces analyses illustrent le caractère dynamique des populations phytoplanctoniques côtières.

Si l'on compare ces profils pigmentaires à ceux des témoins en microcosmes, on constate que pour la majorité des pigments, les valeurs du témoin se trouvent dans la fourchette des valeurs du milieu naturel. Ce sont 3 pigments sur 15 dans l'expérience D (Mg-DVP, But-fuco, Hex-fuco) (Figure 38) et 5 sur 15 dans l'expérience E (Chl  $c_3$ , Chlide  $a$ , But-fuco, Néo, Zea) (Figure 39), qui présentent, en fin d'expérience en microcosmes, des valeurs hors de cet intervalle. La But-fuco, seul pigment dont la valeur est modifiée (légèrement augmentée) dans les deux cas, est un biomarqueur des pélagophycées et des chrysophycées, (annexe 4). Pour autant, ces pigments ne sont pas exclusifs des groupes dont ils représentent les biomarqueurs. De plus, les autres pigments dont les valeurs dérivent par rapport au milieu naturel dans ces 2 expériences, sont représentés dans divers groupes taxonomiques. Il apparaît donc difficile d'attribuer ces variations à des groupes précis.

On peut supposer que certaines populations des communautés sont sensibles au confinement en bouteilles (impossibilité de migration verticale, active ou passive, des organismes ; lumière imparfaitement représentative des conditions de l'ensemble de la colonne d'eau...) et que de ce fait, la composition phytoplanctonique est légèrement modifiée.

Ratios pigmentaires des eaux de surface et des témoins par rapport à la chlorophylle a (moyennes + erreur-types) pendant la manip D

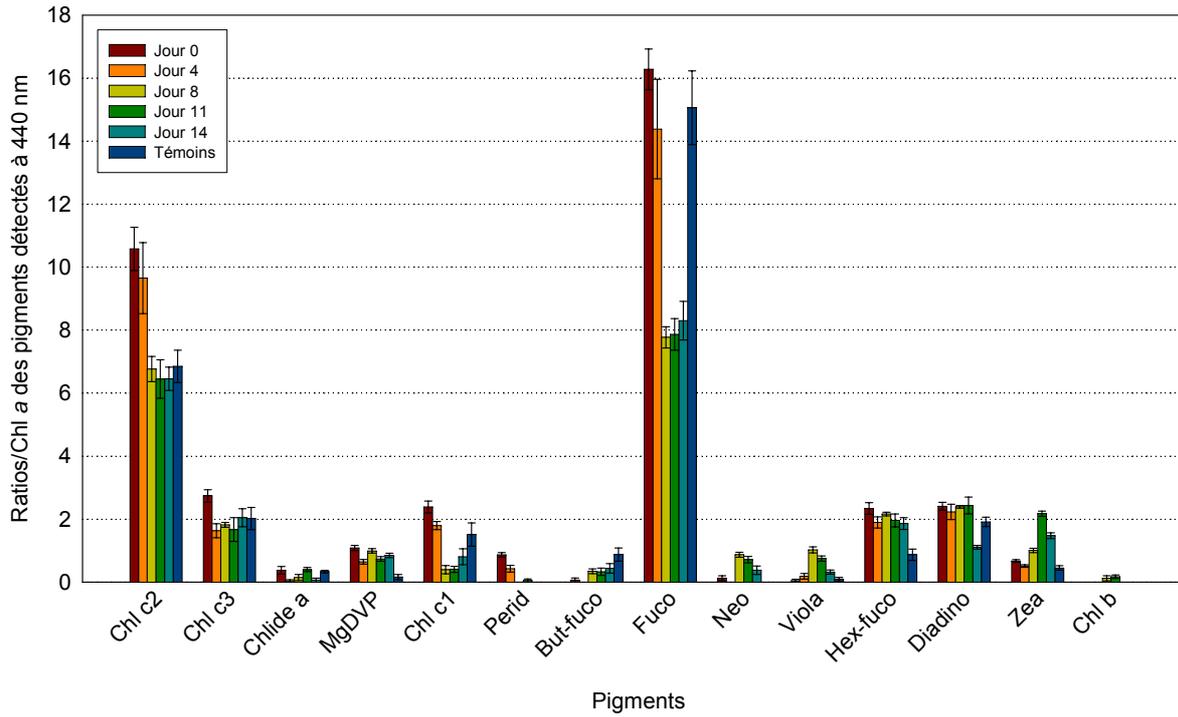


Figure 38 : Profils pigmentaires des eaux de surface et des témoins de l'expérience D.

Ratios pigmentaires des eaux de surface et des témoins par rapport à la chlorophylle a (moyennes + erreur-types) pendant la manip E

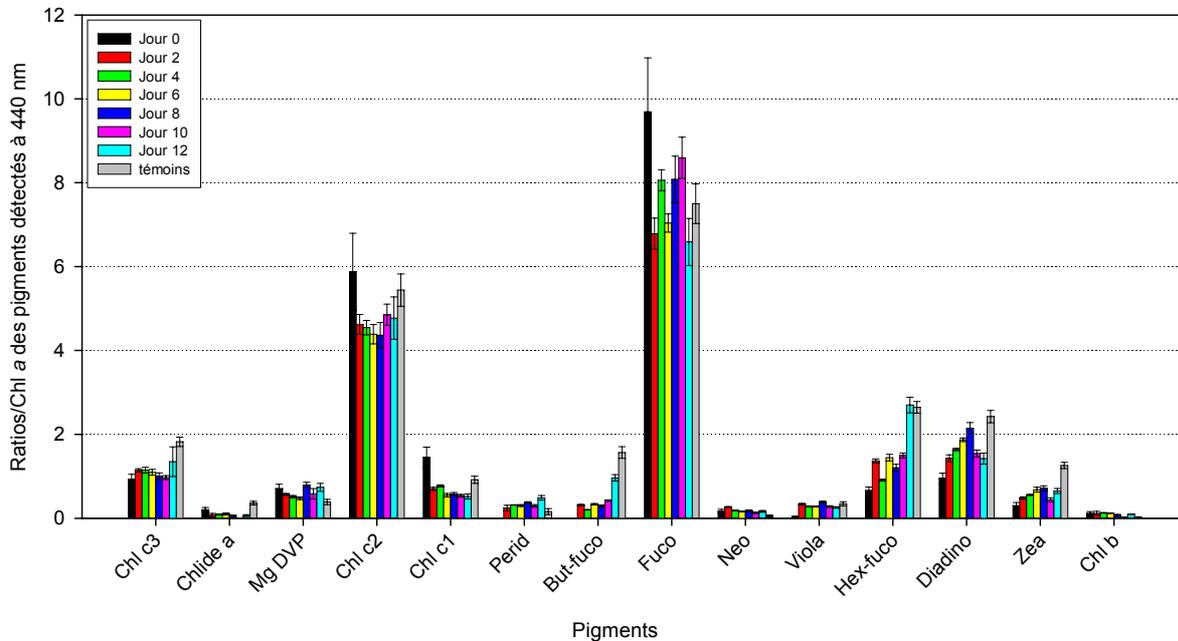


Figure 39 : Profils pigmentaires des eaux de surface et des témoins des expériences D et E.

Toutefois le profil pigmentaire général des témoins en microcosme est relativement semblable à celui des eaux du milieu environnant. Cela nous permet de conclure que la méthode de

renouvellement appliquée aux microcosmes, répond à notre objectif de maintenir en bouteille une communauté représentative de celle du milieu naturel.

Nous pouvons donc considérer que les effets éventuellement observés en bouteilles donnent une image réaliste des effets qui apparaissent réellement dans le milieu, dans des conditions comparables.

### 2.3.5.2 Evaluation de l'impact des pesticides par comparaison des profils pigmentaires

Le calcul des ratios pigmentaires par rapport à la Chlorophylle *a* a été appliqué à tous les échantillons des expériences réalisées. Une illustration du type de résultats obtenus est présentée ci-dessous (Figure 40), pour les microcosmes exposés à 1, 10 et 100 µg/L de Basamaïs, en comparaison avec les microcosmes Témoins : le Basamaïs à 1 et 10 µg/L entraîne une diminution des ratios de plusieurs pigments majoritaires par rapport à la Chl *a* (Chl *c*<sub>3</sub>, *c*<sub>2</sub>, *c*<sub>1</sub>, la Fuco, l'Hex-fuco et la Diadino). A 100 µg/L, moins de pigments semblent concernés (Chl *c*<sub>2</sub>, Fuco, Diadino) et les variations semblent moins importantes.

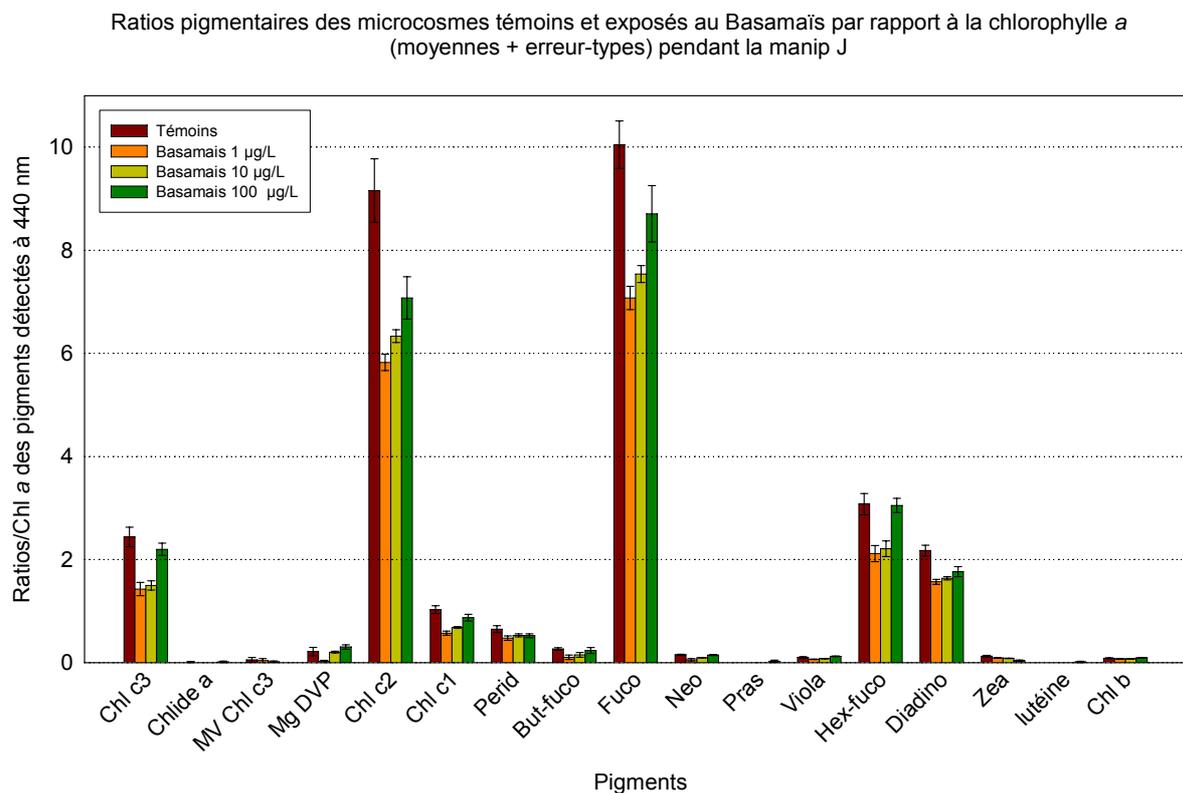


Figure 40 : Profils pigmentaires des microcosmes, Témoins et traitées au basamaïs pendant l'expérience J

Ce phénomène est dû en partie à une baisse relative de la chlorophylle *a*, augmentant ainsi artificiellement les ratios des autres pigments. Parmi les pigments affectés par le Basamaïs, seules la Fuco et l'Hex-fuco sont considérées comme des biomarqueurs de certains taxons, les diatomées et les prymnesiophycées respectivement.

Le bilan des effets des différents pesticides mis en évidence sur les profils pigmentaires des communautés est présenté au chapitre **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** (Tableau 24 à Tableau 29).

### 2.3.6 Résultats des analyses des empreintes génétiques des communautés par TTGE

Certains échantillons des expériences de 2006 ont été analysés par TTGE ; les contenus des microcosmes ont été filtrés, et la biomasse retenue sur les filtres a subi une extraction d'ADN. Ensuite les extraits d'ADN ont été amplifiés au niveau des gènes codant pour les ARNr 16S et 18S, et les produits d'amplification ont été déposés sur gel de polyacrylamide pour une migration dénaturante de 18h :

- conditions de migration pour séparer les ADN 16S : 70V, 100mA, de 63 à 68 °C en 18 h
- conditions de migration pour séparer les ADN 18S : 70V, 100mA, de 57 à 62 °C en 18 h

Une fois les gels photographiés, les bandes de l'ensemble des gels ont été annotées et les empreintes ont été analysées selon un critère présence/absence de bandes (1/0). La matrice binaire obtenue est utilisée pour des calculs de distances euclidiennes entre les différents profils et permet ainsi d'obtenir une matrice de similarité. Les dendrogrammes sont ensuite construits à partir de cette matrice de similarité selon la méthode du lien moyen. Pour plus de clarté, les distances sont exprimées en pourcentages de similarité entre les profils de migration.

#### 2.3.6.1 Analyse des communautés exposées à 100 µg/L de chlorpyrifos-éthyl :

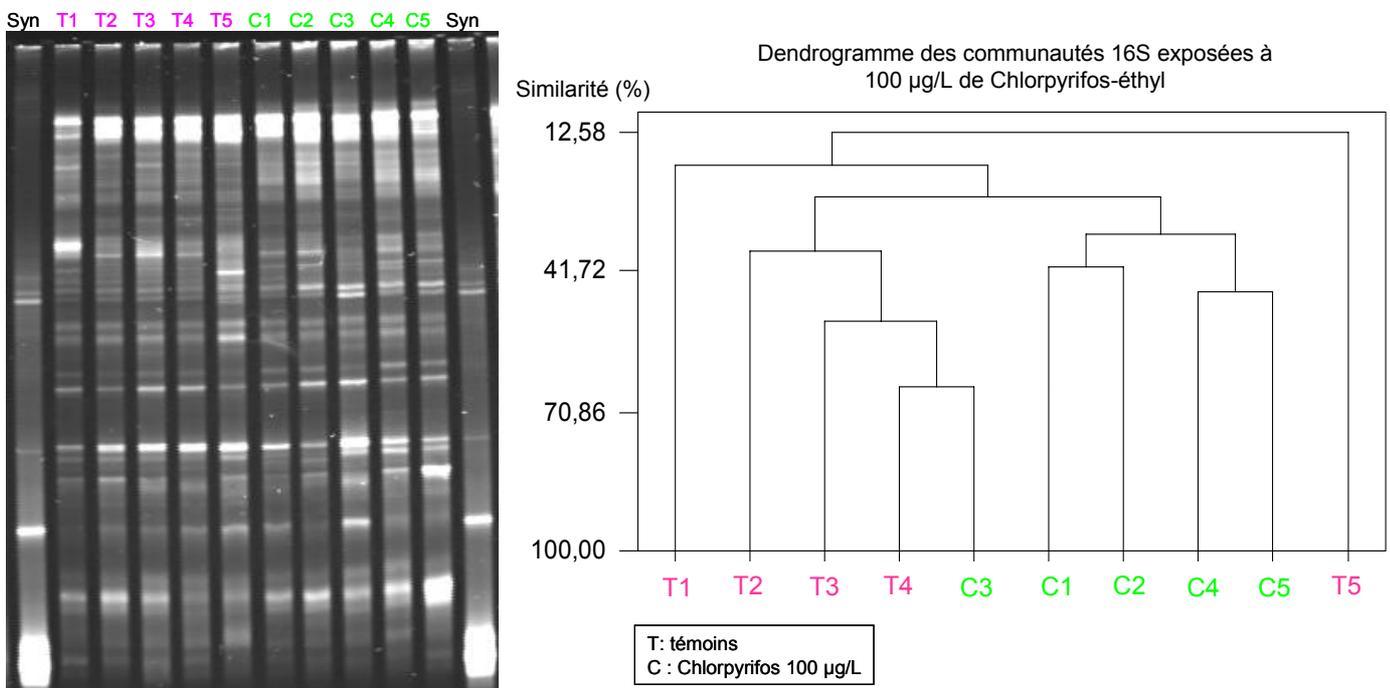


Figure 41 : Gel 16S et dendrogramme (T : témoins ; C : chlorpyrifos 100 µg/L ; Syn : souche de *Synechococcus sp.*)

ARN 16S : Le dendrogramme obtenu à partir du gel ci-dessus (Figure 41) montre 2 groupes de profils migratoires : les quatre échantillons C100 sont regroupés d'une part, et d'autre part

on observe un regroupement de trois témoins avec le dernier C100 (C3),. Les 2 témoins restant (T1 et T5) sont hors de ces 2 groupes.  
On peut donc conclure à un impact du chlorpyriphos à 100 µg/L sur la communauté procaryote.

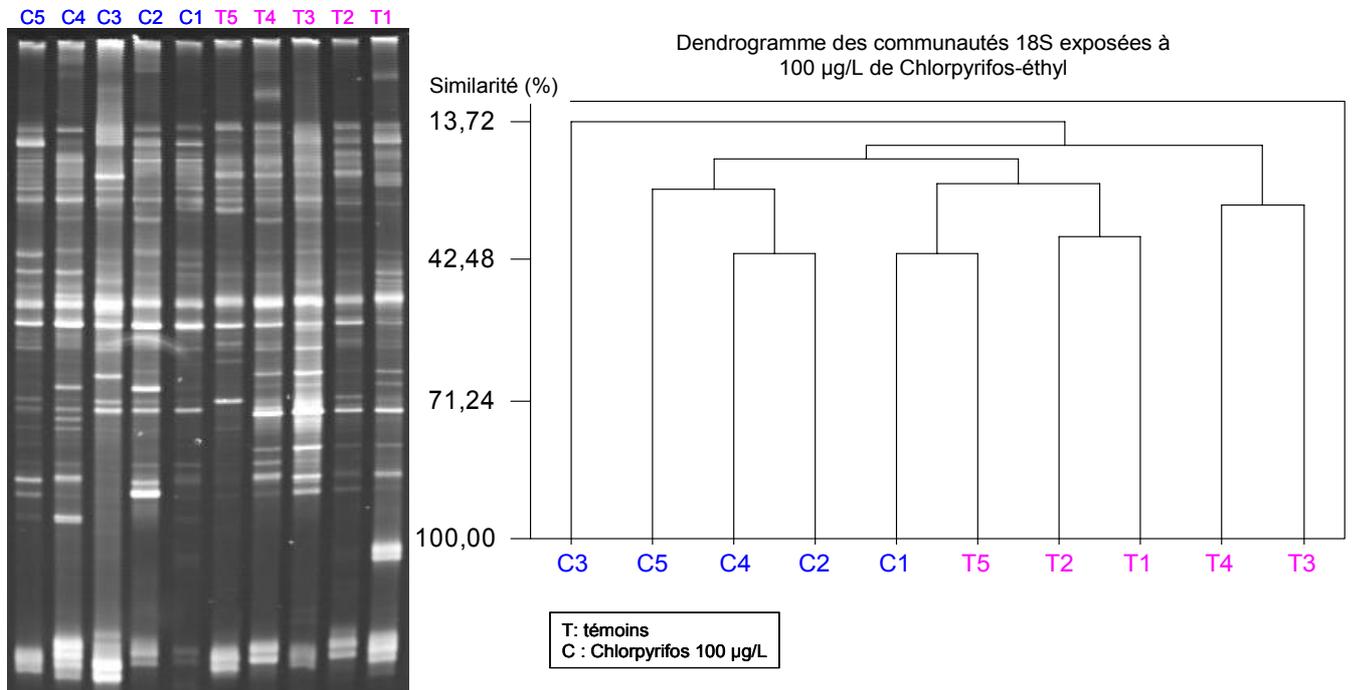


Figure 42 : Gel 18S (T : témoins ; C : chlorpyriphos 100 µg/L)

ARN 18S : Parmi les 4 communautés exposées, trois sont regroupées (Figure 42). De même, parmi les 5 témoins, 3 sont regroupés mais associent un échantillon traité. Les autres échantillons présentent une forte hétérogénéité. Ce dendrogramme suggère un effet du chlorpyriphos à 100 µg/L sur les communautés eucaryotes exposées.

### 2.3.7 Analyse des communautés exposées à 1, 10 et 100 µg/L d'époxiconazole: Epoxiconazole 1 µg/L

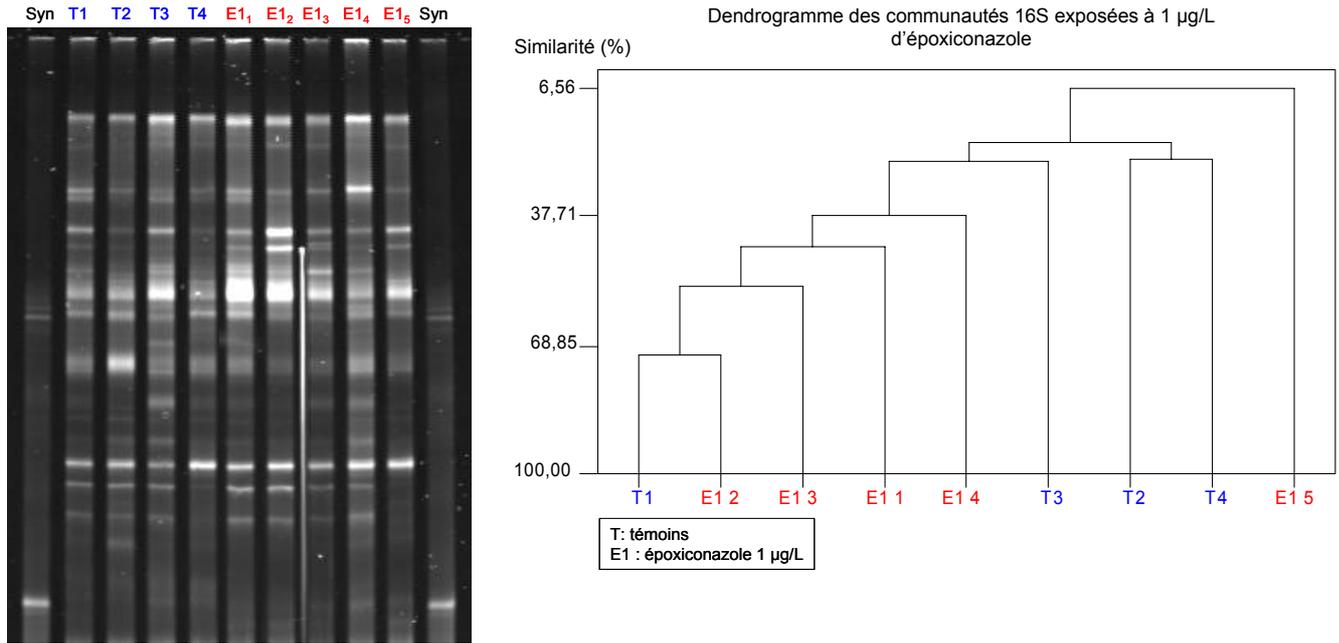


Figure 43 : Gel 16S (T : témoins ; E1 : époxiconazole 1 µg/L ; Syn : souche de *Synechococcus sp.*)

ARN 16S : Le dendrogramme obtenu permet de dégager 2 groupes : l'un fait apparaître un regroupement de 4 des 5 communautés exposées, auxquelles est associé un témoin, l'autre groupe, constitué de 3 communautés témoins et d'une communauté exposée, présente une forte hétérogénéité. (Figure 43). Il semble donc que l'époxiconazole à 1 µg/L modifie l'empreinte moléculaire de la communauté procaryote.

E1<sub>5</sub> E1<sub>4</sub> E1<sub>3</sub> E1<sub>2</sub> E1<sub>1</sub> T4 T3 T2 T1

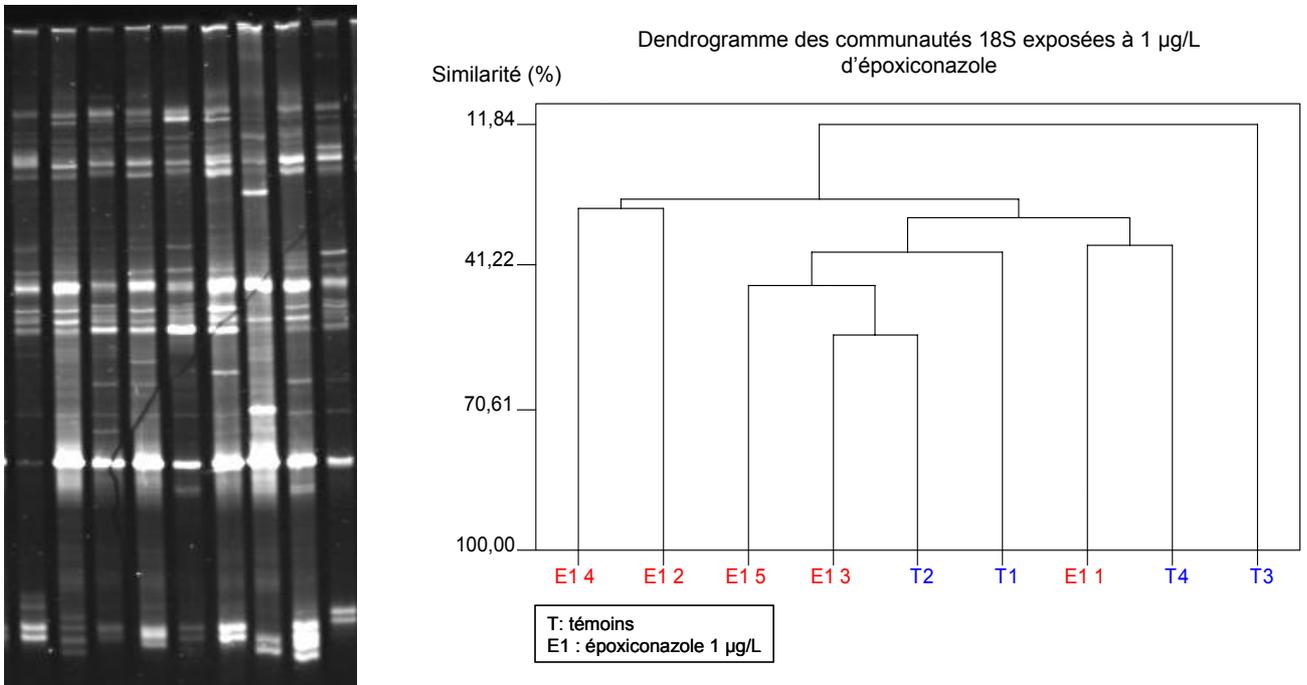


Figure 44 : Gel 18S (T : témoins ; E1 : époxiconazole 1 µg/L)

**ARN 18S :** Le dendrogramme obtenu montre un mélange des profils qui ne permet pas de dégager de regroupements par traitement (Figure 44). La communauté eucaryote ne semble pas impactée par l'époxiconazole à 1 µg/L.

Epoxiconazole 10 et 100 µg/L

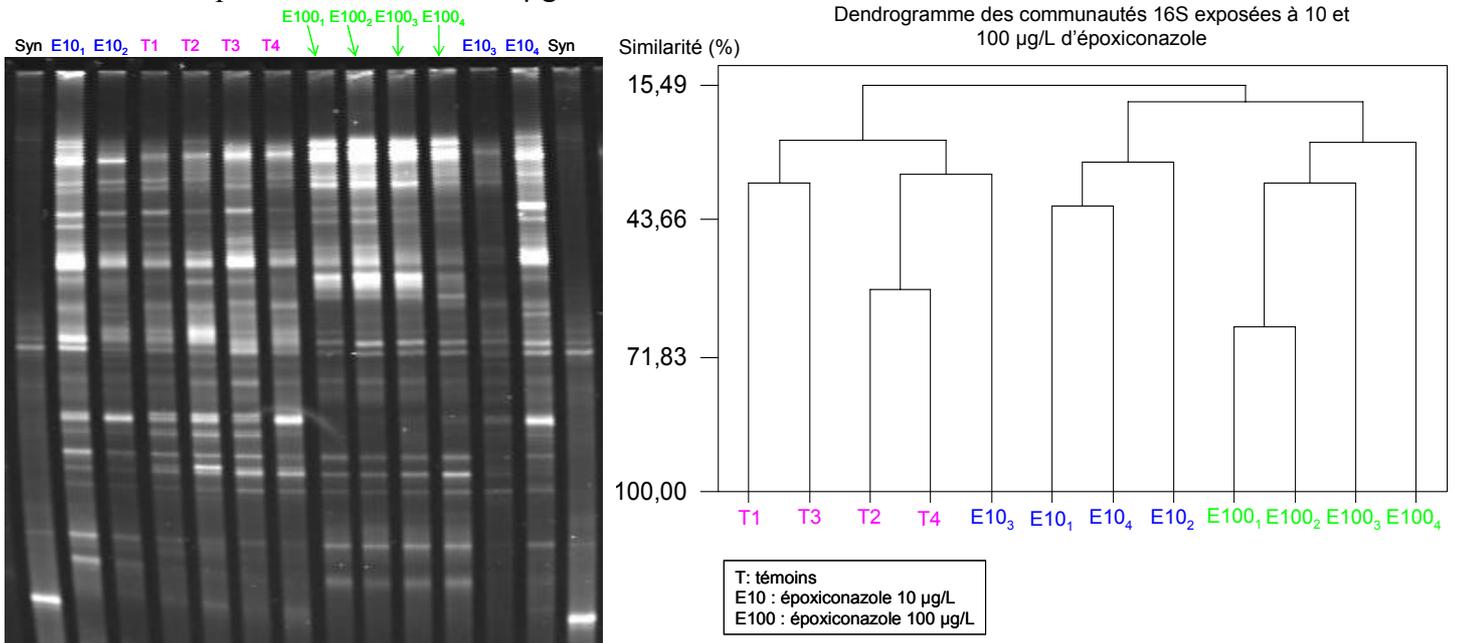


Figure 45 : Gel 16S (T : témoins ; E10 : époxiconazole 10 µg/L E100 : époxiconazole 100 µg/L ; Syn : souche de *Synechococcus sp.*)

**ARN 16 S :** Le dendrogramme fait apparaître 3 regroupements : les quatre E100 forment un groupe, trois E10 forment un deuxième groupe, et les 4 témoins ainsi que le dernier E10 constituent un troisième groupe (Figure 45). Les traitements à 10 et 100 µg/L d'époxiconazole sont eux-même regroupés ensuite. Ce dendrogramme nous permet de confirmer ce qui était déjà visible à l'œil nu sur le gel, à savoir d'importantes différences de profil entre les 3 traitements ; l'époxiconazole a clairement un impact sur les communautés procaryotes à 10 et 100 µg/L.

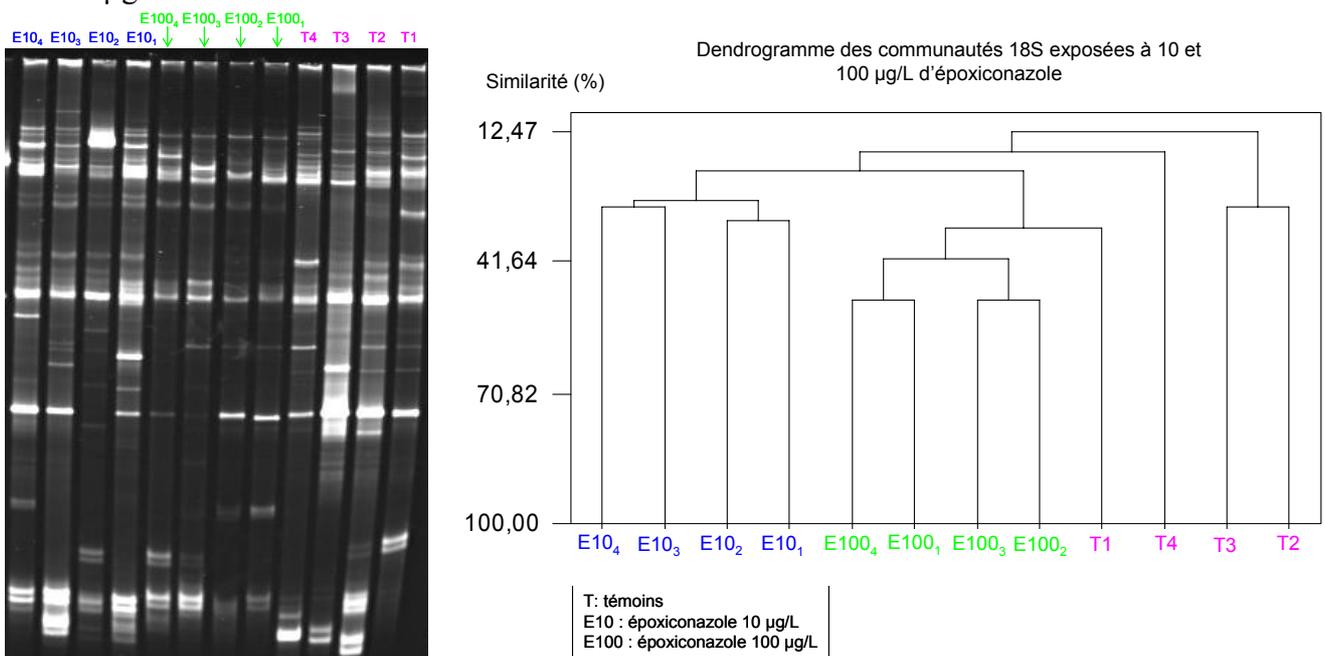
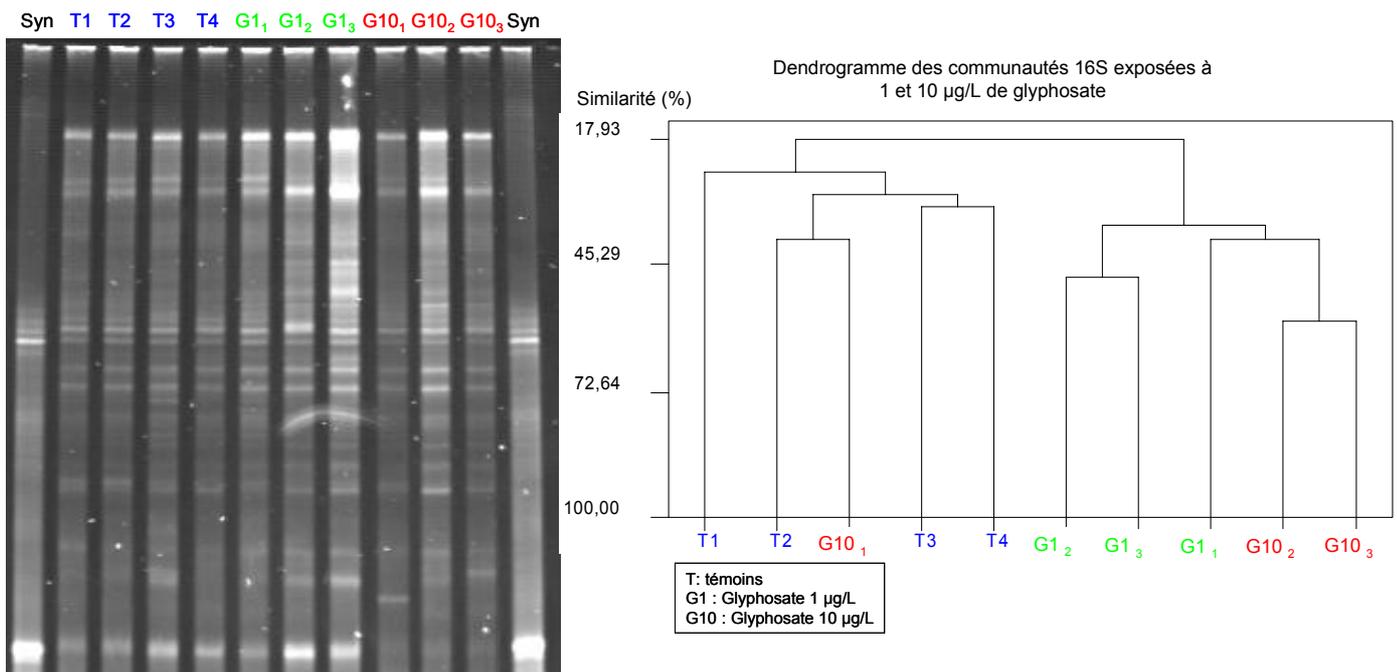


Figure 46 : Gel 18S (T : témoins ; E10 : époxiconazole 10 µg/L ; E100 : époxiconazole 100 µg/L)

ARN 18S : Le dendrogramme obtenu fait apparaître 2 regroupements principaux : les échantillons traités à 10 µg/L d'époxiconazole sont rassemblés, de même que ceux à 100 µg/L (Figure 46). Les témoins sont plus hétérogènes, et l'un est rattaché au groupe des 100 µg/L. Les 2 groupes de communautés traitées, sont également associées entre eux. Comme pour les communautés procaryotes, les profils de bandes permettent de discriminer les traitements appliqués. Les communautés eucaryotes sont donc également impactées par l'époxiconazole à 10 et 100 µg/L.

### 2.3.7.1 Analyse des communautés exposées à 1, 10 et 100 µg/L de glyphosate :

Les échantillons à 1, 10 et 100 µg/L ont tous été extraits en même temps, mais pour ceux à 100 µg/L il n'y avait pas d'ADN détecté dans les extraits obtenus. Nous pouvons donc supposer que le glyphosate pourrait avoir eu un impact négatif très important sur les organismes présents dans les microcosmes, de sorte qu'il ne restait pas assez de matière dans les échantillons pour avoir un extrait d'ADN. C'est pourquoi nous n'avons pas pu faire de TTGE sur les échantillons traités à 100 µg/L de glyphosate.



**Figure 47** : Gel 16S (T : témoins ; G1 : glyphosate 1 µg/L ; G10 : glyphosate 10 µg/L ; Syn : souche de *Synechococcus sp.*)

ARN 16S : Le dendrogramme fait apparaître 2 groupes principaux : d'un côté les communautés exposées au glyphosate, à 1 ou 10 µg/L, de l'autre les 4 témoins, regroupés avec un G10 (Figure 47). Le glyphosate, à 10 et à 1 µg/L provoque donc un changement net des profils des communautés procaryotes.

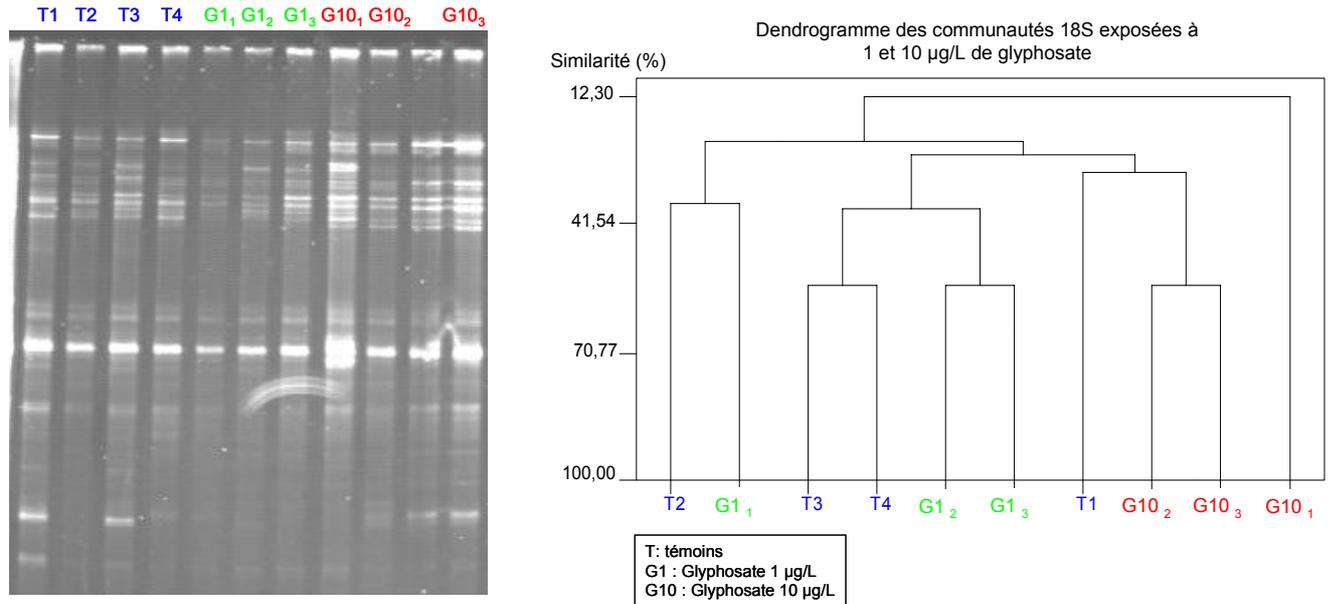


Figure 48 : Gel 18S (T : témoins ; G1 : glyphosate 1 µg/L ; G10 : glyphosate 10 µg/L)

ARN 18S : Deux des trois échantillons à 10 µg/L sont regroupés, et le troisième est fortement différent de tous les autres échantillons. Ceci suggère un éventuel impact du glyphosate à 10 µg/L (Figure 48). Les témoins et traitements à 1 µg/L se trouvent répartis de façon apparemment aléatoire, aucun effet du glyphosate n'est mis en évidence pour ces concentrations.

### 2.3.7.2 Conclusion sur les analyses des empreintes moléculaires par TTGE :

Les difficultés techniques liées à cette méthode délicate n'ont pas permis de réaliser une évaluation exhaustive de l'impact des pesticides retenus sur les empreintes moléculaires des communautés. Toutefois les résultats obtenus démontrent la sensibilité de cet outil. Ils permettent de montrer que le glyphosate (Round-up) et l'époxiconazole (Opus) modifient la communauté procaryote (test sur 16S) dès 1 µg/L de substance active, alors que la communauté eucaryote (test sur 18S) n'est impactées qu'à partir de 10 µg/L pour l'époxiconazole, et, semble-t-il, pour le glyphosate.

### 2.3.8 Analyse par cytométrie de flux :

Les échantillons des expériences D, G, I et J ont été analysés en cytométrie de flux. L'analyse a porté sur les paramètres concentration cellulaire, taille, fluorescence rouge (650 nm, chlorophylle) et orange (600 nm, phycoérythrine). L'ensemble des résultats pour lesquels des différences significatives ont été démontrées est présenté au chapitre 2.3.9. Un exemple de cytogramme est présenté ci-après, avec une comparaison entre les microcosmes Témoins et traités à 100 µg/L d'Opus (manip I, Figure 49) :

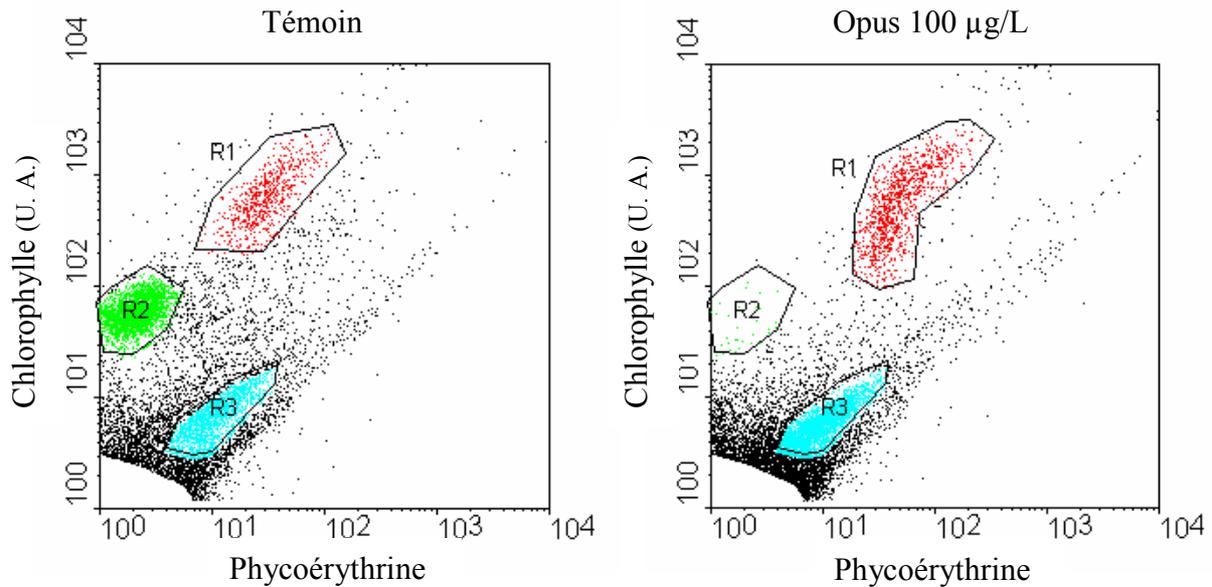


Figure 49 : Cytogrammes de microcosmes Témoins et exposés à 100 µg/L d'Opus (R1 : eucaryotes, R2 : prasinophycées, R3 : Synechococcus).

L'impact de l'Opus est nettement visible ici avec la disparition de la population des prasinophycées (Figure 49, R2). Les Synechococcus semblent aussi influencés par ce pesticide, car leur abondance est multipliée par 3. Les commentaires sur les effets de ce fongicide et des autres pesticides sont détaillés au chapitre suivant.

### 2.3.9 Synthèse des résultats des tests d'impact sur les microcosmes in situ

Les résultats présentés dans les tableaux suivants sont à considérer comme suit : pour la TTGE, toutes les analyses réalisées apparaissent dans les tableaux pour la cytométrie en flux et l'HPLC, afin de ne pas surcharger les tableaux, n'apparaissent que les résultats pour lesquels une différence significative a été mise en évidence par rapport aux témoins, (Mann-Whitney,  $p > 0.05$ ).

#### 2.3.9.1 Herbicides

##### Basamaïs

Le Basamaïs testé à 0.1 µg/L en 2004 et 2005 n'a pas montré d'effet sur les pigments des communautés phytoplanctoniques.

*Effet sur les populations (cytométrie en flux) :*

Cet herbicide défini comme inhibiteur du photosystème II provoque une diminution équivalente de l'abondance des eucaryotes à 1 et 10 µg/L (Tableau 24), alors qu'à 100 µg/L la population des prasinophycées voit son abondance augmenter fortement : elle a doublé par rapport aux témoins. A 100 µg/L, le Basamaïs semble donc avoir un effet dopant sur la population de prasinophycées. Tandis que Les eucaryotes totaux ne sont apparemment plus affectés.

**Tableau 24 : Effets du Basamaïs sur les communautés phytoplanctoniques naturelles : populations et pigments**

Manip Période	Concentration ( $\mu\text{g/L}$ )	Analyse	Paramètre	Mesure	Effet/Témoin
J juil-août 2006	1	cytométrie en flux	Eucaryotes	cellules/mL	$\downarrow \times 0,8$
		HPLC	Chl $c_3$	aire/aire chl a	$\downarrow \times 0,6$
			Chl $c_2$		$\downarrow \times 0,6$
			Chl $c_1$		$\downarrow \times 0,6$
			But-fuco		$\downarrow \times 0,4$
			Fuco		$\downarrow \times 0,7$
			Neo		$\downarrow \times 0,4$
			Hex-fuco		$\downarrow \times 0,7$
			Diadino		$\downarrow \times 0,7$
J juil-août 2006	10	cytométrie en flux	Eucaryotes	cellules/mL	$\downarrow \times 0,7$
		HPLC	Chl $c_3$	aire/aire chl a	$\downarrow \times 0,6$
			Chl $c_2$		$\downarrow \times 0,7$
			Chl $c_1$		$\downarrow \times 0,7$
			Fuco		$\downarrow \times 0,8$
			Neo		$\downarrow \times 0,6$
			Hex-fuco		$\downarrow \times 0,7$
			Diadino		$\downarrow \times 0,8$
			J juil-août 2006		100
HPLC	Diadino	aire/aire chl a		$\downarrow \times 0,8$	
	Zea			$\downarrow \times 0,3$	

*Effet sur les pigments (HPLC) :*

Un effet comparable apparaît pour des concentrations de 1 et 10  $\mu\text{g/L}$  : les mêmes pigments (Chl  $c_3$ ,  $c_2$ ,  $c_1$ , Fuco, Neo, Hex-fuco, Diadino) sont impactés à la baisse dans des proportions équivalentes dans les 2 cas, seule la But-fuco voit son ratio diminuer à 1  $\mu\text{g/L}$  et pas à 10  $\mu\text{g/L}$ . Aucun effet significatif du Basamaïs n'a été détecté pour les concentrations en Chlorophylle  $a$  des échantillons : on peut donc considérer que les variations des ratios pigmentaires observées ne sont pas imputables à ce facteur. Les chlorophylles et la Diadino sont présentes dans de nombreux groupes taxonomiques (annexe 4 : tableau Lampert) et ne permettent pas de soupçonner un effet sur un groupe défini ; par contre, la Fuco est considérée comme un biomarqueur des diatomées, la Neo est un biomarqueur des chlorophycées et prasinophycées et l'Hex-fuco est un biomarqueur des prymnesiophycées.

Ces données pourraient suggérer un effet assez large au niveau des taxons cités, effet visible en cytométrie en flux avec la baisse d'abondance des eucaryotes à 1 et 10  $\mu\text{g/L}$  de Basamaïs. Cependant, aucune différence n'a été mise en évidence pour la concentration en Chlorophylle  $a$ . La concentration cellulaire en chlorophylle pourrait être augmentée chez les eucaryotes et/ou chez *Synechococcus*.

Le Basamaïs à 100  $\mu\text{g/L}$  entraîne une diminution du ratio de Zea, qui est considéré comme le biomarqueur des cyanophycées (annexe 4 : tableau Lampert). Pourtant la cytométrie ne met pas en évidence de diminution de la population de *Synechococcus*.

*Conclusion :*

Le Basamaïs semble avoir 2 types d'effets sur les abondances des populations, avec un basculement entre 10 et 100  $\mu\text{g/L}$ , aussi bien sur la cible que sur le sens de la variation.

L'action du Basamaïs sur le photosystème II pourrait expliquer la chute des populations eucaryotes, mais aussi induire une surproduction de Chl a, mais certaines populations peuvent aussi se nourrir sur un mode hétérotrophe et « compenser » ainsi les effets du pesticide.

### Round'up

Le Round'up est un herbicide dont l'action revendiquée est l'inhibition de l'EPSP synthase, une enzyme impliquée dans la synthèse de certains acides aminés essentiels.

Le Round'up testé à 0.1 µg/L en 2004 et 2005 n'a pas eu d'effet visible sur les communautés phytoplanctoniques.

#### *Effet sur les empreintes génétiques des communautés (TTGE) :*

Cet herbicide semble avoir un effet sur l'empreinte génétique de la communauté procaryote dès 1 µg/L (Tableau 25), par contre l'empreinte eucaryote ne semble pas affectée, même à 10 µg/L.

**Tableau 25 : Effets du Round'up sur les communautés microbiennes naturelles : empreintes génétiques, populations et pigments**

Manip Période	Concentration (µg/L)	Analyse	Paramètre	Mesure	Effet/Témoin	
J juil-août 2006	1	TTGE	----- 16S ----- 18S	% similarité	oui non	
J juil-août 2006	10	TTGE	----- 16S ----- 18S	% similarité	oui non ?	
		cytométrie en flux	Prasinophycées	cellules/mL	↑ × 1,4	
J juil-août 2006	100	cytométrie en flux	Prasinophycées	cellules/mL	↓ × 0,7	
				Phycoérythrine (u.a.)	↑ × 1,2	
			Eucaryotes	Phycoérythrine (u.a.)	↑ × 1,2	
			Synechococcus	Chlorophylle (u.a.)	↑ × 2,6	
			Phycoérythrine (u.a.)	↑ × 2,8		
		HPLC	Chl c <sub>1</sub>	aire/aire Chl a	ng/L	↑ × 1,8
			Viola			↓ × 0,4
Hex-fuco	↓ × 0,3					
Chl b	↓ × 0,05					
	[Chl a]			↑ × 2,3		

#### *Effet sur les populations (cytométrie) :*

L'abondance des prasinophycées (Tableau 25) est augmentée de manière significative à 10 µg/L, alors qu'elle est diminuée à 100 µg/L et que son contenu cellulaire en phycoérythrine augmente. Par contre, pour les populations d'eucaryotes et de *Synechococcus*, bien que leurs abondances ne soient pas affectées par le pesticide, les contenus cellulaires en pigments sont modifiés : la fluorescence « phycoérythrine » est augmentée chez les eucaryotes et les *Synechococcus*, et la chlorophylle est également augmentée chez les *Synechococcus*.

Aucun effet n'a été démontré sur *Synechococcus* à 1 et 10 µg/L, ce qui laisserait penser que les variations observées en TTGE seraient plutôt imputables à d'autres procaryotes photosynthétiques ou non-photosynthétiques.

*Effet sur les pigments (HPLC) :*

Aucune variation significative des pigments n'a été détectée à 1 et 10 µg/L, ce qui tendrait à confirmer que les variations vues en TTGE viendraient plutôt de procaryotes non-photosynthétiques.

Par contre, à 100 µg/L, la concentration en Chlorophylle *a* a plus que doublé (Tableau 25). On peut donc penser que c'est ce facteur qui entraîne la diminution des ratios de Viola, Hex-fuco et Chl *b*. Le ratio de chl *c*<sub>1</sub> a quasiment doublé alors qu'il est calculé sur une aire qui a elle-même beaucoup augmenté, on peut donc dire que cela reflète certainement une modification de la communauté imputable à quelques taxons bien définis, ce pigment n'étant pas considéré comme un biomarqueur.

L'augmentation de Chlorophylle *a* observée peut être mise en relation avec l'augmentation de concentration en chlorophylle des *Synechococcus*, (cytométrie) aucune des 3 populations suivies en cytométrie n'ayant vu son abondance augmenter.

*Conclusion :*

Le Round'up semble avoir un effet sur les bactéries hétérotrophes aux plus basses concentrations (1 et 10 µg/L). A 10 et 100 µg/L, même si un effet sur l'abondance des prasinophycées a été détecté, cet effet n'est pas confirmé par les pigments biomarqueurs de ce groupe.

Cet herbicide semble toutefois influencer sur le contenu cellulaire en pigments de certaines populations, visible en HPLC en cytométrie. Là encore, le Round'up paraît affecter plusieurs taxons, en modifiant l'abondance des prasinophycées et probablement les performances photosynthétiques et/ou métaboliques de plusieurs populations. On peut aussi noter une inversion de tendance pour l'abondance des prasinophycées entre 10 et 100 µg/L.

Ce pesticide semble avoir des effets variés et complexes sur les communautés microbiennes marines.

**Milagro**

Cet herbicide est un inhibiteur de l'enzyme ALS (acétolactate synthase) qui conduit à la synthèse d'acides aminés ramifiés.

Le Milagro n'a aucun effet significatif sur les paramètres mesurés quand les communautés naturelles sont exposées à 1 et 10 µg/L (Tableau 26). A 100 µg/L, 2 pigments voient leur ratio modifié de façon significative, avec une augmentation pour la Perid qui est un biomarqueur de dinoflagellés, et une diminution pour la Zea qui est un biomarqueur de cyanophycées (annexe 4 : tableau Lampert). On pourrait donc penser que ces groupes d'organismes sont impactés par le pesticide, toutefois, aucune différence n'est apparue en cytométrie en flux, le type d'impact reste donc à clarifier.

Le Milagro semble tout de même nettement moins toxique que les autres herbicides sur les communautés testées.

**Tableau 26 : Effets du Milagro sur les communautés phytoplanctoniques : pigments**

Manip Période	Concentration (µg/L)	Analyse	Paramètre	Mesure	Effet/Témoin
J juil-août 2006	100	HPLC	Perid Zea	aire/aire chl a	↑ × 1,8 ↓ × 0,2

**Frontière**

Le Frontière à 0.1 µg/L n'a pas eu d'effets significatifs sur les ratios pigmentaires, ni sur les critères analysés en cytométrie en flux, lors des expériences conduites en 2004 et 2005.

Les communautés phytoplanctoniques naturelles exposées au Frontière à 1, 10 et 100 µg/L pendant 12 jours semblent impactées par cet herbicide, mais seulement au niveau pigmentaire (Tableau 27) : les ratios de nombreux pigments ont significativement baissé par rapport aux témoins. Cependant, les ratios pigmentaires sont calculés avec la Chlorophylle *a* pour référence, et la concentration de ce pigment est significativement plus élevée dans les 3 traitements au Frontière. On peut donc supposer que les baisses de ratios sont dues à l'augmentation de la concentration de Chlorophylle *a*. Ce pigment étant un indicateur de biomasse autotrophe totale (Jeffrey, 1997 dans Lampert, 2001), il semble que le Frontière ait un effet « dopant » sur une partie au moins de la communauté phytoplanctonique, et ce dès 1 µg/L, avec un effet plus marqué à partir de 10 µg/L. Les analyses faites en cytométrie en flux n'apparaissent pas dans ce tableau car aucune différence significative n'a été détectée, que ce soit pour les concentrations cellulaires ou les pigments. L'analyse des pigments par HPLC semble ici plus sensible que la cytométrie en flux.

**Tableau 27 : Effets du Frontière sur les communautés phytoplanctoniques : pigments**

Manip Période	Concentration (µg/L)	Analyse	Paramètre	Mesure	Effet/Témoin
I juin 2006	1	HPLC	Chl <i>c</i> <sub>3</sub>	aire/aire chl a	↓ × 0,5
			Chl <i>c</i> <sub>2</sub>		↓ × 0,5
			But-fuco		↓ × 0,4
			Fuco		↓ × 0,6
			Viola		↓ × 0,4
			Hex-fuco		↓ × 0,6
			Diadino		↓ × 0,6
			[chl a]	ng/L	↑ × 1,7
I juin 2006	10	HPLC	Chl <i>c</i> <sub>3</sub>	aire/aire chl a	↓ × 0,6
			Mg DVP		↓ × 0,4
			Chl <i>c</i> <sub>2</sub>		↓ × 0,5
			Chl <i>c</i> <sub>1</sub>		↓ × 0,6
			But-fuco		↓ × 0,5
			Fuco		↓ × 0,5
			Neo		↓ × 0,4
			Viola		↓ × 0,4
			Hex-fuco		↓ × 0,7
			Zea		↓ × 0,4
			[chl a]		ng/L
			I juin 2006	100	HPLC
Mg DVP	↓ × 0,4				
Chl <i>c</i> <sub>2</sub>	↓ × 0,5				
Chl <i>c</i> <sub>1</sub>	↓ × 0,6				
But-fuco	↓ × 0,4				
Fuco	↓ × 0,6				
Neo	↓ × 0,4				
Viola	↓ × 0,4				
Hex-fuco	↓ × 0,5				
Diadino	↓ × 0,7				
Zea	↓ × 0,4				
[chl a]	ng/L	↑ × 2,4			

### 2.3.9.2 Insecticide

#### Dursban

Cet insecticide est un inhibiteur de l'acétylcholineestérase.

##### *Effet sur les pigments (HPLC) :*

Les communautés exposées à 1 µg/L de Dursban en été 2005 aux Glénan semblent impactées au niveau des ratios de 3 pigments (Tableau 28), avec une diminution pour la Chl  $c_3$ , la But-fuco (biomarqueur de chrysophycées et pélagophycées, annexe 4) et l'Hex-fuco (biomarqueur de prymnesiophycées). On peut donc penser que ce pesticide a potentiellement un impact dès 1 µg/L sur certains groupes de phytoplancton à un moment donné.

Par contre, ces résultats n'ont pas été retrouvés lors de l'expérience menée en 2006 à Port-la-Forêt : à 1 µg/L, mais également à 10 et 100 µg/L de Dursban, aucune variation significative des ratios pigmentaires n'a été alors observée. Il semblerait donc que les résultats soient variables d'une année sur l'autre et d'un site à un autre, et qu'ils dépendent probablement des conditions environnementales qui gouvernent la composition des communautés phytoplanctoniques présentes. De plus, on peut se demander dans quelle mesure la localisation des expériences influence les résultats : les communautés présentes au niveau de l'archipel des Glénan seraient-elles moins impactées et donc plus sensibles (Cf PICT)

##### *Effet sur les empreintes génétiques des communautés (TTGE) :*

Les communautés procaryotes et eucaryotes exposées à 100 µg/L de Dursban semblent modifiées par rapport aux témoins (Figure 41 et Figure 42).

##### *Effet sur les populations (cytométrie) :*

Seul le contenu cellulaire des eucaryotes en phycoérythrine (Tableau 28) semble modifié par le Dursban à 100 µg/L.

**Tableau 28 : Effets du Dursban sur les communautés microbiennes naturelles : empreintes génétiques, populations et pigments**

Manip Période	Concentration (µg/L)	Analyse	Paramètre	Mesure	Effet/Témoin
F juin-juil 2005	1	HPLC	Chl $c_3$	aire/aire chl a	↓ × 0,7
			But-fuco		↓ × 0,4
			Hex-fuco		↓ × 0,6
J juil-août 2006	100	TTGE	16S	% similarité	oui
			18S		oui
		cytométrie en flux	Eucaryotes	Phycoérythrine (u.a.)	↑ × 1,4

##### *Conclusion :*

Le Dursban semble avoir des effets assez variables qui mériteraient d'être confirmés. Aucune tendance ne se dégage des expériences menées avec ce pesticide, sa toxicité apparaît moindre comparée à celle de certains herbicides.

### 2.3.9.3 Fongicide

#### Opus

Ce fongicide inhibe la 14-a déméthylation des stérols.

*Effet sur les empreintes génétiques des communautés (TTGE) :*

L'Opus testé à 1, 10 et 100 µg/L entraîne une variation des profils électrophorétiques obtenus pour la communauté 16S (Tableau 29), ce qui suggère une modification au niveau des bactéries phototrophes ou hétérotrophes. La communauté des eucaryotes ne semble pas modifiée par le fongicide à 1 µg/L, mais à 10 et 100 µg/L. Les bactéries seraient donc plus sensibles aux faibles doses d'Opus.

*Effet sur les pigments (HPLC) :*

L'opus à 1 µg/L entraîne la diminution significative des ratios pigmentaires de la Chl  $c_2$  et de la Fuco (Tableau 29), cette dernière étant un biomarqueur de diatomées, et la Chl  $c_2$  étant également retrouvé chez les diatomées, (annexe 4 : tableau Lampert), on peut supposer un léger impact du fongicide sur les diatomées dès 1 µg/L. Il faut toutefois remarquer qu'aucune variation significative des ratios pigmentaires n'est visible pour le traitement à 10 µg/L. La concentration en Chl  $a$  dans les échantillons traités avec 100 µg/L d'Opus a quasiment doublé par rapport à celle des témoins : le fongicide paraît donc avoir un effet dopant sur une partie au moins de la biomasse autotrophe. Du fait de cette augmentation, certains pigments voient leur ratio diminuer (Mg DVP, chl  $c_1$ , But-fuco et Fuco). D'autres (chl  $c_3$ , MV chl  $c_3$  et Hex-fuco) ont augmenté assez fortement. Parmi eux, l'Hex-fuco, biomarqueur des prymnesiophycées (annexe 4 : tableau Lampert), ainsi que la chl  $c_3$ , également caractéristique des prymnesiophycées ont fortement augmentés.

**Tableau 29 : Effets de l'Opus sur les communautés microbiennes naturelles : empreintes génétiques, populations et pigments**

Manip Période	Concentration (µg/L)	Analyse	Paramètre	Mesure	Effet/Témoin
I juin 2006	1	TTGE	16S 18S	% similarité	oui non
		HPLC	Chl $c_2$ Fuco	aire/aire chl a	↓ × 0,8 ↓ × 0,8
I juin 2006	10	TTGE	16S 18S	% similarité	oui oui
I juin 2006	100	cytométrie en flux	Synechococcus	cellules/mL	↑ × 3,3
			Prasinophycées		↓ × 0,02
		HPLC	Chl $c_3$	aire/aire chl a	↑ × 1,9
			MV Chl $c_3$		↑ × 10,5
			Mg DVP		↓ × 0,5
			Chl $c_1$		↓ × 0,2
			But-fuco		↓ × 0,5
Fuco	↓ × 0,5				
Hex-fuco	↑ × 2,6				
TTGE	[chl a]	ng/L	↑ × 1,8		
		TTGE	16S 18S	% similarité	oui oui

L'Opus a donc visiblement eu des effets à 100 µg/L sur certains taxons de la communauté phytoplanctonique.

*Effet sur les populations (cytométrie) :*

L'Opus à 100 µg/L, a entraîné d'importantes variations dans les abondances des populations de *Synechococcus* (qui a plus que triplé) et de prasinophycées (qui a quasiment disparu), alors qu'aucun effet n'était visible sur ces populations en cytométrie à 1 et 10 µg/L.

On peut donc dire que l'Opus à 100 µg/L a un effet massif aussi bien sur certains eucaryotes que sur certains procaryotes.

*Conclusion :*

L'Opus semble avoir des effets à 1 et 10 µg/L, mis en évidence au niveau des empreintes génétiques principalement. Par contre, à 100 µg/L, les trois méthodes d'analyses montrent des variations significatives par rapport aux témoins. Les résultats de cytométrie en flux semblent corroborer ceux de la TTGE, car 2 populations, l'une eucaryote (prasinophycées) et l'autre procaryote (*Synechococcus*), sont fortement affectées par ce fongicide. Il semblerait que l'augmentation de concentration en Chlorophylle *a* puisse être liée à l'augmentation de la population de *Synechococcus*.

### **2.3.10 Conclusions sur les expérimentations en microcosmes in situ**

Parmi les 4 herbicides testés, trois (Basamaïs, Round-up et Frontière) provoquent une modification de la communauté microplanctonique, perceptible dès 1 µg/L de substance active. Plus inattendu, on observe également, une perturbation de la flore par l'Opus, un fongicide, dès 1 µg/L de substance active.

Les perturbations concernent:

- la modification des proportions de pigments par cellules (effets physiologiques).
- la modification des proportions relatives des populations (différences de sensibilités).
- la modification de la concentration totale de la flore phytoplanctonique mesurée par la Chl *a*.

Certains taxons semblent particulièrement impactés (à la hausse ou à la baisse), et mériteraient des études spécifiques. Citons en particulier les prasinophycées, prymnesiophycées, et cyanophycées.

Les effets varient selon les pesticides et les concentrations. On peut penser que, à chaque condition correspond une modification de l'avantage compétitif des populations présentes (seuil de sensibilité différent selon les espèces), induisant l'augmentation ou la diminution relative des populations.

Lorsqu'elles ont été analysées, les empreintes moléculaires mettent en évidence un effet sur les populations procaryotes dès 1µg/L, alors que l'effet n'est perceptible qu'à 10 µg/L pour les eucaryotes. Il n'est pas possible de trancher entre l'hypothèse d'une plus grande sensibilité des procaryotes aux pesticides, ou bien d'une sensibilité plus grande de cette méthode d'analyse lorsqu'elle est appliquée aux procaryotes.

Il semble que les pesticides présentent un effet sur le profil pigmentaire à la fois par la modification de la proportion relative de populations ayant des caractéristiques pigmentaires différentes, et par la modification des concentrations cellulaires en pigments.

Cela explique que l'HPLC, par ailleurs de mise en œuvre relativement facile, soit une méthode présentant une bonne sensibilité.

### 3 La réponse des microalgues en cultures monospécifiques

#### 3.1 Comparaison de la sensibilité de trois espèces phytoplanctoniques compétitrices présentes en estuaire de Penzé, au mélange de pesticides

La présence simultanée des trois espèces de dinoflagellés : *Alexandrium minutum* (producteur de toxine paralysante PST), *Scrippsiella trochoidea* et *Heterocapsa triquetra* dans l'estuaire de Penzé laisse à penser que lorsque la prédominance d'*A. minutum* est observée (efflorescence), les conditions environnementales sont plus favorables à cette dernière espèce. Parmi les facteurs sélectifs possibles nous avons testé les pesticides étudiés dans le projet.

La méthode prévue consistait à contaminer une culture mixte des trois espèces et observer les variations des densités respectives. Le principal obstacle à son application était l'effet allélopathique des excréments d'*Alexandrium minutum* vis-à-vis de ses compétiteurs, ce qui contribuait à leur élimination même en conditions non contaminées (Arzul *et al.*, 1999 ; Arzul et Gentien, 2005). C'est pourquoi une adaptation de la méthode utilisée sur le phytoplancton naturel dans le test PICT décrit précédemment (paragraphe 2.2.2) était appliquée sur chacune des algues, en culture monospécifique. Les CSEO et CE50 obtenues ont permis de comparer leur sensibilité aux contaminants.

##### 3.1.1 Matériel et méthode

Les souches utilisées sont cultivées en laboratoire en milieu f/2 (Guillard and Ryther, 1962) . *Alexandrium minutum* : AM99PZ (taille 25 µm) ; *Scrippsiella trochoidea* : ST97PZ (30 µm) ; *Heterocapsa triquetra* : HT99PZ (24 µm). Les trois espèces sont issues d'isollements provenant d'efflorescences en estuaire de rivière de Penzé situé sur la côte Nord-Bretagne. Le mélange de pesticides utilisés en formulations est le même que celui utilisé pour les tests PICT.

La méthode appliquée est décrite ci-dessus, sur les cultures âgées de huit jours, en fin de phase exponentielle de croissance.

##### 3.1.2 Résultats

La production primaire chez *A. minutum* n'est pas significativement atténuée par les plus faibles concentrations de pesticides, et la CSEO est de 50 µg/L du mélange total de molécules actives.

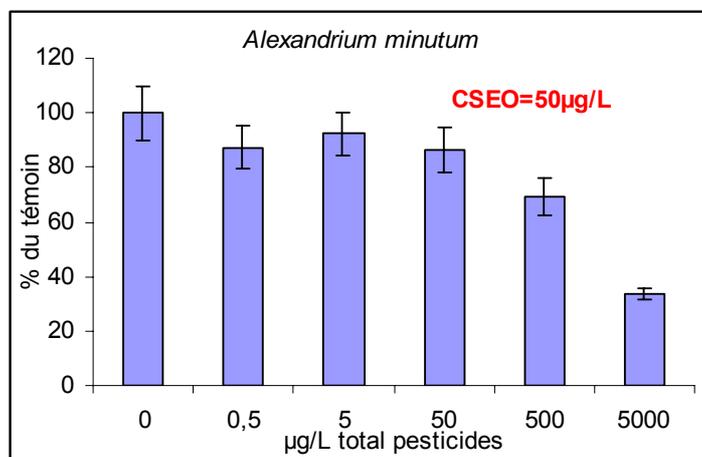


Figure 50 : Influence d'un mélange de 5 pesticides sur la production

primaire d'*A.minutum*

Le calcul de la CE50 au moyen de l'équation qui décrit le mieux les variations de la production primaire ( $R^2=0,97$ ) est de  $3005 \pm 44 \mu\text{g/L}$  du mélange.

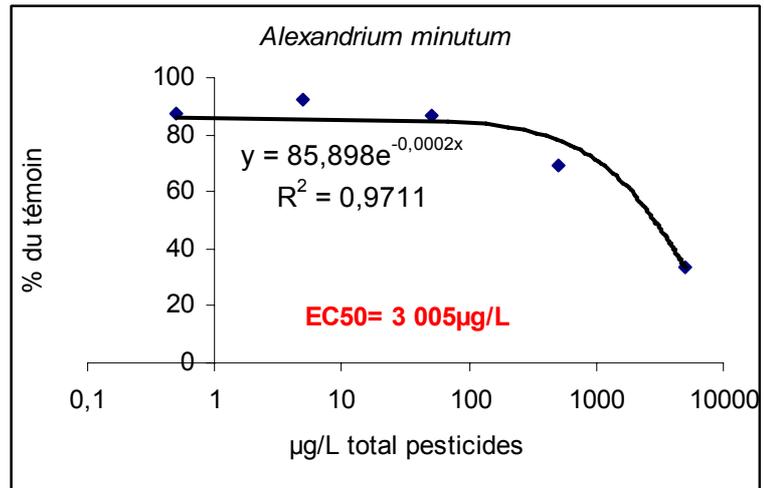


Figure 51 : calcul de la CE50 pour la production primaire

*Heterocapsa triquetra* apparaît plus tolérant vis-à-vis des pesticides et la production primaire n'est diminuée qu'à partir de concentrations supérieures à  $500 \mu\text{g/L}$ . En présence de  $5000 \mu\text{g/L}$  la production primaire est de 66 %. Un effet d'hormèse correspondant à une stimulation de croissance de  $116 (\pm 6) \%$  est observé en présence de pesticides aux plus faibles concentrations : 0,5 à  $5 \mu\text{g/L}$ .

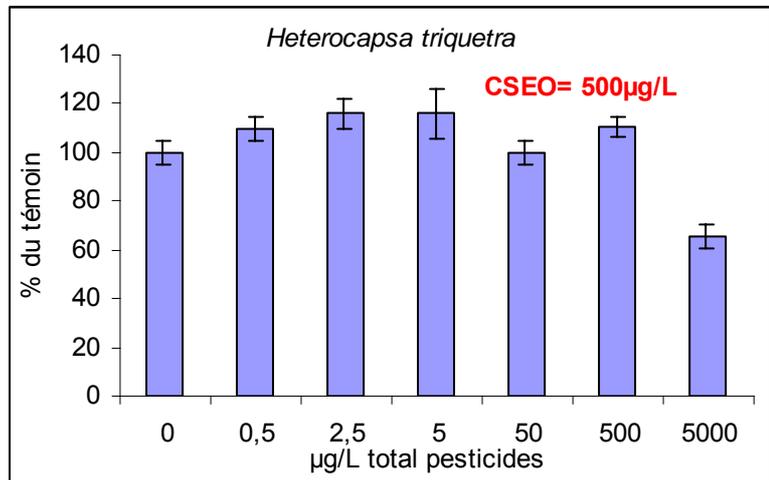


Figure 52 : influence d'un mélange de 5 pesticides sur la production primaire d'*H.triquetra*

La CE50 calculée à partir de l'équation de la courbe ajustée est  $8024 \pm 274 \mu\text{g/L}$  de pesticides en mélanges.

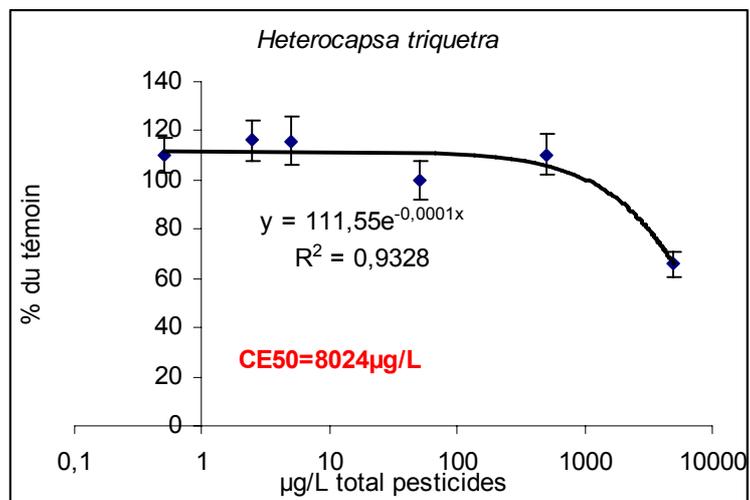


Figure 53 : calcul de la CE50 pour la production primaire

La production primaire chez *Scrippsiella trochoidea* est également stimulée en présence de faibles concentrations en pesticides : elle s'élève à 120 (± 5) % du témoin avec 2,5 µg/L. La CSEO est de 500 µg/L, et 5000 µg/L réduit la production primaire à 75 %.

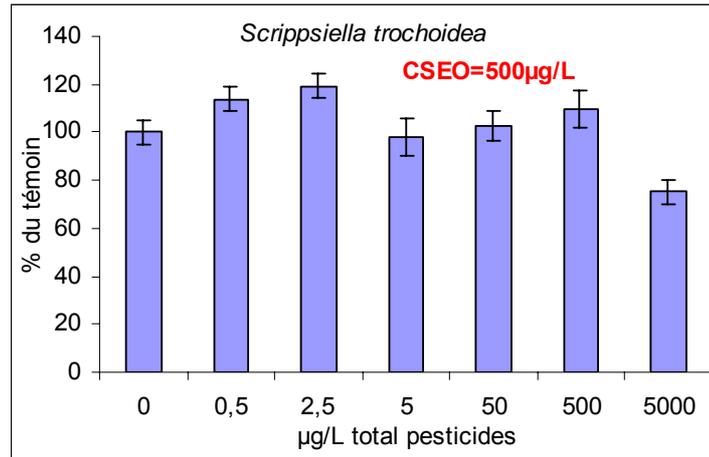


Figure 54 : influence dun mélange de 5 pesticides sur la production primaire de *S.trochoidea*

La CE50 calculée est de 8328 ± 496 µg/L.

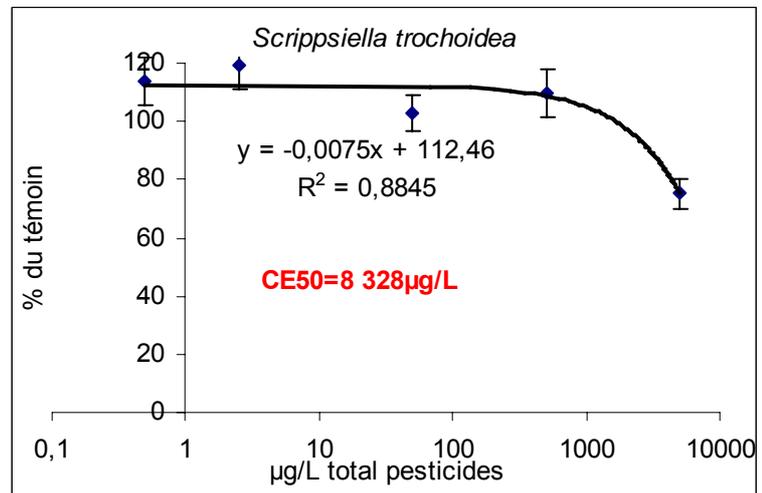


Figure 55 : calcul de la CE50 pour la producton primaire

Les résultats résumés dans le Tableau 30 montrent que la CSEO la plus faible concerne *Alexandrium* : 50 µg/L, celles d'*Heterocapsa* et *Scrippsiella* étant dix fois plus élevées. La CE50 est également plus faible chez *Alexandrium* : 3005 µg/L, tandis que chez les deux autres espèces elles sont plus de deux fois supérieures et très voisines. *A. minutum* est donc plus sensible à la toxicité des pesticides, que *H. triquetra* et *S. trochoidea*, lorsque les trois espèces sont testées séparément en cultures monospécifiques.

Tableau 30 : récapitulatif des CSEO et CE50

µg/L de molécules actives en mélange	<i>A. minutum</i>	<i>H. triquetra</i>	<i>S. trochoidea</i>
CSEO	50	500	500
CE50	3005 ± 44	8024 ± 274	8328 ± 496

### 3.2 Etude de l'effet des pesticides sur la cyanobactérie *Synechococcus sp.*, RCC 752, (WH7803),.

Deux séries de tests avec des pesticides ont été réalisés sur cette souche cultivée sur milieu SN: une série en juin 2006 sous éclairage naturel (entre 30 et 100  $\mu\text{moles}$  de photons/ $\text{m}^2/\text{s}$ ) avec 4 répétitions par condition, et une série sous éclairage artificiel (entre 80 et 100  $\mu\text{moles}$  de photons/ $\text{m}^2/\text{s}$ ) avec 4 répétitions par condition. La croissance de la souche à 18°C est évaluée par la mesure de l'absorbance des cultures à 550 nm. Les courbes obtenues sont présentées ci-dessous.

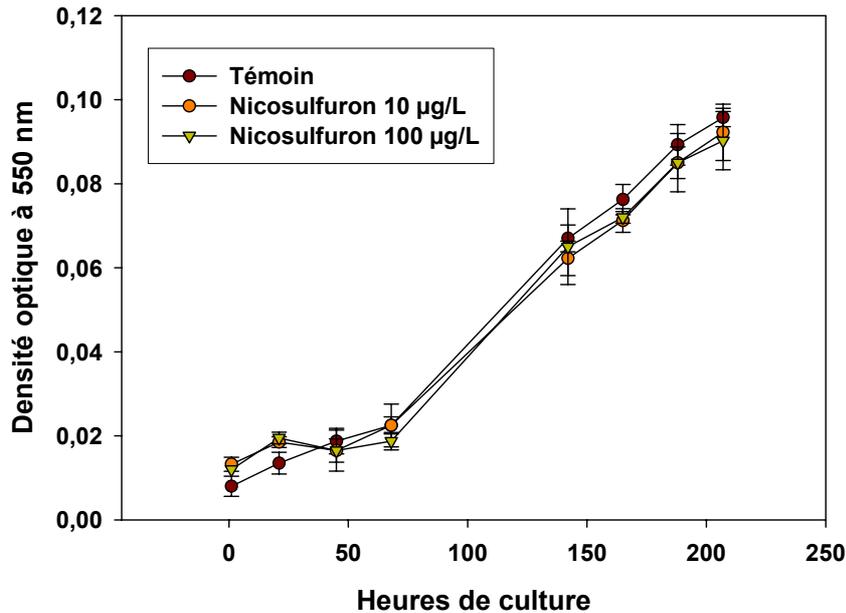


Figure 56 : Cultures de *Synechococcus* (4 réplicats) en lumière naturelle exposées au Milagro (nicosulfuron) ; les barres représentent les intervalles de confiance au seuil 95 %.

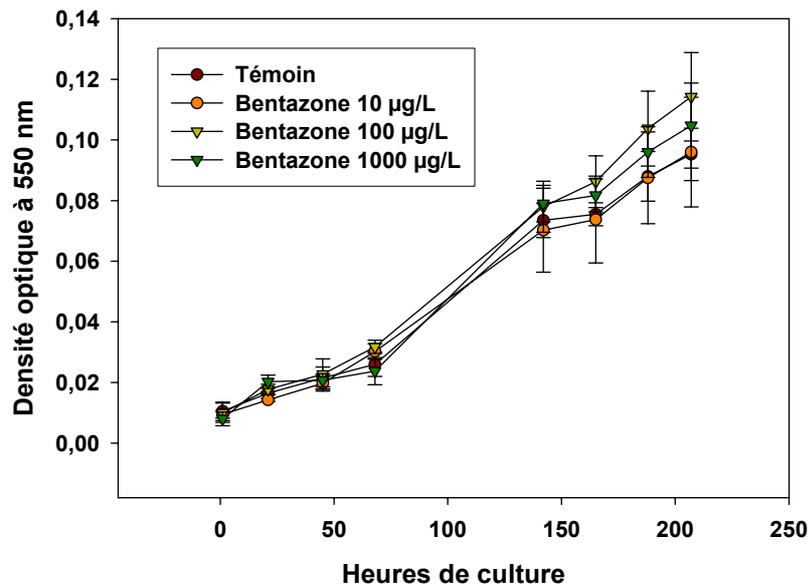


Figure 57 : Cultures de *Synechococcus* (4 réplicats) en lumière naturelle exposées au Basamaïs (Bentazone); les barres représentent les intervalles de confiance au seuil 95 %.

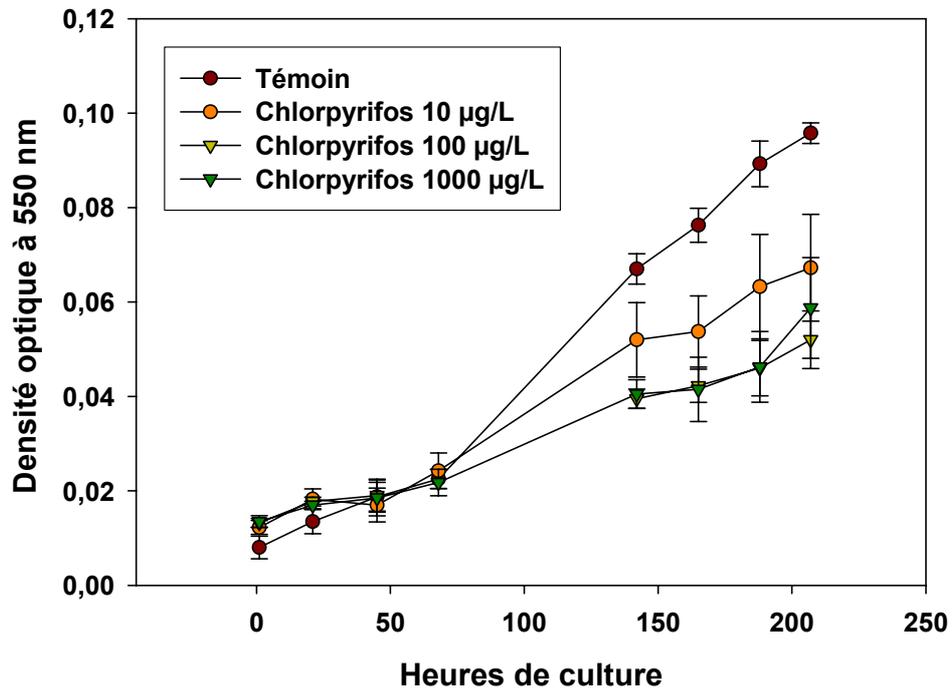


Figure 58 : Cultures de *Synechococcus* (4 réplicats) en lumière naturelle exposées au Dursban (Chlorpyrifos) ; les barres représentent les intervalles de confiance au seuil 95 %.

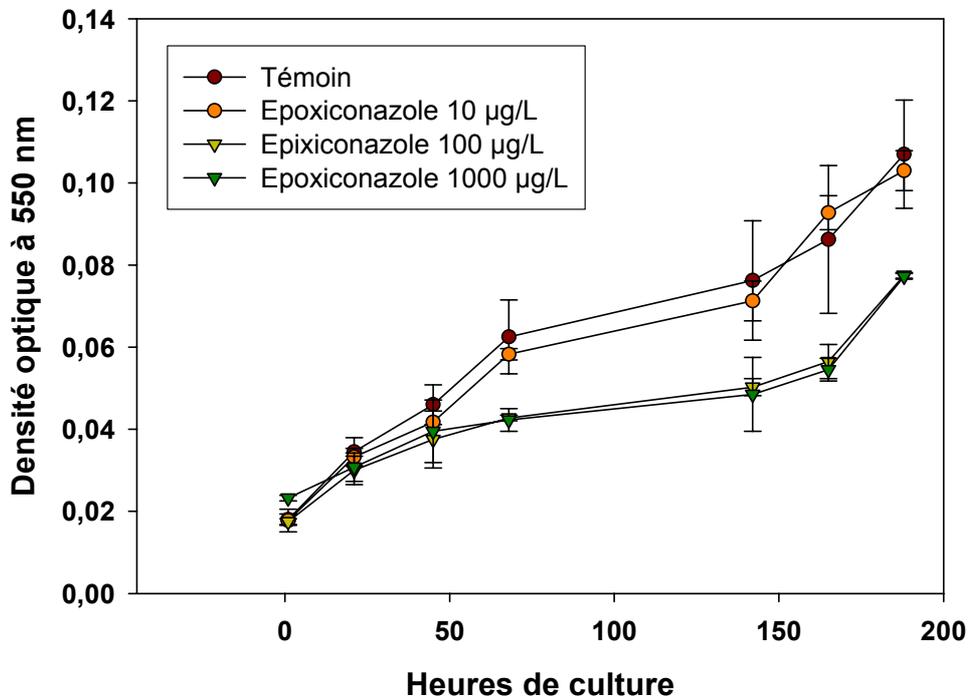


Figure 59 : Cultures de *Synechococcus* (4 réplicats) en lumière naturelle exposées à l'Opus (Epoxiconazole) ; les barres représentent les intervalles de confiance au seuil 95 %.

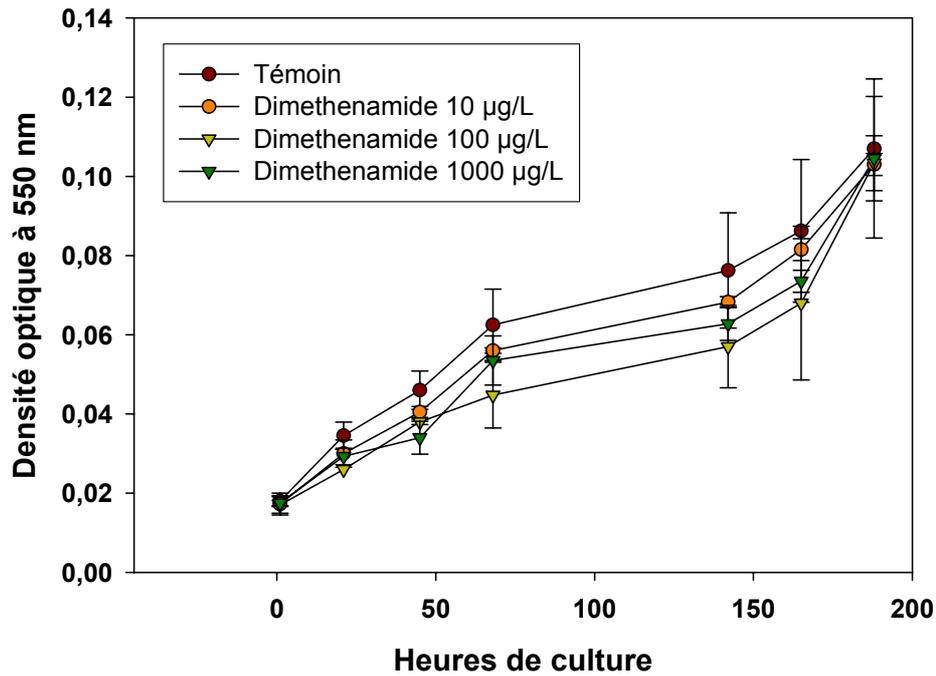


Figure 60 : Cultures de *Synechococcus* (4 réplicats) en lumière naturelle exposées au Frontière (Diméthénamide); les barres représentent les intervalles de confiances au seuil 95 %.

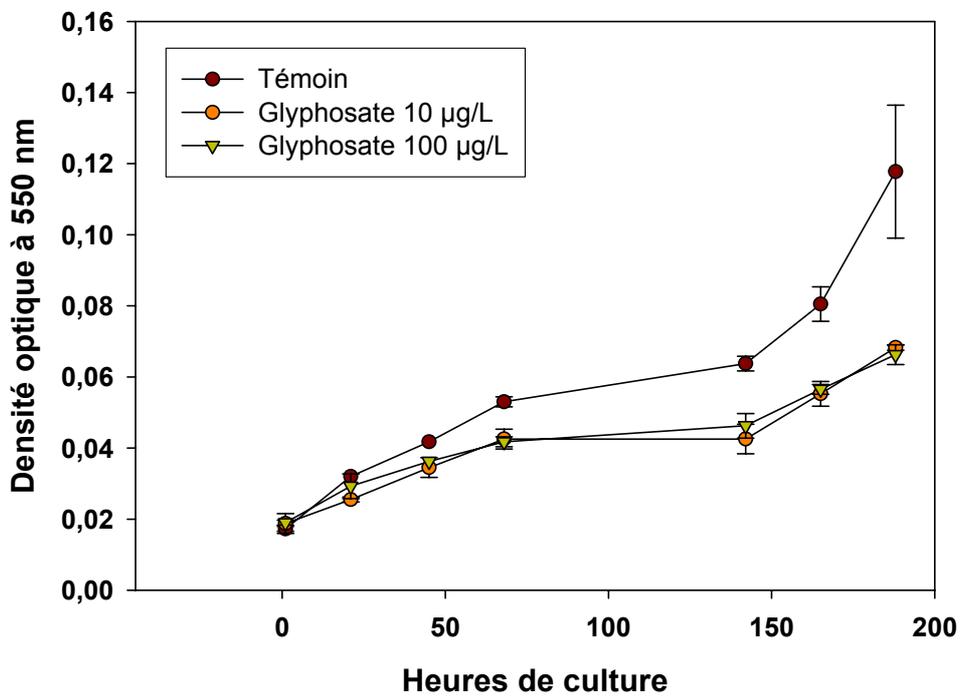


Figure 61 : Cultures de *Synechococcus* (4 réplicats) en lumière naturelle exposées au Round-up (Glyphosate); les barres représentent les intervalles de confiances au seuil 95 %.

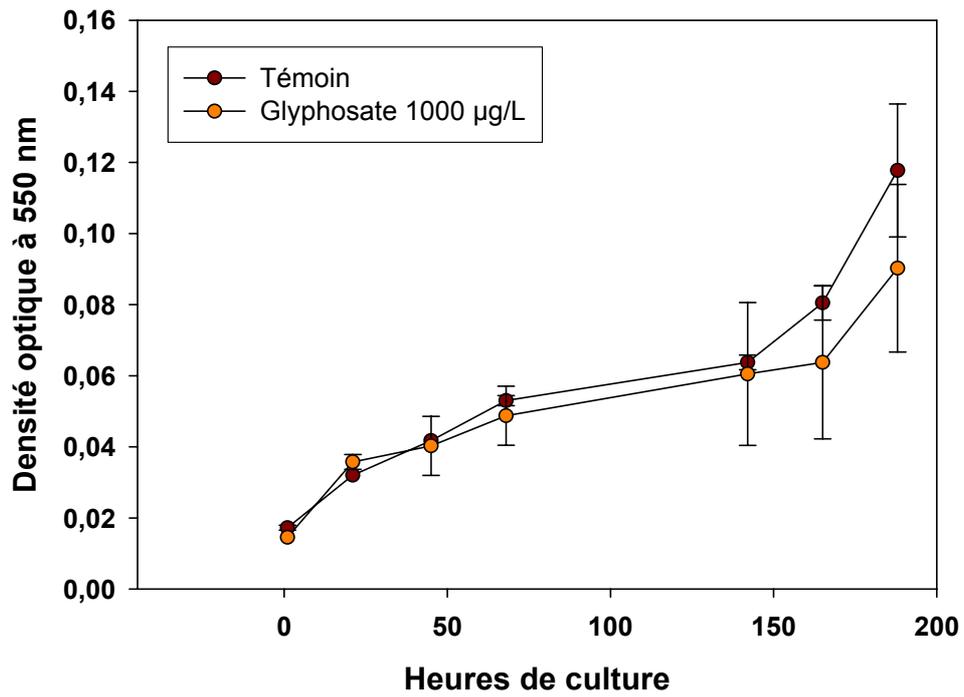


Figure 62 : Cultures de *Synechococcus* (4 réplicats) en lumière naturelle exposées au Round-up (Glyphosate); les barres représentent les intervalles de confiance au seuil 95 %.

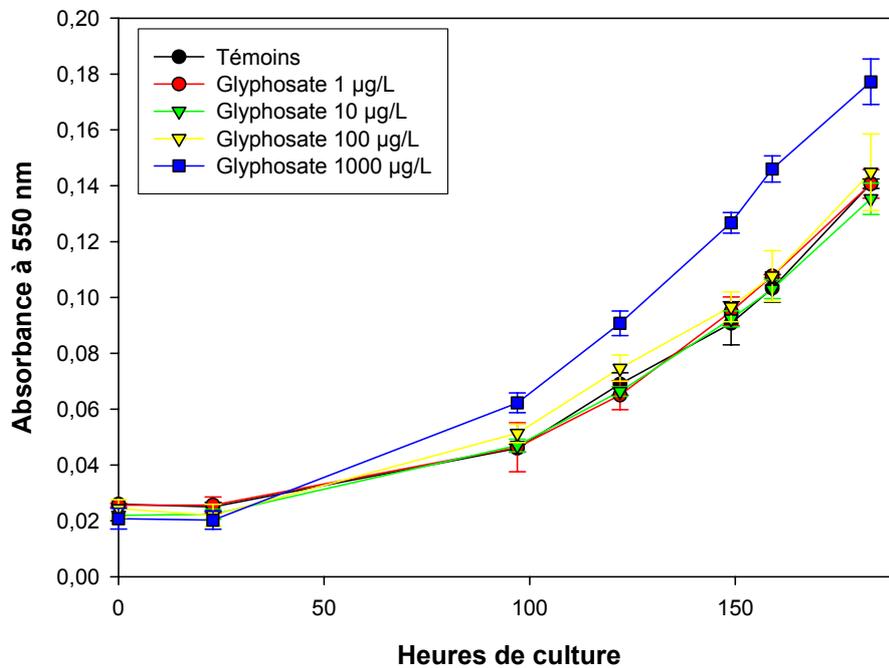


Figure 63 : Cultures de *Synechococcus* (4 réplicats) en lumière artificielle exposées au Round-up (Glyphosate); les barres représentent les intervalles de confiance au seuil 95 %.

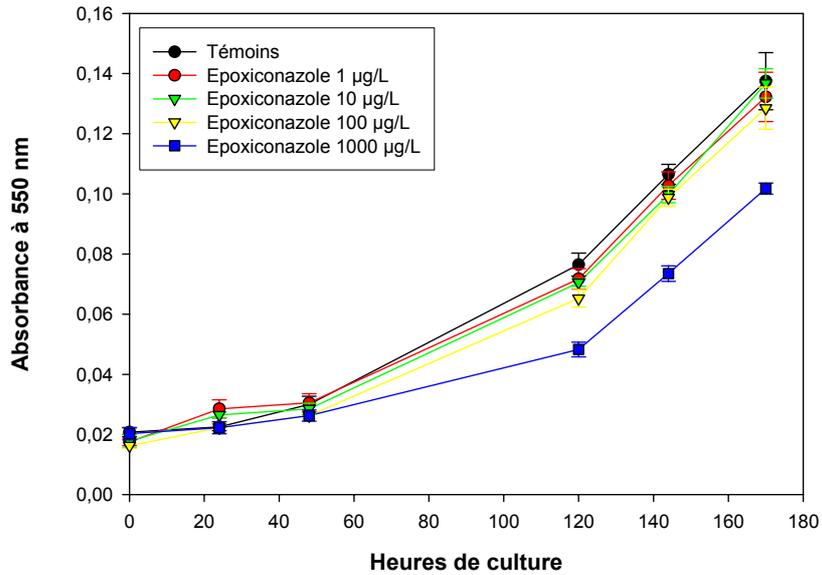


Figure 64 : Cultures de *Synechococcus* (4 réplicats) en lumière artificielle exposées à l'Opus (Epoxiconazole); les barres représentent les intervalles de confiance au seuil 95 %.

Une synthèse des résultats de ces tests cinétiques est présentée dans le tableau ci-dessous :

Les cultures de *Synechococcus* exposées à la lumière naturelle ont été inhibées par le chlorpyrifos-éthyl dès 10 µg/L, et par l'époxiconazole à partir de 100 µg/L. En lumière artificielle, cet effet est retrouvé pour l'époxiconazole à partir de 1000 µg/L.

Le glyphosate quant à lui, présente des résultats contradictoires, avec une inhibition à 10 et 100 µg/L en lumière naturelle et une stimulation à 1000 µg/L en lumière artificielle.

lumière naturelle				lumière artificielle			
pesticide	temps d'exposition (h)	concentration (µg/L)	effet à 550 nm	pesticide	temps d'exposition (h)	concentration (µg/L)	effet à 550 nm
Nicosulfuron	207	10	0	Glyphosate	185	1	0
		100	0			10	0
		1000	0			100	0
Bentazone	207	10	0	Epoxiconazole	170	1000	+
		100	0			1	0
		1000	+			10	0
Chlorpyrifos-éthyl	207	10	-	Epoxiconazole	170	100	0
		100	-			1000	-
		1000	-			170	0
Epoxiconazole	230	10	0	Glyphosate	230	10	-
		100	-			100	-
		1000	-			1000	0
Diméthénamide	230	10	0	Glyphosate	230	100	-
		100	0			1000	0
		1000	0				

Tableau 31 : Synthèse des résultats obtenus sur la croissance de *Synechococcus sp.* Exposée à divers pesticides.

L'effet est symbolisé par un 0 lorsque les absorbances à 550 nm des cultures témoins et des cultures exposées au pesticide indiqué sont similaires, (+) lorsque les absorbances des cultures exposées sont significativement supérieures à celles des témoins, et (-) quand elles sont significativement inférieures aux témoins.

### 3.3 Comparaison des caractéristiques écotoxicologiques des pesticides

#### 3.3.1 Etudes sur cultures monospécifiques de microalgues :

##### 3.3.1.1 Caractéristiques écotoxicologiques des substances étudiées

Les bioessais réalisés en laboratoire selon un protocole qui prend en compte les conditions naturelles de développement phytoplanctoniques, permettent de comparer les effets des contaminants sur les algues cibles et de comparer les réponses des espèces choisies au même contaminant. Les effets de la composition du milieu en sels nutritifs sont également pris en compte. Les pesticides sont testés purs, et en formulation afin de connaître leur activité en présence de produits adjuvants. Ces tests sont donc nécessaires pour mieux comprendre les effets observables *in situ*.

### Matériel et méthode

Les pesticides utilisés et leur formulation sont,

- les quatre herbicides et leurs formulations : le bentazone et Basamais, le nicosulfuron et Milagro, la sulcotrione et Mikado, le diméthénamide et Frontière
- le fongicide : l'épiconazole et Opus
- et l'insecticide : le chlorpyriphos-éthyl et Dursban.

**Tableau 32 : Tableau récapitulatif des gammes de concentrations testées pour les différentes substances**

		<i>A. minutum</i>	<i>C. gracilis</i>
bentazone	pur	0,5µg/L-100mg/L	10ng/L-100mg/L
	formulation	0,5µg/L-100mg/L	1µg/L-10mg/L
nicosulfuron	pur	10ng/L-10mg/L	10ng/L-10mg/L
	formulation	10ng/L-10mg/L	1µg/L-10mg/L
sulcotrione	pur	100µg/L-10mg/L	10µg/L-10mg/L
	formulation	100µg/L-10mg/L	1µg/L-10mg/L
diméthénamide	pur	100µg/L-10mg/L	24µg/L-4,8mg/L
	formulation	80µg/L-8mg/L	99µg/L-9,9mg/L
epoxiconazole	pur	270µg/L-11mg/L	270µg/L-11mg/L
	formulation	50ng/L-1,14mg/L	50ng/L-1,14mg/L
Chlorpyriphos-éthyl	pur	50µg/L-2mg/L	50µg/L-2mg/L
	formulation	75ng/L-310µg/L	75ng/L-310µg/L

Les produits disponibles, sous forme de poudre ou huileuse, sont dissous en eau de mer préalablement autoclavée. La dissolution est réalisée par agitation magnétique à température ambiante et à l'abri de la lumière durant un temps suffisant pour obtenir la solubilisation maximale (24 h si nécessaire) puis les solutions sont stérilisées par filtration à travers des cartouches Stérivex (0,22 µm) (Millipore®). Les concentrations réelles sont déterminées par

analyse chimique. Les formulations commerciales sont préparées par dilution directe en eau de mer autoclavée.

Les solutions sont ensuite diluées pour effectuer les cultures de phytoplancton (Tableau 32). Les solutions mères de contaminants sont stockées, congelées pour les expériences ultérieures, et les concentrations réelles en molécules actives à nouveau contrôlées.

Organismes modèles utilisés comme cibles :

Diatomée : *Chaetoceros gracilis* (fournie par SATMAR, Saint-Vaast-La-Hougue) est maintenue en culture en laboratoire, en milieu f/2 (Guillard et Ryther, 1962) et en lumière 60 à 80  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , alternée jour/nuit (12 h/12 h). La température est de  $19 \pm 2$  ° C. La salinité du milieu est de 35.

Dinoflagellé : *Alexandrium minutum* (AM89BM) isolé à partir d'une efflorescence en rivière de Morlaix et maintenu en culture comme pour la diatomée.

**Conditions de culture :**

Pour nos expériences, *C. gracilis* et *A. minutum* sont préalablement acclimatées aux conditions nutritives utilisées dans les tests. Pour cela, une culture intermédiaire est réalisée dans le milieu choisi, avec un apport minimum d'ensemencement (milieu f/2) afin de limiter les apports non contrôlés en sels nutritifs.

*C. gracilis* est testée en milieux de cultures dont la composition en substances nutritives simulent les conditions rencontrées en rade de Brest en périodes sensibles : période post-hivernale à teneurs maximales en sels nutritifs, et estivale à teneurs minimales (Le Pape *et al.*, 1995; Arzul & Durand, 1999). Pour l'expérience (laboratoire UBO) la durée de la phase d'éclaircissement est de 16 h. *A. minutum* est testé dans ces deux milieux mais également en milieu désigné "Penzé", dont les concentrations en nitrates sont particulièrement élevées. Les inocula de chaque espèce dépendent des concentrations en sels nutritifs disponibles. L'ordre de grandeur des concentrations initiales pour chacune est précisé dans le Tableau 33 : Composition nutritive des différents milieux traités. Les concentrations approchées des différents inocula sont mentionnées en  $\text{cell L}^{-1}$  pour *Chaetoceros gracilis* et *Alexandrium minutum*.

**Tableau 33 : Composition nutritive des différents milieux traités. Les concentrations approchées des différents inocula sont mentionnées en  $\text{cell L}^{-1}$  pour *Chaetoceros gracilis* et *Alexandrium minutum*.**

	f/2	Post-hivernal	Estival	Penzé
NO <sub>3</sub> $\mu\text{M}$ (N)	880	23	0,8	440
PO <sub>4</sub>	36	0,4	0,23	2,5
Vitamines	0,5 $\mu\text{g l}^{-1}$ B12 et biotine - 0,1 $\text{mg l}^{-1}$ thiamine			
Métaux	11,7 Fe – 0,08 Zn – 0,9 Mn – 0,03 Mo – 0,05 Co – 0,04 Cu			
Inoculum <i>C.g.</i>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	
Inoculum <i>A.m.</i>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>

Les volumes des bioessais sont de 50 mL pour *C. gracilis* et *A. minutum*, les cultures étant menées en ballons de verre de 100 mL, bouchés non hermétiquement.

Les cultures sont suivies par comptage des cellules selon plusieurs méthodes, calibrées par rapport au dénombrement optique au microscope.

Trois méthodes de comptage ont été utilisées selon la taille des cellules :

*Alexandrium minutum* (30 à 35 µm) était dénombré au microscope optique à la cellule de Nageotte. Dans les cultures monospécifiques en présence de bentazone les concentrations élevées ont été déterminées au Coulter Counter, après vérification des résultats avec ceux des comptages optiques.

*Chaetoceros gracilis* (4-6 µm) était dénombré au microscope optique à la cellule de Malassez. Dans les triplicats de cultures, la mesure de densité optique à 670 nm (Fernandez-Alba *et al.*, 2002) a permis d'estimer la concentration cellulaire après calibrage de la DO mesurée par le comptage au microscope dans l'un des réplicats.

### Calculs des paramètres écotoxicologiques :

Les résultats obtenus permettent de tracer des courbes de croissance en fonction de la durée de la culture. Après transformation logarithmique des concentrations cellulaires, les taux de croissance sont calculés par régression linéaire (droitereg de XLS). Les CE50 et CE10 pour chaque pesticide ont été calculées d'après le logiciel Macro Regtox de Vindimian *et al.* (1983). Les concentrations sans effets observés (CSEO) dépendent des écarts entre les dilutions appliquées dans le protocole expérimental. Les CSEO seules sont précisées lorsque le calcul des CE10 par le logiciel est impossible (par exemple, trop faible inhibition du taux de croissance).

### Résultats

L'ensemble des caractéristiques ainsi obtenues est résumé dans le Tableau 34.

**Tableau 34 : Résumé des résultats écotoxicologiques obtenus en mg/L (p<0,05**

	estival		post-hivernal	
<i>C. gracilis</i>	CE10	CE50	CE10	CE50
bentazone	CSEO 10	>100	CSEO10	>100
Basamais	0,035 (0,028-0,044) CSEO0 < 0,07	0,102 (0,091-0,110)	0,003 (0,001-0,010) CSEO 0,001	0,076 (0,048-0,112)

	estival		post-hivernal		Penzé	
<i>A. minutum</i>	CE10	CE50	CE10	CE50	CE10	CE50
bentazone	9,27 9,0-9,64 CSEO 1	11,45 (10,96-11,64)	9,58 (2,0-34,0) CSEO 10	>100	36 (30,52-40,59) CSEO 10	71,45 (65,83-76,06)
Basamais	0,43 (0,15-1,34) CSEO 0,35	2,23 (1,45-3,39)	2,62 (1,47-3,13) CSEO 0,7	3,36 (2,98-3,50)	0,16 (0,08-0,28) CSEO 0,1	1,4 (1,06-1,83)

*Impact des pesticides sur l'environnement marin*

	estival		post-hivernal	
<i>C. gracilis</i>	CE10	CE50	CE10	CE50
nicosulfuron	pas d'effet	pas d'effet	pas d'effet	pas d'effet
Milagro	3,29 (2,52-4,45) CSEO 1	4,87 (4,66-5,04)	0,91 (0,79-1,27) CSEO 1	2,79 (2,47-3,15)

	estival		post-hivernal		Penzé	
<i>A. minutum</i>	CE10	CE50	CE10	CE50	CE10	CE50
nicosulfuron	pas d'effet	pas d'effet	pas d'effet	pas d'effet	pas d'effet	pas d'effet
Milagro	0,03 (0,017-0,07) CSEO 0,01	0,13 (0,10-0,16)	0,07 (0,05-0,12) CSEO 0,1	0,38 (0,29-0,49)	0,04 (0,02-0,09) CSEO 0,01	0,55 (0,40-0,72)
<i>C. gracilis</i>	estival		post-hivernal			
	CE10	CE50	CE10	CE50		
sulcotrione	0,76 (0,52-1,04) CSEO 0,5	2,18 (1,90-2,53)	0,44 (0,19-0,79) CSEO 0,18	1,33 (0,95-1,61)		
Mikado	0,10 (0,04-0,23) CSEO 0,1	0,90 (0,66-1,24)	0,37 (0,30-0,44) CSEO 0,1	0,93 (0,82-0,98)		

	post-hivernal		Penzé	
<i>A. minutum</i>	CE10	CE50	CE10	CE50
sulcotrione	CSEO 0,5	>10	0,15 (0,08-0,30) CSEO 0,1	6,69 (5,28-8,30)
Mikado	0,01 (0,01-0,02) CSEO <0,1	0,12 (0,09-0,16)	0,08 (0,01-1,86) CSEO 0,5	3,77 (1,09-17,03)

	estival		post-hivernal	
<i>C. gracilis</i>	CE10	CE50	CE10	CE50
diméthénamide	0,38 (0,28-0,39) CSEO 0,24	0,44 (0,39-0,45)	Pas d'effet	Pas d'effet
Frontière	CSEO 0,1	>10	Pas d'effet	Pas d'effet

	post-hivernal		Penzé	
<i>A. minutum</i>	CE10	CE50	CE10	CE50
diméthénamide	0,37 (0,17-0,45) CSEO 0,1	0,48 (0,40-0,50)	0,01 (0,01-0,03) CSEO <0,1	0,77 (0,59-0,99)
Frontière	0,28 (0,26-0,31) CSEO 0,08	0,58 (0,56-0,60)	0,19 (0,13-0,28) CSEO 0,1	0,70 (0,60-0,82)

	estival		post-hivernal	
<i>C. gracilis</i>	CE10	CE50	CE10	CE50
époxyconazole	0,30 (0,10-0,80) CSEO 0,25	1,01 (0,66-1,49)	CSEO<0,25	NC
Opus	0,01 (0,007-0,008) CSEO 0,001	0,01 (0,01-0,02)	0,002 (0,001-0,004) CSEO 0,001	0,004 (0,003-0,005)

	post-hivernal		Penzé	
	CE10	CE50	CE10	CE50
<i>A. minutum</i>				
époxyconazole	2,52m (2,03-3,0) CSEO 1,4	6,45 (5,97-6,95)	0,73 (0,36-1,24) CSEO<0,27	2,96 (2,26-3,72)
Opus	0,0016 (0,0002-0,0010) CSEO 0,001	0,03 (0,01-0,07)	0,006 (0,001-0,025) CSEO 0,001	0,03 (0,01-0,06)

	estival		post-hivernal	
	CE10	CE50	CE10	CE50
<i>C. gracilis</i>				
chlorpyriphos-éthyl	pas d'effet	pas d'effet	pas d'effet	pas d'effet
Dursban	pas d'effet	pas d'effet	0,07 (0,03-0,13) CSEO 0,015	0,13 (0,11-0,15)

	post-hivernal		Penzé	
	CE10	CE50	CE10	CE50
<i>A. minutum</i>				
chlorpyriphos-éthyl	1,88 (1,44-1,92) CSEO 1,0	2,06 (2,02-2,15)	0,72 (0,57-0,90) CSEO 0,25	1,12 (1,02-1,22)
Dursban	0,09 (<0,001-0,13) CSEO 0,015	0,13 (0,01-0,15)	0,007 (0,005-0,011) CSEO 0,0007	0,02 (0,015-0,022)

NC=non calculable

Comparaison des CE50 obtenues avec celles de la littérature (site Agritox)

Les CE50 citées sont connues pour les organismes d'eau douce et les microalgues utilisées sont *Chlorella fusca*, *Ankistrodesmus bibriainus*, *Scenedesmus suspicatus*. Les tests en conditions normalisées sont réalisés en milieu riche ce qui rend la comparaison des résultats délicate. Néanmoins, dans la plupart des cas les mêmes ordres de grandeur sont retrouvés (Tableau 35).

**Tableau 35 : Comparaison des CE50 en mg/L données dans Agritox pour *Chlorella fusca* ©, *Ankistrodesmus bibriainus* (A), *Scenedesmus suspicatus* (S).**

	Agritox	<i>A. minutum</i>		<i>C. gracilis</i>	
		post-hivernal	Penzé	estival	Post-hivernal
bentazone	C : 279 A : 102	>100	71,45	>100	>100
nicosulfuron	S : 182	Pas d'effet			
sulcotrione	? : 3,5	>10	6,69	2,18	1,33
diméthénamide	S : 0,062	0,48	0,77	0,44	Pas d'effet
époxyconazole	A : 0,81	6,45	2,96	1,01	NC
chlorpyriphos-éthyl	Non communiqué	2,06	1,12	Pas d'effet	

NC=non calculable

L'herbicide bentazone est moins toxique pour la microalgue d'eau douce *Chlorella* que pour l'espèce marine testée *Alexandrium minutum*.

Le nicosulfuron ne présente pas d'effet sur la croissance des espèces marines étudiées, dans les conditions des expériences.

La sulcotrione est plus toxique pour l'espèce d'eau douce testée (non précisée) et *Chaetoceros* que pour *Alexandrium*.

D'une façon générale le diméthénamide est 10 fois moins inhibiteur pour les espèces marines que pour *S. suspicatus*.

Le fongicide époxiconazole est légèrement moins toxique pour *A. minutum* que pour *C. gracilis* et *A. bibriainus*.

L'insecticide chlorpyriphos-éthyl est toxique pour *A. minutum* et sans effet sur la croissance de *C. gracilis*.

En se basant sur les CE50, la molécule la plus toxique tant en eau douce qu'en eau marine est le diméthénamide, et la mieux tolérée est le bentazone.

### Différence de toxicité entre solutions pures et formulations

Les CE50 calculées, transformés en Unités Toxiques aiguës selon la formule 100/CE50 d'après EPA (1993) sont portées sur la Figure 65. Les molécules actives en formulations sont plus toxiques qu'en solutions pures, à l'exception du Frontière, formulation du diméthénamide. Le bentazone en formulation Basamaïs est particulièrement toxique vis-à-vis de la diatomée *C. gracilis*. Le dinoflagellé *A. minutum* est plus sensible au Milagro et au Mikado.

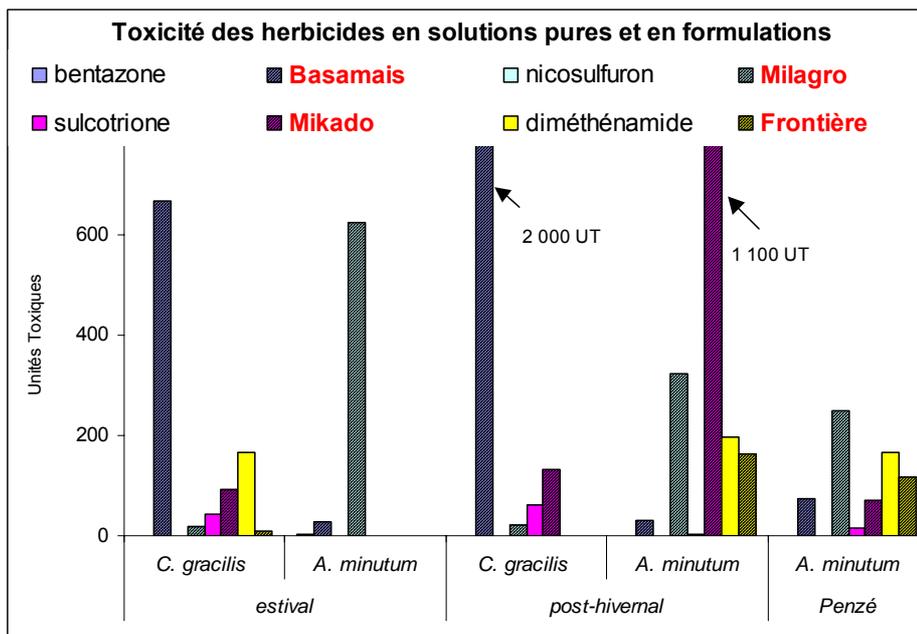


Figure 65 : Comparaison des toxicités des molécules herbicides, pures et en formulations.

La même représentation pour le fongicide époxiconazole et l'insecticide chlorpyriphos-éthyl montre également la plus grande toxicité des molécules actives en formulations Opus et Dursban (Figure 66). La toxicité du fongicide pour la diatomée est dix fois plus élevée que celle calculée pour les herbicides.

Les adjuvants des formulations commerciales jouent donc un rôle important de cofacteur dans l'action herbicide des molécules actives.

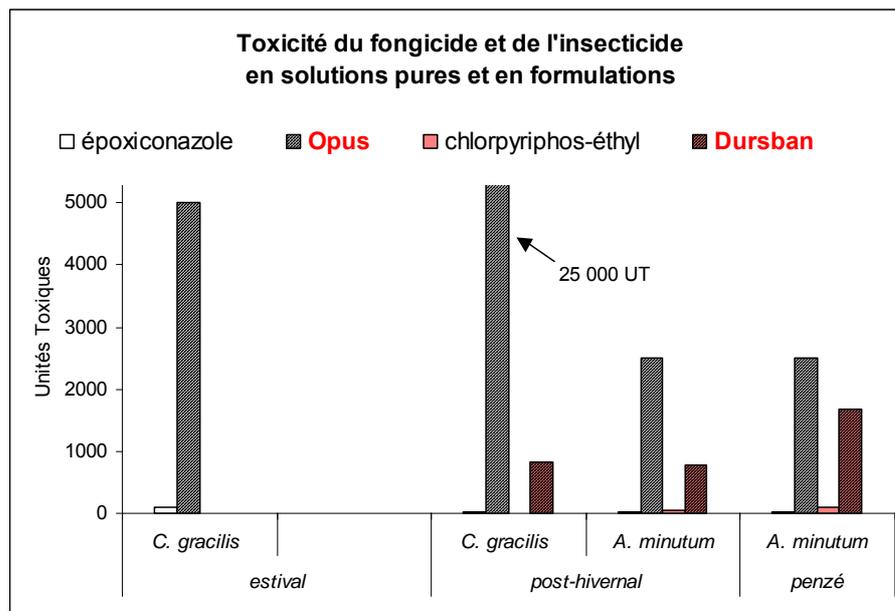


Figure 66 : Comparaison des toxicités des molécules fongicide (époxiconazole) et insecticide (chlorpyriphos-éthyl), pures et en formulations.

### Réponse des cellules algales selon le mode d'action

Les herbicides testés agissent sur les végétaux supérieurs à différents niveaux de fonctionnement.

Le nicosulfuron (sulfonylurée) fait partie du groupe des inhibiteurs de l'acétolactate synthase (Ray, 1984 ; Simpson *et al.*, 1995 ; Shimizu *et al.*, 2002). Cette enzyme intervient dans la biosynthèse des acides aminés à chaînes ramifiées : la valine, la leucine et l'isoleucine. Brown et Kearney (1991) rapportent une action toxique des sulfonylurées vis à vis des végétaux supérieurs, algues et bactéries. L'inhibition de la croissance serait due à une absence de branchement des chaînes latérales sur les précurseurs d'acides aminés ou à une accumulation d'intermédiaires toxiques de la biosynthèse des acides aminés ramifiés (La Rossa *et al.*, 1987 ; Shimizu *et al.*, 2002).

Le nicosulfuron ne présente aucun effet sur la croissance du phytoplancton dans nos conditions expérimentales, excepté en formulation Milagro où sa toxicité est marquée surtout chez le dinoflagellé *A. minutum*.

Le diméthénamide (chloroacétamide) est un inhibiteur de l'élongation des acides gras à longue chaîne qui permet la formation des acides gras saturés possédant 20 carbones et plus. Cette élongation des acides gras comporte quatre étapes et c'est la première enzyme de la séquence, la 3-acétyl synthase qui est sensible à l'action des chloroacétamides (Böger et Matthes, 2002).

Sa présence ne modifie pas la croissance de la diatomée, mais diminue celle du dinoflagellé.

La bentazone (thidiazinone) est un inhibiteur de la photosynthèse ; en se liant à la protéine D1 du photosystème 2, il bloque le transfert des électrons et génère un stress oxydatif (Cremlyn, 1991 ; Scalla et Gauvrit, 1991).

La bentazone est moyennement toxique sur le phytoplancton lorsque la molécule active est seule. En formulation Basamais sa toxicité est la plus élevée des herbicides.

La sulcotrione (tricétone) agit indirectement sur la synthèse des caroténoïdes en inhibant la 4-hydroxyphénylpyruvate dioxygénase (HPD) (Secor, 1994 ; Hirai *et al.*, 2002). Cette enzyme catalyse la conversion du 4-hydroxyphénylpyruvate et de l'oxygène moléculaire en homogentisate et CO<sub>2</sub>, 1<sup>ère</sup> étape de la biosynthèse de la plastoquinone et du tocophérol ; ceci conduit, comme montré par Prisbilla *et al.* (1993) et Lee *et al.* (1997) à une réduction de la phytoène désaturase et de la teneur en caroténoïdes des chloroplastes (Sandmann, 2002).

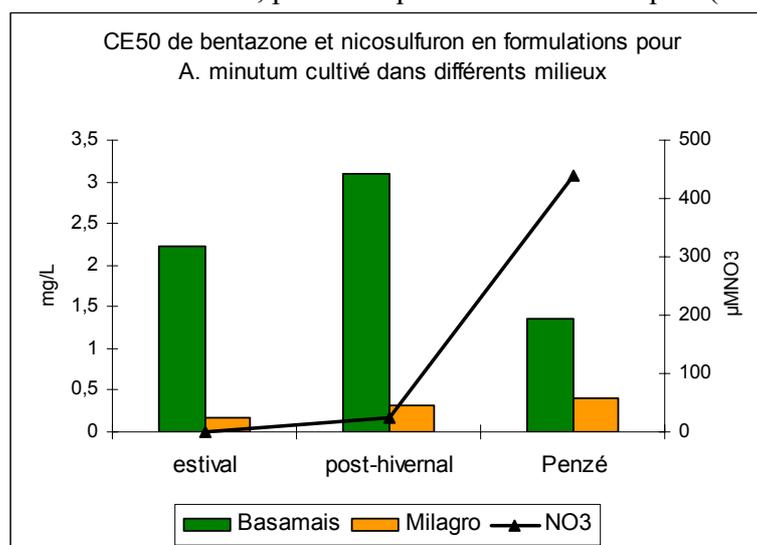
En solution pure son action inhibitrice sur la croissance du phytoplancton est relativement bien marquée chez la diatomée.

L'époxiconazole, fongicide triazole dont l'action primaire est d'inhiber la synthèse des stérols, induit, par voie de conséquence, la formation de membranes non fonctionnelles chez les champignons (Siegel, 1981 ; Atkers *et al.*, 1990 ). Son effet inhibiteur sur la croissance du phytoplancton peu marqué en solution pure, est le plus important des tous les produits testés en formulation Opus.

Bien que les plantes soient les organismes cibles des herbicides, elles sont également affectées par l'insecticide chlorpyrifos-éthyl, principalement en formulation Dursban.

### **Importance du milieu nutritif**

La sensibilité du phytoplancton aux pesticides présents dans le milieu de culture est influencée par l'état physiologique des cellules, lequel dépend de la composition du milieu en éléments nutritifs. En effet, bien que controversé par Mayer *et al.*, 1998, qui mettent la lumière principal facteur régulateur de la réponse du phytoplancton, la richesse du milieu par son action stimulatrice de croissance, peut masquer l'effet des toxiques (Sbrilli *et al.*, 2005).



**Figure 67 : Variations des CE50 obtenues dans les différents milieux de culture pour *A. minutum*, en présence de bentazone (Basamais) et de nicosulfuron (Milagro)**

Bien que la croissance d'*A. minutum* en milieu estival soit réduite, deux séries d'expériences avec le bentazone et le nicosulfuron en formulations Basamaïs et Milagro ont permis d'étudier la réponse de l'algue dans les 3 milieux : estival, post-hivernal, Penzé dont les teneurs en azote sont croissantes. La comparaison des CE50 met en évidence deux réponses opposées (Figure 67).

La toxicité du Milagro diminue en milieu riche (Penzé : milieu estuarien type à 440 µM N), tandis qu'une tendance inverse mais moins nette, apparaît avec le Basamaïs. L'explication de ces réponses opposées peut être au niveau des modes d'action des contaminants. Ces résultats montrent qu'il est difficile de prévoir le degré de toxicité des pesticides en fonction d'un seul facteur.

### Effet des faibles doses

Chez certaines cultures la croissance est stimulée en présence de faibles doses de contaminants (Tableau 36). Cette stimulation connue sous le nom d'hormèse correspond à une accélération du taux de croissance lorsque le stress imposé est relativement faible (Stebbing, 1998). Les cas d'hormèses repérés sur les histogrammes de croissance sont résumés dans le Tableau 36.

**Tableau 36 : Effet stimulateur des faibles doses des pesticides testés : SA (« pure ») et formulations**

Molécules actives	Conditionnement	Espèce et milieu	Doses mg/L	% par rapport au témoin
nicosulfuron	Milagro	<i>C. gracilis</i> estival	0,1	118
sulcotrione	pure	<i>C. gracilis</i> post-hivernal	0,18	120
	Mikado	<i>C. gracilis</i> estival	0,01-0,1	120
diméthénamide	pure	<i>A. minutum</i> post-hivernal	0,1	130
	Frontière	<i>A. minutum</i> Penzé	0,08	120
époxyconazole	pure	<i>A. minutum</i> post-hivernal	0,25-0,55	115
	Opus	<i>C. gracilis</i> estival	0,00001-0,001	150
		<i>A. minutum</i> post-hivernal	0,00005	130
		<i>A. minutum</i> Penzé	0,001	120
		<i>C. gracilis</i> post-hivernal	0,0001-0,001	120
chlorpyriphos-éthyl	pure	<i>A. minutum</i> post-hivernal	0,5	110
	Dursban	<i>A. minutum</i> post-hivernal	0,0007-0,015	170
		<i>C. gracilis</i> post-hivernal	0,015	130

Les formulations Opus et Dursban apportées à très faibles doses (ng/L) présentent les effets les plus prononcés, jusqu'à 70 % de stimulation de croissance dans le cas du Dursban à 700 ng/L de chlorpyriphos-éthyl.

### CSEO et Unités Toxiques chroniques, et doses détectées en milieux naturels

De même que pour le calcul de la toxicité aiguë suivant les formules de l'EPA (1993), les CSEO sont transformées en unités toxiques chroniques UTc 100/CSEO. Lorsqu'un effet est observé sur la croissance du phytoplancton, la CSEO des molécules actives est plus faible en formulation qu'en solution pure. Des différences marquées apparaissent au niveau des UTc (Figure 68). Le Basamaïs et le Milagro montrent une toxicité chronique plus élevée, respectivement pour *C. gracilis* et *A. minutum*, les autres formulations étant relativement moins actives à faible concentration.

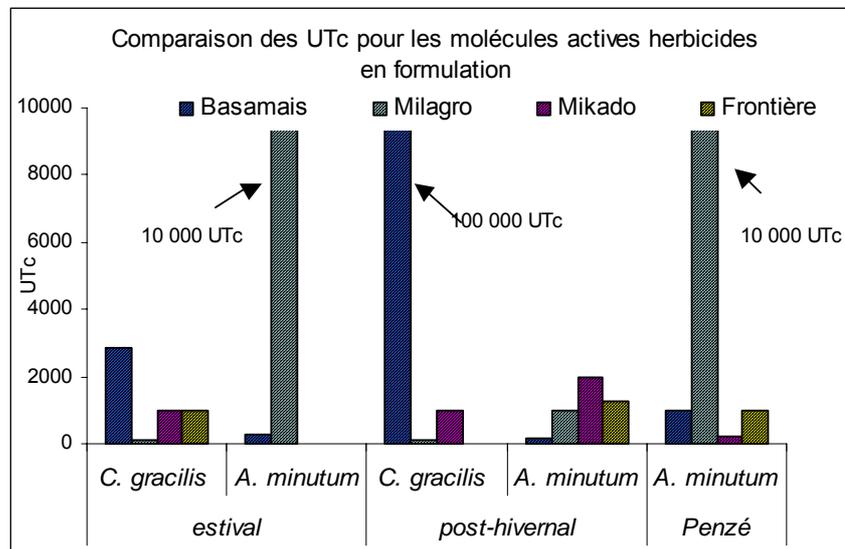


Figure 68 : Comparaison de la toxicité chronique définie à partir des CSEO chez les herbicides en formulation.

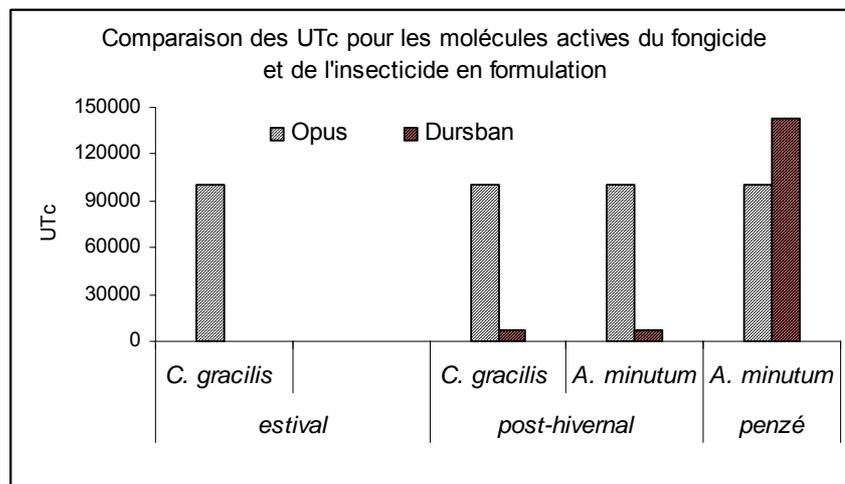


Figure 69 : Comparaison de la toxicité chronique définie à partir des CSEO chez le fongicide et l'insecticide en formulation.

La toxicité chronique du fongicide Opus est particulièrement élevée vis à vis des deux espèces algales testées, tandis que l'insecticide Dursban présente une toxicité chronique élevée pour *A. minutum* en milieu Penzé (Figure 69).

### 3.4 Discussions

Les expériences sur cultures monospécifiques ont montré que la sensibilité des algues marines à la toxicité des contaminants, est plus importante que celle des algues d'eau douce. Cette constatation a déjà été faite par Arzul *et al.* (2006) qui ont montré une inhibition de croissance par l'isoproturon et le carbofuran plus marquée chez *Chaetoceros gracilis* et *Phaeodactylum tricorutum*, que chez *Chlorella vulgaris* et *Selenastrum capricornutum*.

La toxicité des molécules actives testées seules est moins importante que lorsqu'elles sont testées en mélange, en formulations commerciales. Ce résultat peut s'expliquer par la présence, dans le mélange commercialisé, d'adjuvants qui agissent pour favoriser la pénétration de la molécule active dans la cellule végétale, ou la véhiculer jusqu'au site intracellulaire approprié, ou encore rendre l'organisme plus accessible à l'effet toxique. Il en résulte une échelle de toxicité très différente entre les molécules pures et les molécules appliquées en formulation, ces dernières étant de beaucoup les plus toxiques.

Dans nos expériences, le dinoflagellé *A. minutum* apparaît plus sensible vis-à-vis des herbicides, nicosulfuron en formulation (inhibiteur de la synthèse des acides aminés ramifiés), et diméthénamide en formulation (inhibiteur de l'élongation de acides gras). La croissance de la diatomée *C. gracilis* est particulièrement inhibée par la sulcotrione, même pure, qui agit en abaissant la teneur en caroténoïdes. L'herbicide inhibiteur de photosynthèse bentazone en formulation et le fongicide inhibiteur de la synthèse des stérols époxiconazole sont des molécules particulièrement toxiques vis-à-vis des deux espèces phytoplanctoniques. L'effet toxique de l'insecticide chlorpyrifos-éthyl pour le phytoplancton résulterait de la présence des additifs de la formulation.

Plusieurs facteurs environnementaux sont à prendre en compte dans la sensibilité du phytoplancton, tels que la lumière (Mayer *et al.*, 1998), et la richesse du milieu en éléments nutritifs. Cependant des résultats contradictoires sont obtenus : en conditions d'enrichissement croissant, la sensibilité d'*A. minutum* au Basamaïs (inhibiteur de photosynthèse) augmente tandis que la sensibilité au Milagro (inhibiteur de synthèse d'acides aminés à chaînes ramifiées) tend à diminuer. Cette réponse suggère que la sensibilité des organismes résulte de l'interférence de plusieurs facteurs.

L'effet d'hormèse est particulièrement marqué avec les plus faibles concentrations de produits toxiques apportés dans les cultures (Stebbing, 1982). Cette augmentation de croissance observée par ailleurs dans de nombreux cas est expliquée par la stimulation de défense de l'organisme que produit un stress de faible intensité (Calabrese et Baldwin, 2003). Dans notre étude les stimulations maximales, 150 et 170 % par rapport au témoin, sont observées chez *C. gracilis* en présence de faibles concentrations de fongicide époxiconazole en formulation (0,00001-0,001 mg/L), et *A. minutum* en présence de l'insecticide chlorpyrifos-éthyl en formulation (0,0007-0,0015 mg/L).

Les résultats obtenus sur la cyanobactérie *Synechococcus*, espèce phytoplanctonique présente en quantité importante dans les eaux cotières en fin d'été (Lampert, 2001), montrent un

impact dès 10 µg/L pour le glyphosate ou le chlorpyrifos-éthyl. Toutefois la sensibilité n'apparaît plus pour le glyphosate lorsque les cultures sont réalisées en conditions de lumière artificielle. Les conditions d'expérimentation sont donc importantes. Un travail plus conséquent serait nécessaire afin de mieux comprendre la relation entre les conditions expérimentales et la sensibilité. En s'appuyant sur ces tests en laboratoire (cultures monospécifiques), il apparaît un risque faible pour les concentrations inférieures à 1 µg/L car les effets sont réduits ou absents à 10µg/L. Cependant, l'impact mis en évidence sur les bactéries planctoniques par des analyses de l'empreinte moléculaire 16S en microcosme (chapitre 2-3-7) suggère une sensibilité dès 1µg/L chez certaines espèces bactériennes pour certains pesticides. Il faut donc s'interroger sur la validité du test monospécifique choisi.

Les réponses obtenues en laboratoire chez les microalgues en cultures monospécifiques montrent donc des différences dans l'intensité des effets toxiques des différents pesticides. Dans les assemblages naturels les réponses de ces mêmes espèces aux mêmes contaminants pourront être différentes, en raison de la présence d'espèces concurrentes dont les effets se font ressentir de diverses façons.

La comparaison de ces réponses obtenues en laboratoire avec les concentrations détectées dans le milieu montrent que seule, chaque molécule active même en formulation, ne représente pas de risque pour la croissance des cultures. En effet les concentrations détectées pour chacune sont inférieures à 1 µg/L, tandis que les CSEO sont, en général, supérieures ou égales à 1 µg/L.

Cependant ces observations sont à compléter par deux remarques :

- 1) les concentrations mesurées sont ponctuelles et ne rendent pas compte des maxima réels présents occasionnellement,
- 2) les études permettant de déterminer la CSEO sont faites sur cultures monospécifiques en conditions contrôlées, en présence de la seule molécule de pesticide étudiée. Or cette situation ne reflète pas les conditions réelles. En effet le nombre d'espèces chimiques détectées simultanément dans le milieu naturel, s'il est variable, peut atteindre jusqu'à 30 comme le montrent nos résultats sur Penzé et Bélon (chapitre 2). Le risque réel de diminution de la biomasse phytoplanctonique par les apports de pesticides dans le milieu naturel est donc important. Ceci est vérifiable au niveau de la production primaire des communautés naturelles, diminuée par un mélange de 5 pesticides dont la concentration totale est de 0,5µg/L (chapitre 2, test PICT sur les quatre sites étudiés).

Ainsi, l'utilisation des résultats d'expériences en laboratoire est parfois limitée, lorsqu'il s'agit de prévoir le risque encouru par les organismes en milieu naturel.

## 4 Modifications cellulaires induites par les pesticides

L'étude des perturbations induites par les pesticides au niveau de la population phytoplanctonique, est complétée par celle des modifications au niveau cellulaire. Trois niveaux sont considérés : le fonctionnement physiologique, le protéome et la structure de l'ADN.

### 4.1 Effets physiologiques

Les perturbations du fonctionnement physiologique chez les cellules phytoplanctoniques sont mises en évidence par le changement de leur comportement : respiration et production d'oxygène, et de leur composition chimique : pigments, ATP, produits de dégradation des lipides.

#### 4.1.1 Matériel et Méthodes

##### 4.1.1.1 Matériel

La diatomée *Chaetoceros gracilis* était cultivée en milieu f/2 ou en milieu post hivernal en présence ou non du pesticide, utilisé sous sa formulation commerciale.

##### 4.1.1.2 Dosage des pigments

Après filtration de 80 à 100 millions de cellules (filtres Millipore GV, 0,45 µm), les pigments étaient extraits par du méthanol à 65° C pendant 20 min. Après centrifugation, la densité optique était mesurée aux longueurs d'onde de 470, 510, 630 et 664 nm. Les concentrations en chlorophylles (a et c) et en caroténoïdes (µg/ml) étaient déterminées respectivement selon les méthodes de Jeffrey et Humphrey (1975) et Gala et Giesy (1993), selon les équations suivantes :

Chlorophylle a =  $11,47 A_{664} - 0,4 A_{630}$

Chlorophylle c =  $24,36 A_{630} - 3,73 A_{664}$

Caroténoïdes =  $7,6 (A_{480} - 1,49 A_{510})$

##### 4.1.1.3 Détermination de l'ATP

La teneur en ATP a été déterminée par bioluminescence, en utilisant un kit (Perkin ElmerR). 100 µl de suspension algale étaient directement injectés dans le puits d'une microplaque et additionnés de 50 µl de tampon de lyse. Après agitation (5 min), 50 µl du mélange luciférine luciférase étaient ajoutés et la luminescence était mesurée. Les données de luminescence étaient converties en ATP, à l'aide d'une courbe de calibration obtenue par dissolution d'ATP dans de l'eau de mer stérile. Cette technique très sensible permet de quantifier l'ATP en utilisant un très petit nombre de cellules algales; environ 70 cellules suffisent.

#### 4.1.1.4 Mesure de la respiration et de la photosynthèse

La mesure de ces deux paramètres était effectuée à l'aide d'une électrode à oxygène de type Clark (YSI 53 Oxygen Monitor) dans de l'eau de mer saturée en air, à 20 °C. A cette température et pour une salinité de 35 ‰, la teneur en O<sub>2</sub> du milieu est de 7,4 mg d'O<sub>2</sub>/L.

La respiration était mesurée à l'obscurité, par la diminution de la teneur en O<sub>2</sub> du milieu. La photosynthèse apparente était déterminée par l'élévation de la teneur en O<sub>2</sub> du milieu pour une PAR de 140 µmol/m<sup>2</sup>/sec (Li-Cor, model Li 250 light Meter).

#### 4.1.1.5 Peroxydation des lipides

La peroxydation des lipides était estimée suivant les méthodes de Minotti et Aust (1987) et Iturbe-Omaetxe *et al.* (1998). Après filtration des cellules, les peroxydes lipides étaient extraits par le mélange acide métaphosphorique - butyl hydroxytoluène. Après 30 min à 4°C et centrifugation, le chromogène était formé en mélangeant le surnageant avec du butyl hydroxytoluène, de l'acide thiobarbiturique et du HCL. Le mélange réactionnel était chauffé à 95°C (30 min) et refroidi dans de la glace. Le chromogène était extrait par addition de 1-butanol et la densité optique mesurée à 532 nm. La concentration en TBARS était calculée en utilisant le coefficient d'extinction de 155 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>.

#### 4.1.1.6 Résultats

##### **Effet des herbicides sur les teneurs en pigments, en ATP et sur la densité cellulaire**

Les données consignées dans le Tableau 37 montrent que :

- lorsque la densité cellulaire est diminuée, que ce soit par la bentazone, le diméthénamide ou le nicosulfuron, on observe une égale augmentation des teneurs des 3 pigments photosynthétiques, à savoir les chlorophylles a et c et les caroténoïdes. Plus la densité cellulaire n'est réduite par l'herbicide et plus la teneur en pigments se trouve accrue. Globalement, on peut voir qu'une diminution de 50 % de la densité cellulaire s'accompagne d'un doublement de la teneur des pigments ;
- parallèlement, il apparaît que cette réduction de la densité cellulaire est associée à une très nette augmentation de la teneur en ATP ; l'effet le plus spectaculaire étant produit par le nicosulfuron à la concentration de 4,5 mg/L puisque la teneur en ATP est multipliée par un de facteur 4,7 ;

Ces herbicides qui, tous 3 réduisent la densité cellulaire, produisent aussi des effets similaires sur les teneurs en ATP et pigments photosynthétiques bien qu'ils possèdent des mécanismes d'action très différents. En effet, ces 3 herbicides sont respectivement : inhibiteur de la photosynthèse pour la bentazone, inhibiteur de l'élongation des acides gras à longue chaîne qui permet la formation des acides gras saturés possédant 20 carbones et plus pour le diméthénamide et inhibiteur de la biosynthèse des acides aminés à chaînes ramifiées pour le nicosulfuron.

**Tableau 37 : Effet des herbicides (formulation commerciale) sur la teneur en ATP, en pigments et la densité cellulaire de *Chaetoceros gracilis* après 3 j de culture en milieu post hivernal.**

Herbicide	ATP (pmol 10 <sup>6</sup> cell <sup>-1</sup> )	Chlorophylle a (ng 10 <sup>6</sup> cellules <sup>-1</sup> )	Chlorophylle c (ng 10 <sup>6</sup> cell <sup>-1</sup> )	Caroténoïdes (ng 10 <sup>6</sup> cell <sup>-1</sup> )	Densité Cell. Millions L <sup>-1</sup>
0 = Témoin	13,66	156,28 ± 18,31	62,46 ± 9,38	103,51 ± 13,94	332,5
Bentazone :					
1 µg L <sup>-1</sup>	-	154,7 (99%)	60,9 (97%)	99,4 (96%)	325,8 (98%)
10 µg L <sup>-1</sup>	-	153,1 (98%)	68,7 (110%)	96,3 (93%)	322,5 (97%)
20 µg L <sup>-1</sup>	23,52 (172%)	248,5 (161%)	94,9 (152%)	151,1 (146%)	229,4 (69%)
50 µg L <sup>-1</sup>	27,88 (204%)	357,9 (231%)	132,4 (217%)	164,6 (159%)	98,1 (29%)
Diméthénamide:					
100 µg L <sup>-1</sup>	18,59 (136%)	228,2 (146%)	86,2 (138%)	130,4 (126%)	322,5 (97%)
2 mg L <sup>-1</sup>	27,35 (200%)	300,0 (192%)	116,2 (186%)	164,6 (159%)	169,6 (51%)
Nicosulfuron:					
0,45 mg L <sup>-1</sup>	-	168,8 (108%)	62,5 (100%)	98,3 (95%)	329,2 (99%)
1,31 mg L <sup>-1</sup>	13,29 (97%)	210,4 (135%)	64,4 (103%)	98,3 (95%)	310,3 (93%)
4,5 mg L <sup>-1</sup>	64,32 (471%)	284,4 (182%)	116,2 (186%)	173,9 (168%)	179,5 (54%)
Sulcotrione :					
88 µg L <sup>-1</sup>	14,93 (109%)	-	-	-	299,2 (90%)
1 mg L <sup>-1</sup>	15,32 (112%)	123,5 (79%)	50,0 (80%)	69,35 (67%)	269,3 (81%)
5 mg L <sup>-1</sup>	-	-	-	-	182,9 (55%)

– la sulcotrione produit, à l'inverse des 3 autres herbicides, une diminution de 20 % de la teneur en chlorophylles a et c et de 33 % de celle des caroténoïdes lorsque la densité cellulaire est abaissée de 20 %. Une légère augmentation de la teneur en ATP est parallèlement observée.

Cette diminution de la teneur en caroténoïdes s'inscrit dans la logique du mécanisme d'action de la sulcotrione. En effet, cet herbicide agit indirectement sur la synthèse des caroténoïdes en inhibant la 4-hydroxyphénylpyruvate dioxygénase (HPD) (Secor, 1994 ; Hirai *et al.*, 2002).

#### **L'ensemble de ces résultats permet de conclure que :**

- les 4 herbicides testés sont susceptibles de réduire, après 3 jours de contact, la densité cellulaire de *C. gracilis* avec, par ordre d'efficacité croissante, le nicosulfuron, la sulcotrione, le diméthénamide et la bentazone ;
- ces réductions de la division cellulaire par le nicosulfuron, le diméthénamide et la bentazone s'accompagnent d'une augmentation par cellule des teneurs en pigments chlorophylliens et en ATP.

#### **Effets de l'époxiconazole (fongicide) et du chlorpyrifos-éthyl (insecticide) sur les teneurs en ATP, en pigments et sur la densité cellulaire**

Les résultats rapportés dans le Tableau 38 montrent que les 2 pesticides testés produisent, après 3 jours de contact, une réduction de la densité cellulaire. Ces inhibitions de la division cellulaire sont ici également associées à une augmentation de la teneur en chlorophylles a et c et en caroténoïdes et surtout à un accroissement spectaculaire de la teneur en ATP.

Le fongicide s'avère très nettement plus efficace que l'insecticide causant dès 4 µg /L une réduction de 40 % de la densité cellulaire et empêchant pratiquement toute division de la diatomée à la concentration de 36 µg/L (cette réduction drastique de la croissance en présence de 36 µg/L a rendu impossible toute mesure de la teneur en pigments, faute de disposer d'un nombre suffisant de cellules).

L'époxiconazole est connu pour altérer la synthèse des stérols aussi bien chez les plantes que chez les champignons. Ce fongicide a été montré aussi inhiber le transport d'électrons photosynthétiques (Benton and Cobb, 1997) et réduire la synthèse des gibbérellines, ce qui entraîne une réduction de la croissance des plantes (Rademacher, 2000), avec augmentation de la teneur en chlorophylle (Benton et Cobb, 1995). Ces effets sont retrouvés chez *C. gracilis*, à savoir une réduction de la densité cellulaire et une augmentation des pigments. L'élévation de la teneur en ATP n'en serait que la conséquence ; toutefois, une étude des échanges gazeux sera nécessaire pour expliquer ce fait.

**Tableau 38 : Effet du chlorpyriphos-éthyl et de l'époxiconazole (formulations commerciales) sur la teneur en ATP, en pigments et la densité cellulaire de *Chaetoceros gracilis* après 3 j de culture en milieu post hivernal.**

Pesticide	ATP (pmol 10 <sup>6</sup> cell <sup>-1</sup> )	Chlorophylle a (ng 10 <sup>6</sup> cellules <sup>-1</sup> )	Chlorophylle c (ng 10 <sup>6</sup> cell <sup>-1</sup> )	Caroténoïdes (ng 10 <sup>6</sup> cells <sup>-1</sup> )	Densité Cell. Millions L <sup>-1</sup>
0 = Témoin	13,66	156,28 ± 18,31	62,46 ± 9,38	103,51 ± 13,94	332,5
Chlorpyriphos : 15 µg L <sup>-1</sup> 31 µg L <sup>-1</sup> 100 µg L <sup>-1</sup>	47,70 (349%)	290,7 (186%) - 228,2 (146%)	126,2 (202%) - 91,2 (146%)	172,9 (167%) - 139,7 (135%)	179,5 (54%) - 219,4 (66%)
Epoxiconazole : 1 µg L <sup>-1</sup> 4 µg L <sup>-1</sup> 10 µg L <sup>-1</sup> 36 µg L <sup>-1</sup> 72 µg L <sup>-1</sup>	- - 94,9 (695%) 102,5 (750%)	165,66 (106%) 265,7 (170%) 315,7 (202%) - -	66,21 (106%) 103,7 (166%) 124,9 (200%) - -	97,30 (94%) 167,7 (162%) 180,1 (174%) - -	307,6 (93%) 199,5 (60%) 172,9 (52%) 49,9 (15%) 29,9 (9%)

### Effets physiologiques de la bentazone (formulation commerciale)

#### *Effet au cours du temps de la bentazone sur la croissance de C. gracilis*

La Figure 70 montre l'effet au cours du temps de la bentazone sur la croissance de *C. gracilis* cultivée en milieu post hivernal (A) et dans un milieu f/2 (B). L'effet inhibiteur de la bentazone se produit de façon plus atténuée en milieu f/2 mais, après 3 jours de traitement, l'effet inhibiteur de l'herbicide, tend à disparaître progressivement dans les 2 milieux.

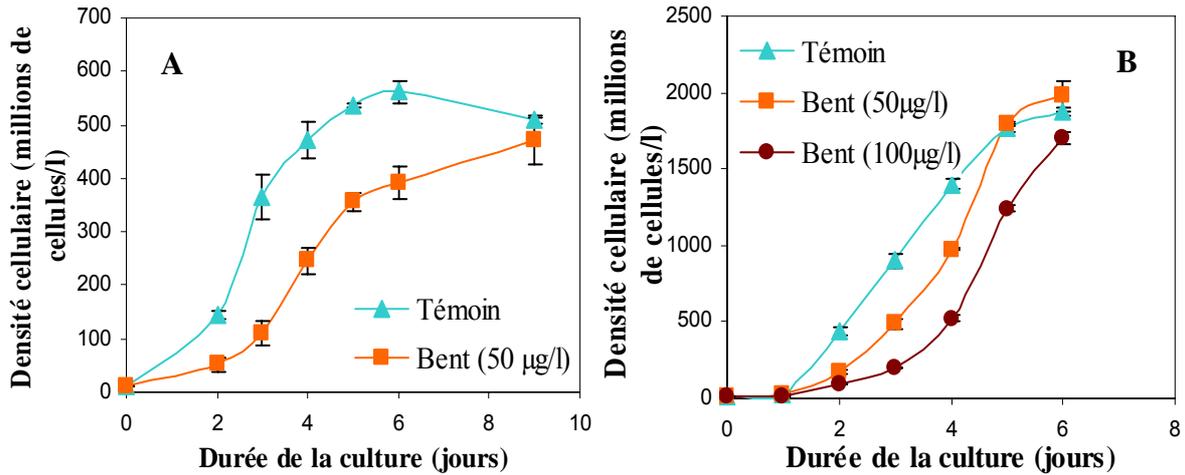
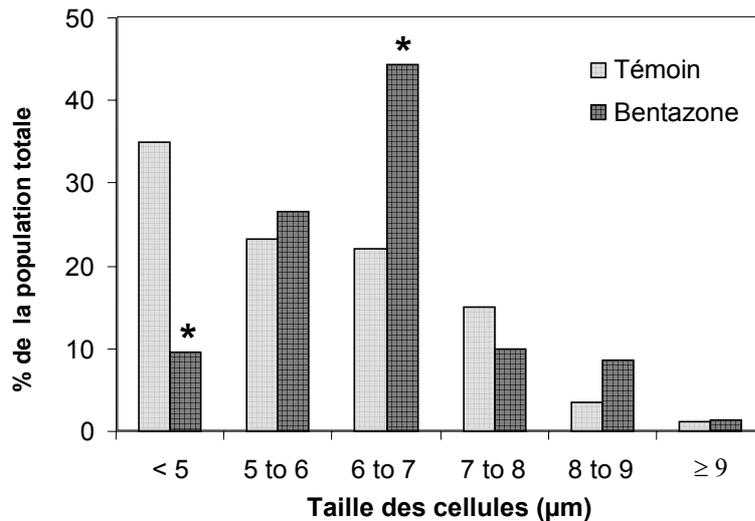


Figure 70 : Effet au cours du temps de la bentazone sur la croissance de *C. gracilis*

Après une exposition de 3 jours à 100 µg/L de bentazone (formulation), la taille des cellules s'avère significativement augmentée comme montré dans la Figure 71 et les tailles moyennes sont respectivement pour le témoin et les cellules traitées de 5,15 et 5,95 µm.

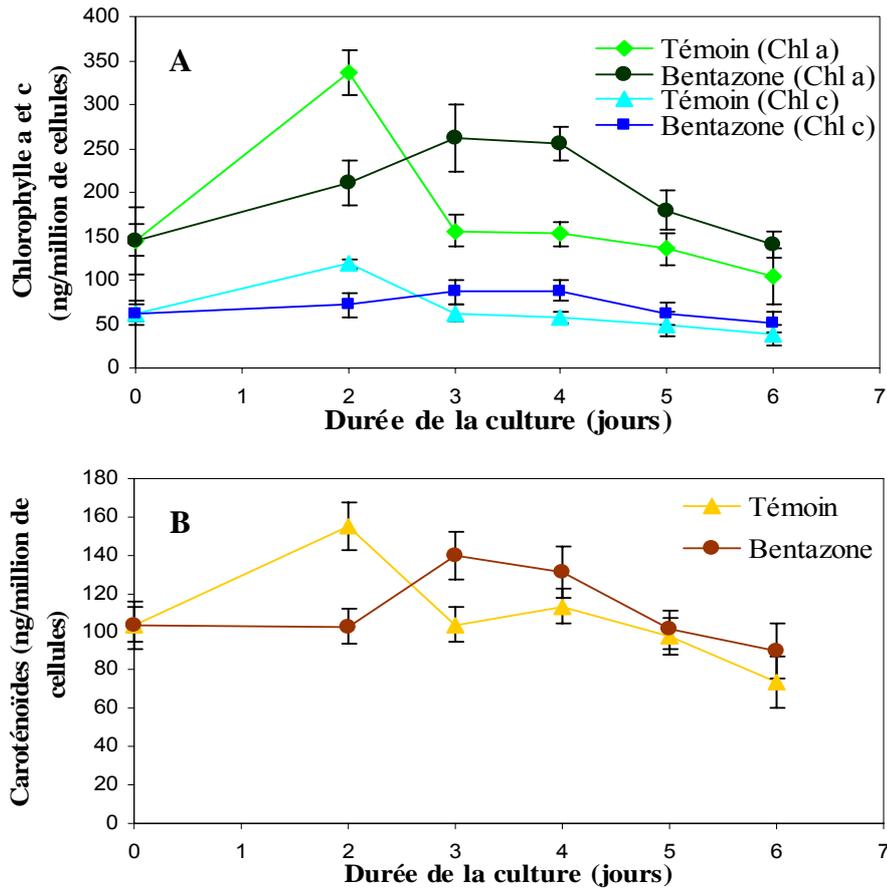


\* indique une valeur significativement au seuil de  $p < 0,05$ .

Figure 71 : Effet de la bentazone (100 µg/L) sur la taille des cellules de *C. gracilis* après 3j de culture. Témoin : n = 118 ; bentazone : n = 127.

#### Effet de la bentazone sur l'évolution de la teneur en pigments

Les modifications au cours du temps des teneurs en pigments de *C. gracilis* sont montrées dans la Figure 72.



**Figure 72 : Influence de la bentazone (50 µg/L) sur la teneur en pigments de *C. gracilis* cultivée en milieu post hivernal. Résultats exprimés en ng/million de cellules ± ES.**

**A : chlorophylles ; B : caroténoïdes.**

Dans les cultures témoins, après une forte augmentation des teneurs en chlorophylles et en caroténoïdes qui se produit après 2 jours de culture, la teneur en pigments décline ensuite et retourne à sa valeur initiale. Comparée aux témoins, l'addition de 50 µg/L de bentazone induit un décalage dans l'évolution des courbes; ce qui se traduit à 3 jours par une stimulation de la teneur en pigments qui s'atténue ou disparaît ensuite progressivement.

Le même phénomène de stimulation, quoique plus précoce, est retrouvé lorsque *C. gracilis* est cultivé sur un milieu f/2 (Tableau 39), avec une teneur générale plus élevée en pigments très certainement due à la richesse du milieu en éléments nutritifs, azote notamment.

**Tableau 39 : Influence de 50 µg/L de bentazone (Basamaïs) sur les teneurs en pigments et en ATP de *C. gracilis* cultivée pendant 1 et 2 jours dans un milieu f/2.**

		Pigments (ng. 10 <sup>6</sup> cellules <sup>-1</sup> )			ATP (pmoles 10 <sup>6</sup> cell. <sup>-1</sup> )
		Chlorophylle a	Chlorophylle c	Caroténoïdes	
1 jour	Témoin	187 ± 17	120 ± 12	173 ± 15	119 ± 13
	Bentazone	291 ± 26*	163 ± 14*	227 ± 21*	177 ± 15*
2 jours	Témoin	227 ± 20	144 ± 14	205 ± 19	111 ± 10
	Bentazone	294 ± 27*	166 ± 16	242 ± 25	159 ± 15*

Moyennes of 3-4 expériences indépendantes ± SD. \* indique une valeur significativement différente du témoin au seuil de P<0.05

**Effet de la bentazone sur la respiration et la photosynthèse**

La présence dans le milieu de culture de bentazone à 40 et 50 µg/L induit, à 3 j de culture, une augmentation des vitesses de respiration et de photosynthèse (Tableau 40)

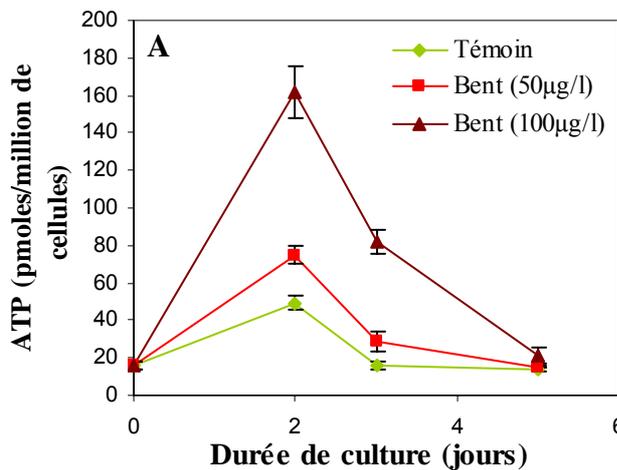
**Tableau 40 : Vitesses de respiration et de photosynthèse de *C. gracilis* exposée à différentes concentrations de bentazone après 3 jours de culture en milieu post hivernal.**

Bentazone (µg /L)	µL h <sup>-1</sup> 10 <sup>6</sup> cells <sup>-1</sup>	
	Photosynthèse vraie	Respiration
0	14,83 ± 1,2	4,02 ± 0,45
10	18,98 ± 3,13	4,11 ± 0,46
40	25,69 ± 2,85*	5,35 ± 0,49*
50	26,69 ± 3,54*	5,79 ± 0,52*

Moyennes ± SD (n = 6). \* indique une valeur significativement différente du témoin, P<0.05

**Effet de la bentazone sur la teneur en ATP**

La Figure 73 montre que la bentazone amplifie l'augmentation de la teneur en ATP qui se produit normalement à 2 j de culture.



**Figure 73 : Influence de la bentazone (50 et 100 µg/L) sur l'évolution de la teneur en ATP de *C. gracilis* cultivée en milieu post hivernal. Moyennes de 4 expériences indépendantes ± SD**

**Effet de la bentazone sur la formation de TBARS**

Le Tableau 41 montre une nette augmentation de substances réactives à l'acide thiobarbiturique, indicatrices de la peroxydation des lipides, après 2 j de culture en présence de bentazone.

**Tableau 41 : Modification des TBARS après 2 j d'exposition à la bentazone (50 µg/L) de *C. gracilis* cultivée en milieu f/2**

Témoin	Bentazone
9,10 ± 0,65 (100 %)	13,39 ± 0,87 (147 %)

Moyennes (n=3) exprimées en nmoles 10<sup>6</sup> cellules<sup>-1</sup> ± SD

#### 4.1.2 Discussion

L'ensemble des résultats concernant la bentazone montrent que, après 2-3 jours de culture :

- cet herbicide en même temps qu'il inhibe la division cellulaire produit une augmentation de la taille des cellules,
- augmente la teneur en pigments photosynthétiques, ce qui se traduit très logiquement par une augmentation de la photosynthèse,
- augmente aussi la vitesse de respiration,
- et par voie de conséquence produit une élévation de la teneur en ATP.

Ces différentes actions de la bentazone disparaissent avec la durée de culture. Ceci pourrait être dû à un métabolisme actif de la bentazone et, la détoxification de la bentazone, est un facteur clef dans le mécanisme de tolérance. De tels résultats ont été rapportés pour de nombreuses plantes incluant « mauvaises herbes » et plantes cultivées (Wu et Wang, 2003).

Les TBARS sont des indicateurs de la peroxydation des lipides qui génère principalement du malondialdéhyde et du 4-hydroxynonanal (Lagadic *et al.*, 2004). Des travaux récents rapportent que les aldéhydes insaturés dérivés des diatomées (Adolph *et al.*, 2004) et le 4-hydroxynonanal (Monneypenny et Gallagher, 2005) présentent une activité antiproliférative vis à vis de différents organismes. La production accrue de TBARS à 2 jours de traitement à la bentazone pourrait contribuer à réduire la croissance de la diatomée; cet effet disparaîtrait ensuite avec la métabolisation de la bentazone, permettant la reprise de la division cellulaire.

En se basant sur ces résultats, on peut dire que les valeurs obtenues après 3 à 4 jours d'exposition à l'herbicide peuvent ne donner qu'une vue partielle des faits se produisant dans un écosystème marin. Bien qu'un retour à la normale de la culture se produise après 6 jours de traitement, il n'en demeure pas moins que les effets, observés à 3 jours, entraînent une modification de l'écosystème marin.

Concernant les autres pesticides (à l'exception de la sulcotrione), les effets mesurés après 3 jours de traitement sont dans l'ensemble très semblables à ceux obtenus pour la bentazone, à savoir :

- réduction de la densité cellulaire
- augmentation de la teneur en pigments et en ATP

Il est à noter que ces effets du diméthénamide, du nicosulfuron et du chlorpyrifos-éthyl sont observés pour des concentrations élevées en ces pesticides, non retrouvées dans les estuaires. En revanche, l'époxiconazole se révèle toxique à de faibles concentrations, qui ont été détectées dans certains estuaires.

Une expérience complémentaire a été réalisée en conditions de culture stabilisée (tous les paramètres sont maintenus constants).

#### 4.2 Etude de l'effet de la bentazone sur *Chaetoceros gracilis* en turbidostat de type « carboxystat »

L'effet de la bentazone sur le métabolisme de *Chaetoceros gracilis* a été étudié en culture continue en bioréacteur. Dans cette culture de type pH-stat, le pH évolue en fonction de la concentration en CO<sub>2</sub> dans le milieu. Pour 2 litres de milieu de culture stérile (milieu F/2) sont

ajoutés 10 mL de NaHCO<sub>3</sub> à 30 g/L, filtrés stérilement sur membrane 0,2 µm, et 600 µL de HCl 10 %, afin d'obtenir un milieu à pH 7,2. La consommation de CO<sub>2</sub> lors de la photosynthèse provoque une augmentation du pH, automatiquement compensée par l'apport de milieu neuf contenant du CO<sub>2</sub>, et l'évacuation de milieu contenant les cellules.

La concentration de carbone fixé dans les cellules par la photosynthèse est ainsi automatiquement maintenue constante dans le bioréacteur. Le taux de renouvellement du milieu mesuré en continu est donc, dans ce système, proportionnel au taux de photosynthèse. Il est égal au taux de croissance lorsque la concentration cellulaire est constante. Il peut être évalué sur des périodes de 24 heures dans le cas de cultures en cycle jour/nuit.

Dans cette expérience, après mise à l'équilibre durant 7 jours, le Basamaïs (bentazone) a été ajouté au milieu entrant (Figure 74).

A 300 µg/L de Basamaïs, une légère réduction du taux de croissance a été détectée dans les premières 24 heures. A partir de 900 µg/L, la réduction du taux de croissance était d'environ 40 %, et 80 % pour 1,8 mg/L.

Le renouvellement permanent du milieu de culture conduit à une croissance cellulaire constante, avec stabilisation de la densité cellulaire et de tous les paramètres physiques et chimiques. Ceci permet de mettre à jour une inhibition rapide par le Basamaïs de la croissance de *C. gracilis* puisque cet effet est obtenu après 24 h d'action et qu'il est fonction de la concentration en herbicide ajoutée. Ces résultats confirment ce qui est observé après 2 jours de traitement au Basamaïs en milieu post-hivernal, l'effet étant dans ces conditions difficile à apprécier après seulement 24 h de mise en culture. La diminution de la densité cellulaire observée en présence de Basamaïs (900 µg/L) alors que la biomasse est constante (principe de la méthode appliquée) confirme des résultats rapportés précédemment (Figure 71) à savoir une augmentation de la taille des cellules.

Toutefois malgré la sensibilité de cette méthode, sa difficulté de mise en œuvre en limite l'utilisation. Elle n'a donc pas été appliquée pour les autres molécules.

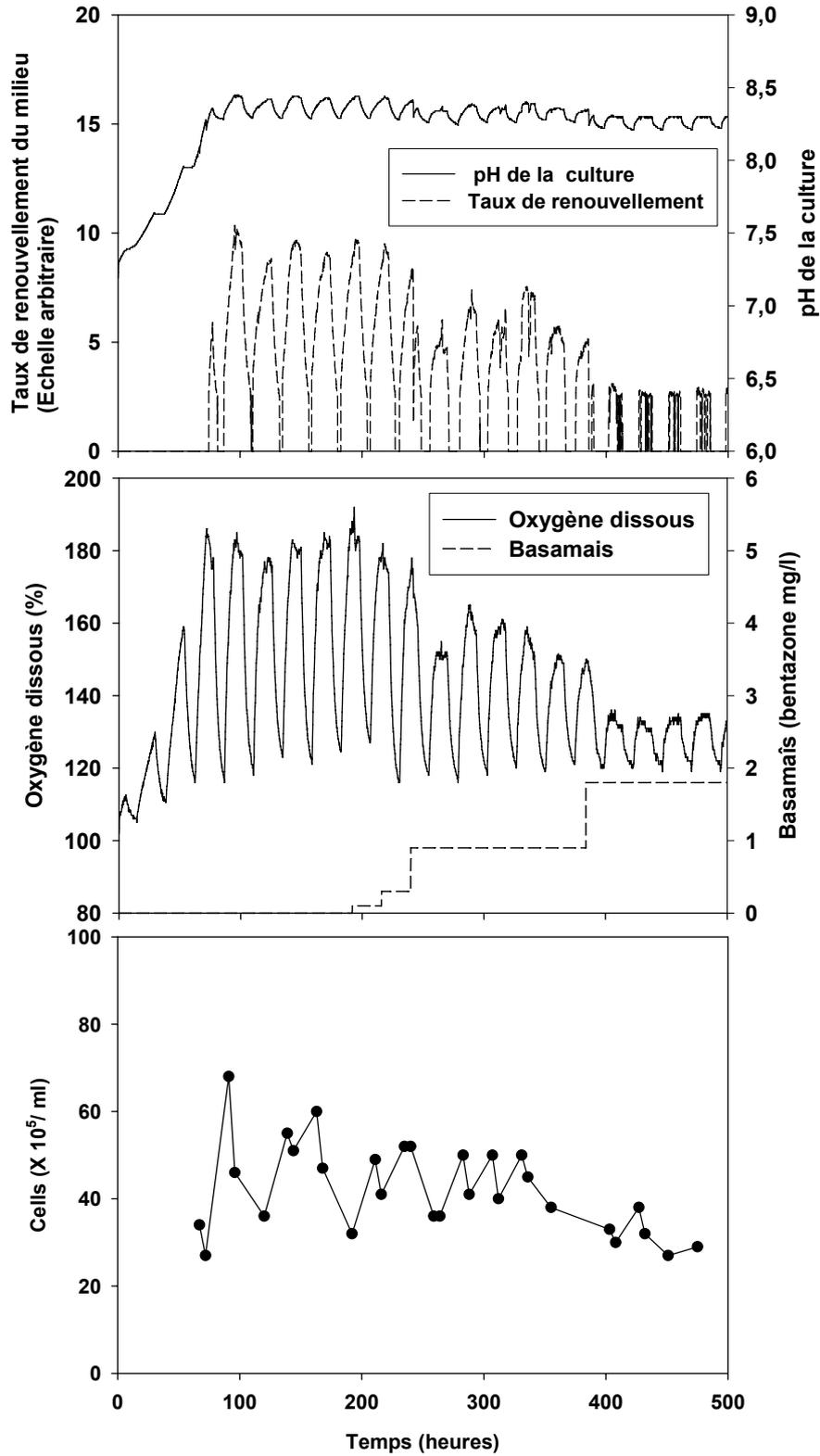


Figure 74 : Impact de l'ajout de Basamaïs sur la culture de *Chaetoceros gracilis* en carboxystat.

### 4.3 Altérations génétiques

L'adaptation des cellules face à la pression extérieure est également recherchée au niveau de la protéomique chez les cellules cultivées en milieu contaminé. Une tentative d'analyse protéomique appliquée sur la diatomée *Chaetoceros gracilis* cultivée en milieu post-hivernal était réalisée par Innova Proteomics.

#### Etude de l'Effet de la bentazone sur la diatomée *Chaetoceros gracilis*

Les cellules sont cultivées sur milieu printanier en bouteilles de 2 litres dans les bacs à 20°C, et soumises à un éclairage artificiel entre 120 et 150  $\mu\text{moles}/\text{m}^2/\text{s}$ .

La bentazone provoque une inhibition totale de la croissance à 200  $\mu\text{g}/\text{L}$  mais la tendance est déjà visible entre 50 et 100  $\mu\text{g}/\text{L}$ .

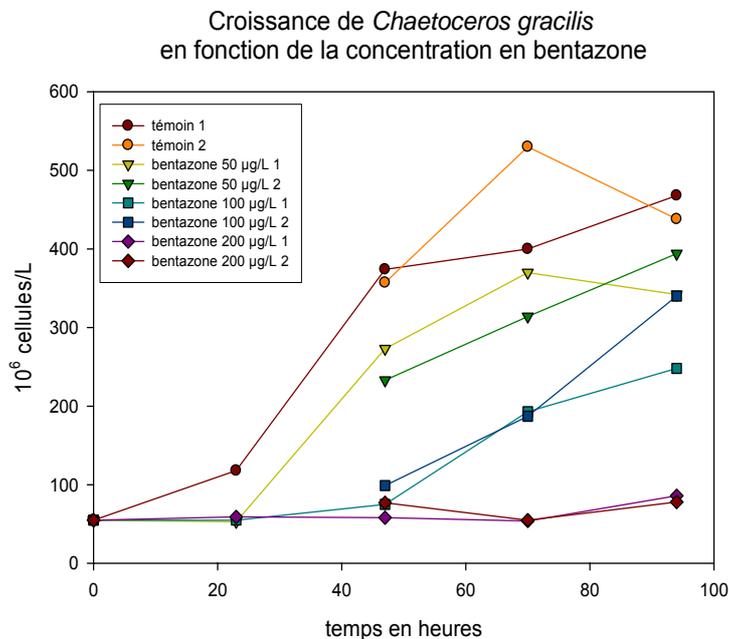


Figure 75 : Influence de la bentazone sur la croissance de *C. gracilis*

Le but initial était de déterminer quelle concentration serait appliquée afin de réaliser une étude protéomique différentielle sur cette diatomée. Les travaux d'extraction par la plateforme protéomique du Gépôle Ouest n'ont pas permis d'obtenir une qualité de gel suffisante pour réaliser l'étude différentielle (technique DIGE) envisagée.

La structure de l'ADN peut être modifiée sous l'effet des contaminants chimiques même à faible concentration.

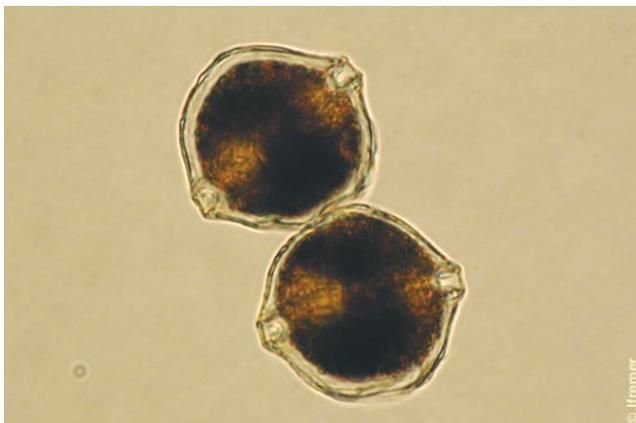
Parmi les modifications produites dans le noyau des cellules cultivées en présence de certains pesticides, des cassures de brins de l'ADN ont été mises en évidence par le test des comètes.

Plusieurs tentatives d'application du test des comètes ont été faites sur cultures. La diatomée *Chaetoceros gracilis* s'est révélée de taille trop réduite (4 µm) pour permettre une détection des modifications de noyaux (Figure 76). L'expérience reprise sur le dinoflagellé *Alexandrium minutum* n'a pas donné de résultats concluants.

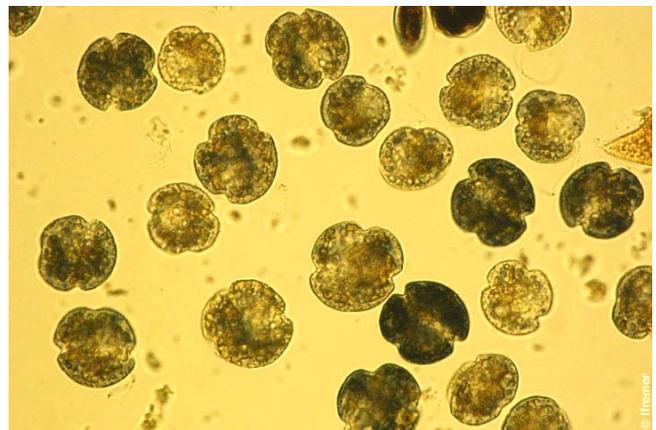


Figure 76 : Diatomée *Chaetoceros gracilis* (4 µm environ)

Pour cette espèce, l'absence d'effets après exposition directe à un génotoxique modèle, l'hydrogène peroxyde, est vraisemblablement expliquée par l'inefficacité de notre tampon de lyse à digérer la membrane cytoplasmique. *Alexandrium minutum* présente en effet une thèque protectrice qui entoure les cellules.



Dinoflagellé *Alexandrium minutum*,  
20-30 µm environ.



Dinoflagellé *Karenia mikimotoi*  
20-40 µm environ

L'applicabilité du test des comètes n'a pu être démontrée que pour le dinoflagellé *Karenia mikimotoi* cultivé en milieu f/2 (Guillard *et al.*, 1982). Les effets génotoxiques de différents pesticides ont ainsi pu être étudiés par la mesure du niveau de cassures de brins de l'ADN. Le test des comètes a été appliqué selon le protocole décrit par Akcha *et al.* (2003). Le test a été réalisé sur une culture de *K. mikimotoi* en fin de phase exponentielle de croissance et après exposition 24 h à différents pesticides. Les pesticides testés sont les insecticides organochlorés endosulfan et chlorpyrifos-éthyl (sous forme Dursban) et le fongicide époxiconazole (Opus). Chaque produit préparé en solutions d'eau de mer est apporté dans 50 mL de culture pour avoir les concentrations finales de 1, 10, 100 µg/L. La culture a également

été exposée 1 h à de l'hydrogène peroxyde (5 et 100  $\mu\text{M}$ ), un génotoxique direct utilisé comme témoin positif pour le test des comètes. Pendant l'exposition, l'éclairage est identique à celui de la culture (60  $\mu\text{mol quanta/h/cm}^2$ ).

### Contrôle positif

Après exposition à l'hydrogène peroxyde, une augmentation concentration dépendante du niveau de cassures de brins de l'ADN est observée dans les noyaux des cellules de *Karenia mikimotoi* ( $p < 0,005$ ) (Figure 77). Ce résultat a permis de valider ainsi l'applicabilité de notre test des comètes pour l'étude des effets génotoxiques chez cette espèce de microalgues.



Photo du noyau de *Karenia mikimotoi* : témoin négatif.

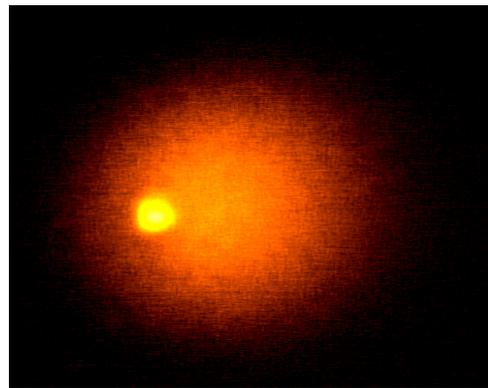
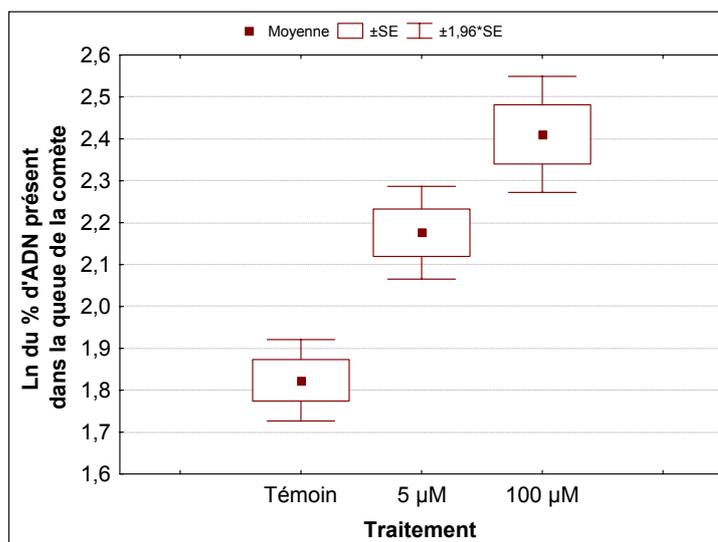


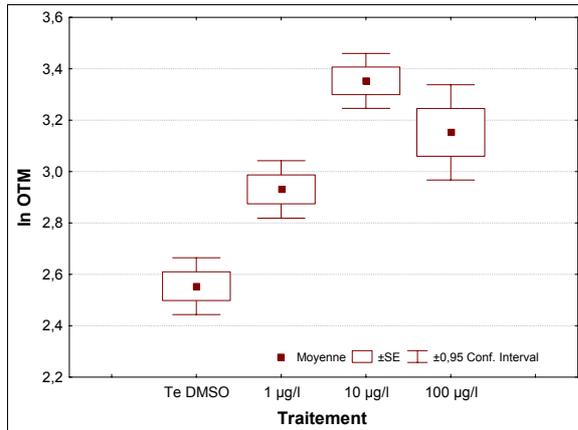
Photo du noyau de *K. mikimotoi* après exposition à 100 $\mu\text{M}$  de peroxyde d'hydrogène : témoin positif

**Figure 77 : Photos du noyau de *Karenia mikimotoi***

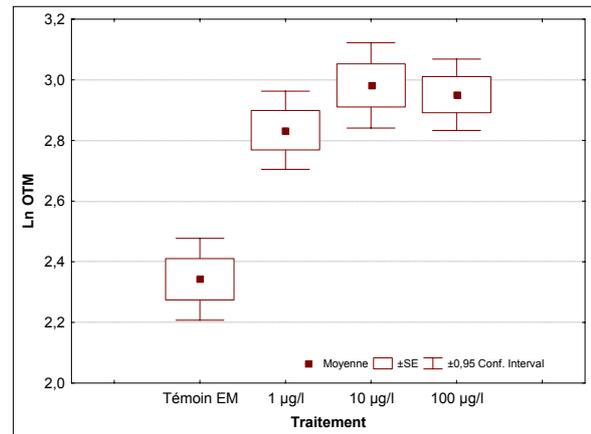


**Figure 78 : Effet de l'exposition à l' $\text{H}_2\text{O}_2$  sur le niveau de cassures de brins de l'ADN de *Karenia mikimotoi***

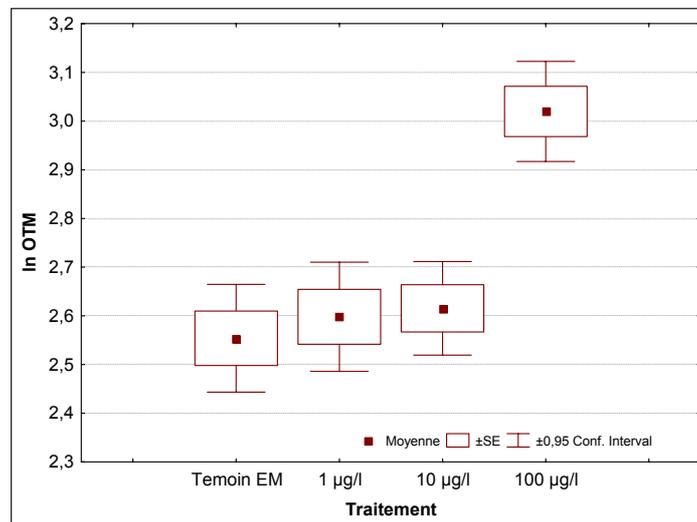
Résultats obtenus en présence des pesticides



Chlorpyriphos éthyl (Dursban)



Endosulfan



Epoxiconazole (Opus)

Figure 79 : Effet de l'exposition à 3 pesticides sur le niveau de cassures de brins de l'ADN de *Karenia mikimotoi*

Le chlorpyriphos éthyl présente un effet génotoxique dès la plus faible concentration testée de 1 µg/L ( $p < 0,05$ ). L'effet génotoxique obtenu après exposition à 10 µg/L est significativement plus fort que celui obtenu à 1 µg/L. Au delà de 10 µg/L, l'effet ne génotoxique ne semble néanmoins plus dépendant de la concentration. L'endosulfan présente également une génotoxicité pour *Karenia mikimotoi*. Après exposition, une augmentation du niveau de cassures de brins de l'ADN est observée dès la plus faible concentration testée de 1 µg/L ( $p < 0,05$ ). Dans le cas de l'endosulfan, les effets génotoxiques n'apparaissent pas dépendants de la concentration d'exposition. L'exposition à l'époxiconazole ne présente un effet toxique qu'à la plus forte concentration testée de 100 µg/L.

Ces résultats montrent que les pesticides peuvent être absorbés par les cellules phytoplanctoniques et bioactivés en espèces chimiques réactives pour le matériel génétique. La formation de cassures de brins de l'ADN résulte en effet majoritairement de l'attaque de l'ADN par des oxyradicaux produits par le métabolisme cellulaire mais également lors de la

biotransformation de molécules de xénobiotiques. . Ces résultats complètent ceux déjà connus chez la microalgue d'eau douce *Euglena gracilis* soumise à l'effet génotoxique de molécules organiques (Aoyama *et al*, 2003), chez la diatomée marine *Chaetoceros tenuissimus* en présence de métaux tels que cadmium, plomb et mercure (Desa *et al*, 2006), ou encore de façon générale chez les organismes soumis aux contaminants organiques ou métalliques du sédiment dans le milieu naturel (Clément *et al*, 2004). Ces auteurs soulignent également que la réparation des cassures peut se manifester quasi immédiatement (Desa *et al*, 2006). Il en résulte néanmoins une atteinte au génome chez les microorganismes.

Cette étude sera à compléter par des expériences similaires en présence de différentes molécules, en solution pure et en formulation. En effet, certaines n'ont pas montré d'effet significatif (bentazone et Bazamais) ce qui laisse supposer leur innocuité génétique. D'autre part la toxicité des adjuvants à la molécule active est souvent négligée bien qu'il apparaisse une réactivité beaucoup plus grande du mélange, dont les doses minimales tolérables ne sont pas mentionnées dans la littérature.



## 5 Conclusions générales et perspectives

L'objectif du projet IPEM était d'étudier l'impact des pesticides détectés (ou susceptibles de l'être) dans les eaux côtières sur le phytoplancton marin, depuis les assemblages de populations jusqu'à la cellule. Pour cela les différentes actions se sont appuyées sur l'étude des populations naturelles et sur les cultures monospécifiques en laboratoire, exposées aux six molécules suivantes ainsi qu'à l'une de leur formulation (bentazone, chlorpyrifos-éthyl, diméthénamide, nicosulfuron et sulcotrione).

Les analyses de pesticides réalisées en différentes zones plus ou moins soumises aux contaminations par les pesticides utilisés en agriculture ont montré que les molécules sélectionnées pour notre étude n'ont pas la même fréquence de présence. Les plus utilisées sont les herbicides. Le choix des molécules pour l'étude a été fait suite à l'interdiction de l'atrazine (2002) et aux orientations des préconisations pour une substitution, or dans notre région même si elles ont été suivies, c'est finalement l'acétochlore (non retenu dans cette étude), qui a été le plus utilisé avec une homologation à 2000 g/ha. Le nicosulfuron utilisé à 60 g/ha a été retrouvé sur différents sites de l'étude dans les eaux côtières à faible concentration. Cependant il est important de prendre en compte l'activité biologique des molécules pesticides, la plus présente n'étant pas forcément la plus toxique, et la présence simultanée de plusieurs espèces chimiques est de loin le facteur le plus pertinent à prendre en compte, comme le montrent nos résultats.

L'effet de mélange a été étudié sous deux aspects :

- 1) la formulation commerciale des produits sélectionnés, qui comprend plusieurs coformulants (adjuvants, additifs, solvants...). Les résultats ont montré généralement une plus grande activité toxique de la molécule active lorsqu'elle est en formulation : plus de 1000 fois plus toxique pour l'herbicide bentazone en formulation Basamais (présentation au SETAC, Prague : Hourmant *et al.*, 2004) ;
- 2) les pesticides testés en mélange de formulation ont une toxicité particulièrement élevée et quasi-immédiate (présentations à Aqualife et Alger avec test PICT : Arzul *et al.*, 2006).

Les assemblages de populations naturelles contaminées expérimentalement et suivis quant à leur composition spécifique, ont montré des modifications : prédominance des diatomées centriques, au détriment des diatomées pennées et des dinoflagellés. Les espèces phytoplanctoniques nuisibles du fait de la toxicité qu'elles confèrent aux organismes filtreurs, ou de leur propriété ichtyotoxiques, n'ont pas montré de tolérance particulière vis-à-vis des produits phytosanitaires, hormis *Heterosigma akashiwo*. De plus, dans le prélèvement réalisé en estuaire de Penzé les genres phytoplanctoniques favorables à la reproduction des copépodes se développent moins bien en présence de pesticides, ce qui laisse présager un possible impact sur la chaîne trophique.

Du point de vue de la tolérance des assemblages au stress chimique causé par les pesticides, il apparaît une variation en fonction de la contamination chronique du milieu. En effet, les populations issues des milieux les moins contaminés sont les plus sensibles à la toxicité des pesticides, tandis que dans les zones où la concentration en pesticides présents naturellement est élevée, le phytoplancton est moins affecté par la contamination aiguë (PICT : Arzul *et al.*,

2006). Ces résultats confirment ceux très similaires, obtenus en milieu dulçaquicole (Bérard *et al.*, 1999 ; Dorigo *et al.*, 2002).

Les changements apparus dans la communauté des microorganismes, contaminée expérimentalement par des doses faibles de pesticides, ont été suivis en microcosmes *in situ*. Ils ont mis en évidence les modifications au niveau de la composition pigmentaire, et de structure génomique des communautés naturelles. Ces changements laissent supposer, comme avec le test PICT, un changement de composition spécifique, mais également une possible sélection des individus tolérants, et/ou l'adaptation chez les espèces.

Les espèces utilisées en cultures monospécifiques pour comparer la toxicité des pesticides : la diatomée *Chaetoceros gracilis*, le dinoflagellé *Alexandrium minutum* et la cyanobactérie *Synechococcus* sp. ont montré, d'une part, que leur réponse aux produits toxiques ne permet pas de définir si l'une ou l'autre est plus sensible, étant donné l'importance des autres facteurs tels que : conditions nutritives et lumière. D'autre part, il apparaît que les CE<sub>50</sub> du déméthénamide calculées à l'aide des résultats obtenus sont les plus faibles, tandis que les CE<sub>50</sub> du bentazone sont les plus élevées. Ceci permet de classer ces deux produits (molécules actives seules) comme respectivement, le plus et le moins toxique. À partir des cultures monospécifiques, il a également été démontré que l'insecticide chlorpyrifos-éthyl a un effet sur les microalgues. Bien que son action biologique sur les végétaux ne soit pas prévisible, les effets observés avec la formulation Dursban sur *A. minutum* en milieu estuarien simulé montrent la CSEO la plus faible (< 1 µg/L).

En comparant les CSEO pour chaque produit testé individuellement en culture monospécifique, aux concentrations mesurées *in situ*, le risque pour les producteurs primaires apparaît peu probable : concentration mesurées *in situ* / CSEO < 1. En revanche les expériences sur le phytoplancton naturel exposé aux pesticides en mélanges, ont mis en évidence la grande sensibilité des microorganismes procaryotes et eucaryotes (Stachowski-Haberkorn *et al.* 2007). Les expériences sur les cultures monospécifiques sous-estiment les effets observés sur les populations en milieu naturel.

Les études physiologiques sur les cellules cultivées en présence de pesticides ont montré une stimulation du métabolisme : élévation de la respiration, de la production d'oxygène, forte élévation de l'ATP intracellulaire, augmentation du contenu pigmentaire et de la taille des cellules. Le mode d'action du bentazone en formulation, lequel agit théoriquement au niveau du photosystème II, s'appuie également sur l'oxydation des lipides, avec formation de dérivés aldéhydes. Ceux-ci sont connus pour bloquer les divisions cellulaires, ce que permet de vérifier les courbes de croissances obtenues, très ralenties lorsque le contenu cellulaire en dérivés oxydés est important. La levée d'inhibition de croissance est observée en même temps que les dérivés oxydés diminuent (Hourmant *et al.*, 2007). Les mécanismes d'action des pesticides sur les cellules phytoplanctoniques peuvent donc être multiples.

D'après cette étude, et celles d'autres auteurs (Bérard *et al.*, 1999 et Dorigo *et al.*, 2004) les effets des pesticides sur les assemblages phytoplanctoniques pourraient conduire à l'élimination des espèces les plus sensibles, mais également à l'adaptation de certaines devenant tolérantes. Les altérations de l'ADN sous l'effet du stress chimique a montré, chez le dinoflagellé *Karenia mikimotoi*, la production de cassures (test des comètes : Akcha *et al.*, 2007). Bien que réparables, ces cassures pourraient conduire à des modifications génétiques transmissibles et irréversibles.

Les travaux de ce projet apportent donc les réponses aux questions posées, et ont permis plusieurs mises au point :

- expérimentales en routines, pour les cultures monospécifiques avec de nombreux contacts auprès des spécialistes en écotoxicologie,
- technologiques avec la mise au point du protocole pour les études génétiques, le test des comètes sur phytoplancton,
- techniques avec la mise au point des microcosmes *in situ*,
- analytiques avec l'application à l'écotoxicologie des profils pigmentaires et des empreintes moléculaires des communautés.

Enfin, à partir des résultats obtenus de nouvelles questions auxquelles certaines expériences en cours devraient apporter des réponses apparaissent :

- Quelle est la part de l'impact indirect des pesticides sur les herbivores ? Est-ce un impact dû aux contaminants ou à leurs métabolites s'ils existent ?
- Quel sera l'impact à moyen terme sur l'écosystème, des assemblages phytoplanctoniques exposés à des contaminations chroniques : les modifications morphologiques (taille, facteur essentiel dans la sélection par les filtreurs) et la composition chimique, bien que partiellement étudiées ici, laissent supposer des changements avec des répercussions sur les consommateurs herbivores.
- Par ailleurs, tout décalage dans la production de certaines espèces microalgales ne répond plus aux besoins des premiers stades larvaires chez les filtreurs (Moal *et al.*, 1987 ; Dupuy *et al.*, 1999; Powell *et al.*, 2002). Or les pesticides peuvent retarder la croissance des populations, comme l'ont montré les expériences tant en microcosmes qu'en cultures monospécifiques.
- Que deviennent les brins d'ADN altérés : la vitesse de réparation est-elle observable et mesurable ? Les individus atteints seraient-ils viables à moyen terme, se divisent-ils à la même vitesse et quelles sont leurs nouvelles particularités (modifications de tolérance, métabolique...)?



## 6 Valorisation, Communications et diffusion des résultats

### 6.1 Publications

Akcha F., Arzul G., Rousseau S., Bardouil M.. Suitability of the comet assay for the genotoxicity study of pollutant exposure in phytoplankton . **accepté** (PRIMO)

Arzul Geneviève, Quiniou Françoise, Hourmant Annick, de la Broise Denis, Stachowski-Haberkorn Sabine, Akcha Farida, Limon Gwendolina, Durand Gael. Contribution des pesticides dans le contrôle du développement phytoplanktonique. **Soumis pour publication au GFP.**

Arzul G. and Quiniou F, Carrie C., 2006. In Vitro Test-Based Comparison of Pesticide-Induce Sensitivity in Marine and Freshwater Phytoplankton. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 16:1–7

Arzul G., Quiniou F., Carrie C., Forget G., Colmagro E., Videau C., Durand G. Role of the development stage in the response of microalgae to pesticide toxicity. *En cours d'achèvement (traduction)*

Arzul G., Durand G., Hureau D., Limon G. and Sauren S. Use of Pollution-induced community tolerance in marine phytoplankton communities as bioindicator of long term contamination, and experimental tolerance induction. *En cours d'achèvement (traduction)*

Arzul G. and Quiniou L.. Experimental modification in coastal marine specific diversity by organic pollutants input. *En cours de rédaction*

Arzul G. et nombreux autres auteurs, Projet d'ouvrage en co édition Ifremer (Quae) : Les pesticides dans l'environnement côtier. Quel impact sur les premiers niveaux trophiques ? *En cours, sortie prévue 2008.*

De la Broise D., Palenik B., Immersed *in situ* microcosm: a tool for the assessment of pollution impact on phytoplankton, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 341: 274–281, 2007.

Hourmant A., Amara A., Pouline P., Durand G., Arzul G. and Quiniou F. Effect of bentazon on growth and physiological responses of marine diatom: *Chaetoceros gracilis*. **Soumis.**

Stachowski-Haberkorn S., Quiniou F., Nedelec M., Robert R., Limon G., De la Broise D., *In situ* microcosms, a tool to assess pesticide impacts on oyster spat *C. gigas* accepté avec corrections (en cours) *Ecotoxicology*

Stachowski Sabine, De La Broise Denis, Herbicide impact assessment on marine phytoplankton communities using multiple *in situ* microcosms, (*en cours*)

Stachowski Sabine, De La Broise Denis, Impacts of Round'up (Glyphosate) on marine phytoplankton, (*en cours*)

Stachowski Sabine, De La Broise Denis, Pesticide impact on marine phytoplankton communities : comparative assessment of FACS analysis, molecular fingerprints (TTGE) and pigment Fingerprints (HPLC), (*en cours*)

## **6.2 Congrès**

Plusieurs **participations à des congrès** ont permis de présenter les premiers résultats.

### **6.2.1 PRIMO**

Congrès annuel, Floride, mai 2007

#### **Applications of the alkaline comet assay in marine organisms: *in situ* and laboratory studies**

F. Akcha, N. Wessel, S. Rousseau, C. Munsch, D. Menard, X. Caisey, G. Arzul, F. Quiniou, T. Burgeot

Ifremer, Département de Biogéochimie et Ecotoxicologie, Rue de l'Île d'Yeu, 44311 Nantes Cedex 03, France.  
Email : fakcha@ifremer.fr

### **6.2.2 SETAC**

11<sup>ème</sup> colloque annuel, Rimouski, Québec, 28-29 mai 2007-06-24

#### **Utilisation des microcosmes *in situ* pour évaluer la toxicité de pesticides sur du naissain d'huîtres *Crassostrea gigas*. 1<sup>er</sup> prix décerné pour la présentation et le contenu.**

Sabine Stachowski-Haberkorn<sup>1</sup>, Françoise Quiniou<sup>2</sup>, Morgane Nédelec<sup>3</sup>, René Robert<sup>2</sup>, Gwendolina Limon<sup>4</sup>, Denis de la Broise<sup>1</sup>.

1 : LUMAQ Université de Bretagne Occidentale, Quimper, France

2 : Ifremer-BP70, Plouzané

3 : Agrocampus-Begmeil

4 : IDHESA- BP 52, Plouzané

### **6.2.3 Groupe Français des Pesticides**

XXVIIème congrès du Groupe Français pour les Pesticides, Bordeaux, 21-23 mai 2007.

Poster : Session A : Pesticides : aspects généraux

#### **Contribution des pesticides dans le contrôle du développement phytoplanctonique**

Arzul Geneviève<sup>1</sup>, Quiniou Françoise<sup>1</sup>, Hourmant Annick<sup>2</sup>, de la Broise Denis<sup>3</sup>, Stachowski-Haberkorn Sabine<sup>3</sup>, Akcha Farida<sup>1</sup>, Limon Gwendolina<sup>4</sup>, Durand Gael<sup>4</sup>.

1 : Ifremer, BE-Ecotox, 29280 Plouzané ; 2 : UBO, 29200 Brest ; 3 : LUMAQ, 29000 Quimper ; 4 : IDHESA, 29280 Plouzané

La production primaire en milieu marin est due en grande partie aux algues unicellulaires qui se développent dans la masse d'eau : le phytoplancton pélagique et benthique. Son

développement est influencé par de nombreux facteurs caractéristiques du milieu, et qui correspondent aux exigences physiologiques et nutritionnelles des espèces. Parmi ces facteurs il faut citer : l'hydrodynamisme, la température et la salinité, la lumière, les teneurs en carbone et le pH, les éléments nutritifs majeurs et traces. La production de cellules algales est limitée par le broutage et la filtration des organismes herbivores, le développement de parasites, les compétitions allélopathiques. A ces facteurs propres au milieu, s'ajoute le stress chimique, résultat des apports en milieu côtier de contaminants de nature et d'origine diverses. Certains pesticides d'origine agricole principalement, par leur propriété herbicide, peuvent dans certains cas exercer une pression importante sur le développement du phytoplancton. Leur présence en mélanges augmente les effets inhibiteurs de croissance des populations, et les espèces les plus sensibles disparaissent au profit des plus tolérantes. Il est ainsi possible de modifier les assemblages d'espèces lorsque les populations sont soumises à un stress chronique, avec une évolution vers la sélection d'espèces résistantes, et même jusqu'au phénomène d'eutrophisation avec production de fortes densités cellulaires. La résistance des microalgues à la toxicité des pesticides peut également être acquise au niveau de l'espèce, comme l'ont montré des expériences de repiquages successifs en milieu contaminé. Dans certains cas, des lésions à l'ADN sont observées (test des comètes). Les pesticides peuvent agir selon leur mode d'action, à plusieurs niveaux physiologiques : modification de la respiration et de la photosynthèse, production de malondialdéhyde et retard de division cellulaire, stockage d'ATP, et modifications morphologiques. Ajoutées au changement de composition spécifique des populations, ces modifications peuvent avoir des conséquences négatives sur les herbivores. En effet le zooplancton, dont font partie les phases larvaires de nombreuses espèces d'invertébrés et de poissons, sensible à la qualité chimique et à la taille des cellules algales, peut ainsi se trouver en situation de stress nutritionnel. Les effets des pesticides diffèrent également selon le stade de développement des populations phytoplanctoniques, les stades initiaux étant les plus sensibles. Inversement lorsque les pesticides arrivent en eaux côtières où se trouve une efflorescence microalgale déjà bien établie, son développement n'est pas modifié. Les pesticides peuvent donc intervenir dans le contrôle des développements phytoplanctoniques en milieu marin.

#### **6.2.4 Premier Congrès Méditerranéen d'Océanologie**

Tolérance des populations induite par la pollution : un bon indicateur pour évaluer l'effet de la pollution chronique chez les communautés phytoplanctoniques côtières, Alger, Algérie, 20-22 novembre 2006

Arzul G<sup>1</sup>, Durand G<sup>2</sup>, Hureau D<sup>2</sup>, Limon G<sup>2</sup>, and Masson D<sup>1</sup>.

1 : Ifremer, Plouzané and La Tremblade, France, [genevieve.arzul@ifremer.fr](mailto:genevieve.arzul@ifremer.fr)

2 : Pôle Analytique des Eaux, BP 52, 29280 Plouzané, France, [gael.durand@pae-brest.fr](mailto:gael.durand@pae-brest.fr)

**Assessment of pollution impact on marine phytoplankton : Development and test of experimental tools**, Alger

Denis de la Broise<sup>1</sup>, Claude Cerceau<sup>1</sup>, Gaël Durand<sup>2</sup>, Sabine Stachowski<sup>1</sup>.

1 : LUMAQ Université de Bretagne Occidentale, Quimper, France, [denis.de-labroise@univ-brest.fr](mailto:denis.de-labroise@univ-brest.fr)

2 : Pôle Analytique des Eaux, Brest, France, [gael.durand@pae-brest.fr](mailto:gael.durand@pae-brest.fr)

### 6.2.5 31ème congrès de l'Union des Océanographes de France

« Santé et Environnement Marin : Impacts de l'environnement marin sur la santé de l'homme, des organismes et des écosystèmes marins », Nantes, 2-3 novembre 2006.

Communication orale :

#### Rôle du stade de développement dans la sensibilité des cultures phytoplanctoniques vis-à-vis de la toxicité des pesticides.

G.Arzul<sup>1</sup>, F. Quiniou<sup>1</sup>, C. Carrie<sup>2</sup>, G. Forget<sup>1</sup>, E. Colmagro<sup>3</sup>, C. Videau<sup>2</sup>, G. Durand<sup>2</sup>.

1 : Ifremer, BE, BP 70, 29280 Plouzané

2 : Pôle Analytique des Eaux, BP 52, 29280 Plouzané

3 : UBO, Bd Le Gorgeu, 29200 Brest

Poster

Action d'un herbicide, le bentazone (formulation), sur la croissance et le métabolisme d'une diatomée marine : *Chaetoceros gracilis*

Amara A<sup>1</sup>, Hourmant A<sup>1</sup>, Stachowski S<sup>1</sup>, Arzul G<sup>2</sup>, Quiniou F<sup>2</sup>, Durand G<sup>3</sup>.

1: Université de Bretagne Occidentale, 29238 Brest cedex 3, France

2: Ifremer, BE, BP 70, 29280 Plouzané, France

3: Pôle Analytique des Eaux, BP 52, 29280 Plouzané, France

### 6.2.6 Seminar AquaLife

Kiel bbe Moldaenke, September 2006

#### Pollution-Induced Community Tolerance: a good indicator for long term pollution assessment in coastal phytoplankton communities

Arzul G.\*, Durand G.\*\*, Hureau D.\*\*, Limon G.\*\* and Masson D.\*

\*Ifremer, Plouzané and La Tremblade, France

\*\*Pôle Analytique des Eaux, Plouzané, France

### 6.2.7 UOF Forum des jeunes océanographes - EMECS 7, Environmental Management of Enclosed Coastal Areas

9-12 mai, 2006, Caen, France

#### Poster : *In situ* microcosms, a tool to assess pesticides impacts on natural marine phytoplankton communities

S. Stachowski<sup>1</sup>, G. Dieuset<sup>1</sup>, D. Hureau<sup>2</sup>, G. Durand<sup>2</sup>, D. de la Broise<sup>1</sup>  
(prix du meilleur poster-UOF)

1 LUMAQ, Université de Bretagne Occidentale, 6 rue de l'université, 29334 Quimper, France.

2 Pôle Analytique des Eaux, 120 rue A. De Rochon, B.P. 52, 29280 Plouzané, France

Pesticides are widely used for domestic and agricultural practices, and coastal areas can be chronically contaminated with some of these chemicals. In these areas, primary producers, and especially phytoplankton, are key organisms because they have to sustain invertebrates and fishes; these non-target organisms can also be affected by pesticides, and sensitive species can be replaced by more tolerant-ones, leading to a disturbance of

the phytoplankton community. In order to assess this aspect, we used *in situ* microcosms located in the Glénan archipelago (10 nautic miles from the coast, south Brittany), a usually non-contaminated area. Microcosms were a set of 108 2L glass bottles, placed on 3 immersed structures, at 4 m depth. These bottles contained natural 200 µm filtered sea-water. The pesticides tested were: 5 herbicides (Bentazon, Dimethenamid, Glyphosate, Nicosulfuron, Sulcotrione), 1 insecticide (Chlorpyrifos-éthyl), 1 fungicide (Epoxyconazol). 4 experiments were conducted in 2005, from May to September, each one lasted 12-14 days. The concentrations tested were in the same range than those found in natural coastal environments, i.e. 0.1 µg/L of active substance. Samples were analyzed by HPLC. The results showed that in such experiments, natural phytoplankton communities can be kept in bottles and stay close to the surface water phytoplankton composition. First results suggest little effects of Glyphosate on the communities. This has to be further investigated using other analysis tools.

**Poster : Effects of pesticides on cellular ATP concentration in marine phytoplankton**

*S. Stachowski*<sup>1</sup>, *A. Amara*<sup>2</sup>, *E. Colmagro*<sup>2</sup>, *J. Pothier*<sup>3</sup>, *A. Hourmant*<sup>2</sup>, *G. Arzul*<sup>3</sup>, *F. Quiniou*<sup>3</sup>

1 LUMAQ, Université de Bretagne Occidentale, 6 rue de l'université, 29334 Quimper, France.

2 Université de Bretagne Occidentale, 29238 Brest cedex 3, France

3 IFREMER, Dept BE-Ex, BP 70, 29280 Plouzané, France.

The effect of pesticides on marine phytoplankton is studied in the project IPEM, « Impact des Pesticides sur l'Environnement Marin » (Financial support: MEDD). Among the changes induced by pesticides, the growth attenuation is a bioindicator applied in standard tests, and the ATP content is a biomarker of energetic budget. The preliminary results of ATP analyses are presented here and further have to be compared to other parameters such as growth rate, cell volume and pigment concentrations. The concentration of ATP in *A. minutum* cultivated in presence of pesticide is always higher than in the control on day 3. The more elevated values are measured in Milagro tests (370 to 400 % of control). Later, in all cases the concentrations of ATP decrease dramatically and they become almost similar to the control, except in Basamais, Milagro (EC50) and Dursban tests, where the concentrations remain relatively elevated.

In most cases the ATP concentration in *C. gracilis* cultivated in presence of pesticide was also higher than in control, especially with Milagro (EC50), 450 % of control, and Opus, 600 to 700 % of control.

**A part of the study focusses on Basamais. This herbicide induces an increase in pigment and ATP concentrations during the 3-4 first culture days, and in the same time it inhibits the cell division. After 5-6 days the cell growth starts and the stimulating effects on ATP and pigment production disappear.**

In general the ATP concentration in the phytoplankton cells is higher at the beginning of the culture development. In presence of chemical stress the energetical budget can be strongly increased, even at low pesticide concentration (NEC).

These results suggest that the herbicide Basamais stops temporary the cell division, but does not affect the synthesis of ATP and pigments necessary to the division. Further investigations in cell size variation, radical and lipoperoxide production are planned. These informations are expected to bring information about the ecosystem response to the chemical stress induced by the pesticides in coastal area.

**6.2.8 8th International Conference on Shellfish Restoration, ICSR**

Enhancement and sustainability of shellfish resources

October 2–5, 2005, Brest, France

a- Poster :

**How can we study pesticides impacts on marine phytoplankton ?**

*Sabine Stachowski*<sup>1</sup>, *Harold Anseaume*<sup>1</sup>, *Dorothee Hureau*<sup>2</sup>, *Gaël Durand*<sup>2</sup>, *Denis de la Broise*<sup>1</sup>

1 LUMAQ, Université de Bretagne Occidentale, 6 rue de l'université, 29334 Quimper, France.

2 Pôle Analytique des Eaux, 120 rue A. De Rochon, B.P. 52, 29280 Plouzané, France

**Effect of an experimental pesticide contamination on natural phytoplankton communities and possible consequences on the secondary production**

*Geneviève Arzul*<sup>1</sup>, *Pascale Malestroit*<sup>2</sup>, *Christiane Videau*<sup>3</sup>, *Françoise Quiniou*<sup>1</sup>, *Gaël Durand*<sup>3</sup> et *Dorothee Hureau*<sup>3</sup>

1 IFREMER, Dept BE-Ex, BP 70, 29280 Plouzané, France.

2 IFREMER, Dept LER-LERPC, BP 133, 17 390 La Tremblade, France.

3 Pôle Analytique des Eaux, 120 rue A. De Rochon, B.P. 52, 29280 Plouzané, France

**Toxic effects of some pesticides on the diatom *Chaetoceros gracilis*, the prymnesiophyceae *Isochrysis galbana* and the bivalve *Crassostrea gigas* larval stage**

Caroline Leturque<sup>1</sup>, Benoît Jan<sup>1</sup>, Fabien Barloy<sup>1</sup>, Colin Le Balle<sup>1</sup>, Françoise Quiniou<sup>1</sup>, Gaël Durand<sup>2</sup> et Dorothée Hureau<sup>2</sup>, Geneviève Arzul<sup>1</sup>,

1 IFREMER, Dept BE-Ex, BP 70, 29280 Plouzané, France.

2 Pôle Analytique des Eaux, 120 rue A. De Rochon, B.P. 52, 29280 Plouzané, France

**b- Résumés / Abstracts**

**EFFECTS OF EXPERIMENTAL CONTAMINATED SEAWATER ON PHYTOPLANKTON PRODUCTION USED IN HATCHERY AND OYSTER EMBRYO-LARVAL STAGE DEVELOPMENT**

G. Arzul,<sup>1</sup> C. Leturque,<sup>1</sup> J. Benoît,<sup>1</sup> F. Barloy,<sup>1</sup> C. Le Balle,<sup>1</sup> G. Durand,<sup>2</sup> D. Hureau,<sup>2</sup> and F. Quiniou,<sup>1</sup> <sup>1</sup>Ifremer, Département BE-LabEx, BP 70, 29280 Plouzané, France, <sup>2</sup>Pôle Analytique due Eaux, BP52, 29280 Plouzané, France

When the hatchery is close to agricultural areas it is difficult to avoid the contamination of seawater by runoff from cultivated lands. Runoff can carry concentrations of pesticides at levels deleterious to the production of forage microalgae, as well as for the growth and survival of bivalve larvae. The present work aims to determine the effects on phytoplankton growth and oyster (*Crassostrea gigas*) embryo larval development, of seawater experimentally contaminated by pesticides detected in coastal seawater of Brittany (France). Among the two algal species tested, the diatom *Chaetoceros gracilis* was more affected in growth rate than the prymnesiophyte *Isochrysis galbana*, when cultivated in presence of four herbicides, dimethenamide, nicosulfuron, sulcotrione and glyphosate, and the insecticide chlorpyrifos-ethyl. Obviously the commercial formulations were more potent toxicants than the pure active molecules. According to the effective concentration producing 50 % attenuation of the algal growth rate (CE50), it was possible to determine an increasing toxicity of the formulations: For *C. gracilis*: sulcotrione formulation (Mikado) was more potent toxicant than glyphosate (Roundup), nicosulfuron (Milagro) and dimethenamide (Frontière). For *I. galbana*: dimethenamide (Frontière) was more toxic than nicosulfuron (Milagro). According to abnormal oyster embryo development a similar classification gave nicosulfuron (Milagro) more toxic than chlorpyrifos-ethyl (Dursban). The pesticides can modify the algal production and induce embryo abnormalities at much lower concentrations. Calculated EC10 and the pesticide concentrations recorded in coastal seawater are in the same range and show that hatchery functioning can be affected by contaminated seawater.

**EFFECT OF AN EXPERIMENTAL PESTICIDE CONTAMINATION ON NATURAL COASTAL PHYTOPLANKTON COMMUNITIES AND POSSIBLE CONSEQUENCES ON THE SECONDARY PRODUCTION**

G. Arzul,<sup>1</sup> P. Malestroit,<sup>2</sup> C. Videau,<sup>3</sup> F. Quiniou,<sup>1</sup> G. Durand,<sup>3</sup> and D. Hureau,<sup>3</sup> <sup>1</sup>Ifremer, Département BE-LabEx, BP 70, 29280 Plouzané, France, <sup>2</sup>Ifremer, Département LER-LERPC, PB 133, 17390 LaTremblade, France, <sup>3</sup>Pôle Analytique due Eaux, BP52, 29280 Plouzané, France

Marine coastal phytoplankton communities can be affected by the pesticide contaminations. Not only the toxicants modify quantitatively the chlorophyll concentration, but also the specific composition of the populations can be changed. This is due to the differences in sensitivity to the toxicants, of the algal species. In normal conditions, species succession and herbivory occurrence are in accordance, and several authors pointed out the role of some phytoplankton species in the success of bivalve larval development. Our experiment was based on seawater sampled in subsurface layer nearby two shellfish production areas. Sub-samples were contaminated by a mixture of pesticides that can be occasionally detected in coastal marshlands releases. The no-contaminated (control) and contaminated samples were incubated in indoor mesocosms under controlled temperature and alternated light/dark conditions. The biomass in term of chlorophyll concentration presented a general decrease during the first part of the experiment in the contaminated samples, and conversely an increase in the control. In the same time the percentages of potentially noxious phytoplankton cells (*Karenia* sp., *Alexandrium* sp., *Pseudonitzschia* sp.) was more elevated in the contaminated samples than in the controls. With reference to the published data concerning *Prorocentrum* and *Chaetoceros* species favorable to zooplankton reproduction, our results showed that both were less represented in the contaminated samples, while less favorable diatoms (*Skeletonema* sp., *Thalassiosira* sp., *Navicula* sp.) sometimes could be more important in contaminated than in controls. These results support the hypothesis that pesticides can be indirectly involved in the decrease of natural shellfish production.

**IN SITU MICROCOSMS FOR THE EVALUATION OF THE PESTICIDE IMPACT ON PHYTOPLANKTON**

D. De La Broise, and S. Stachowski, LUMAQ, Université de Bretagne Occidentale, 6, rue de l'université, 29334 Quimper, Cedex, France

Experimentations on the impact of xenobiotics on natural environments are usually set up in microcosms or mesocosms. However, physical, chemical and biological conditions in such systems are often far from natural conditions. In phytoplankton microcosms, a bloom is often observed that would not occur in the original sea water. Then, conclusions from experiments in such systems are often difficult to extend to the natural environment. The main challenge in microcosm studies is then to create and maintain conditions that mimic as close as possible the natural environment. We tested a

phytoplankton microcosm system in 2 litres bottles, including a liquid and a gas phase. A set of 36 bottles is maintained 4 meters underwater on a stainless steel structure. Renewal of a part of the liquid phase can be made every 2 to 4 days. Comparison of two weeks old microcosms and natural surrounding sea water were based on the phytoplankton pigments analysis (assessed by HPLC of pigments). Results showed that such microcosms can be useful as tools for xenobiotic impact evaluation. Applications were run on low concentrations of agricultural pesticides.

### **6.2.9 Forum des doctorants, 10 mars 2005**

#### **Comment étudier l'impact des pesticides sur le phytoplancton marin?**

*Sabine Stachowski<sup>1</sup>, Harold Anseaume<sup>1</sup>, Dorothée Hureau<sup>2</sup>, Gaël Durand<sup>2</sup>, Denis de la Broise<sup>1</sup>*

1 LUMAQ, Université de Bretagne Occidentale, 6 rue de l'université, 29334 Quimper, France.

2 Pôle Analytique des Eaux, 120 rue A. De Rochon, B.P. 52, 29280 Plouzané, France

Annexe A

#### **Influence of nutrients on the phytotoxicity of bentazone in pure solution and formulation, to marine phytoplankton**

Annick Hourmant<sup>1</sup>, Patrick Pouline<sup>1</sup>, Geneviève Arzul<sup>2</sup>, Gaël Durand<sup>3</sup>, Dorothée Hureau<sup>3</sup>, Audrey Robic<sup>2</sup>, Christiane Videau<sup>3</sup>, Françoise Quiniou<sup>2</sup>, Denis De La Broise<sup>1</sup>

1 : UBO, Laboratoire de Physiologie Végétale, 29200 Brest, France

2 : Ifremer, DEL-PC, BP 70, 29280 Plouzané, France

3 : PAE, Rue De Rochon, 29280 Plouzané, France

### **6.2.10 Congrès SETAC Europe 14th Annual Meeting,**

Prague (République Tchèque), 14-21 avril 2004

#### **Poster : Influence of nutrients on the phytotoxicity of bentazone in pure solution and formulation, to marine phytoplankton**

Annick Hourmant<sup>1</sup>, Patrick Pouline<sup>1</sup>, Geneviève Arzul<sup>2</sup>, Gaël Durand<sup>3</sup>, Dorothée Hureau<sup>3</sup>, Audrey Robic<sup>2</sup>, Christiane Videau<sup>3</sup>, Françoise Quiniou<sup>2</sup>, Denis De La Broise<sup>1</sup>

1 : UBO, Université de Bretagne Occidentale, 29200 Brest, France

2 : Ifremer, DEL-PC, BP 70 29280 Plouzané, France

3 : Pôle Analytique des Eaux, BP 52, 29280 Plouzané, France

Bentazone action was studied on growth and physiological functions in the marine diatom, *Chaetoceros gracilis* (respiration, photosynthesis and ATP production). The algal cultures were realized in nutrient enriched and depleted media, simulating respectively post-hivernal and summer situations in temperated areas. The experiments were carried out in various inputs concentrations ( $5 \cdot 10^{-4}$  to  $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) of bentazone in pure solutions, and in commercial formulation (Basamais). The herbicide bentazone (3-isopropyl-1H-2,1,3-benzothiadiazine-4(3H)-one 2,2-dioxide) is a binder to the acceptor side of PS II. In all cases, growth inhibition in *C. gracilis* was observed in presence of bentazone at 0.1 to  $100 \text{ mg L}^{-1}$ . More sensible effets were obtained with post-hivernal enrichment. Bentazone had also disturbing effets on the physiological functions in the different tested media, whatever the algal-contaminant contact duration (up to 72 h). In contrast, long term bentazone treatment (72 h) increased gazeous exchanges rate, and ATP production in enriched medium. The major role of

nitrate in these exchanges was also demonstrated. Generally, basamais produced most efficient effect on growth and physiological functions in *C. gracilis*.

Similar results were observed in the case of a dinoflagellate, *Alexandrium minutum* growth.

### 6.2.11 21e Forum des jeunes océanographes – 1er Forum européen des jeunes océanographes

06230 Villefranche/mer, 13-14 mai 2004.

Poster : **Effet des pesticides sur la taille cellulaire du phytoplancton marin.**

Laisné C.\*, Lassus M.\*\*, Arzul G\*\*., Quiniou F.\*\*, Durand G.\* et Hureau D.\*

\* Pôle Analytique des Eaux – BP 52, 29280 Plouzané, France

\*\* Ifremer Brest - BP 70 – 29280 Plouzané, France

**Charlotte Laisné** a été **lauréate du prix** accordé par l'UOF lors du 21e Forum des jeunes océanographes, pour son poster "Effet des pesticides sur la taille cellulaire du phytoplancton marin".

Les pesticides sont utilisés pour éliminer les "organismes cibles" indésirables, mais ces produits peuvent également avoir des activités néfastes sur d'autres organismes non-cibles. Il apparaît nécessaire de rechercher l'impact des pesticides sur ces organismes, en particulier sur les espèces phytoplanctoniques qui constituent le premier niveau trophique des écosystèmes marins. C'est l'objectif du projet «Impact des Pesticides sur l'Environnement Marin» (IPEM, financement MEDD).

Les effets potentiels sont étudiés sur des cultures algales monospécifiques, ayant pour base les protocoles normalisés utilisés en écotoxicologie. Ces tests, en milieu contrôlé *in vitro*, considèrent deux caractéristiques : le taux de croissance, et la production de biomasse. Or la réponse du phytoplancton au stress chimique causé par les pesticides ne s'exprime pas nécessairement au niveau de taux de croissance (mesuré à 72 ou 96 heures). En effet, les concentrations cellulaires sont peu ou pas modifiées en présence de molécule active à des concentrations élevées (mg.L<sup>-1</sup>), peu réalistes par rapport aux niveaux mesurés *in situ* (ng-µg.L<sup>-1</sup>). L'observation des cellules algales au microscope a permis de mettre en évidence des modifications de la taille cellulaire, en présence de différentes concentrations en pesticide, plus faibles que celles agissant sur la biomasse algale. Cette réponse est observée dans le cas de deux espèces phytoplanctoniques (un dinoflagellé : *Alexandrium minutum* et une prymnesiophycée : *Isochrysis galbana*). D'une façon générale, un changement des tailles et donc des volumes cellulaires est observé.

La signification de ce changement de taille est discutée. Ces résultats sont une synthèse de deux études :

- les effets du nicosulfuron, de la sulcotrione et de la bentazone sur un dinoflagellé isolé dans l'estuaire de la Penzé (France)
- les effets de l'époxiconazole et de la bentazone sur une prymnesiophycée, utilisée en éclosérie pour nourrir les larves de bivalves.

Pour chacune de ces deux études les molécules actives et leur formulation commerciale sont testées.

Les principaux résultats obtenus suggèrent que la modification de la taille peut être considérée comme un indicateur de stress causé par les pesticides, chez les algues unicellulaires.

### 6.2.12 Congrès de Bordeaux : 9<sup>th</sup> FECS Conference on Chemistry and the Environment and 2<sup>nd</sup> SFC Meeting on Environmental Chemistry Behaviour of Chemicals in the Environment

Bordeaux, France, 2004 August 29<sup>th</sup> - September 1<sup>st</sup> .

Poster : **Effects of two herbicides, bentazone and nicosulfuron, on a marine diatom : *Chaetoceros gracilis*.**

Charlotte Laisné\*, Patrick Pouline\*\*, Gaël Durand\*, Dorothée Hureau\*, Johann Legrand\*\*, Françoise Quiniou\*\*\* and Geneviève Arzul\*\*\*

\* Pôle Analytique des Eaux, 29280 Plouzané, France

\*\*Université de Bretagne Occidentale, 29200 Brest, France

\*\*\*Ifremer, DEL-PC, 29280 Plouzané France

Bentazone and nicosulfuron are used for weeds elimination in maize culture. They transport by river runoff leads to the contamination of coastal seawater. Since bentazone inhibits photosystem II, and nicosulfuron inhibits branch chain amino acid synthesis (valine, leucine, isoleucine), these herbicides can alter microalgae ecophysiology. Bentazone and nicosulfuron toxicity was tested at several concentrations towards a diatom: *Chaetoceros gracilis*. Both herbicides were studied separately in seawater dissolutions of pure products and of formulations. Formulations include additional compounds that enhance the toxic effect of the active molecule. The growth media enrichment simulated natural conditions observed in coastal environment, in post-winter (23 µM NO<sub>3</sub>; 0.4 µM PO<sub>4</sub>) and summer (0.8 µM NO<sub>3</sub>; 0.2 µM PO<sub>4</sub>). The role of nutrients level in algal sensitivity was different according to the toxicant, pure solutions of bentazone being more toxic than nicosulfuron in post-winter conditions.

Different endpoints were considered to assess the herbicides effect: algal culture growth rate (72 h), and cell physiological activities such as photosynthesis, respiration, ATP production and cell morphology.

In all cases the pesticides in formulation were more potent toxicants towards the diatom, than in pure solutions, and Basamais (bentazone formulation) was more toxic than Milagro (nicosulfuron formulation).

The results show that both herbicides have complex effects on the diatom, and the use of herbicides has potentially ecotoxicological consequences by affecting non target organisms.

Poster : **Compared effects of two pesticides , bentazone and epoxiconazole, on two trophic levels : the algae *Isochrysis galbana* and the Japanese oyster *Crassostrea gigas*.**

### 6.2.13 ISME

Congrès à Cancun, Mexique, 10, 23 août 2004

Poster : **an immersed *in situ* mesocosm as a tool for the assessment of pollution impact on *Synechococcus***

## 6.3 Information et sensibilisation

### Les valorisations grand public

**2004.** Quiniou F. et Arzul G, « Utilisation des larves d'huître pour le suivi de la décontamination de l'eau lors d'une efflorescence phytoplanctonique ichtyotoxique » : Journal le marin mars 2004.

**2005.** Arzul G., Quiniou F., Malestroit P., Durand G., Hureau D., Videau C., Effets des pesticides sur le milieu marin : cas particulier des herbicides et du phytoplancton. Semaine du

développement durable, cap Atlantique, 30 mai- 04 juin Guérande. (Communication orale et débat public).

**2004.** Arzul G., Lhéoerff G., Intervention d'une demi-journée dans une classe de 5<sup>ème</sup> du collège de Kerzourat à Landivisiau, dans le cadre du mois de la science. « Découverte du phytoplancton et du zooplancton »

**2005 et 2006.** Arzul G., Quiniou F., Intervention d'une demi-journée dans une classe de 5<sup>ème</sup> du collège de Kerzourat à Landivisiau, dans le cadre du mois de la science. « Découverte du phytoplancton et du zooplancton »

**2005 et 2006** – Arzul G., Quiniou F., 2005-2006. Participation à la réalisation d'une émission télévisée FR3 Bretagne «La terre pour avenir»: « L'impact des pesticides sur l'environnement marin », diffusée le 22 octobre 2005. Autres rediffusions en français et langue bretonne (octobre 2005- janvier 2006).

**CD Rom joint au rapport.**

**2004 -2005 – 2006** – Quiniou F. –participation au salon de l'orientation AZIMUT en janvier au parc de Penfeld, dans le stand Ifremer.

**2004-2005-2006-** Quiniou F. participation au mois de la science, en Octobre chaque année dans le stand Ifremer.

## **6.4 Formation**

### **Thèse :**

Sabine Stachowski, impact des pesticides sur le phytoplancton marin et le naissain d'huîtres, LUMAQ - Université de Bretagne Occidentale, 2004-2008 (soutenance prévue juin 2008)  
Actuellement embauchée en CDD à IFREMER Nantes, sur la thématique développée dans le cadre de sa thèse.

### **Accueil de stagiaires :**

Eléonore Che- Impact de pesticides sur la souche phototrophe *Synechococcus sp.* et analyse de communautés phytoplanctoniques naturelles exposées à des pesticides, par TTGE, BTS anabiotec, Pontivy, hiver 2006-2007

Anis Amara – action d'un herbicide : le bentazone sur la croissance et le métabolisme d'une diatomée marine : *Chaetoceros gracilis* – Master 2 sciences chimiques de l'environnement marin, IUEM-UBO Brest, 2006

Jonathan Pothier – Evaluation de l'impact par voie trophique des pesticides sur la croissance larvaire de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : cas du bentazone en formulation commerciale Basamais – DEUST technicien de la mer, Université du littoral Cote d'Opale, 2006

Yann Le Floch- Impact de pesticides sur le phytoplancton marin et le naissain d'huîtres en microcosmes *in situ* et optimisation de bacs de cultures de phytoplancton en laboratoire, BTS anabiotec, Saint-Jacut-Les-Pins, été 2006

Camille Kerros – Optimisation de bacs de cultures de phytoplancton en laboratoire avec exposition à la lumière naturelle et impact de pesticides sur la souche phototrophe *Synechococcus sp.*, DUT Biologie Appliquée, Brest, printemps 2006

Caroline Leturque – Stage de fin d'étude, Ecole d'Ingénieur Agronome de Grenoble, 2005

Benoît Jan – Stage de deuxième année, Ecole d'Ingénieur EME, Rennes, 2005

Fabien Barloy – Stage de fin d'étude, DUT Génie biologique spécialisé génie de l'environnement, IUT Tours, 2005

Colin Le Balle – évaluation de la toxicité potentielle de quatre pesticides à l'aide d'un bio-essai sur le développement embryo-larvaire de l'huître creuse (*Crassostrea gigas*), IUT de Colmar, département de génie biologique, 2005

Gabriel Dieuset – Impact de pesticides sur le phytoplancton marin en microcosmes *in situ* et optimisation de la TTGE, BTS Orléans, 2005

Matthieu Lassus – Essais pour l'évaluation de l'impact des phytosanitaires en éclosérie : cas du bentazone et de l'époxiconazole testés seuls et en mélange sur la microalgue marine *Isochrysis galbana* et sur les larves de l'huître creuse *Crassostrea gigas* - Stage de DEA de toxicologie de l'environnement, UFR de Metz, 2004

Charlotte Laisné – Stage de Maîtrise de biochimie, Université de Rouen ; Contrat Chèque Insertion de la Région Bretagne, 2004

Sabine Collignon – Stage de Maîtrise, Université Bretagne Occidentale- Brest, 2004

Audrey Robic – Détermination des effets d'un pesticide : la bentazone sur la croissance d'*Alexandrium minutum* - Stage de Maîtrise des Sciences Biologiques et Médicales, Ecole de Pharmacie de Caen, 2004

Harold Anseaume – Mise en place de microcosmes *in situ* et étude de l'impact de pesticides sur les communautés naturelles de phytoplancton, analyse des pigments par HPLC, Stage de fin d'études, Intechmer (Cherbourg) été 2004.

Patrick Poulaine – Effet d'un herbicide, le bentazone, sur une diatomée présente dans la rade de Brest, *Chaetoceros gracilis*. -Stage de DESS Gestion et expertise des littoraux, UBO Brest, 2003.

## **6.5 Site Internet**

Le site est hébergé sous : <http://www.univ-brest.fr/lumag> dans la rubrique Sites rattachés / IPEM



## 7 Bibliographie

AFNOR, 1998. Qualité de l'eau - Essai d'inhibition de la croissance des algues marines avec *Skeletonema costatum* et *Phaeodactylum tricornutum*. NF EN ISO 10253, T90-311, 8p.

AGRITOX - Base de données sur les substances actives phytopharmaceutiques.

Aoyama K., Iwahori K., Miyata N., 2003. Application of *Euglena gracilis* cells to comet assay: evaluation of DNA damage and repair. *Mutation Research* 538, 155–162

Arzul G., Malestroit P., Videau .C, Quiniou F., Durand G. and Hureau D., 2005. Effect of an experimental pesticide contamination on natural coastal phytoplankton communities and possible consequences on the secondary production. Poster présenté à la 8ième conférence internationale sur la sauvegarde et le repeuplement des mollusques marins, Brest 3-5 octobre 2005.

Arzul G., Gentien P., 2005. Allelopathic interactions among marine microalgae. In: D.V. Subba Rao Edt. *Algal cultures, analogues of blooms and applications*. Science Publishers, Enfield (NH), USA, pp 131-161.

Arzul G., Seguel M., Guzman L. & Eard-Le Denn E., 1999. Comparison of allelopathic properties of three toxic *Alexandrium* species. *Journal of Experim. Mar. Biol. and Ecol.*, 232 (2), 285-295

Arzul, G. et Durand G., 1995 - Effet des herbicides détectés en Rade de Brest, sur la croissance in vitro d'une diatomée et d'un dinoflagellé. Actes du Colloque CORPEP "Qualité des eaux et produits phytosanitaires: du diagnostic à l'action", Rennes, le 27 novembre 1995, p. 186-195.

Arzul, G. et Durand G., 1999 - Effet des herbicides sur la croissance in vitro du phytoplancton marin. Colloque IFREMER-INRA, 23-24 septembre 1999, Saint-Brieuc acte du colloque 24 "Pollution diffuses". Editions IFREMER.

Bengtson Nasha S.M., Quayle P.A., Schreiber U., Müller J.F., 2005. The selection of a model microalgal species as biomaterial for a novel aquatic phytotoxicity assay. *Aquatic Toxicology* 72 : 315–326

Bérard-A; Dorigo-U; Humbert-U; Leboulanger-C; Seguin-E, 2002. Application of the Pollution-Induced Community Tolerance (PICT) method to algal communities: its values as a diagnostic tool for ecotoxicological risk assessment in the aquatic environment. *Annales de limnologie, International journal of limnology*; 38 (3) : 247-261.

Bérard A. et Pelte T., 1999 - The impact of Photosystem II (PS II) inhibitors on algae communities and dynamics. *Revue des Sciences de l'Eau*, 12 (2).

Böger P. and Matthes B. - 2002. Inhibitors of biosynthesis of very-long-chain fatty acids. In « Herbicide classes in development ». Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. Böger P., Wakabashi K., Hirai K. (Eds), pp. 115-137.

Brown H. M. and Kearney P.C. – 1991. Plant biochemistry, environmental properties and global impact of the sulfonylurea herbicides. In « Synthesis and Chemistry of Agrochemicals II ». American Chemical Society Symposium Series. Vol 443.

Calabrese E.J., Baldwin L.A., 2003. Toxicology rethinks its central belief. *Nature* 421 : 691-692

Ceballos S. and Ianora A., 2003. Different diatoms induce contrasting effects on the reproductive success of the copepod *Temora stylifera*. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 294 (2) : 189-202.

Clement, B; Devaux, A; Perrodin, Y; Danjean, M; Ghidini-fatus, M 2004. Assessment of Sediment Ecotoxicity and Genotoxicity in Freshwater Laboratory Microcosms. *Ecotoxicology [Ecotoxicology]*. Vol. 13, no. 4, 323-333

Cremllyn, R.J., 1991. *Agrochemicals : preparation and mode of action*. J. Wiley and Sons Inc., New York, USA.

D'Souza FLM and Loneragan NR, 1999. Effects of monospecific and mixed-algae diets on survival, development and fatty acid composition of penaeid prawn (*Penaeus* spp.) larvae, *Marine Biology*; 133 (4) : 621-633.

Desa S. R., Verleca X. N., Goswami N. U., 2006. Genotoxicity of cadmium in marine diatom *Chaetoceros tenuissimus* using the alkaline Comet assay. *Ecotoxicology* DOI 10.1007/s10646-006-0076-2 Springer Science+Business Media, LLC 2006

Dorigo, U., Bourrain, X., Bérard, A., Leboulanger, C., 2004. Seasonal changes in the sensitivity of river microalgae to atrazine and isoproturon along a contamination gradient. *The Science of the Total Environment* 318: 101-114

Dupuy, C., Le Gall, S., Hartmann H.J., Breret M., 1999. Retention of ciliates and flagellates by the oyster *Crassostrea gigas* in French Atlantic coastal ponds : protists as a trophic link between bacterioplankton and benthic suspension-feeders. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 177, 165-175

Guillard R.R.L., 1979. Cultures methods and growth measurements. In: Stein, J.R. (Ed.), *Handbook of Phycological Methods*. Cambridge Univ. Press, pp. 289-311.

Guillard RRL, Ryther JH (1962) Studies of marine planktonic diatoms. I: *Cyclotella nana* Husted and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can J Microbiol* 8:229–239

Hirai K., Uchida A. and Ohno R. – 2002. Major synthetic routes for modern herbicide classes and agrochemical characteristics. In « « Herbicide classes in development ». Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. Böger P., Wakabashi K., Hirai K. (Eds), pp. 179-289.

ISO 10253, 2004. Projet de norme internationale : Qualité de l'eau – Essai d'inhibition de la croissance des algues marines avec *Skeletonema costatum* et *Phaeodactylum tricorutum*. Pr EN ISO 10253 : 2004, 2004, 13p.

Kashino Y., Kudoh S., Hayashi Y., Suzuki Y., Odate T., Hirawake T., Satoh K., Fukuchi M., 2002. Strategies of phytoplankton to perform effective photosynthesis in the North Water. *Deep-Sea Research II* 49 : 5049–5061

Kooijman.S. A. L. M., Hansveit A. O. and Nyholm N., 1996, No-effect concentrations in algal growth, *Inhibition Tests.*, *Wat. ReS.* Vol. 30, n°7, pp. 1625-1632.

Lampert L. , 2001 Dynamique saisonnière et variabilité pigmentaire des populations phytoplanctoniques dans l'atlantique nord (Golfe de Gascogne) Thèse de doctorat ; Université de Bretagne Occidentale, France.

La Rossa R.A., Van Dyk T.K. and Smulsky D.R. – 1987. Toxic accumulation of  $\alpha$ -ketobutyrate caused by inhibition of the branched-chain amino biosynthesis enzyme acetolactate synthase in *Salmonella thyphimurium*. *Journal of Bacteriology.* 169 : 1373-1378.

Lee D.L., Prisbylla M.P., Cromartie T.H., Dagarin D.P., Hawared S.W., Provan W.M., Fraser T. and Mutter L.C. – 1997. The discovery and structural requirements of inhibitors of p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Weed Sci.*, 45 : 601-609. 1997

Le Pape O. Del Amo Y., Cann P., Ménesguen A., Aminot A., Quéguiner B. et Tréguer P., 1995. Résistance à l'eutrophisation d'un écosystème côtier enrichi : la rade de Brest. 3èmes rencontres scientifiques internationales. Actes du colloque, 14-16 mars, Brest. Vol.1, pp. 59-79.

Lorenzen, C.J., 1967 – Determination of chlorophyll and phaeophytin. Spectrophotometric equations. *Limnol. Oceanogr.*, 12, 343-346.

Maestrini S., Bonin D.J. et M.R. Droop, 1984 - Phytoplankton ad indicators of sea water quality: bioassays approaches and protocols. In “Algae as ecological indicators”, *Acd. Press*, London, p. 71-132.

Mayer P., Frickmann J., Christensen E.R. and Nyholm N., 1998. Influence of growth conditions on the results obtained in algal toxicity tests. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(6) 1091–1098

Moal, J., Marti-Jezequel, V., Harris, R.P., Samain, J.F., Poulet S.A., 1987. Interspecific and intraspecific variability of the chemical composition of marine phytoplankton. *Oceanol Acta* 10, 339-346

Molander S. and Blanck H., 1992. Detection of pollution-induced community tolerance (PICT) in marine periphyton communities established under diuron exposure. *Aquatic Toxicology* 22, 129-144

Parrish C.C., Horsfield-Brian, ed ; Radke-Matthias, ed ; Schaffer-Rainer-G., ed ; Wilkes-Heinz, ed. 1997. Lipid biogeochemistry of plankton, settling matter and sediments in Trinity Bay, Newfoundland. I. Lipid classes. *Advances in organic geochemistry. Part II: Biogeochemistry* 29 (5-7) : 1531-1545; 5.

Powel E.N, Bochenek E.A., Klinck J.M., Hofman, E.E., 2002. Influence of food quality on the growth and development of *Crassostrea gigas* larvae: a modeling approach. *Aquaculture* 210: 89-117

Prisbilla M.P., Onisko B.C., Shribbs J.M., Adams D.O., Liu Y., Ellis M. K., Hawkes T.R., and Mutter L. C. – 1993. The novel mechanism of action of the herbicidal triketones. *Proc. British Crop Prot. Conf. Weeds 2* : 731-738.

Ray T. B., 1984. Site of action of chlorsulfuron : inhibition of valine and isoleucine biosynthesis in plants. *Plant Physiology*. 75 : 827-831.

Rimet F., 1998. Comparaison des effets de l'atrazine et du nicosulfuron sur la structure des communautés phytoplanctoniques du Léman. Rapport de stage DESS Eaux continentales, pollutions et aménagement, INRA-Thonon. n° 836E, Univ. Franche-Comté UFR Sciences, 57p.

Sandmann G. – 2002. Bleaching herbicides : action mechanism in carotenoid biosynthesis, structural requirements and engineering resistance. In « Herbicide classes in development ». Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. Böger P., Wakabashi K., Hirai K. (Eds), pp 179-289.

Scalla R. and Gauvrit C. - 1991. Mécanismes d'action phytotoxique des autres familles d'herbicides. In « Les herbicides : mode d'action et principes d'utilisatio, R. Scalla (Ed), INRA, pp. 115-191.

Secor J. - 1994 . Inhibition of barnyardgrass 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase by sulcotrione. *Plant Physiology*, 106 : 1429-1433.

Shimizu T., Nakayama I., Nakayama K., Miyazama T. and Nezu Y. - 2002. Acetolactate synthase inhibitors. In « « Herbicide classes in development » ». Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. Böger P., Wakabashi K., Hirai K. (Eds) , pp 1-41.

Simpson D.M., Stoller E.W. and Wax L.M. 1995. An *in vitro* acetolactate assay. *Weed Technology*. 95 : 17-22.

Singh NP *et al.* *Exp Cell Res* 175:184-191, 1988

Soudant-P; Marty-Y; Moal-J; Masski-H; Samain-JF , 1998. Fatty acid composition of polar lipid classes during larval development of scallop *Pecten maximus* (L.) Comparative biochemistry and physiology- A Molecular and integrative physiology, 121 (3) : 279-288.

Stebbing, A.R.D., 1982. Hormesis – The stimulation of growth by low levels of inhibitors. *The Science of the Total Environment* 22 : 213-234

Tréguer P. et Le Corre P., 1975 – Manuel d'analyse des sels nutritifs dans l'eau de mer (utilisation de l'Autoanalyser II, Technicon), 2ème édition. Université de Bretagne Occidentale, Brest, 110p.

Utermöhl, H., 1931 - Neue Wege in der quantitativen Erfassung des Planktons (mit besonderer Berücksichtigung des Ultraplanktons). *Verh. int. Ver. theor. angew. Limnol.*, 5, p. 567-596.

Videau C., 2003. Impact des pesticides sur la croissance des populations phytoplanctoniques naturelles de l'estuaire de la Penzé (Baie de Morlaix) et l'estuaire de l'Elorn (Rade de Brest). Rapport d'activité Pôle Analytique des Eaux, 40 p.

Vindimiam E., Robaut C., Fillion G., 1983. A method for cooperative binding studies using non linear regression analysis on a microcomputer. J. Appl. Biochem. 5, p. 261-268.



## **8 Annexes :**

### **8.1 Annexe 1 : Méthodes d'analyses des pesticides**

#### **8.1.1 Protocole pour l'analyse des solutions « en directe » :**

La liste des produits phytosanitaires recherchés est la suivante : bentazone, nicosulfuron, chlorpyrifos, epoxiconazole, dimethenamide et sulcotrione.

Les pesticides sont analysés par injection directe (boucle de 100 µL) de l'échantillon d'eau dans le système analytique (LC-MSMS).

##### **8.1.1.1 Matériel et produits**

★ Chromatographe en phase liquide WATERS Separations module 2690 + détection par spectrométrie de masse MICROMASS (Quattro Ultima)

★ Réactifs

Acide minéral : Acide formique (CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 99-100 % pour analyses

Solvants : Acétonitrile (CH<sub>3</sub>CN)

Gaz : Azote et argon de haute pureté.

★ Etalons de référence

Ils doivent être de haute pureté ou certifiés. Ces produits sont commandés auprès des fournisseurs suivant : Riedel de Haen (Fluka, Sigma Aldrich) et Dr. Ehrenstorfer (Promochem).

★ Verrerie

Flacon de prélèvement à usage unique d'une contenance de 1250 mL en verre brun.

Vial en verre de 1.5 mL à usage unique.

##### **8.1.1.2 Préparation des réactifs et des solutions étalons**

★ Préparation de l'acide formique à 0.15 %

200 mL d'eau osmosée + 300µL d'acide formique dans un flacon de 250 mL.

Le mélange est préparé extemporanément. Filtrer sur filtre 0.22 µm.

★ Solutions étalons et mélange

Les solutions mères sont préparées à partir des produits purs, dans différents solvants.

✓ seule la sulcotrione est achetée en solution à 10 mg/L dans l'acétonitrile.

✓ les autres pesticides sont préparés dans l'acétone.

Les mélanges sont préparés par dilution des diverses solutions mères dans le méthanol.

Après emploi, toutes les solutions doivent être à nouveau pesées.

Conservation au réfrigérateur.

### 8.1.1.3 Conditions d'analyses et limites de détection

★ Chromatographie liquide (CLHP) : colonne et gradient

Colonne : Hypersil Green ENV (ThermoHypersil) de type C18 avec des particules de 5 µm, de taille 250×2.1 mm.

Précolonne : de même type que la colonne.

Débit : 0.20 mL/min

Gradient : il est composé d'acétonitrile et d'eau ultra pure contenant 0.15 % d'acide formique.

Temps (min)	% de A	% de B
	93	7
1	93	7
15	30	70
20	30	70
23	93	7

Avec A : 0.15 % acide formique et B : Acétonitrile

★ Détection : spectrométrie de masse

Paramètres de réglages du spectromètre de masse équipé de la source electrospray.

Source (ES+ / ES-)	Analyser (ES+/-)
Capillaire : 3 kV Cone : dépendant du composé RF Lens : 0.0 V Température de la source : 130°C Température de désolvatation : 350°C Débit du cone gaz (N2) : 60 L/hr Débit du gaz de désolvatation : 600 L/hr	LM 1 resolution : 13.0 HM 1 resolution : 13.0 Ion energy 1 : 1.0 Entrance : -2 Collision : dépendant du composé Exit : 1 LM 2 resolution : 13 HM 2 resolution : 13 Ion energy : 2.0 Multiplier : 600 V

★ Confirmation et identification des substances

La spectrométrie de masse permet en choisissant des ions caractéristiques de chaque composé, de rechercher les transitions pertinentes pour caractériser un composé.

Choix des ions caractéristiques pour les pesticides recherchés :

COMPOSES	Mode d'ionisation ES +/-	Masse molaire (g/mol)	Ion précurseur (m/z)	Ion produit (m/z)	Cone voltage (V)	Energie de collision (eV)	Limite de détection (µg/L)
Bentazone	ES-	240	239	132	35	27	0.008
Dimethenamide	ES+	275	276.12	244.09 et 168.09	51	12 et 26	0.008
Epoxiconazole	ES+	329	330	121 et 123	35	20	0.006
Nicosulfuron	ES+	410	411	182.1 et 213.1	35	15	0.008
Chlorpyriphos	ES+	350	350 et 351.9	197.8 et 199.9	35	18 et 20	0.08
Sulcotrione	ES-	328	327.1	290.9 et 212	35	11 et 21	0.2

La sulcotrione présente une limite de détection bien supérieure à celle obtenue pour les autres composés.

Donc il a été décidé d'analyser cette molécule avec un autre mode de détection : en UV-barrette de diodes, car on atteint une limite de détection de 0.05 µg/L en injectant seulement 20 µL d'échantillon. (Longueur d'onde 260 nm).

### **8.1.2 Méthodologie pour l'analyse des pesticides acides et des produits de dégradation :**

La liste des herbicides acides recherchés est la suivante : bentazone, dicamba, dichlorprop, diclofop-méthyl, mécoprop, MCPA, 2,4-D, 2,4-dichlorophenol (métabolite), 4-chloro-2-methylphenol (métabolite), bentazone-methyl (métabolite), bentazone-8-hydroxy (métabolite), dicamba-5-hydroxy (métabolite) et le MCPB.

Les herbicides présents dans l'échantillon d'eau sont extraits par extraction liquide-solide en ligne sur cartouches PLRP-s, élués par un mélange de solvants, puis séparés, identifiés et quantifiés par CLHP avec détection UV et confirmation par spectrométrie de masse.

#### **8.1.2.1 Matériel et produits**

- ★ Chromatographe en phase liquide WATERS Separations module 2690 + détection en UV/Barrette de Diodes WATERS 996
- ★ Système d'extraction liquide-solide PROSPEKT composé de 2 unités.
- ★ Confirmation par spectrométrie de masse MICROMASS (Quattro Ultima)
- ★ Matériau adsorbant PLRP-s, pour l'extraction en phase solide. Ces cartouches sont délivrées par Polymer Laboratories.

#### ★ Etalons de référence

Ils doivent être de haute pureté ou certifiés. Ces produits sont commandés auprès des fournisseurs suivant : Riedel de Haen (Fluka, Sigma Aldrich) et Dr. Ehrenstorfer (Promochem).

#### ★ Réactifs

Acide minéral : Acide orthophosphorique (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 85 % pour analyses et acide acétique glacial 99 % (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>)

Tampon : potassium dihydrogenophosphate (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

Solvants : Méthanol (CH<sub>3</sub>OH), acétonitrile (CH<sub>3</sub>CN) et acétone (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O)

Gaz : Hélium, de haute pureté, pour dégazer les solvants CLHP.

#### ★ Verrerie

Flacon de prélèvement à usage unique d'une contenance de 1250 mL en verre brun.

Flacon en verre de 250 mL à usage unique.

### 8.1.2.2 Protocole d'analyse

★ Préparation d'un témoin et d'un blanc

Le témoin (eau dopée) et le blanc de la manipulation sont réalisés à chaque série

★ Préparation de l'échantillon

Si nécessaire, éliminer les matières en suspension par filtration sur un filtre en fibre de verre.

On prélève 250 mL d'échantillon que l'on place dans un flacon en verre auquel on ajoute l'étalon interne (à hauteur de 1 µg/L) et on ajuste le pH à environ 2 en introduisant 125 µL d'acide acétique (100 %) et 250 µL d'acide orthophosphorique au ½.

★ Phases de conditionnement du matériau, de concentration et d'élution

Les cartouches sont conditionnées, lavées et rincées avec 4 mL du mélange méthanol/acétone puis avec 4 mL d'eau osmosée à pH 2.

Ensuite, rinçage du système avec l'échantillon puis préconcentration sur la cartouche à un débit de 5 mL/min et ce pendant 50 minutes. Le volume à préconcentrer a été fixé à 250 mL. L'élution des composés vers la colonne se fait par le passage même de la phase mobile sur la cartouche et ce pendant 20 minutes.

L'échantillon avant passage sur la cartouche subit une étape d'acidification afin de pouvoir retenir les herbicides acides. En effet, ces derniers dans les conditions initiales de pH de l'échantillon, soit un pH de 6, ne sont pas adsorbés sur la cartouche.

★ Chromatographie liquide (CLHP) : colonne et gradient

Colonne : Nova Pak (Waters) de type C18 avec des particules de 5 µm, de taille 250×3.9 mm.

Précolonne : de type RP18ec (Merck achat chez Interchim).

Débit : 0.75 mL/min

Gradient : il est composé d'acétonitrile et de tampon phosphate. Les 2 éluents contiennent chacun 100 µL d'acide acétique glacial.

Temps (min)	% de A	% de B
	94	6
16	40	60
19	40	60
28	10	90
33	10	90
33.1	94	6

Avec A : 5 mmol/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 100 µL d'acide acétique glacial

et B : Acétonitrile + 100 µL acide acétique glacial

★ Détection

Contrôle des spectres à plusieurs longueurs d'onde, à 220 et 280 nm, et chaque fois choisir la plus favorable pour la quantification des substances individuelles.

Caractérisation du composé par son temps de rétention et son spectre UV.

★ Confirmation et identification des substances

Par spectrométrie de masse, identification des ions caractéristiques et suivi des transitions.

Remarque concernant les analyses de sulcotrione :

L'analyse de la sulcotrione quand elle est en forme pure, utilisée pour les dopages des eaux ne pose aucun problème à l'analyse.

Il a cependant été remarqué qu'en formulation Mikado, l'adjuvant était difficile à solubiliser (test de nombreuses méthodes), et donc les analyses de contrôle faisaient apparaître une très faible présence de sulcotrione dans les eaux préparées. Les résultats lorsqu'on a utilisé la sulcotrione pure sont cohérents avec la base de données Agritox tableau 31, l'effet du Mikado s'est avéré supérieur figure 66, d'autres expérimentations ont été écartées.

L'ensemble des résultats d'analyses réalisées dans le cadre du projet est présenté dans le CD Rom.



## 8.2 Annexe 2 : synthèse des résultats d'analyses

Dans cette annexe sont présentés les résultats d'analyses de pesticides effectuées sur les échantillons prélevés dans le cadre du projet IPEM ou les synthèses sur les autres données disponibles, pour les autres molécules que les six du projet IPEM

### 8.2.1 Résultats d'analyses sur le site de la RADE de BREST :

Dans le cadre du « Contrat de Baie de la rade de Brest », des analyses sont réalisées **en rade**, d'avril à septembre, tous les ans depuis 1993 ; et sur son **bassin versant** de la même façon, depuis 1996. Il y a quinze points de prélèvements en rade et vingt et un sur le bassin versant. Pour la présentation des résultats nous avons pris en compte toutes les données de 2003 à 2006. Les molécules recherchées sont les mêmes en rade et sur le bassin versant.

*Quarante sept molécules sont recherchées, quatre font partie des six étudiées et quinze des quarante neuf supplémentaires.*

#### 8.2.1.1 Résultats d'analyses en RADE de BREST :

Parmi les quinze molécules communes aux quarante neuf supplémentaires, quatre ne sont pas ou peu décelées : propachlore, linuron, oxadixyl (5 valeurs comprises entre 0,006 et 0,02 µg/L) et trifluraline.

Le tableau suivant présente les valeurs retrouvées pour ces onze molécules (quinze moins quatre).

Résultats d'analyses (µg/L) en RADE de Brest (molécules supplémentaires)

	ATRAZINE				DEA			
	2003	2004	2005	2006	2003	2004	2005	2006
Nb analyses	76	66	65	66	76	66	65	66
% de détection	70	76	45	43	58	71	34	51
Ordre de grandeur	0,003-0,038	0,003-0,043	0,003-0,020	0,003-0,063	0,003-0,036	0,003-0,057	0,003-0,024	0,003-0,067
	SIMAZINE				ACETOCHLORE			
	2003	2004	2005	2006	2003	2004	2005	2006
Nb analyses	76	66	65	66	-	66	65	66
% de détection	9	15	5	6	-	18	15	16
Ordre de grandeur	0,003-0,004	0,003-0,006	0,003-0,011	0,003-0,006	-	0,003-0,013	0,003-0,029	0,003-0,055
	METAZACHLORE				ISOPROTURON			
	2003	2004	2005	2006	2003	2004	2005	2006
Nb analyses	-	66	65	66	76	66	65	66
% de détection	-	1,5	-	-	9	16	21,5	32
Ordre de grandeur	-	0,008	-	-	0,006-0,026	0,003-0,043	0,006- <b>0,316</b>	0,006-0,072
	CARBOFURAN				DIURON			
	2003	2004	2005	2006	2003	2004	2005	2006
Nb analyses	-	66	65	66	76	66	65	66
% de détection	-	3	-	3	76	83	78	80
Ordre de grandeur	-	0,003-0,004	-	0,052-0,074	0,002- <b>0,640</b>	0,005- <b>0,803</b>	0,006- <b>0,275</b>	0,006- <b>0,338</b>
	IRGAROL				GLYPHOSATE			
	2003	2004	2005	2006	2003	2004	2005	2006
Nb analyses	76	66	65	66	76	66	65	66
% de détection	4	7,5	18	7,5	8	21	5	3
Ordre de grandeur	0,050-0,068	0,004- <b>0,102</b>	0,006-0,043	0,004-0,029	0,060- <b>1,430</b>	0,060- <b>0,300</b>	0,100- <b>0,110</b>	0,060-0,080
	AMPA							
	2003	2004	2005	2006				
Nb analyses	76	66	65	66				
% de détection	48	57,5	18,5	15				
Ordre de grandeur	0,060- <b>0,690</b>	0,060- <b>0,420</b>	0,060- <b>0,880</b>	0,060- <b>0,470</b>				

L'atrazine, la DEA, le diuron et l'AMPA sont décelées dans plus de 50 % des échantillons. Les concentrations retrouvées pour le glyphosate, l'AMPA et le diuron sont importantes.

D'autres molécules non communes aux cinquante cinq (six étudiées et quarante neuf supplémentaires) sont décelées, les valeurs sont globalement inférieures à la norme eau potable : 0,1 µg/L. Sauf pour le 2,4 MCPA, dont les valeurs décelées vont de 0,011 à 0,375 µg/L, cette molécule est appliquée sur les céréales.

### 8.2.1.2 Résultats d'analyses sur le BASSIN VERSANT de la rade de Brest :

Sur le bassin versant les valeurs pour les onze molécules communes aux quarante neuf supplémentaires, sont bien plus élevées.

Le tableau ci-après précise les résultats.

**Résultats d'analyses (µg/L) sur le BASSIN VERSANT de la rade de Brest (molécules supplémentaires)**

	ATRAZINE				DEA			
	2003	2004	2005	2006	2003	2004	2005	2006
Nb analyses	126	120	120	120	126	120	120	120
% de détection	100	98	77,5	80	97	100	81	97,5
Ordre de grandeur	0,003- <b>0,137</b>	0,003- <b>0,192</b>	0,003- <b>0,626</b>	0,003- <b>0,109</b>	0,003-0,068	0,004-0,086	0,003-0,057	0,003-0,059
	SIMAZINE				ACETOCHLORE			
	2003	2004	2005	2006	2003	2004	2005	2006
Nb analyses	126	120	120	120	-	120	120	120
% de détection	21	30	12,5	15	-	49	43	37,5
Ordre de grandeur	0,003-0,013	0,003-0,040	0,003-0,056	0,003-0,029	-	0,003-0,097	0,003- <b>0,260</b>	0,003- <b>0,274</b>
	METAZACHLORE				ISOPROTURON			
	2003	2004	2005	2006	2003	2004	2005	2006
Nb analyses	-	120	120	120	126	120	120	120
% de détection	-	0,8	0,8	2,5	13,5	24	32	26
Ordre de grandeur	-	0,023	0,019	0,004-0,005	0,006- <b>0,825</b>	0,003- <b>0,164</b>	0,006- <b>0,181</b>	0,006-0,089
	CARBOFURAN				DIURON			
	2003	2004	2005	2006	2003	2004	2005	2006
Nb analyses	-	120	120	120	120	120	120	120
% de détection	-	15	8,5	16,5	41	56	56	42,5
Ordre de grandeur	-	0,004-0,023	0,003-0,031	0,004- <b>0,122</b>	0,006- <b>0,285</b>	0,006- <b>0,790</b>	0,006- <b>0,668</b>	0,006- <b>0,305</b>
	IRGAROL				GLYPHOSATE			
	2003	2004	2005	2006	2003	2004	2005	2006
Nb analyses	126	120	120	120	126	120	120	120
% de détection	1,6	-	-	-	11	50	36	15
Ordre de grandeur	0,014- <b>0,167</b>	-	-	-	0,060- <b>1,370</b>	0,060- <b>17</b>	0,060- <b>0,790</b>	0,060-2,297
	AMPA							
	2003	2004	2005	2006				
Nb analyses	126	120	120	120				
% de détection	76	73	62	36				
Ordre de grandeur	0,060- <b>2,670</b>	0,060- <b>2,060</b>	0,060- <b>1,610</b>	0,060- <b>1,120</b>				

L'atrazine, la DEA, l'acétochlore et l'AMPA sont décelés dans plus de 50 % des échantillons, voir dans la totalité des prélèvements.

On remarquera également les très fortes valeurs pour le glyphosate et l'AMPA : plus de 1µg/L.

Dix autres molécules non communes aux cinquante cinq (six étudiées et quarante neuf supplémentaires) sont décelées dans de nombreux échantillons. Les valeurs retrouvées sont bien plus importantes qu'en rade de Brest. Les résultats présentés ci-dessous reprennent tous les points et toutes les années de 2003 à 2006 :

- Famille des Aryloxyacides :

- Le **2,4 D** (désherbant céréales, maïs et gazons...) est décelé dans 22 % des échantillons (486), les concentrations retrouvées varient de 0,015 à 0,560 µg/L.
  - Le **2,4 MCPA** (désherbant céréales et gazons...) est décelé dans 26 % des échantillons (486), les concentrations retrouvées varient de 0,011 à 0,865 µg/L.
  - Le **dichlorprop** (utilisé en association avec les deux précédents) est retrouvé dans 7 % des échantillons (486), les concentrations décelées varient de 0,012 à 0,610 µg/L.
  - Le **mécoprop** (désherbant céréales et gazons...) est retrouvé dans 13,5 % des échantillons (486), les concentrations décelées varient de 0,011 à 0,407 µg/L.
  - Le **dicamba** (désherbant maïs et gazons...) est retrouvé dans 4,5 % des échantillons (486), les concentrations décelées varient de 0,039 à 0,340 µg/L.
- Divers pesticides :
- L'**alachlore** (désherbant maïs de la famille des amides) est décelé dans 19 % des échantillons (486), les concentrations retrouvées varient de 0,003 à 0,610 µg/L.
  - Le **métolachlore** (désherbant maïs de la famille des acétinilides) est décelé dans 6 % des échantillons (486), les concentrations retrouvées varient de 0,003 à 0,127 µg/L.
  - Le **diflufénicanil** (désherbant céréales et non –agricole, de la famille des pyridines carboxamides) est décelé dans 24 % des échantillons (394), les concentrations retrouvées varient de 0,003 à 0,116 µg/L.
  - L'**oxadiazon** (désherbant non –agricole, de la famille des oxadiazoles) est décelé dans 42,5 % des échantillons (404), les concentrations retrouvées varient de 0,004 à 0,840 µg/L.
  - Le **propiconazole** (fongicides céréales, gazons et rosiers, mais également usage biocide pour le traitement du bois, de la famille des triazoles) est décelé dans 10,5 % des échantillons (486), les concentrations retrouvées varient de 0,005 à 0,254 µg/L.

### **8.2.2 Résultats d'analyses sur le site de PENZE :**

D'autres résultats d'analyses sont disponibles sur la rivière Penzé, dans le cadre du « Bilan du programme d'actions du Contrat de Baie de Morlaix – 1996- 2002 ».

La DDASS réalise des prélèvements à la prise d'eau de Coz Porz, sur la rivière Penzé et le syndicat mixte du Haut Léon sur vingt trois points de la rivière Penzé et à la prise d'eau. Les analyses effectuées sur les vingt trois points l'ont été par des tests ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent asSAy). Ces tests sont basés sur la réaction d'enzymes spécifiques à certains pesticides. Trois types de molécules ont été recherchés : les triazines, le diuron et l'isoproturon.

Pour les triazines les tests représentent l'ensemble de la famille (atrazine, simazine, DEA, DIA...) sans distinction. Pour le diuron et l'isoproturon, la réaction est plus spécifique, elle permet d'obtenir des résultats pour chaque molécule individuellement.

A la prise d'eau les analyses sont réalisées par chromatographie.

## Analyses de la DDASS

Trente sept molécules sont recherchées à la prise d'eau et trois (triazines, diuron et isoproturon) sur les vingt trois points de la rivière.

*Seize matières actives sont communes avec les cinquante cinq (six molécules étudiées, plus quarante neuf supplémentaires) recherchées dans le cadre de l'étude.*

*Quatre font parti des six molécules étudiées dans le cadre du programme IPEM.*

Un seul tableau précise les résultats pour l'ensemble des molécules (seize).

Il présente les résultats par molécules : nombre d'analyses, nombre de détection, l'ordre de grandeur des valeurs décelées en µg/L et le pourcentage de valeurs supérieures à 0,1 µg/L (norme eau potable pour une molécule).

Pour la présentation des résultats, toutes les années sont confondues. Les données DDASS sont disponibles de 1996 à 2002 et celles du SMHL de 1999 à 2002.

Résultats d'analyses (µg/L) en Rivière de Penzé

	<b>Atrazine</b>	<b>DEA</b>	<b>Simazine</b>	<b>Triazines</b>	<i>Bentazone</i>	<i>Diméthénamide</i>
Nb d'analyse	41	82	41	361	1	7
Nb de détection	13	31	0	99	0	0
Ordre de grandeur	<b>0,030 à 0,320</b>	<b>0,030 à 0,110</b>		0,020 à 3,900		
% valeur > 0,1 µg/L	31	3		50		
	<b>Carbofuran</b>	<b>Métazachlore</b>	<b>Métolachlore</b>	<i>Nicosulfuron</i>	<i>Sulcotrione</i>	<b>Trifluraline</b>
Nb d'analyse	5	4	7	3	4	3
Nb de détection	1	0	0	0	0	0
Ordre de grandeur	0,650					
% valeur > 0,1 µg/L	20					
	<b>Linuron</b>	<b>Isoproturon</b>	<b>Diuron</b>	<b>Glyphosate</b>	<b>AMPA</b>	
Nb d'analyse	6	179	121	28	27	
Nb de détection	0	33	55	7	17	
Ordre de grandeur		<b>0,020 à 0,580</b>	<b>0,020 à 0,690</b>	<b>0,050 à 0,890</b>	<b>0,070 à 0,320</b>	
% valeur > 0,1 µg/L		45	26	57	77	

Les *quatre molécules étudiées* ne sont pas décelées à la prise d'eau de Coz Porz.

Six molécules sont détectées en quantités supérieures au seuil de détection. Toutes ont des usages agricoles sauf le diuron, qui sur ce bassin versant est d'origine non agricole : désherbage des parcs, jardins et trottoirs (il ne peut avoir pour origine un usage antifouling, car il n'y a pas de bateaux au mouillage dans la rivière). On remarquera les fortes fréquences de détection de l'isoproturon, du diuron, du glyphosate et de l'AMPA.

Sur les trente sept molécules recherchées, outre les seize présentées dans le tableau précédent, deux autres sont décelées :

- l'alachlore (désherbant maïs), trente valeurs sont disponibles la molécule a été décelée à six reprises, cinq des résultats dépassent 0,100 µg/L, les concentrations vont de 0,040 à 1,360 µg/L.
- le bifénox (désherbant des céréales, commercialisé en association avec d'autres molécules), sur six valeurs, il y a deux concentrations de 0,050 g/L.

**8.2.3 Résultats d'analyses sur le site de RIEC sur BELON :**

Sur ce site d'autres données sont disponibles, à différentes dates de 2003 à 2005. En effet les cinquante cinq molécules (six molécules étudiées et quarante neuf supplémentaires) préalablement citées ont été recherchées dans les eaux du port du béton, dans le cadre du programme « CONCHPOL : Protection des installations conchylicoles contre les pollutions accidentelles. »

Sur les quarante neuf autres molécules recherchées, trente sont détectées. Le tableau suivant présente le nombre d'analyses, la fréquence de détection et les valeurs maximum ( $\mu\text{g/L}$ ).

**Résultats d'analyses ( $\mu\text{g/L}$ ) sur le site de RIEC sur BELON (molécules supplémentaires)**

	Atrazine			DEA			Simazine		
	2003	2004	2005	2003	2004	2005	2003	2004	2005
Nb d'analyse	6	17	8	6	16	8	6	11	8
Nb de détection	1	17	8	0	14	8	0	2	2
Valeur maximale	0,046	0,036	0,042		0,019	0,004		0,001	<0,001
	Acétochlore			Rimsulfuron			Isoproturon		
Nb d'analyse	-	14	8	-	16	8	6	13	8
Nb de détection		3	2		5	0	0	6	1
Valeur maximale		0,011	0,001		0,05			0,006	0,006
	Linuron			Métazachlore			Métoxuron		
Nb d'analyse	6	11	8	5	11	8	6	12	8
Nb de détection	0	1	1	0	1	1	0	1	1
Valeur maximale		<0,001	0,001		<0,001	0,002		0,024	<0,001
	Metsulfuron-Me			Monolinuron			Trifluraline		
Nb d'analyse	5	11	8	6	11	8	6	12	8
Nb de détection	0	0	2	0	0	1	0	1	0
Valeur maximale			<0,001			<0,001		0,051	
	Oxadixyl			Iprodione			Isophenphos		
Nb d'analyse	6	13	8	6	12	8	6	11	8
Nb de détection	0	6	1	0	1	0	0	0	2
Valeur maximale		0,006	0,006		0,002				0,002
	Carbofuran			Chlorfenvinphos			Pyrimicarbe		
Nb d'analyse	6	13	8	6	12	8	6	12	8
Nb de détection	0	2	4	0	1	3	0	1	0
Valeur maximale		0,012	0,002		0,014	0,006		0,002	
	Quizalofop-éthyl			Carbendazime			Chlorothalonil		
Nb d'analyse	6	11	8	6	12	8	6	13	8
Nb de détection	0	1	3	0	4	5	0	0	0
Valeur maximale		0,002	0,001		0,016	<0,001		0,019	
	Diuron			DCPMU			DCPU		
	2003	2004	2005	2003	2004	2005	2003	2004	2005
Nb d'analyse	6	17	8	-	16	8	-	14	8
Nb de détection	3	17	8		8	7		3	0
Valeur maximale	0,052	<b>0,869</b>	0,052		0,033	0,012		0,01	
	Irgarol			Pencyuron			TCMTB Busan		
Nb d'analyse	-	16	8	6	12	8	-	11	8
Nb de détection		13	8	0	1	3		0	3
Valeur maximale		<b>0,102</b>	0,007		0,005	0,001			0,003
	ZnPT			AMPA			Glyphosate		
Nb d'analyse	-	13	8	5	18	7	5	18	7
Nb de détection		2	0	4	5	2	3	2	1
Valeur maximale		0,023		<b>1,287</b>	<b>0,169</b>	<b>0,403</b>	<b>0,114</b>	0,085	<b>0,139</b>

Quatre molécules sont décelées en fortes concentrations ( $> 0,1 \mu\text{g/L}$ , norme eau potable) : le diuron, l'irgarol, le glyphosate et l'AMPA. La présence des deux premières peut s'expliquer par la grande quantité de mouillages de bateaux de plaisance dans le port et la rivière de Bélon.

D'autres analyses réalisées en eau douce plus en amont dans la rivière montrent des concentrations nettement plus élevées pour les molécules citées précédemment (diuron, irgarol, glyphosate et AMPA), ainsi que pour d'autres à vocation agricole, jusqu'à :

- $0,14 \mu\text{g/L}$  de DCPU (produit de dégradation du diuron)
- $0,36 \mu\text{g/L}$  de DCPMU (produit de dégradation du diuron)

#### **8.2.4 Résultats d'analyses sur le site des GLENAN :**

Huit échantillons ont été prélevés dans le milieu, six en 2004 et deux en 2005. Sur chacun les six molécules du programme ont été recherchées et sur un les quarante neuf matières actives supplémentaires ont été analysées.

Lors du prélèvement du 25/05/05 les quarante neuf molécules supplémentaires ont été recherchées.

Quatre ont été décelées en quantités assez importantes :

- l'atrazine :  **$0,026 \mu\text{g/L}$**
- l'AMPA (produit de dégradation du glyphosate):  **$0,106 \mu\text{g/L}$**
- le DCPMU (produit de dégradation du diuron)  **$0,001 \mu\text{g/L}$**
- le quizalofop-éthyl :  **$0,002 \mu\text{g/L}$** .

Trois types d'usages pour ces molécules peuvent être cités :

- *Usage agricole :*
  - Le nicosulfuron est utilisé comme désherbant du maïs, en remplacement de l'atrazine, interdite depuis octobre 2003 (*avis JO 27/11/01*).
  - L'isoproturon est appliqué comme désherbant sur les céréales.
  - Le quizalofop-éthyl est un herbicide préconisé sur divers types de cultures : cultures légumières, arbres fruitiers, betteraves fourragères, tournesol, pois protéagineux, colza...
  - La simazine est interdite depuis octobre 2003 (*avis JO 27/11/01*), elle était homologuée sur cassissiers et framboisiers. Elle était déjà interdite au niveau non-agricole depuis 1997.
  - Quand à la DEA, il s'agit d'un des produits de dégradation de l'atrazine.
- *Usage non –agricole :*
  - Le glyphosate bien qu'essentiellement utilisé au niveau non agricole, l'est aussi ou niveau agricole pour le déchaumage du maïs. Il est contenu, entre autre, dans la formulation commerciale « Round'Up ».
  - L'AMPA est le produit de dégradation du glyphosate. Il est très stable dans l'eau.

- *Peintures antisalissure :*
  - Le carbendazime, le diuron, le DCPMU (produit de dégradation du diuron), l'irgarol et le pencycuron sont contenus des les peintures antifouling appliquées sur la coque des bateaux. Toutes ces molécules sauf l'irgarol ont également une homologation agricole.



### **8.3 Annexe 3 : Composition des mélanges testés et concentrations en pesticides retrouvés dans les microcosmes en début et en fin de cultures**

Manip E : le mélange contient les pesticides :

- \* sulco 0.1
- \* nico 0.1
- \* gly 0.1
- \* benta 0.1

- manip F : les mélanges à 0.1 et à 1 contiennent tous les pesticides (7)

- manip G : les mélanges à 0.1 et à 1 contiennent tous les pesticides sauf la sulcotrione

- manip H : le mélange à 0.1 contient les pesticides :

- \* chlor 0.1
- \* nico 0.1
- \* diméthé 0.1
- \* benta 0.1

- manip H : le mélange à 1 contient les pesticides :

- \* chlor 1
- \* nico 1
- \* diméthé 1
- \* benta 1
- \* sulco 0.1
- \* gly 0.1
- \* epoxi 1

#### **Tableau récapitulatif des demi-vies connues en eau douce (source Agritox)**

	<b>Temps de demi-vie</b> (pH de 5 à 9)
Bentazone :	>30 jour(s) = stable
Chlorpyrifos éthyl :	72 jour(s)
Diméthénamide :	>31 jour(s) = stable
Époxiconazole :	stable
Nicosulfuron :	stable
Sulcotrione :	100 jour(s)

Manip B									
Pesticides	Echantillons								
	Eau libre J14	Témoïn J14	Diméthé 0,1 J14	Benta 0,1 J14	Chlor 0,1 J14	Sulco 0,1 J14	Glypho 0,1 J14	Nico 0,1 J14	Mélange 0,1 J14
Bentazone	<0,008	<0,008	<0,008	0,044	<0,008	<0,008	<0,008	<0,008	0,023
Diméthénamide	<0,008	<0,008	0,018	<0,008	<0,008	<0,008	<0,008	<0,008	0,023
Chorpyrifos	<0,08	<0,08	<0,08	<0,08	<0,08	<0,08	<0,08	<0,08	<0,08
Nicosulfuron	<0,008	<0,008	<0,008	<0,008	<0,008	<0,008	<0,008	0,02	0,044
Sulcotrione	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Glyphosate	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

Manip D							
Pesticides	Echantillons						
	Eau libre J0	Eau libre J14	Témoïn J14	Diméthé 0,1 J14	Benta 0,1 J14	Chlor 0,1 J14	Sulco 0,1 J14
Bentazone	<0,008	<0,008	<0,008	<0,008	0,019	<0,008	<0,008
Diméthénamide	<0,008	<0,008	<0,008	0,023	<0,008	<0,008	<0,008
Chorpyrifos	<0,08	<0,08	<0,08	<0,08	<0,08	<0,08	<0,08
Nicosulfuron	0,016	<0,008	<0,008	<0,008	<0,008	<0,008	<0,008
Sulcotrione	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Glyphosate	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

*Impact des pesticides sur l'environnement marin*

N° ECHANTILLON	Eau des Glénans	Eau des Glénans	
REFERENCE manip F	IPEM - eau dopée 0.1µg/L 22/6/2005 J0	IPEM - eau dopée 1µg/L 22/6/2005 J0	
DATE D'ARRIVEE	27/6/2005	27/6/2005	
DATE D'ANALYSE	29/6/2005	29/6/2005	
RESPONSABLE DE PREPRATION	DH	DH	
ETALON	Solution du	26/1/2005	26/1/2005
INTERNE	Volume (µl)	30	27
RESPONSABLE EXTRACTION	DH	DH	
RESPONSABLE ANALYSE	DH	DH	
VOLUME D'EAU EXTRAIT (ml)	22	20.5	
<b>RESULTATS:</b>	<b>µg/L d'eau</b>		
Irgarol	<b>0.010</b>	<b>0.008</b>	
DCPU	< 0.005	< 0.005	
Dichlofluanid	< 0.005	< 0.005	
Thiram	< 0.005	< 0.005	
DCPMU	< 0.005	< 0.005	
DCA	< 0.005	< 0.005	
ZnPT	< 0.005	< 0.005	
TCMTB Busan	< 0.005	< 0.005	
Amidosulfuron	< 0.005	< 0.005	
Metsulfuron-Me	< 0.005	< 0.005	
Nicosulfuron	<b>0.022</b>	<b>0.043</b>	
Rimsulfuron	< 0.005	< 0.005	
Thifensulfuron	< 0.005	< 0.005	
Triasulfuron	< 0.005	< 0.005	
Bensulfuron-Me	< 0.005	< 0.005	
Dimethenamide	<b>0.046</b>	<b>0.14</b>	
Acetochlore	< 0.005	< 0.005	
Metazachlore	< 0.005	< 0.005	
Sulcotrione (LC-UV)	<b>0.072</b>	<b>0.697</b>	
Bentazone	< 0.005	< 0.005	
Epoxiconazole	<b>0.06</b>	<b>0.19</b>	
Chlorpyrifos	<b>0.011</b>	<b>0.057</b>	
Glyphosate	< 0.05	< 0.05	
AMPA	< 0.05	< 0.05	

*Impact des pesticides sur l'environnement marin*

Manip F j14

Echantillons	Concentration en µg/L						
	Bentazone	Dimethenamide	Epoxiconazole	Nicosulfuron	Chlorpyrifos	Sulcotrione	Glyphosate
Structure α témoin	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.05	< 0.01	< 0.05
Structure β nicosulfuron 0.1µg/L	< 0.005	< 0.005	0.001	0.057	< 0.05	< 0.01	< 0.05
Structure β diméthénamide 0.1µg/L	0.005	0.069	0.001	0.012	< 0.05	< 0.01	< 0.05
Structure β sulcotrione 0.1µg/L	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.05	0.011	< 0.05
Structure α epoxiconazole 0.1µg/L	< 0.005	< 0.005	0.072	< 0.005	< 0.05	< 0.01	< 0.05
Structure α chlorpyrifos 0.1µg/L	< 0.005	< 0.005	0.001	0.001	< 0.05	< 0.01	< 0.05
Structure α bentazone 0.1µg/L	0.079	0.002	< 0.005	< 0.005	< 0.05	< 0.01	< 0.05
Structure α glyphosate 0.1µg/L	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.05	< 0.01	< 0.05
Mélange structure α 0.1µg/L	0.030	0.034	0.047	0.014	< 0.05	0.013	< 0.05
Structure β sulcotrione 1µg/L	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.05	0.122	< 0.05
Structure β nicosulfuron 1µg/L	< 0.005	< 0.005	< 0.005	0.661	< 0.05	< 0.01	< 0.05
Structure β diméthénamide 1µg/L	0.032	0.523	0.012	0.100	< 0.05	< 0.01	< 0.05
Structure γ epoxiconazole 1µg/L	0.003	0.003	0.468	< 0.005	< 0.05	< 0.01	< 0.05
Structure γ chlorpyrifos 1µg/L	0.008	0.001	0.001	0.001	0.032	< 0.01	< 0.05
Structure γ bentazone 1µg/L	0.668	< 0.005	0.004	< 0.005	< 0.05	< 0.01	< 0.05
Structure γ glyphosate 1µg/L	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.05	< 0.01	< 0.05
Mélange structure γ 1µg/L	0.116	0.008	0.018	0.005	0.051	0.074	< 0.05

PROGRAMME IPem Glénans du 23/08/2005 - Manip G Manip G J12 en Injection directe + Manip G J0 (sulcotrione et mélanges avant et après filtration du 11/08/05)

Echantillons	Concentration en µg/L						
	Bentazone	Dimethenamide	Epoxiconazole	Nicosulfuron	Chlorpyrifos	Sulcotrione	Glyphosate
Eau libre	< 0.005	0,005	< 0.005	< 0.005	< 0.05	< 0.01	< 0.05
Structure α témoin	< 0.005	0,010	< 0.005	< 0.005	< 0.05	< 0.01	< 0.05
Structure β témoin	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.05	< 0.01	< 0.05
Structure γ témoin	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.05	< 0.01	< 0.05
Sulcotrione avant filtration 0.1µg/L du 11/08	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.05	0,048	< 0.05
Sulcotrione après filtration 0.1µg/L du 11/08	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.05	0,036	< 0.05
Structure β nicosulfuron 0.1µg/L	< 0.005	< 0.005	< 0.005	0,080	< 0.05	< 0.01	< 0.05
Structure β diméthénamide 0.1µg/L	< 0.005	0,030	< 0.005	0,015	< 0.05	< 0.01	< 0.05
Structure α epoxiconazole 0.1µg/L	< 0.005	< 0.005	0,072	< 0.005	< 0.05	< 0.01	< 0.05
Structure α chlorpyrifos 0.1µg/L	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.05	< 0.01	< 0.05
Structure α bentazone 0.1µg/L	0,249	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.05	< 0.01	< 0.05
Structure α glyphosate 0.1µg/L	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.05	< 0.01	< 0.05
Mélange structure α 0.1µg/L	0,105	0,035	0,075	0,080	0,030	< 0.01	< 0.05
Mélange structure α 1µg/L	0,740	0,315	0,580	0,270	< 0.05	< 0.01	< 0.05
Structure β nicosulfuron 1µg/L	< 0.005	< 0.005	< 0.005	0,235	< 0.05	< 0.01	< 0.05
Structure β diméthénamide 1µg/L	< 0.005	0,060	< 0.005	0,010	< 0.05	< 0.01	< 0.05
Structure γ epoxiconazole 1µg/L	< 0.005	< 0.005	0,340	< 0.005	< 0.05	< 0.01	< 0.05
Structure γ chlorpyrifos 1µg/L	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.05	< 0.01	< 0.05
Structure γ bentazone 1µg/L	0,790	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.05	< 0.01	< 0.05
Structure γ glyphosate 1µg/L	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.05	< 0.01	< 0.05
Mélange avant filtration 0.1µg/L du 11/08	0,170	0,060	0,115	0,090	< 0.05	< 0.01	< 0.05
Mélange après filtration 0.1µg/L du 11/08	0,145	0,025	0,030	0,095	< 0.05	< 0.01	< 0.05
Mélange avant filtration 1µg/L du 11/08	1,180	0,530	0,760	0,325	< 0.05	< 0.01	< 0.05
Mélange après filtration 1µg/L du 11/08	1,305	0,240	0,030	0,390	< 0.05	< 0.01	< 0.05

*Impact des pesticides sur l'environnement marin*

**PROGRAMME IPEM Glénans du 19/09**  
**Manip H J13**

**ECHANTILLONS du 19/09/2005 Glenan Manip H J13**

Echantillons	Concentration en µg/L						
	Bentazone	Dimethenamide	Epoxiconazole	Nicosulfuron	Chlorpyrifos	Sulcotrione	Glyphosate
Eau libre	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.05	< 0.01	< 0.05
Structure α témoins	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.05	< 0.01	< 0.05
Structure β témoins	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.05	< 0.01	< 0.05
Structure γ témoins	0,003	< 0.005	0,004	< 0.005	< 0.05	< 0.01	< 0.05
Structure α Huitres témoins	< 0.005	< 0.005	< 0.005	0,016	< 0.05	< 0.01	< 0.05
Structure β nicosulfuron 0.1µg/L	0,003	0,004	< 0.005	0,070	< 0.05	< 0.01	< 0.05
Structure β diméthénamide 0.1µg/L	0,005	0,510	< 0.005	< 0.005	< 0.05	< 0.01	< 0.05
Structure α chlorpyrifos 0.1µg/L	0,008	0,007	< 0.005	< 0.005	0,012	< 0.01	< 0.05
Structure α bentazone 0.1µg/L	0,039	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.05	< 0.01	< 0.05
Mélange structure α 0.1µg/L	0,004	0,018	< 0.005	< 0.005	< 0.05	< 0.01	< 0.05
Structure β nicosulfuron 1µg/L	< 0.005	0,002	0,002	0,868	< 0.05	< 0.01	< 0.05
Structure β diméthénamide 1µg/L	0,025	1,016	0,045	0,094	< 0.05	< 0.01	< 0.05
Structure γ epoxiconazole 1µg/L	0,011	0,026	0,632	0,002	< 0.05	< 0.01	< 0.05
Structure γ chlorpyrifos 1µg/L	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	0,046	< 0.01	< 0.05
Structure γ bentazone 1µg/L	0,091	0,002	0,015	< 0.005	< 0.05	< 0.01	< 0.05
Structure α sulcotrione 1µg/L	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.05	< 0.01	< 0.05
Mélange structure γ 1µg/L (avec sulco et gly)	0,668	0,699	1,640	0,682	< 0.05	< 0.01	< 0.05
Structure γ Glyphosate 1µg/L	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.05	< 0.01	< 0.05

ECHANTILLONS du 06/09/2005 Manip H J0							
Mélange 1µg/L	0,910	0,853	1,125	0,485	< 0.05	0,603	< 0.05
Mélange 0.1µg/L	0,062	0,108	0,012	0,094	0,029	< 0.01	< 0.05

Manip I J0

Référence de l'échantillon	Témoin structure β Huitres	Basamais (10 µg/L)	Basamais (70 µg/L)	Opus (10 µg/L)	Opus (70 µg/L)	Opus +basamais (10 µg/L)
Date du prélèvement	15/06/2006	15/06/2006	15/06/2006	15/06/2006	15/06/2006	15/06/2006
Date du dépôt	21/06/2006	21/06/2006	21/06/2006	21/06/2006	21/06/2006	21/06/2006
Volume déposé (approximatif) mL	250	250	250	250	250	250
<b>RESULTATS:</b>						
µg/L	Limites de quantification					
Bentazone	< 0.005	< 0.005	7,04	45,76	< 0.005	< 0.005
Epoxiconazole	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	8,69	44,55
						8,29

Manip I J12

Référence de l'échantillon	témoin	Dimethenamid 1µg/L	Dimethenamid 10µg/L	Dimethenamid 100µg/L	Opus 1µg/L	Opus 10µg/L	Opus 100µg/L
Date du prélèvement	28/06/2006	28/06/2006	28/06/2006	28/06/2006	28/06/2006	28/06/2006	28/06/2006
Date du dépôt	30/06/2006	30/06/2006	30/06/2006	30/06/2006	30/06/2006	30/06/2006	30/06/2006
Volume déposé (mL)	200	200	200	200	200	200	200
<b>RESULTATS:</b>							
µg/L	Limites de quantification						
Dimethenamide	< 0.005	< 0.005	0,61	1,89	23,17	< 0.005	< 0.005
Epoxiconazole	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005	0,84	2,36
							44,42

*Impact des pesticides sur l'environnement marin*

Référence de l'échantillon	Eau libre Beg Meil Manip J Jour A structure alpha	Basamaïs Manip J Jour A 10µg/L structure alpha	Basamaïs Manip J Jour A 70µg/L structure alpha	Basamaïs Manip J Jour B 1µg/L structure beta	Basamaïs Manip J Jour B 10µg/L structure beta	Basamaïs Manip J Jour B 100µg/L structure beta	Round up Manip J Jour B 1 µg/L structure beta	Round up Manip J Jour B 10 µg/L structure beta	Round up Manip J Jour B 100 µg/L structure beta
Date du prélèvement	25/07/2006	25/07/2006	25/07/2006	27/07/2006	27/07/2006	27/07/2006	27/07/2006	27/07/2006	27/07/2006
Date du dépôt	02/08/2006	02/08/2006	02/08/2006	02/08/2006	02/08/2006	02/08/2006	02/08/2006	02/08/2006	02/08/2006
Volume déposé (mL)	200	200	200	200	200	200	200	200	200
<b>RESULTATS:</b> µg/L	Limites de quantification								
Bentazone	< 0,005		12,24	40,35	0,83	7,29	44,55	< 0,005	< 0,005
Dimethenamide	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005
Epoxiconazole	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005
Chlorpyrifos	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005
Nicosulfuron	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005
Glyphosate	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	0,11	3,56	113,4
AMPA	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	0,13	< 0,05	< 0,05

Référence de l'échantillon	Dursban Manip J Jour B 1 µg/L structure gamma	Dursban Manip J Jour B 10 µg/L structure gamma	Dursban Manip J Jour B 100 µg/L structure gamma	Milagro Manip J Jour B 1 µg/L structure gamma	Milagro Manip J Jour B 10 µg/L structure gamma	Milagro Manip J Jour B 100 µg/L structure gamma
Date du prélèvement	27/07/2006	27/07/2006	27/07/2006	27/07/2006	27/07/2006	27/07/2006
Date du dépôt	02/08/2006	02/08/2006	02/08/2006	02/08/2006	02/08/2006	02/08/2006
Volume déposé (mL)	200	200	200	200	200	200
<b>RESULTATS:</b> µg/L	Limites de quantification					
Bentazone	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005
Dimethenamide	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005
Epoxiconazole	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005
Chlorpyrifos	< 0,005	0,49	5,41	22,1	< 0,005	< 0,005
Nicosulfuron	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	0,98	12,75
Glyphosate	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
AMPA	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05

Référence de l'échantillon	Temoin Beg Meil Manip J Jour E structure gamma	Dursban Manip J Jour E 1µg/L structure gamma	Dursban Manip J Jour E 10µg/L structure gamma	Dursban Manip J Jour E 100µg/L structure gamma	Milagro Manip J Jour E 1µg/L structure gamma	Milagro Manip J Jour E 10µg/L structure gamma	Milagro Manip J Jour E 100µg/L structure gamma	Temoin Beg Meil Manip J Jour E+1 structure beta
Date du prélèvement	02/08/2006	02/08/2006	02/08/2006	02/08/2006	02/08/2006	02/08/2006	02/08/2006	03/08/2006
Date du dépôt	23/08/2006	23/08/2006	23/08/2006	23/08/2006	23/08/2006	23/08/2006	23/08/2006	23/08/2006
Volume déposé (mL)	200	200	200	200	200	200	200	200
<b>RESULTATS:</b> µg/L	Limites de quantification							
Bentazone	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005
Dimethenamide	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005
Epoxiconazole	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005
Sulcotrione	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Nicosulfuron	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	1,09	5,71	50,96	< 0,005
Chlorpyrifos	< 0,005	< 0,005	0,76	5,32	41,32	< 0,005	< 0,005	< 0,005
Glyphosate	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
AMPA	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05

Référence de l'échantillon	Round up Manip J Jour E+1 1µg/L structure beta	Round up Manip J Jour E+1 10 µg/L structure beta	Round up Manip J Jour E+1 100 µg/L structure beta	Basamaïs Manip J Jour E+1 1µg/L structure beta	Basamaïs Manip J Jour E+1 10 µg/L structure beta	Basamaïs Manip J Jour E+1 100 µg/L structure beta
Date du prélèvement	03/08/2006	03/08/2006	03/08/2006	03/08/2006	03/08/2006	03/08/2006
Date du dépôt	23/08/2006	23/08/2006	23/08/2006	23/08/2006	23/08/2006	23/08/2006
Volume déposé (mL)	200	200	200	200	200	200
<b>RESULTATS:</b> µg/L	Limites de quantification					
Bentazone	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	0,76	28,49
Dimethenamide	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005
Epoxiconazole	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005
Sulcotrione	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Nicosulfuron	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005
Chlorpyrifos	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005
Glyphosate	< 0,05	0,13	3,08	51,00	< 0,05	< 0,05
AMPA	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05

8.4 Annexe 4 : Pigment message taxonomique

<b>Chlorophylles</b>	
Chla	<b>Biomasse autotrophe totale</b> moins prochlorophycées
DV-chla	<b>Prochlorophycées</b>
Chlb	<b>Algues vertes</b> : chlorophycées, prasinophycées, euglénophycées
DV-chlb	Prochlorophycées
Chlc totale	Chromophycées
Chlc1	Diatomées, quelques prymnésiophycées, raphidophycées
Chlc2	Diatomées, dinoflagellés, prymnésiophycées, raphidophycées, cryptophycées
Chlc3	Quelques prymnésiophycées, une chrysophycée, plusieurs dinoflagellés et diatomées
<b>Caroténoïdes</b>	
Allo	<b>Cryptophycées</b>
19BF	Qqs. prymnésiophycées, <b>pélagophycées</b> , <b>chrysophycées</b> , dinoflagellés
Fuco	<b>Diatomées</b> , prymnésiophycées, chrysophycées, raphidophycées, qqs. dinoflagellés
19HF	<b>Prymnésiophycées</b> , dinoflagellés
Lute	Algues vertes : <b>chlorophycées</b> , prasinophycées
Neo	Algues vertes : <b>chlorophycées</b> , <b>prasinophycées</b> , euglénophycées
Peri	<b>Dinoflagellés</b>
Prasi	Quelques <b>prasinophycées</b>
Sipho	Plusieurs prasinophycées, une euglénophycée
Viola	Algues vertes : chlorophycées, prasinophycées, eustigmatophycées
Zea	<b>Cyanophycées</b> , prochlorophycées, rhodophycées, chlorophycées, eustigmatophycées
Dino	Dinoflagellés
DDX	Diatomées, dinoflagellés, prymnésiophycées, chrysophycées, raphidophycées, euglénophycées

Tableau « Lampert » : Pigments chlorophylliens et caroténoïdes et leur signification taxonomique. En gras sont indiqués les biomarqueurs utilisés. (Extrait des tableaux 4.1 dans Jeffrey, 1997) in Lampert 2001.

