



TOPHYPAC :

Tolérance des communautés phytoplanctoniques aux phytosanitaires dans le panache de la Charente

Phytoplankton community tolerance to pesticides in the Charente river estuary

Rapport final d'activités : rapport de synthèse
17 juillet 2014

Sabine Stachowski-Haberkorn, Stéphane Guesdon et Christian Béchemin,
coordinateurs IFREMER

N° de contrat Ministère : 10-MBGD-PESTICIDES-2-CVS-026

Date du contrat : 18 novembre 2010



Sommaire :

Résumé.....	4
Abstract	5
Rapport de synthèse : français.....	6
1. Contexte général.....	6
2. Objectifs généraux du projet	6
3. Quelques éléments de méthodologie	6
4. Résultats obtenus.....	7
5. Implications pratiques, recommandations, réalisations pratiques, valorisation	8
5.1. Implications pratiques : sans objet	8
5.2. Recommandations et limites éventuelles	8
5.3. Réalisations pratiques et valorisation : sans objet.....	8
6. Partenariats mis en place, projetés, envisagés	9
7. Pour en savoir plus	9
8. Valorisation	10
Synthetic report : english.....	11
9. General context.....	11
10. Main objectives of the project.....	11
11. Methods	11
12. Main results	12
13. Recommendations and limits	13
14. Consortium	13
15. To learn more	14
16. Valorisation	14

Résumé

TOPHYPAC est une étude sur l'estuaire de la Charente (bassin de Marennes-Oléron). L'objectif général du projet était d'évaluer l'impact éventuel de la contamination chimique par le cuivre et les pesticides sur les communautés phytoplanctoniques. Un suivi environnemental comportant des paramètres physiques, chimiques tels que les nutriments, métaux et pesticides, et biologiques (phytoplancton) a été réalisé de 2011 à 2014 ; ce suivi a été couplé, en 2012 et 2013, à une approche expérimentale sur les communautés de phytoplancton transplantées en laboratoire et exposées au cuivre et à deux mélanges d'herbicides. Les effets des contaminants testés ont été recherchés sur la photosynthèse et les abondances du phytoplancton.

Le projet TOPHYPAC a permis de dresser un état des lieux de la contamination de l'estuaire par les pesticides : les analyses ont révélé une présence quasiment permanente des herbicides glyphosate (et son métabolite l'AMPA) et métolachlore au niveau de la station la plus en amont (Fort Lupin) du site d'étude. Les concentrations les plus importantes sont retrouvées dans la première partie de l'année. La période de printemps et début d'été est également celle où d'autres herbicides sont présents dans l'environnement tels que : diméthénamide, acétochlore, bentazone, mésotrione, métamitron.

L'évolution du phytoplancton dans son milieu naturel a été analysée de manière globale mais aussi sur des sous-groupes : micro-phytoplancton, nano-phytoplancton, pico-phytoplancton et les cyanobactéries *Synechococcus* sp. L'influence prépondérante de la température, liée à la saisonnalité, a été démontrée sur l'abondance globale de la communauté ; cependant des paramètres tels que la salinité ou la turbidité, ainsi que le rayonnement, influencent aussi notablement les différents sous-groupes. Le modèle utilisé a mis en évidence une période pendant laquelle les *Synechococcus* sp. étaient anormalement peu abondants, au printemps 2012. La survenue concomitante d'une importante dessalure accompagnée de pesticides ne semble pas être en cause, mais pourrait constituer un facteur fragilisant les communautés.

Au niveau expérimental, les expositions des communautés au cuivre ont montré une sensibilité plus importante de celles-ci en 2012 : en particulier, une sensibilité très marquée des *Synechococcus* sp. au cuivre a été démontrée, avec des valeurs seuils d'effets parfois de l'ordre du $\mu\text{g.L}^{-1}$. Le mélange d'herbicides utilisé en 2012 (glyphosate, métolachlore et mésotrione) n'a conduit à aucun effet significatif aux concentrations testées sur les communautés, quelle que soit la période. En 2013, le mélange, quelque peu différent (glyphosate, S-métolachlore, diméthénamide et métamitron), a entraîné des effets significatifs modérés, uniquement sur la photosynthèse, et relativement stables au niveau spatial (stations) et temporel (saisons). Il semble que les essais réalisés du printemps à l'automne au cours de deux années consécutives ne permettent pas de conclure à une sensibilité particulière du phytoplancton aux concentrations environnementales des herbicides testés.

Mots clés : continuum eau douce/eau côtière, pesticides, métaux, communautés phytoplanctoniques, efficacité de photosynthèse, PICT, tolérance, cytométrie en flux, toxicité chronique

Abstract

TOPHYPAC is a field study that was conducted in the Charente river estuary (Marennes-Oléron bay). The main goal was to assess the possible impact of chemical contamination with copper and pesticides on phytoplankton communities. Physical, chemical (nutrients, metals and pesticides) and biological (phytoplankton community) parameters were monitored in the field during three years, from 2011 to 2014. In 2012 and 2013, field sampling was coupled with experimental exposure of phytoplankton communities to copper and to an herbicide cocktail, after transportation to the lab: the effects were assessed using photosynthesis endpoint and cellular densities.

TOPHYPAC allowed to set the framework of Charente estuary contamination with pesticides: herbicides glyphosate (and its metabolite AMPA) and metolachlor were almost permanently found at the most upstream station (Fort Lupin) from the studied area. The most elevated concentrations were noticed during the first part of each year. Samples from spring and early summer also exhibited other herbicide substances: dimethenamid, acetochlor, bentazon, mesotrion, metamitron.

Phytoplankton evolution in the natural environment was studied as a whole but also on the following community subsets: micro-phytoplankton, nano-phytoplankton, pico-phytoplankton and cyanobacteria *Synechococcus* sp.. The most influent driver on the whole phytoplankton community abundance was shown to be temperature, related to seasons; however other variables such as salinity, turbidity and solar radiation were also significant drivers for the community subsets. The analysis model used highlighted an abnormal low abundance period for *Synechococcus* sp. during spring 2012. At the same time, a massive freshwater discharge that brought pesticides was also noticed: this event was not identified as responsible for this drop, but it could weaken the communities.

The experimental part of the study showed a marked sensitivity of phytoplankton communities that were exposed to copper during the year 2012: especially, *Synechococcus* sp. were shown to be impacted by copper, at concentrations at the $\mu\text{g.L}^{-1}$ level. The herbicide cocktail used during the year 2012 (glyphosate, metolachlor and mesotrion) induced no significant effect on phytoplankton communities, whatever the concentration tested and the season. During the year 2013, the modified cocktail (glyphosate, S-metolachlor, dimethenamid and metamitron) led to significant but slight effects on photosynthesis with no variation related to stations or seasons. Tests run from spring to autumn during two years did not demonstrate phytoplankton sensitivity towards the tested herbicides at environmental relevant concentrations.

Keywords: freshwater/coastal water continuum, pesticides, metals, phytoplankton communities, photosynthesis efficiency, PICT, tolerance, flow cytometry, chronic toxicity

Rapport de synthèse : français

1. Contexte général

Le bassin versant de la Charente, d'une surface d'environ 10 000 km², est caractérisé par une importante activité agricole avec une Surface Agricole Utile qui représente plus de 75% de sa surface (Agreste, recensement agricole 2010). Cette activité peut nécessiter l'emploi de phytosanitaires de différentes natures (organiques de synthèse, minéraux). Une fois épandues, les substances utilisées pour les usages agricoles et non-agricoles peuvent se retrouver dans les écosystèmes aquatiques *via* le transfert atmosphérique, les précipitations et les phénomènes de ruissellement et de lessivage des sols. Le réceptacle final des eaux de la Charente est constitué par la partie nord du bassin de Marennes-Oléron, qui est le bassin conchylicole le plus important de France et d'Europe. Cette forte productivité est notamment permise grâce à la présence d'une ressource trophique suffisamment abondante et de bonne qualité, constituée pour partie par le phytoplancton. Le phytoplancton joue un rôle fondamental dans les écosystèmes aquatiques puisqu'il assimile le dioxyde de carbone atmosphérique et se trouve ainsi à la base des réseaux trophiques aquatiques : grâce à sa fonction de producteur primaire, il soutient le développement des consommateurs tels que les bivalves. De par sa physiologie proche de celle des végétaux, le phytoplancton peut être impacté par certains herbicides. De plus, les communautés de micro-algues peuvent développer, en cas d'exposition chronique, une forme de tolérance à ces polluants. Dans ce contexte, la question de l'impact des pesticides sur le phytoplancton au niveau de l'estuaire de la Charente a été posée. La contamination chimique par les pesticides, supposée chronique au niveau de l'estuaire de la Charente, et les enjeux économiques, sociétaux et scientifiques qui en découlent ont conduit à la construction du projet TOPHYPAC.

2. Objectifs généraux du projet

L'objectif général du projet TOPHYPAC était d'évaluer, dans le panache de la Charente, l'impact éventuel de la contamination chimique, en particulier les pesticides, sur les communautés phytoplanctoniques. Afin de remplir cet objectif, le projet a été réalisé en deux phases : la première a consisté en une analyse environnementale du site d'étude conduisant à des essais expérimentaux sur les communautés naturelles transplantées en laboratoire (deuxième phase).

3. Quelques éléments de méthodologie

Les échantillonnages ont été réalisés toutes les deux semaines au niveau de quatre stations dans l'estuaire de la Charente, dont deux stations fixes et deux stations mobiles définies à chaque sortie en fonction du gradient de salinité : l'objectif était d'obtenir un gradient le plus équilibré possible entre les quatre stations étudiées. Les campagnes ont été réalisées avec un départ à la station 1 (station la plus amont, point d'entrée de la Charente dans le bassin) à basse-mer, en privilégiant des coefficients de marée moyens compris entre 45 et 95.

Lors de chaque campagne, des mesures *in situ* ont été réalisées à l'aide de sondes multi-paramètres : température, salinité, oxygène dissous, pH, turbidité. Des prélèvements d'eau ont été effectués pour les différentes analyses : sels nutritifs, carbone organique dissous, azote total, chlorophylle a, métaux, pesticides, phytoplancton. Des prélèvements supplémentaires ont été ajoutés pour les expérimentations en laboratoire sur les communautés de phytoplancton. Deux types d'analyses ont permis d'étudier la structure des communautés phytoplanctoniques : des analyses au microscope permettant de déterminer les abondances et espèces du micro-phytoplancton (cellules de grande taille) et des analyses par cytométrie en flux pour les abondances du pico-, nano-phytoplancton et des bactéries photosynthétiques du genre *Synechococcus* sp..

Les expérimentations en laboratoire ont été réalisées afin d'évaluer l'éventuelle tolérance des communautés phytoplanctoniques à certains contaminants présents dans leur milieu : compte-tenu de son action directe sur la photosynthèse, de son utilisation en tant que fongicide et algicide, et de sa présence dans le milieu, le cuivre a été choisi comme toxique de référence. Les communautés phytoplanctoniques ont été également exposées à deux mélanges d'herbicides correspondant aux molécules retrouvées dans le milieu (glyphosate, métolachlore

et mésotrione en 2012 ; glyphosate, S-métolachlore, diméthénamide et métamitron en 2013). Au cours de chaque expérimentation, chacune des communautés provenant des stations 2, 3 et 4 a été exposée d'une part au cuivre, à des concentrations de $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ à 20mg.L^{-1} ; d'autre part au mélange d'herbicides, à des concentrations de $0.1 \mu\text{g.L}^{-1}$ à $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ en concentrations unitaires. Après 2 h d'exposition aux contaminants en conditions contrôlées (lumière artificielle ; température identique à celle de l'environnement), les effets ont été évalués sur la photosynthèse, sur les abondances et sur le contenu relatif en chlorophylle. Les résultats obtenus ont permis de déterminer les concentrations en cuivre et en herbicides responsables d'une diminution de 10 % de chacun des paramètres considérés (CE_{10}).

4. Résultats obtenus

Le projet TOPHYPAC a totalisé 69 campagnes de prélèvements réalisées entre le 9 février 2011 et le 30 janvier 2014 : 24 en 2011, 22 en 2012, 21 en 2013 et deux en 2014. 27 expérimentations sur les communautés de phytoplancton ont été réalisées en laboratoire : 13 en 2012 et 14 en 2013, réparties principalement sur les saisons de printemps, été et début d'automne.

Cette étude environnementale de grande ampleur constitue une approche unique au niveau estuarien, tant par le suivi réalisé que par les expérimentations effectuées sur les communautés phytoplanctoniques. La fréquence du suivi a permis de dresser un cadre relativement précis des variations environnementales i) physico-chimiques, intégrant les nutriments et la contamination par les pesticides et les métaux, et ii) biologiques, tenant compte de l'ensemble de la communauté phytoplanctonique.

La partie environnementale de l'étude réalisée sur les trois années 2011, 2012 et 2013 fait ressortir un contexte hydro-climatique contrasté avec une première année marquée par un important déficit d'apport en eau douce au printemps, les deux années suivantes étant caractérisées par de fortes dessalures au premier semestre. Les analyses des pesticides ont révélé, aussi bien en contexte de fort ou de faible apport en eau douce, une concomitance des pics de concentrations en phytosanitaires avec les dessalures, mais uniquement de février à juillet. Ces pics atteignent au maximum entre 0.5 et $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ en concentrations cumulées. Les molécules retrouvées systématiquement lors de cette fenêtre au cours des trois années sont les herbicides glyphosate et métolachlore. D'autres molécules ont été mesurées plus ponctuellement et semblent résulter de changements dans les pratiques agricoles selon les années (mésotrione, diméthénamide, métamitron, acétochlore, bentazone, chlortoluron, isoproturon). Malgré la variété de molécules mesurées ou détectées dans le milieu, l'estuaire de la Charente ne semble pas fortement exposé aux phytosanitaires : à titre d'exemple, sur les trois années de suivi, les concentrations cumulées ont dépassé à trois reprises la valeur de $0.5 \mu\text{g.L}^{-1}$, qui est le seuil maximal à ne pas dépasser dans les eaux potables. Les valeurs de cuivre dissous mesurées au cours de cette étude sont comprises entre 0.31 (aval) et $1.32 \mu\text{g.L}^{-1}$ (amont), ce qui correspond à des valeurs moyennes par rapport à d'autres estuaires (Chiffolleau et al., 2001).

Le développement et les successions des communautés de phytoplancton sont conditionnés par les facteurs environnementaux comme la température, le rayonnement solaire et les nutriments : chacune des sous-communautés (micro-, nano-, pico-phytoplancton et les bactéries du genre *Synechococcus* sp.) est sous l'influence d'une multitude de variables aux contributions inégales, tant au niveau spatial (gradient amont/aval) que temporel (saisonnalité). Un modèle d'analyse a été utilisé afin d'identifier les variables contribuant significativement à la dynamique de chaque sous-communauté : l'analyse effectuée sur les *Synechococcus* sp. a permis de mettre en évidence une période au printemps 2012, durant laquelle les abondances de ce genre étaient très faibles alors que celui-ci est habituellement présent tout au long de l'année. La survenue d'une dessalure accompagnée d'un pic de pesticides à cette période (glyphosate, métolachlore, acétochlore et diméthénamide) a été identifiée sans toutefois expliquer les observations. Il est même peu probable qu'un lien existe entre les deux événements : en effet les expérimentations sur les communautés de phytoplancton réalisées en 2012 n'ont montré aucun effet du mélange d'herbicides (glyphosate, métolachlore et mésotrione) sur les *Synechococcus* sp.. Même lorsque le mélange testé en 2013 a induit des effets significatifs, la composante *Synechococcus* sp. n'était pas touchée (abondance et contenu relatif en chlorophylle). Cependant, à la même période, l'ensemble des communautés a exprimé une forte sensibilité au cuivre : il peut être supposé qu'un facteur environnemental aurait pu fragiliser les communautés, ce facteur pouvant être de différentes natures (autre type de contaminant chimique, agent biologique, conjonction de conditions défavorables).

La sensibilité des communautés ne semble pas modulée par les abondances des différents groupes, ni par la diversité du micro-phytoplancton, mais par d'autres facteurs environnementaux (physiques, chimiques) ou d'autres éléments non pris en compte dans cette étude (autres types de contaminants chimiques, interactions avec les prédateurs, les virus, etc.).

Compte-tenu des différents éléments discutés, il paraît hasardeux de conclure quant à une tolérance des communautés phytoplanctoniques aux phytosanitaires présents dans l'estuaire de la Charente. Deux hypothèses peuvent être formulées pour expliquer le peu d'effets mesurés suite à l'exposition aux herbicides :

- les molécules testées présentent une faible toxicité vis-à-vis du phytoplancton ;
- les communautés pourraient être tolérantes à ces molécules tout au long du gradient estuarien et ne pas réagir fortement à une sur-exposition.

La combinaison des mesures de photosynthèse avec la cytométrie en flux a permis de détecter des effets du cuivre sur les différentes sous-communautés : ainsi, il ressort que les mesures de photosynthèse semblent refléter principalement la réponse du micro-phytoplancton. Les mesures réalisées par cytométrie en flux ont quant à elles mis en évidence une sensibilité importante des communautés de petites cellules au cuivre, soulignant l'intérêt et la pertinence de cette technique pour compléter l'acquisition de résultats dans le cadre d'expérimentations sur les communautés. Le travail réalisé démontre l'intérêt représenté par les petites communautés (pico-, nano-phytoplancton, bactéries du genre *Synechococcus* sp.) qui pourraient constituer des bio-indicateurs de certaines perturbations du milieu.

5. Implications pratiques, recommandations, réalisations pratiques, valorisation

5.1. Implications pratiques : sans objet

5.2. Recommandations et limites éventuelles

Les données produites par ce projet peuvent être intégrées dans la base nationale Quadrige² dédiée à la surveillance de l'environnement côtier, qui souffre du manque de données concernant la contamination chimique du milieu par les pesticides. Cette base commune à plusieurs structures de recherche, couvre l'ensemble du domaine côtier français et sert à la surveillance, la compréhension et la modélisation du fonctionnement des écosystèmes côtiers.

Diverses recommandations peuvent être émises avec une visée plus appliquée aux réseaux d'observation locaux et qui pourraient intéresser les structures telles que la Région Poitou-Charentes, la Section Régionale Conchylicole (SRC) de Poitou-Charentes, le Conseil Général de Charente-Maritime, et l'Agence de l'Eau Adour Garonne. Une proposition chiffrée visant à intégrer la surveillance des pesticides dans les réseaux actuels pourrait être formulée, en tenant compte des limites énoncées dans le rapport scientifique et comportant : une liste de molécules pertinentes à rechercher, les stratégies d'échantillonnages envisagées, les sites et périodes ciblés, enfin les coûts associés. De la même manière, un suivi des communautés phytoplanctoniques par cytométrie en flux pourrait être préconisé en différents points de l'estuaire et du bassin de Marennes-Oléron, afin de valider la notion d'indicateurs d'une perturbation du milieu en particulier pour les *Synechococcus* sp.. Ce suivi pourrait être ajouté aux procédures déjà en place dans le cadre de la surveillance actuelle (par exemple REPHY, DCE), pour venir renforcer la capacité de détection d'une période critique vis-à-vis de la ressource trophique. En cas de perturbation suspectée, une étape supplémentaire serait de tester la sensibilité accrue des organismes à une sur-exposition à la contamination chimique, par la mise en place de protocoles standardisés ciblés sur un contaminant modèle tel que le cuivre et dont le travail présenté ici pourrait servir de base.

5.3. Réalisations pratiques et valorisation : sans objet

6. Partenariats mis en place, projetés, envisagés

Partenariats mis en place dans le cadre de ce projet :

<p>Partenaire 1 : coordinateur du projet Laboratoire Environnement Ressources des Pertuis Charentais (LER/PC) Responsable : Christian Béchemin Tél : 05 46 50 06 34 E-mail : christian.bechemin@ifremer.fr</p> <p>Ifremer (rattaché au Centre de Nantes) BP 7 - 17137 L'HOUMEAU Ifremer (rattaché au Centre de Nantes) Avenue de mus de Loup 17390 La Tremblade</p>	<p>Partenaire 2 : co-coordonateur Laboratoire d'écotoxicologie (LEX) Responsable scientifique : Sabine Stachowski Tél : 02 40 37 41 70 E-mail : Sabine.Stachowski.Haberkorn@ifremer.fr Ifremer Centre de Nantes rue de l'île d'Yeu BP 21105 44311 Nantes cedex 03</p>
<p>Partenaire 3 : Laboratoire de Biogéochimie des Contaminants Métalliques (LBCM) Responsable scientifique : Jean-François Chiffolleau Tél : 02 40 37 41 77 E-mail : Jean.Francois.Chiffolleau@ifremer.fr Ifremer Centre de Nantes rue de l'île d'Yeu BP 21105 44311 Nantes cedex 03</p>	<p>Partenaire 4 : Laboratoire des sciences de l'environnement marin (LEMAR) UMR 6539 Responsable scientifique : Philippe Soudant Tél : 02 98 49 86 23 E-mail : Philippe.Soudant@univ-brest.fr Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM) Place Nicolas Copernic 29280 Plouzané</p>
<p>Partenaire 5 : Laboratoire d'Études Environnementales des Systèmes Anthropisés, équipe Analyse et Modèle (LEESA/EQAM) Responsable scientifique : Alain Jadas-Hécart Tél : 02 41 73 53 73 ou 02 41 48 75 70 E-mail : alain.jadas-hecart@univ-angers.fr Université d'Angers 2 boulevard Lavoisier 49045 Angers</p>	

7. Pour en savoir plus

- Bérard, A., Pelte, T., 1999. Les herbicides inhibiteurs du photosystème II (PSII), effets sur les communautés algales et leur dynamique. Synthèse bibliographique. *Revue des Sciences de l'Eau* 12, 333–361.
- Blanck, H., 2002. A Critical Review of Procedures and Approaches Used for Assessing Pollution-Induced Community Tolerance (PICT) in Biotic Communities. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 8, 1003–1034.
- Chiffolleau, J.-F., Claisse, D., Cossa, D., Fitch, A., Gonzalez, J.-L., Guyot, T., Michel, P., Miramand, P., Oger, C., Petit, F., 2001b. La contamination métallique, Rapport du Programme Scientifique Seine aval, Ifremer, 39 pp.
- Debelius, B., Forja, J.M., DelValls, T.A., Lubián, L.M., 2009. Toxicity of copper in natural marine picoplankton populations. *Ecotoxicology*, 18, 1095–1103.
- Domingues, R.B., Anselmo, T.P., Barbosa, A.B., Sommer, U., Galvão, H.M., 2011. Light as a driver of phytoplankton growth and production in the freshwater tidal zone of a turbid estuary. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 91, 526–535.
- Gustavson, K., Wängberg, S.L., 1995. Tolerance induction and succession in microalgae communities exposed to copper and atrazine. *Aquatic Toxicology*, 32, 283–302.

8. Valorisation

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES	
Publications scientifiques parues	
Publications scientifiques à paraître	
Publications scientifiques prévues	<p>Un article traitera de la contamination chimique de l'estuaire « Charente estuary contamination with pesticides and metals : a 3-year survey ». Il pourra être soumis à la revue Marine pollution bulletin par exemple.</p> <p>Un deuxième article sera soumis à la revue Environmental Science and Pollution Research en décembre 2014 dans le cadre d'un numéro spécial « écotoxicologie microbienne » suite à la présentation des résultats de TOPHYPAC au cours des Journées d'écotoxicologie microbienne à Banyuls-sur-mer en mai 2014 : il portera sur l'évolution des communautés phytoplanctoniques dans l'estuaire de la Charente.</p> <p>Un troisième article sera soumis à la revue Aquatic toxicology et portera sur les expérimentations sur communautés naturelles exposées au cuivre et aux herbicides.</p>
COLLOQUES	
Participations passées à des colloques	<p>Colloque écotoxicologie microbienne, Banyuls sur mer, 2014</p> <p>Colloque Ecobim, Reims 2012</p> <p>Colloque Pesticides, Dijon 2012</p> <p>Séminaire Pesticides, LabEX COTE, Bordeaux 2012</p> <p>Colloque Pesticides, Tours 2011</p>
Participations futures à des colloques	non défini
THESES : SANS OBJET	
ARTICLES DE VALORISATION-VULGARISATION : SANS OBJET	
AUTRES ACTIONS VERS LES MEDIAS : SANS OBJET	
ENSEIGNEMENT - FORMATION	
Enseignements/formations dispensés	<p>Deux stages de Master 2 : Nathalie Coquillé en 2012 (sciences de la mer et du littoral, mention sciences biologiques marines) et Stéphane Guesdon en 2014 (Ecologie et Dynamique des Littoraux et Estuaires)</p> <p>Un stage Intechmer (Technicien supérieur de la mer) : Célia Khélifi en 2011</p> <p>Un contrat d'apprentissage (DUT Génie biologique) : Alexandra Duchemin de 2011 à 2013</p>
Enseignements/formations prévus	
EXPERTISES : SANS OBJET	
METHODOLOGIES (GUIDES...) : SANS OBJET	
AUTRES	
PRESENTATIONS A DES INSTANCES PROFESSIONNELLES OU DE DECISION	Présentation du projet à la Région Poitou-Charentes : C. Béchemin, mars 2012

Synthetic report : english

9. General context

The Charente catchment basin, that covers about 10 000 km², is characterized by important agricultural activities (75 % of its surface, Agreste, recensement agricole 2010). Such activities can induce the use of different kind of pesticides (organic, mineral). Substances spread for agricultural or non-agricultural uses can reach aquatic systems via spray-drift, rainfall and runoff. The final receptacle of Charente waters is the north part of Marennes-Oléron bay, the most important shellfish basin in France and Europe. This high productivity is allowed by a sufficient trophic resource in quantity and quality, that is in part represented by phytoplankton. Phytoplankton play a key role in aquatic ecosystems, metabolising carbon dioxide from atmosphere, making them the basis of aquatic food webs. As primary producers, they sustain the development of primary consumers such as bivalves. Due to their physiological homologies with plants, phytoplankton are potentially vulnerable to herbicides. In addition, micro-algae communities can exhibit some tolerance to this pollutants after chronic exposure. In this context, the question of pesticide impacts on phytoplankton in the Charente estuary was raised. The supposed chronic contamination of the Charente estuary with pesticides, as well as economic, social and scientific arising issues have led to the setting up of the TOPHYPAC project.

10. Main objectives of the project

The main objective of the TOPHYPAC project was to assess, in the Charente estuary, the possible impact of chemical contamination with pesticides on phytoplankton communities. To that aim, the project was completed in two steps: the first one consisted in an environmental analysis of the studied site. During the second step, exposures of phytoplankton communities to chemicals were performed at the laboratory.

11. Methods

Sampling was performed every two weeks at four stations in the Charente estuary. Two stations were fixed sites, the two other were mobile sites that were defined each time, depending on salinity. The aim was to obtain an homogeneous gradient between the stations. The sampling campaigns began at station 1 (the most upstream, corresponding to the entrance of Charente river into the bay) at low-tide, with tidal coefficient between 45 et 95.

During each campaign, *in situ* measurements were performed using multi-parameter probes for temperature, salinity, dissolved oxygen, pH, turbidity. Water samples were taken for analyses: nutrients, dissolved organic carbon, total nitrogen, chlorophyll *a*, metals, pesticides, phytoplankton. Supplementary samples were taken for exposure experiments of phytoplankton communities in the lab. Two kind of analyses were performed to study phytoplankton community structure: microscope analyses to determine abundances and species of micro-phytoplankton (large cells) and flow cytometry analyses for abundances of pico-, nano-phytoplankton and photosynthetic bacteria of genus *Synechococcus* sp..

Laboratory experiments were run in order to assess the possible tolerance of phytoplankton communities to chemicals of their environment: copper was used as reference toxicant, as it acts directly on photosynthesis, and it is used as a fungicide and an algicide, and also present in the Charente estuary. Phytoplankton were also exposed to two herbicide cocktails composed of molecules that were measured in the environment (glyphosate, metolachlor and mesotrion in 2012 ; glyphosate, S-metolachlor, dimethenamid and metamitron in 2013). During each experiment, each community from stations 2, 3 and 4 was exposed independently to both copper (at concentrations ranging from 1 µg.L⁻¹ to 20 mg.L⁻¹) and herbicide cocktail (concentrations ranging from 0.1 µg.L⁻¹ to 100 µg.L⁻¹, individual concentrations). After a two-hour exposure under controlled conditions (artificial light, same temperature than the environment), effects were measured on photosynthesis, abundances and relative chlorophyll content. The results were used in order to calculate, whenever possible, the effective concentrations that induced a 10 % drop of the parameter considered (EC₁₀).

12. Main results

A number of 69 sampling campaigns was performed during the TOPHYPAC project, from the 9th of February, 2011 until the 30th of January, 2014: 24 during 2012, 21 during 2013 and two in 2014. 27 experimentations on phytoplankton communities were run at the laboratory: 13 during 2012 and 14 during 2013, mostly between spring and early fall.

This huge environmental study is unique at the estuary level, including the monitoring as well as experiments conducted on phytoplankton communities. The frequency of the monitoring allowed to set quite precisely the environment variations i) on physical and chemical parameters, like nutrients, pesticides and metals; ii) on biological parameters such as the entire phytoplankton community.

The environmental part of the study was performed during the three years 2011, 2012 and 2013 and showed contrasting hydrologic and climatic context: the first year showed a lack of freshwater discharge during spring whereas the two following years exhibited high freshwater discharge during the first part of the year. In both contexts, pesticide analyses revealed simultaneity of peaks of pesticide and freshwater discharges between February and July. These peaks reached between 0.5 and 1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (cumulated concentrations). The substances found during this period over the three years were the herbicides glyphosate and metolachlor. Other substances were also detected occasionally, probably resulting in changes of use, depending on the year (mesotrion, dimethenamid, metamitron, acetochlor, bentazon, chlortoluron, isoproturon). Despite the various substances measured or detected in the field, the Charente estuary does not seem highly exposed to pesticides: for example, over the three years the cumulated concentrations went only three times over the threshold maximal concentration of 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ allowed in drinking waters. Dissolved copper concentrations measured during this study ranged from 0.31 (downstream) to 1.32 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (upstream), quite similar to average values encountered in other estuaries (Chiffolleau et al., 2001).

The development and successions of phytoplankton communities are driven by environmental parameters like temperature, solar radiation and nutrients: each of the community subsets (micro-, nano-, pico-phytoplankton and bacteria from genus *Synechococcus* sp.) is influenced by several variables with unequal contributions, at the space (upstream/downstream gradient) and time (seasons) levels. An analysis model was used to identify the significant variables that explain the community subset dynamic: the model highlighted a critical period for *Synechococcus* sp. during spring 2012, with very low abundances contrary to the rest of the year. At the same time, a strong freshwater discharge occurred together with a pesticide peak (glyphosate, metolachlor, acetochlor et dimethenamid). However this event does not explain the observations. It is unlikely that both events could be linked: the experiments performed during this period showed no significant effect of the herbicide cocktail on *Synechococcus* sp.. Even when significant effects were induced on communities with the herbicide cocktail used during 2013, no effects were shown on *Synechococcus* sp.. In contrast, the whole community exhibited a high sensitivity towards copper at that time: an environmental factor of different origin could have weakened the communities (other chemical kind, biological agent, unfavorable conditions).

Community sensitivity does not appear to be modulated by the subset abundances, either by micro-phytoplankton diversity. It could rather be due to other environmental factors (physical or chemical), or variables not considered in this study (other chemical contaminants, predator interactions, viruses, etc.).

Given the different results obtained, it would be unwise to conclude about phytoplankton tolerance to pesticides in the Charente estuary. Two assumptions can be proposed to explain the weak effects induced by pesticides:

- the tested substances are not highly toxic to phytoplankton;
- communities could be tolerant to these substances all along the gradient, and so they would not show effects in case of overexposure.

The association of photosynthesis measurement with flow cytometry allowed to detect effects of copper on the different subsets of the phytoplankton community: the results tend to show that photosynthesis measurements seem to reflect mostly the response of micro-phytoplankton. Flow cytometry measurements highlighted a high sensitivity of small cell communities towards copper, demonstrating the relevance and interest of this technique to complete result acquisition during such experiments. The work performed during

this project shows the importance and interest of small cell communities (pico-, nano-phytoplankton, *Synechococcus* sp.) that could represent indicators of an environment disturbance.

13. Recommendations and limits

The data produced in this project could be included in the national database Quadrige² dedicated to coastal environment monitoring, that lacks information about contamination with pesticides. This database, common to several research institutions, covers the french coastal domain and is used for monitoring, understanding et modelling the coastal ecosystem functioning.

Several recommendations could be enunciated with an aim of application for local observation network, that could be of interest for Région Poitou-Charentes, Section Régionale Conchylicole (SRC) de Poitou-Charentes, Conseil Général de Charente-Maritime, and Agence de l'Eau Adour Garonne. A costed proposal could be formulated in order to include pesticide monitoring in current network, that should consider the limits detailed in the scientific report but also: a substance list with molecules relevant to look for, sampling strategies, sites and periods. In the Marennes-Oléron bay, a monitoring of phytoplankton communities could be proposed using flow cytometry, in order to validate the assumption of possible relevant bioindicators of environment disturbance, especially for *Synechococcus* sp.. This could be added to procedures already applied in monitoring programs such as REPHY or WFD, to strengthen the ability to detect a critical period for trophic resource. In such a case, a supplementary step could be to test the sensitivity of organisms towards an overexposure to chemicals: this could be done using standardised protocols targeting a model chemical like copper. To that aim, the present work could serve as a basis.

14. Consortium

<p>Partner 1 : coordinator Laboratoire Environnement Ressources des Pertuis Charentais (LER/PC) Scientific in charge: Christian Béchemin Tél : 05 46 50 06 34 E-mail : christian.bechemin@ifremer.fr</p> <p>Ifremer (rattaché au Centre de Nantes) BP 7 - 17137 L'HOUMEAU Ifremer (rattaché au Centre de Nantes) Avenue de mus de Loup 17390 La Tremblade</p>	<p>Partner 2 : co-coordinator Laboratoire d'écotoxicologie (LEX) Scientific in charge: Sabine Stachowski Tél : 02 40 37 41 70 E-mail : Sabine.Stachowski.Haberkorn@ifremer.fr Ifremer Centre de Nantes rue de l'île d'Yeu BP 21105 44311 Nantes cedex 03</p>
<p>Partner 3 : Laboratoire de Biogéochimie des Contaminants Métalliques (LBCM) Scientific in charge: Jean-François Chiffolleau Tél : 02 40 37 41 77 E-mail : Jean.Francois.Chiffolleau@ifremer.fr Ifremer Centre de Nantes rue de l'île d'Yeu BP 21105 44311 Nantes cedex 03</p>	<p>Partner 4 : Laboratoire des sciences de l'environnement marin (LEMAR) UMR 6539 Scientific in charge: Philippe Soudant Tél : 02 98 49 86 23 E-mail : Philippe.Soudant@univ-brest.fr Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM) Place Nicolas Copernic 29280 Plouzané</p>
<p>Partner 5 : Laboratoire d'Études Environnementales des Systèmes Anthropisés, équipe Analyse et Modèle (LEESA/EQAM) Scientific in charge: Alain Jadas-Hécart Tél : 02 41 73 53 73 ou 02 41 48 75 70 E-mail : alain.jadas-hecart@univ-angers.fr</p>	

Université d'Angers 2 boulevard Lavoisier 49045 Angers	
--	--

15. To learn more

- Bérard, A., Pelte, T., 1999. Les herbicides inhibiteurs du photosystème II (PSII), effets sur les communautés algales et leur dynamique. Synthèse bibliographique. *Revue des Sciences de l'Eau* 12, 333–361.
- Blanck, H., 2002. A Critical Review of Procedures and Approaches Used for Assessing Pollution-Induced Community Tolerance (PICT) in Biotic Communities. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 8, 1003–1034.
- Chiffolleau, J.-F., Claisse, D., Cossa, D., Fitch, A., Gonzalez, J.-L., Guyot, T., Michel, P., Miramand, P., Oger, C., Petit, F., 2001b. La contamination métallique, Rapport du Programme Scientifique Seine aval, Ifremer, 39 pp.
- Debelius, B., Forja, J.M., DelValls, T.A., Lubián, L.M., 2009. Toxicity of copper in natural marine picoplankton populations. *Ecotoxicology*, 18, 1095–1103.
- Domingues, R.B., Anselmo, T.P., Barbosa, A.B., Sommer, U., Galvão, H.M., 2011. Light as a driver of phytoplankton growth and production in the freshwater tidal zone of a turbid estuary. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 91, 526–535.
- Gustavson, K., Wängberg, S.L., 1995. Tolerance induction and succession in microalgae communities exposed to copper and atrazine. *Aquatic Toxicology*, 32, 283–302.

16. Valorisation

SCIENTIFIC PUBLICATIONS	
Published Scientific articles	
Scientific articles to be published	
Planned Scientific articles	<p>One article « Charente estuary contamination with pesticides and metals : a 3-year survey » will be submitted to <i>Marine pollution bulletin</i>.</p> <p>A second article on phytoplankton evolution in the Charente estuary will be submitted to <i>Environmental Science and Pollution Research</i>.</p> <p>A third article will be submitted to <i>Aquatic toxicology</i> and will deal with exposure of phytoplankton communities to copper and herbicides.</p>
CONGRESS	
Participations to congress (past)	<p>écotoxicologie microbienne, Banyuls sur mer, 2014</p> <p>Ecobim, Reims 2012</p> <p>Pesticides, Dijon 2012</p> <p>Pesticides, LabEX COTE, Bordeaux 2012</p> <p>Pesticides, Tours 2011</p>
Participations to congress (future)	not defined yet
THESIS	
VALORISATION-VULGARISATION ARTICLES	
ACTIONS TO MÉDIAS	
TEACHING/TRAINING	
Teaching/training	<p>Deux stages de Master 2 : Nathalie Coquillé en 2012 (sciences de la mer et du littoral, mention sciences biologiques marines) et Stéphane Guesdon en 2014 (Ecologie et Dynamique des Littoraux et Estuaires)</p> <p>Un stage Intechmer (Technicien supérieur de la mer) : Célia Khélifi en 2011</p> <p>Un contrat d'apprentissage (DUT Génie biologique) : Alexandra Duchemin de 2011 à 2013</p>
EXPERTISES : SANS OBJET	
METHODOLOGIES	
OTHERS	

PRESENTATIONS TO PROFESSIONAL INSTANCES Presentation to Région Poitou-Charentes : C. Béchemin, march 2012