



PREDIRE L'IMPACT DES HERBICIDES EN MELANGE ET A FAIBLE CONCENTRATION SUR LES COMMUNAUTES ALGALES PLANCTONIQUES ET BENTHIQUES LACUSTRES.

PREDICT THE IMPACT OF HERBICIDES IN MIXTURE AND AT LOW CONCENTRATION ON PLANKTONIC AND BENTHIC ALGAL COMMUNITIES IN LAKES.

Programme Evaluation et réduction des risques liés à l'utilisation des Pesticides
APR 2009
Rapport final- 01_2014

INRA - UMR CARTEL
Agnès BOUCHEZ
UMR CARTEL
75 avenue de Corzent,
74200 THONON

Date : 07/04/2014

N° de contrat : 29000506
Date du contrat : 11/01/2011

SYNTHESE

PREDIRE L'IMPACT DES HERBICIDES EN MELANGE ET A FAIBLE CONCENTRATION SUR LES COMMUNAUTES ALGALES PLANCTONIQUES ET BENTHIQUES LACUSTRES.

PROGRAMME EVALUATION ET REDUCTION DES RISQUES LIES A L'UTILISATION DES PESTICIDES - APR 2009

AGNES BOUCHEZ - INRA CARTEL



INRA CARTEL: Frédéric Rimet, Bernard Montuelle, Orlane Anneville, Christian Gillet, Nicolas Bernes, Floriane Larras, Vera Georgescu
UNI Lausanne (CH) : Nathalie Chèvre, Vincent Gregorio
EPFL (CH) : Felipe De Alencastro
Irstea Lyon: Stéphane Pesce



IMPALAC

CONTEXTE GENERAL

De nombreux écosystèmes aquatiques font l'objet d'une pollution diffuse par des mélanges de contaminants en provenance de leurs bassins versants. Les milieux aquatiques sont le réceptacle final de tous les ruissellements et les flux de pesticides qui en résultent peuvent avoir des conséquences marquées sur les communautés, en terme de diversité et de fonction. Parmi eux, les lacs sont d'importantes masses d'eau qui collectent et diluent fortement ces contaminants parmi lesquels de plus en plus de substances chimiques différentes sont désormais détectées. La question de la dégradation de l'écosystème prend une ampleur particulière dans les lacs qui de par leur taille importante et leur faible taux de renouvellement ont une durée de réaction très importante.

Si la compréhension et la prédiction de l'effet individuel des substances progressent, l'effet des mélanges est encore peu abordé. De plus, la plupart des études mettent en évidence des effets à des concentrations relativement élevées, qui ne sont pas réalistes en comparaison des faibles doses rencontrées dans les lacs. Dans ce contexte, la compréhension et la prédiction des impacts représentent des enjeux majeurs pour la protection de ces milieux.

L'évaluation du risque environnemental s'intéresse aux impacts des substances et des mélanges de substances sur les organismes en évaluant à la fois l'exposition, résultant du rejet de polluants chimiques, et les effets de ceux-ci sur les structures et les fonctions de l'écosystème. On distingue deux types d'approches : 1/ l'évaluation du risque *a priori* utilisée notamment pour l'homologation des pesticides et destinée à prédire le risque potentiel des substances, et 2/ l'évaluation du risque *a posteriori* destinée à évaluer des impacts avérés. Cependant, historiquement, ces deux méthodes focalisent sur les substances isolées et ne tiennent que rarement compte des mélanges de composés chimiques. Il est donc nécessaire d'améliorer ces méthodes en tenant compte de ces mélanges. De plus, les prédictions d'évaluation du risque ont rarement été confrontées à des données de terrain à l'échelle des communautés (de Zwart, 2005). Pourtant une telle évaluation est cruciale pour (i) améliorer l'évaluation du risqué et (ii) obtenir des outils de gestion de l'environnement robustes.

OBJECTIFS GENERAUX DU PROJET

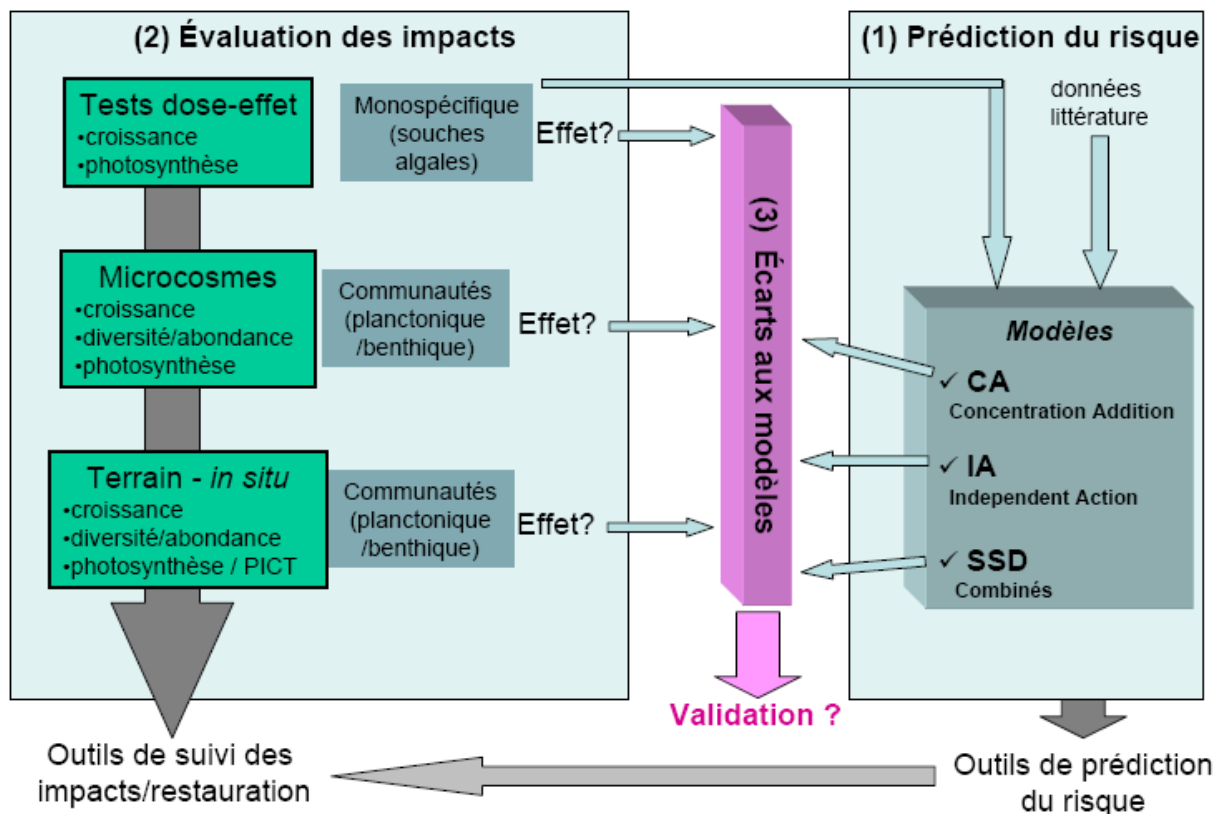
Dans ce contexte, le projet exploratoire IMPALAC (Prédire l'impact des herbicides en mélange et à faible concentration sur les communautés algales planctoniques et benthiques lacustres) s'est attaché à établir des liens entre l'évaluation des impacts des mélanges d'herbicides et la prédiction du risque de façon notamment à tester différents modèles de prédiction du risque des mélanges sur les communautés algales.

Ce projet s'articule en 3 parties

- 1) approche *a priori* : enrichissement des modèles de **prédiction de risque** par des bioessais en laboratoire,

- 2) approche *a posteriori* : **évaluation des effets** des mélanges au niveau spécifique (souches algales) et sur les communautés par des approches expérimentales et de terrain,
- 3) confrontation des deux approches d'évaluation « *a priori* » et « *a posteriori* » : **évaluation des écarts aux modèles** et de l'efficacité des modèles dans une démarche de prédiction du risque.

Ces 3 étapes sont présentées dans le schéma général du projet ci-dessous.



QUELQUES ELEMENTS DE METHODOLOGIE (ET EVENTUELLES DIFFICULTES RENCONTREES)

SITES ET CAS RETENUS

Le lac Léman présente depuis de nombreuses années une contamination en pesticides en lien avec un bassin versant viticole sur sa rive Suisse et sur le bassin versant du Rhône amont, ainsi que des industries de production de ces molécules en amont (Valais, CH). Le monitoring assuré par la CIPEL au centre du lac, détecte une trentaine de pesticides et/ou métabolites sur les 200 qui sont testés en routine depuis 2004 par le laboratoire de chimie cantonale de Genève (CIPEL 2008, 2011). Ces molécules à elles seules ou en mélange peuvent franchir les seuils de risque retenus. Le Léman a donc été retenu comme site d'étude de façon à bénéficier des longues séries de données physico-chimiques et biologiques disponibles sur ce lac grâce notamment au SOERE « grands lacs péri-alpins » (INRA de Thonon, <http://www6.dijon.inra.fr/thonon/L-observatoire>) et à la CIPEL (www.cipel.org).

Nous nous sommes attachés à étudier les impacts sur **les communautés algales** caractéristiques des écosystèmes lacustres, celles rencontrées dans la colonne d'eau (**communautés planctoniques**) et celles rencontrées en zone littorale formant des biofilms (**communautés benthiques**). En effet dans les lacs, les zones côtières peuvent être soumises à des expositions aux toxiques différentes selon la nature du bassin-versant local et donc de la présence/absence de rejets et de la nature de ces rejets. Ces expositions peuvent être très différentes de celle retrouvée au centre du lac et révéler des processus de réponse différents.

Pour ce projet nous avons concentré notre attention sur un groupe de pesticides : **les herbicides**, pesticides les plus fréquemment détectés dans les eaux de surface. Les effets de ces molécules sont communément observés sur les espèces non-cibles que sont les communautés de producteurs primaires des milieux aquatiques, i.e. les algues, et ce dans de nombreux contextes différents (*in situ*, expérimentation, faibles doses...), notamment par les équipes du projet IMPALAC. Nous avons donc tout d'abord réalisé une synthèse sur l'effet des herbicides sur les communautés microbiennes phototrophes d'eau douce (Pesce et al 2011). Nous avons ensuite retenus des herbicides représentatifs de la contamination environnementale avec les critères de choix suivants : conserver **une molécule par famille et par mode d'action** qui soit **encore autorisée**, et si possible une autre molécule de la même famille **très toxique**(autorisée ou non). Cela nous a amené à retenir 3 triazines, 2 phénylurées et 2 chloroacétamides.

Pour la **prédiction du risque**, nous utilisons les courbes de distribution de sensibilité des espèces (Species Sensitivity Distribution; SSD) qui permettent de dériver des "Hazardous Concentrations" (HCs). Les seuils HC sont une alternative intéressante à l'utilisation des PNECs (Predicted No Effect concentration) associées aux facteurs d'évaluation. Pour la prédiction du **risque des mélanges**, il existe actuellement deux modèles toxicologiques acceptés pour décrire les effets de mélanges de substances chimiques sans interactions entre elles. Le modèle d'addition des concentrations (CA) s'applique lorsque les substances du mélange ont des modes d'action similaires sans interaction. Le modèle d'indépendance des effets (IA) s'applique lorsque les substances ont des modes d'actions dissemblables, également sans interaction.

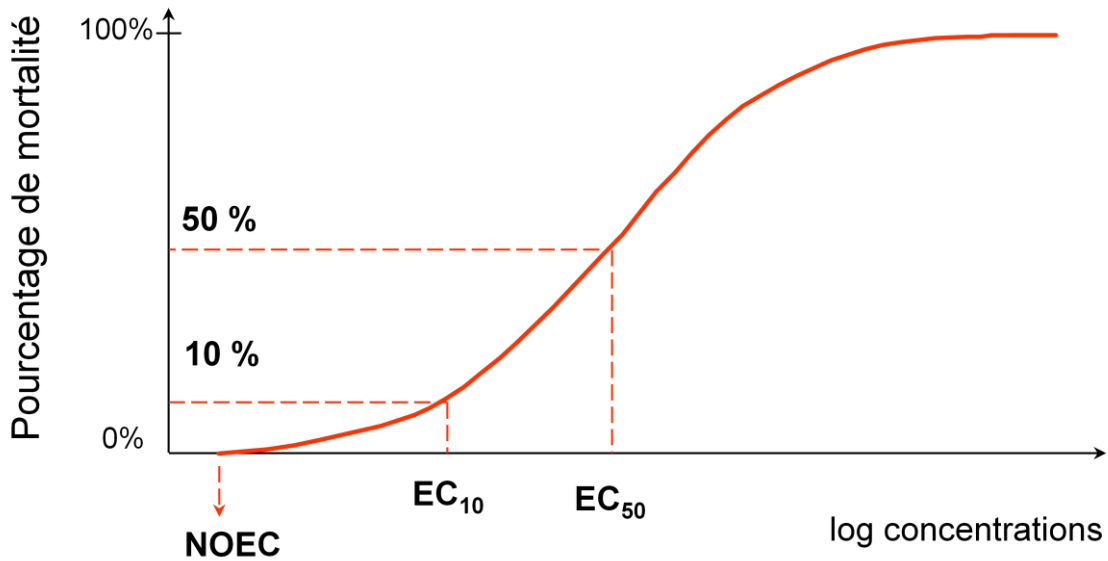
Le projet IMPALAC s'articule en 3 phases (voir schéma ci-dessus) à travers un **changement d'échelle progressif** allant de tests simples en laboratoire (une espèce / une herbicide) à des évaluations *in situ* en environnement naturel (complexe de par toutes les interactions en jeux). Ce changement d'échelle est destiné à valider du bioessais à l'environnement les outils d'évaluation de risque.

RESULTATS OBTENUS

PREDICTION DU RISQUE DES MELANGES (APPROCHE A PRIORI)

Une des limites importantes à l'utilisation des modèles d'évaluation du risque est le manque de données disponibles sur les effets individuels des substances, notamment aux faibles doses. La courbe dose-réponse (ci-dessous) établie par des bioessais en laboratoire évaluant la réponse (ici la mortalité) d'une espèce à un toxique permet d'extrapoler des valeurs caractérisant la sensibilité de cette espèce à ce toxique. Les valeurs caractéristiques de l'effet des faibles doses sont par exemple

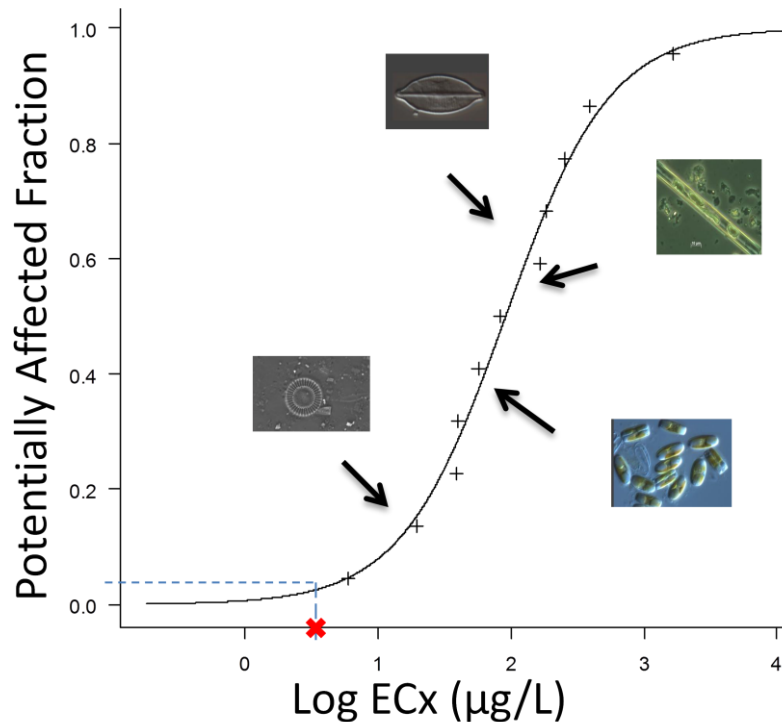
la NOEC (No Observed Effect Concentration) ou la CE10 (concentration affectant le paramètre observé de 10%).



Relations dose-effet

Nous avons donc commencé par enrichir les modèles de prédiction du risque lié aux herbicides, grâce à des données d'expériences de type « dose-effet » entre molécules d'herbicides et microalgues. En effet un bon ajustement des courbes SSD (ci-dessous) pour prédire le risque des herbicides sur les communautés naturelles (HCx : concentration à risque pour x% des espèces) nécessite d'acquérir ou collecter des données de sensibilité :

- (1) fiables et homogènes (même conditions d'obtention),
- (2) sur un nombre important d'espèces (au moins 10),
- (3) sur des espèces représentatives de la biodiversité des milieux à protéger.



Trois bases de données de sensibilité aux herbicides ont été construites:

- sensibilité des souches algales planctoniques aux herbicides sur base bibliographique. Il s'agit de valeurs de CE50 présentant une certaine hétérogénéité (différents end-points mesurés, différents protocoles...).
- sensibilité d'espèces phytoplanctoniques acquise par des bioessais en croissance planctonique. Elle a permis d'alimenter en données de sensibilité précises l'approche de modélisation.
- sensibilité de souches de diatomées caractéristiques du milieu lacustre côtier présentant une large diversité, tant phylogénétique qu'écologique (guilde écologique, mode trophique). Les bioessais ont été réalisés selon les deux modes de croissance : planctonique (libre dans l'eau) et benthique (en biofilm).

Les données de sensibilité acquises dans le projet IMPALAC en bioessais intègrent un degré de réalisme écologique supérieur aux protocoles classiquement utilisés. Elles assurent une meilleure représentativité environnementale (diversité environnementale, mode d'exposition réaliste) dans des conditions standardisées et comparables permettant de modéliser des SSD et d'en dériver des seuils protecteurs (HC).

Prédiction de risque : courbes SSD et seuils HC

Nos résultats ont révélé un degré élevé de variabilité de la sensibilité de l'ensemble des espèces testées. Pour les herbicides inhibiteurs du photosystème II, le regroupement des espèces de diatomées par niveau de sensibilité semble en lien avec leur mode de trophique et leur guilde écologique. Les HC5 extrapolées (concentrations à risque pour 5% des espèces), révèlent que les communautés de

diatomées pourraient être affectées par les concentrations régulièrement rencontrées dans les environnements aquatiques.

Nous avons également observé que le biofilm présente un effet protecteur contre les herbicides qui a tendance à diminuer avec l'augmentation de l'hydrophobie des herbicides. La matrice du biofilm semble bien contrôler l'exposition aux herbicides, et par conséquent leur toxicité envers les diatomées benthiques. Pour les herbicides hydrophobes, dériver des seuils protecteurs à partir de données de sensibilité obtenues en croissance benthique, plus proche de la réalité environnementale, semble offrir une alternative prometteuse pour améliorer l'évaluation du risque pour les communautés benthiques.

Prédiction du risque des mélanges

Deux modèles sont en général utilisés pour prédire la toxicité des mélanges : le modèle d'addition des concentrations (CA) et le modèle d'addition des réponses (RA). Leur aptitude à décrire la toxicité des mélanges pour les organismes pris individuellement a été montrée ces dernières années. Pour l'évaluation du risque des mélanges, il a donc été proposé d'utiliser ces modèles directement sur les courbes de distribution de sensibilité des espèces ou courbes SSD afin de calculer un potentiel d'espèces affectées par le mélange. Nous avons comparé cette approche, à une démarche plus "correcte" basée directement sur les courbes SSD multi-espèces.

De manière générale, cette étude a montré que l'utilisation des modèles CA ou RA sur les courbes SSD pour calculer un risque a tendance à surestimer la toxicité du mélange. En appliquant la méthode de mélange directement sur les SSD, on obtient donc une valeur de seuil assez conservative. Cette surestimation est accentuée quand le nombre de substances augmente. Il conviendrait donc, par la suite, de définir un domaine d'applicabilité des modèles sur les courbes SSD pour ne pas risquer de sous-estimer les seuils de risque des mélanges.

Données spécifiques ou génériques

Le manque de données écotoxicologiques rend difficile la construction de courbes SSD fiables pour la prédiction du risque. Nous avons comparé le risque de 4 herbicides, séparément et en mélange évalué au travers de :

- 1) SSD génériques construites avec des données de sensibilité de la littérature
- 2) SSD spécifiques construites sur les données de sensibilité du projet IMPALAC

Cette comparaison a révélé que le choix des données à inclure dans les courbes SSD est capital dans l'extrapolation des seuils de risque (HC). Si les SSD sont basées sur des données qui sous-estiment la sensibilité des communautés à protéger, cet écart génère des seuils de risque moins protecteurs qu'ils ne devraient l'être pour réellement protéger les communautés environnementales. Il semble donc particulièrement important de baser les seuils de risque sur des données de sensibilité représentatives des communautés à protéger.

Evaluation du risque par screening (first tier)

Cette approche, actuellement en discussion dans l'UE, a été utilisée pour évaluer le risque des mélanges de substances chimiques pour une rivière (le Rhône) et un lac (le Léman). Elle permet de mettre en évidence les substances les plus problématiques du mélange. Cependant, elle montre également que le simple fait

d'être exposés simultanément à des dizaines de substances chimiques (effet cocktail) conduit à dépasser le seuil de risque pour les organismes exposés. En termes de management, ceci implique qu'il est important de réduire les quantités de chacune des substances qui entrent dans l'environnement.

EVALUATION DES IMPACTS DES MELANGES (APPROCHE A POSTERIORI) :

Nous avons choisi une démarche d'évaluation d'impact progressive allant d'une moindre complexité (bioessais de laboratoire) à une complexité maximum (in situ). Cette approche nous permet de valider en conditions simples des impacts, puis de poser des hypothèses sur des observations en conditions plus complexes.

Impact des mélanges au niveau de l'espèce – approche en bioessais

Pour les 4 herbicides les plus toxiques de notre panel, nous avons réalisé un mélange équi-toxique qui a été testé sur un panel d'espèces et a permis d'extrapoler la sensibilité de chacune des espèces au mélange (CE50).

Impact des mélanges au niveau des communautés – approche en microcosmes

Dans l'environnement, la structure et la composition taxonomique des communautés naturelles de diatomées sont modulées par certains facteurs environnementaux tels que la température, la luminosité ou encore les teneurs en nutriments. Ces paramètres fluctuent naturellement et de manière rapide selon les événements météorologiques ou encore de manière relativement régulière suite aux successions saisonnières. Ces changements de structure et de composition s'accompagnent souvent d'une évolution de la sensibilité aux pesticides. Il est donc important de considérer les modifications environnementales pour protéger de manière fiable les communautés naturelles. Nous nous sommes intéressés à l'influence de 2 paramètres environnementaux (température, saison) sur la dynamique et la composition de ces communautés, sur leur sensibilité aux herbicides.

La température semble conditionner la sensibilité aux herbicides des communautés périphytiques. Ceci suggère que la sensibilité des communautés d'algues aux pesticides peut dépendre de la saison et des caractéristiques bioclimatiques. Enfin, cela montre que l'évaluation de l'effet des herbicides doit prendre en compte cette spécificité environnementale qui module la toxicité.

En ce qui concerne les saisons, la variation de la composition de la communauté conduit à la présence / dominance d'espèces résistantes aux herbicides à des degrés divers, ce qui influence fortement la résistance globale de la communauté. Dans ce contexte, la variation saisonnière de sensibilité des communautés en raison de l'évolution de la composition taxonomique doit être prise en compte pour évaluer le risque lié à la présence d'herbicides en mélange.

Impact des mélanges au niveau des communautés – approches environnementales

Tout d'abord, l'évolution de la sensibilité des communautés planctoniques du lac Léman aux herbicides a été évaluée par une approche comparative (1999-2011) réalisée grâce à l'approche PICT. La baisse des concentrations en cuivre et atrazine observée au cours de ces 12 années dans le Léman semble correspondre à un changement des communautés, communautés qui se révèlent plus sensibles aux

toxiques. Cette augmentation de sensibilité, si elle est concomitante à la levée partielle de la pression en toxiques est également couplée à des changements globaux observés sur le lac Léman : modification des températures, ré-oligotrophisation, présence de cocktail de contaminants, etc. L'approche PICT permet d'affirmer que le changement des communautés associé à une modification de leur sensibilité révèle une forte évolution à l'échelle de la dizaine d'années liée pour partie à la baisse des certains toxiques.

Le suivi à long-terme du lac Léman par la CIPEL et du SOERE de l'INRA de Thonon nous ont donné l'opportunité d'évaluer dans quelle mesure la présence d'herbicides en mélange et à faibles doses pouvait expliquer les changements d'abondance du phytoplancton dans le Léman au cours des années 2004 à 2009, en comparaison avec d'autres paramètres classiques comme les variations de phosphore ou de température. Cette analyse permet de conclure que la toxicité du mélange d'herbicides est un facteur clé pour expliquer les changements d'abondance du phytoplancton dans le Léman. Cependant les modifications d'assemblage de ces communautés sont également partiellement expliquées par l'évolution d'autres facteurs environnementaux tels les concentrations en nutriments, les températures, etc.

Approche de modélisation : "mésocosme virtuel"

Enfin, un "mésocosme virtuel", modèle PhytoHerb, a été initié dans le projet. Il s'agit d'un modèle individus-centré qui permet de modéliser la croissance d'une communauté phytoplanctonique en présence d'un cocktail d'herbicides. Il pourrait être finalisé et mis en œuvre pour tester des scénarios de contamination au faibles doses et en mélange et devrait permettre de comparer évaluation *a priori* et évaluation *a posteriori* à partir des propriétés émergentes des communautés phytoplanctoniques qui seront révélées par le modèle.

CONFRONTATION DES DEUX APPROCHES : ECARTS AUX MODELES DE PREDICTION DES RISQUES

Sensibilité des communautés versus espèces

L'effet prédit du mélange quaternaire à partir de tests monospécifiques et du modèle CA a été comparé à l'effet observé du même mélange sur un assemblage "contrôlé" d'espèces de diatomées exposé en microcosmes à un gradient de 8 concentrations du mélange. Les valeurs de sensibilités (CE50) extrapolées pour le mélange à l'aide du modèle CA ont été mal estimées et sont différentes des CE50 obtenue dans des conditions multi-espèces. La sensibilité des diatomées benthiques semble évoluer avec la complexité biologique du système. Les bioessais monospécifiques largement utilisés en écotoxicologie sont censés fournir des données de sensibilité qui reflètent les sensibilités des espèces dans leur milieu naturel, même s'ils sont en fait menés en laboratoire dans des conditions optimales et standardisés. Même si ces tests sont des outils utiles pour évaluer la toxicité des produits chimiques de base et sont nécessaires pour les processus d'évaluation de risque, ils représentent mal la réalité environnementale.

Effets environnementaux et écarts de prédiction:

Notre base de données de sensibilité nous a permis de construire une SSD spécifique de la communauté des diatomées du lac Léman au mélange des quatre herbicides. Les seuils dérivés (HC) ont été comparés aux sensibilité observées en mésocosme aux deux saisons. Le seuil protecteur HC5 dérivé des SSD avait un effet protecteur pour la communauté hivernale, mais pas pour la communauté estivale. Un seuil protecteur pour la communauté microalgale benthique contre les herbicides devrait donc tenir compte des changements des conditions physico-chimiques de l'environnement qui influencent fortement ces communautés. Dans l'attente de SSD adaptées, ce résultat souligne l'intérêt encore actuel d'utiliser des facteurs d'évaluation ("assessment factors" pour dériver les PNEC) en évaluation du risque *a priori* pour contrebalancer ce type de variations. Pour utiliser les SSD en évaluation du risque, il est utile d'utiliser des espèces présentes dans le milieu, et notamment les plus sensibles au cours des différentes saisons pour permettre de dériver des seuils de protection efficaces tout au long de l'année.

CONCLUSION

Notre étude, tout en apportant des données de base de sensibilité, a montré que les SSD sont néanmoins utilisables en n'appliquant pas les modèles de mélanges espèce par espèce, mais sur toutes les espèces. Le risque de sous-estimer le risque du mélange est alors faible, sauf dans les cas rares où les courbes dose-réponse des différentes substances sont très plates. Il nous paraît donc judicieux de conseiller d'utiliser cette approche, plus robuste, lorsque cela est possible.

Les modèles de risque utilisés sont des approches théoriques. Se pose donc la question du réalisme des prédictions. Nos travaux ont permis de montrer que les mélanges de substances chimiques jouent un rôle dans les fluctuations de communautés lacustres. Il nous semble donc particulièrement important d'insister sur la prise en compte des mélanges dans les évaluations de risque. Ceci pose toutefois la question du management du risque, puisque cette fois-ci, ce n'est pas une substance qui doit être légiférée, mais bien un ensemble de substances provenant de sources parfois très différentes.

Par ailleurs, les écosystèmes aquatiques sont de plus en plus soumis à des rejets autres que les pesticides (e.g., rejets de substances pharmaceutiques) dont les effets n'ont pas été clairement identifiés, en substances seules et en mélange, en particulier sur les microalgues. L'application des méthodes SSD à ces mélanges de contaminants devient donc indispensable. La problématique des mélanges est aujourd'hui au cœur de l'écotoxicologie et de l'évaluation du risque environnemental, mais le degré de complexité supplémentaire qu'ils induisent n'est pas encore entièrement compatible avec les outils d'évaluation du risque actuels. Si les approches de recherche peuvent donner (et donnent) des éléments de compréhension sur les mécanismes de l'exposition et la réponse biologique, leur traduction en éléments de connaissance intégrables aux outils de gestion reste encore un réel verrou opérationnel.

IMPLICATIONS PRATIQUES, RECOMMANDATIONS, REALISATIONS PRATIQUES, VALORISATION

- Implications pratiques :

Dans l'attente de SSD adaptées, ce résultat souligne l'intérêt encore actuel d'utiliser des facteurs d'évaluation ("assessment factors" pour dériver les PNEC) en évaluation du risque *a priori* pour contrebalancer ce type de variations. Pour utiliser les SSD en

évaluation du risque, il est utile d'améliorer leur réalisme écologique. Par exemple en utilisant des espèces présentes dans le milieu, et notamment les plus sensibles au cours des différentes saisons pour permettre de dériver des seuils de protection efficaces tout au long de l'année.

L'approche d'évaluation réalisée sur le lac Léman et sur le Rhône indique qu'en termes de management, il est important de réduire les quantités de chacune des substances qui entrent dans l'environnement.

- Recommandations et limites éventuelles :

Dans un contexte d'évaluation du risque des herbicides, l'intégration des co-effets des paramètres environnementaux (température, lumière, et éléments nutritifs) qui influent sur la dynamique, la structure et la composition de la communauté des microalgues semble être cruciale pour améliorer la pertinence environnementale de modèles et des seuils de qualité. L'évaluation de l'effet des herbicides doit prendre en compte cette spécificité environnementale qui module la toxicité.

- Réalisations pratiques et valorisation :

Le projet IMPALAC s'est appuyé en bonne partie sur le travail de doctorat 1/ de Floriane LARRAS (INRA Thonon) sous la direction d'Agnès Bouchez et Bernard Montuelle, et 2/ de Vincent GREGORIO (UNI Lausanne) sous la direction de Nathalie Chèvre. La 1ère a été soutenue en novembre 2013, et la seconde en avril 2014.

Le projet IMPALAC a donné lieu à 9 publications dans des revues scientifiques internationales et 16 communications lors de congrès. 1 article est encore à paraître et 1 autre est en préparation.

Un modèle PhytoHerb initié lors du projet IMPALAC est encore en développement. Ce modèle individu-centré propose un "mésocosme virtuel" destiné à tester des scénarios de contamination par des mélanges sur les communautés algales. Il a été mis au point au cours du projet par Dr Vera GEORGESCU et devrait permettre à terme de tester différents scénarios de contamination en mélange et à faible doses dans les mois à venir. Il est disponible dans sa version actuelle auprès du porteur du projet.

PARTENARIATS MIS EN PLACE

La collaboration entre toutes les équipes impliquées a permis un partage de questionnements, de connaissances, de compétences qui devrait conduire à de nouveaux projets. Un partenariat a été mis en place avec l'ONEMA dans le cadre d'un projet sur les liens entre phylogénie et bioindication mené par l'INRA de Thonon (2012-2015) et a débouché sur une publication conjointe (Larras, Keck et al, 2014).

POUR EN SAVOIR PLUS

CHÈVRE N, LOEPFE C, SINGER H, STAMM C, FENNER K, ESCHER B (2006) Including mixtures in the determination of water quality criteria for herbicides in surface water. *Environmental Science and Technology*; 40: 426-435.

EUROPEAN COMMISSION (2003) Technical Guidance Document on Risk Assessment. TGD Part II. Institute for Health and Consumer Protection, European Chemicals Bureau, European Commission (EC), Ispra, Italy,.

- GREGORIO V., BUCHI L., ANNEVILLE O., RIMET F., BOUCHEZ A., CHEVRE N. (2012) Risk of herbicides mixture as a key parameter to explain phytoplankton fluctuation in a great lake: the case of lake Geneva, Switzerland. *Ecotoxicology* 21:2306-2318
- GREGORIO V., CHEVRE N., JUNGHANS M. (2013) Critical issues in using the common mixture toxicity models Concentration Addition or Response Addition on Species Sensitivity Distributions: a theoretical approach. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(10):2387–2395
- GREGORIO V, CHÈVRE N. (2014) Assessing the risks posed by mixtures of chemicals in freshwater environments: case study of Lake Geneva, Switzerland. *WIREs Water* (In press)
- LARRAS F., BOUCHEZ A., RIMET F., and MONTUELLE B. (2012) Assessment of Species Sensitivity Distribution of benthic diatoms to herbicides using single species bioassays. *PLoS ONE* 7(8):e44458
- LARRAS F., MONTUELLE B. and BOUCHEZ A. (2013) Assessment of toxicity thresholds in aquatic environments: does benthic growth of diatoms affect their exposure and sensitivity to herbicides? *STOTEN* 463-464:469-477
- LARRAS F., LAMBERT A.S., PESCE S., RIMET F., BOUCHEZ A., MONTUELLE B. (2013) The effect of temperature and an herbicide mixture on freshwater periphytic algae. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 98:162-170
- LARRAS F., KECK F., MONTUELLE B., RIMET F., BOUCHEZ A. (2014) Linking diatoms sensitivity to herbicide to phylogeny: a step forward for biomonitoring? *EST*, DOI10.1021/es4045105
- MARCEL R, BOUCHEZ A, RIMET F (2013) Influence of herbicide contamination on diversity and ecological guilds of river diatoms. *Cryptogamy Algology* 34(2):169-183
- PESCE S, BOUCHEZ A, MONTUELLE B (2011) Effects of Organic Herbicides on Phototrophic Microbial Communities in Freshwater Ecosystems. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 214:87-124

LISTE DES OPERATIONS DE VALORISATION ISSUES DU CONTRAT

	PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES
Publications scientifiques parues	<ol style="list-style-type: none"> 1. PESCE S., BOUCHEZ A., MONTUELLE B. (2011) Effects of Organic Herbicides on Phototrophic Microbial Communities in Freshwater Ecosystems. <i>Reviews of Environmental Contamination and Toxicology</i> 214:87-124 2. GREGORIO V., BUCHI L., ANNEVILLE O., RIMET F., BOUCHEZ A., CHEVRE N. (2012) Risk of herbicides mixture as a key parameter to explain phytoplankton fluctuation in a great lake: the case of lake Geneva, Switzerland. <i>Ecotoxicology</i> 21:2306-2318 3. LARRAS F., BOUCHEZ A., RIMET F., and MONTUELLE B. (2012) Assessment of Species Sensitivity Distribution of benthic diatoms to herbicides using single species bioassays. <i>PLoS ONE</i> 7(8):e44458 4. LARRAS F., MONTUELLE B. and BOUCHEZ A. (2013) Assessment of toxicity thresholds in aquatic environments: does benthic growth of diatoms affect their exposure and sensitivity to herbicides? <i>STOTEN</i> 463-464:469-477 5. LARRAS F., LAMBERT A.S., PESCE S., RIMET F., BOUCHEZ A., MONTUELLE B. (2013) The effect of temperature and an herbicide mixture on freshwater periphytic algae. <i>Ecotoxicology and Environmental Safety</i> 98:162-170 6. GREGORIO V., CHEVRE N., JUNGHANS M. (2013) Critical issues in using the common mixture toxicity models Concentration Addition or Response Addition on Species Sensitivity Distributions: a theoretical approach. <i>Environmental Toxicology and Chemistry</i>, 32(10):2387–2395 7. LARRAS F., KECK F., MONTUELLE B., RIMET F., BOUCHEZ A. Linking diatoms sensitivity to herbicide to phylogeny: a step forward for biomonitoring? <i>EST</i>, DOI10.1021/es4045105 8. GREGORIO V, CHÈVRE N. Assessing the risks posed by mixtures of chemicals in freshwater environments: case study of Lake Geneva, Switzerland. <i>WIREs Water</i>, DOI:10.1002/wat2.1018 9. LARRAS F., MONTUELLE B., RIMET F., CHEVRE N. and BOUCHEZ A. Seasonal sensitivity evolution of benthic microalgal community to an herbicide mixture: Consequences on the protectiveness of hazardous concentration. <i>Ecotoxicology</i>, DOI 10.1007/s10646-014-1254-2
Publications scientifiques à paraître	LARRAS F., GREGORIO V., BOUCHEZ A., MONTUELLE B. and CHEVRE N. Building specific and generic species sensitivity distributions for herbicides risk assessment: are thresholds impairing diatoms assemblage? (submitted to <i>Pest Management Science</i>)
Publications scientifiques prévues	LARRAS F., RIMET F., LÉBOULANGER C., BERARD A., MONTUELLE B., BOUCHEZ A. PICT monitoring of phytoplankton sensitivity to atrazine and Cu in lake Geneva : evolution from 1999 to 2011. (to be submitted to <i>Freshwater biology special issue</i>)
	COLLOQUES
Participations passées à des colloques	<p>GREGORIO V., BOUCHEZ A., ANNEVILLE O., CHEVRE N. (2010) Evaluation du risque des mélanges de substances chimiques : application au cas du phytoplancton du Léman. Journées Internationales de Limnologie (JIL), Thonon (France), 5-8 octobre 2010 (poster)</p> <p>GREGORIO V, CHEVRE N. (2010) Evaluation du risque des</p>

- mélanges de substances chimiques: phytoplancton versus périphyton. *Ecologie 2010*, September 2-4, 2010, Montpellier, France. (poster)
- LARRAS F., BOUCHEZ A., MONTUELLE B. (2011) Benthic Microbial community responses to pesticides in lake littoral zone. 12th Symposium on Aquatic Microbial Ecology, Rostock (Germany), August 28th - September 2nd 2011 (poster)
- LARRAS F., BOUCHEZ A., Montuelle B. (2011) Adaptation des modèles de « distribution de sensibilité des espèces » aux diatomées benthiques pour l'évaluation du risque des herbicides. 4^{ème} Séminaire d'Écotoxicologie de l'INRA, Saint Langer (France), 7-9 Novembre 2011 (communication)
- BOUCHEZ A. (2011) Prédire l'impact des herbicides en mélange et à faible concentration sur les communautés algales planctoniques et benthiques lacustres. Colloque "Pesticides & Environnement : entre science et décision", Tours (France), 23-25 mars 2011 (communication)
- RIMET F., LARRAS F., MONTUELLE B., BOUCHEZ A. (2012) Integrating complexity dimension in ecotoxicology: case of herbicide impact on benthic diatoms. 6th Central European Diatom Meeting, Innsbruck (Austria), 22-25 March 2012 (communication)
- LARRAS F., BOUCHEZ A., MONTUELLE B. (2012) Species Sensitivity Distribution for the prediction of herbicides toxicity on benthic diatoms. 6th SETAC World Congress 2012, Berlin (Germany), 20-24 May 2012 (communication)
- GREGORIO V, CHÈVRE N, JUNGHANS M. (2012) On the appropriateness of using the common mixture toxicity models CA and IA on species sensitivity distributions: a theoretical approach. 6th SETAC World Congress 2012, Berlin (Germany), 20-24 May 2012
- MONTUELLE B., LARRAS F., RIMET F., BOUCHEZ A. (2012) Modélisation de la Distribution de Sensibilité des Espèces (SSD) pour évaluer le risque environnemental lié aux pesticides en milieu aquatique. 16^{ème} colloque du Chapitre Saint-Laurent, Québec (Canada), 7-8 June 2012 (communication)
- BOUCHEZ A., MONTUELLE B., LARRAS F., RIMET F. (2012) Use of "Species Sensitivity Distribution" for herbicides toxicity assessment on benthic diatom assemblages. International Diatom Symposium, Ghent (Belgium), 27-31 August 2012 (communication)
- RIMET F., LARRAS F., MONTUELLE B., BOUCHEZ A. (2012) Intégrer la complexité en écotoxicologie : cas de l'impact des herbicides sur les diatomées benthiques. 31st Colloque de l'Association des Diatomistes de Langue Française, Le Mans (France), 11-13 September 2012 (communication)
- GREGORIO V, CHÈVRE N, JUNGHANS M. (2012) On the appropriateness of using the common mixture toxicity models CA and IA on species sensitivity distributions: a theoretical approach. 6th SETAC World Congress 2012, Berlin (Germany), 20-24 May 2012 (communication)
- GREGORIO V, CHEVRE N, JUNGHANS M. (2012) Utilisation des modèles de mélanges pour l'évaluation du risque avec les courbes de distribution de sensibilité des espèces: approche théorique. French Society of Fundamental and Applied Ecotoxicology (SEFA) 2012 meeting, Lyon (France), 4-5 July 2012 (communication)
- GEORGESCU V., ANNEVILLE O., BOUCHEZ A. (2012) IBM model to assess the impact of mixtures of herbicides on phytoplankton communities. French Society of Fundamental and Applied Ecotoxicology (SEFA) 2012 meeting, Lyon (France), 4-5 July 2012 (poster)
- LARRAS F., GREGORIO V., MONTUELLE B., BOUCHEZ A., CHÈVRE N. (2013) Are threshold derived from specific species sensitivity distributions protective for benthic diatom assemblage? the case of a four herbicides mixture. 23rd SETAC Europe Annual Meeting, Glasgow

	(UK), 12-16 May 2013 (communication) BOUCHEZ A., LARRAS F., RIMET F., MONTUELLE B. (2013) Modélisation de la distribution de sensibilité des espèces (SSD) pour évaluer le risque environnemental lié aux pesticides en milieu aquatique. 32 nd Colloque de l'Association des Diatomistes de Langue Française, Thonon (France), 16-18 September 2013. (communication)
Participations futures à des colloques	
	THESES
Thèses passées	Floriane LARRAS L'approche de modélisation SSD (Species Sensitivity Distributions) appliquée à l'évaluation du risque des herbicides pour les diatomées benthiques : éléments d'amélioration et pertinence écologique. (thèse soutenue le 26/11/2013, INRA, U.de Savoie)
Thèses en cours	Vincent GREGORIO Modélisation des effets des mélanges et conséquences sur la prédiction du risque. (thèse en cours, soutenance prévue le 17/04/2014, UNI Lausanne, CH)
	ARTICLES DE VALORISATION-VULGARISATION
Articles de valorisation parus	
Articles de valorisation à paraître	
Articles de valorisation prévus	
	AUTRES ACTIONS VERS LES MEDIAS
Actions vers les médias (interviews...) effectuées	
Actions vers les médias prévues	
	ENSEIGNEMENT - FORMATION
Enseignements/formations dispensés	
Enseignements/formations prévus	
	EXPERTISES
Expertises menées	
Expertises en cours	
Expertises prévues	
	METHODOLOGIES (GUIDES...)
méthodologies produites	
méthodologies en cours d'élaboration	
méthodologies prévues	
	AUTRES
Précisez...	

RESUMES

En français

RESUME

Contexte

De nombreux écosystèmes aquatiques font l'objet d'une pollution diffuse par des mélanges de contaminants en provenance de leurs bassins versants. Les milieux aquatiques sont le réceptacle final de tous les ruissellements et les flux de pesticides qui en résultent peuvent avoir des conséquences marquées sur les communautés, en terme de diversité et de fonction. Parmi eux, les lacs sont d'importantes masses d'eau qui collectent et diluent fortement ces contaminants parmi lesquels de plus en plus de substances chimiques différentes sont désormais détectées. Dans ce contexte, Il est nécessaire d'améliorer les méthodes d'évaluation du risque en tenant compte des mélanges et des faibles doses. De plus, les prédictions d'évaluation du risque ont rarement été confrontées à des données de terrain à l'échelle des communautés alors même qu'une telle évaluation est cruciale pour (i) améliorer l'évaluation du risque et (ii) obtenir des outils de gestion de l'environnement robustes.

Objectifs

Dans ce contexte, le projet exploratoire IMPALAC (Prédire l'impact des herbicides en mélange et à faible concentration sur les communautés algales planctoniques et benthiques lacustres) s'est attaché à établir des liens entre l'évaluation des impacts des mélanges d'herbicides et la prédiction du risque de façon notamment à tester différents modèles de prédiction du risque des mélanges sur les communautés algales. Ce projet s'articule en 3 parties : 1/ approche *a priori* : enrichissement des modèles de prédiction de risque par des bioessais en laboratoire, 2/ approche *a posteriori* : évaluation des effets des mélanges au niveau spécifique (souches algales) et sur les communautés par des approches expérimentales et de terrain, et 3/ confrontation des deux approches d'évaluation « *a priori* » et « *a posteriori* » : évaluation des écarts aux modèles et de l'efficacité des modèles dans une démarche de prédiction du risque.

Méthodologie

Le lac Léman présente depuis de nombreuses années une contamination en pesticides en lien avec une activité viticole et la présence d'industries de production de ces molécules. Nous nous sommes attachés à étudier les impacts sur les communautés algales caractéristiques des écosystèmes lacustres, celles rencontrées dans la colonne d'eau (communautés planctoniques) et celles rencontrées en zone littorale formant des biofilms (communautés benthiques). Nous avons concentré notre attention sur les herbicides, pesticides les plus fréquemment détectés dans les eaux de surface et dont les effets sont communément observés sur les espèces non-cibles que sont les communautés algales. Enfin pour la prédiction du risque, nous utilisons les courbes de distribution de sensibilité des espèces (Species Sensitivity Distribution; SSD) qui permettent de dériver des seuils protecteurs ou "Hazardous Concentrations" (HCs). Pour la prédiction du risque des

mélanges, nous avons utilisé les modèles toxicologiques CA et RA qui décrivent les effets de mélanges de substances chimiques sans interactions entre elles. Le projet IMPALAC s'est articulé en 3 phases à travers un changement d'échelle progressif destiné à valider du bioessais à l'environnement les outils d'évaluation de risque.

Principaux résultats obtenus

Trois bases de données de sensibilité aux herbicides ont été construites, en s'attachant à utiliser des bioessais fiables et homogènes (même conditions d'obtention), sur un nombre important d'espèces (au moins 10) représentatives de la biodiversité des milieux à protéger. Ces données de sensibilité intègrent ainsi une meilleure représentativité environnementale dans des conditions standardisées et comparables permettant de modéliser des SSD et d'en dériver des seuils protecteurs (HC). Cependant, même si ces tests sont des outils utiles pour évaluer la toxicité des produits chimiques de base et sont nécessaires pour les processus d'évaluation de risque, ils représentent mal la réalité environnementale.

Les seuils extrapolés à partir de ces bases de données révèlent que les communautés de diatomées pourraient être affectées par les concentrations régulièrement rencontrées dans les environnements aquatiques. Pour les diatomées, le biofilm présente un effet protecteur contre les herbicides qui a tendance à diminuer avec l'augmentation de l'hydrophobie des herbicides.

Pour évaluer le risque des mélanges, nous avons montré que l'utilisation des modèles CA ou RA sur les courbes SSD pour calculer un risque a tendance à surestimer la toxicité du mélange, surestimation accentuée quand le nombre de substances augmente.

Nous nous sommes intéressés à l'influence de 2 paramètres environnementaux (température, saison) sur la dynamique et la composition de ces communautés, sur leur sensibilité aux herbicides. Ces deux facteurs influencent la sensibilité des communautés aux mélanges.

L'analyse des données environnementales du Léman (2004 à 2009) permet de conclure que la toxicité du mélange d'herbicides est un facteur clé pour expliquer les changements d'abondance du phytoplancton dans le Léman.

Enfin, chaque niveau d'observation, du bioessai mono-spécifique aux approches environnementales, a révélé l'importance d'introduire de l'écologie et du réalisme environnementale dans la démarche de prédiction de risque pour réconcilier approches a priori et a posteriori.

Sorties opérationnelles pour décideurs, applications éventuelles

Dans l'attente de SSD adaptées, nos résultats soulignent l'intérêt encore actuel d'utiliser des facteurs d'évaluation ("assessment factors" pour dériver les PNEC) en évaluation du risque *a priori* pour contrebalancer les variations environnementales. Pour utiliser les SSD en évaluation du risque, il est utile d'améliorer leur réalisme écologique. Par exemple en utilisant des espèces présentes dans le milieu, et notamment les plus sensibles au cours des différentes saisons pour permettre de dériver des seuils de protection efficaces tout au long de l'année.

L'approche d'évaluation réalisée sur le lac Léman et sur le Rhône indique qu'en termes de management, il est important de réduire les quantités de chacune des substances qui entrent dans l'environnement.

Recommandations

Dans un contexte d'évaluation du risque des herbicides, l'intégration des co-effets des paramètres environnementaux (température, lumière, et éléments nutritifs) qui influent sur la dynamique, la structure et la composition de la communauté des microalgues semble être cruciale pour améliorer la pertinence environnementale de modèles et des seuils de qualité. L'évaluation de l'effet des herbicides doit prendre en compte cette spécificité environnementale qui module la toxicité.

MOTS CLES

pesticides, communautés microalgales, biofilms, impacts, prédiction du risque, courbes SSD

ABSTRACT**Context**

Many aquatic ecosystems are submitted to diffuse pollution by mixtures of contaminants from their watersheds. Aquatic environments are the ultimate repository of all runoff and the resulting flow of pesticides can have marked consequences on communities, in terms of diversity and function. Among them, the lakes are important water bodies that collect and strongly dilute these contaminants including more and more different chemicals that are now detected. In this context, it is necessary to improve the methods of risk assessment taking into account mixtures and low doses. In addition, risk assessment has rarely been confronted with field data to the community level even though such assessment is crucial to (i) improve risk assessment and (ii) obtain robust tools for environmental management.

Objectives

In this context, the IMPALAC exploratory project (Predicting the impact of herbicide mixtures and low concentration on lake planktonic and benthic algal communities) has sought to establish links between the assessment of impacts of herbicide mixtures and risk assessment, particularly so as to test different models of risk assessment of mixtures on algal communities. This project is divided into 3 parts: 1 / a priori approaches : enrichment of models predicting risk by laboratory bioassays, 2 / a posteriori approach: assessing the effects of mixtures at the specific (algal strains) and community levels by experimental and field approaches, and 3 / confrontation of the two assessment approaches "a priori" and "a posteriori": gap assessment and effectiveness of models in a process of risk assessment.

Methodology

Lake Geneva for many years has a pesticide contamination in connection with a winyards and the presence of industrial production of these molecules. We studied the impacts on algal communities characteristics of lake ecosystems, those found in the water column (plankton communities) and those encountered in coastal areas forming biofilms (benthic communities). We focused our attention on herbicides, the most frequently detected pesticides in surface waters and whose effects are commonly observed in non-target species such as algal communities. Finally for risk assessment, we used the curves of species sensitivity distribution (SSD) from which can be derived protective thresholds or " Hazardous Concentrations " (HC). For assessing the risk of mixtures, we used the CA and RA toxicological models that describe the effects of mixtures of chemicals without interactions between them. The IMPALAC project is divided into 3 phases through a gradual change of scale to validate bioassays of environmental assessment tools for risk.

Main results

Three databases of sensitivity to herbicides were built, with a focus on using reliable and consistent bioassays (same conditions), a large number of species (at least 10) representative of the biodiversity of environments to be protected. These sensitivity

data include a better environmental representation, together with standardized and comparable conditions, in order to model SSD and derive protective thresholds (HC). However, although these tests are useful tools for evaluating the toxicity of chemicals and are necessary for the process of risk assessment, they misrepresent the environmental reality. Thresholds extrapolated from these databases show that diatom communities may be affected by the concentrations commonly encountered in aquatic environments. For diatoms, the biofilm has a protective effect against herbicides which tends to decrease with increasing hydrophobicity of herbicides. To assess the risk of mixtures, we have shown that the use of CA or RA models on the SSD curves to calculate a risk tends to overestimate the toxicity of the mixture, overestimation which is pronounced when the number of substances increases. We looked at the influence of two environmental parameters (temperature, season) on the dynamics and composition of these communities, their sensitivity to herbicides. Both factors influence the sensitivity of communities to mixtures.

The analysis of environmental data from lake Geneva (2004 to 2009) led us to conclude that the toxicity of the herbicide mixture is a key factor in explaining changes in the abundance of phytoplankton in Lake Geneva. Finally, each level of observation, from mono-specific bioassay to environmental approaches, revealed the importance of introducing ecology and environmental realism in the process of risk assessment, in order to reconcile a priori and a posteriori approaches.

Applications for public policies

Pending fully adapted SSD, our results highlight the current interest to still use assessment factors in risk assessment to counteract this environmental variations. To use the SSD in risk assessment, it is useful to improve their ecological realism. For example using species that are present in the environment, including the most sensitive ones during different seasons to allow to derive protection thresholds efficient throughout the year.

The evaluation approach of mixtures risk carried out at Lake Geneva and the Rhone indicates that in terms of management, it is important to reduce the amount of each substance entering the environment.

Recommendations

In a context of risk assessment of herbicides, the integration of co-effects of environmental parameters (temperature, light, and nutrients) that influence the dynamics, structure and composition of microalgae communities seems to be crucial for improving the environmental relevance of models and the quality of thresholds. The evaluation of the effect of herbicides has to take into account this environmental specificity modulating toxicity.

KEY WORDS

pesticides, microalgae communities, biofilms, impacts, risk assessment, SSD curves