

Rapport scientifique



ERICOR Evaluation du risque « pesticides » pour les récifs coralliens de La Réunion

Programme "Evaluation et réduction des risques liés à l'utilisation des pesticides"

Jean TURQUET, ARVAM, Agence pour la Recherche et la Valorisation Marines

Françoise QUINIOU et Sabine STACHOWSKI-HABERKORN, IFREMER - Laboratoire
d'Ecotoxicologie - Département Biogéochimie et Ecotoxicologie

Régis DELESMONT, IPL Santé Environnement Durables Nord - Laboratoire Littoral

Gaël DURAND, IDHESA Bretagne Océane, Institut départemental d'analyses, de
conseil et d'expertise en hygiène alimentaire, eau et environnement et santé animale



Participants au projet : remerciements collaborateurs



Jean TURQUET, Fabien TONA, Matthieu LAJEUNESSE, Harold CAMBERT, Aurélie VION, Morgane HUBERT, Matthieu DUSSAUZE, Fanette BARRAQUET, Jean Pascal QUOD.

ARVAM, Agence pour la Recherche et la Valorisation Marines
C/o CYROI, 2 rue Maxime Rivière, 97490, Sainte Clotilde, La Réunion
Tél., 02 62 93 88 10, Fax, 02 62 28 08 81, Mél : jean.turquet@arvam.com

Collaborations réunionnaises :

ARDA : Frédéric GAUMET, Nicolas MACE, Pierre BOSC.

AQUARIUM de La Réunion : Patrick DURVILLE, Thierry MULOCHEUX, Sophie DURVILLE.



Françoise QUINIOU, Sabine STACHOWSKI-HABERKORN, Geneviève ARZUL, Romain DAVY, Alban VIAUD

IFREMER - Laboratoire d'Ecotoxicologie - Département Biogéochimie et Ecotoxicologie

Centre de Brest, BP 70

29 280 Plouzané

Tél., 02 98 22 44 67

Mél : Francoise.Quiniou@ifremer.fr,

Sabine.Stachowski.Haberkorn@ifremer.fr



Régis DELESMONT, Edith DELESMONT

Institut Pasteur de Lille - Laboratoire du Littoral

IPL Santé, Environnement Durables Nord, Laboratoire Littoral.

Route du Grand Colombier - 59820 Gravelines

Tél. : 03 28 24 55 44

Fax. : 03 28 23 09 47

Mel : regis.delesmont@ipl-groupe.fr



Gaël DURAND, Gwendolina LIMON,

IDHESA Bretagne Océane, Institut départemental d'analyses, de conseil et d'expertise en hygiène alimentaire, eau et environnement et santé animale.

Technopôle Brest-Iroise, B.P. 52, 120 avenue Alexis de Rochon, 29 280 Plouzané, tel : 02 98 34 11 00, Fax : 02 98 34 11 01, Mel : gael.durand@idhesa.fr

Glossaire

Additivité : phénomène par lequel l'exposition simultanée d'un organisme à deux toxiques différents se traduit par l'addition de la nocivité des deux substances concernées.

Adjuvant : substance ou groupe de substances autres que l'ingrédient actif ajouté intentionnellement à celui-ci afin d'améliorer ses propriétés physiques (par exemple, indice de pulvérisation, solubilité, pouvoir d'étalement et stabilité), chimiques ou biologiques. Contrairement aux ingrédients actifs, les produits de formulation qui entrent dans la composition d'un produit commercial ne sont pas inscrits sur son étiquette.

Antagonisme : phénomène par lequel l'exposition simultanée d'un organisme à deux toxiques différents se traduit par une neutralisation ou une atténuation de la nocivité de l'une ou des deux substances concernées. En d'autres termes, deux facteurs en combinaison ont un effet moindre que la somme de leurs effets attendus.

DCE : Directive Cadre Européenne sur l'Eau (n°2000/60/CE). Elle a été adoptée le 22 décembre 2000 et transposée en droit français le 6 avril 2004. Elle fixe des objectifs de qualité pour tous les types d'eau (surface, souterraine, côtière, estuaire, plan d'eau, naturel ou artificiel) à l'horizon 2015.

CEx (CLx) : concentration efficace (létale) qui entraîne une réduction du paramètre mesuré (mortalité) de X% par rapport à un témoin.

CSEO (Concentration Sans Effet Observé) ou NOEC (No Observed Effect Concentration) : plus forte concentration testée pour laquelle le résultat n'est pas significativement différent de celui obtenu pour les témoins (lorsque des analyses statistiques sont réalisées ; sinon, c'est la concentration la plus forte pour laquelle 10% d'effets ou moins sont observés (CE₁₀)).

Formulation commerciale : contient la ou les substances actives ainsi que les adjuvants.

LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) : plus faible concentration testée pour laquelle un effet de plus de 10% est observé (lorsque les analyses statistiques sont réalisées ; sinon, la LOEC correspond à un pourcentage d'effets compris entre 20 et 30%).

NOEC : voir CSEO

NQE : normes de qualité environnementale pour les substances prioritaires et certains autres polluants listés dans la DCE. Ces limites portent sur des concentrations maximales admissibles en cas de pics de pollution, ainsi que sur des valeurs moyennes annuelles. Ces normes de qualité se focalisent majoritairement à la qualité des eaux de surface, et sont déterminées à partir de PNEC (Concentrations prédites sans effets).

Substance active : substance ou micro-organisme (y compris les virus) exerçant une action générale ou spécifique sur les organismes nuisibles ou sur les végétaux, parties de végétaux ou produits végétaux (Directive n°91/414/CEE du 15 juillet 1991).

Synergie : phénomène par lequel l'exposition d'un organisme à plusieurs substances appliquées simultanément se traduit par un effet supérieur à la somme des effets de ces substances appliquées séparément.

Sommaire

1. Introduction	8
2. Contexte	10
3. Les pesticides	13
3.1. Les pesticides dans les différents milieux	13
3.2. Le choix des molécules	19
3.3. Etude bibliographique	20
4. Essais sur les organismes marins	21
4.1. Les différents bioessais mis en œuvre	21
4.2. Préparation des produits et dosages	21
4.2.1. <i>Mise en œuvre des produits</i>	21
4.2.2. <i>Contrôle des concentrations</i>	23
5. Essais Phytoplancton	29
5.1. Mise au point des modèles tropicaux	29
5.1.1. <i>Les diatomées</i>	29
5.1.2. <i>Les zooxanthelles</i>	29
5.1.3. <i>Le protocole mis au point</i>	31
5.1.4. <i>Contrôle Qualité</i>	32
5.2. Le modèle tempéré	34
5.2.1. <i>Méthode :</i>	34
5.2.2. <i>Contrôle Qualité</i>	35
5.3. Résultats	35
5.3.1. <i>Sur le modèle tempéré</i>	35
5.3.2. <i>Sur les modèles tropicaux</i>	37
5.3.3. <i>Synthèse</i>	39
6. Echinodermes : Oursin	41
6.1. Mise au point du modèle tropical	41
6.1.1. <i>Le protocole mis au point</i>	41
6.1.2. <i>Contrôle qualité</i>	42
6.2. Le modèle tempéré	44
6.2.1. <i>Méthode</i>	44
6.3. Résultats	48
6.3.1. <i>Sur le modèle tempéré</i>	48
6.3.2. <i>Sur les modèles tropicaux</i>	48
6.3.3. <i>Synthèse</i>	50
7. Mollusques	52
7.1. Mise au point du modèle tropical	52
7.2. Le modèle tempéré	53
7.2.1. <i>Méthode</i>	53
7.2.2. <i>Contrôle qualité</i>	54
7.2.3. <i>Résultats</i>	55

8. Crustacés	57
8.1. Mise au point du modèle tropical	57
8.2. Le modèle tempéré	57
8.2.1. <i>Méthode</i>	57
8.2.2. <i>Contrôle qualité :</i>	58
8.2.3. <i>Résultats :</i>	58
9. Corail	61
9.1. Mise au point du modèle	61
9.2. Le protocole mis au point.	63
9.2.1. <i>Contrôle qualité</i>	64
9.3. Résultats	67
9.3.1. <i>Le sulfate de Cuivre</i>	67
9.3.2. <i>Les pesticides du programme</i>	67
10. Poissons	69
10.1. Mise au point du modèle tropical	69
10.1.1. <i>Le protocole mis au point</i>	70
10.1.2. <i>Contrôle qualité</i>	71
10.2. Le modèle tempéré	71
10.2.1. <i>Méthode</i>	71
10.2.2. <i>Contrôle qualité</i>	72
10.3. Résultats	73
10.3.1. <i>Sur le modèle tempéré</i>	73
10.3.2. <i>Sur le modèle tropical</i>	74
10.3.3. <i>Synthèse</i>	75
11. Synthèse	77
11.1. Les différents modèles toxicologique testés	79
11.2. Caractérisation du danger des substances actives	81
11.2.1. <i>Le carbendazime</i>	81
11.2.2. <i>Le diuron</i>	85
11.2.3. <i>Le glyphosate</i>	89
11.2.4. <i>Le métolachlore</i>	92
11.2.5. <i>Le carbofuran</i>	94
11.2.6. <i>La deltaméthrine</i>	96
12. Conclusion - perspectives	99
Références	103
<u>Annexe 1 : Tableaux de synthèse par pesticides</u>	
<u>Annexe 2 : Méthode pour l'analyse des pesticides</u>	
<u>Annexe 3 : Valorisation</u>	
<u>Annexe : partie confidentielle</u>	

Tableaux :

Tableau 1 : Identification des substances phytosanitaires importées sur l'île de La Réunion en 2003, 2005 et 2006 (données DAF – SPV). Les substances sont classées par ordre d'importance à l'importation dans l'île, (en gras ont été détectées en eau douce, celles en bleu en milieu marin).	14
Tableau 2 : Pesticides détectés dans les matrices animales prélevées entre 2003 et 2008 autour de La Réunion (modioles, oursins, poissons, ...).	15
Tableau 3 : Pesticides détectés dans les sédiments prélevés entre 2006 et 2007 autour de l'île de La Réunion (Programme CARTOMAR).	16
Tableau 4 : Pesticides détectés dans les eaux côtières par SBSE et POCIS entre 2008 et 2009 à La Réunion (Gonzalez et al., 2009).	16
Tableau 5 : Pesticides détectés dans les eaux douces (superficielles et souterraines) entre 2000 et 2007 à la Réunion (Données DRASS, OLE).	17
Tableau 6 : Données du réseau de l'OLE et du réseau de la DRASS mesurées en rivière pour l'année 2008 ($\mu\text{g/L}$).	17
Tableau 7 : Concentrations mesurées ($\mu\text{g/L}$) en produits antialgues des différents ports de La Réunion (* sont des produits de dégradation du diuron).	18
Tableau 8 : Pesticides sélectionnés dans le cadre du programme ERICOR.	19
Tableau 9 : Les bioessais réalisés dans le cadre du programme ERICOR	21
Tableau 10 : Liste des produits et préparation des solutions mères.	22
Tableau 11 : Composition (en g/L) de l'eau de mer synthétique de Zarogian (1969).	23
Tableau 12 : Correspondance des concentrations nominales et des concentrations effectivement testées pour chaque substance, exprimées en $\mu\text{g/L}$ (Ifremer pour oursin).	25
Tableau 13 : Résultats des dosages réalisés sur les solutions mères	25
Tableau 14 : Correspondance des concentrations nominales et des concentrations effectivement testées pour chaque substance, exprimées en $\mu\text{g/L}$ (ARVAM pour essais phytoplancton et poisson).	26
Tableau 15 : Correspondance des concentrations nominales et des concentrations effectivement testées pour chaque substance, exprimées en $\mu\text{g/L}$; en gras valeurs des dosages ; (ARVAM pour essais oursin).	26
Tableau 16 : Correspondance des concentrations nominales et des concentrations effectivement testées pour chaque substance, exprimées en $\mu\text{g/L}$ (ARVAM pour essais corail)	28
Tableau 17 : <i>Navicula</i> sp. (D007), CE_{50} obtenues avec du bichromate de potassium ($K_2CR_2O_7$). IC : Intervalle de confiance à 95 %.	33
Tableau 18 : <i>Symbiodinium</i> sp. (ZX02), CE_{50} obtenues avec du bichromate de potassium ($K_2CR_2O_7$). IC : Intervalle de confiance à 95 %.	33
Tableau 19 : Résultats comparés des essais obtenus avec du bichromate de potassium ($K_2CR_2O_7$).	34
Tableau 20 : <i>Phaeodactylum tricornutum</i> – essai avec 3-5 Dichlorophénoles	35
Tableau 21 : Pourcentage d'inhibition observée avec <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	35
Tableau 22 : Essais du diuron sur <i>Phaeodactylum tricornutum</i> .	36
Tableau 23 : Effets de cinq substances observés sur <i>Navicula</i> sp.	37
Tableau 24 : Effets observés de cinq substances sur <i>Symbiodinium</i> sp.	38
Tableau 25 : Détail des essais réalisés avec le diuron sur <i>Navicula</i> sp.	38
Tableau 26 : Détail des essais réalisés avec le diuron sur <i>Symbiodinium</i> sp.	38
Tableau 27 : pourcentages d'inhibition mesurés sur les trois organismes phytoplanctoniques testés. Valeurs exprimées en $\mu\text{g/L}$ pour des expérimentations réalisées avec n=1 à 7)	39

Tableau 28 : CSEO déterminées pour les substances testées sur les trois organismes phytoplanctoniques ($\mu\text{g/L} \pm \text{IC } 95 \%$).	39
Tableau 29 : CE_{50} et CSEO (ou CE_{10}) calculées pour les six substances testées sur <i>Paracentrotus lividus</i> .	48
Tableau 30 : CE_{50} calculées pour les six substances testées sur <i>Echinometra mathaei</i> .	49
Tableau 31 : CSEO calculées pour les six substances testées sur <i>Echinometra mathaei</i> .	50
Tableau 32 : Effets obtenus des pesticides sur le développement embryo-larvaire des deux espèces d'oursin testées (CE_{50} et valeurs maximales sans effet sont exprimées en $\mu\text{g/L} \pm \text{IC } 95 \%$; $n = 3$ à 10).	50
Tableau 33 : <i>Crassostrea gigas</i> – essai avec le sulfate de cuivre, les CE_{50} sont donnés pour l'ion Cu.	54
Tableau 34 : Essais larves de <i>Crassostrea gigas</i> avec trois substances	55
Tableau 35 : Essais larves de <i>Crassostrea gigas</i> avec S-métolachlore	55
Tableau 36 : Essais larves de <i>Crassostrea gigas</i> avec Carbendazime	56
Tableau 37 : Essais larves de <i>Crassostrea gigas</i> avec glyphosate	56
Tableau 38 : <i>Acartia tonsa</i> – essai avec 3-5 Dichlorophénol	58
Tableau 39 : Essais <i>Acartia tonsa</i> avec trois substances	59
Tableau 40 : Essais <i>Acartia tonsa</i> avec S-métolachlore	59
Tableau 41 : Essais <i>Acartia tonsa</i> avec carbofuran	59
Tableau 42 : Essais <i>Acartia tonsa</i> avec Deltaméthrine	60
Tableau 43 : Corail : <i>Pocillopora</i> – essai avec Sulfate de Cuivre	65
Tableau 44 : Résultats des essais réalisés avec les pesticides du programme.	68
Tableau 45 : Embryons vésiculés d'ombrine – essai avec le cuivre.	71
Tableau 46 : Embryons vésiculés de bar – essai avec l'ion cuivre.	72
Tableau 47 : Embryons vésiculés de bar – essai avec 3-5 Dichlorophénol	72
Tableau 48 : Embryons vésiculés de bar – essais avec 4 substances	73
Tableau 49 : Embryons vésiculés de bar – essais avec le Carbofuran	73
Tableau 50 : Embryons vésiculés de bar – essais avec la deltaméthrine	74
Tableau 51 : CE_{50} calculées pour les deux substances testées sur <i>Sciaenops ocellatus</i>	74
Tableau 52 : CSEO calculées pour les six substances testées sur <i>Sciaenops ocellatus</i>	75
Tableau 53 : Effets obtenus des pesticides sur les embryons de poissons des deux espèces ciblées : concentrations sans effet et/ou CE_{50} exprimées en $\mu\text{g/L}$	75
Tableau 54 : Résultats comparés des essais embryons de poissons obtenus avec du sulfate de cuivre.	76
Tableau 55 : CE_{50} déterminées dans le programme ERICOR (en bleu pale : les espèces tempérées).	77
Tableau 56 : CSEO déterminées dans le programme ERICOR	78
Tableau 57 : Synthèse des données issues de la littérature pour le diuron.	85
Tableau 58 : Synthèse des données issues de la littérature pour le glyphosate.	89
Tableau 59 : Synthèse des données issues de la littérature pour le carbofuran.	94
Tableau 60 : Synthèse des données issues de la littérature pour la deltaméthrine.	96

Figures :

Figure 1 : Corrélation entre concentrations visées et concentrations nominales en deltaméthrine dans une série d'eau de mer synthétique. _____	24
Figure 2 : Evolution des concentrations des différents produits sur 96 h dans les conditions expérimentales de l'essai Corail. _____	27
Figure 3 : <i>Navicula</i> sp. (souche D007) (x400), Photo ARVAM _____	29
Figure 4 : (a) vue à la loupe binoculaire d'une bouture de corail (<i>Pocillopora meandrina</i>), dont les tissus sont riches en zooxanthelles, (b) souche de zooxanthelle en culture (x400). _____	30
Figure 5 : (a) évolution de la concentration cellulaire de la souche D007 en fonction du temps et en présence de différentes concentrations en $K_2CR_2O_7$. (b) Pourcentage par rapport au témoin du taux de croissance de la souche D007 en présence de différentes concentrations en $K_2CR_2O_7$. _____	32
Figure 6 : (a) évolution de la concentration cellulaire de la souche de <i>Symbyodinium</i> sp. ZX02 en fonction du temps et en présence de différentes concentrations en $K_2CR_2O_7$. (b) Pourcentage par rapport au témoin du taux de croissance de la souche ZX02 en présence de différentes concentrations en $K_2CR_2O_7$. _____	33
Figure 7 : <i>Phaeodactylum tricornutum</i> (photo CCAP). _____	34
Figure 8 : Exemple d'une courbe obtenue avec le diuron sur <i>Phaeodactylum tricornutum</i> _____	36
Figure 9 : Exemple d'une courbe obtenue avec le diuron sur <i>Phaeodactylum tricornutum</i> _____	37
Figure 10 : Les différentes anomalies observées au cours du développement embryo-larvaire de <i>Echinometra mathaei</i> . (a) développement normal, (b) exogastrula, (c) pluteus retardé, (d) longueur inégales des baguettes somatiques, (e) baguette somatique tordue. (Photos ARVAM) _____	43
Figure 11 : <i>Paracentrotus lividus</i> (Photo FQ- Ifremer©) _____	44
Figure 12 : Différentes anomalies du développement embryo-larvaire chez <i>Psammechinus miliaris</i> applicable pour <i>Paracentrotus lividus</i> (d'après Klöckner et al., 1985). a : stades embryonnaires (P2 en jaune) et pluteus retardés (R en orange) ; b : pluteus normal (N) ; c à h : anomalies morphologiques des plutei (P1). _____	46
Figure 13 : (a) larves pluteii normales de <i>Paracentrotus lividus</i> : longueur environ 300 μ m. (b-e) Anomalies morphologiques de plutei chez <i>paracentrotus lividus</i> : (b) spicules non jointes au sommet du pluteus, (c et d) bras antérieurs ou postérieurs déformés, (e) extrémités des spicules fourchues, (f et h) prismes anormaux, (g et h) blocage au stade embryo (Photos FQ. Ifremer©). _____	47
Figure 14 : Effet du carbendazime sur le développement embryonnaire _____	51
Figure 15 : Spécimen de <i>Pinctada margaritifera</i> dans un bain chaud à 32 °C (Photo ARVAM) _____	53
Figure 16 : Larves D normales (env. 70 μ m), (Photo IPL) _____	54
Figure 17 : <i>Acartia tonsa</i> (env. 1 mm) (Photo IPL) _____	58
Figure 18 : Colonies de <i>Pocillopora</i> fixée sur les filières. (Photos ARVAM) _____	61
Figure 19 : Conditions expérimentales de la première phase (à l'ARDA), _____	62

- Figure 20 : (a) boutures dans les puits, (b) la chambre climatique SANYO _____ 65
- Figure 21 : (a) bacs de stabulation des colonies mères, (b) les « verrues » sur une branche de *Pocillopora meandrina*, (c) découpage des « verrues », (d) boutures *in vitro* ne présentant aucun signe de stress à 96 h, (e) polypes invaginés, (f) dévagination de la poche gastro-intestinale, (g) expulsion des zooxanthelles et nécrose tissulaire. (Photos ARVAM). ____ 66
- Figure 22 : Exemple de courbe dose-réponse obtenue avec les boutures de coraux (Influence de la concentration en CuSO_4 sur la mortalité des boutures (% net de mortalité) témoins 100 % de survie. _____ 67
- Figure 23 : Ombrine tropicale (*Sciaenops ocellatus*) adulte et embryon à 48 h. (Photos : A Diringer et ARVAM) _____ 70
- Figure 24 : Embryons vésiculés de bar d'un jour (photo Ecloserie Aquanord)rd) _____ 72

1. INTRODUCTION

Les produits phytosanitaires sont employés de façon courante (et en quantité croissante) à La Réunion depuis des années. Le problème du risque environnemental lié à l'utilisation de pesticides doit être analysé de façon globale dans un contexte plus ample d'usages multiples de phytosanitaires sur la durée, et ce, dans un contexte d'environnement tropical.

Par ailleurs, La Réunion a été touchée entre 2004 et 2006 par une épidémie de Chikungunya, virus transmis à l'homme par un moustique du genre *Aedes* (*Aedes albopictus*). Pour lutter contre cette maladie, la pulvérisation d'insecticides adulticide et larvicide a été effectuée massivement dans les quartiers habités touchés par le virus et dans les ravines. La stratégie de lutte a comporté l'utilisation de plusieurs molécules, dans un premier temps le fénitrothion (adulticide) et le téméphos (larvicide), remplacées en début d'année 2006 par la deltaméthrine (adulticide) et le BTi (larvicide). A ce jour, la Lutte Anti Vectorielle (LAV) s'est allégée, se concentrant sur des traitements ciblés sur des quartiers à risque ou les ravines.

Les dangers de ces molécules pour l'environnement marin et *a fortiori* récifal sont sous documentés, voire méconnus ; quant aux expositions, elles sont quasi totalement inconnues (évaluées par des modèles). Les impacts potentiels de ces molécules rendent nécessaire la mise en place, de manière urgente, d'une évaluation du risque sur les écosystèmes sensibles que sont les récifs coralliens et l'environnement côtier des îles dans les régions tropicales. Cette évaluation du risque écotoxicologique associée à l'exposition des récifs coralliens à des polluants toxiques constitue une démarche essentielle à la mise en œuvre de mesures de prévention et de protection des écosystèmes.

Cette évaluation implique plusieurs démarches complémentaires, en particulier :

- la connaissance des effets de ces produits phytosanitaires sur les organismes marins et plus spécifiquement les peuplements récifaux ;
- la connaissance du degré de pollusensibilité des espèces récifales majeures ;
- la connaissance de l'exposition des peuplements récifaux aux produits employés à La Réunion ;
- la surveillance de l'environnement marin récifal, par l'analyse de la contamination des différents compartiments (eau, sédiments, organismes dominants) par les molécules de pesticides.

C'est en 2003 que les prémices d'un réseau de surveillance ont été mis en place, par le MEDD (DIREN Réunion), au travers d'un programme de Recherche/Développement portant sur la mise au point d'outils de mesure des micropolluants en zone côtière. Ainsi le programme « modiole » vise à adapter le modèle RNO métropolitain sur la moule, au contexte réunionnais par l'utilisation de *Modiolus auriculatus* comme bio-intégrateur de pollution. Les résultats de ce programme ont permis de disposer d'une première « photographie » de la qualité des eaux côtières de l'île. En complément, des opérations de mesure des contaminants dans les sédiments et dans les matrices animales ont aussi été menées afin de disposer d'un début de référentiel, mais aussi d'éléments pertinents dans le cadre de suivi de la lutte anti-vectorielle (LAV) en milieu marin côtier (Turquet *et al.*, 2005, 2006a et b).

L'analyse de la contamination de la zone côtière de La Réunion dans le cadre spécifique du Chikungunya est effective depuis février 2006. Elle vise essentiellement à étudier la présence et le comportement des produits utilisés dans la lutte anti-vectorielle (LAV) en milieu marin côtier. La première campagne de mesure sur différents sites en aval des zones de traitement a montré l'absence de trace des produits utilisés pour la LAV, cependant

d'autres molécules comme le Fipronil¹ et ses dérivés ont été détectés dans plusieurs sites, en relation avec des épisodes de fortes pluies.

En effet, le contexte climatique de La Réunion, par l'intensité de ses précipitations (pluviosité élevée), ainsi que les caractéristiques géologiques de l'île (reliefs accidentés) sont responsables de phénomènes érosifs considérables et d'un ruissellement important qui rend particulièrement vulnérables les milieux récepteurs proches. Les temps de transferts entre les surfaces cultivées, les rivières et le littoral sont plus longs via les eaux souterraines.

La surveillance de l'environnement marin récifal, par l'analyse de la contamination des différents compartiments (eau, sédiments, organismes dominants) par les polluants toxiques est donc dans sa phase finale de mise en œuvre opérationnelle. Ainsi les premiers résultats obtenus, permettront d'identifier les molécules présentes dans le milieu côtier réunionnais.

Cependant il manque les évaluations du degré de polluosensibilité et des effets de l'exposition aux pesticides qui restent très peu documentées à ce jour dans le contexte tropical (Ramade et Roche, 2006). Les recommandations émises par les experts écotoxicologues mandatés par le MEDD pour la lutte contre le Chikungunya, insistent sur la nécessité de mettre en place des études complémentaires aux analyses de la contamination chimique (E. Thybaud de l'INERIS et M. Echaubard, de la Commission Faune du CNPN *in* rapport du COMITÉ SCIENTIFIQUE « CHIKUNGUNYA – Impact sur l'environnement » - Réunion du 24/02/2006).

L'usage des biomarqueurs d'exposition et/ou d'effets constitue par ailleurs un instrument utile, voire indispensable, dans la surveillance écotoxicologique et l'évaluation du risque d'un polluant pour les populations et les peuplements. Jusqu'à présent, il n'existe que très peu de recherches sur la détection et *a fortiori* la validation et le calibrage de biomarqueurs dans des biocœnoses récifales (Ramade et Roche, 2006). Une première approche a été initiée en Martinique par l'Ifremer dans le cadre d'un bilan ponctuel effectué en 2002 afin de mieux caractériser la contamination du milieu marin par le chlordécone (Bocquené *et al.*, 2002). A La Réunion, l'usage des biomarqueurs devait être initié dans le cadre du projet EnviroCHIK (présenté à l'ANR en mai 2006), comme outil complémentaire d'évaluation de l'exposition aux polluants, malheureusement le projet n'a pas été retenu, ni suivi.

Le présent projet porte essentiellement sur les évaluations du degré de polluosensibilité des organismes dominants, et/ou d'importance écologique pour l'écosystème récifal.

Ainsi les résultats attendus portaient sur trois niveaux d'action :

- mettre au point des bioessais spécifiques au contexte tropical pour la recherche de toxicité des pesticides utilisés localement ;
- compléter l'évaluation de la toxicité des principales molécules utilisées localement par des tests sur des organismes récifaux ;
- disposer d'outils adaptés au niveau local pour l'analyse du risque en cas de crise aiguë et de gestion des pratiques agricoles en amont des zones coralliennes.

Le principal aspect innovant du programme concerne effectivement l'adaptation de bioessais existants à des espèces spécifiques aux écosystèmes coralliens.

Associé aux programmes en cours tels que les réseaux de surveillance (par l'analyse de la contamination des différents compartiments par les polluants toxiques), ce projet participe à l'évaluation du danger, de l'exposition et du risque pour les récifs coralliens.

¹ les produits de dégradation de cette molécule seraient très toxiques pour les poissons.

2. CONTEXTE

Quatre sociétés importent des produits phytosanitaires à La Réunion.

En 1998, les quantités utilisées pour les productions agricoles étaient (*Source : Enquête SPV/DAF auprès des importateurs*) : 147 tonnes d'insecticides, 74 tonnes de fongicides, 617 tonnes d'herbicides, soit un total de 838 tonnes de produits commerciaux.

En terme de pression de pesticides sur la SAU, tous produits confondus, elle s'établit à une moyenne de 19 kg/ha de produits commerciaux (838 t/ 43 692 ha), la moyenne métropolitaine étant de l'ordre de 15 kg/ha.

En 2003, ces valeurs semblent stables avec 162 tonnes d'insecticides, 57 tonnes de fongicides et 502 tonnes d'herbicides. Avec l'épidémie de Chikungunya qui a sévit en 2005-2006 ces valeurs sont maintenant en cours de réactualisation.

Ce chiffre moyen cache de grandes disparités selon les cultures :

- canne : désherbage après la coupe (juin à novembre) et avant la repousse (décembre janvier), traitement insecticide obligatoire lors de la replantation tous les 7 à 10 ans ;
- maraîchage (légumes, tubercules) : nombreux traitements toute l'année, le plus souvent en préventif ;
- agrumes : traitements herbicide, fongicide et insecticide, très peu de traitements aériens ;
- bananes : herbicides et insecticides – pas de problèmes fongiques ;
- letchis : désherbage ;
- cultures fourragères : traitement herbicide éventuel.

Les analyses réalisées par la DRASS entre 2000 et 2002 ont mis en évidence la présence de pesticides sur 19 captages d'eau souterraine, dont quatre dépassaient la norme (0,1 µg/L). Les molécules incriminées sont : le déséthyl-atrazine, le diuron, le lindane et l'hexazinone.

Ces substances chimiques commercialisées à La Réunion sont considérées comme des "substances existantes". Des substances nouvelles sont susceptibles d'être mises sur le marché. La législation européenne, depuis 1993, oblige à procéder à une évaluation des risques des substances chimiques afin d'assurer la protection de l'homme et de l'environnement. La procédure adoptée est basée sur un manuel technique d'évaluation du risque chimique commun à l'Union européenne (Technical Guidance Document ou TGD, 1992, revu en 1998 et adapté au milieu marin en 2003). Si l'on dispose d'informations sur la toxicité aiguë des substances chimiques au travers de tests d'écotoxicité basés sur des modèles biologiques tempérés (normalisés et/ou standardisés), il n'existe par contre que très peu de données sur leur toxicité sur des organismes tropicaux ni sur leurs effets chroniques (Ramade et Roche, 2006). Par ailleurs, la majorité des données pour évaluer les risques dans les milieux aquatiques provient des espèces vivant en eaux douces, ce qui laisse de très larges incertitudes pour le milieu marin et très méconnus pour les zones tropicales marines.

Le processus d'évaluation et de gestion des risques se décompose en trois phases successives : la recherche scientifique, l'évaluation des risques qui relèvent du domaine scientifique et la gestion des risques qui appartient au domaine politique. Ces trois phases interfèrent entre elles pour générer d'un côté de l'information scientifique et de l'autre des besoins de recherche. La méthodologie d'évaluation des risques comporte

fondamentalement quatre étapes : 1) Identifier ou caractériser les dangers correspondants aux propriétés intrinsèques de la substance, 2) Evaluer la relation dose-effet qui détermine l'échelle de la gravité des dangers, de l'importance des effets, 3) Evaluer l'exposition, c'est-à-dire la probabilité de contamination ou d'exposition de l'homme ou de l'environnement, 4) Evaluer le risque qui correspond à l'estimation de la gravité des effets susceptibles de se produire sur l'homme et l'environnement en fonction du danger de la substance et de l'exposition (exposition aux concentrations dans le milieu et/ou dans l'alimentation).

Face aux multiples sources de perturbations, l'approche de la toxicologie environnementale s'intègre à une démarche écologique. Aujourd'hui l'écotoxicologie propose une association de différentes méthodes autorisant un diagnostic global de l'état de stress environnemental. Ce stress intègre les effets de substances chimiques mais également les interactions de facteurs environnementaux sur différents groupes trophiques. Le stress environnemental issu des perturbations chimiques chroniques ne peut être évalué sans remonter de l'échelle moléculaire à l'échelle physiologique. L'évolution de l'écotoxicologie passe donc par l'optimisation et l'intégration de ces trois volets méthodologiques (indices biotiques, bioessais et biomarqueurs) et la recherche de nouvelles approches conceptuelles permettant d'étudier les mécanismes biologiques d'adaptations et les pathologies observables au niveau des individus et des populations.

Parmi les perspectives susceptibles de contribuer à cette évolution, deux axes de recherche ont été retenus pour relever le défi d'échelle du "moléculaire aux populations tropicales" et pour répondre aux besoins d'outils applicables en surveillance ainsi que pour l'évaluation du risque chimique :

- étude de la reprotoxicité des produits phytosanitaires chez les oursins et mollusques bivalves ;
- étude d'évaluation du risque pour les différents niveaux trophiques recommandés par le TGD marin (1998, 2003), en choisissant des espèces adaptées au contexte tropical. Les niveaux trophiques recommandés par le TGD (bactérie, phytoplancton, crustacé, mollusque, échinoderme et poisson) pourront ou pourraient être complétés par les organismes spécifiques des récifs coralliens en commençant évidemment par les coraux eux-mêmes.

La finalité de ces activités opérationnelles est de fournir aux "décideurs" les connaissances scientifiques et les outils nécessaires aux évaluations d'impact et de risques écologiques liés à la contamination chimique, afin de promouvoir la gestion durable et intégrée des ressources marines, et proposer pour l'île de La Réunion, une première série de valeurs seuils pour la DCE (2000).

Il est devenu de plus en plus évident que les récifs coralliens représentent, de loin, le type d'écosystème le plus menacé de la planète. Ils sont exposés à tous les types de dégradation d'origine anthropique en particulier au spectre complet des polluants (Salvat, 2005). L'importance de la pollution des eaux récifales par les substances chimiques et ses conséquences écotoxicologiques, quoiqu'évoquée régulièrement dans la littérature scientifique concernant la dégradation des écosystèmes coralliens, n'a jusqu'à présent donné lieu qu'à un nombre assez restreint de publications. Plus particulièrement et de façon paradoxale, très peu d'études concernent l'impact sur les coraux des produits chimiques utilisés en agriculture (Ramade et Roche, 2006).

Le blanchissement des coraux est le résultat de l'expulsion de leurs microalgues symbiotiques, de couleur brune, qui vivent dans leurs tissus, laissant apparaître leur squelette calcaire, de couleur blanche, au travers de la transparence des tissus. Le

blanchissement des coraux est un état transitoire, qui conduit souvent à la mort du corail, mais au delà duquel des récupérations sont aussi observées. Les coraux ont des capacités d'adaptation, mais celles-ci sont affaiblies par les dégradations chroniques auxquelles les coraux doivent faire face.

Plusieurs facteurs environnementaux peuvent induire le blanchissement des coraux. L'élévation de la température de l'eau de mer est le principal facteur impliqué, agissant en synergie avec l'irradiance solaire. Une baisse de salinité peut aussi provoquer un blanchissement (Coles et Brown, 2003).

Des progrès récents ont été réalisés ces dernières années dans la connaissance des effets écotoxicologiques des herbicides sur les coraux. Ces travaux ont été motivés par la découverte de contaminations de zones marines côtières tropicales en Australie par des herbicides utilisés par l'agriculture comme le diuron, ou utilisés dans les peintures anti salissure comme le diuron et l'irgarol 1051 (Scalett *et al.*, 1999 ; Connelly *et al.*, 2001). De ces études conduites récemment, il est clair que les herbicides peuvent pénétrer les tissus des coraux (en quelques minutes) et réduire le rendement photosynthétique des microalgues symbiotes. Ces dinoflagellés associés aux coraux sont donc très sensibles aux herbicides comme les autres organismes phototrophes testés, la photosynthèse peut être affectée à des concentrations extrêmement faibles (ex. partie par trillion). De par leur mode d'action (la plupart des herbicides agissent sur le photosystème PSII), il n'est pas surprenant que le paramètre le plus sensible mesuré soit la réduction de la photosynthèse des microalgues symbiotiques (voir revue de Jones 2005). Ainsi les quelques herbicides qui ont fait l'objet de recherches écotoxicologiques sur leur éventuel impact sur la fécondation et/ou la fixation des larves planula, et leur fixation ultérieure préalable à leur métamorphose en polypier, n'ont mis en évidence aucun impact sur ces processus aux concentrations auxquelles ils peuvent se rencontrer dans les eaux littorales les plus polluées par les pesticides de la Grande Barrière Australienne. Ainsi, la métamorphose des planula d'*Acropora millepora* ne commence à être significativement inhibée par le diuron qu'à des concentrations de 300 µg/L et *Pocillopora damicornis* à 1000 µg/L (Negri *et al.*, 2005).

De même un insecticide qui a été détecté, entre autres, dans les eaux côtières des zones cultivées jouxtant la grande barrière australienne, le chlorpyrifos, provoque une inhibition de 40 % de la fixation des planulas de *Pocillopora damicornis* sur un substrat d'algues calcaires encroûtantes (*Porolithon* sp.), quand il est imprégné par une eau de mer renfermant une concentration de 5 µg.L de cet insecticide (Richmond *et al.*, 1997 *in* Peters *et al.*, 1997).

Divers tests de toxicité ont été effectués sur des organismes récifaux, plus particulièrement sur des espèces très communes de coraux. Il s'imposerait en conséquence de développer des bioessais d'écotoxicité sur des organismes dominants et espèces clefs de voûte des récifs coralliens.

Une approche combinant données acquises *in situ* et application d'un modèle d'écosystème récifal permettrait de déterminer l'impact d'une pollution sur la productivité primaire et secondaire d'un récif.

Dans l'immédiat, il semble plus réaliste d'accorder la priorité au développement de tests de toxicité, aiguë et chronique sur des espèces marines de différents niveaux trophiques et à différents stades de leur vie afin de sélectionner des espèces sensibles représentatives de l'écosystème corallien (estuarien, côtier). Le véritable enjeu consistera à sélectionner des outils pertinents dont les résultats *in vitro* seront extrapolables à l'environnement *in situ*.

L'utilisation de tests basés sur la fécondation, ou encore le recrutement des larves et à leur métamorphose, plus particulièrement pour ces écophases des madrépores constitue un outil fort utile pour les recherches en écotoxicologie récifale. En effet, la plus grande pollusensibilité des jeunes écophases du cycle vital en fait des organismes sentinelles privilégiés pour la surveillance permanente de l'environnement récifal.

Par ailleurs l'utilisation d'espèces de remplacement pour des bioessais de toxicité est envisagée lorsque des espèces écologiquement importantes, propres à l'écosystème

corallien, ne peuvent pas être élevées en laboratoire, ou que leur utilisation en routine présente de trop importantes difficultés. Cette approche peut s'avérer inappropriée pour l'évaluation des effets d'exposition à long terme à de faibles concentrations de polluants et *a fortiori* pour l'extrapolation *in situ* dans des écosystèmes aussi complexes que les récifs coralliens, mais apportera des outils de comparaisons entre modèle tempéré et tropical.

3. LES PESTICIDES

3.1. Les pesticides dans les différents milieux

Les principales activités menées ont porté sur le regroupement et la synthèse des éléments existants localement pour le choix des molécules à tester. Cette sélection est essentiellement guidée par l'importance des importations, leur cible, leur persistance dans l'environnement, les premiers résultats des mesures réalisées *in situ* par les programmes de surveillance, ainsi que de leur mode d'action. Un des enjeux indirect du programme porte aussi sur la définition des molécules à suivre dans le milieu dans le cadre de la mise en place des objectifs de la DCE.

Plusieurs réunions de travail ont été réalisées avec la DIREN et le service de la Protection des Végétaux de la DAF, afin de disposer rapidement des derniers éléments sur les produits importés à La Réunion pour l'agriculture (qualité et quantité). Cependant, aucune liste validée n'a été produite à ce jour pour les données depuis 2006. La principale difficulté porte sur les codes douaniers qui englobent souvent un grand nombre de substances. Le travail ainsi fourni se fait directement avec les plus gros importateurs. A ce jour, une liste des 20 biocides d'usage agricole les plus importants a été établie pour 2003, 2004 et 2006. Les principales substances importées et utilisées sur l'île sont regroupées, dans le *Tableau 1* (données DAF/SPV). Les substances en gras sont celles qui ont été identifiées dans les eaux douces, celles en bleu dans les eaux marines.

La deuxième source d'information mobilisée est la DRASS, qui coordonne une partie de la lutte anti-vectorielle (LAV). Les données sont disponibles et à jour (ex en 2007 de janvier à octobre, 60 kg de matière active (deltaméthrine) et $3 \cdot 10^6$ UTI de BTi ont été utilisées pour la LAV par les agents de DRASS).

Ces données (DAF et DRASS) excluent de fait les importations de biocides destinées aux autres usages (domestiques, collectivités, industriels, ...).

Le Groupe Régional Phytosanitaire ne s'étant plus réuni depuis 2006, il nous apparaît de plus en plus difficile de réunir des informations complémentaires pour le choix des molécules.

Tableau 1 : Identification des substances phytosanitaires importées sur l'île de La Réunion en 2003, 2005 et 2006 (données DAF – SPV). Les substances sont classées par ordre d'importance à l'importation dans l'île, (en gras ont été détectées en eau douce, celles en bleu en milieu marin).

2003	2005	2006
2,4-d (sel de diméthylamine)	2,4-d (sel de diméthylamine)	2,4-d (sel de diméthylamine)
glyphosate (sel d'isopropylamine)	glyphosate (sel d'isopropylamine)	glyphosate (sel d'isopropylamine)
diuron	diuron	diuron
chlorate de sodium	mancozebe	2,4-d (sel d'amine)
mancozebe	asulame (sel de sodium)	mancozebe
ametryne	triclopyr (ester d'éthylène glycol butyl ether)	hexazinone
alachlore	hexazinone	asulame (sel de sodium)
asulame (sel de sodium)	diazinon	<i>bacillus thuringiensis serotype 14</i>
manebe	paraquat	triclopyr (ester d'éthylène glycol butyl ether)
triclopyr (ester d'éthylène glycol butyl ether)	s-metolachlore	soufre micronise
diazinon	soufre micronise	s-metolachlore
paraquat	2,4-d (sel d'amine)	acetochlore
2,4-d (sel d'amine)	alachlore	methomyl
hexazinone	glufosinate ammonium	paraquat
glufosinate ammonium	methomyl	diazinon
huile de vaseline	metazachlore	chlorothalonil
soufre micronise	huile de vaseline	glufosinate ammonium
civre du sulfate	chlorpyriphos-ethyl	endosulfan
acetochlore	malathion	malathion
n-phosphonométhylglycine	acetochlore	huile de vaseline

La surveillance du milieu marin littoral a permis ces dernières années l'acquisition de données qualitatives et quantitatives nouvelles pour La Réunion.

Quatre programmes spécifiques ont été mis en œuvre pour l'analyse d'échantillons prélevés dans le milieu marin côtier :

- programme MODIOLE : 2003-2008, analyses dans la chair de moule tropicale dont les derniers résultats sont disponibles depuis juin 2008 (environ 40 échantillons) ;
- programme CARTOMAR : analyse en 2005 et 2007 dans les sédiments marins prélevés tout autour de l'île (derniers résultats disponibles depuis avril 2008) (environ 70 échantillons) ;
- programme CHIK 1 : 2006, analyses sur cinq sites, de différentes matrices (poissons, oursins, moules et sédiments) ;
- programme CHIK 2 : analyses hebdomadaires sur deux bassins versants (eau de mer, oursin, sédiments) pendant six mois ;

- programme PEPS 2010 : Pré étude Echantillonnage Passif pour la Surveillance de la contamination chimique. Etude IFREMER/ARVAM/CEDRE/Université Bordeaux 1.

Ainsi, il ressort de ces différents programmes la présence de pesticides dans le milieu marin côtier.

Les analyses faites sur les différentes matrices biologiques ont permis de détecter 19 molécules différentes au cours des différents suivis (Tableau 2).

Tableau 2 : Pesticides détectés dans les matrices animales prélevées entre 2003 et 2008 autour de La Réunion (modioles, oursins, poissons, ...).

Molécules détectées	Nombre d'analyses	% de détection	Maximum (µg/kg sec)	Minimum (µg/kg sec)
DDD op'	98	4,1	2,2	1,5
DDD pp'	98	2,0	1,5	1,1
DDE op'	87	1,1	1,5	1,5
DDE pp'	98	13,3	3,5	1
DDT op'	98	2,0	1,4	1,1
DDT pp'	98	6,1	4,1	1
deltaméthrine	98	1,0	11	11
diazinon	74	1,4	46,4	46,4
endosulfan alpha	98	18,4	10	1
endosulfan beta	98	17,3	14	1,2
endosulfan sulfate	24	20,8	8,3	5,1
fipronil sulfide	98	2,0	15	13
fipronil disulfenil	98	7,1	28	10
gamma HCH (Lindane)	96	1,0	7,6	7,6
isoproturon	77	1,3	6,8	6,8
métolachlore	24	12,5	20	14,9
isodrine	8	50,0	2,7	2,2
dieldrine	8	12,5	2,4	2,4
fluroxypyr	8	25,0	34,5	34,5

Dans les sédiments marins, les molécules détectées sont moins nombreuses, qualitativement trois nouvelles molécules y ont été identifiées (chlorpyrifos éthyl, folpet et pyrimiphos méthyl) (Tableau 3).

Tableau 3 : Pesticides détectés dans les sédiments prélevés entre 2006 et 2007 autour de l'île de La Réunion (Programme CARTOMAR).

Molécules détectées	Nombre d'analyses	% de détection	Maximum (µg/kg sec)	Minimum (µg/kg sec)
chlorpyrifos éthyl	68	1,5	8,3	8,3
DDD pp'	68	2,9	6,5	3,5
DDE pp'	68	1,5	4,1	4,1
DDT op'	68	1,5	1,3	1,3
DDT pp'	68	1,5	7,3	7,3
diazinon	19	5,3	2,9	2,9
folpet	49	2,0	53,8	53,8
pyrimiphos méthyl	8	12,5	1,1	1,1

Du suivi de la qualité de l'eau de mer durant la crise du Chikungunya, il ressort que seule une molécule a été détectée dans une embouchure de la côte Est (le métazachlore à 0,03 µg/L).

En 2008-2009, une étude pilote pour caractériser la contamination chimique des eaux côtières a permis la mise en place à grande échelle de nouveaux outils, des échantillonneurs passifs, tout autour de La Réunion (Gonzalez *et al.*, 2009). Pour les pesticides, les techniques POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Sampler) et SBSE (Stir Bar Sorptive Extraction) ont été mises en œuvre sur deux saisons bien marquées. Ces techniques permettent de mesurer des concentrations dans l'eau avec des seuils pouvant atteindre le ng/L. Le détail des molécules détectées parmi les 75 substances pesticides ou métabolites qui ont été recherchés dans cette étude est présenté dans le Tableau 4. Sur certaines stations, l'endosulfan, l'endrine, et le lindane mesurés dépassent les NQE-MA.

Tableau 4 : Pesticides détectés dans les eaux côtières par SBSE et POCIS entre 2008 et 2009 à La Réunion (Gonzalez *et al.*, 2009).

atrazine	diuron	DCPMU
DCPU	124 dichlorodiphénylurée	irgarol
isoproturon	terbuthylazine	endosulfan
alpha, beta et delta-BHC	aldrine	isodrine
dieldrine	endrine	alachlore
metolachlore	metazachlore	

En parallèle des pesticides, d'autres substances ont été mesurées en zones côtières comme les alkylphénols et certains composés pharmaceutiques comme aspirine, caféine, carbamazépine, diazépam, diclofénac, gemfibrozil, ibuprofène, paracétamol, terbutaline, théophylline.

En zone continentale, les suivis des eaux de boisson organisés par la DRASS depuis 1993, montrent une augmentation des fréquences d'observation, et, pour certaines molécules, une détection presque systématique (atrazine en particulier). Cependant, les eaux restent à ce jour faiblement contaminées.

Couplées avec les données acquises par l'OLE (Office Local de l'Eau) dans le cadre de la surveillance environnementale depuis 2005 (Tableau 5), c'est ainsi une trentaine de molécules qui sont détectées dans les eaux douces continentales (superficielles et souterraines). En 2008, les dernières données synthétiques disponibles montrent la contamination récurrente des eaux superficielles (Tableau 6).

Tableau 5 : Pesticides détectés dans les eaux douces (superficielles et souterraines) entre 2000 et 2007 à la Réunion (Données DRASS, OLE).

2,4,D alachlore AMPA atrazine atrazine déséthyl atrazine hydroxy bentazone butoxide de pipéronil carbendazime DCP MU	deltaméthrine desethyl terbutylazine diazinon diuron DNOC (dinitroorthocrésol) endosulfan (a, b et sulfate) fénitrothion gamma HCH (Lindane) glyphosate hexazinone	métazachlore methyl urée (linuron) métolachlore oxadixyl paraquat simazine téméphos terbutryne terbutylazine triclopyr (ester de butyl glycol)
---	---	---

Tableau 6 : Données du réseau de l'OLE et du réseau de la DRASS mesurées en rivière pour l'année 2008 ($\mu\text{g/L}$).

Substance	Pourcentage de détection*	Moyenne des valeurs	Valeur maximale
atrazine	11	0,04	0,1
diéthylatrazine	23	0,07	0,22
diuron	14	0,04	0,2
hexazinone	5	0,03	0,06
métolachlore	5	0,02	0,03
monuron	3	0,05	0,11
aminotriazole	3	0,08	0,08
bentazone	1	0,03	0,04
oxadixyl	2	0,02	0,03
2,4 D	1	0,03	0,03
AMPA	1	0,18	0,2
glyphosate	1	0,37	0,4

* nombre de détections positives par rapport au nombre d'analyses de ce paramètre

Les deux molécules récurrentes dans l'eau douce sont l'atrazine et son produit de dégradation, le déséthyl-atrazine. Cette molécule n'est plus utilisée localement depuis 2002.

Secondairement sont rencontrés régulièrement le 2,4D, le diuron, l'hexazinone, le métazachlore et le métolachlore.

Le cas des produits antialissures a aussi été abordé. La solution la plus efficiente retenue porte sur l'analyse des eaux des principaux ports par IDHESA, dans le cadre du présent programme. Les analyses sont en cours, sur la base d'échantillons d'eau collectés dans tous les principaux ports réunionnais (n=6), Tableau 7.

Tableau 7 : Concentrations mesurées ($\mu\text{g/L}$) en produits antialissures des différents ports de La Réunion (sont des produits de dégradation du diuron).*

Site / Substances	Irgarol	Diuron	DCPU*	DCA *	DCPMU*	Thiram
Port Ouest militaire	0,097	0,145	0,002	< 0,500	0,034	< 0,010
Port Ouest plaisance	0,211	0,176	< 0,002	< 0,500	0,040	< 0,010
Port Est (Port de commerce)	0,088	0,072	0,002	< 0,500	0,022	< 0,010
Port Saint-Gilles plaisance et pêche	0,112	0,108	0,003	< 0,500	0,012	< 0,010
Port Saint-Pierre plais et pêche	0,008	0,075	0,003	< 0,500	< 0,009	< 0,010
Port Sainte-Marie plais et pêche	0,015	0,024	0,003	< 0,500	< 0,009	< 0,010

Site / Substances	Dichlofluanid	Chlorothalonil	TCMTB busan	Dinoterb
Port Ouest militaire	< 0,100	< 0,005	0,007	0,067
Port Ouest plaisance	< 0,100	< 0,005	0,025	0,003
Port Est (Port de commerce)	< 0,100	< 0,005	0,010	0,019
Port Saint-Gilles plaisance et pêche	< 0,100	< 0,005	0,020	0,007
Port Saint-Pierre plais. et pêche	< 0,100	< 0,005	0,009	0,001
Port Sainte-Marie plais. et pêche	< 0,100	< 0,005	0,019	0,005

Les biocides des peintures antialissures retrouvés dans les ports de La Réunion sont principalement le diuron et ses produits de dégradation, puis l'irgarol et le TCMTB busan. Le dinoterb, herbicide, a aussi été retrouvé lors des analyses.

3.2. Le choix des molécules

Ces résultats d'analyses (présentés ici de façon synthétique) montrent la détection de plus en plus systématique de pesticides dans les eaux et les organismes.

C'est sur cette base de molécules détectées dans l'environnement, en particulier marin, qu'une première liste provisoire a été fixée et soumise pour avis au Comité scientifique du programme. Après plusieurs échanges, le choix sur les cinq molécules suivantes a été arrêté en février 2009 (Tableau 8). C'est ainsi trois herbicides, deux insecticides et un fongicide de mode d'action différent qui ont servi de base au projet.

Tableau 8 : Pesticides sélectionnés dans le cadre du programme ERICOR.

TYPE	PRODUIT	FAMILLE CHIMIQUE	MODE D'ACTION	SOLUBILITE 20-25°C
Fongicide	Carbendazime	Benzimidazole	Fongicide polyvalent et systémique. Action protectrice et curative (PM/IP). Absorbé par les racines et les organes vert, véhiculé par le courant de sève brute (IP).	29 à pH = 4, 8 à pH =7, 7 à pH = 8 mg/L (pM)- 28 à pH = 4 (IP)
Herbicide	Diuron	Urée substituée	Herbicide systémique. Absorbé principalement par les racines (PM). Assez longue persistance d'action dans le sol (IP).	36,4 mg/L
Herbicide	Glyphosate	Amino-phosphonates (glycines)	Herbicide systémique non sélectif. Absorbé par les feuilles, véhiculé par la sève jusqu'à l'extrémité des racines et des rhizomes. Blocage de la biosynthèse des acides aminés aromatiques (IP).	12 g/L (PM), 10g/L (IP)
Herbicide	Métolachlore	Chloroacetamides	Herbicide sélectif. Inhibiteur de la division cellulaire, de la germination. Absorbé en majorité par les pousses et les hypocotyles.	488 mg/L
Insecticide	Carbofuran	Carbamate	Insecticide systémique. Action par contact, ingestion (PM) et plus faiblement par inhalation (IP).	320 (20°C) - 351(25°C) mg/L
Insecticide	Deltaméthrine	Pyréthriñoïde de synthèse	Insecticide non systémique, agit par contact et ingestion. Agit sur un grand nombre d'insectes à des doses très faibles (IP), Action rapide (PM).	< 0,2 µg/L

PM : The Pesticide Manual, Crop protection publications.

IP : Index Phytosanitaire Acta.

3.3. Etude bibliographique

Les molécules sélectionnées pour cette étude ont été documentées par une analyse de la littérature existante. Cette approche bibliographique est orientée autour des critères suivants :

- bioessais sur organismes aquatiques ;
- milieu aqueux (eau douce ou marine) ;
- modèle tempéré ou tropical ;
- systèmes expérimentaux (*in vitro*, microcosmes, mésocosmes) ;
- molécule pure ou formulation commerciale ;
- paramètre mesuré (toxicité, fécondation, ...) ;
- durée d'exposition, CSEO, CE, CL, ...

Toutes les données collectées sont synthétisées dans un tableau de synthèse (Annexe 1).

Le diuron est la substance active la mieux documentée. C'est ainsi 34 références bibliographiques qui abordent sa toxicité. Près d'une vingtaine de ces références portent sur le milieu marin, dont près d'une dizaine la zone tropicale.

Le glyphosate est bien documenté, sur les 31 références relevées, seules 7 ont été réalisées sur des organismes marins et 2 concernent la zone tropicale.

Les autres substances (carbendazime, métolachlore, carbofuran et deltaméthrine) sont largement sous documentées. Moins de 20 références cumulées ont été retrouvées, aucune ne porte sur le milieu marin.

4. ESSAIS SUR LES ORGANISMES MARINS

4.1. Les différents bioessais mis en œuvre

Trois partenaires sont intervenus pour réaliser ces bioessais. Deux se sont concentrés sur les modèles tempérés classiquement maîtrisés : Ifremer Brest et IPL. L'ARVAM, structure basée à la Réunion s'est focalisée sur la mise en œuvre des bioessais tropicaux.

Un des enjeux du programme portait sur la mise au point de bioessais spécifiques au contexte tropical pour la recherche de toxicité des pesticides utilisés localement.

Ainsi six groupes d'organismes ont été ciblés dans un premier temps. Les choix ont porté sur la disponibilité effective des organismes au niveau local, ainsi que sur la capacité du laboratoire ARVAM à mettre au point les tests rapidement. C'est ainsi 7 types de bioessais différents qui ont été réalisés (Tableau 9). Pour certains, le « miroir » tropical n'a pu être mis au point, comme pour les bivalves et les Crustacés.

Tableau 9 : Les bioessais réalisés dans le cadre du programme ERICOR

Bioessais	Cibles	ARVAM	IPL	Ifremer Brest
Phytoplancton	Diatomée	X	X	
Phytoplancton	Zooxanthelle	X		
Invertébré	Oursin	X		X
Invertébré	Crustacés	ND	X	
Invertébré	Mollusque	ND	X	
Invertébré	Corail	X		
Vertébré	Poisson	X	X	

ND : protocole non développé

4.2. Préparation des produits et dosages

4.2.1. Mise en œuvre des produits

Tous les essais ont été réalisés à partir des mêmes lots de produit à tester :

- carbofuran : Pestanal[®] Riedel de Haën N°32056
- carbendazime : Pestanal[®] Riedel de Haën N°45368
- glyphosate : Pestanal[®] Riedel de Haën N°45521
- S-métolachlore : Pestanal[®] Riedel de Haën N°33859
- diuron : Pestanal[®] Riedel de Haën N°45463
- deltaméthrine : Pestanal[®] Riedel de Haën N°45423

Les procédures de mise en œuvre ont présenté des différences entre les équipes, mais elles ont été répétées à l'identique avant chaque essai.

Le Tableau 10 résume les diluants et les concentrations des solutions mères de travail dans chaque équipe.
Les concentrations ont été calculées pour ne jamais dépasser la dose de 1 mg de DMSO par litre dans les solutions d'essais.

Tableau 10 : Liste des produits et préparation des solutions mères.

Produit	ARVAM		IPL		IFREMER	
	Diluant	Concentration solution mère (mg/mL)	Diluant	Concentration solution mère (mg/mL)	Diluant	Concentration solution mère (mg/mL)
Carbendazime	DMSO	1,0	DMSO	1,0	DMSO	1,0
Diuron	eau MiliQ	0,03	DMSO	1,0	DMSO	1,0
Glyphosate	eau MiliQ	0,25	eau MiliQ	2,0	DMSO	1,0
S-métolachlore	eau MiliQ	0,25	eau MiliQ	0,2	DMSO	1,0
Carbofuran	eau MiliQ	0,25	DMSO	1,0	DMSO	1,0
Deltaméthrine	DMSO	1,0	DMSO	1,0	DMSO	1,0

La mise en solution est réalisée par agitation magnétique en flacon hermétique durant 24 heures à 20°C et en lumière atténuée.

Les solutions à tester ont été préparées peu de temps avant les essais et stockés à 7 °C à l'abri de la lumière afin d'éviter toute modification des milieux et conserver au mieux leurs caractéristiques et leur intégrité (Quiniou *et al.*, 2005).

Les dilutions des solutions ou suspensions obtenues sont faites, soit sur une base d'eau de mer synthétique (cas de IPL), soit sur une base d'eau de mer naturelle, collectée sur le même site que les organismes tests d'origine (cas de l'ARVAM) ou à l'écloserie d'Argenton (Ifremer).

Deux types d'eau de mer synthétique ont été réalisés selon le type de test à réaliser par IPL :

- test sur algue : eau de mer synthétique de la norme ISO 10253 (06/2006) enrichie en nutriments ;
- autres tests : eau de mer selon la formule proposée par G. Zarogian (1969), Tableau 11.

Leur pH est fixé à : $8,0 \pm 0,4$

Tableau 11 : Composition (en g/L) de l'eau de mer synthétique de Zarogian (1969).

Composés	Concentrations (g/L)
NaCl	23,5
MgCl ₂ , 6H ₂ O	10,78
Na ₂ SO ₄	4,0
CaCl ₂ , 2H ₂ O	1,47
KCl	0,7
KBr	0,1
H ₃ BO ₃	0,03
SrCl ₂ , 6H ₂ O	0,02
NaF	0,003
NaHCO ₃	0,2
Na ₂ SiO ₃ , H ₂ O	0,020

4.2.2. Contrôle des concentrations

Afin de contrôler les concentrations introduites dans les milieux d'essais, des dosages ont été réalisés par le laboratoire IDHESA sur plusieurs séries d'échantillons.

La nature des échantillons testés (solution mères, filles, dilution, cinétique de dégradation) a été différente en fonction des équipes. Elle a été guidée par l'avancement des différentes mises au point de bioessais, le nombre de solution à tester par équipe, la distance entre le laboratoire d'analyse et les équipes de bioessais. Pour ce dernier point, le nombre d'envoi entre La Réunion et Brest a été limité. Les conditionnements et les pré-requis pour le transport des échantillons (- 20°C jusqu'à réception des échantillons) ont été des opérations lourdes à mettre en place.

Les méthodes d'analyse

La liste des produits phytosanitaires recherchés est la suivante : carbofuran , carbendazime, diuron, S-métolachlore, et deltaméthrine, ainsi que leurs produits de dégradation : 2-aminobenzimidazole, 3,4-dichloraniline (DCA), 1-(3,4-dichlorophényl)urée, (DCPU), 1-(3,4-dichlorophényl)-3-méthylurée (DCPMU), carbofuran -3-kéto, carbofuran -3-hydroxy, carbofuran -3-hydroxy-7-phenol, 2-éthyl-6-méthylaniline, 2-éthyl-6-méthyl-2-chloroacétanilide, acide carboxylique-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-diméthyl-(1-cyclopropane)

Les analyses ont été effectuées en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem, en injection directe pour les concentrations testées. La méthode est présentée en Annexe 2.

Pour IPL

Des dosages ont été réalisés sur deux séries complètes d'essais, une pour chaque type d'eau de mer. Les résultats obtenus permettent de distinguer trois groupes de produits :

1. Les composés pour lesquels les concentrations nominales sont retrouvées à $\pm 5\%$ et qui ne nécessitent donc pas de facteur de correction. Ce sont diuron et carbendazime.
2. Les composés pour lesquels une correction de la concentration est nécessaire. Ce sont le carbofuran, le glyphosate et le S-métolachlore. Les concentrations nominales sont corrigées selon la pente de la droite de corrélation, respectivement 0,8107 ; 0,9166 ; 0,5972.
3. Le dernier composé est la deltaméthrine pour lequel une correction ne peut être envisagée en raison de l'absence de corrélation entre les dosages et les doses introduites (Figure 1). Il semble que l'échantillonnage des solutions préparées ne soit pas représentatif des concentrations des solutions. Compte tenu du caractère très peu soluble de la deltaméthrine dans l'eau (environ $2\ \mu\text{g/L}$), les solutions manipulées sont en réalité des suspensions pour lesquelles des décantations ont pu se produire avant l'échantillonnage pour analyse. Un argument en faveur de cette hypothèse repose sur le bon échelonnement des réponses biologiques sans relation avec les doses mesurées.

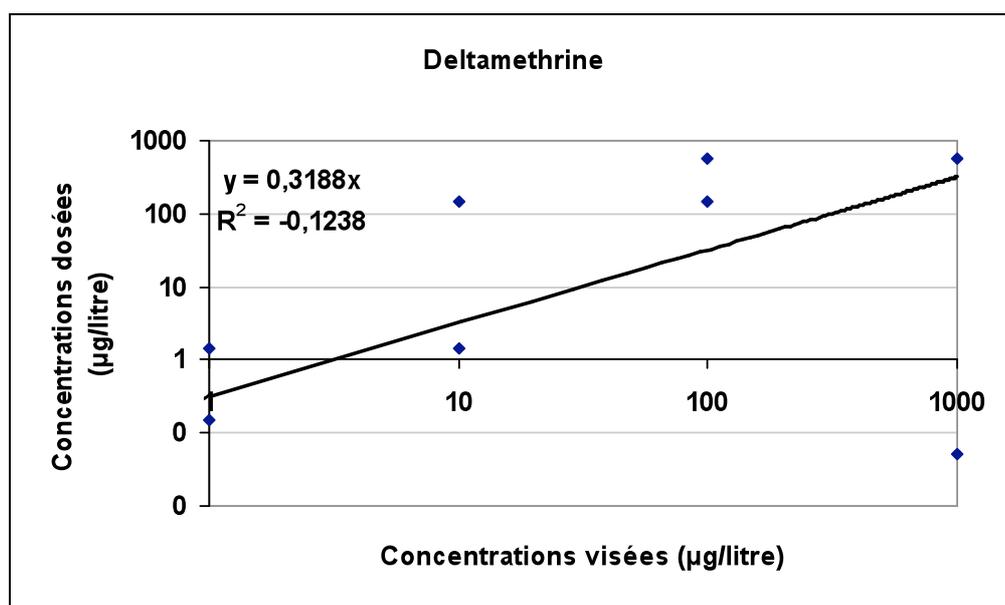


Figure 1 : Corrélation entre concentrations visées et concentrations nominales en deltaméthrine dans une série d'eau de mer synthétique.

Les concentrations nominales seront donc utilisées sans correction pour la deltaméthrine pour tous les bioessais réalisés pour IPL.

Pour Ifremer

Dans les courbes présentant les résultats et pour les calculs de CE_{50} ou $CE_{10} = CSEO$ (concentration sans effet observé), se sont les valeurs présentées dans le Tableau 12 qui ont été prises en considération, pour le test oursin tempéré.

Tableau 12 : Correspondance des concentrations nominales et des concentrations effectivement testées pour chaque substance, exprimées en $\mu\text{g/L}$ (Ifremer pour oursin).

Substance / [C] nominales	0,1	1	10	100	1000
Carbendazime	0,04	0,76	9,27	113,60	635,80
Glyphosate	0,02	0,10	0,75	7,45	76,99
Diuron	0,146	0,73	10,99	122,59	898,25
S-Métolachlore	0,04	1,24	9,98	101,20	1095,00
Deltaméthrine	0,066	0,465	8,63	50,23	564,14
Carbofuran	0,091	1,703	6,84	118,22	962,68

Pour ARVAM

Les dosages de contrôle de valeur ont été réalisés en deux séries distinctes.

Une première série, effectuée entre juin et août 2009, a permis de doser les concentrations réelles des solutions mères préparées pour les essais phytoplancton et poissons tropicaux (Tableau 13).

Tableau 13 : Résultats des dosages réalisés sur les solutions mères

Substance	Concentration nominale (mg/mL)	Concentration dosée moyenne, n=3 (mg/mL)
Carbendazime	1,00	1,04
S-Métolachlore	0,20	0,29
Glyphosate	0,25	0,25
Diuron	0,30	0,32
Deltaméthrine	1,00	0,79
Carbofuran	0,25	0,17

Ainsi, deux groupes de produits sont distingués :

1. les composés pour lesquels les concentrations nominales sont retrouvées à $\pm 5\%$ et qui ne nécessitent donc pas de facteur de correction. Ce sont le diuron, le glyphosate, et le carbendazime ;
2. les composés pour lesquels une correction de la concentration est nécessaire. Ce sont le carbofuran, la deltaméthrine et le S-métolachlore. Les concentrations nominales sont corrigées par extrapolation sur les différentes dilutions.

Les valeurs présentées dans le Tableau 14 ont été prises en considération pour les tests phytoplancton (diatomées et zooxanthelles), et Poisson (ombrine).

Tableau 14 : Correspondance des concentrations nominales et des concentrations effectivement testées pour chaque substance, exprimées en µg/L (ARVAM pour essais phytoplancton et poisson).

Substance / [C] nominales	0,1	1	10	100	1000
Carbendazime	0,1	1	10	100	1000
Glyphosate	0,1	1	10	100	1000
Diuron	0,1	1	10	100	1000
S-Métolachlore	0,15	1,45	14,5	145	1450
Deltaméthrine	0,08	0,8	7,9	79	790
Carbofuran	0,07	0,7	6,8	68	680

La deuxième série, effectuée entre novembre 2009 et mars 2010, s'est focalisée sur l'analyse des solutions utilisées pour les essais oursin et corail.

Pour chacun des produits, la concentration la plus élevée a été dosée. Pour le test corail (exposition 96 h) un suivi quotidien de la dégradation des produits a été entrepris.

Les valeurs présentées dans le Tableau 15 ont été prises en considération pour les tests oursin. Les valeurs en gras italique sont les valeurs obtenues des dosages.

Pour le glyphosate, l'écart observé est inférieur à 5 %, ainsi la concentration nominale est maintenue.

Pour le carbofuran, des incohérences dans les valeurs obtenues sont constatées, rendant impossible une analyse. Les valeurs nominales sont donc utilisées dans ce cas.

Tableau 15 : Correspondance des concentrations nominales et des concentrations effectivement testées pour chaque substance, exprimées en µg/L ; en gras valeurs des dosages ; (ARVAM pour essais oursin).

Substance / [C] nominales	0,1	1	10	100	1000
Carbendazime	0,08	0,8	7,6	75,6	756
Glyphosate	0,1	1	10	100	1000
Diuron	0,1	1	9,8	98,2	982
S-Métolachlore	0,07	0,7	7,2	71,5	715
Deltaméthrine	0,01	0,14	1,4	13,5	135
Carbofuran	0,1	1	10	100	1000

Pour le test corail (exposition 96 h), le suivi quotidien des concentrations met en évidence de fortes disparités entre les produits. Dans tous les cas une diminution importante est notée sur les 96 h de l'essai.

La

Figure 2 représente les concentrations mesurées dans les milieux aux plus fortes concentrations (1000 µg/L en concentration nominale).

Le glyphosate comme le diuron montre une stabilité sur les 96 h dans les conditions expérimentales testées.

Le carbendazime semble se dégrader à partir de 48 h, près de la moitié de la substance n'est plus retrouvé à 96 h.

Le carbofuran et la deltaméthrine se dégradent très rapidement. Près de 60 % du carbofuran n'est plus dosé dans nos milieux après 48 h d'exposition aux conditions expérimentales testées.

La deltaméthrine étant très peu soluble dans l'eau, il est possible que l'écart constaté entre la valeur mesurée et la valeur nominale, soit le résultat d'une mauvaise mise en suspension des solutions.

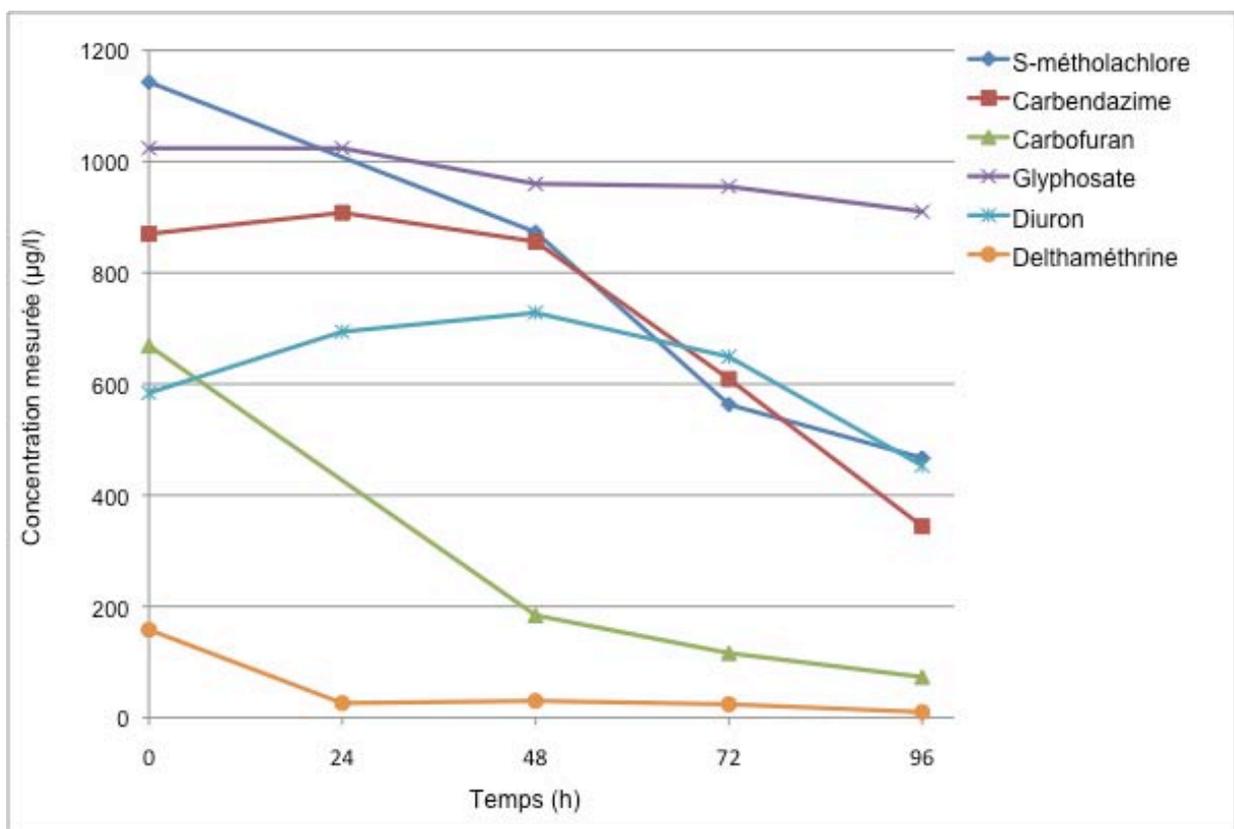


Figure 2 : Evolution des concentrations des différents produits sur 96 h dans les conditions expérimentales de l'essai Corail.

Dans le cas du test corail, les substances testées n'ont pas eu d'effet significatif sur ce groupe d'organismes (cf. § 9.3). Ainsi, les « valeurs maximales testées » présentées pour ce bioessai correspondent aux concentrations dosées des solutions à t0 (Tableau 16).

Tableau 16 : Correspondance des concentrations nominales et des concentrations effectivement testées pour chaque substance, exprimées en µg/L (ARVAM pour essais corail)

Substance / [C] nominales	1000
Carbendazime	870
Glyphosate	1000
Diuron	728
S-Métolachlore	1143
Deltaméthrine	158
Carbofuran	670

5. ESSAIS PHYTOPLANCTON

5.1. Mise au point des modèles tropicaux

Il était prévu de travailler sur deux cibles : (i) une microalgue benthique classiquement rencontrée dans les récifs coralliens de l'île et, (ii) les zooxanthelles, dinoflagellés symbiontes des coraux.

En l'absence de souches de zooxanthelles et de diatomées dans PHYTOBANK (souchothèque de l'ARVAM), de nombreux isollements ont été réalisés en 2007. En parallèle, et sur la base de la collection existante, une souche de dinoflagellé (*Amphidinium* sp.) a fait l'objet d'une simulation de test en septembre – octobre 2007. Genre proche des zooxanthelles, la croissance observée n'a pas été satisfaisante, incompatible avec un test sur 72-96 h. Cependant, cette souche nous a permis de faire de multiples essais en faisant varier le milieu de culture, la température, la photopériode, etc, ceci afin de mieux préciser les conditions optimales de croissance des zooxanthelles.

5.1.1. Les diatomées

Des échantillons de coraux morts et de macroalgues ont été collectés sur le récif de la Saline. Après traitement, plusieurs dizaines de souches de diatomées benthiques ont été isolées et ont montré des développements *in vitro* variables, mais prometteurs pour certaines.

Au bout de plusieurs mois de suivi, le choix s'est porté sur une souche de Navicule (D007, Navicula sp.,

Figure 4) qui supporte bien les repiquages et présente des taux de division proches de 0,04 div/h (limite inscrite pour les diatomées planctoniques de la norme ISO 10 253). La diagnose de l'espèce reste à réaliser.

Plus d'une vingtaine de bioessais ont été réalisés pour la mise au point. Le taux de croissance moyen obtenu dans nos conditions expérimentales est d'environ $0,02 \mu h^{-1}$ (ou $0,67 \mu j^{-1}$).



Figure 4 : *Navicula* sp. (souche D007) (x400), Photo ARVAM

5.1.2. Les zooxanthelles

Plusieurs tentatives initiales d'isolement se sont révélées infructueuses et ceci sur plusieurs espèces de coraux durs. Des adaptations de protocoles, en particulier sur les conditions de culture ainsi que le choix du milieu ont été testées sans succès.

En parallèle, et afin de ne pas prendre trop de retard sur ce volet, une commande de quatre souches différentes déjà en culture a été réalisée mi-2007 (ces souches sont originaires des Caraïbes, mais proviennent d'espèces coralliennes présentes à La Réunion). Leur adaptation aux conditions du laboratoire a été plus longue que prévue, entre temps des clones locaux ont été obtenus.

En effet, suite aux multiples essais sur les microboutures de coraux effectués début 2008, les reliquats d'expérimentation ont été utilisés pour isoler des zooxanthelles. Ces microalgues ont été placées dans du milieu f/2 classiquement utilisé (Figure 6).

Ce sont plus de 15 souches de zooxanthelles qui sont maintenues dans PHYTOBANK. Deux morphotypes différents semblent présents, nous avons ainsi sélectionné en première intention une souche de chaque morphotype.

Les dinoflagellés forment un groupe de microalgues dont la culture est souvent plus difficile que les diatomées. Les taux de croissance sont moins élevés que les diatomées et leur comportement peut varier en fonction des conditions de culture.

Ainsi, nous avons rencontré de nombreuses difficultés quant à la mise au point du test. Les zooxanthelles ont montré un comportement tantôt mobile (planctonique), tantôt immobile (posée sur le fond). Ces différences comportementales sont fonction du morphotype testé, des conditions expérimentales (photopériode et intensité lumineuse), mais aussi des contaminants et doses testées. Ces comportements variables entre chaque souche, mais aussi entre chaque test, ont compliqué le choix des techniques, en particulier pour mesurer la concentration cellulaire.

Plus d'une vingtaine d'essais ont été nécessaires pour mettre au point un protocole reproductible. Une souche a été sélectionnée pour le programme, numéroté ZX02.



Figure 6 : (a) vue à la loupe binoculaire d'une bouture de corail (*Pocillopora meandrina*), dont les tissus sont riches en zooxanthelles, (b) souche de zooxanthelle en culture (x400).

Les taux de croissance obtenus dans ces conditions expérimentales sont supérieurs à ceux observés pour les diatomées benthiques, soit en moyenne $0,05 \mu h^{-1}$.

5.1.3. Le protocole mis au point

Le bioessai « tropical » développé à ce jour s'inspire de la norme NF EN ISO 10253. C'est un test d'inhibition de la croissance mesurée par rapport à des cultures témoins réalisées dans des conditions identiques. Les bases de ce protocole sont identiques pour les deux souches étudiées dans le programme. Leur principale caractéristique, par rapport à la norme concerne leur mode de vie, benthique, compliquant ainsi certains points du protocole, en particulier le dénombrement.

Conditions expérimentales :

- eau de mer filtrée sur filtre Whatman GF/F, autoclavée ;
- milieu culture : Guillard F/2 (complémenté en Si pour les diatomées) ;
- température : 26 ± 1 °C ;
- pH des préparations : $8,0 \pm 0,2$;
- luminosité continue verticale :
 - Diatomées = 4 000 - 6 000 lux
 - Zooxanthelles = 10 000 - 12 000 lux
- néon blancs Osram et Philips, qualité lumière du jour ;
- durée du test : 96 h ;
- microplaques 6 puits plastique stérile à usage unique **non traité culture cellulaire** (Falcon) ;
- dénombrement à l'aide du microscope inversé CK2 Olympus.

Préparation de la préculture :

- 72h avant le début de l'essai, activer une culture mère : dénombrement sur cellule de Malassez et repiquage pour obtenir une culture à environ $100 \cdot 10^3$ cellules/mL ;
- vérification du pH du milieu ;
- afin de conserver la croissance exponentielle, la préculture est incubée dans les mêmes conditions que celles de l'essai ;
- mesurer la densité cellulaire de la préculture juste avant l'utilisation pour calculer le volume adéquat de l'inoculum.

Mise en place des bioessais :

- préparation des milieux de bioessais (milieu F/2 ou F/2+Si + toxique) dans des pots en polystyrène cristal stériles, à raison de 50 ml de milieu à tester par pot ;
- chaque concentration testée est réalisée en triplicat ;
- les milieux sont inoculés par une suspension algale (inoculum), pour une concentration finale d'environ 1 000 cellules/mL ;
- chaque suspension (milieu et algue) est placée dans 4 puits d'une microplaque (24 puits) à raison de 2 ml par puits ;
- quatre plaques témoin sont mise en place en parallèle afin de suivre la croissance toutes les 24h ;
- toutes les plaques sont placées dans une enceinte thermostatée à 26 ± 1 °C. et sous un éclairage adaptée a la souche (4 000 - 6 000 lux pour les diatomées, 10 000 - 12 000 lux pour les zooxanthelles) ;
- l'exposition est maintenue en lumière continue pendant 96 h.

Dénombrements :

- les puits à dénombrer sont fixés au lugol ;
- les comptages sont réalisés sous microscope, avec un objectif adapté à la concentration observée. Le diamètre des champs est mesuré afin de calculer la densité en nombre de cellule par unité de surface, dans chaque puits. Un minimum de cinq champs par puits est compté.
- les témoins sont suivis toutes les 24 h.
- les essais sont fixés après 96 heures d'incubation.
- à la fin de chaque essai le pH est contrôlé dans les puits témoins.

Résultats :

- les calculs de taux de croissance, de pourcentage d'inhibition, sont réalisés suivant la norme NF EN ISO 10 253 ;
- la détermination des CE est réalisée avec le logiciel REGTOX.

5.1.4. Contrôle Qualité

La diatomée

L'utilisation de bichromate de potassium ($K_2CR_2O_7$) a permis de tester la sensibilité de la souche à ce toxique.

Six bioessais ont été réalisés dans les mêmes conditions et donne une CE_{50} calculée avec le logiciel REGTOX qui varie entre 1,3 et 2,3 mg/L, Tableau 17.

La

Figure 8 montre un exemple de courbe de croissance obtenue, ainsi qu'une des réponses obtenues avec du bichromate de potassium ($K_2CR_2O_7$).

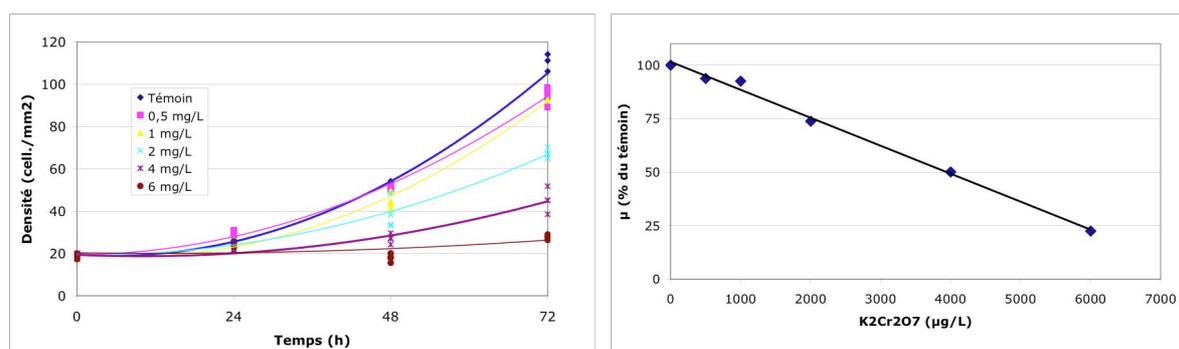


Figure 8 : (a) évolution de la concentration cellulaire de la souche D007 en fonction du temps et en présence de différentes concentrations en $K_2CR_2O_7$. (b) Pourcentage par rapport au témoin du taux de croissance de la souche D007 en en présence de différentes concentrations en $K_2CR_2O_7$.

Les premières CE_{50} calculées avec le logiciel REGTOX varient entre 1,3 et 2,3 mg/L, (valeur moyenne $1,84 \pm 0,36$, $n = 6$). Cette sensibilité calculée pour la *Navicula* sp. (D007) est voisine de celle observée pour *Skeletonema costatum* (2,5 mg/L, $n = 7$) et inférieure à celle de *Phaeodactylum tricornutum* (20,1 mg/L, $n = 7$), espèces proposées dans la norme ISO 10253.

Tableau 17 : *Navicula sp. (D007)*, CE_{50} obtenues avec du bichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$). IC : Intervalle de confiance à 95 %.

N° bioessai	Taux de croissance (μh^{-1})	CE_{50} ($\mu g/L$)	IC min ($\mu g/L$)	IC max ($\mu g/L$)
AD001	0,018	2040	1550	2550
AD015	0,017	2378	953	5136
AD017	0,028	1300	860	1940
AD033	0,026	1800	1600	2000
AD034	0,026	1850	1110	2820
AD035	0,026	1700	1600	1800

La zooxanthelle

La

Figure 10 montre un exemple de courbe de croissance obtenu, réponse obtenue avec du bichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$).

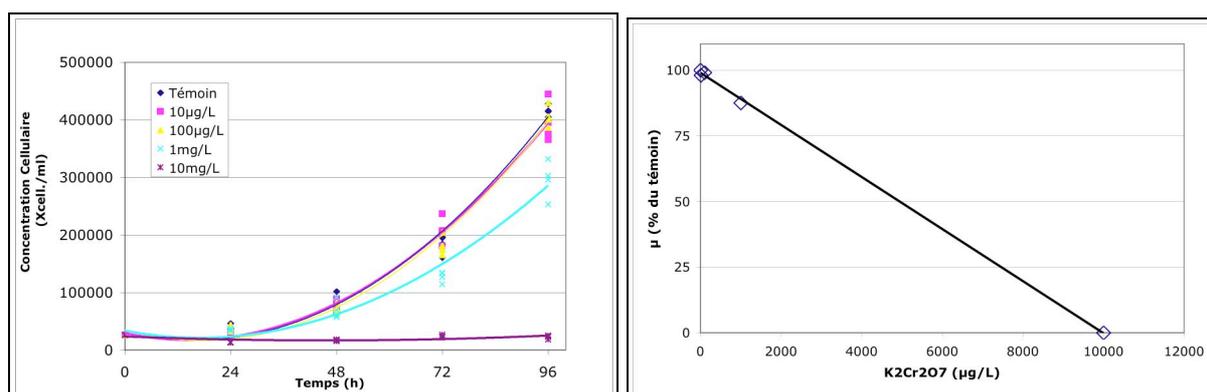


Figure 10 : (a) évolution de la concentration cellulaire de la souche de *Symbiodinium sp. ZX02* en fonction du temps et en présence de différentes concentrations en $K_2Cr_2O_7$. (b) Pourcentage par rapport au témoin du taux de croissance de la souche ZX02 en présence de différentes concentrations en $K_2Cr_2O_7$.

Tableau 19 : *Symbiodinium sp. (ZX02)*, CE_{50} obtenues avec du bichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$). IC : Intervalle de confiance à 95 %.

N° bioessai	Taux de croissance (μh^{-1})	CE_{50} ($\mu g/L$)	IC min ($\mu g/L$)	IC max ($\mu g/L$)
AZ001	0,05	3400	2960	3910
AZ003	0,06	2790	2570	3050
AZ006	0,06	2810	2550	3110
AZ007	0,06	3160	2900	3420
AZ010	0,06	2040	1390	2880
AZ017	0,05	3470	3290	3640

AZ021	0,06	3730	3570	3890
-------	------	------	------	------

Les CE₅₀ calculées avec le logiciel REGTOX varient entre 2,0 et 3,7 mg/L, donnent une sensibilité voisine de celle de la diatomée testée en parallèle (valeur moyenne de 2,89 ± 0,71, n = 7). Cette sensibilité calculée pour la zooxanthelle (ZX02) est voisine de celle observée pour *Skeletonema costatum* (2,5 mg/L, n = 7) et inférieure à celle de *Phaeodactylum tricornutum* (20,1 mg/L, n = 7), proposées dans la norme ISO 10253.

Tableau 20 : Résultats comparés des essais obtenus avec du bichromate de potassium (K₂CR₂O₇).

Organisme d'essais	Valeur moyenne CE ₅₀ (mg/L)	Ecart type (mg/L)	Référence
<i>Navicula</i> sp. (D007)	1,84, n=6	0,36	Projet ERICOR
<i>Symbiodinium</i> sp. (ZX02)	2,89, n=7	0,71	Projet ERICOR
<i>Skeletonema costatum</i>	2,5, n=7	1,1	ISO 10253
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20,1, n=7	5,3	ISO 10253

5.2. Le modèle tempéré

C'est un essai sur une microalgue marine, *Phaeodactylum tricornutum*. Il est mis en œuvre par l'Institut Pasteur de Lille (Laboratoire du littoral).

5.2.1. Méthode :

La méthodologie employée suit la norme NF EN ISO 10253 "Essai d'inhibition de la croissance des algues marines avec *Skeletonema costatum* et *Phaeodactylum tricornutum*". Une souche de *Phaeodactylum tricornutum* provenant du CCAP (1052/1A) a été utilisée pour les essais.

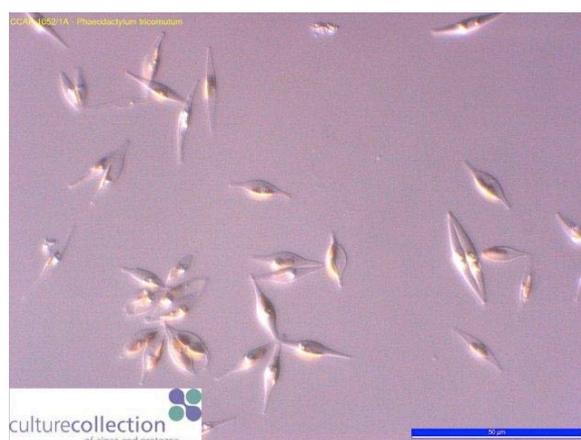


Figure 12 : *Phaeodactylum tricornutum* (photo CCAP).

Cette souche en phase de croissance est mise en présence des milieux à tester. Ceux-ci sont des séries de concentrations croissantes en produit à tester dans de l'eau de mer synthétique enrichie en nutriments.

Une série d'essais témoins est réalisée en parallèle.

Les milieuxensemencés sont incubés à 20 °C sous éclairage continu pendant 72 heures afin de permettre la croissance de plusieurs générations d'algues.

En fin d'essai on mesure le pourcentage d'inhibition de la croissance algale dans les milieux d'essais par rapport aux témoins.

La CE₅₀ est la concentration de produit qui crée un pourcentage d'inhibition de 50 %.

5.2.2. Contrôle Qualité

Chaque série de tests a été accompagnée d'un test de contrôle utilisant le 3-5 Dichlorophénol.

Les valeurs sont proches de celles observées lors des essais de validation de la norme (CE₅₀ = 2,7 ± 0,2 mg/L, n = 7).

Tableau 21 : *Phaeodactylum tricornutum* – essai avec 3-5 Dichlorophénol

Date essais	CE ₅₀ (µg/L)	Intervalle de confiance à 95% (µg/L)
15/04/2009	3,9	? < CE ₅₀ < ?
12/05/2009	3,1	2,3 < CE ₅₀ < 3,9
23/03/2010	2,9	2,7 < CE ₅₀ < 3,1

A titre expérimental, un essai a été réalisé avec un autre standard, le Cuivre II sous forme de sulfate. Une CE₅₀ de 101 µg/L a été obtenue.

5.3. Résultats

5.3.1. Sur le modèle tempéré

Les essais ont mis en évidence des effets inférieurs à 20 % pour cinq des six produits testés.

Tableau 22 : Pourcentage d'inhibition observée avec *Phaeodactylum tricornutum*

Produit	Dose maximale testée (µg/L)	Réponse (% inhibition)
Carbendazime	1 000	7
	1 000	12,7
	1 000	<1
Carbofuran	810	7,4
	810	10
	810	11
Deltaméthrine	1 000	6,6
	1 000	8,5
	1 000	4,9
Glyphosate	9200	1
	92000	9,1
	92000	<1
	10 000	13

S-Métolachlore	10 000	18,5
	10 000	9,6

Seul le diuron a montré une toxicité marquée vis à vis de l'algue testée.
Trois séries de tests sont exploitables et ont permis des calculs de CE₅₀ variant entre 24 et 52 µg/L.

Tableau 23 : Essais du diuron sur *Phaeodactylum tricornutum*.

Date essais	CE ₅₀ (µg/L)	Intervalle de confiance à 95 % (µg/L)
15/04/2009	24,6	19,9 < CE ₅₀ < 29,6
12/05/2009	51,2	44,2 < CE ₅₀ < 64,6
23/03/2010	31,8	28,3 < CE ₅₀ < 35,9

Date essais	CE ₁₀ (µg/L)	Intervalle de confiance à 95 % (µg/L)
15/04/2009	4,4	2,5 < CE ₁₀ < 6,7
12/05/2009	0,96	0,58 < CE ₁₀ < 1,6
23/03/2010	3,6	2,5 < CE ₁₀ < 4,9

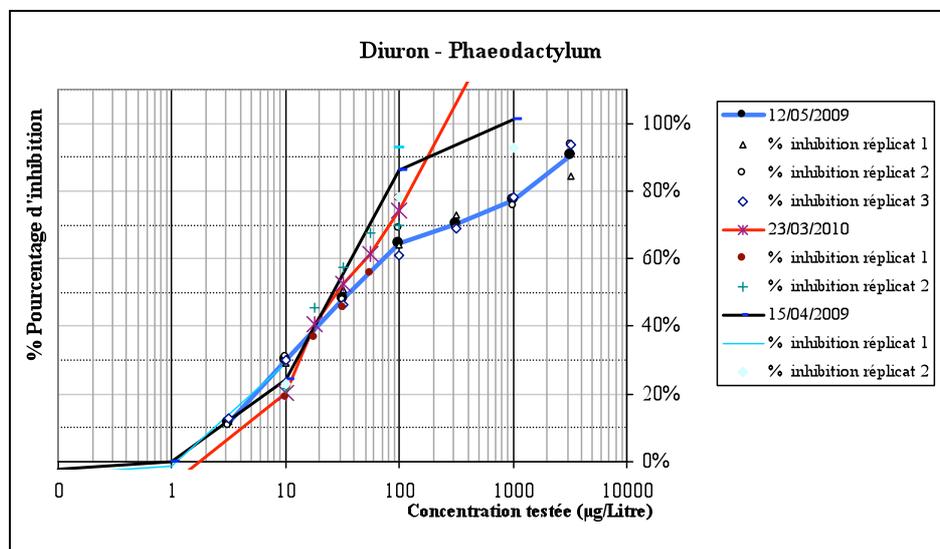


Figure 13 : Exemple d'une courbe obtenue avec le diuron sur *Phaeodactylum tricornutum*

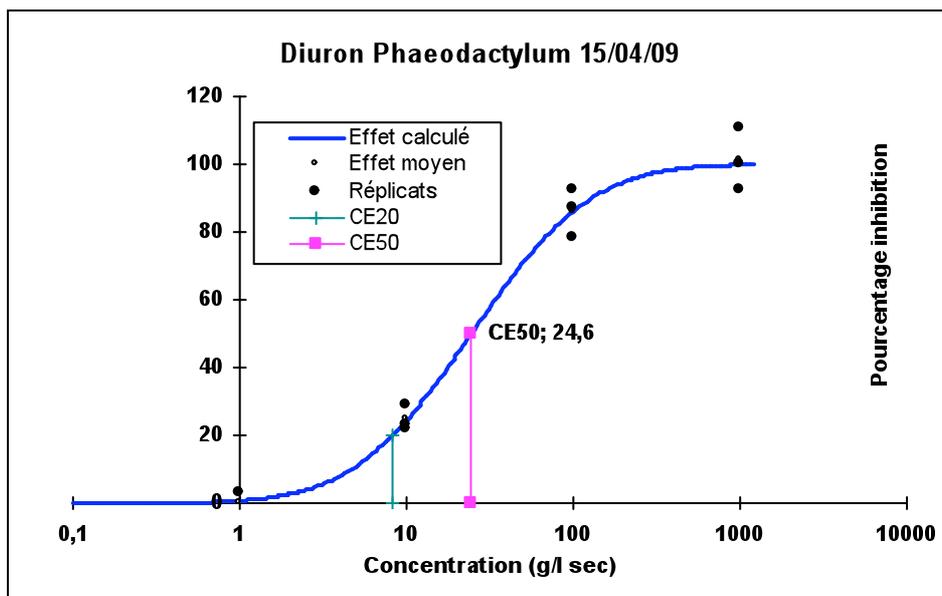


Figure 14 : Exemple d'une courbe obtenue avec le diuron sur *Phaeodactylum tricorutum*

5.3.2. Sur les modèles tropicaux

Près de 80 essais ont été effectués avec les produits pesticides sélectionnés sur les deux organismes tropicaux ciblés.

Seules deux produits montrent un effet quantifiable, le diuron et dans une moindre mesure le S-métolachlore sur la diatomée *Navicula* sp. Pour ce dernier produit, seul un essai s'est avéré exploitable pour le calcul de la CE₅₀.

Pour le diuron, quatre essais par organisme permettent de calculer une CE₅₀ moyenne significative.

Tableau 24 : Effets de cinq substances observés sur *Navicula* sp.

Substance	Dose maximale testée (µg/L)	Nb de tests	Réponse
Carbendazime	1 000	3	10 % d'inhibition à dose maximale **
Carbofuran	680	10	15 % d'inhibition à dose maximale**
Deltaméthrine	785	7	Aucun effet *
Glyphosate	1 000	6	Aucun effet *
S-Métolachlore	1 400	3	CE ₅₀ = 1 528 µg/L (1 246-4 058), n = 1

* test ANOVA : pas d'effet significatif au risque d'erreur (0,05) à dose maximale testée.

** effet significatif, données insuffisantes pour calcul CE₅₀.

Tableau 25 : Effets observés de cinq substances sur *Symbiodinium sp.*

Substance	Dose maximale testée (µg/L)	Nb de tests	Réponse
Carbendazime	1 000	9	Aucun effet *
Carbofuran	680	10	10 % d'inhibition à dose maximale **
Deltaméthrine	785	6	Aucun effet *
Glyphosate	1 000	3	Aucun effet *
S-Métolachlore	1 400	5	Aucun effet *

* test ANOVA : pas d'effet significatif au risqué d'erreur (0,05) à dose maximale testée.

** effet significatif, données insuffisantes pour calcul CE₅₀.

Tableau 26 : Détail des essais réalisés avec le diuron sur *Navicula sp.*

Numéro essais	CE ₅₀ (µg/L)	Intervalle de confiance à 95 % (µg/L)
AD010	12,22	7,46 < CE ₅₀ < 22,4
AD018	41,21	30,26 < CE ₅₀ < 60,48
AD029	19,16	17,59 < CE ₅₀ < 21,12
AD030	18,76	17,49 < CE ₅₀ < 20,13

Tableau 27 : Détail des essais réalisés avec le diuron sur *Symbiodinium sp.*

Numéro essais	CE ₅₀ (µg/L)	Intervalle de confiance à 95 % (µg/L)
AZ005	42,74	37,13 < CE ₅₀ < 50,36
AZ012	29,53	23,94 < CE ₅₀ < 37,82
AZ015	26,92	25,50 < CE ₅₀ < 28,29
AZ022	41,30	37,52 < CE ₅₀ < 45,95

5.3.3. Synthèse

Les Tableaux 28 et 29 reprennent les résultats obtenus sur les trois organismes phytoplanctoniques étudiés dans le projet.

Tableau 28 : pourcentages d'inhibition mesurés sur les trois organismes phytoplanctoniques testés. Valeurs exprimées en µg/L pour des expérimentations réalisées avec n=1 à 7)

Substance	Effet sur zooxanthelles <i>Symbiodinium</i> sp. (ZX02)	Effet sur Diatomées tropicale <i>Navicula</i> sp. (D007)	Effet sur <i>Phaeodactylum tricornutum</i>
Carbendazime	Aucun effet * à 1000	10 % à 1000 **	10 % à 1000
Diuron	CE ₅₀ = 35,1 ± 8,1	CE ₅₀ = 22,8 ± 12,6	CE ₅₀ = 35,9 ± 13,8
Glyphosate	Aucun effet * à 1000	Aucun effet * à 1000	Aucun effet * à 1 000
S-Métolachlore	Aucun effet * à 1 400	CE ₅₀ = 1 528	Aucun effet * à 1 000
Carbofuran	10 % à 680 **	15 % à 680 **	10 % à 810
Deltaméthrine	Aucun effet * à 785	Aucun effet * à 785	6 % à 1000

* test ANOVA : pas d'effet significatif au risque d'erreur (0,05) à dose maximale testée.

** effet significatif, données insuffisantes pour calcul CE₅₀.

Tableau 29 : CSEO déterminées pour les substances testées sur les trois organismes phytoplanctoniques (µg/L ± IC 95 %).

Substance	<i>Symbiodinium</i> sp.	<i>Navicula</i> sp.	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>
Carbendazime	>1 000	1 000 ***	1 000 ***
Diuron	11,0 ± 2,6 *	5,7 ± 4,6 *	3,8 ± 1,8 *
Glyphosate	1 000 ***	1 000 ***	1 000 ***
S-Métolachlore	ND	10,7 (0,1-119,5)	10 000 ***
Carbofuran	680 ***	680 ***	810 ***
Deltaméthrine	ND	ND	1 000 ***

* CE₁₀ obtenue par REGTOX

** CE₁₀ obtenue graphiquement.

***CSEO estimée, égale à la dose maximale testée.

L'ensemble de ces essais montre une grande similitude de réaction entre les diatomées tropicales et tempérées dans ces conditions expérimentale et vis à vis des produits testés.

Ces organismes sont très sensibles au diuron. Concernant les deux autres herbicides testés, seul le S-métolachlore semble avoir un effet sur la diatomée tropicale, *Navicula* sp., avec une CSEO calculée à 10,7 µg/L. Ce résultat reste à confirmer.

L'ensemble de ces résultats ne permet pas d'établir une différence de sensibilité entre les espèces phytoplanctoniques d'eau douce ou marines, ni même entre tropicale et tempéré. Globalement, les sensibilités observées sont du même ordre de grandeur d'une manière générale.

6. ECHINODERMES : OURSIN

6.1. Mise au point du modèle tropical

Les tests d'embryotoxicité sont possibles sur au moins une espèce d'oursin, voire deux (*Echinometra mathaei* et *Tripneustes gratilla*) à La Réunion.

Les essais effectués caractérisent une période de maturation gonadique satisfaisante pour la bonne pratique des tests de novembre à avril. En dehors de cette période, les individus ne sont pas matures (peu de gamètes récoltés ou taux de fécondation < 60 %).

Entre décembre et avril 2008, plusieurs expérimentations ont permis de valider le protocole, proche de celui de l'ASTM.

Dans nos conditions expérimentales (eau de mer naturelle, température de 26 °C), les premiers résultats montrent :

- un taux de fécondation toujours supérieur à 90 %, pour le couple sélectionné ;
- une première division observée entre 75 et 90 minutes après fécondation ;
- le stade larve *pluteus* normale observée après 48 heures d'incubation à 26 °C ;
- les taux de réussite dans les témoins supérieurs à 80 % de larves *pluteus* « normales » ;
- cinq types d'anomalies ont été observés durant les essais avec le sulfate de cuivre et le bichromate de potassium (Figure 15) : des embryons bloqués au stade *blastula* et *exogastrula*, des retards de croissance (*pluteus* retardé), des anomalies morphologiques (baguettes somatiques raccourcies ou tordues).

Facile à mettre en œuvre, les tests préliminaires pour ce bioessai ont permis de bien encadrer le protocole expérimental.

La sensibilité sera testée pour chaque géniteur par la réalisation systématique d'un essai avec du sulfate de cuivre en parallèle des bioessais.

6.1.1. Le protocole mis au point

L'espèce choisie pour ces essais est *Echinometra mathaei*. Les individus sont prélevés le matin du début de l'essai sur le récif corallien de Grand-Fond (St-Gilles, La Réunion).

Conditions expérimentales

- eau de mer filtrée sur GF/F, prélevé le même jour que les oursins ;
- pH : $8,00 \pm 0,2$; Salinité 35,0 ‰ ;
- température de incubation : 26 ± 1 °C, obscurité ;
- durée du test : 48 h ;
- essais réalisés dans des pots en polystyrène cristal stérile ;
- observation et dénombrement à l'aide du microscope inversé CK2 Olympus.

Protocole expérimental

Le protocole correspond à celui décrit par : Pagano *et al.*, 1986 ; 1996 ; His 1996 ; Trieff, 1995 ; Bayed *et al.*, 2005 ; De Nicola *et al.*, 2004, 2007 ; Meriç *et al.*, 2005.

Les gamètes des géniteurs males et femelles sont sélectionnées en fonction de leur maturité et de la mobilité des spermatozoïdes. La fécondation est réalisée en eau de mer filtré et prélevée le jour même.

Les œufs fécondés sont inoculés dans les milieux à tester 15 mn après la fécondation à raison de 20 à 50 000 / litre ;

Les essais sont réalisés en pots de polystyrène cristal, à raison de 30 ml de milieu à tester par pot et en triplicat pour chaque concentration testée.

Les pots sont placés en enceinte thermostatée sans lumière pendant 48 h à $26,0 \pm 1$ °C, période au bout de laquelle le stade larve *pluteus* est atteint.

A la fin de l'exposition, le dénombrement des anomalies du développement embryo-larvaire peut être réalisé directement dans les pots. Les larves sont fixées par ajout d'une à deux gouttes de formol neutre à 8 %. Les observations sont réalisées immédiatement à l'aide d'un microscope inversé, Le comptage est réalisé sur 100 larves par réplication.

Le stade final est la larve *pluteus*, et il est possible d'observer plusieurs types d'anomalies de développement. Ainsi chaque larve observée sera classée dans les catégories suivantes (Figure 9) :

- a) développement normal
- b) développement bloqué au stade *exogastrula* ;
- c) *pluteus* retardée ;
- d) longueurs inégales des baguettes somatiques ;
- e) baguettes somatiques tordues ;
- f) larve morte.

La sensibilité au CuSO₄ (toxique de référence) est testée systématiquement pour chaque couple.

- les bioessais retenus sont ceux où le taux de fécondation est supérieure à 90 %, et ceux ayant un taux d'anomalies dans les témoins inférieur à 10 % ;
- les calculs de % d'anomalies sont réalisés pour chaque concentration de produit testé ;
- la détermination des CE est réalisé avec le logiciel REGTOX.

6.1.2. Contrôle qualité

Un contrôle qualité a été réalisé sur chaque série de couple utilisé dans nos essais tropicaux. Ainsi 35 essais avec du CuSO₄ ont été réalisés.

Six essais ont montré des résultats aberrants, disqualifiant de fait le couple sujet.

La valeur moyenne des CE₅₀ obtenues à 48 h avec ce toxique de référence est de : **74,97 ± 4,66 µg/L (n=24) pour le sulfate de cuivre (29,85 ± 1,86 µg/L (n=24) équivalent Cu²⁺)**.

Le faible écart type obtenu reflète la stabilité de ce protocole dans les conditions expérimentales retenues.

La sensibilité observée avec ce toxique est comparable à celle du modèle tempéré *Paracentrotus lividus* (Manzo, 2004).

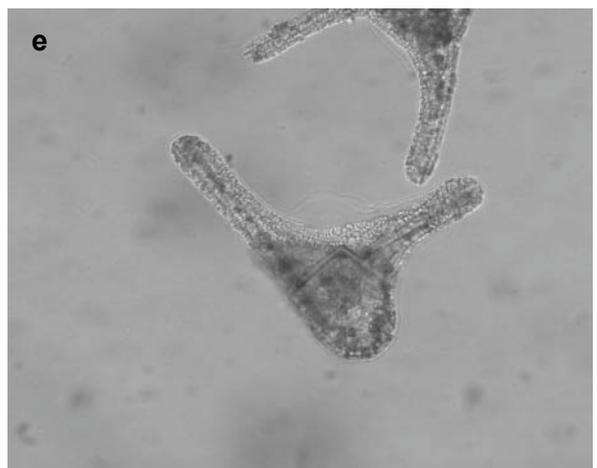
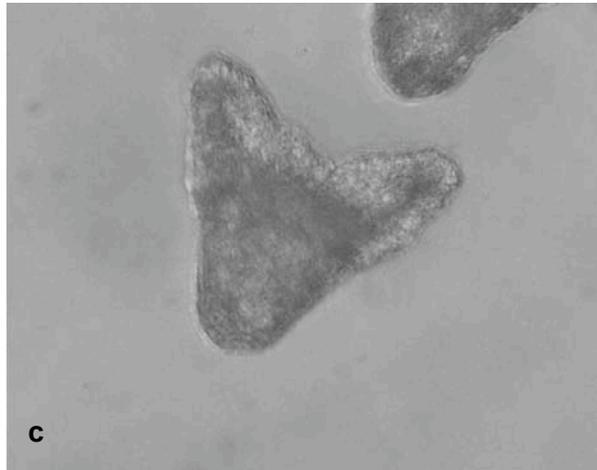
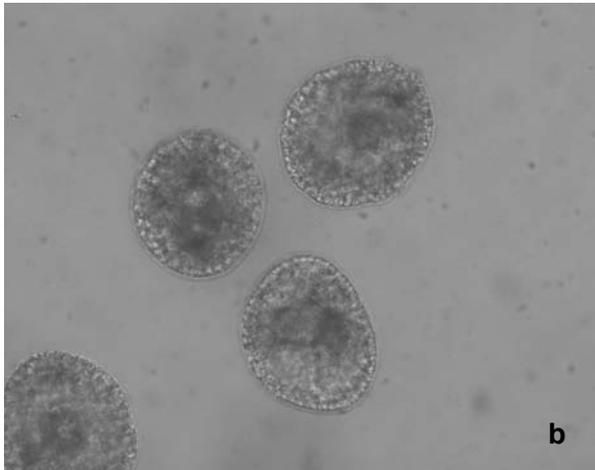


Figure 15 : Les différentes anomalies observées au cours du développement embryonnaire-larvaire de Echinometra mathaei. (a) développement normal, (b) exogastrula, (c) pluteus retardé, (d) longueur inégales des baguettes somatiques, (e) baguette somatique tordue. (Photos ARVAM)

6.2. Le modèle tempéré

Les essais ont été réalisés au centre de Brest d'Ifremer.

6.2.1. Méthode

Pour les essais sur oursin tempéré, c'est l'espèce *Paracentrotus lividus* qui a été retenue. Les organismes proviennent de la pointe de Bretagne et ont été employés pendant leur période de maturation naturelle.



Figure 16 : *Paracentrotus lividus* (Photo FQ- Ifremer©)

Eau de mer référence

L'eau de mer employée est une eau naturelle provenant de l'écloserie Ifremer d'Argenton où elle est préfiltrée sur cartouche de 1 µm de vide de maille. Elle est stockée en chambre thermostatée à 15 °C et à l'obscurité et est employée dans les 15 jours qui suivent l'échantillonnage. Avant emploi, elle est filtrée sur membrane millipore de vide de maille 0,2 µm et ramenée à la salinité 33.

Cette eau a servi à la récupération des gamètes, la réalisation des fécondations et la préparation des milieux à tester.

Toxique de référence

Pour chaque essai, une gamme de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ est employée pour vérifier la sensibilité des embryons au cuivre.

Le $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a été testé à des concentrations allant de 0 à 200 µg de sulfate de cuivre/L d'eau de mer référence. Cette gamme est réalisée à partir d'une solution stock de concentration 100 mg/L d'eau ultra pure (traitée à 0,22 µm sur appareil Millipore MilliQ).

Protocole expérimental

Le protocole correspond à celui décrit par : Pagano *et al.*, 1986 ; 1996 ; His 1996 ; Trieff, 1995 ; Bayed *et al.*, 2005 ; De Nicola *et al.*, 2004, 2007 ; Meriç *et al.*, 2005.

Les gamètes des géniteurs males et femelles sont sélectionnées en fonction de leur maturité et de la mobilité des spermatozoïdes. La fécondation est réalisée en eau de mer référence, les œufs fécondés sont inoculés dans les milieux à tester 15 mn après la fécondation à raison de 30 000 œufs fécondés/Litre.

Les essais sont réalisés en pots de polystyrène cristal, à raison de 30 ml de milieu à tester par pot et en triplicat pour chaque concentration testée.

Seuls les essais répondant aux critères de validité sont retenus pour l'exploitation des résultats.

Une fois tous les milieux inoculés, ces derniers sont placés en enceinte thermostatée sans lumière pendant 72 h à $17,5 \pm 1$ °C, période au bout de laquelle le stade larve *pluteus* est atteint.

A la fin de l'exposition, le dénombrement des anomalies du développement embryo-larvaire peut être réalisé directement dans les pots. Les larves sont fixées par ajout d'une à deux gouttes de formol neutre à 8 %. Les observations se font juste après ajout du formol, sous une hotte aspirante.

Les observations s'effectuent à l'aide d'un microscope inversé, ce qui permet de ne pas avoir de perte ou de détérioration du matériel biologique provoquées par la filtration et pouvant modifier significativement les résultats. Le comptage est réalisé sur 100 organismes par répliquat.

Le stade final dans ces expérimentations est la larve *pluteus* ; les observations portent alors sur les différents types et/ou anomalies du développement. Elles sont classées en cinq catégories décrites par Klöckner *et al.* (1985), Pagano *et al.* (1986 ; 1987), Lassus *et al.* (1990), Quiniou et Guillou (1999), Guillou *et al.* (2000) ; Bayed *et al.* (2005) et illustrées avec les *Figure 17* et *Figure 18* :

- N = *pluteus* normal ;
- R = *pluteus* retardé ou inhibé, dont la taille est < à deux fois celle de N ;
- P1 = *pluteus* pathologique : malformation du squelette et/ou du tube digestif ;
- P2 = développement bloqué aux stades : *prisme*, *gastrula*, *blastula*, *morula*
- E = blocage aux premières divisions voir fécondation ;
- D = larve morte.

Validité des bioessais et traitement des résultats

Seuls les résultats des bioessais où le taux de fécondation, dans les témoins, est d'au moins 80 ± 5 % ont été retenus pour les calculs des CE₅₀ et CSEO.

La sensibilité au CuSO₄ a été mesurée sur chaque série. La CE₅₀ CuSO₄ moyenne calculée est de 85 µg/L (écart-type ± 15 µg/L).

Les résultats présentés correspondent aux moyennes des observations pour les différents réplicats, complétées par l'intervalle de confiance à 95 % (IC 95 %).

Les CE₅₀ et CE₁₀ = CSEO (concentration sans effet observé) ont été déterminées graphiquement ou à l'aide du logiciel REGTOX en utilisant le modèle de Hill.

Elimination des déchets

A la fin des essais les solutions testées sont séparées suivant leur nature et récupérées dans des contenants prévus à cet effet, ces derniers sont stockés dans un local dédié. C'est la société SARP Ouest – Saniroise qui en assure le traitement.

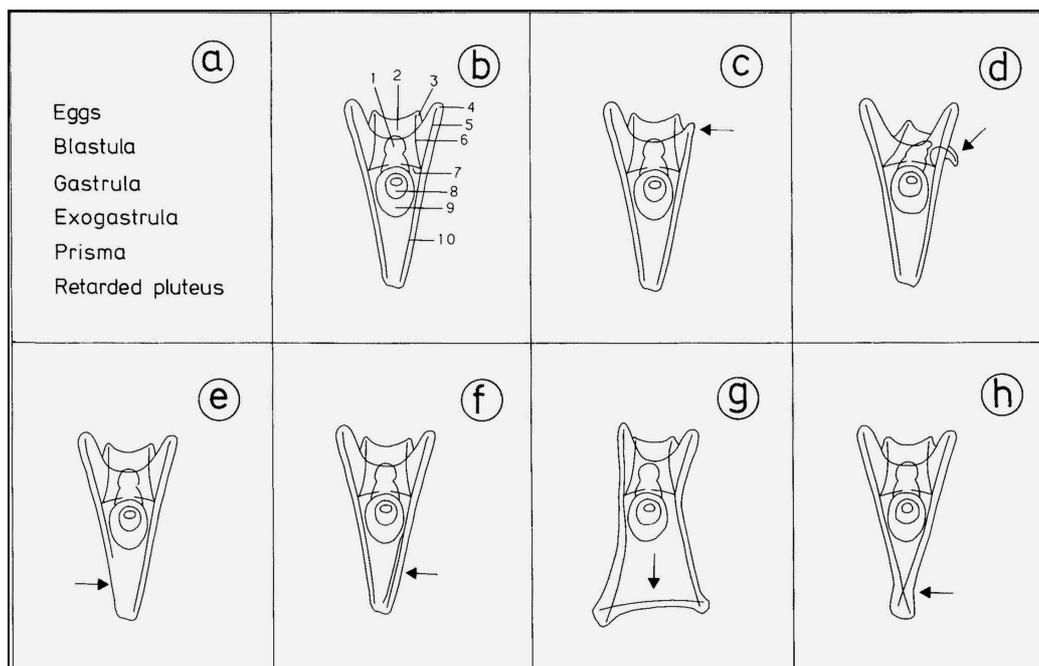


Figure 17 : Différentes anomalies du développement embryonnaire chez *Psammechinus miliaris* applicable pour *Paracentrotus lividus* (d'après Klöckner et al., 1985). a : stades embryonnaires (P2 en jaune) et pluteus retardés (R en orange) ; b : pluteus normal (N) ; c à h : anomalies morphologiques des plutei (P1).

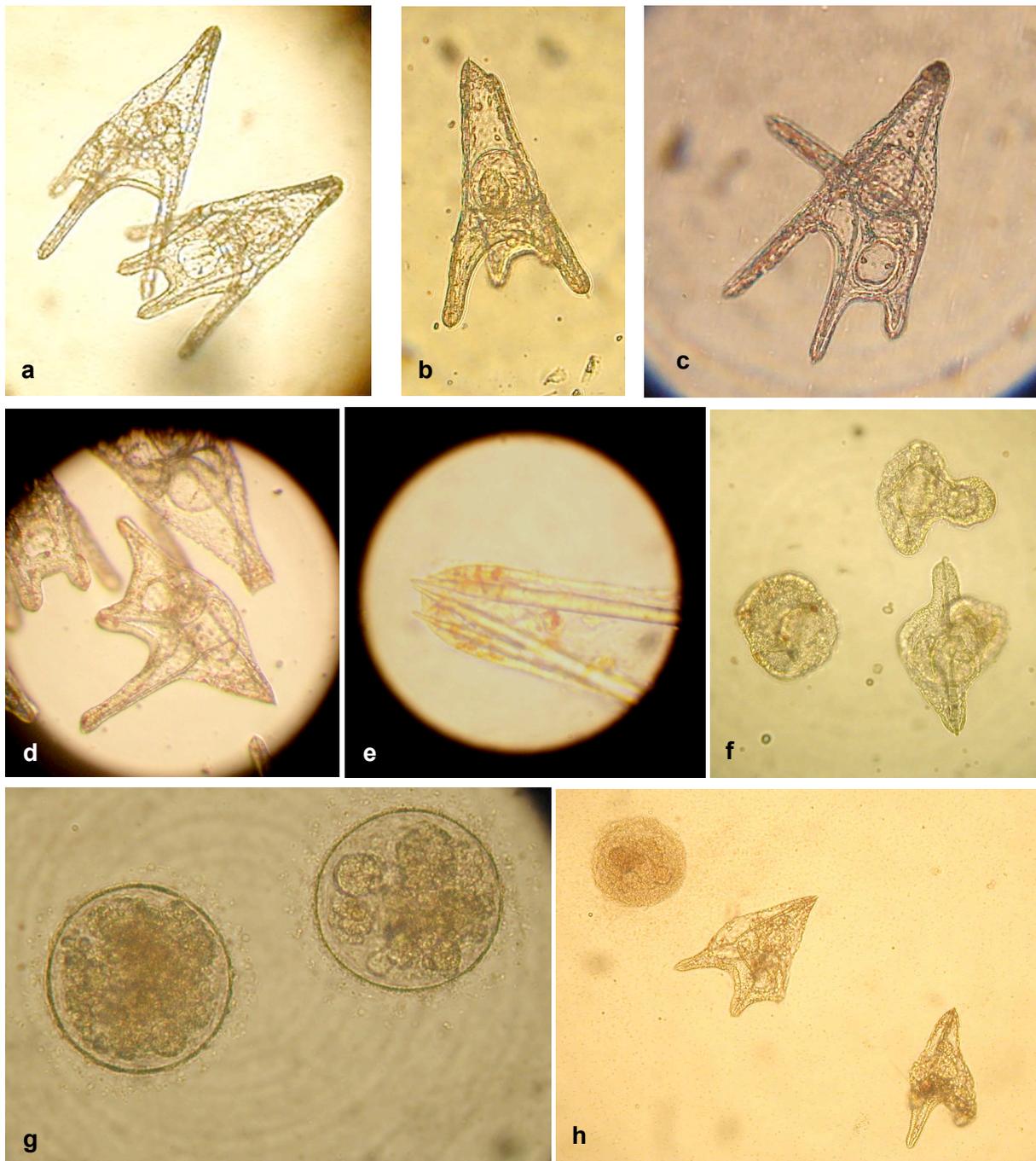


Figure 18 : (a) larves pluteii normales de *Paracentrotus lividus* : longueur environ 300 μm . (b-e) Anomalies morphologiques de plutei chez *paracentrotus lividus* : (b) spicules non jointes au sommet du pluteus, (c et d) bras antérieurs ou postérieurs déformés, (e) extrémités des spicules fourchues, (f et h) prismes anormaux, (g et h) blocage au stade embryon (Photos FQ. Ifremer©).

6.3. Résultats

6.3.1. Sur le modèle tempéré

Tableau 30 : CE_{50} et CSEO (ou CE_{10}) calculées pour les six substances testées sur *Paracentrotus lividus*.

Substance	Concentration maximale testée ($\mu\text{g/L}$)	CSEO ($\mu\text{g/L}$)	IC 95 %	CE_{50} ($\mu\text{g/L}$)	IC à 95 %
Carbendazime	635,8	0,774	0,655 – 3,273	1,011	0,881 - 3,666
Glyphosate	76,99	> 76,99	ND	ND	ND
Diuron	898,25	> 898,25	ND	ND	ND
S-Métolachlore	1 095	4,82	ND	76 596	ND
Deltaméthrine	564,14	597,52	176,28 – 5805,75	7 992	913,4 – 5,2.10 ¹⁰
Carbofuran	962,68	717,21	135,10 – 1 497,21	16 034	1 463,81 - 34,0.10 ⁶

ND : non déterminable

Le carbendazime induit un effet toxique sur le développement embryonnaire de la larve d'oursin significatif. Avec une CE_{50} de 1 $\mu\text{g/L}$, cette toxicité est considérée comme forte.

Les autres substances ne montrent pas d'effet toxique significatif. Cependant des CE_{10} ont pu être déterminées pour la deltaméthrine, le S-métolachlore et le carbofuran.

6.3.2. Sur les modèles tropicaux

Plus de 30 essais ont été effectués avec les substances du programme. La plupart ont été validés et ont permis de déterminer une CE_{50} (Tableau 31) et une CSEO (Tableau 32).

Le carbendazime induit un effet toxique sur le développement embryonnaire de la larve d'oursin significatif. Avec des CE_{50} calculée qui varie de 49,5 à 159,1 $\mu\text{g/L}$, la sensibilité du modèle est bonne.

Les autres substances ne montrent pas d'effets toxiques importants. Cependant des CE_{50} et des CSEO ont pu être déterminées pour la deltaméthrine, le S-métolachlore et le diuron (CE_{10} déterminées par REGTOX).

Tableau 31 : CE_{50} calculées pour les six substances testées sur *Echinometra mathaei*. Les valeurs sont exprimées en $\mu\text{g/L}$ et les intervalles de confiance arrondis à l'unité près.

Substance	Référence	Concentration maximale testée ($\mu\text{g/L}$)	CE_{50} ($\mu\text{g/L}$)	IC à 95 % ($\mu\text{g/L}$)		
Diuron	OUR049	982,7	4 815,6	3 315	< CE_{50} <	9 559
Diuron	OUR050	982,7	1 681,0	1 651	< CE_{50} <	1 709
Diuron	OUR065	1 878,4	4 611,4	2 587	< CE_{50} <	11 925
Diuron	OUR066	1 878,4	2 479,5	2 402	< CE_{50} <	10 840
Diuron	OUR070	1 878,4	4 156,1	2 492	< CE_{50} <	15 513
Diuron	OUR071	1 878,4	2 740,9	2 528	< CE_{50} <	126 447
Diuron	OUR090	1 878,4	3 949,7	2 258	< CE_{50} <	15 864
Deltaméthrine	OUR057	222	665,7	285	< CE_{50} <	7 084
Deltaméthrine	OUR058	222	475,7	282,1	< CE_{50} <	92 923 112
Deltaméthrine	OUR086	222	651,7	313,3	< CE_{50} <	2 099,9
Carbendazime	OUR054	629,2	72,2	71,9	< CE_{50} <	72,4
Carbendazime	OUR059	314,6	153,5	140,7	< CE_{50} <	157,0
Carbendazime	OUR060	314,6	49,5	45,6	< CE_{50} <	51,9
Carbendazime	OUR081	314,6	159,1	158,7	< CE_{50} <	159,5
Carbendazime	OUR082	314,6	95,2	86,1	< CE_{50} <	100,3
Carbendazime	OUR085	314,6	148,8	134,3	< CE_{50} <	151,5
Carbendazime	OUR095	314,6	151,0	118,9	< CE_{50} <	155,4
Carbendazime	OUR096	314,6	70,4	61,9	< CE_{50} <	74,2
Carbendazime	OUR099	314,6	90,4	87,2	< CE_{50} <	93,4
Carbendazime	OUR100	314,6	90,6	87,9	< CE_{50} <	92,7
S-Métolachlore	OUR043	715	*		< CE_{50} <	
S-Métolachlore	OUR044	715	*		< CE_{50} <	
S-Métolachlore	OUR045	715	*		< CE_{50} <	
Carbofuran	OUR076	2 000	*		< CE_{50} <	
Carbofuran	OUR077	2 000	*		< CE_{50} <	
Carbofuran	OUR078	2 000	*		< CE_{50} <	
Glyphosate	OUR037	1 000	*		< CE_{50} <	
Glyphosate	OUR038	1 000	*		< CE_{50} <	
Glyphosate	OUR039	1 000	*		< CE_{50} <	

* test ANOVA : pas d'effet significatif au risqué d'erreur (0,05) à dose maximale testée.

Tableau 32 : CSEO calculées pour les six substances testées sur *Echinometra mathaei*.

Substances	Concentration maximale testée (µg/L)	CSEO (µg/L)
Carbendazime	314,6	90,5 ± 42,3 (n=10)*
Diuron	222	1 949,2 ± 313,6 (n=6)*
Glyphosate	1 000	1 000**
S-Métolachlore	715	715**
Carbofuran	2 000	2 000**
Deltaméthrine	629,2	280,3 ± 21,2 (n=13)*

* CE₁₀ obtenue par REGTOX

** CE₁₀ obtenue graphiquement.

***CSEO estimée, égale à la dose maximale testée.

6.3.3. Synthèse

Les tests d'embryotoxicité sont comparé sur les deux espèces : *Echinometra mathaei*, oursin tropical et *Paracentrotus lividus*, oursin tempéré. Aucune différence de sensibilité vis à vis du Sulfate de Cuivre (toxique de référence utilisée) n'est notée entre organisme tropical et tempéré.

Le Tableau 33 reprend les résultats obtenus avec les six substances du programme.

Tableau 33 : Effets obtenus des pesticides sur le développement embryo-larvaire des deux espèces d'oursin testées (CE₅₀ et valeurs maximales sans effet sont exprimées en µg/L ± IC 95 % ; n = 3 à 10).

substances	tropical <i>Echinometra mathaei</i>	tempéré <i>Paracentrotus lividus</i>
Carbendazim	108,1 ± 40,9	1,01
Diuron	3 491 ± 1 192	Aucun effet * à 898
Glyphosate	Aucun effet * à 1 000	Aucun effet * à 77
S-Métolachlore	Aucun effet * à 715	76 596,
Carbofuran	Aucun effet * à 2 000	16 000
Deltaméthrine	597,7 ± 105,9	7 800

* test ANOVA : pas d'effet significatif au risqué d'erreur (0,05) à dose maximale testée.

Les essais effectués montrent un effet significatif avec le fongicide carbendazime. Une différence de sensibilité face à cette substance est notée entre tropicale et tempéré. La CE₅₀ calculée pour *E. mathaei* est obtenue sur une série de 10 essais effectués avec des gammes de concentrations plus rapprochées de cette CE₅₀. Cependant cette différence dans le calcul ne peut expliquer à lui seul ce rapport de 1 à 100 observé.

Pour *Paracentrotus lividus*, dès la concentration de 9,27 µg/L notons qu'il y a 100 % d'anomalie avec 90,7 % d'organismes bloqués au stade embryon. Ces 100 % d'anomalie sont observés à partir de 151,2 µg/L de composé actif.

Très peu de résultats sont retrouvés dans la littérature. Quelques études montrent une sensibilité très importante des macro-invertébrés d'eau douce à la carbendazime, sa toxicité s'exprimant au-dessus de 3,3 µg/L.

Ainsi le modèle oursin représente une cible appropriée pour l'étude toxicologique de cette catégorie de produit.

Le glyphosate, le diuron, le carbofuran et le S-métolachlore n'induisent pas d'effet observable aux concentrations testées. Il n'y a aucune tendance nette et aucune valeur significative qui ont pu être calculée par le Regtox.

La deltaméthrine l'un des produits de LAV (Lutte Anti Vectorielle), donne une CSEO à peu près égale à la concentration maximale testée (597 µg/L) pour *P. lividus*. Une CE₅₀ a pu être estimée avec le modèle tropical, 598 µg/L, avec une CSEO de 280 µg/L. Quoique que modérée, la deltaméthrine induit un effet sur le développement de la larve d'oursin.

Cette substance a été retrouvée dans l'environnement marin lors de la crise du Chikungunya en 2005 (Turquet *et al.* 2006), en fond de baie dans des oursins biofilmovores.

Une attention particulière peut-être portée à cette molécule dans les prochaines études, en combinant les essais toxicologiques aux dosages systématiques des concentrations en contact *in vitro*, afin de bien caractériser la toxicité de ce produit.

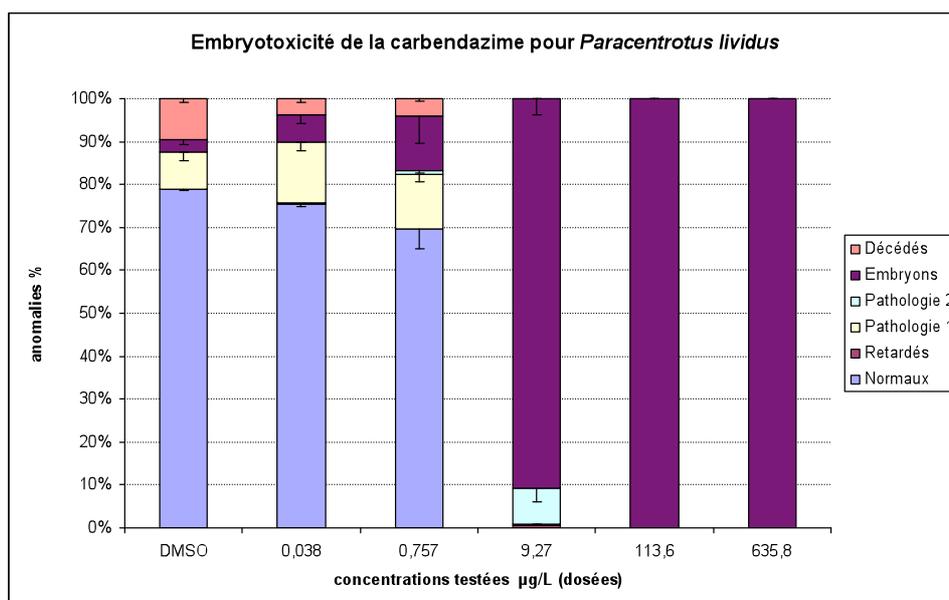


Figure 19 : Effet du carbendazime sur le développement embryonnaire de *Paracentrotus lividus*.

7. MOLLUSQUES

Un autre projet complémentaire à ERICOR a été soumis à l'ANR en 2007 (mise au point d'un biomarqueur d'exposition dans le cadre de la lutte contre le Chikungunya, « EnviroCHIK »), mais n'a pas été retenu. Une activité spécifique prévue dans ce projet a dû être intégrée dans le présent programme. Ainsi, le développement du test d'embryotoxicité de bivalve tropical a été entrepris.

7.1. Mise au point du modèle tropical

Le bioessai ciblé porte sur le développement embryo-larvaire, principe identique à celui développé pour l'huître et la moule.

Pour la mise au point de ce test, deux espèces de bivalves ont été sélectionnées :

- *Modiolus auriculatus*, moule de récif corallien et
- *Pinctada margaritifera*, huître perlière rencontrée dans la concession marine de l'ARDA (Figure 12).

Une vingtaine d'essais d'obtention de gamètes a été réalisée de novembre 2007 à avril 2008, période supposée de maturation et de ponte pour la modiole (ARVAM, programme modiole).

Les techniques par choc thermique ont été utilisées pour les deux mollusques, *P. margaritifera* et *Modiolus auriculatus*. L'induction de la ponte doit être réalisée par stimulation thermique dans des bacs d'eau de mer à 20 et 32 °C (au préalable les organismes passent une nuit à 20 °C à sec).

Aucune émission de gamètes n'a été observée durant la saison. Nous avons fait varier de nombreux paramètres, comme les temps d'alternance entre bain chaud et froid, les températures de chaque bain, etc., sans succès.

Les tentatives de récupération de gamètes par scarification des gonades n'ont pas donné de gamètes fertiles. Des techniques chimiques de maturation gonadique ont aussi été utilisées sans succès.

Le modèle modiole a donc été abandonné. L'espèce présente à La Réunion, *Modiolus auriculatus*, est de petite taille (2 - 4 cm), les gonades n'y sont pas très développées, et les pontes sur la barrière récifale sont souvent diffuses sur plusieurs semaines. Ainsi, avec ce modèle, la mise au point d'un test (utilisant un unique couple de géniteurs par essai) est compromise.

Nos efforts ont ensuite été concentrés sur des bivalves plus gros, à savoir *Pinctada margaritifera*, et *Pinctada maculata*, deuxième espèce présente sur la concession marine de l'ARDA.

Des essais d'obtention de gamètes ont été réalisés durant la saison chaude 2008-2009, période de maturité sexuelle. Toutes les tentatives réalisées n'ont pas donné de résultats concluants. L'effort a été reporté sur le développement du test corail, en fin de programme.

Ces espèces d'huîtres sont bien étudiées sous les tropiques car utilisées dans la perliculture. Dans le cadre du développement de ce bioessai, une étude spécifique doit être entreprise à La Réunion, afin de mieux définir leurs cycles de reproduction et pour tester les différentes techniques de collecte de gamètes.

La deuxième piste de développement de l'embryotoxicité de larve de bivalves tropicaux pourrait être des bénitiers d'élevage. La stabulation et culture de ces organismes sont assez répandues. A La Réunion, une société s'est lancée depuis 2009 dans ce type d'élevage, qui

pourrait à moyen terme représenter une source de larve potentielle pour le développement de ce bioessai.



Figure 20 : Spécimen de *Pinctada margaritifera* dans un bain chaud à 32 °C (Photo ARVAM)

7.2. Le modèle tempéré

Des essais sur un modèle tempéré ont été entrepris en parallèle du développement du bioessai tropical, *Crassostrea gigas*, huître creuse.

7.2.1. Méthode

La méthodologie employée suit la norme XP T90-382 (09/2009) "Détermination de la toxicité potentielle d'échantillons aqueux sur le développement embryo-larvaire de bivalve".

Les solutions de composés à tester obtenues en DMSO ou en eau ultra pure sont diluées dans une eau de mer de synthèse et les suspensions obtenues sont directement utilisées pour le développement larvaire.

Les œufs fécondés obtenus à partir d'huîtres matures *Crassostrea gigas* conditionnées en éclosérie sont rapidement répartis dans les milieux à tester.

Le développement des larves d'huîtres se déroule à une température de 24 °C pendant 24 heures à l'obscurité.

A la fin de l'incubation les larves sont fixées par ajout de formaldéhyde. Les larves obtenues sont alors observées au microscope.

La qualité des larves est appréciée en deux catégories : larves normales (Figure 13) ou anormales (manteaux sortant partiellement de la coquille, coquilles mal formées, segmentations et tailles anormales).

La dose déterminant 50 % de larves anormales (CE_{50}) est déterminée avec son intervalle de confiance à 95 %.

Les conditions opératoires sont contrôlées pour chaque ponte à l'aide d'un essai sur un toxique de référence : le sulfate de cuivre.



Figure 21 : Larves D normales (env. 70µm), (Photo IPL)

7.2.2. Contrôle qualité

Chaque série de tests a été accompagnée d'un test de contrôle utilisant le sulfate de cuivre. Les résultats sont en accord avec les essais d'intercalibration de la norme T90-438

Tableau 34 : *Crassostrea gigas* – essai avec le sulfate de cuivre, les CE50 sont donnés pour l'ion Cu.

Date de l'essai	CE ₅₀ (µg Cu/L)	IC à 95 %		
16/04/2009	6,3	2,7	< CE ₅₀ <	9,6
28/05/2009	3,8	3,1	< CE ₅₀ <	4,5
26/03/2010	6,6	4,2	< CE ₅₀ <	8,7

7.2.3. Résultats

La CE₅₀ n'a pu être atteinte pour trois produits : carbofuran, deltaméthrine et diuron. Pour la deltaméthrine, la CE₂₀ est dépassée à la concentration de 1000 µg/L.

Tableau 35 : Essais larves de *Crassostrea gigas* avec trois substances

Substance	Date de l'essai	Dose maximale testée (µg/L)	Réponse (% net d'anomalies)
Carbofuran	16/04/2009	810	< 1
	28/05/2009	810	< 1
	26/03/2010	810	3,7
Deltaméthrine	16/04/2009	1 000	28,5
	28/05/2009	1 000	24,2
	26/03/2010	1 000	34,7
Diuron	16/04/2009	1 000	< 1
	28/05/2009	1 000	10,9
	26/03/2010	1 000	25,2

Pour le S-métolachlore, la CE₅₀ n'a pu être calculée qu'une fois sur les trois essais pour une concentration comprise entre 597 et 5 970 µg/L alors que deux essais n'ont pas montré de toxicité à 5 970 µg /Litre.

Tableau 36 : Essais larves de *Crassostrea gigas* avec S-métolachlore

Substance	Date de l'essai	Dose maximale testée (µg/L)	Réponse (% net d'anomalies)
S-métolachlore	16/04/2009	5 970	5,8
	28/05/2009	5 970	< 1
	26/03/2010	5 970	1 000 < CE ₅₀ < 10 000

Pour deux composés, la dose induisant 50 % de larves anormales a été dépassée (carbendazime et glyphosate). Dans le cas du glyphosate, les gammes de concentrations réalisées n'ont pas permis de calculs satisfaisant des valeurs de CE₅₀.

Tableau 37 : Essais larves de *Crassostrea gigas* avec Carbendazime

Carbendazime	CE ₅₀ (µg/L)	IC à 95 %		
16/04/2009	?	10	< CE ₅₀ <	100
28/05/2009	31,3	30,8	< CE ₅₀ <	32,6
26/03/2010	11,9	11	< CE ₅₀ <	12,4

Carbendazime	CE ₁₀ (µg/L)	intervalle de confiance à 95%		
28/05/2009	19,0	18,1	< CE ₅₀ <	20,3
26/03/2010	7,4	6,1	< CE ₅₀ <	8,2

Tableau 38 : Essais larves de *Crassostrea gigas* avec glyphosate

Glyphosate	CE ₅₀ (µg/L)	intervalle de confiance à 95%		
16/04/2009	> 9200*	?	< CE ₅₀ <	?
28/05/2009	?	29000	< CE ₅₀ <	51000
26/03/2010	?	10000	< CE ₅₀ <	100000

* : 5,8% de larves anormales à 9200 µg/L

Comme pour le bioessais oursin, le carbendazime a effet significatif sur le développement de la larve d'huître. Avec des valeurs de CE₅₀ calculées comprises entre 10 et 30 µg/L (moyenne de 21,6 µg/L, n=2), la molécule a une activité toxique forte, sur cet organisme marin.

La deltaméthrine montre un effet sur le développement des larves d'huître à des concentrations très élevées. Les valeurs de CE₅₀ ont été calculées sur la base des concentrations nominales en produit dans les solutions testées. La faible solubilité ainsi que la dégradation de la molécule dans le temps ne sont pas pris en compte dans ce calcul. Ce point devrait faire l'objet d'une attention particulière lors des prochaines expérimentations.

8. CRUSTACES

8.1. Mise au point du modèle tropical

Le premier objectif du projet portait sur le choix de l'espèce à cibler. De multiples sorties exploratoires dans les lagons de l'île n'ont pas permis d'identifier de gisement compatible avec la réalisation simple d'un test sur la base d'un fouisseur (les densités observées ne sont pas suffisantes, et les refus de tamis sont souvent plurispécifiques, rendant la phase de tri très longue et délicate).

A défaut, l'utilisation de larve post éclosion de crevette produite pour l'aquaculture (à Madagascar en particulier) est *a priori* possible. Cependant cette solution n'a pas pu être retenue au cours du projet, car difficile à organiser entre nos deux îles.

La deuxième piste portait sur l'adaptation du bioessai copépode (FD ISO 14669) à une espèce tropicale. Des prélèvements et isollements ont été entrepris à partir du mois de juin 2008, dans l'optique de la mise en place d'une production au laboratoire d'une espèce. Trois séries de mésocosmes ont été entrepris afin d'isoler et de disposer de copépodes pour lancer un élevage. Ces séries ont permis d'isoler deux espèces différentes, mais aucune d'entre elle n'a atteint une concentration suffisante et un stade de maturité pour la reproduction *in vitro*. Cette piste devrait être poursuivie dans les prochaines années.

8.2. Le modèle tempéré

Des essais sur un modèle tempéré ont été entrepris en parallèle du développement du bioessai tropical, avec *Acartia tonsa*, copépode marin (Figure 14).

8.2.1. Méthode

Le test sur copépode marin est réalisé avec *Acartia tonsa*, l'un des trois copépodes prévus dans la norme FD ISO 14669 (2003) « Détermination de la toxicité létale aiguë vis à vis de copépodes marins ».

Les copépodes sont élevés au laboratoire pour travailler sur des individus d'âge contrôlé. Les solutions de composés à tester obtenues en DMSO ou en eau ultra pure sont diluées en eau de mer de synthèse et les suspensions obtenues sont directement utilisées pour le test.

Les copépodes sont répartis dans les cupules de microplaques 12 puits à raison de cinq embryons par cupule emplies de 4 ml de milieu à tester ; 20 copépodes sont utilisés par concentration.

La durée du test est de 48 heures à 20 °C avec un éclairage jour/nuit.

Une première lecture est réalisée au bout de 24 heures.

Au bout de 48 heures, les copépodes morts sont dénombrés et un calcul de CE₅₀ est effectué sur les pourcentages nets de survie.



Figure 22 : *Acartia tonsa* (env. 1 mm) (Photo IPL)

8.2.2. Contrôle qualité :

Chaque série de tests a été accompagnée d'un test de contrôle utilisant le 3-5 Dichlorophénol.

La CE_{50} doit être comprise entre 0,5 et 1,5 mg/L.

Tableau 39 : *Acartia tonsa* – essai avec 3-5 Dichlorophénol

Date de l'essai	CE_{50} (mg/L)	IC à 95 %		
14/05/2009	0,60	0,43	< CE_{50} <	0,78
22/10/2009	0,63	0,48	< CE_{50} <	0,80
24/03/2010	0,74	0,57	< CE_{50} <	0,90

Le 26/03/2010, un contrôle qualité limité à une concentration a été réalisé.

La réponse a été de 72 % d'*A. tonsa* morts à la concentration de 1 mg/L, ce qui est en accord avec la norme qui prévoit dans ce cas une réponse entre 20 % et 80 %.

8.2.3. Résultats :

La CE_{50} n'a pu être atteinte pour trois produits : carbendazime, diuron, glyphosate (Tableau 40).

Pour la carbendazime, la concentration de 1000 μ g/L est de l'ordre de la CE_{20} lors des trois essais réalisés.

Cette CE_{20} n'est atteinte qu'une fois sur trois à la concentration de 1000 μ g/L pour le diuron.

Tableau 40 : Essais *Acartia tonsa* avec trois substances

Produit	Date de l'essai	Dose maximale testée (µg/L)	Réponse (% net de morts)
Carbendazime	14/05/2009	1 000	18
	22/10/2009	1 000	21
	24/03/2010	1 000	18
Diuron	14/05/2009	1 000	24
	22/10/2009	1 000	< 1
	24/03/2010	1 000	13
Glyphosate	14/05/2009	92 000	2
	22/10/2009	92 000	< 1
	24/03/2010	92 000	11

Pour trois composés, le carbofuran, la deltaméthrine et le S-métolachlore, la dose occasionnant 50 % de larves anormales a été dépassée.

Tableau 41 : Essais *Acartia tonsa* avec S-métolachlore

S-Métolachlore	CE ₅₀ (µg/L)	IC à 95%
14/05/2009	1 000 < CE ₅₀ < 10 000	-
22/10/2009	1 000 < CE ₅₀ < 10 000	-
24/03/2010	1 000 < CE ₅₀ < 10 000	-
26/03/2010	1 800 < CE ₅₀ < 3 200	-

Tableau 42 : Essais *Acartia tonsa* avec carbofuran

Carbofuran	CE ₅₀ (µg/L)	IC à 95 %
14/05/2009	6,6	5,2 < CE ₅₀ < 8,6
24/03/2010	8,1 < CE ₅₀ < 81	
26/03/2010	27,4	22,1 < CE ₅₀ < 45,2

Carbofuran	CE ₁₀ (µg/L)	IC à 95 %
14/05/2009	0,076	0,041 < CE ₁₀ < 0,126
26/03/2010	4,6	2,6 < CE ₁₀ < 7.3

Tableau 43 : Essais *Acartia tonsa* avec Deltaméthrine

Deltaméthrine	CE ₅₀ (µg/Litre)	IC à 95 %		
14/05/2009	1,3	1,19	< CE ₅₀ <	1,42
24/03/2010	1 < CE ₅₀ < 10	-		
26/03/2010	0,35	0,31	< CE ₅₀ <	0,39

Deltaméthrine	CE ₁₀ (µg/Litre)	IC à 95 %		
14/05/2009	0,11	0,090	< CE ₁₀ <	0,130
26/03/2010	0,10	0,076	< CE ₁₀ <	0,122

Le carbofuran et la deltaméthrine ont un effet significatif sur le crustacé *Acartia tonsa*, copépode marin.

Avec des valeurs de CE₅₀ calculée proche du 1 µg/L, la deltaméthrine a une activité toxique très forte, sur ce modèle.

Plusieurs espèces d'eau douce ont été exposées à la deltaméthrine durant 48 h. Les valeurs de CL₅₀ obtenues en conditions « classiques » d'exposition vont de 0,018 µg/L (Lahr, 1998) à 0,45 µg/L (Ren *et al.*, 2009).

Cela illustre l'important pouvoir toxique de la molécule sur les crustacés, non seulement pour l'eau douce, mais pour les zones côtières, vu les faibles valeurs des concentrations létales.

Le carbofuran a été testé une fois sur un crustacé dans la littérature (Dutra *et al.*, 2009) et confirme la sensibilité du modèle à la substance, avec des concentrations létales inférieures à 100 µg/L. Ces données laissent penser que le carbofuran pourrait représenter un éventuel danger pour ce type d'organismes à proximité des sources d'utilisation.

Des données complémentaires seraient nécessaires afin de confirmer cette toxicité.

9. CORAIL

9.1. Mise au point du modèle

L'enjeu pour ce groupe emblématique des récifs coralliens consiste à trouver une méthodologie basée sur la maîtrise de boutures. L'ARDA (Association Réunionnaise pour le Développement de l'Aquaculture), partenaire sur cet axe, fournit les colonies coralliennes mères, ainsi qu'un espace d'expérimentation.

Les coraux sont des animaux protégés par la CITES, ainsi nous avons choisie de ne prélever dans le milieu naturel que des espèces, des individus, opportunistes, c.a.d. des « salissures » des cages aquacoles de l'ARDA en Baie de Saint-Paul (

Figure 23).

Deux niveaux d'essais ont été envisagés sur deux espèces de corail : *Pocillopora eydouxi* et *P. meandrina*. Le premier sur des boutures de trois à cinq cm, le deuxième sur des microboutures de quelques millimètres disposant d'un minimum de dix polypes, ceci afin de réduire les volumes d'incubation pour les bioessais.

Pour les boutures de 3-5 cm, plusieurs essais ont permis l'obtention d'un protocole satisfaisant avec des taux de survie prometteurs à 48 h. Cependant, les volumes nécessaires pour l'incubation sont relativement importants (5 litres). Ils nécessitent de plus un espace d'expérimentation non disponible de manière permanente, ainsi qu'une quantité importante de colonies mères à prélever dans le milieu naturel. De plus, cet essai est basé sur des conditions de lumière naturelle, lesquelles, entre saison fraîche et chaude, restent différentes et difficilement contrôlables (

Figure 25).

La deuxième contrainte rencontrée porte sur les conditions de stabulation de l'ARDA, qui en saison humide ne permettait pas de maintenir en vie des coraux. En février 2008, nous avons perdu toutes les colonies mères maintenues depuis plusieurs mois, suite à une diminution assez rapide de la salinité au niveau des captages de la ferme aquacole. Sans effet pour les poissons élevés, les coraux n'ont pas résisté à la chute de salinité.



Figure 23 : Colonies de *Pocillopora* fixée sur les filières. (Photos ARVAM)

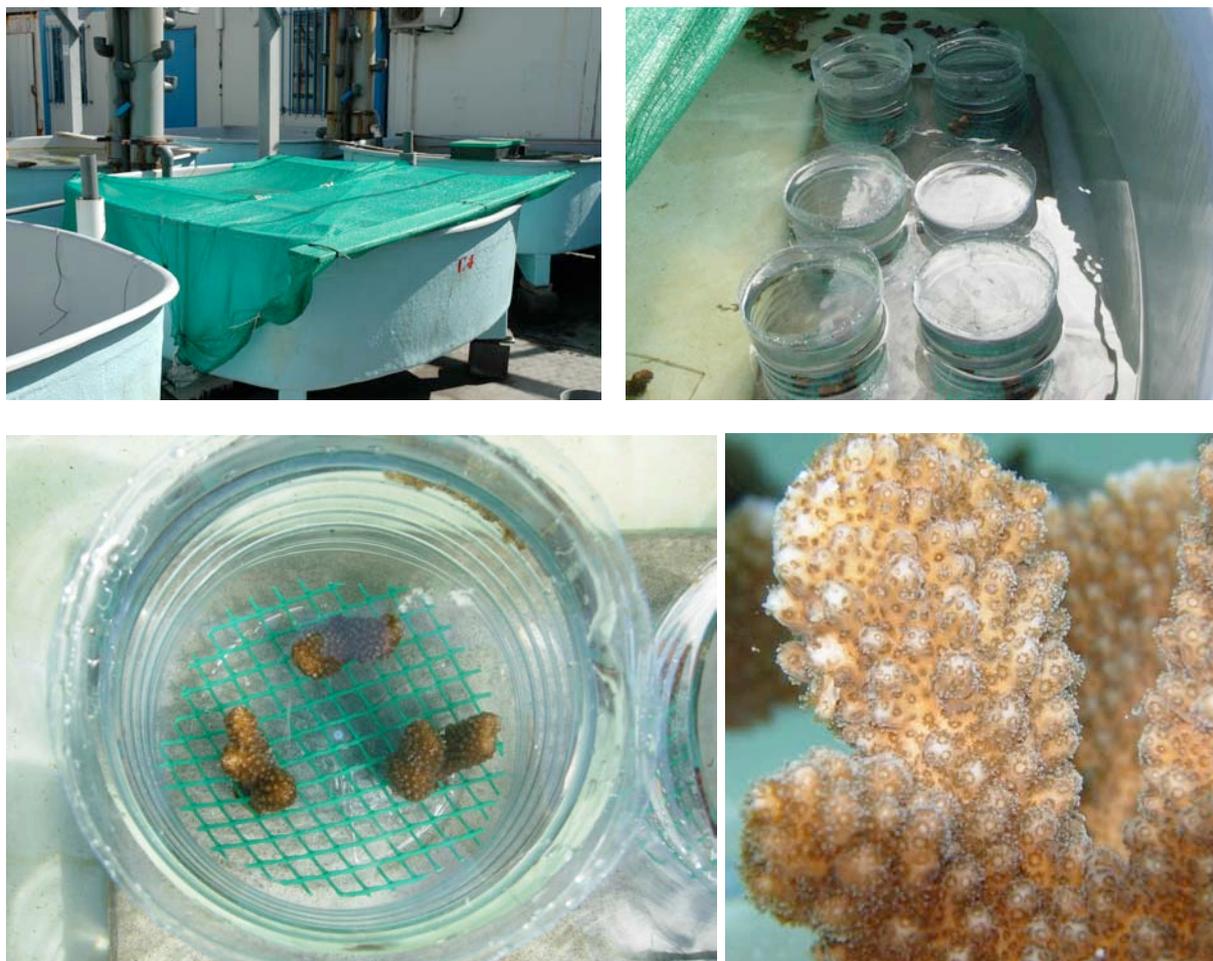


Figure 25 : Conditions expérimentales de la première phase (à l'ARDA), branches de *Pocillopora*, (Photos ARVAM)

Dans une deuxième phase, les colonies mères ont été transférées à l'aquarium de La Réunion. Des bacs de stabulation équipés d'un renouvellement d'eau continu (pompée directement sur le récif) ont été installés avec une lumière artificielle de qualité constante et identique à nos conditions de laboratoire.

L'effort s'est ensuite porté sur les microboutures. Le genre *Pocillopora* est facilement manipulable car il présente des « verrues » à la surface de ces branches.

Les différentes expérimentations ont permis de définir un protocole expérimental pour la réalisation d'un bioessai de toxicité aigue.

Certains éléments clés peuvent être résumés ainsi :

- les colonies mères sont maintenues pendant un minimum de trois semaines dans des bacs stables avec des conditions environnementales proches du milieu d'origine (température de 26 °C, salinité de 35, photopériode 12 :12), mais aussi adaptés aux tests *in vitro*, en particulier par l'utilisation de lumière artificielle (dans notre cas nous avons utilisé des tubes fluorescents, deux OSRAM lumière du jour et un HAGEN, Marine-Glo) ;

- le microbouturage des « verrues » doit être fait de la manière la plus nette possible à l'aide d'une petite tronçonneuse. Dès la découpe effectuée, la microbouture est immédiatement placée sur un tamis dans le bac de stabulation d'origine ;
- la stabulation des microboutures doit durer au minimum 5 jours. Mais il est préférable d'attendre une semaine, temps nécessaire pour une bonne cicatrisation tissulaire ;
- un nettoyage quotidien des tamis est indispensable à la bonne réussite des opérations ;
- le bioessai se déroule dans des plaques multipuits (6 ou 12 puits). Les microboutures sont placées individuellement dans les puits contenant 8 ou 5 ml de solution à tester. Un minimum de 12 puits est utilisé par dose à tester ;
- les cupules doivent être maintenues dans une chambre climatique thermostatée à 26 °C pendant toute la durée du test, ayant les mêmes caractéristiques spectrales que le site de stabulation, photopériode de 12 : 12 (deux OSRAM lumière du jour et deux HAGEN, Marine-Glo) ;
- les observations sont faites toutes les 24 h, à l'aide d'une loupe binoculaire.

Plus de 50 bioessais ont été effectués, dont certains avec des toxiques de référence, comme le sulfate de cuivre et le bichromate de potassium.

Plus de la moitié des essais ont été nécessaires pour affiner les techniques de bouturage et de stabulation, éléments clés pour le maintien *in vitro* des microboutures sans renouvellement d'eau.

Au cours de la saison chaude 2008-2009, un phénomène de blanchissement corallien a été observé à La Réunion, due à une anomalie thermique des eaux. Les coraux expulsent leurs zooxanthelles pour résister à ce stress. Durant cette période une grande sensibilité des colonies mères, couplé à la présence de « maladies » corallienne encore jamais observées, ont handicapé la progression des expérimentations. Une période de « retour à la normale » a été respectée avant de reprendre les collectes de colonies mères.

Les 20 derniers essais ont montrés chez les témoins des signes de stress à 96 h chez moins de 10 % des individus.

Avec un renouvellement d'eau toutes les 48 h, nous avons maintenu des microboutures sans mortalité pendant plus de 20 jours (une fixation dans les cupules a même été observée en quelques jours). Ce premier résultat est intéressant dans le cadre du développement d'un bioessai de toxicité chronique.

Dans le cadre de ce programme, nous nous sommes limités au test de toxicité aigue, sans renouvellement d'eau.

9.2. Le protocole mis au point.

Conditions expérimentales

- eau de mer saturée en oxygène, filtrée sur 0,22 µm (Milipore), prélevé le même jour que les microboutures ;
- pH : 8,0 ± 0,2, Salinité 35,0 ‰ ;
- température de incubation : 26 ± 1 °C, 12 :12, 6 000 LUX en chambre climatique SANYO (Figure 27)
- durée du test : 96 h ;
- essais réalisés dans des plaques multipuits de 6 ou 12 puits non traitées ;
- observation et dénombrement à l'aide d'une loupe binoculaire Zeiss.

Protocole expérimental (Figure 28)

- les microcolonies sont découpées avec un petit disque à trancher (Dremell), à l'air libre ;
- rincer et placer chaque bouture sur un tamis en nylon ;
- les tamis sont maintenus dans les mêmes conditions que les colonies mères pendant 5 à 7 jours ;
- un suivi quotidien est nécessaire à ce stade pour éliminer les organismes morts et nettoyer les bacs de stabulation ;
- les boutures sont récupérées le matin de l'essai et transportées au laboratoire dans des pots en PE rempli d'eau de mer de la station ;
- une quantité suffisante d'eau de la station est ramenée pour la préparation des milieux d'essai.

Préparation de l'eau de mer et des milieux d'essai

- l'eau de mer est aérée à l'aide d'un bulleur pendant environ 60 minutes ;
- mesurer le pH, la salinité et la température de l'eau de mer échantillonnée ;
- filtrer l'eau de mer sur un filtre de 0,22 μm (Milipore) ;
- 100 ml de solution eau de mer + produit à tester sont préparés par dose. Ces milieux d'essais sont préparés dans des pots en polystyrène cristal ;
- préparer une gamme de CuSO_4 (toxique de référence).

Mise en place des essais

- dans des plaques 12 puits (Falcon), répartir chaque solution à hauteur de 5 ml par puits. Chaque dose testée doit être répartie en trois plaques soit 36 réplifications ;
- introduire une bouture par puits ;
- incuber les boîtes à 26 ± 1 °C et aux conditions d'éclairage décrites ;
- les observations sont réalisées toutes les 24 heures, pendant 96 heures ;
- les critères suivants sont notés : (a) invagination des polypes, (b) dévagination de la poche gastro-intestinale, (c) expulsions des zooxanthelles, (d) nécrose tissulaire (Figure 28) ;
- au bout de 96 heures, les boutures mortes sont totalisées et un calcul de CL_{50} est effectué sur les pourcentages nets de survie ;
- validité du test : taux de mortalité des témoins < à 10 %.

9.2.1. Contrôle qualité

Chaque série de tests a été accompagnée d'un test de contrôle utilisant du sulfate de cuivre (CuSO_4) (Tableau 44).

Pour le bioessai corail les CL_{50} sont calculées graphiquement.

Tableau 44 : Corail : Pocillopora – essai avec Sulfate de Cuivre

N° essais	CL ₅₀ (µg/L) eq CuSO ₄	CL ₅₀ (µg/L) eq ion Cu
C017	571,4	227,5
C023	406,3	161,7
C040	360,3	143,4
C043	683,6	272,2
C045	990,0	394,1
C048	464,1	184,8

La valeur moyenne des CL₅₀ obtenues à 96 h avec ce toxique de référence est de : $579,11 \pm 232,73$ µg/L (n=6) pour le sulfate de cuivre ($230,55 \pm 92,66$ µg/L (n=6) équivalent ion Cu).

Le corail reste peu sensible au sulfate de cuivre, à l'avenir l'utilisation de 3-5 dichlorophénol devra être testée.



Figure 27 : (a) boutures dans les puits, (b) la chambre climatique SANYO utilisée pour la stabulation des essais. (photos ARVAM).

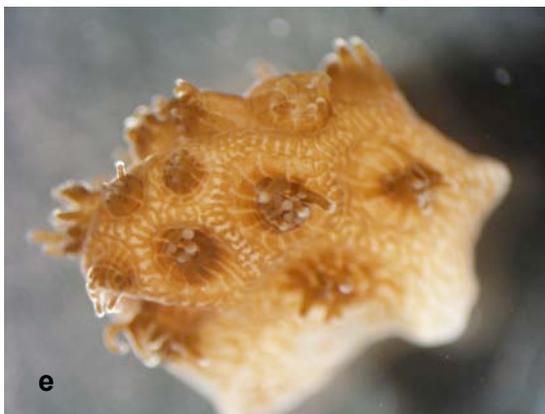
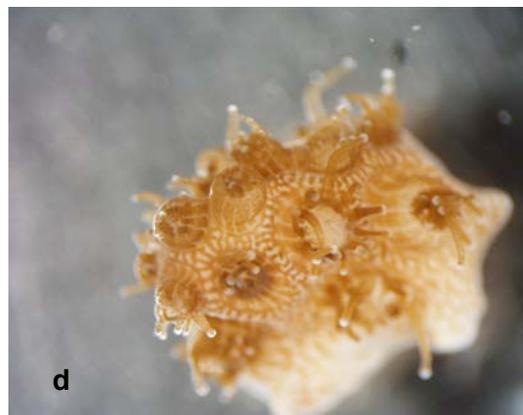
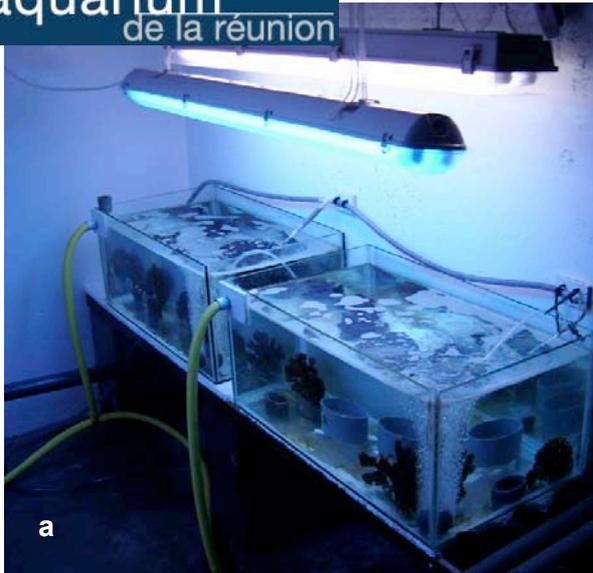


Figure 28 : (a) bacs de stabulation des colonies mères, (b) les « verrues » sur une branche de *Pocillopora meandrina*, (c) découpage des « verrues », (d) boutures *in vitro* ne présentant aucun signe de stress à 96 h, (e) polypes invaginés, (f) dévagination de la poche gastro-intestinale, (g) expulsion des zooxanthelles et nécrose tissulaire. (Photos ARVAM).

9.3. Résultats

Les premiers éléments obtenus avec les toxiques de référence utilisés montrent une sensibilité des boutures de coraux nettement visible à partir de 72 heures.

Une évolution des différents critères morphologiques a pu être décrite (Figure 28). Ainsi le l'apparition des dévaginations de la poche gastro-intestinale dans la majorité des polypes est considéré, dans notre cas comme irréversible à la survie de la microbouture.

9.3.1. Le sulfate de Cuivre

Pour le sulfate de cuivre (Figure 29), les premiers signes de nécrose apparaissent à 48 heures pour des doses de 1 mg/L. Des contacts prolongés à 96 heures ont permis de déterminer **une CL₅₀ (96h) à 230,55 ± 92,66 µg/L (n=6) équivalent Cu.**

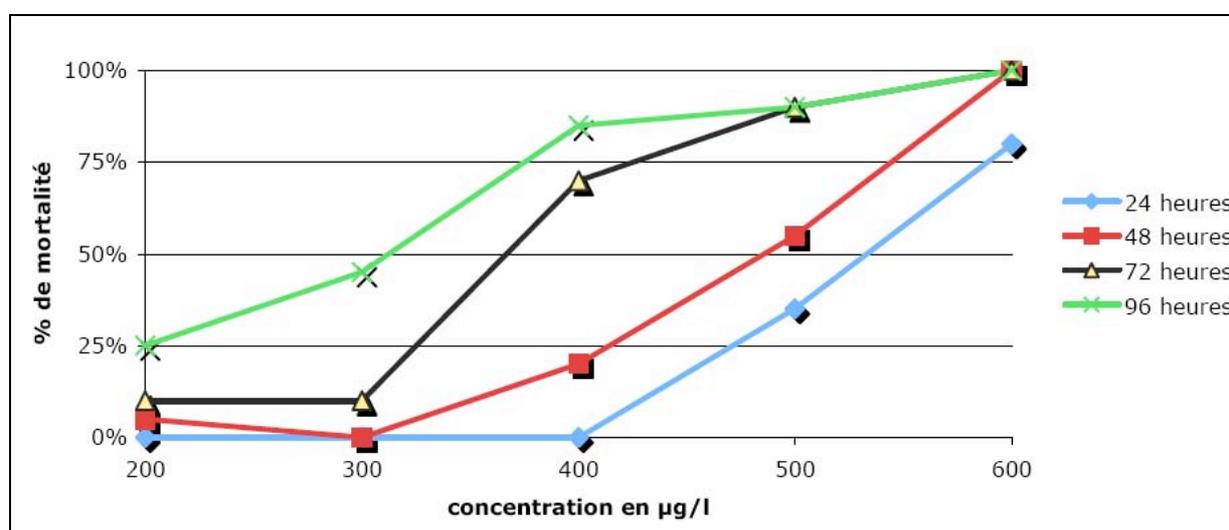


Figure 29 : Exemple de courbe dose-réponse obtenue avec les boutures de coraux (Influence de la concentration en CuSO_4 sur la mortalité des boutures (% net de mortalité) témoins 100 % de survie).

9.3.2. Les pesticides du programme

Seul le carbendazime montre un effet toxique sur les coraux dans nos conditions expérimentales. Une exposition de 96 h à 3 480 µg/L induit une mortalité de 43 % des colonies.

Une CE_{10} (CSEO) peut-être déterminée avec cet essai : 350 µg/L de carbendazime en exposition pendant 96 h.

Les dosages effectués pour ce bioessai ont permis de mieux caractériser les dégradations des substances testées dans nos conditions expérimentales. Les concentrations en carbofuran, en carbendazime et en S-métolachlore peuvent diminuer de plus de la moitié pendant la durée de l'essai. Ces conditions d'exposition doivent être prises en compte dans le calcul des effets. Les résultats actuels (qui restent préliminaires et incomplets) ne nous permettent pas d'intégrer cette notion d'exposition variable sur la durée d'un essai.

Pour la deltaméthrine, un gros écart entre concentration nominale (1 000) et concentration réelle (158) a été constaté. La solubilité de la substance pure dans l'eau peu expliquer cet écart (cf. essai poisson). Comme pour les substances précédentes, la deltaméthrine semble se dégrader rapidement dans nos conditions expérimentales, les concentrations notées passent de 158 à 10 µg/L en 96 h. Cette cinétique forte doit être considérée dans les futurs essais entrepris pour évaluer la toxicité de cette molécule. La question de la dégradation, de la biodisponibilité (dépôt, fixation) et de son assimilation éventuelle est posée.

Tableau 45 : Résultats des essais réalisés avec les pesticides du programme.

Substance	N° bioessai	Dose maximale testée (µg/L)	Réponse (% net mortalité à 96 h)
Carbendazim	C044	870	6
Carbendazim	C046	3 480	43
Carbofuran	C025	670	< 3
Carbofuran	C038	670	< 3
Carbofuran	C050	2 680	< 3
Deltaméthrine	C041	158	< 3
Deltaméthrine	C047	632	< 3
Diuron	C033	728	< 3
Glyphosate	C034	1 000	< 3
Glyphosate	C049	1 000	< 3
S-métolachlore	C037	1 143	< 3

La mise au point de cet essai a été tardif sur le programme, ainsi les résultats obtenus restent peu nombreux, mais montrent un modèle assez peu sensible à ces substances.

10. POISSONS

10.1. Mise au point du modèle tropical

Le choix s'est porté sur l'ombrine tropicale (*Sciaenops ocellatus*) (Figure 30). Cette espèce tropicale fait l'objet d'une production aquacole sur l'île. L'écloserie de l'ARDA (Association Réunionnaise pour le Développement de l'Aquaculture) en maîtrise la reproduction et l'élevage larvaire. Les animaux tests sont donc régulièrement disponibles et en quantité *ad hoc*.

Deux essais avec des juvéniles de 400 mg (J30) ont été satisfaisants en statique sans renouvellement d'eau avec 100 % de survie à 96 h. Au delà, la mortalité est incompatible avec la norme.

La production de ce juvénile n'est pas constante à l'ARDA, ainsi la disponibilité de cette taille de poisson n'est pas garantie toute l'année. C'est pourquoi nous avons essayé de développer un deuxième niveau d'étude, le développement d'une méthode sur des embryons vésiculés, post éclosion (J2).

Le choix méthodologique a été fait avec l'IPL qui a développé le modèle sur le bar *Dicentrarchus labrax* espèce marine. .

La méthode utilisée fait référence à la Guideline 203 car elle est conduite comme un test sur juvéniles mais est appliquée à des embryons vésiculés. A la différence du « fish early-life stage test », elle ne commence pas avec des œufs fécondés pour couvrir l'ensemble de la période embryonnaire, mais avec des embryons post éclosion.

Après plusieurs essais de mise au point, les témoins ont montré un taux de survie de 100 % à 24 h. Sur plusieurs tests, la survie obtenue à 48 h était de l'ordre de 90 %. Cependant certaines conditions expérimentales difficiles à maîtriser peuvent sûrement expliquer les taux de survie variables obtenus à 48 h (par exemple les vibrations de la chambre climatique).

Les différentes expérimentations ont permis de définir un protocole expérimental pour la réalisation de ce bioessai de toxicité aigue.

Certains éléments clés peuvent être résumés ainsi :

- la qualité de la ponte source est importante dans la robustesse des témoins. Ainsi les pontes dont le taux de fécondation est inférieur à 60 % doivent être rejetées ;
- le transfert des embryons vers le laboratoire doit être effectué dans une glacière remplie d'eau (eau de la ferme et du jour) ;
- les solutions sont préparées à partir de l'eau de la ferme aquacole, récupérée le jour même et oxygénée pendant au minimum 1 heure ;
- suite au transfert des larves dans les solutions à tester, un contrôle à 30 min permet d'éliminer les individus qui n'ont pas résisté à la manipulation ;
- le bioessai peut être réalisé dans des flacons contenant un volume minimal de 8 ml (plaque de 6 puits) ;
- un minimum de 10 individus est présent par solution, avec trois réplicats par dose ;
- les boîtes ou flacons sont maintenus à l'obscurité, à 26 °C de température ambiante, les contrôles visuels sont effectués toutes les 24 h ;
- à ce stade et dans ces conditions expérimentales, la bouche des embryons s'ouvre à 48h, ainsi les organismes sont sur leurs réserves vitellines. L'apport d'une alimentation n'est pas utile.

Faute d'embryons entre juin et septembre, les essais ne peuvent être entrepris que de octobre à mai, période de reproduction maîtrisée à l'ARDA.



Figure 30 : Ombrine tropicale (*Sciaenops ocellatus*) adulte et embryon à 48 h. (Photos : A Diringer et ARVAM)

10.1.1. Le protocole mis au point

L'espèce choisie pour ces essais est *Sciaenops ocellatus* (Ombrine tropicale). Les embryons sont récupérés le matin du début de l'essai à l'écloserie de l'ARDA, au Port Ouest.

Conditions expérimentales

- eau de mer filtrée (EMF) à 0,22 μm sur filtre millipore. L'eau est prélevée le jour même, avec les larves de poissons ;
- incubation : température de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ et obscurité ;
- pH des préparations = $8,0 \pm 0,2$;
- durée du test : 24 h ;
- microplaques 6 puits en plastique stérile à usage unique non traité (Falcon).

Préparation de l'eau de mer et des milieux d'essai

- l'eau de mer est aérée à l'aide d'un bulleur pendant environ 60 minutes ;
- mesurer le pH, la salinité et la température de l'eau de mer échantillonnée ;
- filtrer l'eau de mer sur un filtre de 0,22 μm (Milipore) ;
- 50 ml de solution eau de mer + produit à tester sont préparés par dose. Ces milieux d'essais sont préparés dans des pots en polystyrène cristal ;
- préparer une gamme de CuSO_4 (toxique de référence) comme suit ($\mu\text{g/L}$) : 200 - 100 - 50 - 25 - 12,5 - 0.

Mise en place des essais

- dans des plaques 6 multi puits (Falcon), répartir chaque solution à hauteur de 8 ml par puits. Chaque dose doit être faite en triplicats ;
- introduire environ 20 embryons par puits ;
- incuber les boîtes à $26 \pm 1^\circ\text{C}$ et à l'obscurité ;
- les observations sont réalisées toutes les 24 heures, pendant 72 heures ;
- les embryons morts sont régulièrement retirés des milieux ;
- au bout de 24 et 48 heures, les embryons morts sont totalisés et un calcul de CL_{50} est effectué sur les pourcentages nets de survie et la macro Excel REGTOX ;
- validité du test : taux de mortalité des témoins < à 10 %.

10.1.2. Contrôle qualité

Chaque série de tests a été accompagnée d'un test de contrôle utilisant du sulfate de cuivre (CuSO₄).

Dix séries différentes d'essai ont été réalisées, sept ont été analysées.

Tableau 46 : Embryons vésiculés d'ombrine – essai avec le cuivre.

CuSO ₄			Cu ²⁺			N° essai
CL ₅₀ (µg/L)	IC 5 % (µg/L)		CL ₅₀ (µg/L)	IC 5 % (µg/L)		
333,5	288,2	357,7	132,8	114,7	142,4	O 015
211	175	257,6	84,0	69,7	102,6	O 016
213,4	192,1	243,2	85,0	76,5	96,8	O 020
353,9	333,5	362,8	140,9	132,8	144,4	O 021
387,4	363,3	413	154,2	144,6	164,4	O 026
337,2	310,3	364,7	134,2	123,5	145,2	O 038
320	299,9	346	127,4	119,4	137,7	O 043

Ces premiers résultats montrent une relative stabilité de la sensibilité dans nos conditions expérimentales.

Des essais complémentaires seront nécessaires pour définir une valeur guide.

10.2. Le modèle tempéré

Comme pour le bioessai tropical, le choix s'est porté sur le développement d'un essai sur des embryons vésiculés (eleuthereroembryo) de bar *Dicentrarchus labrax* (Figure 31).

Cet essai a été réalisé par l'IPL.

10.2.1. Méthode

Les solutions de composés à tester obtenues en DMSO ou en eau ultra pure sont diluées en eau de mer de synthèse et les suspensions obtenues sont directement utilisées pour le test. La méthode utilisée fait référence à la Guideline 203 car elle est conduite comme un test sur juvéniles mais est appliquée à des embryons vésiculés. À la différence du « fish early-life stage test », elle ne commence pas avec des œufs fécondés pour couvrir la période embryonnaire.

Les embryons de bar éclos dans la nuit à l'écloserie de Gravelines sont transportés en quelques minutes au laboratoire.

À ce stade et durant la totalité du test, les embryons se développent sur leurs propres réserves et ne peuvent s'alimenter.

Les larves sont réparties dans les cupules de microplaques 12 puits à raison de cinq embryons par cupule emplies de 4 ml de milieu à tester ; 20 embryons sont utilisés par concentration.

La durée du test est de quatre jours à 15 °C et à l'obscurité. Dans ces conditions expérimentales, l'ouverture de la bouche n'intervient qu'au bout de sept jours.

Les embryons morts sont régulièrement retirés des milieux.

Au bout de 96 heures, les embryons morts sont totalisés et un calcul de CE₅₀ est effectué sur les pourcentages nets de survie.



Figure 31 : Embryons vésiculés de bar d'un jour (photo Ecloserie Aquanord)rd)

10.2.2. Contrôle qualité

Chaque série de tests a été accompagnée d'un test de contrôle utilisant le 3-5 Dichlorophénol ou l'ion cuivre sous forme de sulfate de cuivre.

Tableau 47 : Embryons vésiculés de bar – essai avec l'ion cuivre.

	CE ₅₀ (µg/L)	IC à 95 %		
20/05/08	230	168	< CE ₅₀ <	324
20/05/08	230	170	< CE ₅₀ <	324
20/05/08	231	83	< CE ₅₀ <	>1000
20/05/08	182	136	< CE ₅₀ <	249
09/06/08	178	139	< CE ₅₀ <	233
16/03/09	90	66	< CE ₅₀ <	118
07/05/09	134	116	< CE ₅₀ <	155
24/03/10	67,8	59,8	< CE ₅₀ <	75,2
Moyenne	168	écart-type :	65	

La CE₅₀ moyenne calculée avec le Cu²⁺ est de 168 µg/L (ET = 65, n=8).

Tableau 48 : Embryons vésiculés de bar – essai avec 3-5 Dichlorophénol

	CE ₅₀ (mg/L)	IC à 95 %		
24/03/2010	1,40	?	< CE ₅₀ <	?
26/03/2010	1,49	?	< CE ₅₀ <	?

10.3. Résultats

10.3.1. Sur le modèle tempéré

La CE₅₀ n'a pu être atteinte pour quatre produits : carbendazime, diuron, glyphosate et S-métolachlore.

Pour la carbendazime, la CE₂₀ n'est atteinte qu'une fois sur trois à la concentration de 1 000 µg/L.

Tableau 49 : Embryons vésiculés de bar – essais avec 4 substances

Produit	Date de l'essai	Dose maximale testée (µg/L)	Réponse (% net de morts)
Carbendazime	07/05/2009	1 000	< 1
	24/03/2010	1 000	30
	26/03/2010	1 000	6,7
Diuron	07/05/2009	1 000	< 1
	24/03/2010	1 000	< 1
	26/03/2010	-	-
S-Métolachlore	07/05/2009	5 970	< 1
	24/03/2010	5 970	5
	26/03/2010	5 970	< 1
Glyphosate	07/05/2009	9 200	< 1
	24/03/2010	92 000	< 1
	26/03/2010	-	-

Pour deux composés, la dose occasionnant 50 % de larves anormales a été dépassée : carbofuran et deltaméthrine.

Tableau 50 : Embryons vésiculés de bar – essais avec le Carbofuran

Carbofuran	CE ₅₀ (µg/L)	IC à 95 %	
07/05/2009	8,1 < CE ₅₀ < 81	-	
24/03/2010	81 < CE ₅₀ < 810	-	
26/03/2010	115	111 < CE ₅₀ < 121	

Carbofuran	CE ₁₀ (µg/L)	IC à 95 %	
26/03/2010	30,2	26,8	< CE ₁₀ < 34,3

Tableau 51 : Embryons vésiculés de bar – essais avec la deltaméthrine

Deltaméthrine	CE ₅₀ (µg/L)	IC à 95 %		
24/03/2010	Env. 10	-	< CE ₅₀ <	-
26/03/2010	7,2	6,5	< CE ₅₀ <	8,2

Deltaméthrine	CE ₁₀ (µg/L)	IC à 95 %		
26/03/2010	2,8	2,7	< CE ₁₀ <	4,0

10.3.2. Sur le modèle tropical

Près de 30 essais ont été réalisés sur *Sciaenops ocellatus* avec les six substances du programme.

Des valeurs significatives de CE₅₀ ont été obtenues pour deux produits : la deltaméthrine et le carbofuran.

Tableau 52 : CE₅₀ calculées pour les deux substances testées sur *Sciaenops ocellatus*

substances	Concentration maximale testée (µg/L)	CE ₅₀ (µg/L)	IC à 95 % (µg/L)		
Deltaméthrine	790	42,2	38,1	< CE ₅₀ <	47,9
Deltaméthrine	790	18,4	13,1	< CE ₅₀ <	21,5
Deltaméthrine	790	12,6	11,0	< CE ₅₀ <	15,7
Deltaméthrine	790	52,2	19,9	< CE ₅₀ <	121,6
Deltaméthrine	790	17,6	12,6	< CE ₅₀ <	20,9
Deltaméthrine	790	32,9	25,2	< CE ₅₀ <	34,5
Carbofuran	680	29,5	8,5	< CE ₅₀ <	34,0
Carbofuran	680	29,1	6,5	< CE ₅₀ <	32,6
Carbofuran	680	49,0	34,4	< CE ₅₀ <	50,6
Carbofuran	680	33,7	26,0	< CE ₅₀ <	39,0
Carbofuran	680	37,0	?	< CE ₅₀ <	?

Tableau 53 : CSEO calculées pour les six substances testées sur *Sciaenops ocellatus*

substances	Concentration maximale testée (µg/L)	CSEO (µg/L)	Nombre d'essai
Deltaméthrine	790	17,5 ± 9,6*	6
Carbofuran	680	32,4 ± 9,0*	5
Diuron	1 000	1 000**	5
Carbendazime	1 000	930**	3
S-Métolachlore	1 450	ND	2
Glyphosate	1 000	930**	3

* CE₁₀ obtenue par REGTOX

** CE₁₀ obtenue graphiquement.

***CSEO estimée, égale à la dose maximale testée.

10.3.3. Synthèse

Tableau 54 : Effets obtenus des pesticides sur les embryons de poissons des deux espèces ciblées : concentrations sans effet et/ou CE₅₀ exprimées en µg/L

substances	tropical (<i>Sciaenops ocellatus</i>)	tempéré (<i>Dicentrarchus labrax</i>)
Carbendazime	Aucun effet * à 930 (n=3)	Effets variables à 1 000 (n=3)
Diuron	Aucun effet * à 1 000 (n=5)	Aucun effet * à 1 000 (n=2)
Glyphosate	Aucun effet * à 1 000 (n=3)	Aucun effet * à 9 200 (n=2)
S-Métolachlore	Aucun effet * à 1 450 (n=2)	Aucun effet * à 5 970 (n=3)
Carbofuran	35,6 ± 8,1 (n=5)	115 (111-121) (n=1)
Deltaméthrine	29,3 ± 15,7 (n=6)	7,2 (6,5 – 8,2) (n=1)

* test ANOVA : pas d'effet significatif au risqué d'erreur (0,05) à dose maximale testée.

Le carbofuran et la deltaméthrine ont un effet significatif sur les embryons de poissons *Sciaenops ocellatus* et *Dicentrarchus labrax*.

Avec des valeurs de CE₅₀ calculée proche du 10 µg/L, la deltaméthrine a une activité toxique très forte, sur ce modèle.

Les poissons d'eau douce sont les organismes aquatiques les plus sensibles à la deltaméthrine. Des 14 espèces testées, les valeurs de CL₅₀ varie de 0,07 à 20 µg/L, plage de

valeur identique à celle que nous avons observées dans notre programme (Thomas *et al.*, 2008 ; Köprücü et Aydin, 2004 ; El-Sayed *et al.*, 2007 ; Ansari *et al.*, 2008 ; Köprücü et Aydin, 2004 ; Rao *et al.*, 1983, *in* Çalta et Ural, 2004 ; Mulla *et al.*, 1978, *in* Çalta et Ural, 2004 ; Velíšek *et al.*, 2007).

Le carbofuran montre des CE₅₀ entre 35,6 et 115 µg/L sur les embryons de poissons. Dans la littérature certaines données montrent que les poissons semblent relativement sensibles au carbofuran, puisque les valeurs de CE/CL₅₀ relevées sont au maximum de 1 mg/L (Saito *et al.*, 1991). Les modèles marins tempérés et tropicaux semblent plus sensibles, cependant les données restent peu nombreuses pour émettre des hypothèses.

Tableau 55 : Résultats comparés des essais embryons de poissons obtenus avec du sulfate de cuivre.

Organisme test	Valeur moyenne CE ₅₀ (µg/L) de Cu ^I	Ecart type (µg/L)	Référence
<i>Sciaenops ocellatus</i>	122,6, n=7	27,4	Projet ERICOR
<i>Dicentrarchus labrax</i>	168 n=8	65	Projet ERICOR
<i>Dicentrarchus labrax</i>	100		Cosson et Martin, 1981

Le Tableau 55 présente les données obtenues avec le toxique de référence Cu²⁺. Les sensibilités obtenues sont comparables entre les modèles, montrant une bonne reproductibilité des essais dans des conditions expérimentales différentes.

11. SYNTHÈSE

Les deux tableaux suivants reprennent les différents résultats obtenus au cours du programme ERICOR.

Tableau 56 : CE_{50} déterminées dans le programme ERICOR (en bleu pâle : les espèces tempérées).

µg/L	Carbendazime	Glyphosate	Diuron	S-Métolachlore	Deltaméthrine	Carbofuran
<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	> 1 000 (n=3)	> 9 200 (n=3)	35,9 ± 13,8 (n=3)	> 10 000 (n=3)	> 1 000 (n=3)	> 810 (n=3)
<i>Navicula sp.</i>	> 1 000 (n=3)	> 1 000 (n=6)	22,8 ± 12,6 (n=4)	1 528 (n=1)	> 785 (n=7)	> 680 (n=3)
<i>Symbiodinium sp.</i>	>1 000 (n=9)	> 1 000 (n=3)	35,1 ± 8,1 (n=4)	>1 400 (n=5)	> 785 (n=6)	> 680 (n=10)
<i>Paracentrotus lividus</i>	1,0	> 77	>> 900	76 596	7 800	16 000
<i>Echinometra mathei</i>	108,1 ± 40,9 (n=10)	> 1 000 (n=3)	3 491 ± 1 192 (n=6)	> 715 (n=3)	597,7 ± 105,9 (n=3)	> 2 000 (n=3)
<i>Crassostrea gigas</i>	21,6 ± 13,7 (n=2)	>9 200 (n=3)	>1 000 (n=3)	>597 (n=3)	>1 000 (n=3)	>810 (n=3)
<i>Acartia tonsa</i>	>1 000 (n=3)	> 92 000 (n=3)	>1 000 (n=3)	1 000 -10 000 (n=3)	0,83 ± 0,67 (n=2)	17,0 ± 14,4 (n=2)
<i>Pocillopora meandrina</i>	3 500 (n=1)	> 1000 (n=2)	> 728 (n=1)	> 1143 (n=1)	> 632 (n=2)	> 2680 (n=3)
<i>Dicentrarchus labrax</i>	> 1 000 (n=3)	> 9 200 (n=3)	> 1 000 (n=3)	> 10 000 (n=3)	7,2 (n=1)	115 (n=1)
<i>Sciaenops ocellatus</i>	> 930 (n=3)	> 1000 (n=3)	> 1000 (n=5)	> 1450 (n=2)	29,3 ± 15,7 (n=6)	35,6 ± 8,1 (n=5)

Tableau 57 : CSEO déterminées dans le programme ERICOR

µg/Litre	Carbendazime	Glyphosate	Diuron	S-Métolachlore	Deltaméthrine	Carbofuran
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	1 000 ***	92 000 (n=2)***	3,0 ± 1,8 (n=3)*	10 000 ***	1 000 ***	810 ***
<i>Navicula sp.</i>	1 000 ***	1 000 ***	5,7 ± 4,6 (n=4)*	10,7 (0,1-119,5), (n=1)	785 ***	680 ***
<i>Symbiodinium sp.</i>	>1 000	1 000 ***	11,0 ± 2,6 (n=4)*	1 400 ***	785 ***	680 **
<i>Paracentrotus lividus</i>	0,775*	ND	ND	4,82*	597,5*	717,2*
<i>Echinometra mathei</i>	280,3 ± 21,2 (n=10)*	1 000 ***	1 949,2 ± 313,6 (n=6)	715 ***	280,3 ± 21,2 (n=3)	2 000 ***
<i>Crassostrea gigas</i>	13,2 ± 8,2 (n=2)*	9 200 (n=3)***	100 (n=3)**	>100 (n=3)**	180-560 (n=2)	810 (n=3)***
<i>Acartia tonsa</i>	100 (n=3)***	92 000 (n=3)***	100 (n=2)**	ND	0,11 ± 0,01 (n=2)*	2,1 ± 3,2 (n=2)*
<i>Pocillopora meandrina</i>	350 (n=1)**	1000 ***	728 ***	1 143***	632 ***	2 680 ***
<i>Dicentrarchus labrax</i>	1 000 (n=3)***	92 000 (n=1)***	1 000 (n=2)***	5 970 (n=3)***	2,8 (2,7-4,0) (n=1)*	30,2 (26,8-34,3) (n=1)*
<i>Sciaenops ocellatus</i>	930 (n=3)***	930 (n=3)***	1 000 (n=5)***	1 450 (n=3)***	17,5 ± 9,6 (n=6)*	32,4 ± 9,0 (n=5)*

* CE₁₀ obtenue par REGTOX

** CE₁₀ obtenue graphiquement

*** CSEO estimée, égale à la dose maximale testée

ND non déterminable avec les résultats obtenus

11.1. Les différents modèles toxicologique testés

L'évaluation du risque recommandé par le TGD porte sur six niveaux trophiques (bactérie, phytoplancton, crustacé, mollusque, échinoderme et poisson). Cinq de ces niveaux ont été abordés dans ERICOR et un niveau trophique complémentaire, spécifiquement tropical, les coraux, a été étudié.

Initialement les **bactéries** devaient être abordés par ERICOR, par l'adaptation du système MICROTOX® qui utilise *Vibrio fischeri* (espèce tempérée à subtropicale). La mesure de la toxicité avec cet outil est réalisée à 15 °C, selon la norme NF EN ISO 11348. L'isolement de bactéries locales n'a pas été entrepris, et l'appareil que nous avons projeté d'acquérir semblait offrir la possibilité d'incuber ces germes à 27 °C, température proche de celle de nos autres essais tropicaux. La confirmation du constructeur a été bien trop tardive pour le démarrage de cette activité. En accord avec le CS, ce niveau trophique a été mis de côté et l'effort reporté sur les autres bioessais abordés.

C'est sur ces différents modèles que cinq molécules détectées dans l'environnement, en particulier marin, ont été testées : trois herbicides (diuron, glyphosate et S-métholachlore), deux insecticides (deltaméthrine et carbofuran) et un fongicide (carbendazime) de mode d'action différent qui ont été ciblés par le projet.

Pour le **phytoplancton**, deux espèces tropicales ont été étudiées et comparées à une espèce tempérée.

Inspirée de la norme NF EN ISO 10253, les bioessais « tropicaux » développés se sont intéressés à des navicules, diatomées benthiques classiquement rencontrées dans les récifs coralliens. La deuxième espèce ciblée était *Symbiodinium sp.*, symbionte des coraux qui se cultive *in vitro* à l'ARVAM. L'essai « tempéré » suit la norme NF EN ISO 10253, et utilise une diatomée planctonique *Phaeodactylum tricornutum*.

L'ensemble des essais effectués montre une similitude de réaction entre les espèces tropicales et la diatomée tempérée, testées dans des conditions expérimentales différentes. Ces trois modèles se sont avérés très sensibles au diuron. Toutes les valeurs de CE₅₀ obtenus sont proches les unes des autres, montrant peu de différence de sensibilité inter modèle.

La littérature actuelle fait état de travaux sur un total de 27 espèces de phytoplancton, dont neuf espèces marines. Pour les espèces d'eau douce et marines, les CE₅₀ calculées sont très variables (comprises entre 0,7 µg/L et 45 µg/L (Fernandez-Alba *et al.*, 2002 ; Koutsaftis et Aoyama, 2006 ; Ma *et al.*, 2006 ; Gatidou et Thomaidis, 2007).

Le S-métholachlore a une activité toxique décelée une fois sur la diatomée tropicale, *Navicula sp.*, avec une CSEO calculée à 10,7 µg/L. Ce résultat reste à confirmer avec de futurs essais. Dans la littérature deux études montrent une grande variabilité dans les réponses obtenues sur des espèces dulçaquicoles, avec des valeurs de CE₅₀ comprises entre 56 µg/L et 19,4 mg/L (Hartgers *et al.*, 1998 ; Ma *et al.*, 2002).

Les essais sur les **échinodermes** ont été réalisés sur deux espèces d'oursin *Echinometra mathei* (très répandue sur les récifs coralliens de La Réunion) et *Paracentrotus lividus* (oursin des eaux tempérées). Ces bioessais mesurent l'embryotoxicité d'une substance sur le développement embryonnaire d'oursin. Les protocoles utilisés sont tirés de l'ASTM. Seules les conditions expérimentales varient entre les deux espèces (température et durée d'exposition).

Les premiers résultats montrent la facilité de mise en œuvre de cet essai, avec une reproductibilité forte pendant la période de maturité sexuelle.

Ces espèces sont très sensibles au carbendazime, fongicide. Très peu de résultats sont retrouvés dans la littérature, ainsi le modèle oursin représente une cible appropriée pour l'étude de cette catégorie de substance. La deltaméthrine montre des effets modérés sur le développement de la larve d'oursin, avec des valeurs de CSEO entre 135 et 597 µg/L relevé respectivement pour l'oursin tropical et tempéré.

Les essais d'embryotoxicité d'oursin sont donc faciles à mettre en œuvre. Des exercices inter-laboratoires permettraient d'avancer rapidement vers une normalisation rapide de ce bioessai.

L'embryotoxicité de larve de **Bivalve** est un bioessai maintenant normalisé (XP T90-382 (09/2009)). Son adaptation à un modèle tropical n'a pas été poursuivie par le programme. Les premiers essais entrepris sur des modioles (*Modiolus auriculatus*) ou des huîtres perlières (*Pinctada margaritifera*) ont été infructueux.

Seuls les essais sur les larves de *Crassostrea gigas* (huître creuse) ont été effectuées. Comme pour le bioessai oursin, ce modèle est très sensible au Carbendazime. Aucun effet des cinq autres substances testées n'a été noté.

Plusieurs pistes de développement en zone tropicale sont lancées : (i) sur l'huître perlière *Pinctada margaritifera*, dont le cycle de reproduction doit être étudié au niveau local, (ii) sur des bénitiers, organismes classiquement rencontrés sur les récifs coralliens et dont l'élevage est maîtrisé.

Seul le **crustacé** *Acartia tonsa* (copépode marin) a été utilisé dans le programme.

Ce modèle montre une grande sensibilité aux insecticides testés, le carbofuran et la deltaméthrine. Avec des valeurs de CE₅₀ proche du µg/L, le pouvoir toxique de ces molécules pour l'environnement est à considérer.

Comme pour les mollusques, l'adaptation de la norme FD ISO 14669 à une espèce tropicale s'est heurtée à une absence d'organisme facilement exploitable durant le programme. Le développement de mésocosmes et l'élevage de copépodes tropicaux semblent être une alternative à étudier pour les prochaines années.

Un bioessai **corail** a été mis au point, afin d'obtenir des informations de toxicité aiguë sur des colonies maintenues *in vitro*, dans des conditions de laboratoire bien maîtrisées. Le choix s'est porté assez rapidement sur l'utilisation de microboutures de colonies de *Pocillopora meandrina*. Les coraux étant protégés par la CITES, nous avons choisi de ne prélever dans le milieu naturel que des individus opportunistes, c.a.d. des « salissures » des cages aquacoles de l'ARDA en baie de Saint-Paul. Ainsi la technique de microbouturage présente aussi l'avantage de limiter les prélèvements dans le milieu, et ainsi de disposer d'un nombre suffisant d'organisme pour répéter les différentes séries d'essais.

La mise au point de ce bioessai a été long, plusieurs mois ont été « perdus » suite à un phénomène de blanchissement observé sur nos colonies mères dans le milieu naturel (le blanchissement est une réponse des organismes à un stress thermique, ils expulsent leurs zooxanthelles et quand les colonies survivent, elles peuvent mettre plus de six mois pour retrouver un état physiologique normal). Une fois le protocole stabilisé, les réponses aux toxiques de référence ont montré une répétabilité satisfaisante entre les différents lots.

Les bioessais réalisés avec les pesticides du programme, montrent que seul le carbendazime a un effet toxique sur les colonies coralliennes. Avec une CSEO calculée à 350 µg/L, cette molécule présente un véritable danger pour la survie des coraux à cette concentration.

Dans la littérature, seule le diuron est documenté. La majorité des études montrent un effet de cette molécule sur les symbiotes (mesures d'efficacité de la photosynthèse) (Jones *et al.*, 2003 ; Raberg *et al.*, 2003). Pour les paramètres mesurés directement sur les coraux

(survie, métamorphose, fécondation, ...), les valeurs de CSEO sont comprises entre 100 et 1000 µg/L (Negri *et al.* 2005), comme celles obtenues par le programme ERICOR.

Les essais sur les **poissons** ont été adaptés à des embryons vésiculés d'espèces tempérés et tropicales. A ce stade, les embryons restent sur leurs réserves vitellines, et n'ont pas besoin d'alimentations externes. Les essais avec ces organismes peuvent généralement durer le temps de l'ouverture de la bouche : sept jours pour le bar (*Dicentrarchus labrax*) (bioessai réalisé sur 96 h) et deux jours pour l'ombrine tropicale (*Sciaenops ocellatus*) (bioessai réalisé sur 48 h).

Le développement de ce bioessai présente de nombreux avantages, en particulier : (i) une réduction des volumes à tester significative (utilisation de plaques multi-puits), (ii) un temps de mise en place court, et (iii) une sensibilité accrue. Ces méthodes sont récentes et ont déjà montrées que les bioessais sur embryon étaient un outil très prometteur en remplacement de ceux sur les poissons classiquement réalisés en toxicologie, ces derniers étant soumis à la réglementation européenne sur l'expérimentation animale, (sur poisson zèbre par Lange *et al.*, 1995 ; Lammer *et al.*, 2008).

Les deux modèles développés montrent une sensibilité équivalente au toxique de référence utilisé, le Cuivre.

Comme pour les crustacés, ce modèle montre une grande sensibilité aux insecticides testés, le carbofuran et la deltaméthrine.

Tous ces niveaux trophiques ont donné des résultats toxicologiques différents en fonction des substances actives testés.

Une approche de la caractérisation du danger des substances testées est proposée ci-dessous.

11.2. Caractérisation du danger des substances actives

Sur la base des premiers éléments toxicologiques obtenus lors du programme ERICOR et des données issues de la littérature, une synthèse des effets toxiques de chaque substance sur les organismes aquatiques est ici présentée.

11.2.1. Le carbendazime

Les études relevées dans la bibliographie concernant ce fongicide testé sur des organismes aquatiques, portent exclusivement sur des organismes d'eau douce. Parmi les 10 études citées dans le tableau de synthèse (Annexe 1), sept d'entre elles ont été réalisées en milieu tempéré, trois autres étant réalisées en milieu tropical. Quatre de ces études ont mis en œuvre des expérimentations monospécifiques en laboratoire, trois études ont été faites en microcosmes « indoor », trois autres en microcosmes/mésocosmes « outdoor ».

L'ensemble de ces études fait apparaître, tous organismes et milieux confondus, des valeurs de toxicité qui couvrent plusieurs ordres de grandeurs, de la centaine de mg/L au µg/L.

La plupart des organismes testés sont des invertébrés aquatiques tels que la daphnie, les crevettes, les copépodes, en tests monospécifiques ou en communautés. Le phytoplancton et le périphyton n'apparaissent que dans une seule étude, de même pour les poissons.

Il est à noter que la carbendazime a été testée en substance active pure dans quatre études,

sous la forme commerciale Derosal dans quatre études, et sous la forme Bavistin dans deux études.

Toxicité sur le phytoplancton (Van den Brink *et al.*, 2000)

La toxicité du carbendazime sous forme Derosal a été évaluée en microcosmes « indoor » sur les communautés de périphyton et phytoplancton : le phytoplancton (CSEO : 33 µg/L) semble nettement plus sensible que le périphyton (CSEO : > 1000 µg/L), sa CSEO étant inférieure de deux ordres de grandeurs.

Cette sensibilité du phytoplancton n'est pas retrouvée *in vitro* sur les trois espèces ciblées dans ERICOR. Les CSEO sont proches de 1 000 µg/L.

Toxicité sur les invertébrés

La daphnie

En tests monospécifiques de laboratoire, les valeurs de toxicité obtenues pour les tests d'immobilité sont :

- 399 µg/L (CL_{50-96h} ; Van Wijngaarden *et al.*, 1998) daphnies > 3 mm
- 91 µg/L (CL_{50-96h} ; Van Wijngaarden *et al.*, 1998) daphnies < 1,5 mm
- 157 µg/L (CL_{50-48h} ; Ferreira *et al.*, 2008)

En microcosmes/mésocosmes, on a les valeurs suivantes :

- 113 µg/L (CL_{50-96h} ; Van den Brink *et al.*, 2000)
- 37 µg/L (CL_{50-28j} ; Van den Brink *et al.*, 2000)
- 300 µg/L (CE_{50-24h} taux d'ingestion ; Slijkerman *et al.*, 2004)

Les valeurs de toxicité relevées couvrent environ un ordre de grandeur, entre 40 et 400 µg/L pour le paramètre d'immobilité (mortalité) : la sensibilité de la daphnie semble relativement comparable en fonction des conditions expérimentales.

Autres invertébrés

Les tests monospécifiques réalisés en laboratoire, en milieu tempéré (Van Wijngaarden *et al.*, 1998) donnent des résultats de toxicité de court-terme (CL_{50-96h}) comprises entre 55 µg/L pour *Gammarus pulex* juvénile et > 8 000 µg/L pour *Simocephalus vetulus*. Les valeurs de toxicité de long-terme vont de 14 et 16 µg/L (CL_{50-21j} pour *Dugesia lugubris* et *Gammarus pulex* adulte respectivement) à 8 130 µg/L (CL_{50-28j}) pour *Bithynia tentaculata*.

Les CE₅₀ obtenues par différents tests (stimuli, force) sont tout aussi étendues : que le test soit de court- ou long-terme, les valeurs obtenues vont de 12 µg/L (*Dugesia lugubris*) à 4 500 µg/L (*Simocephalus vetulus*).

Parmi les espèces testées, *Dugesia lugubris* et *Gammarus pulex* sont les plus sensibles alors que *Bithynia tentaculata* et *Simocephalus vetulus* sont les moins sensibles à la carbendazime en formulation Derosal.

Cette batterie d'espèces testées permet de rendre compte de la différence de sensibilité des organismes, qui couvre plusieurs ordres de grandeurs. Dans une démarche visant à protéger l'écosystème, il convient de réaliser les tests sur les espèces les plus sensibles, mais aussi sur les espèces qui contribuent le plus au maintien de l'écosystème. La meilleure connaissance des relations (interactions, relations trophiques, prédation) entre les composants d'une communauté est un point essentiel afin d'appréhender les conséquences éventuelles liées à la perturbation de l'un de ses éléments.

Communautés d'invertébrés

Les communautés d'invertébrés testées en micro-/mésocosmes tempérés ont été exposées pendant trois à quatre semaines au fongicide. Les valeurs obtenues sont :

- macro-invertébrés : CSEO_{4 semaines} 3,3 µg/L, avec des CL₁₀₀ de 33 à 330 µg/L selon les espèces (Cuppen *et al.*, 2000)

- zooplancton : CSEO_{4 semaines} 33 µg/L (Van den Brink *et al.*, 2000)
- zooplancton : CSEO_{3 semaines} 33 µg/L (Daam et Van den Brink, 2007)
- cladocères : CSEO_{4 semaines} 30 µg/L (Slijkerman *et al.*, 2004)
- rotifères : CSEO_{4 semaines} > 300 µg/L (Slijkerman *et al.*, 2004)
- copépodes : CSEO_{4 semaines} 300 µg/L (Slijkerman *et al.*, 2004)

Ces études sur les communautés fournissent des résultats cohérents, en concordance les uns avec les autres. Les concentrations testées étaient quasiment les mêmes dans chaque étude. Dans le cas de Slijkerman *et al.* (2004), la communauté de zooplancton était analysée en trois groupes de sensibilités différentes ; si l'on souhaite protéger l'écosystème, cela revient à considérer pour la communauté de zooplancton, une CSEO_{4 semaines} de 30 µg/L, soit celle qui permet de protéger les organismes les plus sensibles. On a donc, pour trois études distinctes avec des temps d'exposition de trois à quatre semaines, une même CSEO de 30-33 µg/L pour la communauté de zooplancton.

Les macro-invertébrés semblent plus sensibles que le zooplancton, avec une CSEO de 3,3 µg/L.

Invertébrés tropicaux

Les post-larves de 40 jours, de la crevette géante *Macrobrachium rosenbergii* ne semblent pas très sensibles, *in vitro*, à la carbendazime, puisque la CL_{50-24h} est de 100 mg/L (Satapornvanit *et al.*, 2009).

Par contre, les communautés de zooplancton et de macro-invertébrés exposés en microcosmes outdoor semblent bien plus sensibles au fongicide :

- macro-invertébrés : CSEO_{8 semaines} 3,3 µg/L (Daam *et al.*, 2009b). Dans cette communauté, les organismes les plus sensibles sont les *Corixidae*, les moins sensibles sont les *Hydrachnidae* (CSEO > 1 000 µg/L).
- zooplancton : CSEO_{8 semaines} 100 µg/L (Daam *et al.*, 2009a)

On retrouve, pour les macro-invertébrés tropicaux, la même valeur de CSEO que pour les macro-invertébrés tempérés (Cuppen *et al.*, 2000). Cette sensibilité globale dépend de la diversité de la communauté ainsi que de l'abondance des différents taxons, qui vont plus ou moins influencer la CSEO_{communauté} selon leurs sensibilités individuelles.

C'est notamment le cas pour le zooplancton, avec une CSEO pour les organismes tropicaux trois fois supérieure à celle obtenue pour le zooplancton tempéré (Van den Brink *et al.*, 2000 ; Slijkerman *et al.*, 2004 ; Daam et Van den Brink, 2007). Les auteurs (Daam *et al.*, 2009a) précisent que la communauté zooplanctonique était dominée par des rotifères, plus tolérants, alors que les cladocères, plus sensibles, étaient peu diversifiés et peu abondants.

Dans le cadre du programme ERICOR les données sur des organismes *in vitro* montre la forte sensibilité des larves d'oursin et de mollusque à la carbendazime.

La première évaluation sur les coraux, montre une DL₅₀ à 96 h de 350 µg/L.

Toxicité sur les poissons (Gillet et Roubaud, 1983)

La seule étude réalisée sur les poissons permet de comparer la sensibilité *in vitro* de la carpe commune avec celle de la truite arc-en-ciel. Cette dernière semble plus sensible au fongicide pour le paramètre du pourcentage de fécondation, puisque la CL₁₀₀ obtenue (0.5 mg/L) est 10 fois inférieure à celle de la carpe (5 mg/L). Par contre, la CL₁₀₀ n'a pas été évaluée sur le même temps de survie pour les œufs des 2 espèces (96 h chez la carpe et 25 jours chez la truite).

Pour les embryons de carpe, en fonction de leur âge et du temps d'exposition, les CL₁₀₀ calculées sont de 1 mg/L.

Pour les larves d'Ombrine tropicale et de bar (ERICOR), les CSEO sont supérieures aux doses maximales testées (1 mg/L)

Conclusion pour le carbendazime

Les résultats obtenus dans le programme ERICOR et les études considérées ici montrent une sensibilité très importante des invertébrés à la carbendazime, sa toxicité s'exprimant au-dessus de 0,7 µg/L pour les larves d'oursin Breton.

Les communautés de phytoplancton, zooplancton, invertébrés semblent de sensibilité importante mais moindre. Le premier résultat obtenu sur le corail montre une sensibilité à cette substance.

Le périphyton semble très peu sensible au fongicide, ainsi que la carpe et la truite.

Des études supplémentaires sont nécessaires pour pouvoir réellement classer les organismes en fonction de leur sensibilité, notamment pour les organismes photosynthétiques et les poissons, qui sont sous-représentés dans ces études.

La comparaison entre la sensibilité des organismes tropicaux et tempérés ne peut être réalisée qu'au travers des données acquises avec les essais sur les oursins. Le modèle tropical semble moins sensible avec une CE_{50} proche de 100 µg/L, contre 1 µg/L pour l'oursin tempéré. Des essais complémentaires sont nécessaires pour affiner cette différence.

Le carbendazime est détecté dans les eaux douces à La Réunion. À ce jour, aucune détection dans le milieu marin n'a été relevée.

11.2.2. Le diuron

Les recherches bibliographiques se sont focalisées sur les organismes suivants : phytoplancton, oursins, coraux et poissons. C'est ainsi 34 études portant sur la toxicité de l'herbicide « antifouling » diuron qui ont été trouvées, pour des organismes aquatiques d'eau douce ou marine. Parmi ces études, 13 ont été réalisées sur des organismes dulçaquicoles, et 19 sur des organismes marins. Deux d'entre elles ont porté sur des organismes provenant des deux milieux.

Afin d'avoir une vision générale de ces études, le Tableau 58 rassemble l'essentiel des données présentes.

Tableau 58 : Synthèse des données issues de la littérature pour le diuron.

Organisme	Système	Nombre d'études	Paramètre	Durée d'exposition	CSEO (µg/L)	LOEC (µg/L)	CL ₅₀ ou CE ₅₀ (µg/L)
Bactérie	<i>In vitro</i>	1	Luminescence	30 min			58100
Protozoaire	<i>In vitro</i>	1	Taux croissance	9 h			8200
Phytoplancton	<i>In vitro</i>	14	Inhibition croissance Taux de croissance Augmentation biomasse Photosynthèse Fluorescence	7 min-96 h	0 1-2	0 5-233	0.7-45
Zooplancton	Mésocosmes	1	Abondance	28 jours		14 j : 14 g/ha	
Ascidie	<i>In vitro</i>	1	Anomalies Dvt Mortalité	24 h	6 400	12 800	24400
Corail	<i>In vitro</i> /microcosmes "indoor" /microcosmes "outdoor"	10	Anomalie morphologique Pigmentation tentacules Croissance verticale Blanchissement Fécondation Métamorphose Rétraction tissus Production primaire Incorporation carbone Efficacité photosynthèse Respiration	4 h-50 jours	0,1-1000	0,25-300	2.3-5.9
Oursin	<i>In vitro</i>	3	Fécondation Anomalies Dvt Mortalité	30 min – 48 h	250-1 000	500-3 200	2400-5600
Crustacé	<i>In vitro</i>	4	Mortalité Descendance Poids	1-10 jours	1 000-8 000	3 500-15700	3000-19400
Annélide	<i>In vitro</i>	1	Poids	10 jours	1 800	3 500	
Gastéropode	<i>In vitro</i>	1	Poids	10 jours	13 400	22 800	
Poisson	<i>In vitro</i> /microcosmes "indoor"	5	Viabilité cellulaire Mortalité Croissance Inhibition AchE Comportement Dvt colonne vertébrale ou squelette ?	24 h— 28 jours	0,5-4 200	5-8 300	230-5200

La présente synthèse se limite aux organismes pour lesquels plusieurs études ont été collectées : phytoplancton (14), oursin (3), corail (10), crustacé (4) et poissons (5). Les tests réalisés sont presque exclusivement monospécifiques, et ne tiennent donc pas compte des éventuelles interactions entre espèces qui peuvent influencer la réponse des organismes au toxique, dans le cas des communautés.

D'une manière générale, les organismes les moins sensibles selon les tests effectués, semblent être les crustacés, suivis des poissons, les coraux et le phytoplancton étant les plus sensibles au diuron. Cette première constatation n'est pas surprenante au regard du mode d'action du diuron, qui est un inhibiteur du photosystème II. Les organismes photosynthétiques en sont donc les premières cibles, qu'il s'agisse d'éléments au mode de vie indépendant ou de symbiotes, comme dans le cas des coraux. Les maillons trophiques supérieurs, tels que les crustacés et poissons, ne sont pas les indicateurs les plus sensibles pour détecter des effets liés à l'exposition au diuron.

Phytoplancton

Les études réalisées ont porté sur un total de 27 espèces de phytoplancton, dont neuf espèces marines. Ces organismes ayant un temps de génération relativement court, les effets chroniques des contaminants peuvent être évalués sur des périodes d'exposition de quelques jours : la majorité des tests durent 72 à 96 h, lorsque le paramètre d'effet recherché porte sur la croissance (inhibition de croissance, taux de croissance, biomasse globale).

Pour les espèces d'eau douce, les CE_{50} calculées à partir d'effets sur la croissance des cultures sont comprises entre 0,7 µg/L (Ma *et al.*, 2006) et 45 µg/L (Fernandez-Alba *et al.*, 2002), intervalle qui comprend des concentrations pouvant être mesurées en milieu dulçaquicole, estuarien ou côtier à proximité des ports et marinas. Rien que pour l'espèce *Pseudokirchneriella subcapitata* (ou *Selenastrum capricornutum*, ou *Raphidocelis subcapitata*), les valeurs sont de 0,7 µg/L (Ma *et al.*, 2006), 15 µg/L (Hartgers *et al.*, 1998), 36,4 µg/L (Schrader *et al.*, 1998) et 45 µg/L (Fernandez-Alba *et al.*, 2002). Cela illustre l'importante variabilité des résultats issus d'expériences faites avec la même espèce. Cette variabilité peut provenir de plusieurs sources : souches différentes, conditions d'expositions différentes (température, lumière, densité de l'inoculum), effet opérateur...

Pour les espèces d'eau marine, les valeurs des CE_{50} calculées à partir d'effets sur la croissance des cultures sont comprises entre 5,9 µg/L pour *Dunaliella tertiolecta* (Gatidou et Thomaidis, 2007) et 36 µg/L pour *Chaetoceros gracilis* (Koutsaftis et Aoyama, 2006).

Les mesures qui portent sur l'appareil photosynthétique, ou sur la fluorescence due aux pigments, permettent d'obtenir des résultats après quelques minutes d'exposition (dès 7 minutes pour certaines espèces) ou après quelques jours (72 h). Les valeurs de CE_{50} calculées pour les espèces d'eau douce sont comprises entre 1,2 µg/L (Deblois *et al.*, 2008 : 5,1 nM) et 27 µg/L (Podola et Melkonian, 2005). Cette mesure a été faite sur deux espèces marines, dont les réponses sont très proches : 24 µg/L pour *Navicula sp.* et 25 µg/L pour *Nephroselmis pyriformis* (Magnusson *et al.*, 2008).

L'étude ERICOR, portant sur trois espèces, dont deux tropicales montrent des valeurs de CE_{50} comprise entre 22,8 et 35,9 µg/L, avec peu de différence de sensibilité entre les modèles.

L'ensemble de ces résultats ne permet pas d'établir une différence de sensibilité entre les espèces phytoplanctoniques d'eau douce ou marines, même si des valeurs de CE_{50} plus faibles, inférieures à 1 µg/L, ont été obtenues pour certaines espèces dulçaquicoles. Le nombre d'espèces marines testées étant moitié moindre que le nombre d'espèces d'eau douce, ces résultats ne sont pas forcément représentatifs de la variabilité de réponse existant dans ces milieux. Cependant, on peut tout de même supposer que les sensibilités

sont du même ordre de grandeur d'une manière générale, en gardant à l'esprit qu'une même espèce peut montrer des sensibilités différentes de deux ordres de grandeurs selon l'expérimentation.

Comme le montrent les résultats de Bengtson-Nash *et al.* (2005), une inhibition de 10 % de la photosynthèse intervient, chez des espèces d'eau douce ou marines, dès 0,1 µg/L de diuron. Le diuron est un herbicide dont la toxicité pour le phytoplancton est assez élevée. Il peut probablement représenter un danger certain pour ces organismes dans les zones à risques situées à proximité des sources de contamination.

Corail

Les tests ont été réalisés sur 13 espèces de coraux marins. Les paramètres mesurés pour évaluer les effets du diuron étaient parfois directement liés à l'espèce de zooxanthelle symbiotique associée (photosynthèse, incorporation de carbone, production primaire, pigmentation, blanchissement). Mais un certain nombre de paramètres étaient mesurés sur les animaux, tels que la fécondation, la métamorphose, la croissance, les anomalies de morphologie, la rétractation de tissus, la mortalité.

Dans la majorité des études, les effets ont été évalués après quelques heures ou jours (96 h) d'exposition, mais celle-ci a parfois duré jusqu'à 50 jours. Les paramètres liés aux symbiotes ont donné les résultats de sensibilité les plus élevés : les LOEC calculées sont comprises entre 0,25 µg/L (Jones *et al.*, 2003) et 10 µg/L (Raberg *et al.*, 2003) pour l'efficacité de photosynthèse par exemple. Quant aux paramètres mesurés directement sur les coraux, ils semblent nettement moins impactés par le diuron : c'est le cas pour la survie, la métamorphose, les anomalies morphologiques et la fécondation, avec des valeurs de CSEO entre 100 et 1 000 µg/L (Negri *et al.*, 2005 ; Watanabe *et al.*, 2006).

Le diuron a été testé sur deux cibles pour ERICOR : les symbiotes en cultures libres et les microcolonies en ambiance *in vitro* avec des temps d'exposition de 96 h. Cette substance n'a pas montré de toxicité aigue à 730 µg/L sur des organismes entiers, cependant elle agit fortement sur la croissance des symbiotes (CE₅₀ de 35,1 µg/L).

Il semble donc que les coraux soient très sensibles à cet herbicide, mais que les effets se fassent ressentir plus particulièrement sur leur symbiote. Le diuron, aux concentrations susceptibles d'être retrouvées en milieu côtier tropical, peut représenter une menace pour les coraux, par son action d'inhibition de la photosynthèse qui compromet les bénéfices apportés par les symbiotes.

Oursins

Trois études ont été trouvées sur trois espèces d'oursins marins. Les expositions ont duré de 30 minutes à 48 h, et les effets ont été évalués sur des anomalies de développement et l'intégrité des œufs obtenus après fécondation par des gamètes exposés à l'herbicide, ainsi que sur la mortalité. Les LOEC et CSEO les plus faibles ont été obtenues sur l'espèce *Paracentrotus lividus* (Manzo *et al.*, 2006 ; programme ERICOR), mais restent supérieures à la centaine de µg/L. L'espèce tropicale *Echinometra mathei* semble quand à elle plus sensible avec une CSEO portée à 90,5 µg/L. Ce petit nombre d'études semble montrer une sensibilité relativement peu élevée des oursins tempérés à l'exposition au diuron par opposition aux oursins tropicaux. Cependant, on peut surtout noter le manque de données relatives à ce type d'organismes, et le besoin de développer des tests sur d'autres paramètres afin de vérifier l'existence éventuelle d'indicateurs plus sensibles.

Poissons

Cinq espèces de poissons ont été exposées au diuron, dont une seule espèce marine selon la littérature scientifique. Les expositions ont été réalisées sur les stades juvéniles et œufs sur des durées de 24 h à 28 jours. Les paramètres les plus classiquement étudiés, à savoir la mortalité et la croissance, semblent les moins sensibles à l'effet du diuron : les concentrations d'effets sont de l'ordre du mg/L (Nebeker et Schuytema, 1998 ; Okamura *et al.*, 2002). Ce constat est aussi réalisé sur les deux espèces ciblées dans ERICOR avec aucun effet observé aux doses maximales testées c.a.d. 1 mg/L. Par contre, d'autres types de paramètres liés au développement (Gagnon et Rawson, 2009), au comportement (Saglio et Trijasse, 1998) ou à une activité enzymatique (Bretaud *et al.*, 2000) semblent nettement plus appropriés pour la détection d'un effet. Les LOEC obtenues avec ces mesures sont comprises entre 5 et 50 µg/L. Il reste à savoir dans quelle mesure la perturbation de ce type de paramètres est révélatrice d'effets risquant de compromettre le rôle des organismes concernés dans leur écosystème.

Crustacés

Les crustacés testés dans les études sur le diuron appartiennent à cinq espèces d'eau douce qui ont été exposées durant 24 h à 10 jours. Les paramètres mesurés étaient surtout la mortalité, associée parfois à d'autres critères, comme le nombre de descendants ou le poids (Nebeker et Schuytema, 1998). Les concentrations d'effets obtenues (LOEC et CL₅₀) sont comprises entre 3 mg/L (Bellas *et al.*, 2005), 19,4 mg/L (Nebeker et Schuytema, 1998), et > 1mg/L (ERICOR) ce qui illustre une faible sensibilité des crustacés au diuron.

Il serait intéressant de tester des crustacés en communautés (ils sont pour une grande majorité herbivores), dans des conditions plus réalistes du point de vue environnemental, afin de vérifier la sensibilité de ces organismes à cet herbicide.

Conclusion pour le diuron

Parmi les études collectées et les organismes étudiés, dans les conditions expérimentales de laboratoire, les premiers organismes susceptibles d'être impactés par le diuron aux concentrations environnementales seraient le phytoplancton et les coraux. Les oursins montrent une sensibilité contrastée, avec des effets observés dans le développement des larves tropicales. Les poissons et crustacés ne semblent que peu sensibles à l'herbicide, étant donné les critères d'effets exploités dans ces études.

Le diuron et ses métabolites sont retrouvés dans l'environnement marin réunionnais. Les valeurs disponibles montrent des concentrations qui s'échelonnent entre 0,2 µg/L et 0,2 ng/L, cette dernière valeur ayant été obtenue dans un des lagons avec des échantillonneurs passifs du type POCIS. Ces valeurs sont proches des CSEO obtenues d'expérimentations d'effet chronique (50 j d'exposition) sur des coraux en Australie (Jones *et al.*, 2003).

11.2.3. Le glyphosate

La recherche bibliographique focalisée sur le phytoplancton, les oursins, les coraux et les poissons a permis d'isoler 31 études portant sur la toxicité de l'herbicide glyphosate. Ils sont en majorité réalisés sur des organismes aquatiques d'eau douce. Parmi ces études, 24 ont été réalisées sur des organismes dulçaquicoles, et cinq sur des organismes marins. Deux d'entre elles ont porté sur des organismes provenant des deux milieux.

Afin d'avoir une vision générale de ces études, un tableau synthétique (ci-après) rassemble l'essentiel des données présentes dans le tableau détaillé ci-dessus.

Tableau 59 : Synthèse des données issues de la littérature pour le glyphosate.

Organisme	Système	Nombre d'études	Paramètre	Durée d'exposition	CSEO (mg/L)	LOEC (mg/L)	CL ₅₀ ou CE ₅₀ (mg/L)
Bactérie	<i>In vitro</i>	2	Luminescence	15 – 30 min			10,2 – 162
Protozoaire	<i>In vitro</i>	2	Croissance	9 h – 48 h			5 – 648
Phytoplancton	<i>In vitro</i> – microcosmes indoor	11	Inhibition croissance Taux de croissance Production primaire Photosynthèse Contenu chlorophylle Mobilité Vitesse Nage ascensionnelle Agglomération	1 h – 7 jours	0,05 – 1,7	0,02 – 169	1,85 – > 4700
Macrophyte	<i>In vitro</i>	1	Croissance Pigments	3 jours	16,9	1,69	
Oursin	<i>In vitro</i>	4	Anomalies Dvt Division œuf Ecllosion Transcription	3 h – 48 h	> 0,2	170-1 700	203-592
Crustacé	<i>In vitro</i>	4	Mortalité Eclussions par femelle Portées par femelle	48 h – 15 j	25 – 50	25 – 50	0,57 – > 2000
Bivalve	<i>In vitro</i>	2	Mortalité Anomalies Dvt Fragmentation ADN	18 h – 48 h	> 0,2 – 10		18,3
Poisson	Microcosmes « indoor »	12	Mortalité Comportement Activités enzymatiques Métabolites Hormones Micronoyaux	24 h – 96 h	0,4-1 900	0,2-37,5	4,4 - 21000

La toxicité du glyphosate et de certaines formulations commerciales a été évaluée par de nombreuses études sur le phytoplancton et les poissons. Les effets sur les oursins ont été très peu étudiés, puisque sur les quatre études relevées, trois sont du même auteur et portent sur un aspect particulier. Quant aux coraux, aucune étude sur la toxicité du glyphosate n'a été trouvée.

Les commentaires qui suivent se limiteront aux organismes pour lesquels plusieurs études ont été collectées : phytoplancton (11), oursins (4), crustacés (4) et poissons (12). Les tests réalisés sont presque exclusivement monospécifiques, et ne tiennent donc pas compte des éventuelles interactions entre espèces qui peuvent influencer la réponse des organismes au toxique, dans le cas des communautés.

D'une manière générale, les organismes les moins sensibles selon les tests effectués, semblent être les oursins, suivis des crustacés, poissons, le phytoplancton étant le plus sensible au glyphosate. Le glyphosate est un herbicide inhibiteur de l'EPSP synthétase, une enzyme impliquée dans la synthèse d'acides aminés aromatiques. C'est un herbicide à large spectre, il n'est pas surprenant que les organismes photosynthétiques y soient les plus sensibles.

Phytoplancton

Les études réalisées ont porté sur un total de 16 espèces de phytoplancton, dont une seule espèce marine. Ces organismes ayant un temps de génération relativement court, les effets des contaminants peuvent être évalués sur des périodes d'exposition de quelques jours : la majorité des tests durent 96 h, lorsque le paramètre d'effet recherché porte sur la croissance.

Pour les espèces d'eau douce, les CE₅₀ disponibles calculées à partir d'effets sur la croissance des cultures sont comprises entre 1,85 mg/L (Tsui et Chu, 2003) et 70,5 mg/L (Ma *et al.*, 2003), ce qui tend à montrer une toxicité relativement faible du glyphosate sur ces organismes, comparée par exemple au diuron.

Tsui et Chu (2003) ont testé la toxicité du glyphosate sous différentes formes, ainsi que celle de son surfactant, sur 2 espèces : pour la microalgue d'eau douce *Pseudokirchneriella subcapitata* (ou *Selenastrum capricornutum*), les valeurs de CE₅₀ vont de 3,92 mg/L (POEA) à 41 mg/L (sel d'IPA) ; pour l'espèce marine *Skeletonema costatum*, les valeurs de CE₅₀ sont comprises entre 1,85 mg/L (Roundup) et 5,9 mg/L (sel d'IPA). La toxicité du glyphosate dépend donc de la forme dans laquelle il se trouve, ainsi que des substances qui l'accompagnent lorsqu'il est en formulation.

Pour les espèces marines testées dans le programme ERICOR, les sensibilités sont du même ordre de grandeur. Aucun effet de cette substance n'a été observé aux doses maximales ciblées (cad 1mg/L pour les espèces tropicales et 9,2 mg/L pour *Phaeodactylum*). Des essais avec des concentrations supérieures devraient permettre de comparer la sensibilité des espèces marines à celles d'espèces d'eau douce.

Oursins

Quatre études ont été trouvées sur deux espèces d'oursins marins. Pour l'une des espèces, *Sphaerechinus granularis*, trois études ont été réalisées par les mêmes auteurs (Marc *et al.*, 2003 ; 2004 ; 2005), afin d'explorer la toxicité du glyphosate sous différentes formulations. Le phénomène étudié dans ces études est celui des divisions cellulaires de l'œuf d'oursin après fécondation, jusqu'à l'éclosion. Les effets sont observés pour des concentrations relativement importantes en glyphosate, jusqu'au g/L (8 mM = 1,35 g/L ; 10 mM = 1,7 g/L). Les anomalies de développement ont été évaluées sur *Paracentrotus lividus* (His *et al.*, 1999 et ERICOR, présente étude), ainsi que sur l'espèce tropicale *Echinometra mathei*. Aucun effet n'a été observé aux plus fortes concentrations testées, 200 à 1000 µg/L. Les oursins, dans l'état actuel des connaissances, semblent peu sensibles aux faibles concentrations de glyphosate. Cependant les données sont insuffisantes sur ce type d'organismes.

Crustacés

Les crustacés testés dans les études sur le glyphosate appartiennent à trois espèces dont deux d'eau douce, qui ont été exposées durant 48 h à 96 h pour l'évaluation de la mortalité. La sensibilité d'*Acartia tonsa* (marin) et *Ceriodaphnia dubia* (eau douce), exposés à différentes formes de glyphosate, peut varier d'un ou deux ordres de grandeur, selon la substance. Le POEA semble le plus nocif, le sel d'IPA apparaît comme le moins toxique, comme pour le phytoplancton dans la même étude (Tsui et Chu, 2003). Le crustacé marin est plus sensible au glyphosate que l'espèce d'eau douce, les CL₅₀ entre les deux pouvant varier d'un ordre de grandeur. *Daphnia magna* est nettement plus sensible à la formulation Spasor qu'à la substance active seule (Pereira *et al.*, 2009), ce qui confirme l'importance d'évaluer la toxicité non pas uniquement des substances actives, mais aussi des formulations commerciales utilisées par les usagers.

Les résultats des bioessais réalisés dans ERICOR ne montrent pas d'effet aux doses maximales testées (92 mg/L).

Poissons

Onze espèces de poissons (d'eau douce uniquement) ont été exposées au glyphosate, dont neuf à la formulation Roundup, trois à la substance active et un à la formulation Vision. Les expositions ont été réalisées sur les stades juvéniles ou adultes, sur des durées de 24 h à 96 h. Le paramètre le plus classiquement étudié est la mortalité, qui aboutit à de CL₅₀ comprises entre le mg/L et le g/L (Anton *et al.*, 1994). Des paramètres sublétaux tels que des activités enzymatiques dans différents organes donnent des LOEC d'ordre plus faible, entre 0,2 mg/L (Gluszczak *et al.*, 2007) et 3 mg/L (Gluszczak *et al.*, 2006).

Les résultats des bioessais réalisés dans ERICOR ne montrent pas d'effet aux doses maximales testées (92 mg/L pour le bar et 0,9 mg/L pour l'ombrine).

Conclusion pour le glyphosate

Selon ces différentes études, dans les conditions expérimentales de laboratoire, il semblerait que les premiers organismes susceptibles d'être impactés par le glyphosate seraient le phytoplancton. Cette substance pourrait représenter un danger pour les milieux aquatiques situés à proximité des zones d'épandage de la substance. Les organismes marins étant sous-représentés dans les études collectées, on ne peut conclure quant à la dangerosité de cet herbicide pour ces derniers.

Le glyphosate et son métabolite (AMPA) sont classiquement retrouvés dans les aquifères continentaux réunionnais. Les techniques actuelles de surveillance ne permettent d'évaluer la présence de ces substances dans l'environnement marin.

Il faut garder à l'esprit que l'ensemble des études synthétisées concerne des expérimentations réalisées en conditions de laboratoire, très éloignées des conditions environnementales. Or, un effet du « Roundup » a pu être démontré sur les communautés microbiennes marines exposées à des concentrations compatibles avec un pic de pollution en milieu côtier, lors d'une expérimentation sur les communautés naturelles en microcosmes *in situ* (Stachowski-Haberkorn *et al.*, 2009).

11.2.4. Le métolachlore

Les recherches bibliographiques montrent qu'il y a très peu d'articles sur cette molécule d'une manière générale, ainsi les études concernant d'autres organismes aquatiques ont aussi été considérées.

Seulement 11 références ont pu être collectées, dont huit sur des espèces phytoplanctoniques, deux sur des crustacés et un sur un diptère dont les larves sont aquatiques. Les 11 études portent exclusivement sur des organismes d'eau douce testés par des expériences monospécifiques en conditions contrôlées de laboratoire, donc éloignées des conditions naturelles. Ces tests ne tiennent donc pas compte des éventuelles interactions entre espèces qui peuvent influencer la réponse des organismes au toxique, dans le cas des communautés.

Le métolachlore est un herbicide qui inhibe la mitose, donc la division cellulaire.

Phytoplancton

Les études réalisées ont porté sur un total de neuf espèces de phytoplancton dulçaquicole. La majorité des tests durent 96 h, et portent sur l'inhibition de croissance, sauf pour l'étude de Hartgers *et al.* (1998) qui ont évalué l'inhibition de croissance sur 72 h. Seule l'étude de Juneau *et al.* (2001) porte sur un autre paramètre, à savoir la photosynthèse.

Si l'on considère la globalité des résultats, les espèces testées ont leurs CE₅₀ comprises entre 56 µg/L (Hartgers *et al.*, 1998) et 19,4 mg/L (Ma *et al.*, 2002), ce qui illustre encore la grande variabilité des résultats, liée sans doute à : (i) différentes études donc différentes conditions ; (ii) les souches ne sont pas forcément les mêmes ; (iii) la variabilité de sensibilité intra- et inter-spécifique.

On peut constater une différence de réponse de plusieurs ordres de grandeurs sur une même espèce testée dans différentes études : ainsi la CE₅₀ de *Selenastrum capricornutum* est évaluée à 5,5 mg/L par Ma *et al.* (2006), alors que Hartgers *et al.* (1998) l'avaient évaluée à 56 µg/L, soit 2 ordres de grandeurs en dessous. De même pour *Chlorella pyrenoidosa*, les CE₅₀ vont de 68 µg/L (Liu et Xiong, 2009) à 12,7 mg/L (Ma *et al.*, 2001).

La comparaison de la toxicité des deux énantiomères du métolachlore sur *Chlorella pyrenoidosa*, le *rac*- et le *S*-, va dans le sens d'une toxicité plus élevée du *S*-, avec une CE₅₀ (68 µg/L) plus de deux fois inférieure à celle du *rac*- (Liu et Xiong, 2009).

Dans notre étude le *S*-métholachlore montre des effets tout aussi contrastés, avec une CE₅₀ déterminée uniquement pour l'espèce tropicale de diatomée, *Navicula sp.* (1,5 mg/L) alors qu'aucun effet n'est observé sur les autres espèces marines étudiées à plus de 10 mg/L.

On peut noter que les valeurs obtenues avec les mesures sur l'appareil photosynthétique semblent un peu plus homogènes, l'espèce *Ankistrodesmus falcatus* paraissant la plus sensible, parmi celles testées de cette manière.

Étant donné la variabilité des réponses d'une même espèce testée par différents auteurs, il paraît délicat d'établir un classement des espèces, toutes études confondues, selon leur sensibilité.

Crustacés

Les crustacés testés dans les études sur le métolachlore appartiennent à deux espèces d'eau douce, la daphnie (Liu et Xiong, 2006) et une écrevisse américaine (Cook et Moore, 2008).

Le paramètre le plus sensible chez la daphnie correspond au nombre de juvéniles par femelle, affecté à partir de 10 µg/L pour le *rac*-métholachlore, et à partir de 500 µg/L pour le *S*-

métolachlore. Les mêmes auteurs avaient déjà comparé la toxicité des deux énantiomères sur *Chlorella pyrenoidosa*. Il est intéressant de remarquer que lorsque le *rac*- est moins toxique que le *S*- pour l'algue, à l'opposé le *rac*- est plus toxique que le *S*- pour la daphnie, pour les paramètres de longévité, nombre de portées par femelles et nombre de juvéniles par femelle. Cependant, on peut noter aussi la différence importante entre les valeurs de toxicité chronique citées précédemment, et les valeurs de toxicité aiguë situées à 69,4 mg/L pour le *rac*- et 51,2 mg/L pour le *S*-. On peut remarquer que pour la toxicité aiguë, c'est le *S*- et non plus le *rac*- qui est le plus toxique. Ce genre de résultats confirme l'intérêt de tester non seulement différents types d'organismes, mais aussi de mesurer différents paramètres sur un même type d'organismes, pour évaluer la toxicité d'une molécule.

Enfin, une étude comportementale a été réalisée sur des écrevisses mâles, portant sur des critères d'agressivité et de combativité liés à la réception de signaux olfactifs. Il est apparu que le métolachlore à partir de 80 ppb ($\mu\text{g/L}$) pouvait perturber la réaction des écrevisses mâles mises en situation de combat imminent avec un adversaire dans une enceinte à l'espace réduit.

Conclusion pour le métolachlore

Le peu d'études disponibles sur la toxicité du métolachlore ne permet pas de classer les différents types d'organismes en fonction de leur sensibilité. Les seules données qui existent sur des organismes marins sont celles de notre étude. Un effet du *S*-métholachlore est noté sur la diatomée tropicale avec une CE_{50} de l'ordre de 1,5 mg/L.

Ce manque de donnée ne permet pas de comparer la sensibilité des organismes entre eux, la question reste donc en suspens.

Dans l'environnement marin, cette substance est détectée dans l'environnement marin, et plus particulièrement dans les lagons. L'utilisation d'échantillonneurs passifs comme les SBSE a permis de détecter la molécule à des concentrations de l'ordre de 10 ng/L dans l'eau de mer (Gonzalez *et al.*, 2009). La dangerosité de cette substance avec des expositions chroniques sur les organismes marins tropicaux reste posée.

11.2.5. Le carbofuran

La recherche bibliographique a isolée peu de publications sur le phytoplancton. Les oursins et les coraux ne sont pas documentés, ainsi, les études portant sur d'autres organismes aquatiques ont été considérées. 18 études portant sur la toxicité du carbofuran ont été trouvées, en majorité sur des organismes aquatiques d'eau douce. Une seule étude concernant un organisme marin (l'huître creuse) a été trouvée.

Afin d'avoir une vision générale de ces études, le Tableau 60 rassemble l'essentiel des données de manière synthétique.

Tableau 60 : Synthèse des données issues de la littérature pour le carbofuran.

Organisme	Système	Nombre d'études	Paramètre	Durée d'exposition	CSEO (µg/L)	LOEC (µg/L)	CL ₅₀ ou CE ₅₀ (µg/L)
Phytoplancton	<i>In vitro</i>	1	Inhibition croissance	96 h	200-2 000	500-5 000	4 650-37900
Diptère	<i>In vitro</i>	2	Mortalité	2-24 h			2.13-90
Crustacé	<i>In vitro</i>	1	Mortalité	7 jours			> 10
Bivalve	<i>In vitro</i>	1	AChE	96 h	< 22,1	22,1	670,4
Poisson	<i>In vitro</i> /Microcosmes « indoor »	13	Mortalité Activité AchE Activité ChE Détection olfactive Hormones Indice gonadosomatique Glucose Glycogène Activité EROD Contenu protéique Activité LDH	30 min-30 j	1-500	1-1 000	2-1000

Sur 18 publications collectées, une seule étude concerne le phytoplancton, une seule étude concerne un crustacé, et une seule un bivalve. Deux études ont été trouvées avec pour organisme cible un diptère aquatique, et 13 publications portent sur des poissons.

D'une manière générale, les organismes phytoplanctoniques testés ne semblent pas très sensibles à l'insecticide carbofuran (Ma *et al.*, 2006), puisque les CSEO sont de l'ordre de la centaine de µg/L pour la plus faible, et les CE₅₀ sont supérieures au mg/L.

Par contre, le diptère et le crustacé testés (Parsons et Surgeoner, 1991a, 1991b ; Dutra *et al.*, 2009) semblent beaucoup plus sensibles à la substance, avec des concentrations létales inférieures à la centaine de µg/L. Des CE₅₀ de l'ordre de la dizaine de µg/L ont été obtenus avec le copépode marin *Acartia tonsa* (ERICOR). Ces données laissent penser que la substance pourrait représenter un éventuel danger pour ce type d'organismes à proximité des sources d'utilisation du carbofuran ; cependant, des données complémentaires seraient nécessaires afin de confirmer cette toxicité.

Le seul organisme marin testé dans les publications collectées est l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Anguiano *et al.*, 2009). Cet organisme d'intérêt majeur en aquaculture semble relativement sensible au carbofuran, puisque l'activité AChE est atteinte à partir de 22 µg/L pour une exposition de 96 h. Cependant, le développement des larves d'huître creuse semble peu impacté par cette substance, avec une CSEO supérieure à 1 mg/L obtenu dans le programme ERICOR.

La question des impacts éventuels de la molécule sur les organismes marins présents dans les zones susceptibles de recevoir des pics de pesticides reste posée.

Poissons

Neuf espèces de poissons d'eau douce ont été exposées au carbofuran. Les expositions ont été réalisées sur des cellules en culture, des stades juvéniles et adultes, sur des durées de 30 minutes à 30 jours. Cependant, la majorité des études a été réalisée avec des expositions de 24 à 96 h. Les paramètres étudiés sont variés : le paramètre classique de mortalité est toujours présent, mais on trouve aussi plusieurs études sur l'activité AChE, puisque le carbofuran en est un inhibiteur.

Les poissons semblent relativement sensibles au carbofuran, puisque les valeurs de CL_{50} relevées sont comprises entre 35,6 et 115 $\mu\text{g/L}$ (ERICOR) pour des espèces marines. Les espèces d'eau douce montrent une sensibilité moindre avec un maximum de 1 mg/L (Saito *et al.*, 1991).

La diversité des paramètres étudiés ne permet pas une comparaison rigoureuse de la sensibilité des différentes espèces testées, mais les activités enzymatiques mesurées paraissent suffisamment sensibles pour évaluer la toxicité du carbofuran.

Conclusion pour le carbofuran

Parmi les études collectées et les organismes étudiés, dans les conditions expérimentales de laboratoire, les poissons, crustacés et diptères aquatiques sont sensibles au carbofuran, alors que ce n'est pas le cas du phytoplancton.

Les données acquises au cours du programme montrent une sensibilité plus forte des espèces de poissons marins par rapport aux organismes d'eau douce. Ces résultats restent partiels car réalisés sur un nombre limité d'espèce.

Dans l'environnement marin le carbofuran n'est pas détecté avec les moyens de surveillance actuels.

11.2.6. La deltaméthrine

Aucune étude n'a été trouvée sur les oursins et les coraux, une seule publication concerne le phytoplancton. Sur un total de 18 études collectées, 11 portent sur les poissons (l'une d'elles (Çalta et Ural, 2004) présente un tableau de synthèse des résultats de toxicité aiguë obtenus sur différentes espèces de poissons d'eau douce). Quatre publications rapportent des résultats obtenus sur des crustacés, trois études concernent des espèces de moules d'eau douce. Pour les organismes tels que le phytoplancton, le zooplancton, les bactéries et les insectes aquatiques, une seule étude a été trouvée.

Toutes les études disponibles portent sur des organismes dulçaquicoles.

Afin d'avoir une vision générale des études collectées, le Tableau 61 rassemble l'essentiel des données de manière synthétique.

Tableau 61 : Synthèse des données issues de la littérature pour la deltaméthrine.

Organisme	Système	Nombre d'études	Paramètre	Durée d'exposition	CSEO (µg/L)	LOEC (µg/L)	CL ₅₀ ou CE ₅₀ (µg/L)
Bactérie	Microcosmes <i>in situ</i>	1	Densité UFC Incorporation thymidine	12 h		4,4	
Phytoplancton	<i>In vitro</i>	1	Fluorescence <i>in vivo</i>	40 h	443	443	
Zooplancton	<i>In vitro</i>	1	Mortalité Croissance	40 h	0,89	2,2-4,4	
Crustacé	<i>In vitro</i>	4	Mortalité	48-96 h			0,018-1 000
Insecte	<i>In vitro</i>	1	Mortalité	Non précisé			0,012
Bivalve	Microcosmes « indoor »	3	Mortalité Activité siphon exhalant Activité valvaire Péroxidation lipidique Activité glutathion Activité catalase	30 min à 1 semaine	5-1 600	1-800	6 600
Poisson	<i>In vitro</i> /microcosmes indoor	11	Mortalité Indices hématologiques Biochimie du sérum Anomalies érythrocytes Micronoyaux Péroxidation lipidique Activité GSH Activité SOD	48-96 h		0,4-5	0,074-91

Les tests réalisés sur ces organismes sont exclusivement monospécifiques, et ne tiennent donc pas compte des éventuelles interactions entre espèces qui peuvent influencer la réponse des organismes au toxique, dans le cas des communautés. Ces tests ont été effectués en conditions contrôlées de laboratoire et n'incluent pas les variations des paramètres physico-chimiques qui peuvent intervenir dans le milieu naturel.

Phytoplancton

Notre étude ERICOR est la seule à avoir testé la deltaméthrine sur la croissance du phytoplancton. Aucun effet significatif n'a été observé à 1 mg/L de concentration nominale et des durées d'exposition de 96 heures. Cependant, la faible solubilité de la molécule dans l'eau, les incertitudes méthodologiques du contrôle des concentrations dans les solutions testées, la dégradation rapide du produit dans les conditions expérimentales, ne permettent pas d'affirmer l'absence d'effet sur le phytoplancton.

Oursins

Comme pour le phytoplancton, notre étude a été la première à tester la deltaméthrine sur le développement embryonnaire des oursins. Ainsi, c'est seulement sur l'espèce tropicale *Echinometra mathaei* qu'une CE₅₀ a pu être déterminée (0,6 mg/L) et les CSEO sont comprises entre 0,3 et 0,6 mg/L.

Bivalves

Deux espèces de moules d'eau douce ont été exposées à la deltaméthrine dans trois études. La durée d'exposition a varié en fonction des paramètres analysés : de 30 minutes pour la mesure de l'activité du siphon exhalant (Kontreczky *et al.*, 1997), à 96 h pour la mortalité (Köprücü et Seker, 2008) et différents paramètres cellulaires (Köprücü *et al.*, 2008), jusqu'à une semaine pour l'activité valvaire (Kontreczky *et al.*, 1997). Les bivalves semblent moins sensibles à la substance que ne le sont les crustacés et poissons : en effet, en fonction des paramètres analysés, la LOEC peut aller de 1 µg/L (Kontreczky *et al.*, 1997) à 800 µg/L (Köprücü *et al.*, 2008). La seule étude dans laquelle la toxicité de la deltaméthrine a été évaluée sur la mortalité rapporte une CL₅₀ de 6,6 mg/L.

Les effets sur le développement embryonnaire a été testée sur les larves d'huître creuse (ERICOR), confirmant la faible toxicité de cette substance, avec une CSEO supérieure à 1 mg/L.

L'activité valvaire des coquilles semble être un paramètre d'une plus grande sensibilité pour la détection d'un effet toxique. Même si ces organismes semblent moins sensibles que les crustacés et poissons, les réponses liées à la filtration sont apparemment modifiées pour des concentrations de l'ordre du µg/L, ordre de grandeur compatible avec une contamination du milieu dulçaquicole.

Crustacés

Les crustacés testés appartiennent à quatre espèces d'eau douce, et ont été exposés à la deltaméthrine durant 48 h. Seule la mortalité liée à l'exposition a été évaluée. Les valeurs de CL₅₀ obtenues en conditions « classiques » d'exposition vont de 18 ng/L (Lahr, 1998) à 450 ng/L (Ren *et al.*, 2009). Pour l'espèce marine *Arcatia tonsa* (copépode testé dans notre étude ERICOR), des CL₅₀ de l'ordre du µg/L ont été observées. Les cinq espèces de crustacés testées montrent une sensibilité importante à la deltaméthrine, pour des concentrations très faibles, du µg/L voire inférieures pour les espèces d'eau douce. Cela illustre l'important pouvoir toxique de la molécule, non seulement pour l'eau douce, mais probablement aussi pour les zones estuariennes et côtières, vu la faible valeur des concentrations létales.

Ceci montre aussi la spécificité de la deltaméthrine. « Le mécanisme d'action toxique de la deltaméthrine repose sur la prolongation de l'ouverture des canaux sodiques, perturbant l'influx nerveux des systèmes nerveux central et périphérique, aussi bien chez les

mammifères que chez les insectes. Les pyréthrine de type II, à groupement α -cyano, comme la deltaméthrine, provoquent des vagues d'influx nerveux prolongés »

Poissons

Les poissons d'eau douce exposés à la deltaméthrine appartiennent à 14 espèces. Les expositions ont porté aussi bien sur des stades précoces tels que les embryons ou larves (Köprücü et Aydin, 2004 ; Thomas *et al.*, 2008), sur des juvéniles et des adultes. Les expositions ont été relativement courtes, et ont duré entre 48 et 96h. La grande majorité des études (9) a exploité le paramètre de mortalité des poissons, et seulement deux études ont porté sur des paramètres complémentaires (El-Sayed *et al.*, 2007 ; Ansari *et al.*, 2008).

D'une manière générale, les poissons sont très sensibles à la deltaméthrine, puisque les CL_{50} relevées sont nettement inférieures au $\mu\text{g/L}$ dans de nombreux cas. En fonction du stade de vie et des études réalisées, les CL_{50} obtenues pour la carpe *Cyprinus carpio* sont comprises entre 0,074 $\mu\text{g/L}$ (larves ; Köprücü et Aydin, 2004) et 78 $\mu\text{g/L}$ (Rao *et al.*, 1983, in Çalta et Ural, 2004). De même pour la truite *Oncorhynchus mykiss*, les CL_{50} obtenues dans différentes études couvrent trois ordres de grandeur, allant de 0,5 $\mu\text{g/L}$ (Mulla *et al.*, 1978, in Çalta et Ural, 2004) à 20 $\mu\text{g/L}$ (Velíšek *et al.*, 2007). Des espèces marines testées dans notre programme, les CL_{50} obtenues sont comprises entre 7,2 et 29,3 $\mu\text{g/L}$, confirmant la grande sensibilité des poissons à cette substance.

Ces intervalles couvrent des ordres de grandeurs compatibles avec une contamination, aussi bien des eaux douces de surface, que des eaux estuariennes et côtières.

Conclusion pour la deltaméthrine

Parmi les études collectées et les organismes étudiés, dans les conditions expérimentales de laboratoire, les organismes les plus sensibles à la deltaméthrine aux concentrations environnementales sont les crustacés et les poissons, pour lesquels elle est hautement toxique, avec des seuils de réponses à partir du $\mu\text{g/L}$, voire moins.

Cette molécule a été retrouvée une fois dans l'environnement marin à La Réunion. Utilisée dans la lutte anti vectorielle du Chikungunya, elle a été retrouvée dans les tissus d'oursins côtiers.

12. CONCLUSION - PERSPECTIVES

L'objectif général du programme ERICOR était de compléter dans une optique opérationnelle, la connaissance du risque pour les écosystèmes coralliens de la présence chronique ou aigue (accidentelle) de pesticides.

Ainsi les résultats attendus portaient sur trois niveaux d'action :

- mettre au point des bioessais spécifiques au contexte tropical pour la recherche de toxicité des pesticides utilisés localement ;
- comparer la sensibilité des espèces tropicales par rapport à celle des espèces usuellement employées afin de disposer d'outils adaptés au niveau local pour l'analyse du risque en cas de crise aigue et de gestion des pratiques agricoles en amont des zones coralliennes ;
- compléter l'évaluation de la toxicité des principales molécules utilisées localement par des tests sur des organismes récifaux.

Le principal aspect innovant du programme concerne effectivement l'adaptation de bioessais existants à des espèces spécifiques aux écosystèmes coralliens.

L'évaluation du risque recommandé par le TGD porte sur six niveaux trophiques (bactérie, phytoplancton, crustacé, mollusque, échinoderme et poisson). Cinq de ces niveaux ont été abordé dans ERICOR. En complément, un niveau trophique spécifiquement tropical a été abordé, les coraux (cnidaires).

Cinq bioessais spécifiques du milieu marin tropical ont été mis au point et testés sur six molécules pesticides.

C'est ainsi trois herbicides (diuron, glyphosate et S-métholachlore), deux insecticides (deltaméthrine et carbofuran) et un fongicide (carbendazime) qui ont été ciblé par le projet. Ce choix a été guidé par l'importance de leur utilisation au niveau local, leur présence dans l'environnement, et leur mode d'action.

Le **phytoplancton** a été traité au travers de deux espèces tropicales (*Navicula* sp. et *Symbiodinium* sp. symbionte des coraux) et comparé à une espèce tempérée planctonique (*Phaeodactylum tricornutum*).

L'ensemble des essais effectués montre une similitude de réaction entre les espèces tropicales et la diatomée tempérée, testées dans des conditions expérimentales propres. Ces trois modèles se sont avérés très sensibles au diuron et S-métholachlore, deux des trois herbicides testées.

Les essais sur les **échinodermes** ont été réalisés sur deux espèces d'oursin *Echinometra mathaei* (très répandu sur les récifs coralliens de La Réunion) et *Paracentrotus lividus* (oursin des eaux tempérées).

Ces espèces s'avèrent très sensibles au carbendazime (fongicide) et une toxicité de La deltaméthrine est aussi notée avec des valeurs de CSEO entre 135 et 597 µg/L relevé respectivement pour l'oursin tropical et tempéré. Cette molécule a déjà été retrouvée dans l'environnement marin de La Réunion (dans des oursins, lors de la crise du Chikungunya). Ce résultat interroge sur la dangerosité de ce produit pour des invertébrés marin.

L'adaptation du protocole du test, appliqué à *Paracentrotus lividus*, à l'espèce tropicale *Echinometra mathaei* a été aisée à mettre en œuvre, et les résultats obtenus indiquent que leur sensibilité est très proche. Des exercices d'inter-calibration permettraient de valider l'emploi de cette espèce tropicale pour des études locales.

Un bioessai **corail** a été mis au point, afin d'obtenir des informations de toxicité aigue sur des colonies maintenue *in vitro*. L'utilisation de microboutures de colonies de *Pocillopora meandrina* a permis de réaliser l'ensemble des séries d'essais.

Seul le carbendazime a un effet toxique sur les colonies coralliennes. Avec une CSEO calculée à 350 µg/L, cette molécule peut présenter un véritable danger pour la survie des coraux à ces concentrations.

Généralement, les paramètres mesurés directement sur les coraux (comme la survie) sont peu sensibles aux différentes molécules testées. La sensibilité est par contre très importante dès que l'on aborde les symbiontes. Dans le programme ERICOR, nous avons abordé ce point au travers de la culture *in vitro* de souche de zooxanthelles (cf. § phytoplancton) qui montrent une grande sensibilité au diuron.

Pour appréhender l'impact potentiel d'un toxique sur les coraux, il est donc complémentaire de réaliser simultanément un essai sur microcolonie et un essai sur la croissance *in vitro* de *Symbiodinium* sp.

Les essais sur les **poissons** ont été adaptés à des embryons vésiculés d'espèces tempérés (*Dicentrarchus labrax*) et tropicales (*Sciaenops ocellatus*).

Ces outils sont très prometteurs en remplacement des bioessais sur les poissons, ces derniers étant soumis à la réglementation européenne sur l'expérimentation animale. Ce modèle a montré une grande sensibilité aux insecticides testés, le carbofuran et la deltaméthrine.

Pour les **crustacés** et **bivalves** seuls des essais sur modèles tempérés ont été réalisés. En effet, les essais d'adaptation à des modèles tropicaux n'ont pas abouti à des techniques probantes. Plusieurs pistes de développement en zone tropicale sont lancées : (i) sur l'huître perlière *Pinctada margaritifera*, dont le cycle de reproduction doit être étudié au niveau local, (ii) sur des bénitiers, organismes classiquement rencontrés sur les récifs coralliens, dont l'élevage est maîtrisé. Le développement de mésocosmes et l'élevage de copépodes tropicaux, semblent être une alternative à étudier pour les prochaines années pour le développement des essais sur les crustacés. Ce dernier est particulièrement intéressant pour l'étude des insecticides.

Tous ces groupes ont donné des résultats toxicologiques différents en fonction des substances actives testés. Les molécules ciblées par le programme ont donné une réponse sur au moins une des cibles. L'approche toxicologique basée sur l'utilisation ces bioessais existants et mis au point s'avèrent assez large.

Cependant certains niveaux trophiques ne sont pas pris en compte dans le TGD marin. Il serait très important de s'intéresser aux macroalgues qui jouent un rôle non négligeable dans les écosystèmes littoraux, estuariens et tropicaux.

Des essais de germination des spores, ont montré leur intérêt (F. Quiniou *et al.*, 2003) et l'amélioration des protocoles pourrait faire l'objet d'une proposition de normalisation pour des espèces du littoral européen. Un autre test a été récemment publié concernant la libération des spores chez l'ulve (Han, 2008) et a été proposé à la normalisation « Essai de toxicité basé sur l'inhibition de reproduction de la macro algue verte *Ulva pertusa* » (ISO/CD 13308,

2010) le vote est en cours au niveau du CEN, une autre norme vient de paraître sur la croissance de la macro algue *Ceramium tenuicorne* en eau marine et saumâtre, (ISO/CD 10710, 2009) et sera traduite en norme Afnor en 2011.

De même, les algues calcaires ont une importance non négligeable dans les récifs coralliens, ils participent à la construction des récifs et au cycle des sables de plage. Un bioessai spécifique serait un outil complémentaire à ceux existant.

Les NQE actuelles sont déterminées sur la base de données acquises dans des environnements aquatiques dulçaquicoles. Or les travaux sur des organismes issus du milieu marin montrent l'existence de sensibilités différentes de celles observées en eau douce.

Ainsi, l'effort dans les années à venir devrait soutenir cette mise en place des tests spécifiques au milieu marin. L'opérationnalité des tests développés dans le cadre d'ERICOR, doit être performé, normalisé. Ces outils « marinisés », « tropicalisés », permettront à moyen terme de disposer d'éléments pertinents pour la détermination de NQE « adaptée » au contexte tropical afin de pouvoir statuer sur le bon état des masses d'eau côtières et récifales.

La majorité de ces bioessais peut être utilisée pour analyser la toxicité d'une eau de mer ou d'un effluent *in vitro*. De plus, une partie des tests développés pourrait être conduite *in situ* sur le développement embryo-larvaire de bivalve, (Geffard *et al.*, 2001 ; Quiniou *et al.*, 2007) pour lequel l'Ifremer a déposé un brevet. Ainsi ces outils participeront à la caractérisation de la « qualité biologique » des différentes masses d'eaux côtières, la toxicité potentielle d'une eau de rivière ou d'un rejet arrivant en mer, ainsi que des eaux côtières suite à un important lessivage des sols.

Les îles tropicales hautes comme La Réunion, sont caractérisées par un relief très escarpé, des pluies tropicales lessivant les sols et drainant des quantités souvent importantes de MES dans les eaux marines côtières. Ces phénomènes aigus, dont l'impact sur l'état de santé des récifs reste sous documenté, demeurent une priorité car le lessivage des sols pourrait entraîner la présence même ponctuelle de pesticides dans l'environnement marin.

En parallèle, l'analyse du risque passe par l'amélioration des techniques de détection des molécules dans l'environnement. Le développement d'outils de mesure comme l'échantillonnage passif permet d'améliorer la qualité de la surveillance chimique des masses d'eau côtières. Les premiers essais ont mis en évidence une contamination des eaux côtières qui pour certains composés comme l'endosulfan, endrine, et le lindane sont au delà des NQE-MA. La technique des POCIS a aussi permis de détecter de substances pharmaceutiques comme la caféine, le paracétamol, la théophylline, le terbuthylazine, dont les dangers pour l'environnement marin tropical restent inconnus.

L'un des résultats majeurs a été le transfert des techniques normalisées aux acteurs réunionnais et le développement d'un essai simple de toxicité aigu sur le corail, organisme emblématique des récifs coralliens.

Le programme ERICOR a permis le développement d'échanges, la mise en place de collaborations entre différents laboratoires complémentaires et spécialisés dans la recherche et la surveillance sur les contaminants dans l'environnement marin.

Dans la perspective de l'évaluation à venir des toxiques (directive REACH), les procédures de mesure de l'impact environnemental des pesticides et biocides, en routine, et à haut débit doivent être mises en place à moyen terme.

En milieu marin, si les travaux de recherche récents ont permis l'émergence de tests, leur mise en application, à grande échelle, dans le cadre de procédures standardisées reste à développer.

Au niveau national, la mise en place d'une organisation qui intègre et valide l'ensemble des tests nécessaires à l'évaluation de l'impact des pesticides sur le milieu marin constituerait une action structurante majeure.

Cet outil devrait être conçu pour :

- l'évaluation « en routine » du risque présenté par les nombreuses molécules commercialisées ou susceptibles de l'être ;
- l'évaluation de l'impact éventuel de ces polluants sur le milieu.

REFERENCES

- Abdelghani, A.A., Tchounwou, P.B., Anderson, A.C., Sujono, H., Heyer, L.R., Monkiedje, A., 1998. Toxicity evaluation of single and chemical mixtures of roundup, Garlon-3A, 2, 4-D, and syndets surfactant to channel catfish (*Ictalurus punctatus*), bluegill sunfish (*Lepomis microchirus*), and crawfish (*Procambarus* spp.). *Environmental toxicology* 12, 237-243.
- AFNOR, NF EN ISO 11348 Février 2009. Qualité de l'eau - Détermination de l'effet inhibiteur d'échantillons d'eau sur la luminescence de *Vibrio fischeri* (Essai de bactéries luminescentes) - T90-320
- AFNOR, NF EN ISO 10253 Juin 2006. Qualité de l'eau - Essai d'inhibition de la croissance des algues marines avec *Skeletonema costatum* et *Phaeodactylum tricornutum* - T90-311
- AFNOR, FD ISO 14669 Août 2003. Qualité de l'eau - Détermination de la toxicité létale aiguë vis-à-vis de copépodes marins (Copepoda, Crustacea) - T90-332
- AFNOR, NF EN ISO 16712 Novembre 2007. Qualité de l'eau - Détermination de la toxicité aiguë des sédiments marins et estuariens vis-à-vis des amphipodes - T90-373
- AFNOR, XP T90-382 Septembre 2009. Qualité de l'eau - Bio indicateur de la toxicité potentielle de milieux aqueux - Détermination de la toxicité potentielle d'échantillons aqueux sur le développement embryon-larvaire de bivalve – T90-382.
- AFNOR, T90-307 Juin 1985. Essais des eaux - Détermination de la toxicité aiguë d'une substance vis-à-vis de *Dicentrarchus labrax* - Méthode sans renouvellement du milieu. T90-307.
- Anguiano, G.A., Amador, A., Moreno-Legorreta, M., Arcos-Ortega, F., Vazquez-Boucard, C., del Noroeste, C.I.B., La Paz, M., 2009. Effects of exposure to oxamyl, carbofuran, dichlorvos, and lindane on acetylcholinesterase activity in the gills of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Environmental toxicology*.
- Ansari, R.A., Kaur, M., Ahmad, F., Rahman, S., Rashid, H., Islam, F., Raisuddin, S., 2008. Genotoxic and oxidative stress-inducing effects of deltamethrin in the erythrocytes of a freshwater biomarker fish species, *Channa punctata* Bloch. *Environmental toxicology* 24, 429-436.
- Anton, F.A., Laborda, E., De Ariz, M., 1994. Acute toxicity of the herbicide glyphosate to fish. *Chemosphere*(Oxford) 28, 745-753.
- Bayed A., Quiniou F., Benrha A., Guillou M., 2005, The *Paracentrotus lividus* populations from the northern Moroccan Atlantic coast : growth, reproduction and health condition. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 85, 999-1007.
- Bellas, J., Beiras, R., Marino-Balsa, J.C., Fernandez, N., 2005. Toxicity of organic compounds to marine invertebrate embryos and larvae: a comparison between the sea urchin embryogenesis bioassay and alternative test species. *Ecotoxicology* 14, 337-353.
- Bengtson Nash, S.M., Quayle, P.A., Schreiber, U., Muller, J.F., 2005. The selection of a model microalgal species as biomaterial for a novel aquatic phytotoxicity assay. *Aquatic Toxicology* 72, 315-326.
- Bonnet, J.L., Bonnemoy, F., Dusser, M., Bohatier, J., 2007. Assessment of the potential toxicity of herbicides and their degradation products to nontarget cells using two microorganisms, the bacteria *Vibrio fischeri* and the ciliate *Tetrahymena pyriformis*. *Environmental toxicology* 22, 78-91.

- Brethead, S., Saglio, P., Saligaut, C., Auperin, B., 2002. Biochemical and behavioral effects of carbofuran in goldfish (*Carassius auratus*). *Environmental Toxicology and chemistry* 21, 175-181.
- Brethead, S., Toutant, J.P., Saglio, P., 2000. Effects of carbofuran, diuron, and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 47, 117-124.
- Çalta, M., Ural, M.S., 2004. Acute toxicity of the synthetic pyrethroid deltamethrin to young mirror carp, *Cyprinus carpio*. *Fresen Environ Bull* 13, 1179-1183.
- Cambert H., Gonzalez J.L., Andral B., Turquet J., 2009. Suivi pilote des contaminants chimiques dans les organismes marins à la Réunion. Etude de faisabilité d'un réseau de surveillance par la Modiole (2003-2006). Rapport ARVAM/Ifremer pour le compte de la DIREN Réunion. 95 pp + annexes.
- Cantin, N.E., van Oppen, M.J.H., Willis, B.L., Mieog, J.C., Negri, A.P., 2009. Juvenile corals can acquire more carbon from high-performance algal symbionts. *Coral Reefs* 28, 405-414.
- Cericato, L., Neto, J.G.M., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M., da Rosa, J.G.S., Koakoski, G., Centenaro, L., Pottker, E., Marqueze, A., Barcellos, L.J.G., 2009. Responsiveness of the interrenal tissue of Jundiá (*Rhamdia quelen*) to an in vivo ACTH test following acute exposure to sublethal concentrations of agrichemicals. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 149, 363-367.
- Chatterjee, S., Dutta, A.B., Ghosh, R., 1997. Impact of carbofuran in the oocyte maturation of Catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 32, 426-430.
- Chatterjee, S., Kumar Dasmahapatra, A., Ghosh, R., 2001. Disruption of pituitary-ovarian axis by carbofuran in catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 129, 265-273.
- Coles S.L. & Brown B.E., 2003. Coral bleaching – Capacity for acclimatization and adaptation. *Advances in Marine Biology* 46 : 183-223.
- Connelly D.P., Readman J.W., Knap A.H., Davies J., 2001. Contamination of the coastal waters of Bermuda by organotins and triazine herbicide Irgarol 1051. *Mar. Poll. Bull.*, 42 : 409-414.
- Connors, D.E., Black, M.C., 2004. Evaluation of lethality and genotoxicity in the freshwater mussel *Utterbackia imbecillis* (*Bivalvia: Unionidae*) exposed singly and in combination to chemicals used in lawn care. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 46, 362-371.
- Cook, M.E., Moore, P.A., 2008. The effects of the herbicide metolachlor on agonistic behavior in the crayfish, *Orconectes rusticus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 55, 94-102.
- Cuppen, J.G.M., Van den Brink, P.J., Camps, E., Uil, K.F., Brock, T.C.M., 2000. Impact of the fungicide carbendazim in freshwater microcosms. I. Water quality, breakdown of particulate organic matter and responses of macroinvertebrates. *Aquatic Toxicology* 48, 233-250.
- Daam, M., Satapornvanit, K., Van den Brink, P., Nogueira, A., 2009a. Direct and Indirect Effects of the Fungicide Carbendazim in Tropical Freshwater Microcosms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* DOI 10.1007/s00244-009-9367-y.

Daam, M., Van den Brink, P., 2007. Effects of Chlorpyrifos, Carbendazim, and Linuron on the Ecology of a Small Indoor Aquatic Microcosm. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 53, 22-35.

Daam, M.A., Satapornvanit, K., Brink, P.J.V.d., Nogueira, A.J.A., 2009b. Sensitivity of macroinvertebrates to carbendazim under semi-field conditions in Thailand: Implications for the use of temperate toxicity data in a tropical risk assessment of fungicides. *Chemosphere* 74, 1187-1194.

Datta, M., Kaviraj, A., 2003. Acute toxicity of the synthetic pyrethroid deltamethrin to freshwater catfish *Clarias gariepinus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 70, 296-299.

Day, K.E., 1991. Effects of dissolved organic carbon on accumulation and acute toxicity of fenvalerate, deltamethrin and cyhalothrin to *Daphnia magna* (Straus). *Environmental Toxicology and chemistry* 10, 91-101.

DCE , 2000. Directive 2000/60/CE du Parlement européen et du Conseil du 23 octobre 2000 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau. JO 22 décembre 2000.

De Nicola E, Gallo M, Iaccarino M, Meriç S, Oral R, Russo T, Sorrentino T, Tünay O, Vuttariello E, Warnau, M, Pagano G (2004) Hormetic vs. toxic effects of vegetable tannin in a multi-test study. *Arch Environ Contam Toxicol* 46:336-344

De Nicola E, Meriç S, Cheggour M, Della Rocca C, Di Gennaro A, Gallo M, Iaccarino M, Moukrim A, Tünay O, Pagano G (2007) Wastewater toxicity of tannin- vs. chromium-based leather tanneries in Marrakesh, Morocco. *Arch Environ Contam Toxicol* 53:321-328.

Deblois, C.P., Qiu, B., Juneau, P., 2008. Effect of Herbicides (Diuron and Oxadiazon) on Photosynthetic Energy Dissipation Processes of Different Species of Cyanobacteria and Two Green Algae. In Allen J.F., Gantt, E., Golbeck, J.H., Osmond, B., (eds.): *Photosynthesis. Energy from the sun: 14th International Congress on Photosynthesis*, 1435-1438.

Dutra, B.K., Fernandes, F.A., Lauffer, A.L., Oliveira, G.T., 2009. Carbofuran -induced alterations in the energy metabolism and reproductive behaviors of *Hyalella castroi* (Crustacea, Amphipoda). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 149, 640-646.

El-Sayed, Y.S., Saad, T.T., El-Bahr, S.M., 2007. Acute intoxication of deltamethrin in monosex Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* with special reference to the clinical, biochemical and haematological effects. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 24, 212-217.

Fernandez-Alba, A.R., Hernando, M.D., Piedra, L., Chisti, Y., 2002. Toxicity evaluation of single and mixed antifouling biocides measured with acute toxicity bioassays. *Analytica Chimica Acta* 456, 303-312.

Ferreira, A.L.G., Loureiro, S., Soares, A.M.V.M., 2008. Toxicity prediction of binary combinations of cadmium, carbendazim and low dissolved oxygen on *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology* 89, 28-39.

Gagnon, M.M., Rawson, C.A., 2009. Diuron increases spinal deformity in early-life-stage pink snapper *Pagrus auratus*. *Marine Pollution Bulletin* 58, 1083-1085.

Gatidou, G., Thomaidis, N.S., 2007. Evaluation of single and joint toxic effects of two antifouling biocides, their main metabolites and copper using phytoplankton bioassays. *Aquatic Toxicology* 85, 184-191.

Geffard O, His E, Budzinski H, Seaman M, Garrigues P., 2001, Qualité biologique de l'eau de

mer évaluée *in situ* par le test embryo-larvaire de *Crassostrea gigas* et *Mytilus galloprovincialis*. C R Acad Sci Ser 3 Sci Vie/Life Sci 473, :1149–55

Ghosh, M.C., Ghosh, R., Ray, A.K., 2000. Induction of CYPIA by Carbofuran in Primary Culture of Fish Hepatocytes. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology 14, 204-209.

Gillet, C., Roubaud, P., 1983. Influence sur la survie jusqu'a eclosion des embryons de carpe commune (*Cyprinus carpio* L.) apres traitement, pendant la fecondation et le developpement precoce, par le carbendazime, un fongicide antimitotique de synthese. Water Research 17, 1343-1348.

Gluszczak, L., dos Santos Miron, D., Crestani, M., Braga da Fonseca, M., Araújo Pedron, F., Duarte, M.F., Vieira, V.L.P., 2006. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). Ecotoxicology and Environmental Safety 65, 237-241.

Gluszczak, L., Miron, D.S., Moraes, B.S., Simoes, R.R., Schetinger, M.R.C., Morsch, V.M., Loro, V.L., 2007. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 146, 519-524.

Gonzalez J.L., Turquet J., Cambert H., Budzinski H., Tapie N., Guyomarch J., Andral B., 2009. Projet PEPS La Réunion (pré étude : échantillonnage Passif pour la surveillance de la contamination chimique). Mise en place d'échantillonneurs passifs pour la caractérisation chimique des masses d'eau côtières réunionnaises. Rapport Ifremer/ARVAM/Cedre/Univ. Bordeaux 1, pour le compte de la Diren Réunion, 87 pages.

Grisolia, C.K., 2002. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. Mut. Res.-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 518, 145-150.

Guillou M, Quiniou F., Huart B., Pagano G., 2000, Comparison of Embryonic Development and Metal Contamination in Several Populations of the Sea Urchin *Sphaerechinus granularis* (Lamarck) Exposed to Anthropogenic Pollution. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 39, pp 337-344.

Harrington, L., Fabricius, K., Eaglesham, G., Negri, A., 2005. Synergistic effects of diuron and sedimentation on photosynthesis and survival of crustose coralline algae. Marine Pollution Bulletin 51, 415-427.

Hartgers, E.M., Aalderink, G.H.R., Van den Brink, P.J., Gylstra, R., Wiegman, J.W.F., Brock, T.C.M., 1998. Ecotoxicological threshold levels of a mixture of herbicides (atrazine, diuron and metolachlor) in freshwater microcosms. Aquatic Ecology 32, 135-152.

His, E., Heyvang, I., Geffard, O., de Montaudouin, X., 1999. A comparison between oyster (*Crassostrea gigas*) and sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larval bioassays for toxicological studies. Water Research 33, 1706-1718.

Holdway, D.A., Dixon, D.G., 1988. Acute toxicity of permethrin or glyphosate pulse exposure to larval white sucker (*Catostomus commersoni*) and juvenile flagfish (*Jordanella floridae*) as modified by age and ration level. Environmental Toxicology and chemistry 7, 63-68.

ISO/CD 10710, 2009, Qualité de l'eau – Essai d'inhibition de croissance sur des macroalgues *Ceramium tenuicorne* en eau marine et saumâtre, reprise en norme Afnor en 2011.

ISO/CD 13308 2010, sur le bio essais Qualité de l'eau - Essai de toxicité basé sur l'inhibition de reproduction de la macro algue verte *Ulva pertusa* vote en cours au niveau du CEN.25p.

- Jash, N.B., Bhattacharya, S., 1983. Delayed toxicity of carbofuran in freshwater teleosts, *Channa punctatus* (BLOCH) and *Anabas testudineus* (BLOCH). *Water, Air, & Soil Pollution* 19, 209-213.
- Jin-Clark, Y., Anderson, T.D., Zhu, K.Y., 2008. Effect of Alachlor and Metolachlor on Toxicity of Chlorpyrifos and Major Detoxification Enzymes in the Aquatic Midge, *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 54, 645-652.
- Jiraungkoorskul, W., Upatham, E.S., Kruatrachue, M., Sahaphong, S., Vichasri-Grams, S., Pokethitiyook, P., 2003. Biochemical and histopathological effects of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environmental Toxicology and Water Quality* 18, 260-267.
- Jones R., 2005. The ecotoxicological effects of Photosystem II herbicides on corals. Review. *Mar. Poll. Bull.* 51, 495-506.
- Jones, R.J., 2004. Testing the 'photoinhibition' model of coral bleaching using chemical inhibitors. *Marine Ecology Progress Series* 284, 133-145.
- Jones, R.J., Kerswell, A.P., 2003. Phytotoxicity of Photosystem II(PSII) herbicides to coral. *Marine Ecology Progress Series* 261, 149-159.
- Jones, R.J., Muller, J., Haynes, D., Schreiber, U., 2003. Effects of herbicides diuron and atrazine on corals of the Great Barrier Reef, Australia. *Marine Ecology Progress Series* 251, 153-167.
- Juneau, P., Dewez, D., Matsui, S., Kim, S.G., Popovic, R., 2001. Evaluation of different algal species sensitivity to mercury and metolachlor by PAM-fluorometry. *Chemosphere* 45, 589-598.
- Klößner K., Rosenthal H., Willführ J. (1985) Invertebrate bioassays with North Sea water samples. Structural effects on embryos and larvae of serpulids oysters and sea urchins. *Helgoländer Meeresunters.* 39, 1-19.
- Kobayashi, N., Okamura, H., 2002. Effects of new antifouling compounds on the development of sea urchin. *Marine Pollution Bulletin* 44, 748-751.
- Kontreczky, C., Farkas, A., Nemcsok, J., Salanki, J., 1997. Short-and Long-Term Effects of Deltamethrin on Filtering Activity of Freshwater Mussel (*Anodonta cygnea* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 38, 195-199.
- Köprücü, K., Aydın, R., 2004. The toxic effects of pyrethroid deltamethrin on the common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryos and larvae. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 80, 47-53.
- Köprücü, K., Seker, E., 2008. Acute Toxicity of Deltamethrin for Freshwater Mussel, *Unio elongatulus eucirrus* Bourguignat. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 80, 1-4.
- Köprücü, S., Köprücü, K., Ural, M.S., 2006. Acute toxicity of the synthetic pyrethroid deltamethrin to fingerling European catfish, *Silurus glanis* L. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 76, 59-65.
- Köprücü, S., Yonar, E., Seker, E., 2008. Effects of Deltamethrin on Antioxidant Status and Oxidative Stress Biomarkers in Freshwater Mussel, *Unio elongatulus eucirrus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 81, 253-257.
- Koutsaftis, A., Aoyama, I., 2006. The interactive effects of binary mixtures of three antifouling

biocides and three heavy metals against the marine algae *Chaetoceros gracilis*. *Environmental Toxicology and Water Quality* 21, 432-439.

Koutsaftis, A., Aoyama, I., 2007. Toxicity of four antifouling biocides and their mixtures on the brine shrimp *Artemia salina*. *Science of the Total Environment*, The 387, 166-174.

Lahr, J., 1998. An ecological assessment of the hazard of eight insecticides used in Desert Locust control, to invertebrates in temporary ponds in the Sahel. *Aquatic Ecology* 32, 153-162.

Lammer E., Carr G.J., Wendler K., Rawlings J.M., Belanger S.E. and Th. Braunbeck Th. 2008. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test. Extrait de Back ground Paper on fish embryo toxicity assays, UBA Contract Number 203 85 422, GERMAN FEDERAL ENVIRONMENT AGENCY Thomas Braunbeck & Eva Lammer Eds.

Lange M., Gebauer W, Markl J. and Nagel R. 1995. Comparison of testing acute toxicity on embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio* and RTG-2 cytotoxicity as possible alternatives to the acute fish test Extrait de Back ground Paper on fish embryo toxicity assays, UBA Contract Number 203 85 422, GERMAN FEDERAL ENVIRONMENT AGENCY Thomas Braunbeck & Eva Lammer Eds.

Langiano, V.C., Martinez, C.B.R., 2008. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 147, 222-231.

Lassus P., Bogé G., Gentien P., Loarer R., Pagano. G., F. Quiniou., 1990, Toxicité des rejets urbains. Colloque Rejets Urbains. Ifremer Actes de colloques 11. 171-186.

Leboulanger, C., Bouvy, M., Pagano, M., Dufour, R.A., Got, P., Cecchi, P., 2009. Responses of planktonic microorganisms from tropical reservoirs to Paraquat and Deltamethrin exposure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 56, 39-51.

Liu, H., Xiong, M., 2009. Comparative toxicity of racemic metolachlor and S-metolachlor to *Chlorella pyrenoidosa*. *Aquatic Toxicology* 93, 100-106.

Liu, H., Ye, W., Zhan, X., Liu, W., 2006. A comparative study of rac-and S-metolachlor toxicity to *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63, 451-455.

Liu, H., Yi, M., Shi, X., Liang, P., Gao, X., 2007. Substrate specificity of brain acetylcholinesterase and its sensitivity to carbamate insecticides in *Carassius auratus*. *Fish Physiology and Biochemistry* 33, 29-34.

Lushchak, O.V., Kubrak, O.I., Storey, J.M., Storey, K.B., Lushchak, V.I., 2009. Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. *Chemosphere* 76, 932-937.

Ma, J., 2002. Differential sensitivity to 30 herbicides among populations of two green algae *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 68, 275-281.

Ma, J., Liang, W., 2001. Acute toxicity of 12 herbicides to the green algae *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 67, 347-351.

Ma, J., Lin, F., Wang, S., Xu, L., 2003. Toxicity of 21 herbicides to the green alga *Scenedesmus quadricauda*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 71, 594-601.

- Ma, J., Lu, N., Qin, W., Xu, R., Wang, Y., Chen, X., 2006. Differential responses of eight cyanobacterial and green algal species, to carbamate insecticides. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63, 268-274.
- Ma, J., Wang, S., Wang, P., Ma, L., Chen, X., Xu, R., 2006. Toxicity assessment of 40 herbicides to the green alga *Raphidocelis subcapitata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63, 456-462.
- Ma, J., Xu, L., Wang, S., Zheng, R., Jin, S., Huang, S., Huang, Y., 2002. Toxicity of 40 herbicides to the green alga *Chlorella vulgaris*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 51, 128-132.
- Magnusson, M., Heimann, K., Negri, A.P., 2008. Comparative effects of herbicides on photosynthesis and growth of tropical estuarine microalgae. *Marine Pollution Bulletin* 56, 1545-1552.
- Manzo, S., Buono, S., Cremisini, C., 2006. Toxic Effects of Irgarol and Diuron on Sea Urchin *Paracentrotus lividus* Early Development, Fertilization, and Offspring Quality. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 51, 61-68.
- Marc, J., Le Breton, M., Cormier, P., Morales, J., Bellé, R., Mulner-Lorillon, O., 2005. A glyphosate-based pesticide impinges on transcription. *Toxicology and applied pharmacology* 203, 1-8.
- Marc, J., Mulner-Lorillon, O., Bellé, R., 2004. Glyphosate-based pesticides affect cell cycle regulation. *Biology of the Cell* 96, 245-249.
- Marc, J., Mulner-Lorillon, O., Durand, G., Bellé, R., 2003. Embryonic cell cycle for risk assessment of pesticides at the molecular level. *Environmental Chemistry Letters* 1, 8-12.
- Meriç S, De Nicola E, Iaccarino M, Gallo M, Di Gennaro A, Morrone G, Warnau M, Pagano G (2005) Effluent toxicity in a leather tanning wastewater treatment plant in sea urchins and in marine microalgae. *Chemosphere* 61:208-217
- Morgan, J.D., Vigers, G.A., Farrell, A.P., Janz, D.M., Manville, J.F., 1991. Acute avoidance reactions and behavioral responses of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to Garlon 4®, Garlon 3A® and Vision® herbicides. *Environmental Toxicology and chemistry* 10, 73-79.
- Nebeker, A.V., Schuytema, G.S., 1998. Chronic effects of the herbicide diuron on freshwater cladocerans, amphipods, midges, minnows, worms, and snails. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 35, 441-446.
- Negri A., Vollhardt C., Humphrey A., Heyward A., Jones R., Eaglesham G., Fabricius K. 2005. Effects of herbicide diuron on the early life stages of coral. *Mar. Poll. Bull.*, **51** : 370-383.
- Nielsen, L.W., Dahllöf, I., 2007. Direct and indirect effects of the herbicides Glyphosate, Bentazone and MCPA on eelgrass (*Zostera marina*). *Aquatic Toxicology* 82, 47-54.
- Novis, P.M., Halle, C., Wilson, B., Tremblay, L.A., 2009. Identification and Characterization of Freshwater Algae from a Pollution Gradient Using rbcL Sequencing and Toxicity Testing. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 57, 504-514.
- Okamura, H., Watanabe, T., Aoyama, I., Hasobe, M., 2002. Toxicity evaluation of new antifouling compounds using suspension-cultured fish cells. *Chemosphere* 46, 945-951.
- Osten, J.R.-v., Ortiz-Arana, A., Guilhermino, L., Soares, A.M.V.M., 2005. In vivo evaluation of three biomarkers in the mosquitofish (*Gambusia yucatana*) exposed to pesticides.

Chemosphere 58, 627-636.

Owen, R., Knap, A., Ostrander, N., Carbery, K., 2003. Comparative acute toxicity of herbicides to photosynthesis of coral zooxanthellae. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 70, 541-548.

Pagano G, Cipollaro M, Esposito A, Ragucci E, Giordano GG, Trieff NM (1986) The sea urchin: Bioassay for the assessment of damage from environmental contaminants. In: Cairns J Jr (ed) *Community toxicity testing*. Association for Standard Testing and Materials, Philadelphia, PA, USA, pp 67-92

Pagano G, His E, Beiras R, De Biase A, Korkina LG, Iaccarino M, Oral R, Quiniou F, Warnau M, Trieff NM (1996) Cytogenetic, developmental and biochemical effects of aluminum, iron and their mixture in sea urchins and mussels. *Arch Environ Contam Toxicol* 31 : 466-474

Pagano G., Corsala G., Esposito A., Giordano G.G., 1987, Essais de toxicité sur les embryons et le sperme des échinoides – Colloque international sur *Paracentrotus lividus* et les oursins comestibles – Boudouresque Edit., GIS Posidonie publ., Marseille, 285-297.

Papchenkova, G.A., Golovanova, I.L., Ushakova, N.V., 2009. The parameters of reproduction, sizes, and activities of hydrolases in *Daphnia magna* straus of successive generations affected by Roundup herbicide. *Inland Water Biology* 2, 286-291.

Parsons, J.T., Surgeoner, G.A., 1991a. Acute toxicities of permethrin, fenitrothion, carbaryl and carbofuran to mosquito larvae during single-or multiple-pulse exposures. *Environmental Toxicology and chemistry* 10, 1229-1233.

Parsons, J.T., Surgeoner, G.A., 1991b. Effect of exposure time on the acute toxicities of permethrin, fenitrothion, carbaryl and carbofuran to mosquito larvae. *Environmental Toxicology and chemistry* 10, 1219-1227.

Pathiratne, A., Chandrasekera, L., De Seram, P.K.C., 2008. Effects of Biological and Technical Factors on Brain and Muscle Cholinesterases in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*: Implications for Biomonitoring Neurotoxic Contaminations. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 54, 309-317.

Pereira, J.L., Antunes, S.C., Castro, B.B., Marques, C.R., Gonçalves, A.M.M., Gonçalves, F., Pereira, R., 2009. Toxicity evaluation of three pesticides on non-target aquatic and soil organisms: commercial formulation versus active ingredient. *Ecotoxicology* 18, 455-463.

Perschbacher, P.W., Ludwig, G.M., 2004. Effects of diuron and other aerially applied cotton herbicides and defoliant on the plankton communities of aquaculture ponds. *Aquaculture* 233, 197-203.

Peters E.C., Gassman N.J., FIRMAN J.C., Richmonds R.H. & Power E.A. 1997. Ecotoxicology of tropical marine ecosystems. *Environ. Toxicol. Chem.*, **16** : 12-40.

Pettersson, M., Ekelund, N.G.A., 2006. Effects of the Herbicides Roundup and Avans on *Euglena gracilis*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 50, 175-181.

Podola, B., Melkonian, M., 2005. Selective real-time herbicide monitoring by an array chip biosensor employing diverse microalgae. *Journal of Applied Phycology* 17, 261-271.

Quiniou F., Cueff G., Caisey X. (col. , Arzul G., Delesmont R., Delesmont E., Quéré E. et Carrié C.), 2003, *Projet Seine-Aval 2, année 2002 - Partie 1 : Etude de la toxicité des eaux et des sédiments de la Seine et comparaison de la sensibilité d'espèces marines et dulçaquicoles*. 100p.

Quiniou F., Damiens G, Gnassia Barelli M, Geffard A, Mouneyrac C, Budzinski H, Romeo

Michele (2007). Marine water quality assessment using transplanted oyster larvae. *Environment International*, 33(1), 27-33.

Quiniou F., His É., Delesmont R., Caisey X., 2005, Bio-indicateur de la toxicité potentielle de milieux aqueux : bio-essai « Développement embryo-larvaire de bivalve ». Éd. Ifremer, Méthodes d'analyse en milieu marin, 24 p.

Quiniou. F., Guillou. M., 1999, Arrest and delay in embryonic development in sea urchin populations of the bay of Brest (Brittany, France), link with environmental factors . *Marine Pollution Bulletin*, 38 (5), 401-406.

Råberg, S., Nyström, M., Erös, M., Plantman, P., 2003. Impact of the herbicides 2, 4-D and diuron on the metabolism of the coral *Porites cylindrica*. *Marine Environmental Research* 56, 503-514.

Ramade F. et Roche H. 2006. Effets des polluants sur les écosystèmes récifaux. *Rev. Ecol. (Terre et Vie)* **61**, 3-33.

Ren, Z., Li, Z., Ma, M., Wang, Z., Fu, R., 2009. Behavioral Responses of *Daphnia Magna* to Stresses of Chemicals with Different Toxic Characteristics. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 82, 310-316.

Saglio, P., Trijasse, S., 1998. Behavioral responses to atrazine and diuron in goldfish. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 35, 484-491.

Saito, H., Iwami, S., Shigeoka, T., 1991. In vitro cytotoxicity of 45 pesticides to goldfish GF-Scale(GFS) cells. *Chemosphere(Oxford)* 23, 525-537.

Salvat B. 2005. Les récifs coralliens : réalité et espoirs. *Courier de la Nature*, **219** : 18-27.

Satapornvanit, K., Baird, D.J., Little, D.C., 2009. Laboratory toxicity test and post-exposure feeding inhibition using the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Chemosphere* 74, 1209-1215.

Scarlett, A., Donkin, P., Fileman, T.W., Morris, R.J., 1999. Occurrence of the antifouling herbicide, Irgarol 1051, within coastalwater seagrasses from Queensland, Australia. *Mar. Poll. Bull.* **38**, 687-691.

Schrader, K.K., de Regt, M.Q., Tidwell, P.D., Tucker, C.S., Duke, S.O., 1998. Compounds with selective toxicity towards the off-flavor metabolite-producing cyanobacterium *Oscillatoria* cf. *chalybea*. *Aquaculture* 163, 85-99.

Schrader, K.K., de Regt, M.Q., Tidwell, P.D., Tucker, C.S., Duke, S.O., 1998. Compounds with selective toxicity towards the off-flavor metabolite-producing cyanobacterium *Oscillatoria* cf. *chalybea*. *Aquaculture* 163, 85-99.

Scralett A., Donkin P., Fileman T.W., & Morris R.J. 1999. Occurrence of antifouling herbicide, Irgarol 1051, within coastal-water sea-grasses from queensland, Australia. *Mar. Poll. Bull.* **38** : 687-691.

Singh, R.K., Sharma, B., Carbofuran -induced biochemical changes in *Clarias batrachus*. *Pest Management Science* 53, 285-290.

Slijkerman, D.M.E., Baird, D.J., Conrad, A., Jak, R.G., Van Straalen, N.M., 2004. Assessing structural and functional plankton responses to carbendazim toxicity. *Environmental Toxicology and chemistry* 23, 455-462.

Stauber, J.L., Binet, M.T., Bao, V.W.W., Boge, J., Zhang, A.Q., Leung, K.M.Y., Adams, M.S., 2008. Comparison of the Qwiklite TM algal bioluminescence test with marine algal growth

rate inhibition bioassays. *Environmental Toxicology and Water Quality* 23, 617-625.

TGD, 1998. Technical Guidance Document in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market ».

TGD, 2003. Revised Technical Guidance Document in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market : chapter 3B : environmental risk assessment – Marine

Thomas, C.R., Hose, G.C., Warne, M.S.J., Lim, R.P., 2008. Effects of River Water and Salinity on the Toxicity of Deltamethrin to Freshwater Shrimp, Cladoceran, and Fish. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 55, 610-618.

Trieff. N.M., Romana L.A., Esposito A., Oral R., Quiniou F., Iaccarino M., Alcock N., Ramanujam V.M.S., Pagano G. (1995), Effluent from Bauxite factory induces developmental and reproductive damage in sea urchins. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 28.173-177.

Tsui, M.T.K., Chu, L.M., 2003. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere* 52, 1189-1197.

Tsui, M.T.K., Wang, W.X., Chu, L.M., 2005. Influence of glyphosate and its formulation (Roundup®) on the toxicity and bioavailability of metals to *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Pollution* 138, 59-68.

Turquet J., Cambert H., Gonzalez J.L., Andral B. 2005. Suivi pilote des contaminants chimiques dans les organismes marins à la Réunion. Etude de faisabilité d'un réseau de surveillance par la Modiole (2003-2006) – état d'avancement. Rapport technique pour le compte de la DIREN Réunion. 22 pp + annexes.

Turquet J., Cambert H., Quod J.P. 2006a. Caractérisation des sédiments marins de La Réunion – Note d'expérience pour le compte de la DIREN Réunion. (13 pp + annexes).

Turquet J., Cambert H., Turpin E., Quod J.P. 2006b. Suivi environnemental de l'impact potentiel de la lutte contre le chikungunya. Evaluation de la qualité de l'eau de mer et de la contamination d'animaux marins – Note d'expérience pour le compte de la DIREN Réunion. (8 pp + annexes).

Ural, M., Sa lam, N., 2005. A study on the acute toxicity of pyrethroid deltamethrin on the fry rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 83, 124-131.

Vallotton, N., Moser, D., Eggen, R.I.L., Junghans, M., Chèvre, N., 2008. S-metolachlor pulse exposure on the alga *Scenedesmus vacuolatus*: Effects during exposure and the subsequent recovery. *Chemosphere* 73, 395-400.

Van den Brink, P.J., Hattink, J., Bransen, F., Van Donk, E., Brock, T.C.M., 2000. Impact of the fungicide carbendazim in freshwater microcosms. II. Zooplankton, primary producers and final conclusions. *Aquatic Toxicology* 48, 251-264.

Van Wijngaarden, R.P.A., Crum, S.J.H., Decraene, K., Hattink, J., van Kammen, A., 1998. Toxicity of derosal (active ingredient carbendazim) to aquatic invertebrates. *Chemosphere* 37, 673-683.

- Velíšek, J., Juríková, J., Dobšíková, R., Svobodova, Z., Piašková, V., Machová, J., Novotný, L., 2007. Effects of deltamethrin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Pharmacology* 23, 297-301.
- Vendrell, E., Gómez de Barreda Ferraz, D., Sabater, C., Carrasco, J.M., 2009. Effect of Glyphosate on Growth of Four Freshwater Species of Phytoplankton: A Microplate Bioassay. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 82, 538-542.
- Verma, S.R., Rani, S., Bansal, S.K., Dalela, R.C., 1980. Effects of the pesticides thiothox, dichlorvos and carbofuran on the test fish *Mystus vittatus*. *Water, Air, & Soil Pollution* 13, 229-234.
- Viran, R., Ünlü Erkoç, F., Polat, H., Koçak, O., 2003. Investigation of acute toxicity of deltamethrin on guppies (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 55, 82-85.
- Waring, C.P., Moore, A., 1997. Sublethal effects of a carbamate pesticide on pheromonal mediated endocrine function in mature male Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr. *Fish Physiology and Biochemistry* 17, 203-211.
- Watanabe, T., Utsunomiya, Y., Yuyama, I., 2007. Long-term laboratory culture of symbiotic coral juveniles and their use in eco-toxicological study. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 352, 177-186.
- Watanabe, T., Yuyama, I., Yasumura, S., 2006. Toxicological effects of biocides on symbiotic and aposymbiotic juveniles of the hermatypic coral *Acropora tenuis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 339, 177-188.
- Wong, P.K., 2000. Effects of 2, 4-D, glyphosate and paraquat on growth, photosynthesis and chlorophyll-a synthesis of *Scenedesmus quadricauda* Berb 614. *Chemosphere* 41, 177-182.
- Yildirim, M.Z., Benli, A.Ç.K., Selvi, M., Özkul, A., Erkoç, F., Koçak, O., 2006. Acute toxicity, behavioral changes, and histopathological effects of deltamethrin on tissues (gills, liver, brain, spleen, kidney, muscle, skin) of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fingerlings. *Environmental Toxicology and Water Quality* 21, 614-620.
- Zaroogian, G.E., G. Pesch & Morrison. 1969. Formulation of an artificial sea water medium suitable for oyster larvae development. *Amer. Zool.* 9,1144.

ANNEXE 1 : TABLEAUX DE SYNTHÈSE PAR PESTICIDES

Système expérimental	Substance	Milieu	Organisme	Nom	Stade	Paramètre	Durée d'exposition	CSEO	LOEC	CLx ou CEx	Référence biblio
Laboratoire –in vitro	carbendazime	Eau douce	Carpe commune	<i>Cyprinus carpio</i>	Œufs	% fécondation (survie des œufs à 96 h)	30' à pH 9 30' à pH 7	1.25 mg/L		CL ₁₀₀ : 5 mg/L CL ₇₅ : 0.5 mg/L	Gillet et Roubaud, 1983
	carbendazime				Embryons (âge en h)	Mortalité	24 h 48 h 96 h	1 mg/L (embryons > 22h) 1 mg/L (embryons > 24h) 1 mg/L (embryons > 24h)		CL ₁₀₀ : 1 mg/L (embryons < 17h) CL ₁₀₀ : 1 mg/L (embryons < 24h) CL ₁₀₀ : 1 mg/L (embryons < 24h)	
	carbendazime		Truite arc-en-ciel	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Œufs	% fécondation (survie des œufs à 25 j)	20' à pH 9			CL ₁₀₀ : 0.5 mg/L CL ₂₉ : 0.05 mg/L	
Laboratoire – in vitro	carbendazime	Eau douce tropicale	Crevette géante	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	Post-larves de 40 j (9-10 mm)	Mortalité Taux d'ingestion	24 h Mesuré sur 4 h après 24 h expo			CL ₅₀ : > 100 mg/L CE ₅₀ : > 100 mg/L	Satapornvanit et al., 2009
Laboratoire – in vitro	carbendazime	Eau douce	Daphnie	<i>Daphnia magna</i>		Mortalité (immobilité) Taux d'ingestion	48 h Mesuré sur 4 h après 24 h expo		70 µg/L	CL ₅₀ : 157 µg/L CE ₅₀ : 98 µg/L	Ferreira et al., 2008
Microcosmes indoor	Derosal	Eau douce	Daphnie Periphyton Phytoplancton Zooplancton	<i>Daphnia magna</i> Communauté Communauté Communauté		Mortalité (immobilité)	96 h 4 semaines 4 semaines 4 semaines 4 semaines	100 µg/L 33 µg/L communauté : > 1000 µg/L communauté : 33 µg/L communauté : 33 µg/L		CE ₅₀ : 113 µg/L CE ₅₀ : 37 µg/L	Van den Brink et al., 2000
Microcosmes indoor	Derosal	Eau douce	Macro-invertébrés	Communauté		Mortalité	4 semaines	communauté : 3.3 µg/L		CL ₁₀₀ : de 33 à 330 µg/L selon les espèces	Cuppen et al., 2000
Laboratoire – in vitro	Derosal	Eau douce	Invertébrés	<i>Dugesia lugubris</i> <i>Dero digitata</i> <i>Stylaria lacustris</i> <i>Bithynia tentaculata</i>		Intégrité, réponse à un stimulus tactile Nb cocons Nb jarves Intégrité, réponse à un stimulus tactile réponse à un stimulus tactile	96 h 21 jours 21 jours 21 jours 96 h 96 h 7 jours	 11 µg/L 3.4 µg/L	32 µg/L 11 µg/L	LC ₅₀ : 134 µg/L CE ₅₀ : 25 µg/L LC ₅₀ : 14 µg/L CE ₅₀ : 12 µg/L LC ₅₀ : 980 µg/L LC ₅₀ : 821 µg/L EC ₅₀ : 219 µg/L LC ₅₀ : 232 µg/L EC ₅₀ : 142 µg/L	Van Wijngaarden et al., 1998

Système expérimental	Substance	Milieu	Organisme	Nom	Stade	Paramètre	Durée d'exposition	CSEO	LOEC	CLx ou CEx	Référence biblio
				<i>Planorbis planorbis</i>		réponse à un stimulus tactile + force Nb d'œufs	96 h 28 jours 28 jours	313 µg/L 103 µg/L	313 µg/L	LC ₅₀ : 8130 µg/L EC ₅₀ : 1641 µg/L	
				<i>Gammarus pulex juv</i>		réponse à un stimulus tactile Nb d'œufs	96 h 28 jours	2700 µg/L 301 µg/L	1008 µg/L		
				<i>Gammarus pulex adult</i>		réponse à un stimulus tactile	96 h			LC ₅₀ : 55 µg/L	
				<i>Daphnia magna</i> < 1.5 mm		Couleur et flottaison	96 h 21 jours			LC ₅₀ : 177 µg/L EC ₅₀ : 55 µg/L LC ₅₀ : 16 µg/L EC ₅₀ : 16 µg/L	
				<i>Daphnia magna</i> > 3 mm		Immobilité	96 h 7 jours			LC ₅₀ : 91 µg/L EC ₅₀ : 87 µg/L LC ₅₀ : 61 µg/L EC ₅₀ : 61 µg/L	
				<i>Simocephalus vetulus</i>		Immobilité	96 h		93 µg/L	LC ₅₀ : 399 µg/L EC ₅₀ : 186 µg/L	
				<i>Asellus aquaticus</i>		Nb larves	25 jours	26 µg/L		LC ₅₀ : > 8000 µg/L EC ₅₀ : 4948 µg/L	
						Immobilité	96 h				
						Coordination et mobilité	96 h	991 µg/L			
Microcosmes indoor	Derosal	Eau douce	Escargot aquatique	<i>Bursatella leachii</i>		Broutage et ouverture de l'opercule avec des forceps	3 semaines	33 µg/L			Daam et Van den Brink, 2007
			Zooplancton	Communauté		Diversité et Abondance		33 µg/L			
Microcosmes outdoor	Bavistin FL	Eau douce tropicale	Zooplancton	Communauté		Diversité et Abondance	8 semaines	100 µg/L			Daam <i>et al.</i> , 2009a
Microcosmes outdoor	Bavistin FL	Eau douce tropicale	Macro-invertébrés	<i>Corixidae</i> <i>Baetidae</i> <i>Hydrophilidae</i> <i>larvae</i> <i>Hydrachnidae</i> <i>Oligochaeta</i>		Diversité et Abondance	8 semaines	3.3 µg/L 33 µg/L 33 µg/L > 1000 µg/L 100 µg/L			Daam <i>et al.</i> , 2009b

Système expérimental	Substance	Milieu	Organisme	Nom	Stade	Paramètre	Durée d'exposition	CSEO	LOEC	CLx ou CEx	Référence biblio
				<i>Ampullariidae</i> <i>Ancylidae</i> Communauté		Diversité et Abondance		100 µg/L 33 µg/L 3.3 µg/L			
Mésocosmes outdoor	carbendazime	Eau douce	Daphnie Cladocères Rotifères Copépodes	<i>Daphnia magna</i> Communauté Communauté Communauté		Taux d'ingestion Abondance Abondance Abondance	Mesuré sur 4 h après 24 h expo 28 jours 28 jours 28 jours		300 µg/L 30 µg/L > 300 µg/L 300 µg/L		Slijkerman <i>et al.</i> , 2004

Système expérimental	Substance	Milieu	Organisme	Nom	Stade	Paramètre	Durée d'exposition	CSEO	LOEC	CLx ou CEx	Référence biblio
Laboratoire –in vitro	diuron	Eau douce	Phytoplancton	<i>Raphidocelis subcapitata</i> (ex <i>Selenastrum capricornutum</i>)		% inhibition croissance	96 h			CE ₅₀ : 0.7 µg/L	Ma <i>et al.</i> , 2006
Laboratoire –in vitro	diuron	Eau douce	Phytoplancton	<i>Scenedesmus quadricauda</i>		% inhibition croissance	96 h			CE ₅₀ : 2.7 µg/L	Ma <i>et al.</i> , 2003
Laboratoire –in vitro	diuron	Eau douce	Phytoplancton	<i>Scenedesmus obliquus</i> <i>Chlorella pyrenoidosa</i>		% inhibition croissance	96 h			CE ₅₀ : 4.1 µg/L CE ₅₀ : 1.3 µg/L	Ma <i>et al.</i> , 2002
Laboratoire – in vitro	diuron	Eau douce	Phytoplancton	<i>Oscillatoria</i> cf. <i>chalybea</i> <i>Selenastrum capricornutum</i>		% inhibition croissance	96 h		1 µM 1 µM	CE ₅₀ : 28 µg/L CE ₅₀ : 36.4 µg/L	Schrader <i>et al.</i> , 1998
Laboratoire – in vitro	diuron	Eau douce	Phytoplancton	<i>Synechococcus</i> sp. <i>Synechocystis</i> sp. <i>Microcystis aeruginosa</i>		Efficacité de photosynthèse	72 h			CE ₅₀ : 5.1 nM CE ₅₀ : 9.37 nM CE ₅₀ : 30 nM	Deblois <i>et al.</i> , 2008
Laboratoire – in vitro	diuron	Eau douce	Phytoplancton	<i>Chlorella vulgaris</i> <i>Eudorina elegans</i> <i>Tetraselmis cordiformis</i> <i>Synechocystis</i> sp. <i>Scherffelia dubia</i> <i>Cryptomonas</i> sp. <i>Staurodesmus convergens</i> <i>Chlamydomonas</i> sp. <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>		Fluorescence	20 min	0.1 µg/L 0.1 µg/L 0.1 µg/L 0.1 µg/L 0.1 µg/L 0.1 µg/L 0.1 µg/L 0.1 µg/L	0.5 µg/L 0.5 µg/L 0.5 µg/L 0.5 µg/L 0.5 µg/L 0.5 µg/L 0.5 µg/L 0.5 µg/L	CE ₅₀ : 27 µg/L CE ₅₀ : 13 µg/L CE ₅₀ : 3 µg/L CE ₅₀ : 7.6 µg/L CE ₅₀ : 3.9 µg/L CE ₅₀ : 6.4 µg/L CE ₅₀ : 4.1 µg/L CE ₅₀ : 10.8 µg/L CE ₅₀ : 13.8 µg/L	Podola et Melkonian, 2005
Laboratoire – in vitro	diuron	Eau douce	Phytoplancton	<i>Selenastrum capricornutum</i>		% inhibition croissance	72 h			CE ₅₀ : 15 µg/L	Hartgers <i>et al.</i> , 1998
Laboratoire – in vitro	diuron	Eau douce	Phytoplancton Daphnie	<i>Selenastrum capricornutum</i> <i>Daphnia magna</i>		% inhibition croissance % inhibition mobilité	72 h 48 h		15 µg/L 3.5 mg/L	CE ₅₀ : 45 µg/L CE ₅₀ : 8.6 mg/L	Fernandez-Alba <i>et al.</i> , 2002
Mésocosmes outdoor	diuron	Eau douce	Phytoplancton Zooplancton	Communauté <i>Anabaena laevis</i> Rotifères Copépodes	Adultes Nauplii	Chlorophyll a Production primaire Densité Densité Densité Densité	28 jours		14 j : 14 g/ha 14 j : 14 g/ha		Perschbacher et Ludwig, 2004
Laboratoire – in vitro	diuron	Eau douce	Phytoplancton	<i>Ankistrodesmus falcatus</i> <i>Chlorella vulgaris</i> <i>Monoraphidium arcuatum</i> <i>Scenedesmus quadricauda</i> <i>Scenedesmus subspicatus</i> <i>Pseudokirchneriella subspicata</i>		% inhibition photosynthèse	> 40 min 9 min > 40 min > 40 min > 70 min > 30 min			CE ₁₀ : 0.11 µg/L CE ₁₀ : 0.1 µg/L CE ₁₀ : 0.15 µg/L CE ₁₀ : 0.19 µg/L CE ₁₀ : 0.19 µg/L CE ₁₀ : 0.19 µg/L	Bengtson Nash <i>et al.</i> , 2005

Système expérimental	Substance	Milieu	Organisme	Nom	Stade	Paramètre	Durée d'exposition	CSEO	LOEC	CLx ou CEx	Référence biblio
		Eau marine		(<i>ex Selenastrum capricornutum</i>) <i>Dunaliella tertiolecta</i> <i>Phaeodactylum tricornutum</i> <i>Nitzschia closterium</i>			> 45 min 7 min 14 min			CE ₁₀ : 0.11 µg/L CE ₁₀ : 0.11 µg/L CE ₁₀ : 0.1 µg/L	
Laboratoire – in vitro	diuron	Eau marine	Phytoplancton	<i>Dunaliella tertiolecta</i> <i>Navicula forcipata</i>		% inhibition croissance	96 h			CE ₅₀ : 5.9 µg/L CE ₅₀ : 27 µg/L	Gatidou et Thomaidis, 2007
Laboratoire – in vitro	diuron	Eau marine	Phytoplancton	<i>Chaetoceros gracilis</i>		% inhibition croissance	72 h			CE ₅₀ : 36 µg/L	Koutsaftis et Aoyama, 2006
Laboratoire – in vitro	diuron	Eau marine	Phytoplancton	<i>Pyrocystis lunula</i> <i>Nitzschia closterium</i> <i>Entomoneis cf punctulata</i>		Luminescence Taux de croissance Taux de croissance	24 h 96 h 72 h 72 h	10 mg/L 2 µg/L 2 µg/L	16 mg/L 6 µg/L 6 µg/L	CE ₅₀ : 19 mg/L CE ₅₀ : 35 mg/L CE ₅₀ : 17 µg/L CE ₅₀ : 24 µg/L	Stauber <i>et al.</i> , 2008
Laboratoire – in vitro	diuron	Eau marine tropicale	Phytoplancton benthique estuarien	<i>Navicula sp.</i> <i>Nephroselmis pyriformis</i>		Taux de croissance Augmentation de biomasse Efficacité de photosynthèse Taux de croissance Augmentation de biomasse Efficacité de photosynthèse	72 h			CE ₅₀ : 33 µg/L CE ₅₀ : 16 µg/L CE ₅₀ : 24 µg/L CE ₅₀ : 33 µg/L CE ₅₀ : 25 µg/L CE ₅₀ : 25 µg/L	Magnusson <i>et al.</i> , 2008
Laboratoire – in vitro	diuron	Eau douce Eau marine	Protozoaire cilié Bactérie	<i>Tetrahymena pyriformis</i> <i>Vibrio fischeri</i>		Taux de croissance Luminescence	9 h 30 min			CE ₅₀ : 8.2 mg/L CE ₅₀ : 58.1 mg/L	Bonnet <i>et al.</i> , 2007
Laboratoire – in vitro	diuron	Eau marine	Crustacé	<i>Artemia salina</i>	Larve	Mortalité	24 h			CL ₅₀ : 12 mg/L	Koutsaftis et Aoyama, 2007
Laboratoire – in vitro	diuron	Eau douce	Daphnie Amphipode Escargot	<i>Daphnia pulex</i> <i>Hyalella azteca</i> <i>Physa gyrina</i>	5 jours < 11 j 15 j	Mortalité Mortalité + nb jeunes Mortalité Mortalité + poids Poids Poids	96 h 7 j 96 h 10 j 10 j	4 mg/L 7.9 mg/L 13.4 mg/L	7.7 mg/L 15.7 mg/L 22.8 mg/L 3.5 mg/L	CL ₅₀ : 17.9 mg/L CL ₅₀ : 7.1 mg/L CL ₅₀ : 19.4 mg/L CL ₅₀ : 18.4 mg/L	Nebeker et Schuytema, 1998

Système expérimental	Substance	Milieu	Organisme	Nom	Stade	Paramètre	Durée d'exposition	CSEO	LOEC	CLx ou CEx	Référence biblio
			Ver	<i>Lumbriculus variegatus</i>	Jeunes adultes		10 j	1.8 mg/L			
			Poisson	<i>Pimephales promelas</i>	Œufs	Mortalité Croissance	7 j	4.2 mg/L	8.3 mg/L 3.4 mg/L	CL ₅₀ : 11.7 mg/L	
					Juvéniles	Mortalité Croissance	10 j	1.9 mg/L		CL ₅₀ : 27.1 mg/L	
Laboratoire – in vitro	diuron	Eau marine	Ascidie	<i>Ciona intestinalis</i>	Embryons	Larves normales Mortalité	24 h	6.4 mg/L	12.8 mg/L	CL ₅₀ : 24.4 mg/L	Bellas <i>et al.</i> , 2005
			Crustacé	<i>Palaemon serratus</i>	Zoé I	Mortalité	24 h 48 h	1 mg/L 1 mg/L		CL ₅₀ : 3 mg/L CL ₅₀ : 3 mg/L	
			Oursin	<i>Paracentrotus lividus</i>	Œufs	Plutei normaux Mortalité	48 h		3.2 mg/L	CL ₅₀ : 5.6 mg/L	
Laboratoire – in vitro	diuron	Eau marine	Oursin	<i>Paracentrotus lividus</i>	Sperme	Fécondation, intégrité des oeufs	30 min	0.5 mg/L	1 mg/L	CE ₅₀ : 5.1 mg/L	Manzo <i>et al.</i> , 2006
					Embryon	Plutei normaux	48 h	0.25 mg/L	0.5 mg/L	CE ₅₀ : 2.4 mg/L	
Laboratoire – in vitro	diuron	Eau marine	Oursins	<i>Hemicentrotus pulcherrimus</i> <i>Anthocidaris crassispina</i>	Pluteus	Anomalies du développement	48 h 32 h	1 mg/L 1 mg/L			Kobayashi et Okamura, 2002
Laboratoire – in vitro	diuron	Eau marine	Corail	<i>Acropora tenuis</i>	Juvéniles Aposymbiotiques	Anomalies morphologie Pigmentation tentacules	10 j 10 j	100 µg/L	100 µg/L 100 µg/L 10 µg/L		Watanabe <i>et al.</i> , 2006
					Juvéniles symbiotiques	Anomalies morphologie Pigmentation tentacules	10 j 10 j				
Laboratoire – in vitro	diuron	Eau marine	Corail	<i>Acropora tenuis</i>	Juvéniles symbiotiques	Retard de croissance verticale	50 j	0.3 µg/L	1 µg/L		Watanabe <i>et al.</i> , 2007
Laboratoire – in vitro	diuron	Eau marine	Corail	<i>Madracis mirabilis</i> <i>Diploria strigosa</i> <i>Favia fragum</i>		Incorporation de carbone	8 h 6 h 6 h 6 h	0.5 µg/L	1 µg/L 2 µg/L 2 µg/L 2 µg/L		Owen <i>et al.</i> , 2003
Laboratoire – in vitro	diuron	Eau marine	Corail	<i>Acropora formosa</i> <i>Seriatopora hystrix</i>		Efficacité de photosynthèse	10 h	< 0.3 µg/L < 0.3 µg/L	0.3 µg/L 0.3 µg/L	CE ₅₀ : 2.7 µg/L CE ₅₀ : 2.3 µg/L	Jones et Kerswell, 2003
Laboratoire – in vitro Microcosmes	diuron	Eau marine	Corail	<i>Acropora formosa</i> <i>Montipora digitata</i> <i>Porites cylindrica</i>		Efficacité de photosynthèse	10 h	0.3 µg/L 0.3 µg/L 0.3 µg/L	1 µg/L 1 µg/L 1 µg/L	CE ₅₀ : 5.1 µg/L CE ₅₀ : 5.9 µg/L CE ₅₀ : 4.3 µg/L	Jones <i>et al.</i> , 2003

Système expérimental	Substance	Milieu	Organisme	Nom	Stade	Paramètre	Durée d'exposition	CSEO	LOEC	CLx ou CEx	Référence biblio
outdoor				<i>Seriatopora hystrix</i> <i>Stylophora pistillata</i>			10 h à 100 µmol/m ² /s 10 h à 20 µmol/m ² /s	0.3 µg/L < 0.3 µg/L	1 µg/L 0.3 µg/L 0.25 µg/L	CE ₅₀ : 3.7 µg/L CE ₅₀ : 2.9 µg/L CE ₅₀ : 5.5 µg/L	
Microcosmes indoor	diuron	Eau marine	Corail	<i>Seriatopora hystrix</i>		Efficacité de photosynthèse Blanchissement	14 jours	< 1 µg/L 1 µg/L	1 µg/L 10 µg/L		Jones, 2004
Laboratoire – in vitro	diuron	Eau marine	Corail	<i>Acropora millepora</i>	Juvenile	Incorporation de carbone	10 h	1 µg/L	10 µg/L		Cantin <i>et al.</i> , 2009
Microcosmes outdoor	diuron	Eau marine	Crustose coralline algae	<i>Porolithon onkodes</i>		% inhibition photosynthèse	9 h		2.9 µg/L		Harrington <i>et al.</i> , 2005
Microcosmes outdoor	diuron	Eau marine	Corail	<i>Acropora millepora</i> <i>Montipora aequituberculata</i> <i>Pocillopora damicornis</i>	Aposymbiotiques Symbiotiques Symbiotiques Symbiotiques	Fécondation Métamorphose Survie recrues Survie adultes Efficacité de photosynthèse Fécondation Métamorphose Survie recrues Rétractation tissus recrues Blanchissement recrues Efficacité de photosynthèse Survie adultes	4 h 24 h 96 h 96 h 96 h 6 h 24 h expo puis 24 h dépuración 96 h 96 h 96 h 96 h 96 h	1000 µg/L 100 µg/L 1000 µg/L 100 µg/L 0.1 µg/L 1000 µg/L 1000 µg/L 10 µg/L 1 µg/L 0.1 µg/L 100 µg/L	300 µg/L 1 µg/L 100 µg/L 10 µg/L 1 µg/L		Negri <i>et al.</i> , 2005
Microcosmes outdoor	diuron	Eau marine	Corail	<i>Porites cylindrica</i>		Production primaire brute Respiration Efficacité photosynthèse	48 h	 10 µg/L	10 µg/L 50 µg/L 10 µg/L		Råberg <i>et al.</i> , 2003
Laboratoire – in vitro	diuron	Eau douce	Poisson	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i> <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Lignée cellulaire Juvéniles	Viabilité cellulaire Mortalité	24 h 28 jours			CE ₅₀ : 52 mg/L CL ₅₀ : 0.23 mg/L	Okamura <i>et al.</i> , 2002
Microcosmes indoor	diuron	Eau douce	Poisson	<i>Carassius auratus</i>	Juvenile	Inhibition de l' AChE	48 h	Muscles squelettiques dorsaux : 500	Cerveau LOEC _{12h} : 5 µg/L		Bretaud <i>et al.</i> , 2000

Système expérimental	Substance	Milieu	Organisme	Nom	Stade	Paramètre	Durée d'exposition	CSEO	LOEC	CLx ou CEx	Référence biblio
								µg/L			
Microcosmes indoor	diuron	Eau douce	Poisson	<i>Carassius auratus</i>	Juvénile	Comportement de groupe Nage soudaine	24 h	0.5 µg/L 5 µg/L	5 µg/L 50 µg/L		Saglio et Trijasse, 1998
Laboratoire – in vitro	diuron	Eau marine	Poisson	<i>Pagrus auratus</i>	Oeufs	Dvt de colonne vertébrale	36 h	5 µg/L	50 µg/L		Gagnon et Rawson, 2009

Système expérimental	Substance	Milieu	Organisme	Nom	Stade	Paramètre	Durée d'exposition	CSEO	LOEC	CLx ou CEx	Référence biblio	
Laboratoire – in vitro	Glyphosate acide	Eau douce	Phytoplancton	<i>Pseudokirchneriella subspicata</i> (ex <i>Selenastrum capricornutum</i>) <i>Skeletonema costatum</i> <i>Vibrio fischeri</i>		Inhibition de croissance	96 h			Glyphosate acide CE ₅₀ : 24.7 mg/L	Tsui et Chu, 2003	
		Eau marine	Bactérie	<i>Acartia tonsa</i>		Luminescence	96 h			CE ₅₀ : 2.27 mg/L		
			Crustacé	<i>Ceriodaphnia dubia</i>		Mortalité	15 min			CE ₅₀ : 17.5 mg/L		
		Eau douce	Protozoaire	<i>Tetrahymena pyriformis</i>			48 h			CL ₅₀ : 35.3 mg/L		
		Eau marine		<i>Euplotes vannus</i>			48 h			CL ₅₀ : 147 mg/L		
							48 h			CE ₅₀ : 648 mg/L		
	Glyphosate sel d'IPA	Eau douce	Phytoplancton	<i>Pseudokirchneriella subspicata</i> (ex <i>Selenastrum capricornutum</i>) <i>Skeletonema costatum</i> <i>Vibrio fischeri</i>			Inhibition de croissance	96 h				Glyphosate sel IPA CE ₅₀ : 41 mg/L
		Eau marine	Bactérie	<i>Acartia tonsa</i>			Luminescence	96 h				CE ₅₀ : 5.9 mg/L CE ₅₀ : 162 mg/L CL ₅₀ : 49.3 mg/L
			Crustacé	<i>Ceriodaphnia dubia</i>			Mortalité	15 min				CL ₅₀ : 415 mg/L
		Eau douce	Protozoaire	<i>Tetrahymena pyriformis</i>				48 h				CE ₅₀ : 386 mg/L
		Eau marine		<i>Euplotes vannus</i>			Inhibition de croissance	40 h				CE ₅₀ : 64.1 mg/L
								48 h				
	Surfactant POEA	Eau douce	Phytoplancton	<i>Pseudokirchneriella subspicata</i> (ex <i>Selenastrum capricornutum</i>) <i>Skeletonema costatum</i> <i>Vibrio fischeri</i>			Inhibition de croissance	96 h				POEA CE ₅₀ : 3.92 mg/L
		Eau marine	Bactérie	<i>Acartia tonsa</i>			Luminescence	96 h				CE ₅₀ : 3.35 mg/L
			Crustacé	<i>Ceriodaphnia dubia</i>			Mortalité	15 min				CE ₅₀ : 10.2 mg/L
Eau douce		Protozoaire	<i>Tetrahymena pyriformis</i>				48 h			CL ₅₀ : 0.57 mg/L		
Eau marine			<i>Euplotes vannus</i>			Inhibition de croissance	48 h			CL ₅₀ : 1.15 mg/L		
							48 h			CE ₅₀ : 5 mg/L		
Roundup	Eau douce	Phytoplancton	<i>Pseudokirchneriella subspicata</i> (ex <i>Selenastrum capricornutum</i>) <i>Skeletonema costatum</i> <i>Vibrio fischeri</i>			Inhibition de croissance	96 h			Roundup CE ₅₀ : 5.81 mg/L		
	Eau marine	Bactérie	<i>Acartia tonsa</i>			Luminescence	96 h			CE ₅₀ : 1.85 mg/L		
		Crustacé	<i>Ceriodaphnia dubia</i>			Mortalité	15 min			CE ₅₀ : 24.9 mg/L		
	Eau douce	Protozoaire	<i>Tetrahymena pyriformis</i>				48 h			CL ₅₀ : 1.77 mg/L		
			<i>Euplotes vannus</i>			Inhibition de	48 h			CL ₅₀ : 5.39 mg/L		
							40 h			CE ₅₀ : 29.5 mg/L		
									CE ₅₀ : 23.5 mg/L			

Système expérimental	Substance	Milieu	Organisme	Nom	Stade	Paramètre	Durée d'exposition	CSEO	LOEC	CLx ou CEx	Référence biblio	
		Eau marine				croissance	48 h					
Laboratoire – in vitro	Glyphosate	Eau douce Eau marine	Protozoaire cilié Bactérie	<i>Tetrahymena pyriformis</i> <i>Vibrio fischeri</i>		Taux de croissance Luminescence	9 h 30 min			CE ₅₀ : > 500 mg/L CE ₅₀ : 21.3 mg/L	Bonnet <i>et al.</i> , 2007	
Laboratoire – in vitro	Glyphosate	Eau douce	Phytoplancton	<i>Raphidocelis subcapitata</i> (ex <i>Selenastrum capricornutum</i>)		% inhibition croissance	96 h			CE ₅₀ : 5.5 mg/L	Ma <i>et al.</i> , 2006	
Laboratoire – in vitro	Glyphosate	Eau douce	Phytoplancton	<i>Scenedesmus quadricauda</i>		% inhibition croissance	96 h			CE ₅₀ : 70.5 mg/L	Ma <i>et al.</i> , 2003	
Laboratoire – in vitro	Glyphosate	Eau douce	Phytoplancton	<i>Scenedesmus obliquus</i> <i>Chlorella pyrenoidosa</i>		% inhibition croissance	96 h			CE ₅₀ : 55.9 mg/L CE ₅₀ : 3.5 mg/L	Ma <i>et al.</i> , 2002	
Laboratoire – in vitro	Glyphosate	Eau douce	Phytoplancton	<i>Oscillatoria</i> cf. <i>chalybea</i> <i>Selenastrum capricornutum</i>		% inhibition croissance	96 h		1000 µM 1000 µM		Schrader <i>et al.</i> , 1998	
Laboratoire – in vitro	Glyphosate	Eau douce	Phytoplancton	<i>Scenedesmus quadricauda</i>		Taux de croissance Taux de photosynthèse Contenu en chlorophylle a	Non précisé 1 h Non précisé		20 µg/L 20 µg/L 0.2 mg/L		Wong, 2000	
Laboratoire – in vitro	Roundup Avans+	Eau douce	Phytoplancton	<i>Euglena gracilis</i>		Mobilité Vitesse Nage ascensionnelle Agglomération Mobilité Vitesse Nage ascensionnelle Agglomération	7 jours 7 jours	Roundup 100 µg/L 50 µg/L 200 µg/L 100 µg/L Avans+ 100 µg/L 50 µg/L 100 µg/L 100 µg/L	Roundup 200 µg/L 100 µg/L > 200 µg/L 200 µg/L Avans+ 200 µg/L 100 µg/L 200 µg/L 200 µg/L		Pettersson et Ekelund, 2006	
Laboratoire – in vitro	Glyphosate	Eau douce	Phytoplancton	<i>Scenedesmus acutus</i> <i>Scenedesmus subspicatus</i> <i>Chlorella vulgaris</i> <i>Chlorella saccharophila</i>		Inhibition de croissance	72 h			CE ₅₀ : 24.5 mg/L CE ₅₀ : 26 mg/L CE ₅₀ : 41.7 mg/L CE ₅₀ : 40.6 mg/L	Vendrell <i>et al.</i> , 2009	
Laboratoire – in vitro	Glyphosate	Eau douce	Phytoplancton	<i>Chlorella</i> sp. <i>Neochloris</i> sp. <i>Choricystis minor</i> P4 <i>Choricystis minor</i> P6		Efficacité de photosynthèse	2 h			CE ₁₀ : < 450 mg/L CE ₁₀ : > 3600 mg/L CE ₁₀ : 4700 mg/L CE ₁₀ : 4000 mg/L	Novis <i>et al.</i> , 2009	
Microcosmes indoor	Glyphosate	Eau marine	Macrophyte	<i>Zostera marina</i>		Croissance longueur Croissance poids	3 jours	100 µM			10 µM	Nielsen et Dahllöf, 2007

Système expérimental	Substance	Milieu	Organisme	Nom	Stade	Paramètre	Durée d'exposition	CSEO	LOEC	CLx ou CEx	Référence biblio
			Phytoplancton	Communauté naturelle		Chl a/b Production primaire	4 h	100 µM 10 µM	> 10 µM		
Laboratoire – in vitro	Glyphosate pur Formulation Spasor	Eau douce	Phytoplancton Crustacé	<i>Pseudokirchneriella subspicata</i> <i>Daphnia magna</i> <i>Pseudokirchneriella subspicata</i> <i>Daphnia magna</i>		Inhibition de croissance Immobilité Inhibition de croissance Immobilité	96 h 48 h 96 h 48 h			Glyphosate CE ₅₀ : 129 mg/L CE ₅₀ : > 2000 mg/L Spasor CE ₅₀ : 71 mg/L CE ₅₀ : 307 mg/L	Pereira <i>et al.</i> , 2009
Laboratoire – in vitro	Roundup	Eau douce	Crustacé	<i>Ceriodaphnia dubia</i>		Mortalité	48 h			CL ₅₀ : 5.5 mg/L	Tsui <i>et al.</i> , 2005
Laboratoire – in vitro	Roundup	Eau douce	Crustacé	<i>Daphnia magna</i>		Mortalité Nb éclosions /femelle Nb portées /femelle Nb éco/fem Nb portées/fem Nb éco/fem Nb portées/fem Nb éco/fem Nb portées/fem	96 h 15 jours 15 jours 15 jours 15 jours	G0 < 25 mg/L 25 mg/L G1 < 25 mg/L 25 mg/L G2 < 25 mg/L < 25 mg/L G3 < 50 mg/L 50 mg/L	G0 25 mg/L 50 mg/L G1 25 mg/L 50 mg/L G2 25 mg/L 25 mg/L G3 50 mg/L >50 mg/L	CL ₅₀ : 98 mg/L	Papchenkova <i>et al.</i> , 2009
Laboratoire – in vitro	Roundup	Eau douce	Moule	<i>Utterbackia imbecilis</i>	Glochidie	Mortalité Comètes ADN	24 h 24 h	10 mg/L 5 mg/L		CL ₅₀ : 18.3 mg/L	Connors et Black, 2004
Laboratoire – in vitro	Glyphosate	Eau marine	Huître creuse Oursin	<i>Crassostrea gigas</i> <i>Paracentrotus lividus</i>	Larves Larves	Anomalies développement	18-24 h 48 h	> 200 µg/L > 200 µg/L			His <i>et al.</i> , 1999
Laboratoire – in vitro	Roundup	Eau marine	Oursin	<i>Sphaerechinus granularis</i>	10 min après fécondation	Division de l'œuf (1 ^{er} cycle)	3 h 20 min		1.36 g/L		Marc <i>et al.</i> , 2003
Laboratoire – in vitro	Amega Cargly Cosmic Roundup 3+	Eau marine	Oursin	<i>Sphaerechinus granularis</i>	10 min après fécondation	Division de l'œuf (1 ^{er} cycle)	4 h		1 mM 1 mM 1 mM 8 mM		Marc <i>et al.</i> , 2004

Système expérimental	Substance	Milieu	Organisme	Nom	Stade	Paramètre	Durée d'exposition	CSEO	LOEC	CLx ou CEx	Référence biblio
	Roundup biovert								10 mM		
Laboratoire – in vitro	Roundup	Eau marine	Oursin	<i>Sphaerechinus granularis</i>	4.5 h après fécondation	Éclosion Transcription	14 h 5.5 h		1 mM 1 mM	3.5 mM 1.2 mM	Marc <i>et al.</i> , 2005
Microcosmes indoor	Rival	Eau douce	Poisson	<i>Gambusia yucatana</i>		Mortalité	96 h			CL ₅₀ : 17.8 mg/L	Rendon-von Osten <i>et al.</i> , 2005
Microcosmes indoor	Glyphosate	Eau douce	Poisson	<i>Carassius auratus</i> <i>Oncorhynchus mykiss</i>		Mortalité	96 h	1.9 g/L 0.82 g/L		CL ₅₀ : 4.2-10 g/L CL ₅₀ : 4.3 g/L	Anton <i>et al.</i> , 1994
Microcosmes indoor	Roundup	Eau douce	Poisson	<i>Ictalurus punctatus</i> <i>Lepomis microchirus</i> <i>Procambarus spp.</i>		Mortalité	96 h			CL ₅₀ : 4.9 mg/L CL ₅₀ : 4.4 mg/L CL ₅₀ : 21.6 g/L	Abdelghani <i>et al.</i> , 1998
Microcosmes indoor	Glyphosate	Eau douce	Poisson	<i>Jordanella floridae</i>	Juvénile de 8 j Nourris À jeun	Mortalité	96 h			CL ₅₀ : > 30 mg/L CL ₅₀ : > 3 mg/L	Holdway et Dixon, 1988
Microcosmes indoor	Vision 15% surfactant 10% surfactant	Eau douce	Poisson	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Juvénile	Mortalité Nage errante + respiration rapide Mortalité Nage errante + respiration difficile	96 h 24 h 24 h		13.5 mg/L 37.5 mg/L	CL ₅₀ : 27 mg/L CL ₅₀ : 75 mg/L	Morgan <i>et al.</i> , 1991
Microcosmes indoor	Roundup	Eau douce tropicale	Poisson	<i>Tilapia rendalli</i>		Érythrocytes micronucléés (injection abdominale de roundup)	96 h	< 42 mg/kg	42 mg/kg		Grisolia, 2002
Microcosmes indoor	Roundup	Eau douce tropicale	Poisson	<i>Oreochromis niloticus</i>		Mortalité	96 h			CL ₅₀ : 36.8 mg/L	Jiraungkoorskul <i>et al.</i> , 2003
Microcosmes indoor	Roundup	Eau douce	Poisson	<i>Carassius auratus</i>		SOD cerveau SOD foie SOD rein CAT cerveau CAT foie CAT rein GST foie GR cerveau GR foie GR rein G6DPH cerveau G6DPH foie G6DPH rein	96 h	20 mg/L	2.5 mg/L 2.5 mg/L	Lushchak <i>et al.</i> , 2009	

Système expérimental	Substance	Milieu	Organisme	Nom	Stade	Paramètre	Durée d'exposition	CSEO	LOEC	CLx ou CEx	Référence biblio
									2.5 mg/L		
Microcosmes indoor	Roundup	Eau douce tropicale	Poisson	<i>Prochilodus lineatus</i>	Juvénile	Mortalité Glucose (plasma) Cortisol (Plasma) GST (foie) CAT (foie)	96 h 96 h 96 h 96 h	7.5 mg/L 10 mg/L 10 mg/L 10 mg/L	10 mg/L	CL ₅₀ : 13.7 mg/L	Langiano et Martinez, 2008
Microcosmes indoor	Roundup	Eau douce tropicale	Poisson	<i>Rhamdia quelen</i>	Juvénile	AChE cerveau AChE muscle TBARS cerveau TBARS foie TBARS muscle	96 h	0.4 mg/L 0.4 mg/L	0.2 mg/L 0.2 mg/L		Gluszczak <i>et al.</i> , 2007
Microcosmes indoor	Roundup	Eau douce tropicale	Poisson	<i>Rhamdia quelen</i>	Juvénile	Cortisol (plasma)	96 h		1.2 mg/L		Cericato <i>et al.</i> , 2008
Microcosmes indoor	Roundup	Eau douce tropicale	Poisson	<i>Leporinus obtusidens</i>		AChE cerveau AChE muscle Métabolites foie Métabolites muscle	96 h	20 mg/L	3 mg/L 3 mg/L 3 mg/L		Gluszczak <i>et al.</i> , 2006

Système expérimental	Substance	Milieu	Organisme	Nom	Stade	Paramètre	Durée d'exposition	CSEO	LOEC	CLx ou CEx	Référence biblio
Laboratoire – in vitro	Metolachlor (Dual 960 ^E)	Eau douce	Phytoplancton	<i>Selenastrum capricornutum</i> <i>Chlorella vulgaris</i> <i>Ankistrodesmus falcatus</i> <i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Pediastrum biwae</i>		Efficacité de photosynthèse	96 h			CE ₅₀ : 116 µg/L CE ₅₀ : 341 µg/L CE ₅₀ : 78 µg/L CE ₅₀ : 401 µg/L CE ₅₀ : 408 µg/L	Juneau <i>et al.</i> , 2001
Laboratoire – in vitro	Rac-Metolachlor S- Metolachlor	Eau douce	Phytoplancton	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>		Inhibition de croissance	96 h			CE ₅₀ : 152 µg/L CE ₅₀ : 68 µg/L	Liu et Xiong, 2009
Laboratoire – in vitro	Metolachlor	Eau douce	Phytoplancton	<i>Raphidocelis subcapitata</i> (ex <i>Selenastrum capricornutum</i>)		Inhibition de croissance	96 h			CE ₅₀ : 5.5 mg/L	Ma <i>et al.</i> , 2006
Laboratoire – in vitro	Metolachlor	Eau douce	Phytoplancton	<i>Scenedesmus quadricauda</i>		Inhibition de croissance	96 h			CE ₅₀ : 600 µg/L	Ma <i>et al.</i> , 2003
Laboratoire – in vitro	Metolachlor	Eau douce	Phytoplancton	<i>Chlorella pyrenoidosa</i> <i>Scenedesmus obliquus</i>		Inhibition de croissance	96 h			CE ₅₀ : 12.7 mg/L CE ₅₀ : 19.4 mg/L	Ma <i>et al.</i> , 2001
Laboratoire – in vitro	Metolachlor	Eau douce	Phytoplancton	<i>Chlorella vulgaris</i>		Inhibition de croissance	96 h			CE ₅₀ : 18.9 mg/L	Ma <i>et al.</i> , 2002
Laboratoire – in vitro	S-Metolachlor	Eau douce	Phytoplancton	<i>Scenedesmus vacuolatus</i>		Taux de reproduction	96 h			CE ₅₀ : 341 µg/L	Vallotton <i>et al.</i> , 2008
Laboratoire – in vitro	Metolachlor	Eau douce	Phytoplancton	<i>Selenastrum capricornutum</i>		Inhibition de croissance	72 h			CE ₅₀ : 56 µg/L	Hartgers <i>et al.</i> , 1998
Laboratoire – in vitro	Metolachlor	Eau douce	Crustacé	<i>Orconectes rusticus</i>	Mâles	Engagement d'1 combat % gagnants Durée combat Nb combats	96 h	70 ppb 70 ppb 80 ppb 80 ppb	80 ppb		Cook et Moore, 2008
Laboratoire – in vitro	Rac-Metolachlor S- Metolachlor	Eau douce	Crustacé	<i>Daphnia magna</i>		Mortalité Longueur Longévité Nb j avant 1 ^{ère} descendance Portées par femelle Nb juvéniles par femelle Mortalité Longueur Longévité Nb j avant 1 ^{ère} descendance Portées par femelle Nb juvéniles par femelle	24 h 21 jours 21 jours 21 jours 21 jours 21 jours 24 h 21 jours 21 jours 21 jours 21 jours 21 jours	0.5 mg/L 0.5 mg/L 7 mg/L 0.5 mg/L 0.001 mg/L 0.5 mg/L 5 mg/L 7 mg/L 5 mg/L 0.1 mg/L	1 mg/L 1 mg/L 1 mg/L 0.01 mg/L 1 mg/L 10 mg/L 10 mg/L 0.5 mg/L	CE ₅₀ : 69.4 mg/L CE ₅₀ : 51.2 mg/L	Liu et Xiong, 2006
Laboratoire – in vitro	Metolachlor	Eau douce	Diptère aquatique	<i>Chironomus tentans</i>	Larves 4 ^{ème} stade	Immobilité Inhibition AChE	72 h	0.1 mg/L	1 mg/L	0.1 < CE ₅₀ < 1 mg/L	Jin-Clark <i>et al.</i> , 2008

Système expérimental	Substance	Milieu	Organisme	Nom	Stade	Paramètre	Durée d'exposition	CSEO	LOEC	CLx ou CEx	Référence biblio
Laboratoire – in vitro	Carbofuran (98%)	Eau douce	Phytoplancton	<i>Anabeana flos-aquae</i> <i>Microcystis flos-aquae</i> <i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Selenastrum capricornutum</i> <i>Scenedesmus quadricauda</i> <i>Scenedesmus obliquus</i> <i>Chlorella vulgaris</i> <i>Chlorella pyrenoidosa</i>		% inhibition croissance	96 h	2 mg/L 1 mg/L 2 mg/L 0.5 mg/L 2 mg/L 0.2 mg/L 1 mg/L 2 mg/L	5 mg/L 2 mg/L 5 mg/L 1 mg/L 5 mg/L 0.5mg/L 2 mg/L 5 mg/L	CE ₅₀ : 7.9 mg/L CE ₅₀ : 4.65 mg/L CE ₅₀ : 11.3mg/L CE ₅₀ : 6.2 mg/L CE ₅₀ : 37.9 mg/L CE ₅₀ : 6.8 mg/L CE ₅₀ : 7.9 mg/L CE ₅₀ : 14.6 mg/L	Ma <i>et al.</i> , 2006
Laboratoire – in vitro	Carbofuran	Eau douce	Diptère	<i>Aedes aegypti</i>	Larves	Mortalité	2 h			CL ₅₀ : 2.13 µg/L	Parsons et Surgeoner, 1991 (a)
Laboratoire – in vitro	Carbofuran (99,1%)	Eau douce	Diptère	<i>Aedes aegypti</i>	Larves	Mortalité	24 h			CL ₅₀ : 90 µg/L	Parsons et Surgeoner, 1991 (b)
Microcosmes indoor	Carbofuran	Eau douce	Crustacé	<i>Hyalella catroi</i>	Mâles et femelles	Mortalité	7 jours			CL ₄₀ : 10 µg/L	Dutra <i>et al.</i> , 2009
Microcosmes indoor	Carbofuran (1,58 M)	Eau de mer	Bivalve	<i>Crassostrea gigas</i>	Adultes	Activité AChE branchies	96 h	< 22.13 µg/L	22.13 µg/L	Cl ₅₀ : 670.4 µg/L	Anguiano <i>et al.</i> , 2009
Microcosmes indoor	Curator (carbofuran , 30g/kg)	Eau douce tropicale	Poisson	<i>Oreochromis niloticus</i>		Activité ChE cerveau	24 h	<50 µg/L	50 µg/L	CL ₅₀ : 200 µg/L	Pathiratne <i>et al.</i> , 2008
Microcosmes indoor	Carbofuran	Eau douce	Poisson	<i>Salmo salar</i>	Mâles matures tacons	Détection olfactive de la prostaglandine F2α	30 min	< 1 µg/L	1 µg/L	CL ₅₀ : 2 µg/L	Waring et Moore, 1997
Microcosmes indoor	Carbofuran (75%)	Eau douce	Poisson	<i>Mystus vittatus</i>		Mortalité	96 h	9 µg/L		CL ₅₀ : 0.31 mg/L	Verma <i>et al.</i> , 1980
Microcosmes indoor	Carbofuran (99,9%)	Eau douce	Poisson	<i>Carassius auratus</i>	Immatures	Glucose plasma	48 h	5 µg/L	50 µg/L		Bretau <i>et al.</i> , 2001
Microcosmes indoor	Carbofuran (99,9%)	Eau douce	Poisson	<i>Carassius auratus</i>	Juveniles	Glycogène foie	48 h	5 µg/L	50 µg/L		Bretau <i>et al.</i> , 2000
Microcosmes indoor	Carbofuran (99,9%)	Eau douce	Poisson	<i>Carassius auratus</i>	Juveniles	Inhibition de AChE (cerveau, muscles dorsaux)	48 h	5 µg/L	50 µg/L		Bretau <i>et al.</i> , 2000
Laboratoire – in vitro	Carbofuran (>98%)	Eau douce	Poisson	<i>Carassius auratus</i>	Cellules dérivées de cellules d'écaille	Mortalité	24 h			CL ₅₀ : 1 mg/L	Saito <i>et al.</i> , 1991
Microcosmes indoor	Carbofuran (88,44%)	Eau douce	Poisson	<i>Carassius auratus</i>	Mâles adultes	AChE				Cl ₅₀ : 230 µg/L	Liu <i>et al.</i> , 2007
					Femelles adultes	AChE				Cl ₅₀ : 259 µg/L	

Système expérimental	Substance	Milieu	Organisme	Nom	Stade	Paramètre	Durée d'exposition	CSEO	LOEC	CLx ou CEx	Référence biblio
Microcosmes indoor	Furadan 350L (Carbofuran 35%)	Eau douce	Poisson	<i>Gambusia yucatana</i>		Mortalité	24 h			CL ₅₀ : 0.77 mg/L	Osten <i>et al.</i> , 2005
						Inhibition de AChE (tête et muscles dorsaux)	24 h			CE ₅₀ : 0.22 mg/L	
Microcosmes indoor	Carbofuran (75%)	Eau douce	Poisson	<i>Channa punctatus</i>	Adultes	AChE cerveau	48 h			CE ₅₀ : 0.31 mg/L	Jash et Bhattacharya, 1983
				<i>Anabas testudineus</i>		AChE cerveau	48 h			CE ₅₀ : 0.3 mg/L	
Microcosmes indoor	Carbofuran	Eau douce	Poisson	<i>Heteropneustes fossilis</i>	Femelles adultes	Contenu sérique en 17β-estradiol	30 jours	< 0.5 mg/L	0.5 mg/L		Chatterjee <i>et al.</i> , 2001
						Contenu ovarien en 17β-estradiol	30 jours	<0.5 mg/L	0.5 mg/L		
Microcosmes indoor	Carbofuran (75%)	Eau douce	Poisson	<i>Heteropneustes fossilis</i>	Femelles adultes	Indice gonado-somatique	30 jours	0.5 mg/L	1 mg/L		Chatterjee <i>et al.</i> , 1997
Laboratoire – in vitro	Carbofuran (75%)	Eau douce	Poisson	<i>Heteropneustes fossilis</i>		Activité EROD hépatocytes	24 h			CE ₅₀ : 22.13 µg/L	Ghosh <i>et al.</i> , 2000
Microcosmes indoor	Carbofuran (99,6%)	Eau douce	Poisson	<i>Clarias batrachus</i>		Contenu en protéines dans les organes	96 h		0.01 mg/L		Singh et Sharma, 1998
						Activité lactate deshydrogénase	96 h		0.02 mg/L		

Système expérimental	Substance	Milieu	Organisme	Nom	Stade	Paramètre	Durée d'exposition	CSEO	LOEC	CLx ou CEx	Référence biblio
Microcosmes in situ Laboratoire –in vitro	deltaméthrine	Eau douce tropicale	Bactéries Phytoplancton Zooplancton	Communauté naturelle incubée in situ <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> <i>Monoraphidium sp.</i> <i>Diaphanosoma excisum</i> <i>Moina micrura</i>	 Juvéniles Juvéniles	Densité UFC Incorporation thymidine In vivo fluorescence Mortalité Croissance Mortalité Croissance	12 h 40 h 40 h	 443 µg/L 0.89 µg/L	4.4 µg/L 4.4 µg/L 4.4 µg/L 443 µg/L 4.4 µg/L 4.4 µg/L 2.21 µg/L	 100% de mortalité 100% de mortalité	Leboulanger <i>et al.</i> , 2009
Laboratoire – in vitro	deltaméthrine	Eau douce	Insecte aquatique Crustacé	<i>Anisops sardeus</i> <i>Streptocephalus sudanicus</i>		Mortalité Non précisé	Non précisé Non précisé			CL ₅₀ : 0.012 µg/L CE ₅₀ : 0.018 µg/L	Lahr, 1998
Laboratoire –in vitro	deltaméthrine	Eau douce	Crustacé	<i>Daphnia magna</i>		Mortalité	48 h			CL ₅₀ : 0.45 µg/L	Ren <i>et al.</i> , 2009
Laboratoire –in vitro	deltaméthrine	Eau douce	Crustacé	<i>Daphnia magna</i>		Mortalité	48 h			CL ₅₀ : 0.05-1 mg/L (selon DOC)	Day, 1991
Laboratoire –in vitro	deltaméthrine	Eau douce	Crustacé Poisson	<i>Ceriodaphnia dubia</i> <i>Paratya australiensis</i> <i>Melanotaenia duboulayi</i>	Larves	Mortalité	48 h 96 h 96 h			CL ₅₀ : 0.027 µg/L CL ₅₀ : 0.032 µg/L CL ₅₀ : 0.22 µg/L	Thomas <i>et al.</i> , 2008
Microcosmes indoor	deltaméthrine	Eau douce	Bivalve	<i>Unio elongatus eucirrus</i>		Mortalité	96 h			CL ₅₀ 6.6 mg/L	Köprüçü et Seker, 2008
Microcosmes indoor	deltaméthrine	Eau douce	Bivalve	<i>Unio elongatus eucirrus</i>		Péroxidation lipides : - glande digestive (GD) - branchies Glutathion : - GD - branchies Catalase : - GD - branchies	96 h	400 µg/L 100 µg/L 1.6 mg/L 1.6 mg/L 1.6 mg/L 1.6 mg/L	800 µg/L 200 µg/L		Köprüçü <i>et al.</i> , 2008
Laboratoire – in vitro	deltaméthrine	Eau douce	Bivalve	<i>Anodonta cygnea</i>		Activité siphon exhalant Activité valvaire	30 min 1 semaine	5 µg/L	10 µg/L 1 µg/L		Kontreczky <i>et al.</i> , 1997

Système expérimental	Substance	Milieu	Organisme	Nom	Stade	Paramètre	Durée d'exposition	CSEO	LOEC	CLx ou CEx	Référence biblio
Microcosmes indoor	deltaméthrine	Eau douce	Poisson	<i>Oncorhynchus mykiss</i>		Mortalité	96 h			CL ₅₀ : 0.7 µg/L	Ural et Sağlam, 2005
Microcosmes indoor	deltaméthrine formulation Decis EW 50	Eau douce	Poisson	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Juvéniles	Mortalité	96 h			CL ₅₀ : 20 µg/L	Velišek <i>et al.</i> , 2007
Microcosmes indoor	deltaméthrine	Eau douce	Poisson	<i>Oreochromis niloticus</i>	Juvéniles	Mortalité	48 h			CL ₅₀ : 4.85 µg/L	Yildirim <i>et al.</i> , 2006
Microcosmes indoor	deltaméthrine formulation Butox	Eau douce	Poisson	<i>Oreochromis niloticus</i>		Mortalité Indices hématologiques Biochimie du sérum	96 h		5 µg/L 5 µg/L	CL ₅₀ : 14.6 µg/L	El-Sayed <i>et al.</i> , 2007
Microcosmes indoor	deltaméthrine	E douce trop	Poisson	<i>Poecilia reticulata</i>	Mâles adultes	Mortalité	48 h			CL ₅₀ : 5.1 µg/L	Viran <i>et al.</i> , 2003
Microcosmes indoor	deltaméthrine	Eau douce	Poisson	<i>Channa punctata</i>	Adultes	Anomalies noyaux erythrocytes Micronoyaux Péroxidation lipidique GSH SOD	72 h 72 h 72 h 72 h		0.4 µg/L 0.4 µg/L 0.4 µg/L 0.4 µg/L		Ansari <i>et al.</i> , 2008
Microcosmes indoor	deltaméthrine	Eau douce	Poisson	<i>Silurus glanis</i>	Juvéniles	Mortalité	96 h			CL ₅₀ : 0.69 µg/L	Köprücü <i>et al.</i> , 2006
Microcosmes indoor	deltaméthrine formulation Decis	Eau douce	Poisson	<i>Cyprinus carpio</i>	Juvéniles	Mortalité	96 h			CL ₅₀ : 1.65 µg/L	Çalta et Ural, 2004
Laboratoire – in vitro	deltaméthrine formulation Decis EC	Eau douce	Poisson	<i>Cyprinus carpio</i>	Embryons Larves	Mortalité	48 h			CL ₅₀ : 0.213 µg/L CL ₅₀ : 0.074 µg/L	Köprücü et Aydin, 2004
Microcosmes indoor	deltaméthrine	Eau douce	Poisson	<i>Cyprinus carpio</i>		Mortalité	96 h			CL ₅₀ : 2.3 µg/L	Sun, 1987, in Çalta et Ural, 2004
Microcosmes indoor	deltaméthrine formulation Decis 2.5 EC	Eau douce	Poisson	<i>Cyprinus carpio</i> <i>Oncorhynchus mykiss</i>		Mortalité	96 h 96 h			CL ₅₀ : 3.5 µg/L CL ₅₀ : 2.3 µg/L	Lakota <i>et al.</i> , 1989, in Çalta et Ural, 2004
Microcosmes indoor	deltaméthrine formulation Decis 25 EC	Eau douce	Poisson	<i>Ctenopharyngodon idella</i> <i>Cyprinus carpio</i> <i>Esox lucius</i>		Mortalité	96 h 96 h 96 h			CL ₅₀ : 91 µg/L CL ₅₀ : 78 µg/L CL ₅₀ : 23 µg/L	Rao <i>et al.</i> , 1983, in Çalta et Ural, 2004
Microcosmes indoor	deltaméthrine formula K-Obiol	Eau douce	Poisson	<i>Clarias gariepinus</i>		Mortalité	96 h			CL ₅₀ : 4 µg/L	Datta et Kaviraj, 2003
Microcosmes indoor	deltaméthrine	Eau douce	Poisson	<i>Cyprinodon macularius</i> <i>Gambusia affinis</i> <i>Oncorhynchus mykiss</i> <i>Tilapia mossambica</i>		Mortalité	48 h 48 h 48 h 48 h			CL ₅₀ : 0.6 µg/L CL ₅₀ : 1 µg/L CL ₅₀ : 0.5 µg/L CL ₅₀ : 0.8 µg/L	Mulla <i>et al.</i> , 1978, in Çalta et Ural, 2004
Microcosmes indoor	deltaméthrine	Eau douce	Poisson	<i>Tilapia nilotica</i>		Mortalité	96 h			CL ₅₀ : 14.5 µg/L	Golow et Godzi, 1994, in Çalta et Ural, 2004

ANNEXE 2 : METHODE POUR L'ANALYSE DES PESTICIDES

Les pesticides sont analysés par injection directe (boucle de 200 µL) de l'échantillon d'eau dans le système analytique (LC-MSMS).

Matériel et produits

Chromatographe en phase liquide WATERS Séparations module 2690 + détection par spectrométrie de masse MICROMASS (Quattro Ultima)

- Réactifs

Acide minéral : Acide formique (CH₂O₂) 99-100 % pour analyses

Solvant : Méthanol (CH₃OH)

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 : Sigma-Aldrich et Dr. Ehrenstorfer (C.I.L Cluzeau).

- Verrerie

Flacon de prélèvement à usage unique d'une contenance de 20 mL en verre.

Vial en verre de 1,5 mL à usage unique.

Préparation des réactifs et des solutions étalons

Les solutions mères sont préparées à partir des produits purs, dans l'acétonitrile ou le méthanol.

Les mélanges sont préparés par dilution des diverses solutions mères dans l'acétonitrile. Conservation au congélateur ou réfrigérateur selon les solutions.

Protocole d'analyse et limite de quantification

- Préparation des témoins pour la gamme d'étalonnage et d'un blanc.

La gamme d'étalonnage et le blanc sont réalisés à chaque série

- Préparation de l'échantillon

L'échantillon est mis directement en petit flacons après ajout des étalons internes (simazine D10 et diuron D6) et après dilution si nécessaire

- Chromatographie liquide (CHLP) : colonne et gradient

Colonne Pursuit Xrs C18 , 3µm, 150X2mm

Précolonne : même adsorbant que la colonne

Débit : 0,20 mL/min.

Gradient : il est composé de d'eau ultra pure distillée (A) et de méthanol (B) à 0,05 % d'acide formique.

Temps (min)	% de A	% de B
0	90	10
0.50	90	10
10	10	90
30	10	90
32	90	10
37	90	10

- Détection : spectrométrie de masse

Paramètre de réglages du spectromètre de masse (ESI)

Source (ES+ / ES-)	Analyser (ES+/-)
Capillaire : 3 kV Cone : dépendant du composé RF Lens : 0.0 V Température de la source : 120°C Température de désolvatation : 350°C Débit du cone gaz (N2) : 55 L/hr Débit du gaz de désolvatation : 550 L/hr	LM 1 resolution : 13.0 HM 1 resolution : 13.0 Ion energy 1 : 1.0 Entrance : -1 Collision : dépendant du composé Exit : 1 LM 2 resolution : 13 HM 2 resolution : 13 Ion energy : 1.5 Multiplier : 500 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 (Tableau 12).

Tableau 62 : Choix des ions caractéristiques pour les pesticides recherchés.

Pesticides	Mode d'ionisation ES +/-	Masse molaire (g/mol)	Ion précurseur (m/z)	Ions produits (m/z)	Limite de quantification (µg/L)
Carbofuran	ES+	221.26	221.88	122.97/164.94/165.10	0.005
Carbendazime	ES+	191.19	192.0	132.10/160	0.005
Diuron	ES+	233.10	233.00	72.30/46.30	0.005
Deltaméthrine	ES+	505.21	505.77	280.90/252.69/173.00/171.74	0.10
S-Métolachlore	ES+	283.79	283.96	251.93/175.86	0.005
2-aminobenzimidazole	ES+	133.15	133.94	65.14/91.99	0.020
DCA	ES+	162.02	163.88	128.90/126.95	0.060
DCPMU	ES+	219.07	220.74	126.87/163.77	0.020
DCPU	ES+	205.04	204.83	126.95/161.87	0.060
Carbofuran -3-kéto	ES+	235.24	235.90	207.90/178.85/160.87/150.93	0.200
Carbofuran -3-hydroxy,	ES+	237.25	238.00	181.00/163.00	0.050
Carbofuran -3-hydroxy-7-phenol	ES+	180.20	176.98	88.95/61.12	0.030
2-éthyl-6-méthylaniline	ES+	135.21	135.85	118.86/107.86/90.94	0.05
2-éthyl-6-méthyl-2-chloroacétanilide	ES+	211.70	211.79	183.79/119.83/107.94	0.010
Acide carboxylique-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-diméthyl-(1-cyclopropane	ES+	297.97	288.82	232.79/176.75	0.10

ANNEXE 3 : VALORISATION

12.1.1. Colloques et séminaires

TURQUET J., TONA F., CAMBERT H., QUINIOU F., DAVY R., STACHOWSKI-HABERKORN S., DELESMONT R., DELESMONT E., LIMON G. et DURAND G., Evaluation du risque pesticides pour les récifs coralliens de La Réunion (ERICOR). Communication au Colloque du programme « Évaluation et Réduction des Risques liés à l'Utilisation des Pesticides » *Pesticides et Environnement : De la connaissance à l'action*. Reims 2007.

TURQUET J., TONA F., CAMBERT H., QUINIOU F., DAVY R., STACHOWSKI-HABERKORN S., DELESMONT R., DELESMONT E., LIMON G. et DURAND G., Evaluation du risque pesticides pour les récifs coralliens de La Réunion (ERICOR). Présentation des résultats : Communication au séminaire mi parcours du programme « Évaluation et Réduction des Risques liés à l'Utilisation des Pesticides ». Paris 2009.

TURQUET J., TONA F., CAMBERT H., QUINIOU F., DAVY R., STACHOWSKI-HABERKORN S., DELESMONT R., DELESMONT E., LIMON G. et DURAND G., Evaluation du risque pesticides pour les récifs coralliens de La Réunion (ERICOR). Poster au colloque LITEAU. Montpellier 2009.

TURQUET J., TONA F., CAMBERT H., QUINIOU F., DAVY R., STACHOWSKI-HABERKORN S., DELESMONT R., DELESMONT E., LIMON G. et DURAND G., Evaluation du risque pesticides pour les récifs coralliens de La Réunion (ERICOR). Poster au XXXIXème congrès du Groupe Français des Pesticides, Toulouse 2009.

TURQUET J., TONA F., CAMBERT H., QUINIOU F., DAVY R., STACHOWSKI-HABERKORN S., DELESMONT R., DELESMONT E., LIMON G. et DURAND G., Evaluation du risque pesticides pour les récifs coralliens de La Réunion (ERICOR). Communication au groupe régional Réunion Phytosanitaires. Saint-Denis 2010.

12.1.2. Communication vers décideurs

Quiniou F. : Organisation d'une journée thématique intitulée « Les pesticides dans les eaux littorales bretonnes : état des lieux, évaluation des risques, impacts sur les espèces et les milieux », pour la section Mer Littoral du Conseil économique et social de Bretagne (Région Bretagne), le 06 mai 2010 à Idhesa Quimper. Cinq exposés incluant la présentation du projet Ericor.

Participants : Arzul G., Durand G., de la Broise D., Hourmant A. et Quiniou F.

12.1.3. Publications scientifiques parues

SO

12.1.4. Publications scientifiques à paraître

SO

12.1.5. Publications scientifiques prévues

Deux publications sont prévues d'ici mi 2011 :

- Une spécifique au bioessai embryon de poisson ;
- Une globale avec tous les résultats du programme.