

SYNTHESE



ERICOR EVALUATION DU RISQUE PESTICIDES POUR LES RECIFS CORALLIENS DE LA REUNION.

PROGRAMME "EVALUATION ET REDUCTION DES RISQUES LIES A 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, Institut Pasteur de Lille - Laboratoire du Littoral

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



1. CONTEXTE GENERAL

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 dans 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 pas toujours adaptés à la géomorphologie de l'Île). 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, sédiment, 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-vectoriel (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 courts ou longs *via* les eaux souterraines.

La surveillance de l'environnement marin récifal, par l'analyse de la contamination des différents compartiments (eau, sédiment, 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 pollusensibilité et des effets de l'exposition des organismes aux pesticides qui restent très peu documentés 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 Michel 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 le monitoring 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 biocénoses 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 pollusensibilité des organismes dominants, et/ou d'importance écologique pour l'écosystème récifal. Ces évaluations reposent sur l'adaptation de bioessais d'écotoxicité existant pour le milieu marin aux espèces spécifiques des zones tropicales, et plus particulièrement aux récifs 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 participera à l'évaluation du danger, de l'exposition et l'analyse du risque pour les récifs coralliens.

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

2. OBJECTIFS GENERAUX DU PROJET

L'objectif général du projet est de compléter dans une optique opérationnelle, l'analyse du risque pour les écosystèmes coralliens exposés de manière chronique ou aiguë (accidentelle) aux pesticides.

Les objectifs spécifiques identifiés :

- mettre au point des bioessais spécifiques au contexte tropical pour la recherche de toxicité des pesticides utilisés localement ;
- comparer leur sensibilité à celle des organismes habituellement employés ;
- compléter l'évaluation de la toxicité des principales molécules utilisées localement par des tests sur des organismes récifaux exposés aux biocides ;
- 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.

3. QUELQUES ELEMENTS DE METHODOLOGIE

Sélection des molécules étudiées

Le choix des molécules les plus pertinentes à tester par le projet a été réalisé en concertation avec l'ensemble des acteurs locaux membres actifs du groupe Phytosanitaire. Cette sélection a été soumise à l'avis du Comité Scientifique avant le début des bioessais.

La base de réflexion s'est concentrée sur une sélection de six molécules (intégrant deux voire trois herbicides). Cette sélection a été guidée par l'importance des importations, leur cible, leur persistance dans l'environnement, ainsi que les premiers résultats des mesures réalisées *in situ* par les programmes de surveillance (modiole, sédiment et Peps). De plus, une attention particulière a été portée sur la bonne représentativité des modes d'action des molécules sélectionnées.

Chaque substance active sélectionnée a été testée sur la base des méthodes tropicalisées mises au point dans le programme et comparées aux méthodes normalisées réalisées sur des organismes tempérés.

Mise au point des bioessais et mesure *in vitro* de la toxicité

La première phase a consisté en l'adaptation et la mise au point de tests spécifiques aux écosystèmes tropicaux. Six tests normalisés et pratiqués à L'Institut Pasteur Lille (IPL) et Ifremer, partenaires du projet, ont été identifiés comme transférables et adaptables à des espèces tropicales de La Réunion.

1- Test sur **bactérie luminescente** (système Microtox®) :

Au montage du projet ERICOR, les bactéries devaient être abordés, 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 Comité Scientifique, ce niveau trophique a été mis de côté et l'effort reporté sur les autres bioessais.

- 2- Test sur la croissance d'une **micro-algue marine** en culture monospécifique selon la norme NF EN ISO 10253 :

Deux espèces tropicales ont été étudiées et comparée à une espèce tempérée. Inspirée de la Norme ISO 10253, les bioessais 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* au laboratoire. Ces deux souches ont été isolées dans le cadre du programme et sont maintenues dans la structure PHYTOBANK, souchothèque de l'ARVAM. L'adaptation méthodologique s'est focalisée sur les conditions de culture et les méthodes de dénombrement de ces organismes qui se développent au fond des flacons. Les techniques usuelles de spectrophotométrie n'ont pas pu être adaptées.

L'essai « tempéré » suit la norme NF EN ISO 10253 (2006), et utilise une diatomée planctonique *Phaeodactylum tricornutum*.

- 3- Test sur **crustacé** : test sur les copépodes selon FD ISO 14669 ou test sur un amphipode fouisseur, type *Corophium*, selon la norme NF EN ISO 16712 :

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 (les recherches sur un copépode côtier et un amphipode fouisseur de sédiment corallien n'ont pas permis d'identifier de gisement exploitable pour ce type de bioessai). Plusieurs pistes sont identifiées pour le développement futur de ce bioessai.

Le modèle tempéré a tout de même été utilisé pour l'évaluation de la toxicité des substances sur crustacé, *Acartia tonsa* (copépode marin) testé par IPL.

- 4- Test d'embryotoxicité d'une substance chez l'**oursin** suivant les standards ASTM et Canada :

Ces bioessais ont été réalisés sur deux espèces d'oursin : *Echinometra mathei* (très répandu sur les récifs coralliens de La Réunion) et *Paracentrotus lividus* (oursin tempéré). Ils mesurent la toxicité d'une substance sur le développement embryo-larvaire de l'oursin.

Au niveau tropical, la première année a été consacrée à la maîtrise des cycles de reproduction de ces organismes. En effet, un des facteurs de réussite de ce test réside en la qualité des géniteurs. A La Réunion (hémisphère Sud), quatre mois dans l'année sont exploitables pour sa bonne réalisation des essais : de novembre à mars.

- 5- Test d'embryotoxicité chez les **bivalves**, dérivé de la norme ASTM E 724-89 et proposé à normalisation Afnor, début 2006, selon le protocole décrit par Quiniou *et al.*, (2005) :

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. 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. Seuls les essais sur les larves de *Crassostrea gigas* (huître creuse) ont été effectués.

6- Tests de toxicité létale sur des **juvéniles de poisson** (bar) suivant la norme AFNOR T90 – 307, permettant d’avoir une information sur l’impact possible les vertébrés :

Ces essais sur les poissons ont été adaptés à des embryons vésiculés d’espèces tempérés et tropicales. À ce stade, les embryons restent sur leurs réserves vitellines, et n’ont pas besoin d’alimentation externe. Les essais avec ces organismes peuvent généralement durer jusqu’à l’ouverture de la bouche : soit pour le bar (*Dicentrarchus labrax*) sept jours (le bioessai est 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 restent récentes et ont déjà montré que les bioessais sur embryon de poisson zèbre étaient un outil très prometteur en remplacement de ceux sur les poissons classiquement réalisés en toxicologie, ces derniers devant être soumis à la réglementation européenne sur l’expérimentation animale.

7-Tests de toxicité létale sur des **coraux** :

Un des enjeux du projet concerne les coraux. Aucune norme n’existait pour cet organisme, la principale activité a porté sur la mise au point d’un bioessai corail afin d’obtenir des valeurs 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 espèces, des individus, opportunistes : c’est à dire les « salissures » des cages aquacoles de l’ARDA en Baie de Saint-Paul. La technique de microbouturage présente aussi l’avantage de limiter les prélèvements dans le milieu, et ainsi de disposer d’un nombre suffisant d’organismes pour répéter les différentes séries d’essais. La Figure 1 illustre les différentes étapes de la mise en œuvre de ce bioessai (collaboration effective avec l’ARDA et l’AQUARIUM de La Réunion).

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



Figure 1 : Colonies de *Pocillopora* fixées sur des filières (photos ARVAM).

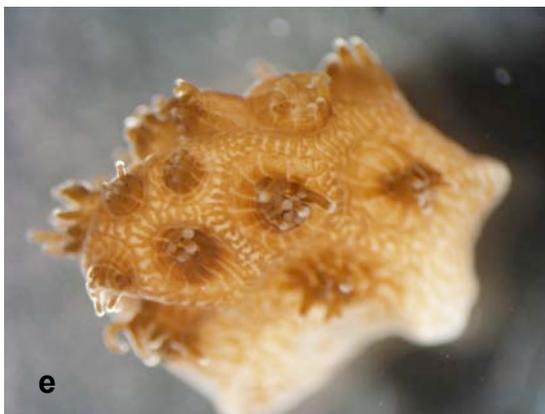
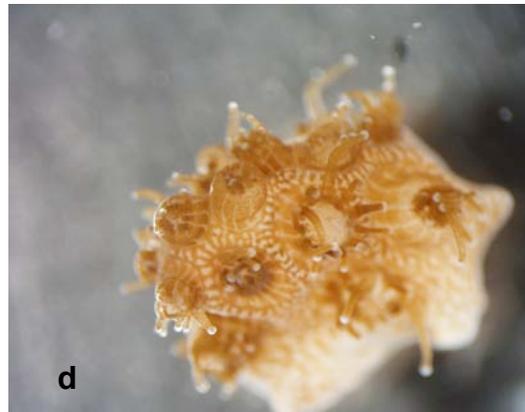
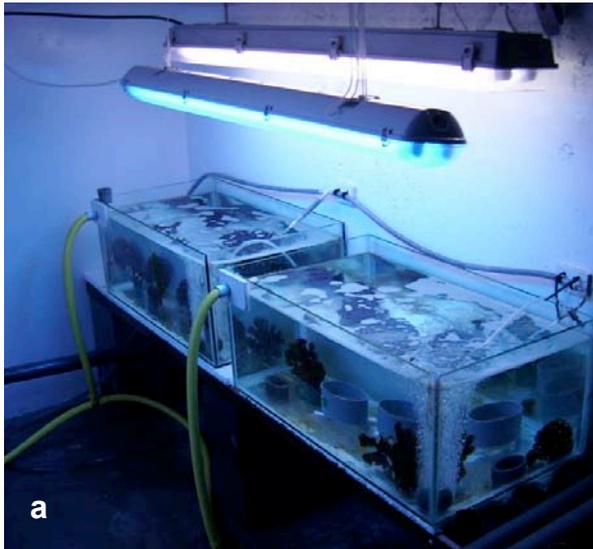


Figure 2 : (a) bacs de stabulation des colonies mères, (b) les « verrues » sur une branche de *Pocillopora meandrina*, (c) découpage des « verrues », (d) boutures in vitro ne présentant aucun signe de stress à 96h, (e) polypes invaginés, (f) évagination de la poche gastro-intestinale, (g) expulsion des zooxanthelles et nécrose tissulaire (photos ARVAM).

4. RESULTATS OBTENUS

L'objectif général du programme ERICOR était de compléter dans une optique opérationnelle, la connaissance des dangers pour les écosystèmes coralliens liés à la présence chronique ou aigüe (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 ;
- 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 aigüe 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.

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. 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 substances pesticides.

ce sont ainsi trois herbicides (diuron, glyphosate et S-métolachlore), deux insecticides (deltaméthrine et carbofuran) et un fongicide (carbendazime) qui ont été ciblés 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 et comparé à une espèce tempérée. Adaptés de la Norme NF EN ISO 10253, les bioessais 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* au laboratoire. L'essai « tempéré » utilise une diatomée planctonique *Phaeodactylum tricornutum*.

L'ensemble des essais effectués montre une similitude de réponse 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-métolachlore, deux des trois herbicides testés.

Les essais sur les **échinodermes** ont été réalisés sur deux espèces d'oursins : *Echinometra mathei* (très répandue sur les récifs coralliens de La Réunion) et *Paracentrotus lividus* (oursin tempérée). Ils mesurent la toxicité d'une substance sur le développement embryonnaire d'oursin.

L'adaptation du protocole à l'espèce tropicale 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. 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 relevées respectivement pour l'oursin tropical et tempéré. Cette molécule a déjà été retrouvée dans l'environnement marin de La Réunion : dans des oursins analysés lors de la crise du Chikungunya. Ce résultat interpelle sur la dangerosité de ce produit pour des invertébrés marins.

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. L'utilisation de microboutures de colonies de *Pocillopora meandrina* présente l'avantage de limiter les prélèvements dans le milieu, et ainsi de disposer d'un nombre suffisant d'organismes pour répéter les différentes séries d'essais. La mise au point de ce bioessai a été longue, c'est pourquoi les résultats obtenus sont incomplets.

Seul le carbendazime a un effet toxique sur les colonies coralliennes. Avec une CSEO calculée de 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 symbiotes. Dans le programme ERICOR, nous avons abordé ce point au travers de la culture *in vitro* de souches 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 tempérées (*Dicentrarchus labrax*) et tropicales (*Sciaenops ocellatus*). De nombreux avantages sont notés, comme une réduction significative des volumes à tester, un temps de mise en place court, et une sensibilité accrue.

Ces essais sont nouveaux mais sont des outils très prometteurs en remplacement de ceux sur les juvéniles de poissons classiquement réalisés en écotoxicologie, ces derniers devant être soumis à la réglementation européenne sur l'expérimentation animale (Directive du 24 novembre 1986).

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 suivant les normes en vigueur (FD ISO 14 669 et XP T90-382).

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 bécards, 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 niveau trophique est particulièrement intéressant pour l'étude des insecticides.

Tous ces groupes ont donné des résultats toxicologiques différents en fonction des substances actives testées. Les molécules ciblées par le programme ont induit un effet sur au moins une des cibles. L'approche écotoxicologique basée sur l'utilisation ces bioessais existants et mis au point s'avère 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 macroalgue *Ceramium tenuicorne* en eau marine et saumâtre, (ISO/CD 10710, 2009) et sera traduite en norme Afnor à paraître 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 existants.

Sur la base des premiers éléments toxicologiques obtenus lors du programme ERICOR et des données issues de la littérature, la synthèse des effets toxiques de chaque substance peut ainsi être résumée :

- 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. Le premier résultat obtenu sur le corail montre une sensibilité à cette substance. 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 les études disponibles. A ce jour, cette molécule est détectée uniquement dans les eaux douces à La Réunion ;
- les premiers organismes susceptibles d'être impactés par le **diuron** aux concentrations environnementales sont le phytoplancton et les coraux. Les oursins montrent une sensibilité contrastée, avec des effets observés sur le développement des larves tropicales. 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) ;
- les organismes susceptibles d'être impactés par le **glyphosate** sont ceux du phytoplancton. 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 de La Réunion. Les techniques actuelles de surveillance ne permettent pas de détecter la présence de ces substances dans l'environnement marin ;
- les seules données qui existent sur la toxicité du **métolachlore** sur des organismes marins sont celles de notre étude ERICOR. Ce manque de données ne permet pas de comparer la sensibilité des organismes entre eux. Dans l'environnement marin, cette substance est détectée, 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 ;
- les poissons, crustacés et diptères aquatiques sont sensibles au **carbofuran**. 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'espèces. Dans l'environnement marin le carbofuran n'est pas détecté avec les moyens de surveillance actuels ;

- les organismes les plus sensibles à la **deltaméthrine** sont les crustacés et les poissons, pour lesquels elle est hautement toxique, avec des seuils de réponses à partir du µg/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.

En parallèle, l'analyse du risque nécessite 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'eaux côtières. Les premiers essais ont mis en évidence une contamination des eaux côtières qui pour certains composés comme l'endosulfan, l'endrine, et le lindane sont au delà des NQE-MA. La technique des POCIS a aussi permis la détection de substances pharmaceutiques comme la caféine, le paracétamol, la théophylline, le terbuthylazine, dont les dangers pour l'environnement marin tropical restent inconnus.

Dans la perspective de l'évaluation à venir des substances chimiques potentiellement toxiques (directive REACH), les procédures de mesure de l'impact environnemental des pesticides et autres 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 valide, normalise, intercalibre puis applique 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 danger et du risque présentés par les nombreuses molécules commercialisées ou susceptibles de l'être ;
- l'évaluation de l'impact éventuel de ces polluants sur le milieu.

5. IMPLICATIONS PRATIQUES, RECOMMANDATIONS, REALISATIONS PRATIQUES, VALORISATION

- Implications pratiques

La majorité des 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 montre 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, telle que développés dans le cadre d'ERICOR, doit être performée, normalisée. Ces outils marinisés, tropicalisés, permettront à moyen terme de disposer d'éléments pertinents pour la détermination de NQE « adaptées » au contexte tropical afin de pouvoir statuer sur le bon état des masses d'eaux côtières et récifales.

La majorité de ces bioessais peut être utilisée pour analyser la toxicité potentielle d'une eau de mer ou d'un effluent *in vitro*. De plus, une partie des tests développés pourrait être conduite *in situ* (comme le test *in situ*, sur le développement embryon-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.

PARTENARIATS MIS EN PLACE, PROJETS, ENVISAGES

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

Le programme ERICOR a permis le développement d'échanges, la mise en place de collaborations entre les quatre principaux laboratoires initiateurs du projet (ARVAM, IPL, Ifremer et Idhesa) complémentaires et spécialisés dans la recherche et la surveillance sur les contaminants dans l'environnement marin.

Au niveau de La Réunion, des structures spécialisées ont été associées à la démarche comme l'ARDA (Association Réunionnaise pour le Développement de l'Aquaculture) et l'Aquarium de La Réunion.

En projet, la construction du Pôle Régional Mer (PRM) doit réunir, l'ensemble des partenaires scientifiques du monde maritime à La Réunion : ARDA, ARVAM, laboratoire ECOMAR de l'Université, BRGM, IRD et Ifremer. Ce projet de mutualisation de moyens et de compétences, nous permettra de disposer d'installations humides ambitieuses pour le développement de la plupart des bioessais dans la perspective d'une mise en œuvre à haut débit.

POUR EN SAVOIR PLUS (QUELQUES REFERENCES) MISES EN ORDRE ALPHABETIQUE

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 embryo-larvaire de bivalve – T90-382.

AFNOR, T90-307 Juin 1985. Essais des eaux - Détermination de la toxicité aigüe d'une substance vis-à-vis de *Dicentrarchus labrax* - Méthode sans renouvellement du milieu. T90-307.

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.

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.

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.

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

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

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

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

Turquet J., Quiniou F., Stachowski-Haberkorn S., Delesmont R., Delesmont E. et Durand G., 2010. Evaluation du risque pesticides pour les récifs coralliens de La Réunion (ERICOR). Présentation des résultats : Rapport scientifique. 114 p + annexes.

LISTE DES OPERATIONS DE VALORISATION ISSUES DU CONTRAT (ARTICLES DE VALORISATION, PARTICIPATIONS A DES COLLOQUES, ENSEIGNEMENT ET FORMATION, COMMUNICATION, EXPERTISES...)

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES	
Publications scientifiques parues	
Publications scientifiques à paraître	
Publications scientifiques prévues	Deux publications sont prévues d'ici mi-2011 : <ul style="list-style-type: none"> • une spécifique au bioessai embryon de poisson ; • une globale avec tous les résultats du programme.
	COLLOQUES
Participations passées à des colloques	Communication au Colloque du programme «Évaluation et Réduction des Risques liés à l'Utilisation des Pesticides» <i>Pesticides et Environnement : De la connaissance à l'action.</i> Reims 2007.
	Communication au séminaire mi parcours du programme « Évaluation et Réduction des Risques liés à l'Utilisation des Pesticides ». Paris 2009.
	Poster au colloque LITEAU. Montpellier 2009.
	Poster au XXXIX ^{ème} congrès du Groupe Français des Pesticides, Toulouse 2009.
	Poster au congrès de la WIOMSA, Sainte-Clotilde 2009.
	Communication au séminaire « pesticides dans l'environnement marin à La Réunion », groupe régional Réunion Phytosanitaires. Saint-Denis 2010.
Participations futures à des colloques	
	THESES
Thèses passées	
Thèses en cours	
	ARTICLES DE VALORISATION-VULGARISATION
Articles de valorisation parus	
Articles de valorisation à paraître	
Articles de valorisation prévus	
	AUTRES ACTIONS VERS LES MEDIAS
Actions vers les médias (interviews...) effectuées	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.
Actions vers les médias prévues	

ENSEIGNEMENT - FORMATION

- Enseignements/formations dispensés
- Tutorat sur deux années universitaires d'un étudiant d'IUT en alternance (Romain DAVY) : formation au métier de technicien et aux bioessais (52007-2009) ;
 - Stage de L3 : trois mois en 2008, test oursin ;
 - « L'écotoxicologie », enseignement à l'ENTE de Valenciennes, février 2010 ;
 - « L'écotoxicité, les biomarqueurs et l'évaluation des risques – exemples en milieu marin. » Formation continue de l'EHESP, 07 novembre 2008.
 - 2 Stages de M1, et 3 stages de technicien supérieur de la mer

Enseignements/formations prévus

EXPERTISES

Expertises menées
Expertises en cours
Expertises prévues

Tester l'ensemble des rejets de STEP à La Réunion

METHODOLOGIES (GUIDES...)

méthodologies produites

- Adaptation de protocoles appliqués à des espèces tempérées, sur les espèces tropicales
- Mise au point d'un protocole sur micro boutures de corail

méthodologies en cours d'élaboration

Adaptation du bioessai sur juvéniles de poisson aux embryons vésiculés.

méthodologies prévues

Participation à l'intercalibration d'un protocole de bio essai proposé en normalisation à l'Afnor (prévu en 2011)

AUTRES

Précisez...

RESUMES

En français

RESUME

½ à 1 page

Les produits phytosanitaires sont employés de façon courante (et en quantité croissante) à La Réunion depuis ces dernières années. La question du risque environnemental lié à l'utilisation de pesticides doit être analysée de façon globale dans un contexte plus ample d'usages multiples de phytosanitaires sur la durée, et dans un contexte d'environnement tropical et insulaire. Les dangers de ces molécules pour l'environnement marin et *a fortiori* récifal (à forte sensibilité écologique) sont sous documentés, voire méconnus ; quant aux expositions, elles sont quasi totalement inconnues. 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 implique plusieurs démarches complémentaires :

- 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 est en cours. Les premiers résultats des niveaux de contamination sont disponibles depuis fin 2007, notamment grâce aux programmes de surveillance ;
- les évaluations du degré de pollusensibilité des organismes dominants, et/ou d'importance écologique pour l'écosystème récifal. Ces évaluations reposent sur l'adaptation de bioessais d'écotoxicité aux espèces spécifiques des récifs coralliens. Le présent projet porte essentiellement sur ce point.

Les bio-essais sur quatre groupes d'organismes ont été mis au point : (i) phytoplancton (diatomée benthique et zooxanthelle en culture), (ii) corail (micro-boutures maintenues *in vitro*), (iii) échinoderme (embryotoxicité) et (iv) vertébré (bioessais sur embryons vésiculés de poisson). Les deux autres groupes, mollusque (embryotoxicité) et crustacé (copépode) n'ont pas été développés sur modèle tropical. Leur mise en œuvre sur des organismes tempérés nous ont permis de compléter l'analyse du danger des substances actives testées.

Six pesticides de mode d'action différents ont été retenus et testés sur les bioessais « tropicaux » et « tempérés » : carbendazime, diuron, glyphosate, carbofuran, deltaméthrine et S-métolachlore.

MOTS CLES

Pesticides, écotoxicité, récif corallien, coraux, bio essais, pollusensibilité.

In English

ABSTRACT

½-1 page

Pesticides are currently used (and in growing quantities) in Reunion Island since many years. Environmental risk linked to use of pesticides should be analysed in a global approach of multiple uses and in the insular/tropical context. Threats to the marine environment and more specifically to coral reefs (of high ecological sensitivity) are largely underreported or unknown. Potential impacts of these molecules make it urgent to estimate qualitatively and quantitatively the risks encountered by coral reefs and coastal zones of tropical islands.

This implies cross activities to be implemented. Monitoring the reefal environment response, through integrated analysis of existing compartments (water, sediments, organisms), to pesticides are actually on course. First results should be available for the end of 2007

The present project aims to estimate the level of pollutantsensitivity of dominating and/or ecologically important reef organisms. Activities to be developed concerns adaptation of ecotoxicity bioassays to specific species from coral reefs. As this project is strongly linked to other tasks actually set up such as monitoring networks, it will allow decision makers, stakeholders to estimate more clearly the danger, exposure and risk analyse of herbicides and pesticides for coral (and non coral) habitats.

Key words: marine environment, ecotoxicity, pesticides, formulations, bacteria, phytoplankton, crustacean, mollusc bivalve, urchins, fish, corals.