

71804

N340 - DUR - E



PROJET D'ETUDE INTERAGENCES
Agence d'exécution : LOIRE-BRETAGNE

**Effet des herbicides détectés dans les eaux de la baie de Morlaix
sur le phytoplancton marin toxique
pouvant contaminer les coquillages consommables.**

Rapport final : Février 2000

Gaël Durand
Pôle Analytique des Eaux

Geneviève Arzul
IFREMER – Brest

Christiane Videau
Université de Bretagne Occidentale

IFREMER Bibliothèque de BREST



OEL11062

PROJET D'ETUDE INTERAGENCES

Années 1997 - 1999

Axe 5 : Eau et Santé

N° 98.00.002

Agence d'exécution : LOIRE-BRETAGNE

Responsable d'étude : P. FERA

Effet des herbicides sur le développement des microalgues marines
toxiques

Pôle Analytique des Eaux
Technopôle Brest-Iroise
120 avenue Alexis de Rochon
BP 52
29 280 Plouzané

Coordinateur de l'étude : Gaël DURAND

Organismes participants :

IFREMER, Université de Bretagne Occidentale et Pôle Analytique des Eaux

Sommaire

Liste des figures	1
Liste des tableaux	3
Résumé	5
Introduction	9
1 – Présentation de l'étude.....	11
2 –Contexte en baie de Morlaix.....	13
3 –Suivi des pesticides en baie de Morlaix	15
3.1- Localisation des prélèvements	15
3.2- Résultats des analyses	21
3.3- Influence de la pluviométrie	32
3.4- Conclusion	39
4 – Effet des herbicides sur la croissance <i>in vitro</i> d' <i>Alexandrium minutum</i>.....	40
4.1- Objectif :	40
4.2- Matériel et méthodes.....	40
4.3- Résultats et discussion	42
4.3.1- Biomasse chlorophyllienne.....	42
4.3.2- Comptages cellulaires	49
4.3.3- Taux de croissance μ^2	52
4.3.4- Taux de croissance spécifique μ	54
4.3.5- Analyses chimique	56
4.4- Conclusion	57
4.5- Références.....	58
5 –Etude du phytoplancton naturel.....	60
5.1- Protocole expérimental	60
5.1.1- Période printanière (année 1998) : Croissance des diatomées.....	60
5.1.2- Période estivale (année 1999) : Croissance d' <i>Alexandrium minutum</i>	61

5.2- Résultats	63
5.2.1- Situation printanière.....	63
5.2.1.1.- Apports de pesticides	63
5.2.1.2- Action des pesticides sur l'évolution des cultures.....	65
5.2.1.2.1- Biomasse chlorophyllienne.....	63
5.2.1.2.2- Production carbonée.....	65
5.2.1.2.3- Composition spécifique du phytoplancton.....	65
5.2.2 Situation pré-estivale.....	74
5.2.2.1- Bioessais en grand volume.....	74
5.2.2.1.1.- Apport des pesticides	74
5.2.2.1.2- Action des pesticides sur l'évolution des cultures.....	75
5.2.2.1.2.1. Biomasse chlorophyllienne	75
5.2.2.1.2.2- Production carbonée.....	78
5.2.2.1.2.3- Composition spécifique du phytoplancton.....	78
5.2.2.2.- Tests en petit volume	92
5.2.2.2.1- Biomasse chlorophyllienne.....	92
5.2.2.2.2- Composition spécifique	92
5.3- Conclusions.....	102
5.4- Références.....	105
Conclusion - Synthèse.....	106
Propositions prospectives.....	109
Annexe 1	111

Liste des figures

Figure 1 : Points de prélèvements	17
Figure 2 : Points de prélèvements zoom en Penzé.....	18
Figure 3 : Points de prélèvements zoom en rivière de Morlaix.....	19
Figure 4a : Concentrations de triazines en Penzé 1998.....	22
Figure 4b : Concentrations de triazines en Penzé 1999.....	23
Figure 5a : Concentrations de triazines en rivière de Morlaix 1998	24
Figure 5b : Concentrations de triazines en rivière de Morlaix 1999.....	25
Figure 6a : Concentrations de diuron et trifluraline en Penzé 1998.....	27
Figure 6b : Concentrations de diuron en Penzé 1999.....	28
Figure 7a : Concentrations de diuron et trifluraline en rivière de Morlaix 1998	29
Figure 7b : Concentrations de diuron en rivière de Morlaix 1999	30
Figure 8 : Concentrations de MCPA en Penzé et en rivière de Morlaix.....	31
Figure 9a : Pluviométrie à Toulivinen en 1998.....	33
Figure 9b : Pluviométrie à Pleyber Christ (Gendarmerie) en 1998.....	34
Figure 9c : Pluviométrie à Pleyber Christ (Particulier) en 1998	35
Figure 10a : Pluviométrie à Toulivinen en 1999.....	36
Figure 10b : Pluviométrie à Pleyber Christ (Particulier) en 1999.....	37
Figure 10c : Pluviométrie à Morlaix en 1999.....	38
Figure 11 : Effet de la trifluraline sur la croissance d' <i>Alexandrium minutum</i>	43
Figure 12 : Effet du 2,4 D sur la croissance d' <i>Alexandrium minutum</i>	43
Figure 13 : Effet de l'atrazine sur la croissance d' <i>Alexandrium minutum</i>	44
Figure 14 : Effet du diuron sur la croissance d' <i>Alexandrium minutum</i>	44
Figure 15 : Effet de l'alachlore sur la croissance d' <i>Alexandrium minutum</i>	45
Figure 16 : Effet du métolachlore sur la croissance d' <i>Alexandrium minutum</i>	45
Figure 17a : Croissance d' <i>A. minutum</i> dans un mélange d'herbicide : enrichissement maxi	46
Figure 17b : Croissance d' <i>A. minutum</i> dans un mélange d'herbicide : enrichissement mini.....	46
Figure 18a : Croissance de <i>C. gracile</i> dans un mélange d'herbicide : enrichissement maxi.....	47
Figure 18b : Croissance de <i>C. gracile</i> dans un mélange d'herbicide : enrichissement mini	47
Figure 19a : Croissance d' <i>H. akashiwo</i> dans un mélange d'herbicide : enrichissement maxi.....	47
Figure 19b : Croissance d' <i>H. akashiwo</i> dans un mélange d'herbicide : enrichissement mini	47
Figure 20a : Croissance de <i>G. mikimotoi</i> dans un mélange d'herbicide : enrichissement maxi...	48
Figure 20b : Croissance de <i>G. mikimotoi</i> dans un mélange d'herbicide : enrichissement mini ...	48
Figure 21 : <i>A. minutum</i> et trifluraline.....	49
Figure 22 : <i>A. minutum</i> et 2,4D	50
Figure 23 : <i>A. minutum</i> et atrazine	50
Figure 24 : <i>A. minutum</i> et diuron	50

Figure 25 : <i>A. minutum</i> et alachlor	51
Figure 26 : <i>A. minutum</i> et métolachlor	51
Figure 27 : Variations d' $\mu 2$ d' <i>A. minutum</i> en pourcentages, en fonction des différentes concentrations (ng/l) en herbicides.....	53
Figure 28 - Evolution de la chlorophylle <i>a</i> dans les différents milieux de culture en avril.	64
Figure 29 - Evolution de la production primaire dans les différents milieux de culture en avril.....	66
Figure 30 - Pourcentages par rapport au milieu témoin, des maxima de chlorophylle <i>a</i> (A) et de production carbonée (B) obtenus dans les milieux dopés.	67
Figure 31 - Pourcentages par rapport au témoin, des taux de croissance obtenus dans les milieux dopés pour les principales espèces de diatomées représentées en avril. ...	70
Figure 32 - Evolution de la chlorophylle <i>a</i> dans les milieux dopés en trifluraline, 2,4-D et alachlore en juin (bioessais en grand volume).	76
Figure 33 - Evolution de la chlorophylle <i>a</i> dans les milieux dopés en atrazine et diuron en juin (bioessais en grand volume).	77
Figure 34 - Pourcentages par rapport au milieu témoin, des maxima de chlorophylle <i>a</i> obtenus dans les milieux dopés en juin (bioessais en grand volume).	79
Figure 35 - Evolution de la production primaire dans les milieux dopés en trifluraline, 2,4-D et alachlore, en juin (bioessais en grand volume).	80
Figure 36 - Evolution de la production primaire dans les milieux dopés en atrazine et diuron en juin (bioessais en grand volume).....	81
Figure 37 - Pourcentages par rapport au milieu témoin, des maxima de production carbonée obtenus dans les milieux dopés, en juin (bioessais en grand volume)... ..	82
Figure 38 - Evolution des densités cellulaires des principales espèces phytoplanctoniques dénombrées en juin dans les milieux dopés en trifluraline (bioessais en grand volume).....	84
Figure 39 - Evolution des densités cellulaires des principales espèces phytoplanctoniques dénombrées en juin dans les milieux dopés en 2,4-D (bioessais en grand volume).....	85
Figure 40 - Evolution des densités cellulaires des principales espèces phytoplanctoniques dénombrées en juin dans les milieux dopés en alachlore (bioessais en grand volume).....	86
Figure 41 - Evolution des densités cellulaires des principales espèces phytoplanctoniques dénombrées en juin dans les milieux dopés en atrazine (bioessais en grand volume).....	87
Figure 42 - Evolution des densités cellulaires des principales espèces phytoplanctoniques dénombrées en juin dans les milieux dopés en diuron (bioessais en grand volume).....	88

Figure 43 - Pourcentages par rapport au témoin, des taux de croissance obtenus dans les milieux dopés pour les principales espèces phytoplanctoniques représentées en juin (bioessais en grand volume).....	89
Figure 44 - Evolution de la chlorophylle <i>a</i> dans les milieux dopés en trifluraline, 2,4-D et alachlore en juin (mini-tests).....	93
Figure 45 - Evolution de la chlorophylle <i>a</i> dans les milieux dopés en atrazine et diuron en juin (mini-tests).	94
Figure 46 - Evolution des densités cellulaires des deux principales espèces représentées en juin dans les mini-tests dans les milieux dopés en trifluraline et 2,4-D.	95
Figure 47 - Evolution des densités cellulaires des deux principales espèces représentées en juin dans les mini-tests dans les milieux dopés en alachlore et atrazine.	96
Figure 48 - Evolution des densités cellulaires des deux principales espèces représentées en juin dans les mini-tests dans les milieux dopés en diuron.....	97
Figure 49 - Pourcentage par rapport au milieu témoin, des maxima de chlorophylle et des taux de croissance des deux principales espèces obtenus dans les milieux dopés (mini-tests).	99
Figure 50 - Pourcentage par rapport au milieu témoin, des taux de croissance d' <i>Alexandrium minutum</i> et de <i>Nitzschia longissima</i> selon le taux de croissance initial des deux populations.	100

Liste des tableaux

Tableau 1 : Bassin versant de la Penzé – matières actives des herbicides épandus.....	13
Tableau 2 : Herbicides utilisés par les communes	14
Tableau 3 : Dates de prélèvements et paramètres physiques	20
Tableau 4 : Concentrations nutritive des cultures utilisées en bioessais : milieu riche.....	40
Tableau 5 : Concentrations en herbicides testées en bioessais.....	41
Tableau 6 : Concentrations en herbicides ajoutés simultanément dans les bioessais pour les tests de synergie.....	41
Tableau 7 : Composition des cultures utilisées en bioessais : milieu pauvre.....	41
Tableau 8 : Valeurs fluorescence/densité cellulaire (<i>f/d</i>) x 10 ⁵ calculées pour les échantillons comptés à différents stade de développement.....	52
Tableau 9 : Récapitulatif des valeurs du taux de croissance μ_2 calculé dans les bioessais pour le dinoflagellé <i>Alexandrium minutum</i>	53
Tableau 10 : Récapitulatif des valeurs du taux de croissance μ_2 calculé dans les bioessais sur les effets conjugués des herbicides, pour les espèces algales testées.....	54
Tableau 11 : Récapitulatif des valeurs du taux de croissance spécifique μ calculé dans les bioessais pour le dinoflagellé <i>Alexandrium minutum</i>	55

Tableau 12 : Récapitulatif des valeurs du taux de croissance spécifique μ calculé dans les bioessais sur les effets conjugués des herbicides, pour les espèces algales testées.....	56
Tableau 13 : Concentrations en herbicides correspondant à la EC50, LOEC et NOEC, exprimées en ng.L^{-1} , pour <i>A. minutum</i> en milieu maxi simulant la situation post-hivernale	56
Tableau 14 : Concentrations de pesticides (ng/L) dosées dans les différents milieux de culture	63
Tableau 15 : Espèces phytoplanctoniques dénombrées <i>in situ</i> , avant la mise en culture, au point de référence et au Pont de la Corde.....	68
Tableau 16 : Taux de croissance (μ_2) des espèces diatomées dominantes dans les milieux témoins	69
Tableau 17 - Tableau récapitulatif de l'action des différents herbicides testés sur la biomasse chlorophyllienne maximale, la production carbonée et les taux de croissance des principales espèces de diatomées.....	73
Tableau 18 : Concentrations de pesticides (ng/L) dosées dans les différents milieux de culture	75
Tableau 19 : Espèces phytoplanctoniques dénombrées avant la mise en culture.	83
Tableau 20 : Taux de croissance (μ_2) d' <i>A. minutum</i> et des espèces de diatomées dominantes dans le milieu témoin	83
Tableau 21 - Tableau récapitulatif de l'action des différents herbicides testés sur la biomasse chlorophyllienne maximale, la production carbonée et le taux spécifique de croissance des principales espèces de diatomées	91
Tableau 22 : Pourcentage de variations du taux de croissance des populations sauvages et des cultures d' <i>A. minutum</i> selon les herbicides testés et les doses utilisées.....	102
Tableau 23 : Variations du taux de croissance de toutes les espèces de diatomées étudiées au cours des périodes printanière et pré-estivale.....	104
Tableau 24 : Concentrations d'herbicides (ng/L) dosés dans la rivière de Penzé, en 1999.....	107

Résumé

Suivi des pesticides en Baie de Morlaix

Le suivi s'est effectué sur les zones d'apparition d'*Alexandrium minutum* en rivière de Penzé et en rivière de Morlaix. Les prélèvements ont eu lieu entre avril et août, sur 2 ans (1998 et 1999), et ont été effectués par bateau ou à pied.

Les pesticides recherchés sont les triazines, les urées substituées, les aryloacides et quelques autres pesticides comme l'alachlore, le métolachlore et la trifluraline.

Des triazines apparaissent fréquemment dans les résultats des analyses, ainsi que le diuron, pour les autres pesticides on remarque des présences ponctuelles mais quelques fois à des concentrations élevées. Pour les triazines, il s'agit surtout de l'atrazine et de son produit de dégradation la dééthylatrazine, de la simazine et plus rarement de la propazine et de la terbuthylazine. Les concentrations sont généralement peu élevées, sauf à l'occasion de 2 suivis après des pluies en juillet et août 1999.

Effet des herbicides sur la croissance *in vitro* d'*Alexandrium minutum*

Les résultats obtenus *in vitro* sur le dinoflagellé toxique *Alexandrium minutum* montrent que, dans les conditions de cultures utilisées :

- la trifluraline diminue la biomasse chlorophyllienne et la densité cellulaire, et inhibe de 11 % le taux de croissance μ_2 à partir de 100 ng/L. En revanche les paramètres s'appuyant sur le calcul du taux de croissance spécifique μ lui confèrent une activité inhibitrice à des concentrations plus élevées. A 50 ng/L nous observons une élévation de la biomasse chlorophyllienne.

- le 2,4-D, bien que présentant un léger effet inhibiteur sur le développement des cultures dès 10 ng/L, ne modifie pas les résultats des calculs de croissance. Il ne présente pas d'effet sur la croissance du dinoflagellé aux concentrations testées, toutes inférieures à 5 $\mu\text{g/L}$.

- l'atrazine diminue la biomasse chlorophyllienne et la densité cellulaire à partir de 20 $\mu\text{g/L}$. Cette diminution n'apparaît plus que pour 50 $\mu\text{g/L}$ en fin de culture. En présence de 100 à 400 ng/L, nous avons observé une stimulation de la croissance du dinoflagellé.

- le diuron diminue la biomasse chlorophyllienne et la densité cellulaire à partir de 1 µg/L, mais cette diminution n'apparaît plus qu'à partir de 5 µg/L en fin de culture.
- l'alachlor et le métolachlor n'ont pas d'effet interprétable apparent sur la croissance de l'algue, en deçà de 2µg/L.

Etude du phytoplancton naturel :

Des tests de toxicité de plusieurs herbicides ont été effectués sur du phytoplancton naturel prélevé dans l'estuaire de la Penzé. Deux périodes d'intervention ont été choisies pour déterminer l'effet des herbicides sur la croissance du phytoplancton: la période printanière (avril 1998) au cours de laquelle se développent les diatomées, base de l'alimentation des bivalves filtreurs, et le début de la période estivale (juin 1999) au cours du développement d'une eau colorée à *Alexandrium minutum*, dinoflagellé toxique. Ont été testés les herbicides les plus abondants dans les eaux côtières : l'atrazine, la trifluraline, l'alachlore et son dérivé le métolachlore, le 2,4-D et le diuron. Les concentrations utilisées correspondent à la gamme de concentrations mesurées *in situ*.

Les diatomées les plus abondantes au printemps étaient soit de petite taille comme *Skeletonema costatum* et *Thalassiosira levanderi* ou de grande taille comme *Thalassiosira rotula* et *Thalassiosira decipiens*. En juin, accompagnant *Alexandrium minutum* se développaient de nouveau *Skeletonema costatum* et *Thalassiosira levanderi* ainsi qu'une autre espèce *Nitzschia longissima*. Selon la période de prélèvement, la même espèce pouvait avoir un taux de croissance différent. L'action des herbicides a été déterminée en comparant les taux de croissance des cultures dopées à celui d'une culture témoin.

La compilation des résultats fait apparaître une sensibilité différente des diverses espèces d'algues selon la nature des herbicides et leur concentration dans le milieu. En outre, dans la plupart des cas, on constate un effet différent des herbicides selon le taux de croissance de l'espèce considérée.

Diatomées

De tous les herbicides testés, le diuron utilisé dans une gamme de concentration variant de 5 à 600 ng/L et l'atrazine (10 à 490 ng/L) s'avèrent être les moins nuisibles à la plupart des diatomées. Seul le taux de croissance de *Thalassiosira rotula* est fortement diminué (de 40 à 60%) en présence de fortes doses de diuron (400 et 600 ng/L) et celui de *Nitzschia longissima* (50%) en présence d'une faible dose d'atrazine (10 ng/L). L'alachlore (50 à 280 ng/L), le métolachlore (400 ng/L) et la trifluraline (10 à 140 ng/L) réduisent uniquement la croissance

des grosses diatomées (de 40 à 80% de réduction) telles que *T. rotula*, *T. decipiens* et de *N. longissima* (en début de croissance seulement pour l'atrazine). Enfin, le 2,4-D utilisé à des doses variant de 170 à 400 ng/L entraîne un ralentissement de croissance plus ou moins marqué (de 10 à 100%) de toutes les diatomées à l'exception de *S. costatum* en fin de croissance. En-dessous de 170 ng/L, il n'y a pas d'effet.

Alexandrium minutum

En début de développement, deux herbicides, la trifluraline et l'atrazine ont une action particulièrement drastique sur la croissance d'*A. minutum*. Ainsi, la trifluraline à des concentrations variant de 20 à 100 ng/L réduit de 70 à 90% le taux de croissance du dinoflagellé. L'atrazine à faible dose (40 ng/L) réduit la croissance de 94% alors qu'à des doses plus élevées (150 et 490 ng/L), la réduction du taux de croissance est de 60%. Le 2,4 D et le diuron induisent également une réduction de croissance mais dans des proportions moindres (25 à 45%) que les deux herbicides précédents. Enfin, les variations du taux de croissance obtenues avec l'alachlore sont faibles ($\pm 15\%$). On peut considérer que cet herbicide n'a pas d'effet sur la croissance d'*A. minutum* en début de développement.

La sensibilité des populations d'*A. minutum* ayant atteint le stade d'eau colorée (faible taux de croissance, densité cellulaire élevée) s'avère différente de celles en cours d'établissement. Ainsi, les deux herbicides, trifluraline et diuron, inhibiteurs de la croissance ~~des populations jeunes, induisent~~ une stimulation de la croissance des populations vieillissantes. Le 2,4 D, à des concentrations ≥ 170 ng/L reste inhibiteur de la croissance (50 à 70% de réduction) ainsi que l'atrazine à des doses ≤ 100 ng/L (15 à 70% de réduction). Pour cet herbicide, on observe toutefois une tendance à la stimulation pour une dose de 400 ng/L. L'alachlore a la même action sur les deux types de populations d'*A. minutum*. Il n'induit qu'une faible réduction du taux de croissance à faible concentration et peut même en entraîner l'augmentation pour un ajout de 200 ng/L.

L'ensemble du phytoplancton est beaucoup plus sensible aux herbicides en début de croissance qu'en fin de développement. On notera que les seules stimulations de la croissance observées concernent les populations vieillissantes qu'il s'agisse des diatomées ou d'*Alexandrium minutum*. Ceci peut à terme modifier *in situ* la composition des communautés phytoplanctoniques et générer un déséquilibre écologique, en particulier, en favorisant le développement d'espèces de qualité trophique moins intéressante pour les conchylicultures.

Variations du taux de croissance de toutes les espèces de diatomées étudiées au cours des périodes printanière et pré-estivale (Sc = *Skeletonema costatum*, Tl = *Thalassiosira levanderi*, Tr = *Thalassiosira rotula*, Td = *Thalassiosira decipiens*, Nl = *Nitzschia longissima*) et du dinoflagellé *Alexandrium minutum*. (Am) en fonction du taux de croissance du témoin. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à la culture témoin. (en tenant compte d'une limite de significativité de $\pm 20\%$, les stimulations sont représentées en bleu et les inhibitions en rouge)

	DIATOMÉES											Am	
	Sc			Tl		Tr		Td		Nl			
Nbre de divisions/jour	0,78	1,64	2,30	0,72	2,60	1,50	1,90	0,88	0,97	0,73	2,08	0,39	1,00
Trifluraline	10	-	-	-	-	-	-	-	-	61	-	107	-
ng/L	20	83	-	-	91	-	-	-	-	-	18	-	27
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	88	-	141	-
	90	213	-	-	90	-	-	-	-	-	43	-	29
	100	-	-	<u>85</u>	<u>98</u>	-	<u>74</u>	-	<u>78</u>	61	-	111	-
	118	-	60	-	142	-	38	0	-	-	-	-	-
	140	85	-	-	92	-	-	-	-	-	60	-	9
2,4-D	< 50	-	-	<u>94</u>	-	<u>78</u>	-	<u>89</u>	-	<u>203</u>	-	-	-
ng/L	100	-	-	-	-	-	-	-	-	80	-	100	-
	170	91	-	-	52	-	-	-	-	-	100	-	64
	200	-	-	-	-	-	-	-	-	58	-	48	-
	250	152	-	-	94	-	-	-	-	-	44	-	55
	310	146	-	-	87	-	-	-	-	-	46	-	55
	374	-	75	-	68	-	91	0	-	-	-	-	-
	400	-	-	-	-	-	-	-	-	47	-	32	-
Alachlore	50	123	-	-	99	-	-	-	-	83	52	93	85
ng/L	68	-	106	-	134	-	105	22	-	-	-	-	-
	<u>110</u>	<u>211</u>	-	-	124	-	-	-	-	97	55	52	84
	200	134	-	-	102	-	-	-	-	97	38	144	116
	280	-	-	<u>111</u>	-	<u>89</u>	-	<u>52</u>	-	<u>68</u>	-	-	-
Métolachlore	400	-	76	<u>109</u>	74	<u>92</u>	181	<u>67</u>	23	<u>107</u>	-	-	-
ng/L													
Atrazine	10	-	-	-	-	-	-	-	-	49	-	85	-
ng/L	40	248	-	-	85	-	-	-	-	-	83	-	6
	100	-	-	-	-	-	-	-	-	82	-	30	-
	150	120	-	-	52	-	-	-	-	-	76	-	43
	400	-	-	<u>105</u>	-	<u>85</u>	-	<u>76</u>	-	<u>96</u>	112	-	122
	425	-	75	-	0	-	82	-	36	-	-	-	-
	490	89	-	-	72	-	-	-	-	-	89	-	37
Diuron	5	70	-	-	86	-	-	-	-	-	96	-	77
ng/L	25	-	-	-	-	-	-	-	-	117	-	104	-
	100	-	-	-	-	-	-	-	-	101	-	111	-
	300	120	-	-	91	-	-	-	-	-	81	-	66
	310	61	-	-	83	-	-	-	-	-	92	-	72
	400	-	-	<u>97</u>	-	<u>85</u>	-	<u>44</u>	-	<u>101</u>	103	-	137
	598	-	100	-	130	-	65	-	141	-	-	-	-

Les valeurs soulignées correspondent à celles obtenues sur les populations marines.

Introduction

Le tonnage de pesticides consommés annuellement en France est de l'ordre de 95 000 tonnes, et l'utilisation des herbicides en Bretagne était estimée à plus de 3 000 tonnes pour l'année 1994, compte-tenu seulement de l'usage agricole. La consommation d'herbicides par les collectivités sur les supports imperméables ou peu perméables, est difficile à estimer, mais concerne essentiellement des substances stables, et à forte rémanence (Grivault, 1995). Il en résulte que les quantités répandues sont souvent excédentaires par rapport à la quantité effective fixée par les végétaux terrestres, et les surplus se retrouvent après une retenue plus ou moins longue par les sols, entraînés dans les réseaux d'eau douce. Les réseaux de surveillance de la qualité de l'eau ont montré une contamination chronique par les herbicides dans de nombreuses rivières. Ainsi en période de pluie des teneurs en atrazine de 14 µg/L ont été détectées en eaux de rivières (Guiho, 1995). L'arrivée des eaux douces en estuaires et leur dilution dans les eaux côtières contribuent à la dispersion des molécules de pesticides, et leur rencontre avec des organismes non ciblés initialement, parmi lesquels les microalgues. Considérant l'abondance des eaux de ruissellement en Bretagne, la richesse des eaux côtières et l'importance des algues planctoniques comme premier maillon de la chaîne alimentaire, il apparaît nécessaire de déterminer l'impact des herbicides sur le développement de ces dernières et en particulier pour les espèces toxiques qui posent de nombreux problèmes au niveau de la contamination des coquillages marins.

L'effet des herbicides sur le développement du phytoplancton marin a déjà été étudié: le 2,4-D et la trifluraline sur *Phaeodactylum tricornutum* et *Skeletonema costatum* (Uensal, 1992), quelques aryloacides et phénylurées sur *Chaetoceros calcitrans* et *Isochrysis galbana* (His et Seaman, 1993). Les effets observés sont variables selon les concentrations des herbicides, les espèces chimiques et phytoplanctoniques testées. Ainsi Uensal a montré l'effet stimulateur de croissance du 2,4 - D jusqu'à 5 mg.L⁻¹, sur *P. tricornutum* et *S. costatum*. His et Seaman ont

trouvé un effet inhibiteur de la croissance des algues aux concentrations utilisées ($25\mu\text{g.L}^{-1}$ à 10 mg.L^{-1}). Une étude de ce type a été réalisée sur les effets de quatre herbicides identifiés et analysés dans les eaux de la rade de Brest, sur la croissance *in vitro* de trois espèces algales présentes dans cette région. Il a été démontré que la diatomée *Chaetoceros gracile* est inhibée par le diuron, l'atrazine et la trifluraline à partir de $0.025\mu\text{g.L}^{-1}$, et le 2,4-D ($0.05\mu\text{g.L}^{-1}$), surtout en milieu appauvri simulant la situation estivale en rade de Brest. Une élévation du taux de croissance du dinoflagellé *Gymnodinium mikimotoi* et de la raphidophycée *Heterosigma akashiwo* a été observée dans certaines conditions.

L'apport de pesticides dans l'environnement constituerait donc un facteur potentiel de sélection des espèces phytoplanctoniques, et outre la diminution de la production chlorophyllienne que leur présence peut entraîner, il apparaît un risque de sélection d'espèces dont la prolifération est indésirable en raison de leurs effets nuisibles.

1 – Présentation de l'étude

La baie de Morlaix, entre Roscoff et la pointe de Primel, constitue une zone estuarienne où se déversent deux rivières enrichies par les apports agricoles et non-agricoles : la Penzé et la rivière de Morlaix. C'est également un secteur utilisé pour la conchyliculture au niveau de l'embouchure des deux rivières. Depuis 1988 les efflorescences estivales d'*Alexandrium minutum* sont responsables de la contamination des coquillages par la toxine paralytique (PSP) produite par l'algue. Le risque pour le consommateur de coquillages est très élevé ; c'est pourquoi des procédures de fermeture de ces zones conchylicoles sont effectuées chaque année. Jusqu'à présent, cette micro-algue se développe essentiellement en Penzé vers la mi-juin (40 millions de cellules par litre en 1997), puis en rivière de Morlaix vers le 15 juillet, mais de façon plus aléatoire (Communications REPHY ; Erard-Le Denn, 1997). Dans ce contexte, il paraît intéressant de rechercher l'effet des herbicides apportés par les rivières sur la production phytoplanctonique de la baie de Morlaix. Une attention particulière sera portée sur l'espèce toxique *Alexandrium minutum*.

La détection des herbicides sera effectuée dans les eaux de la rivière la Penzé et en rivière de Morlaix afin de cerner au plus près les concentrations les plus élevées déversées dans l'estuaire au moment des fortes pluies.

Un complément d'expériences sur une culture monospécifique du dinoflagellé toxique *Alexandrium minutum*, dont les proliférations s'intensifient durant l'été le long des côtes de Nord-Bretagne, sera réalisée : des bioessais effectués selon le même schéma que les tests antérieurs, avec les mêmes substances, permettront de connaître la sensibilité de cette espèce aux apports d'herbicides.

La méthode proposée s'applique à un échantillon de phytoplancton prélevé en un site de la baie, là où se déclenche généralement le développement d'*Alexandrium minutum*. Les algues sont soumises, d'une part à six herbicides ajoutés séparément, et d'autre part ajoutés simultanément. Les résultats observés sont comparés à ceux d'un échantillon témoin sans herbicide.

L'échantillonnage du phytoplancton se fait à partir de 80 litres d'eau environ. Les périodes choisies : mai et juin-juillet, correspondent au maximum de production primaire printanière d'une part, et au maximum de développement du dinoflagellé *A. minutum* dans la baie de Morlaix d'autre part. Les points de prélèvements : au moment du bloom printanier de diatomées, le prélèvement se fera en un point de référence situé hors de l'impact des apports agricoles, et simultanément en un point d'un lieu présumé d'apparition d' *A. minutum* situé dans la Penzé. Un autre échantillon sera prélevé dans la tache colorée au moment de l'efflorescence d' *A. minutum*. L'échantillon réparti en 8 réacteurs de même volume, est conditionné par l'apport des herbicides suivants : atrazine, 2,4-D, trifluraline, diuron, alachlore et métolachlore. Les concentrations appliquées correspondront à des résultats obtenus sur des données existantes en milieu marin (Contrat de Baie de la rade de Brest). L'incubation est réalisée en conditions contrôlées de température et de lumière.

L'expérience se poursuit durant un temps suffisant pour permettre le développement de plusieurs générations de cellules (8 à 12 jours) et l'impact des herbicides peut être décelé par les modifications de la composition floristique des populations planctoniques. Pour cela, des dénombrements cellulaires spécifiques sont prévus sur des prélèvements en chaque réacteur à des intervalles de temps réguliers. L'évaluation de l'effet est également prévue par les mesures de production primaire et de chlorophylle. Celles-ci permettent d'approcher l'état physiologique et l'activité des cellules, du point de vue de leur productivité.

2 – Contexte en baie de Morlaix

Les deux rivières étudiées la Penzé et la rivière de Morlaix font partie du bassin versant de la baie de Morlaix et de ce fait du contrat de baie de la baie de Morlaix. Grâce à l'Association Pro Aqua – Baie de Morlaix, des données concernant les pesticides ont pu être recueillies.

Le bassin versant de ces deux rivières est fortement agricole : on y retrouve des exploitations de bovins, de porcs, de volailles, des grandes cultures (maïs, céréales) et sur le littoral une importante production légumière.

Le tableau 1 montre les résultats d'une enquête menée sur les produits phytosanitaires pour le rapport « Bassin de la Penzé : étude de définition du programme d'actions renforcées - Bretagne Eau Pure 2 phase 1 diagnostic – objectifs du programme » de décembre 1996, fait par le SCE.

Tableau 1 : Bassin versant de la Penzé – matières actives des herbicides épanchés (sont extraits les herbicides de familles identiques à ceux recherchés)

Matière active	Total (kg) pour le BV	Famille
Isoproturon	4 368	Urée substituée
Atrazine	3 780	Triazine
Métobromuron	1 890	Urée substituée
Propachlore	1 637	Amide
Mécoprop	1 056	Aryloxy-acide
Trifluraline	910	Toluidine
Simazine	836	Triazine
Alachlore	473	Amide
Métribuzine	329	Triazine
Linuron	305	Urée substituée
Bentazone	300	Aryloxy-acide
Métamitron	193	Triazine
Métolachlore	188	Amide
2,4-D	21	Aryloxy-acide
MCPA	18	Aryloxy-acide

Urée substituée 6 563 kg

Triazine 5 138 kg

Amide 2 298 kg

Aryloxy-acide 1 395 kg

Toluidine 910 kg

La matière active utilisée en plus fort tonnage, l'isoproturon, est utilisée comme herbicide sur céréales. L'atrazine est caractéristique d'un usage sur maïs. Le métobromuron est un

herbicide des pommes de terre et de l'artichaut. Et le propachlore s'emploie sur oignons, échalotes, choux, radis poireaux.

Les 4 molécules les plus utilisées reflètent bien l'importance sur cette zone de la culture des céréales du maïs et aussi de la zone légumière.

Pour les pesticides d'origine non-agricole une enquête a été menée dans le cadre du contrat de baie de la baie de Morlaix auprès des communes (1997), pour les herbicides étudiés lors de cette étude ou les pesticides de même famille, on peut voir dans le tableau 2 les quantités utilisées.

Tableau 2 : Herbicides utilisés par les communes

Matière active	Total (kg) pour le BV Baie de Morlaix	Total (kg) pour le BV Penzé
Diuron	682	120
Simazine	122	8
Mécoprop	52	17
2,4-D	44	18
Néburon	37	0
MCPA	18	2.5
Atrazine	18	0

D'autres services utilisent aussi des pesticides, tels que la DDE (routes nationales, aéroport..), le Conseil Général (routes départementales), SNCF (voies de chemin de fer), EDF-GDF (désherbage de zones proches des transformateurs et pylônes), les particuliers, etc... mais aucune enquête ne quantifie leurs usages.

Les quantités utilisées en usage non-agricole sont bien inférieures aux quantités utilisées en agriculture, cependant ces herbicides présentent un risque pour les eaux car ils sont épandus sur les trottoirs, les voiries donc sur des surfaces imperméables avec un risque de ruissellement fort lors d'épisodes pluvieux.

Des analyses de pesticides sont effectuées sur le bassin versant de la baie de Morlaix par différentes instances principalement :

- La DDASS suit la qualité des eaux brutes et des eaux traitées pour les usines d'eau potable ou les captages (analyses chromatographiques)
- Les exploitants des usines effectuent des autocontrôles
- Le contrat de baie de la baie de Morlaix effectue des prélèvements analysés par test ELISA.

Les fréquences de ces prélèvements ne sont pas très importantes.

Pour la prise d'eau de Coz Porz sur la Penzé, les plus fortes valeurs enregistrées sont de 240 ng/L mais la prise d'eau se trouve en tête de bassin versant de la Penzé et seulement 5 ou 6 prélèvements sont effectués par an, par la DDASS.

Pour la rivière de Morlaix, seules des données sur l'usine du Pillion (prise d'eau sur le Jarlot) sont disponibles ; là aussi il s'agit d'une prise d'eau en tête de bassin. Les données font apparaître des concentrations importantes : 1 700 ng/L sur des eaux traitées en août 1996 (5 ou 6 prélèvements sont effectués par an).

Il était donc important, au vu du peu de données disponibles sur la zone estuarienne, de mener des campagnes de prélèvements.

De même n'ayant pas de données préalables à l'étude en zone estuarienne ou marine, pour les tests *in vitro* ou *in vivo*, les concentrations testées (en herbicides) de dopages se sont basées sur des concentrations trouvées en rade de Brest (Etats des lieux et des milieux, Contrat de baie de la rade de Brest, avril 1997).

3 – Suivi des pesticides en baie de Morlaix

3.1- Localisation des prélèvements :

La localisation des prélèvements a été choisie en fonction de la problématique de l'étude et en connaissant les zones d'apparition d'*Alexandrium minutum* en 1997 (Communications REPHY; Erard-Le Denn, 1997). Les prélèvements effectués en 1997 étaient sur la Penzé entre le Pont Ferroviaire et le lieu dit Roshamon.

Les points de prélèvements pour l'analyse des pesticides ont été situés pour encadrer cette zone au Pont de la Corde et à Penzé. Le point en Penzé permet d'obtenir l'apport du bassin versant et le point au Pont de la Corde d'être dans la zone de salinité 25 ‰, zone d'apparition probable du phytoplancton toxique (Figure 1 : points 4 et 2, respectivement).

Deux points complémentaires ont été choisis : un dans le Chenal (en face de l'île Callot) sert de point de référence milieu marin, et un en rivière de Morlaix pour comparer les apports des 2 rivières (Figure 1 : points 1 et 5, respectivement).

Des points complémentaires ponctuels étaient introduits quand les conditions de salinité l'imposaient (Figure 1 : points 3, 6 et 7), pour être à une salinité encadrant les 25 ‰.

Les figures 2 et 3 sont des zooms des zones de prélèvements, pour la Penzé et la rivière de Morlaix, respectivement.

La fréquence des campagnes de prélèvements est bimensuelle, 1 fois en bateau pour avoir le point marin référence et une fois à pied pour être plus libre de prélever lors d'épisodes pluvieux, le point du Pont de la Corde étant prélevé à chaque fois.

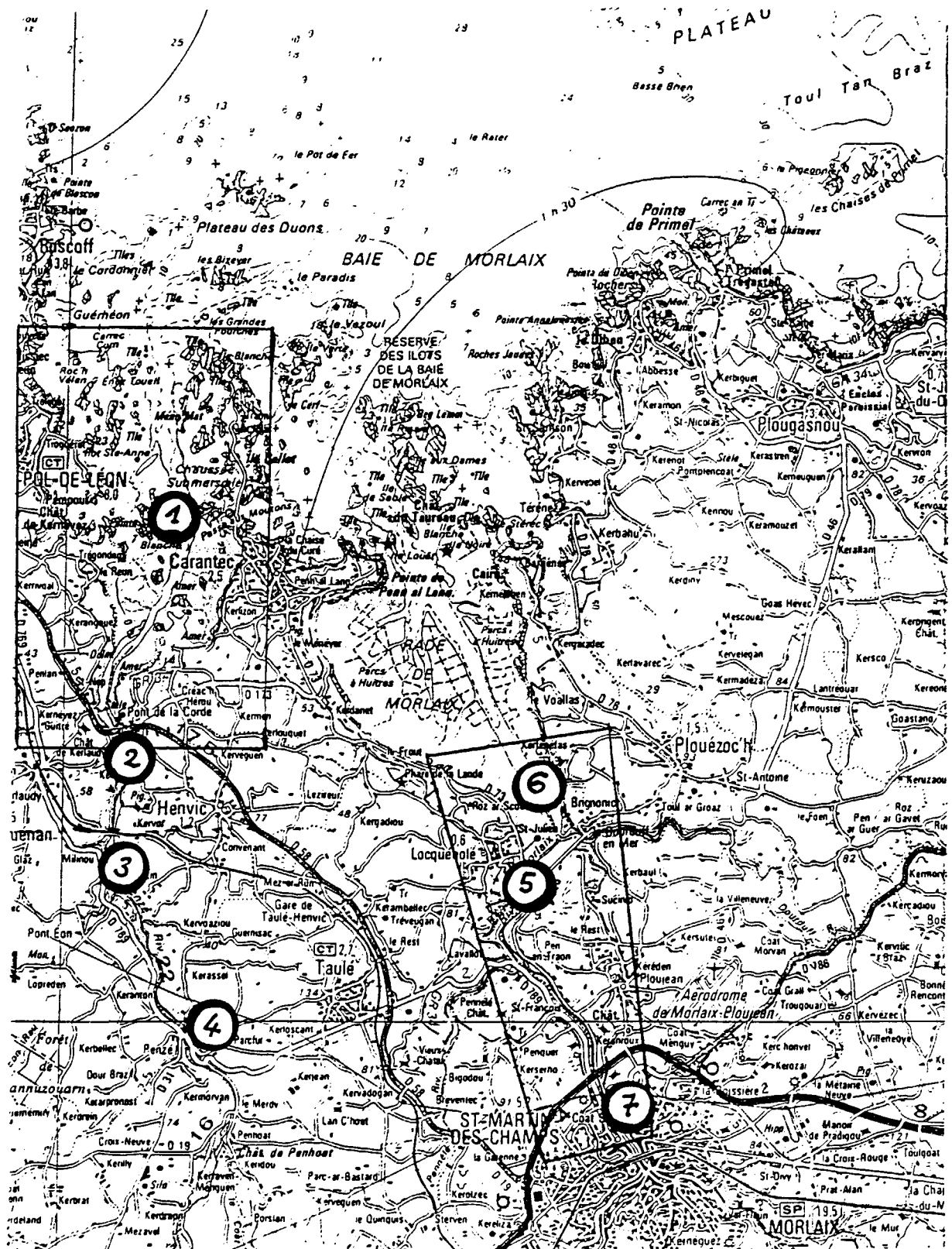


Figure 1 : Points de prélèvements
 1 = Chenal, 2 = Pont de la Corde, 3 = Pont ferroviaire, 4 = Penzé,
 5 = Locquenolé, 6 = Dourduff, 7 = Port de Morlaix

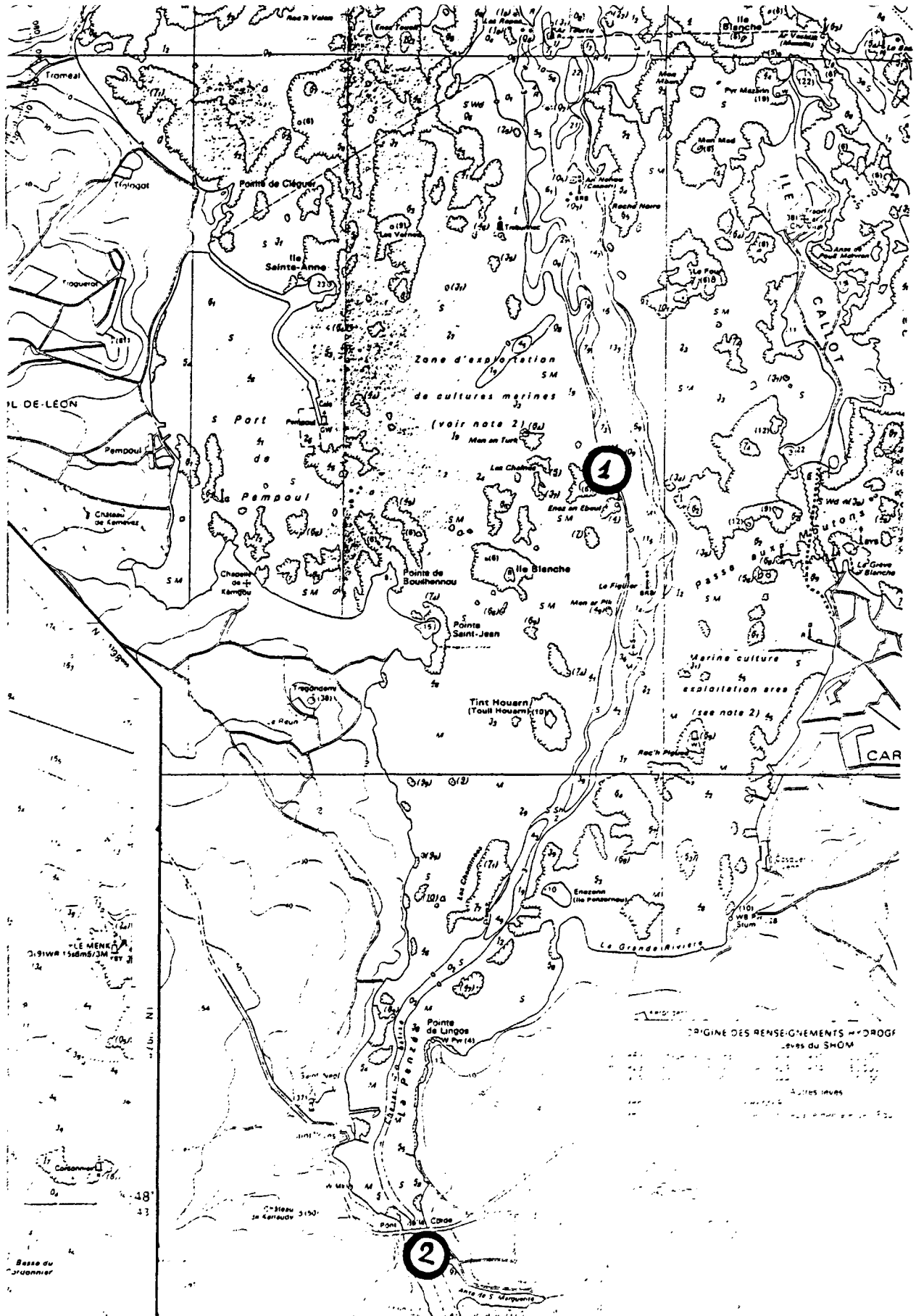


Figure 2 : Points de prélèvements zoom en Penzé
 1 = Chenal, 2 = Pont de la Corde

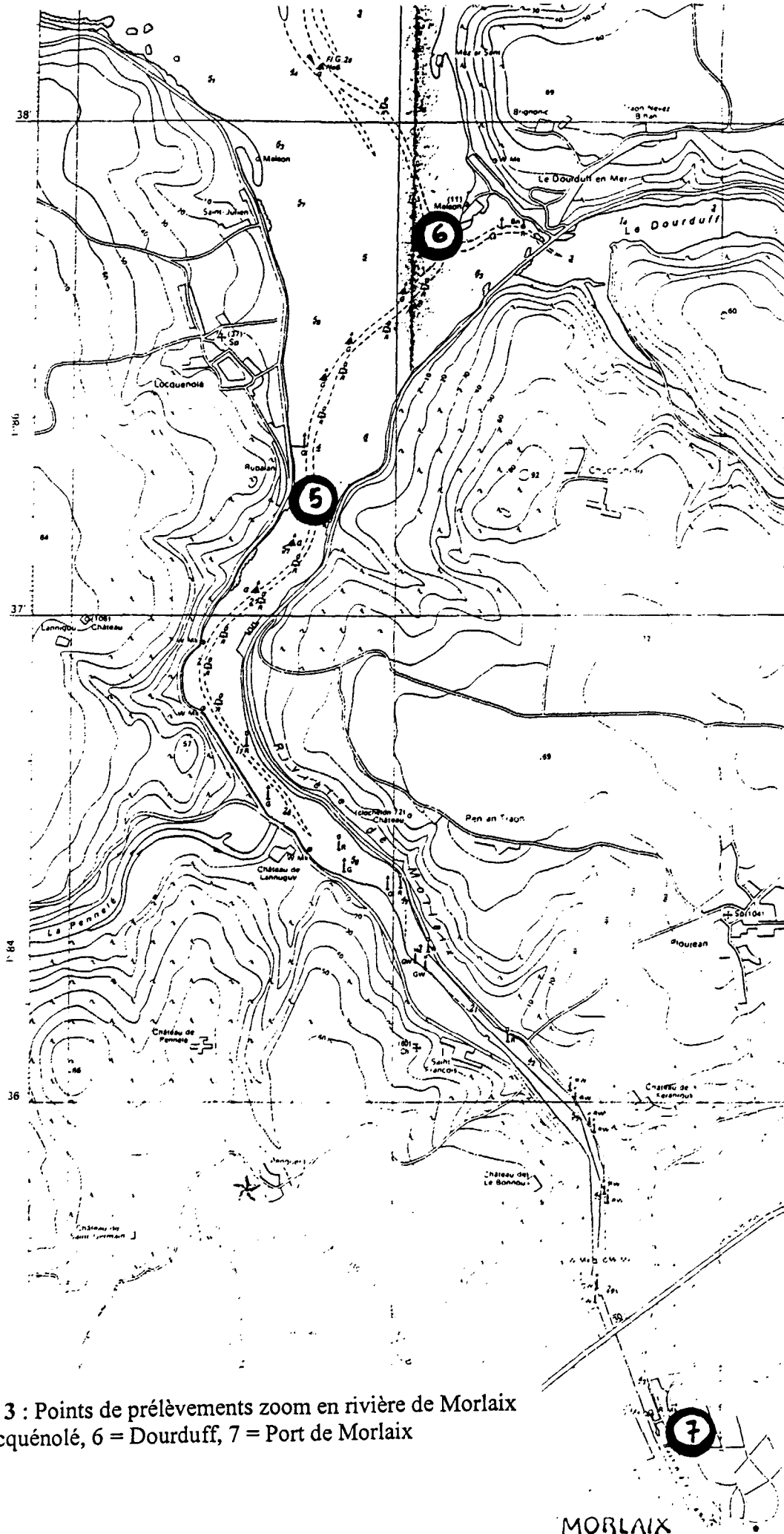


Figure 3 : Points de prélèvements zoom en rivière de Morlaix
 5 = Locquenolé, 6 = Dourduff, 7 = Port de Morlaix

MORLAIX

Les dates de prélèvements sont présentées dans les tableaux 3a et b, respectivement 1998 et 1999.

Tableau 3a : Dates de prélèvements et paramètres physiques pour 1998.

N°	LIBELLE DU POINT	Date	Heure	Salinité ‰	Température °C	Profondeur m
5	Locquéolé	15/04/98	16:50	1,1	9	
2	Pont de la Corde	15/04/98	17:10	13,6	9	
4	Penzé	15/04/98		0	8,9	
1	Chenal	21/04/98		34,1	10,5	19,5
2	Pont de la Corde	21/04/98		23,4	10,9	10,5
5	Locquéolé	12/05/98	15:20	13,6	19,3	
2	Pont de la Corde	12/05/98	15:55	25,7	16,2	
4	Penzé	12/05/98	16:15	0	17,2	
1	Chenal	22/05/98	16:35	34,6	14,7	10
2	Pont de la Corde	22/05/98	16:55	33	16	7,7
3	Pont ferroviaire	22/05/98	17:00	32,2	15,4	1,6
5	Locquéolé	09/06/98	17:30	34,5	15,5	
2	Pont de la Corde	09/06/98	17:55	33	15,6	
4	Penzé	09/06/98	17:45	2,9	15,4	
1	Chenal	23/06/98	16:20	35	15,7	5,1
6	Dourduff	23/06/98		34,9	16,6	6,6
2	Pont de la Corde	23/06/98		34,2	18,4	marée haute
5	Locquéolé	23/06/98		34,8	17,1	
7	Port de Morlaix	15/07/98	11:20	0	14,8	1,3
5	Locquéolé	15/07/98	14:25	28,4	16,8	1
2	Pont de la Corde	15/07/98	14:45	30,8	16,9	marée haute

Les numéros de chaque point correspondent à la notation sur la carte – figure 1.

Tableau 3b : Dates de prélèvements et paramètres physiques pour 1999.

N°	LIBELLE DU POINT	Date	Heure	Salinité	Température °C	Profondeur m
7	Port de Morlaix	05/05/99	10:30	0	12,2	1,1
5	Locquéolé	05/05/99	10:40	33,7	13,2	4 anneaux
2	Pont de la Corde	05/05/99	11:00	30,8	13,8	1 anneau
4	Penzé	05/05/99	11:10	2,5	12,9	3 barres échelle
7	Port de Morlaix	28/05/99	9:30	0	13,9	1,1
5	Locquéolé	28/05/99	9:50	23,3	15,2	1,1
2	Pont de la Corde	28/05/99	10:10	26,2	15,3	8 anneaux
4	Penzé	28/05/99	10:35	0,1	14,2	sous échelle
7	Port de Morlaix	21/06/99	9:30	0	13,3	1,1
5	Locquéolé	21/06/99	9:45	25	16,2	10 anneaux

2	Pont de la Corde	21/06/99	10:15	29,6	16,6	5 anneaux
4	Penzé	21/06/99	10:30	0,1	13,7	sous échelle
1	Chenal	05/07/99	15:20	34,8	16,8	3
2	Pont de la corde	05/07/99	15:40	28	18,6	6,1
3	Pont ferroviaire	05/07/99	15:50	24	18,6	1,7
5	Locquénolé	06/07/99	8:20	29,9	17,5	1,4
1	Chenal	21/07/99	15:25	34,3	17	9
2	Pont de la Corde	21/07/99	14:50	33,2	18,2	8,5
3	Pont Ferroviaire	21/07/99	15:00	31,3	18,8	4,5
6	Dourduff	21/07/99	16:00	34,4	17,8	2,1
1	Chenal	04/08/99	14:50	35,1	17	4,7
2	Pont de la Corde	04/08/99	15:30	30	19	7,3
3	Pont Ferroviaire	04/08/99	15:40	27,4	19,5	2,8
6	Dourduff	04/08/99	14:20	35	17,6	2,8

3.2- Résultats des analyses :

Les analyses effectuées sur ces prélèvements sont principalement des herbicides, faisant partie de plusieurs familles :

Triazines : atrazine, cyanazine, déisopropylatrazine (DIA), dééthylatrazine (DEA), propazine, simazine, terbutryn, irgarol

Urées substituées : chlortoluron, diuron, isoproturon, linuron, néburon

Phénoxyacides : mécoprop, 2,4 D, MCPA, dichlorprop, dicamba, bentazone, fluazifop butyl, diclofop méthyl

Divers : trifluraline, alachlore, métolachlore.

Dans la famille des triazines, 5 molécules se retrouvent dans les eaux pour la période d'avril 1998 à juillet 1998. Ce sont des herbicides principalement utilisés sur le maïs en pré et post levée ou comme la DEA, un produit de dégradation de l'atrazine. La simazine par contre peut être utilisée sur maïs ou en usage non – agricole. Les résultats d'analyse sont présentés sur la figure 4 (a et b) pour la Penzé, respectivement pour les années 1998 et 1999 et la figure 5 (a et b) pour la rivière de Morlaix. Les concentrations retrouvées ne sont pas très importantes, elles ne dépassent pas la norme de 100 ng/L, pour une eau destinée à la consommation humaine en 1998. Pour l'année 1999, il y a quelques dépassements : 2 pour l'atrazine et 2 pour la simazine, dont un important pour l'atrazine où on atteint plus de 600 ng/L pour une salinité de 24 ‰ en Penzé au mois de juillet, ce qui est très important pour une telle salinité et à 250 ng/L en juin au Port de Morlaix à une salinité de 0 ‰.

La période de présence dans les eaux est située entre le mois d'avril et le mois de mai et principalement sur les échantillons estuariens.

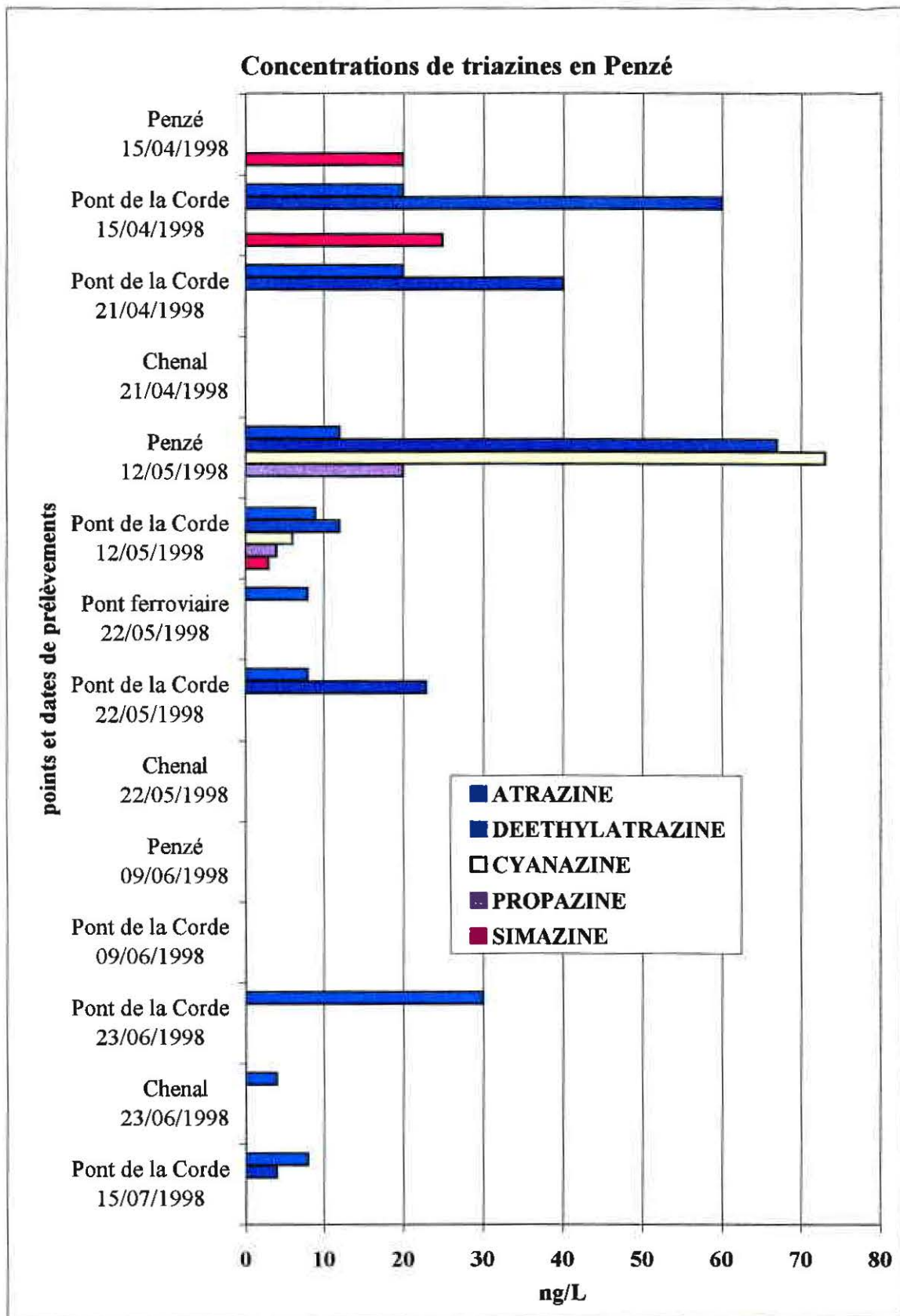


Figure 4a

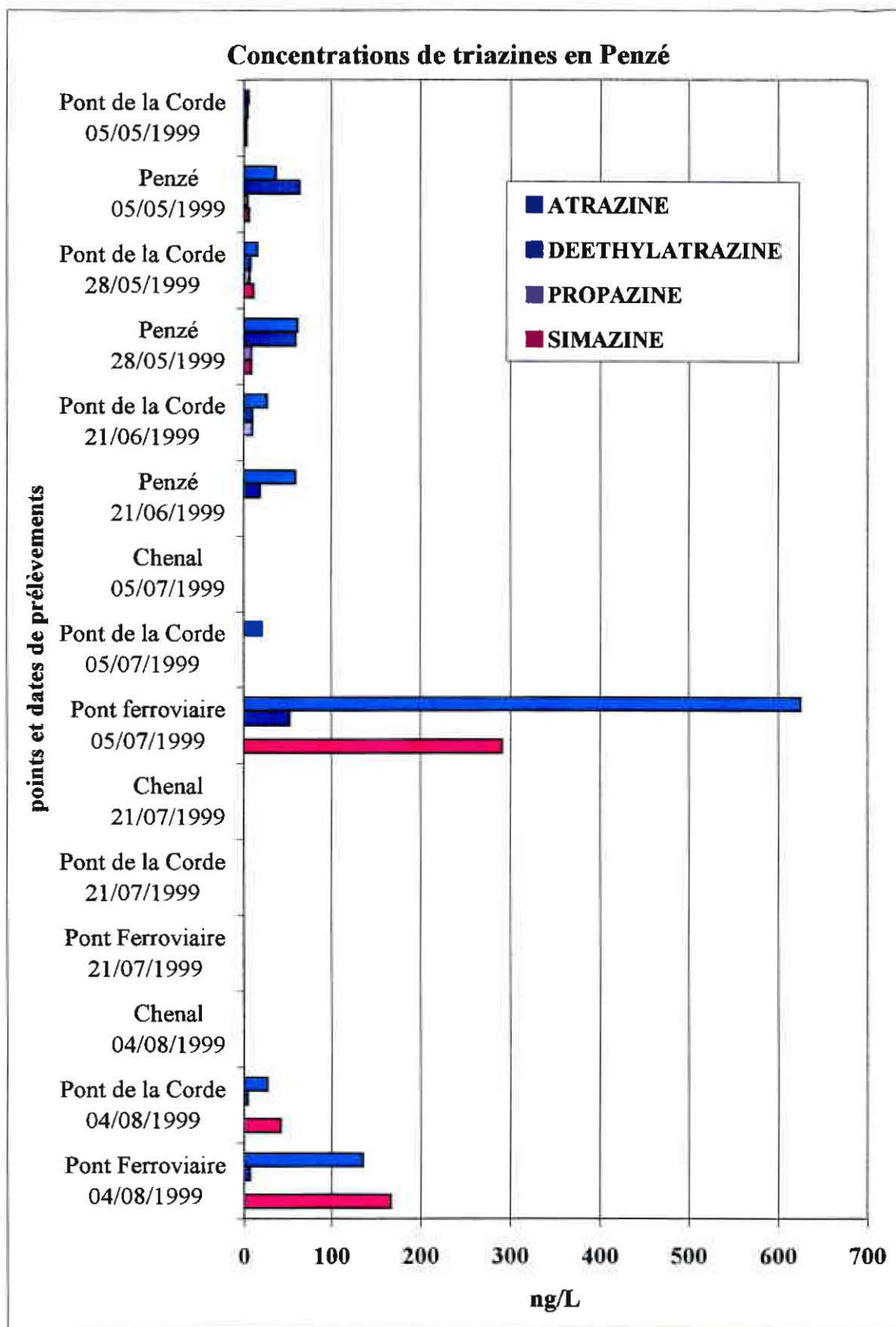


Figure 4b

Concentrations de triazines en rivière de Morlaix

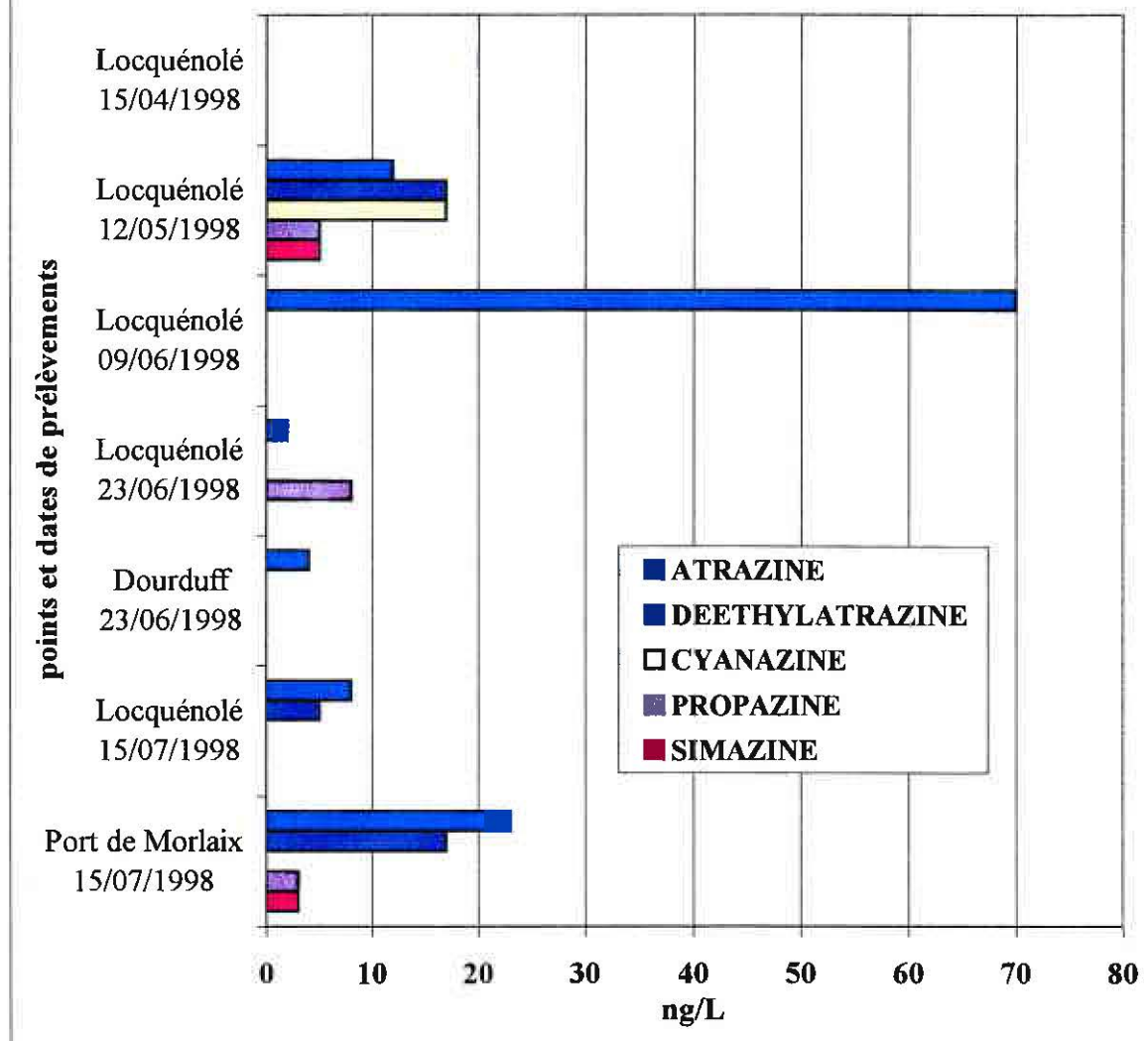


Figure 5a

Concentrations de triazines en rivière de Morlaix

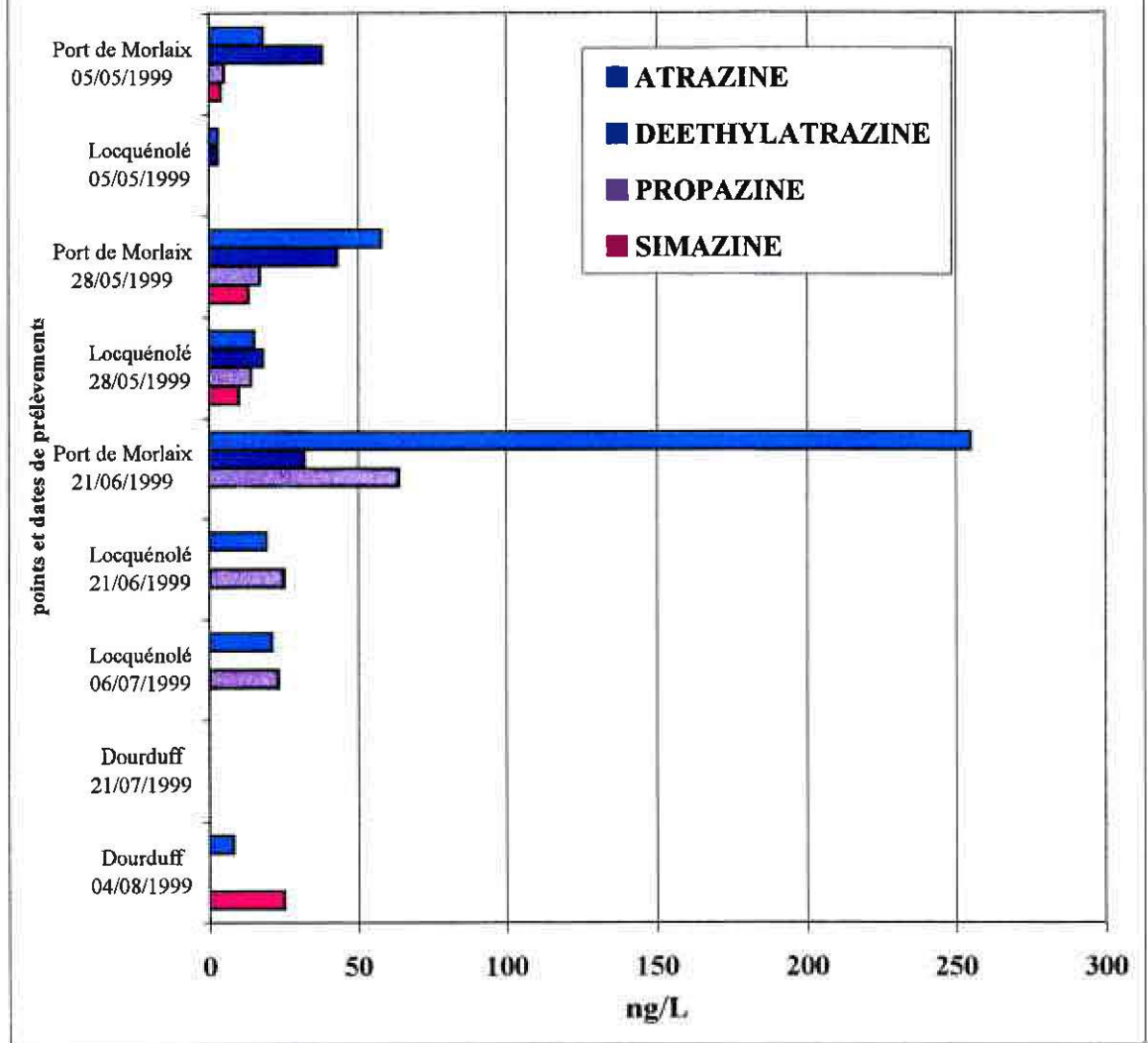


Figure 5b

Les figures 6 (a et b) et 7 (a et b) montrent les concentrations de diuron et de trifluraline pour la Penzé et la rivière de Morlaix, respectivement, en 1998 et 1999. La trifluraline est un herbicide utilisé en culture légumière ou céréalière, elle n'apparaît qu'en 1998. Le diuron est un herbicide à usage non – agricole. Sur les figures on peut remarquer que le diuron est présent à des concentrations dépassant la norme des 100 ng/L, même à des salinités importantes comme en Penzé le 9 juin 1998 (33 ‰).

La figure 8 présente les résultats d'analyse du MCPA sur la Penzé et en rivière de Morlaix pour 1998. En 1999, le MCPA n'a pas été détecté. Les utilisations par les communes de MCPA ont lieu, d'après l'enquête en avril – mai.

Le MCPA est aussi utilisé sur céréales et prairies à partir de février et jusqu'à juin-juillet pour le liseron sur céréales.

On remarquera que la présence du MCPA est ponctuelle mais souvent à de fortes concentrations. Le MCPA possède un très faible Koc (20) qui en fait une molécule très mobile.

La terbuthylazine a aussi été retrouvée dans les eaux lors de la campagne du 12 mai 1998 sur les 3 prélèvements pont de la Corde, Penzé et Locquénolé à des concentrations de 11, 41 et 5 ng/L, respectivement. Cette matière active s'utilise sur maïs ou en usage non – agricole.

De l'isoproturon a été retrouvé ponctuellement au pont de la Corde le 15 avril 1998 à une teneur de 53 ng/L et à 26 ng/L le 5 mai 1999, mais les campagnes ayant débuté en avril c'est un peu tard pour retrouver cette molécule car ses périodes d'utilisation sont plutôt fin janvier-février.

De la propazine a été détectée 16 fois sur 44 prélèvements entre quelques ng/L et jusqu'à la valeur de 64 ng/L (La propazine est peut être utilisée en complément ou en remplacement de l'atrazine).

Concentrations de diuron et trifluraline en Penzé

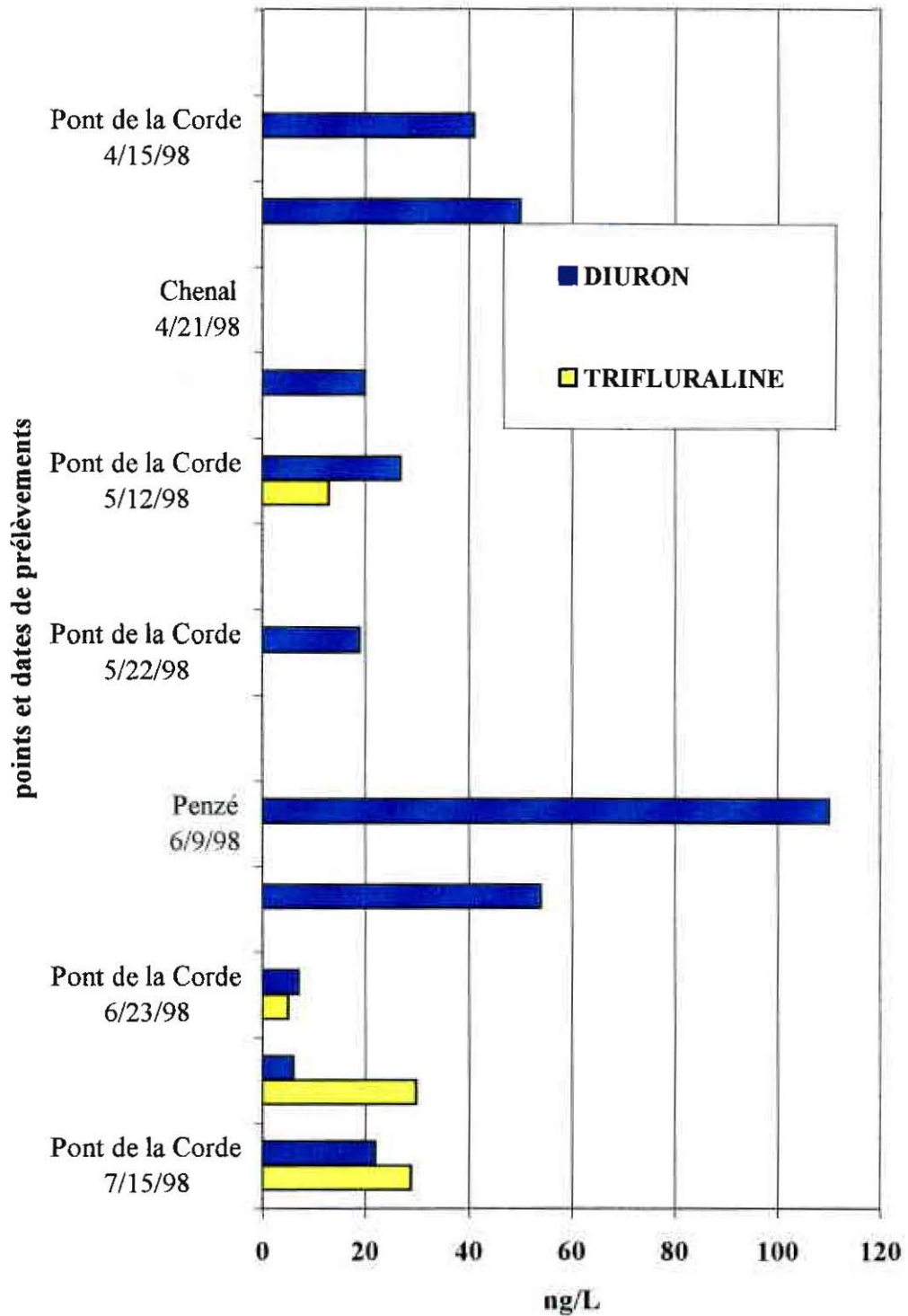


Figure 6a

Concentrations de diuron en Penzé

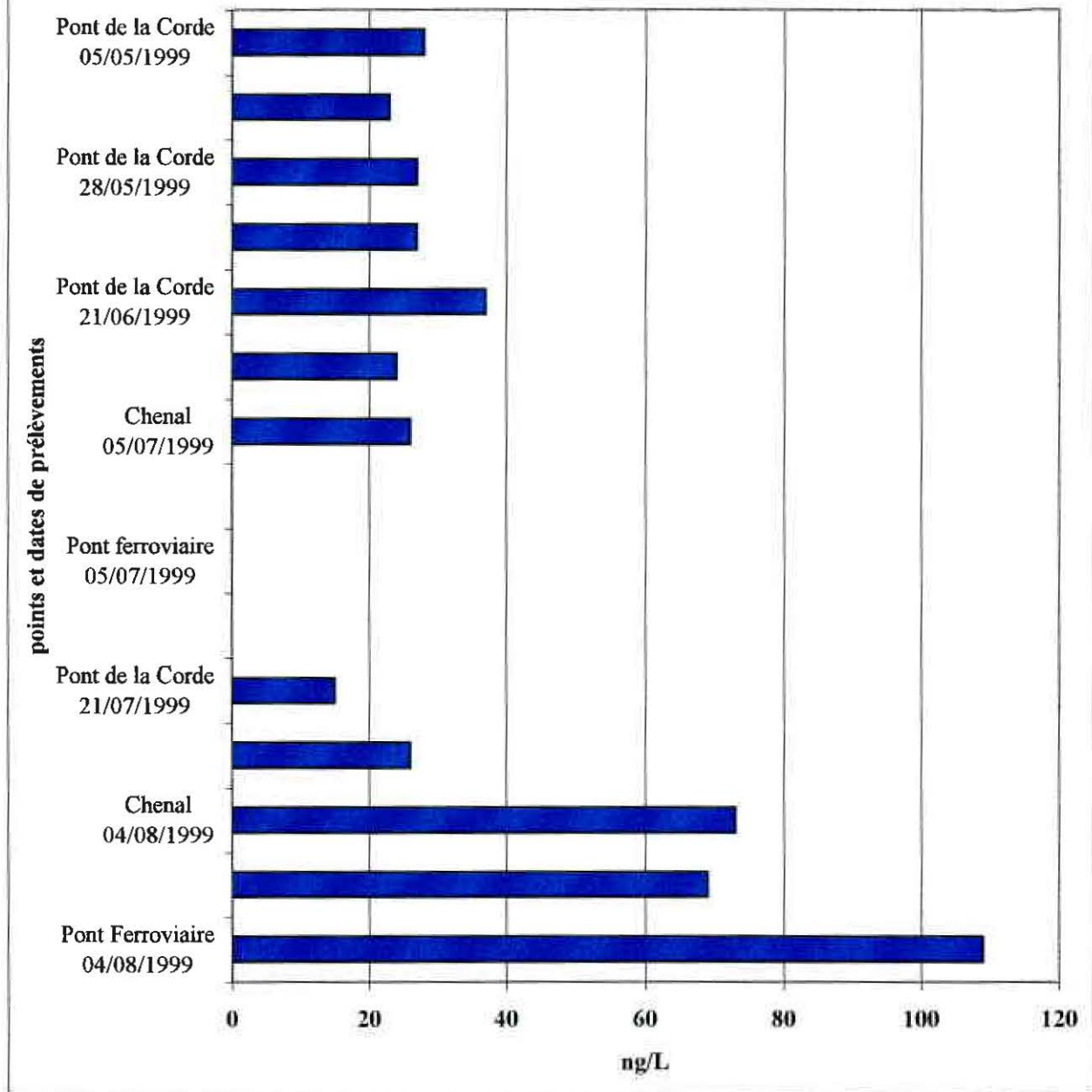


Figure 6b

Concentrations de diuron et trifluraline en rivière de Morlaix

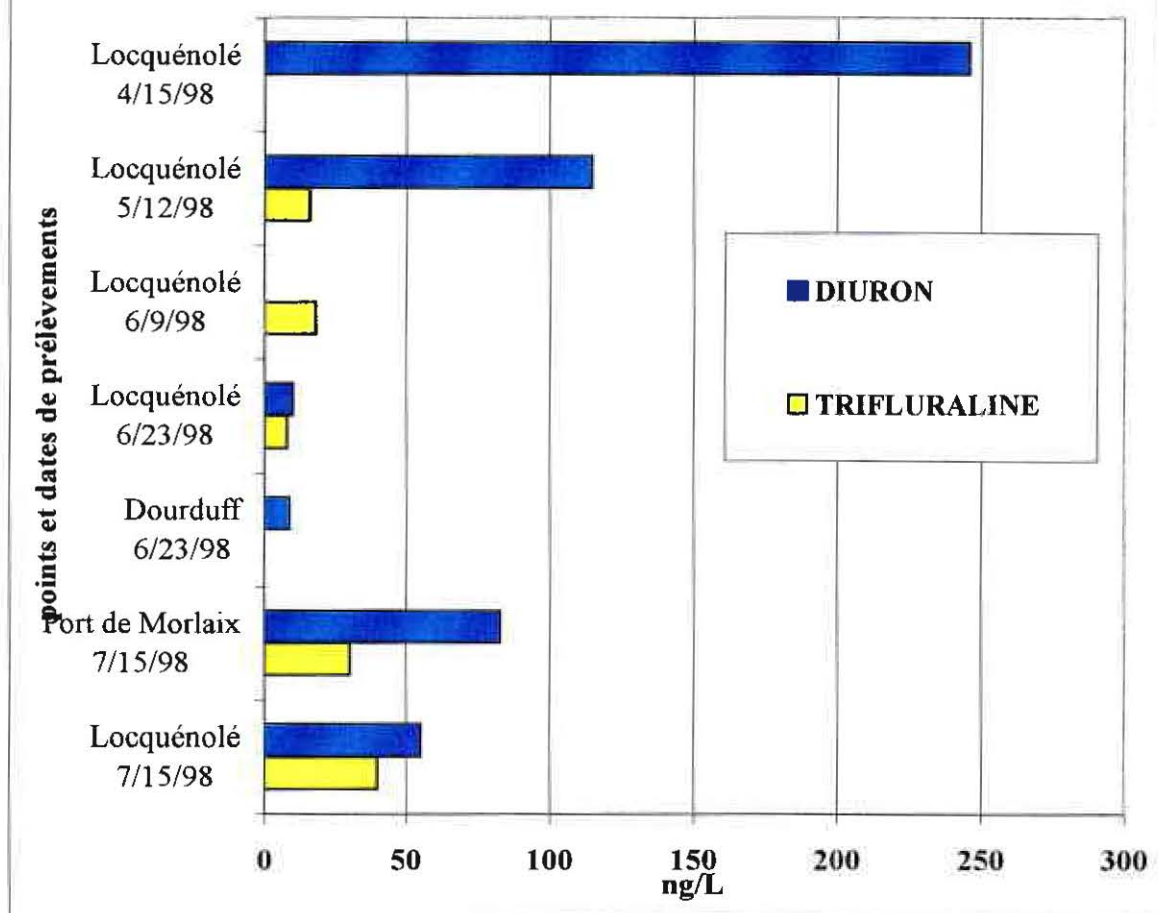


Figure 7a

Concentrations de diuron en rivière de Morlaix

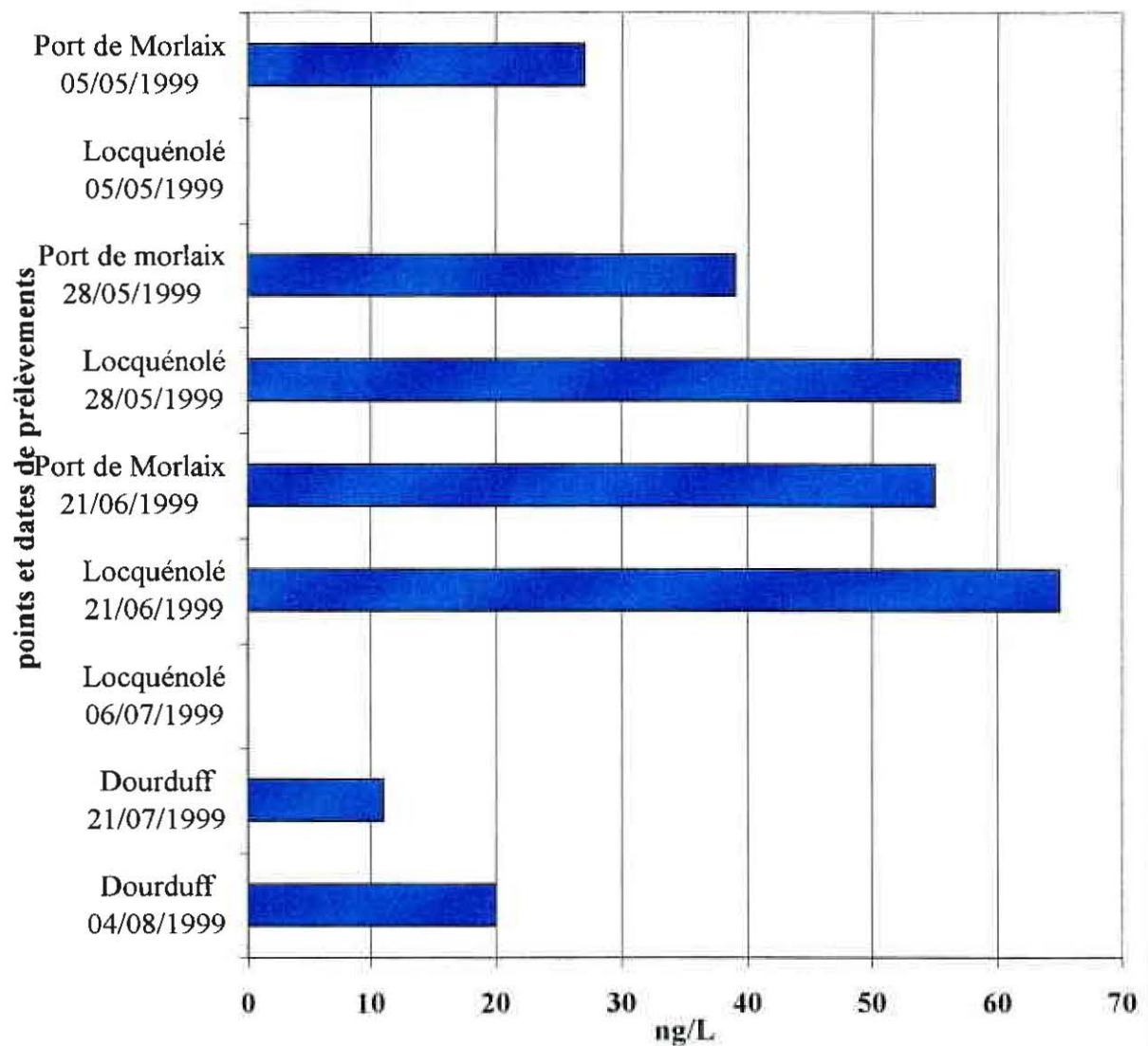


Figure 7b

Concentrations de MCPA en Penzé et en rivière de Morlaix

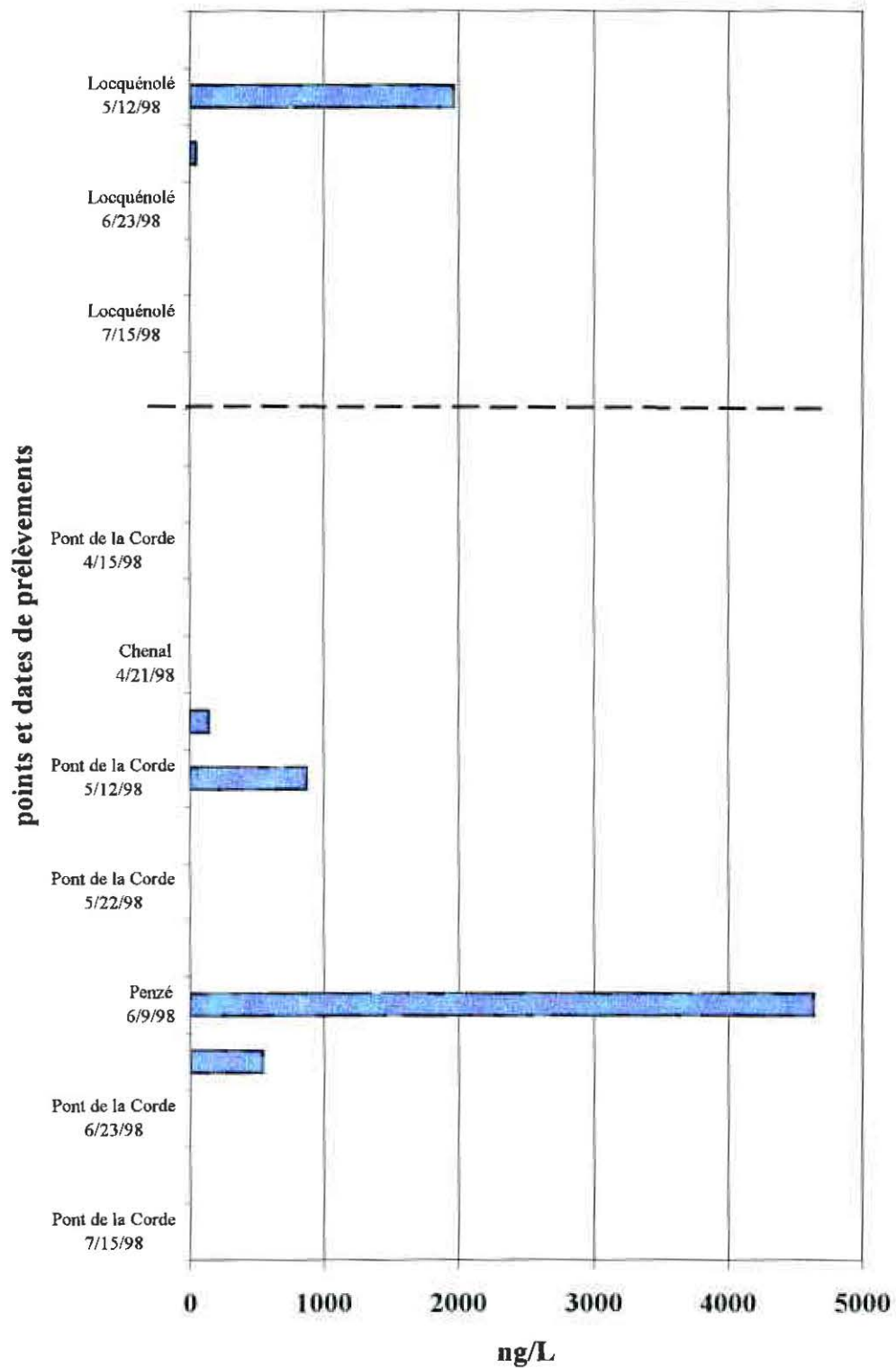


Figure 8

3.3- Influence de la pluviométrie :

Des données pluviométriques nous ont été fournies par le Contrat de Baie de Morlaix pour les stations de Toulivinen (Plougouven) et Pleyber Christ (gendarmerie), et par L'Agence de l'Eau – Météo France pour Morlaix et Pleyber Christ (particulier).

Une observation globale sur la période des prélèvements montre, pour l'année 1998, une bonne similitude au niveau des 3 stations (figures 9a, 9b et 9c).

La période représentée sur les figures montre un mois d'avril pluvieux, tous les jours il a été relevé de quelques millimètres à 20 mm de pluie, un mois de mai plutôt sec avec une forte pluie le 30 mai, et les mois de juin, juillet et août alternent pluie et temps sec.

Les prélèvements se situent principalement lors de journées peu pluvieuses, malgré les essais d'être présents sur le terrain après les pluies. Ce problème est la résultante de 2 facteurs, d'une part pour les prélèvements en bateau il fallait réserver l'embarcation à l'avance et donc la marge de manœuvre était réduite et d'autre part les prélèvements à pied était déclenchés en fonction des évènements pluvieux mais en se basant sur la pluviométrie de Brest, n'ayant pas accès à la pluviométrie, en directe, sur la zone d'étude.

Ce constat explique en partie les concentrations peu élevées qui ont été retrouvées dans les échantillons, par rapport aux analyses effectuées sur d'autres bassins versants où les concentrations sont fréquemment plus fortes.

Pour 1999, on remarque que la pluviométrie est presque identique à 1998, avec en moins l'événement le plus fort (fin mai 98). Par contre si les prélèvements des premières campagnes sont en temps sec, les prélèvements de juin, juillet et août sont effectués après des pluies.

On retrouve dans les eaux des triazines en juillet et août, de l'atrazine et de la simazine, alors que la période d'application est mai-juin. Suite à la petite pluie du 20/06 on a détecté 70 ng/L à Locquéolé et en juillet, suite à la pluie du 4/06, plus de 600 ng/L sur la Penzé, ainsi que 300 ng/L de simazine.

La pluie du 3/08, permet de voir réapparaître dans les prélèvements des triazines et du diuron.

Pluviométrie à Toulivinen 1998

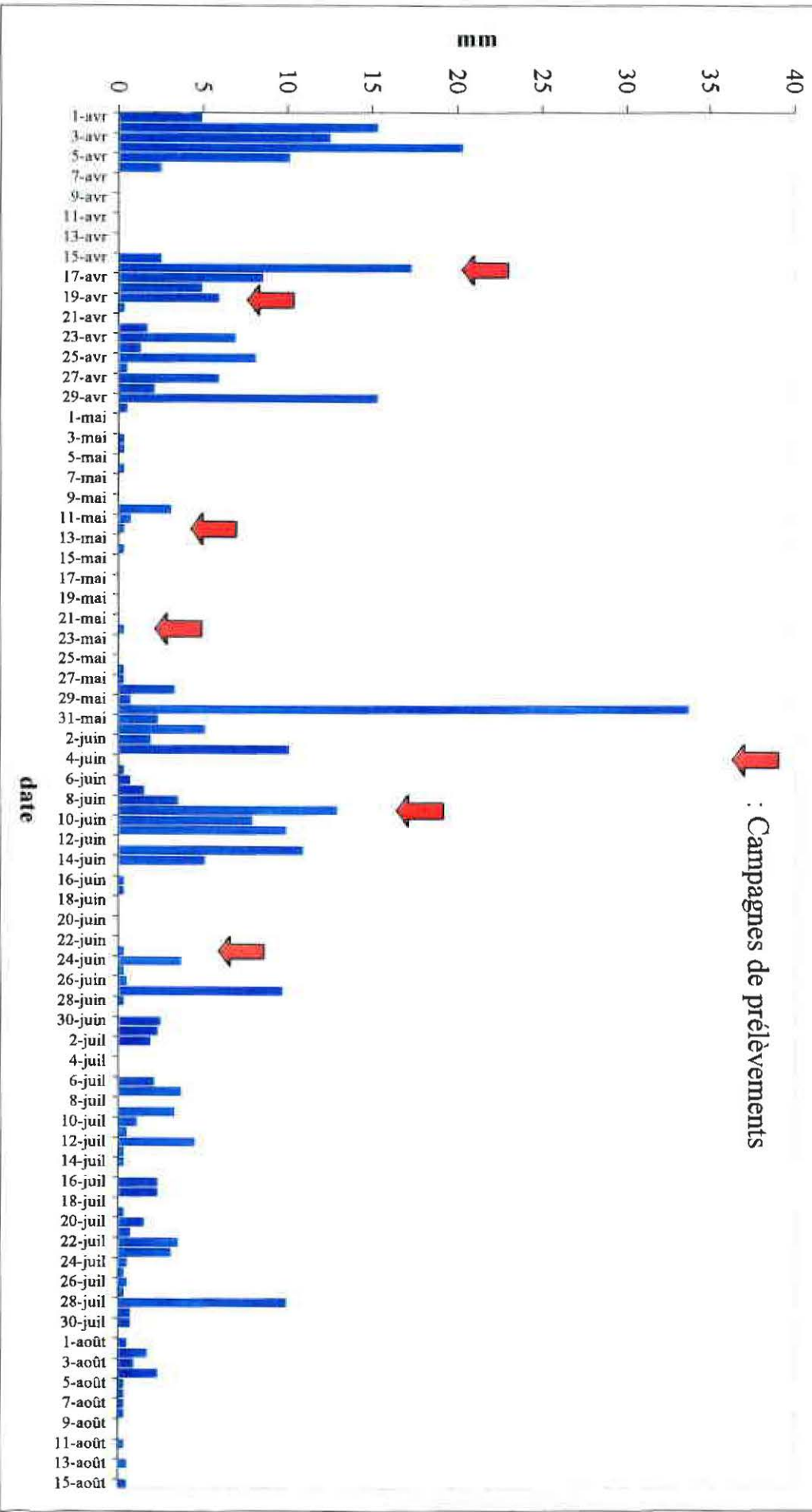


Figure 9a

Pluviométrie à Pleyber Christ (Gendarmerie) 1998

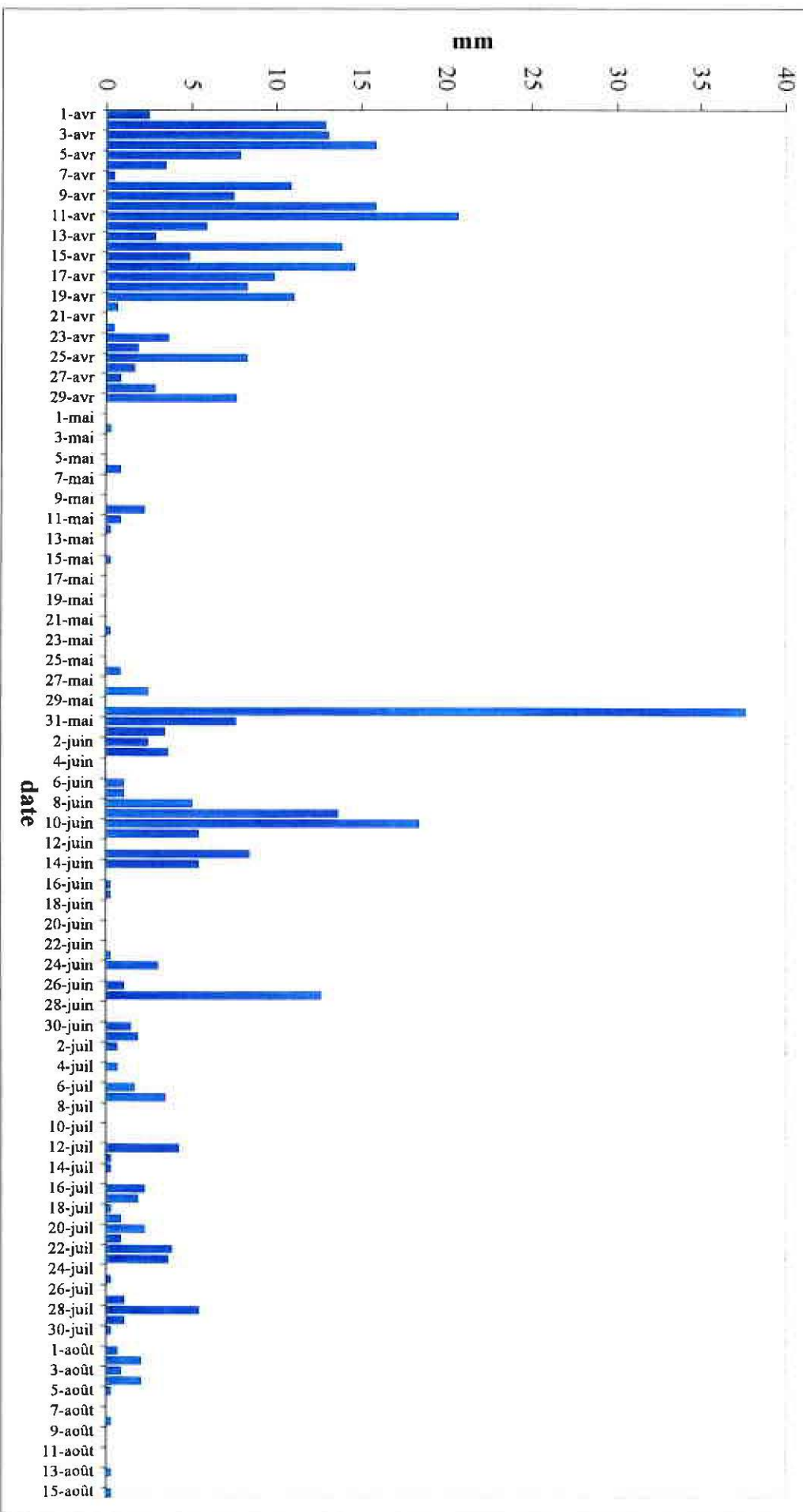


Figure 9b

Pluviométrie à Pleyber Christ (particulier) en 1998

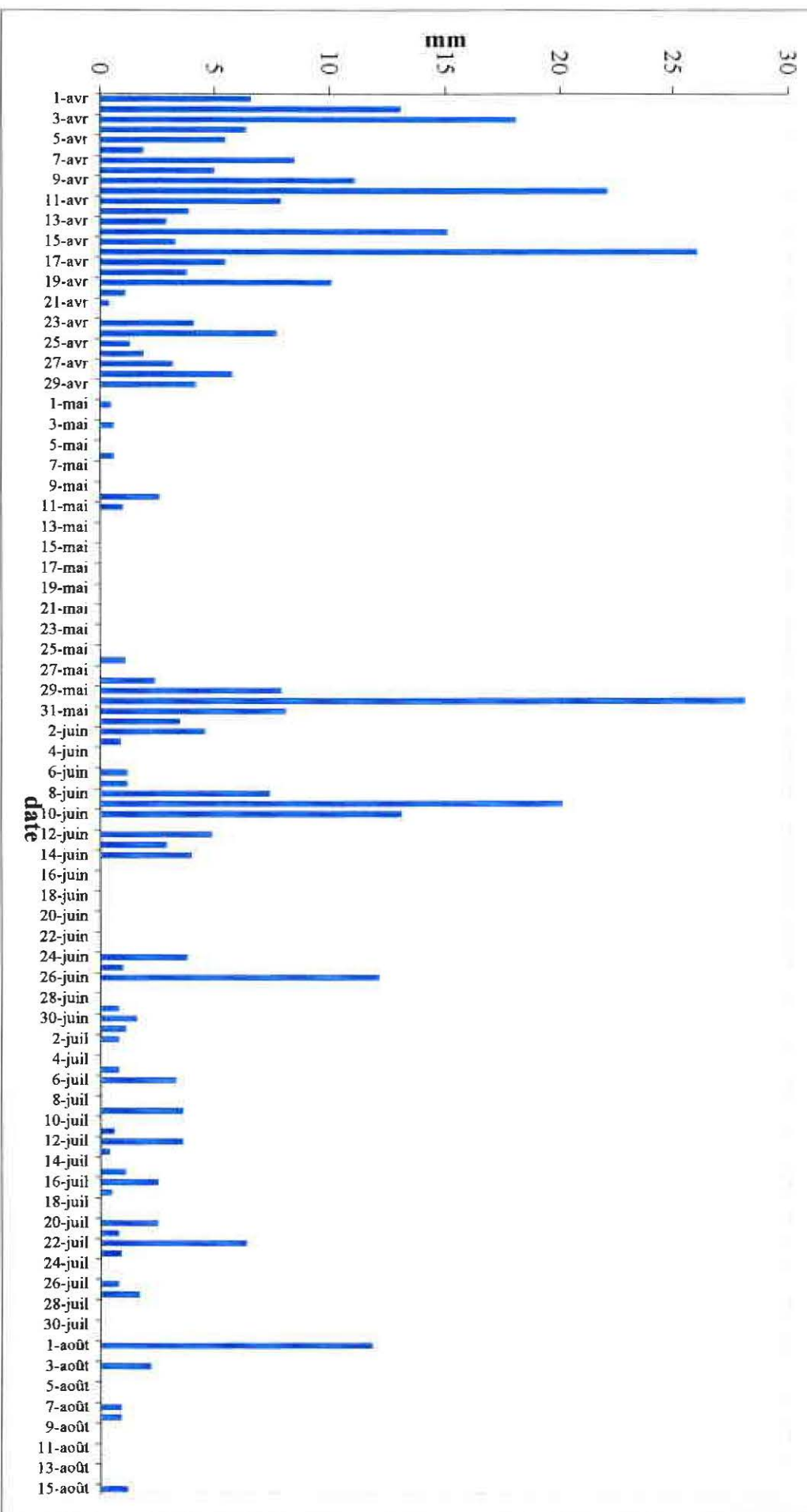


Figure 9c

Pluviométrie à Toulivinen 1999

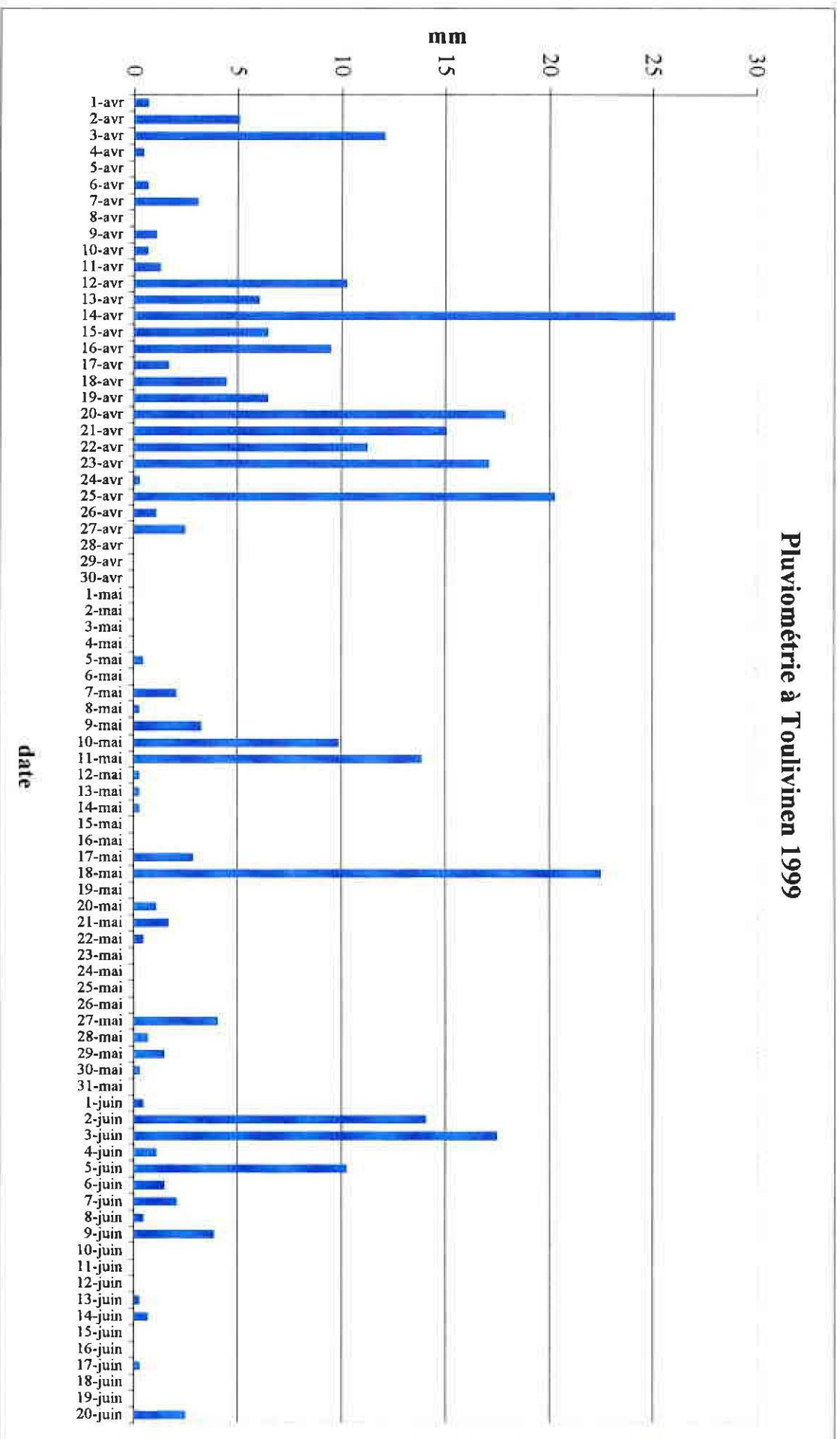


Figure 10a

Pluviométrie à Pleyber Christ (particulier) en 1999

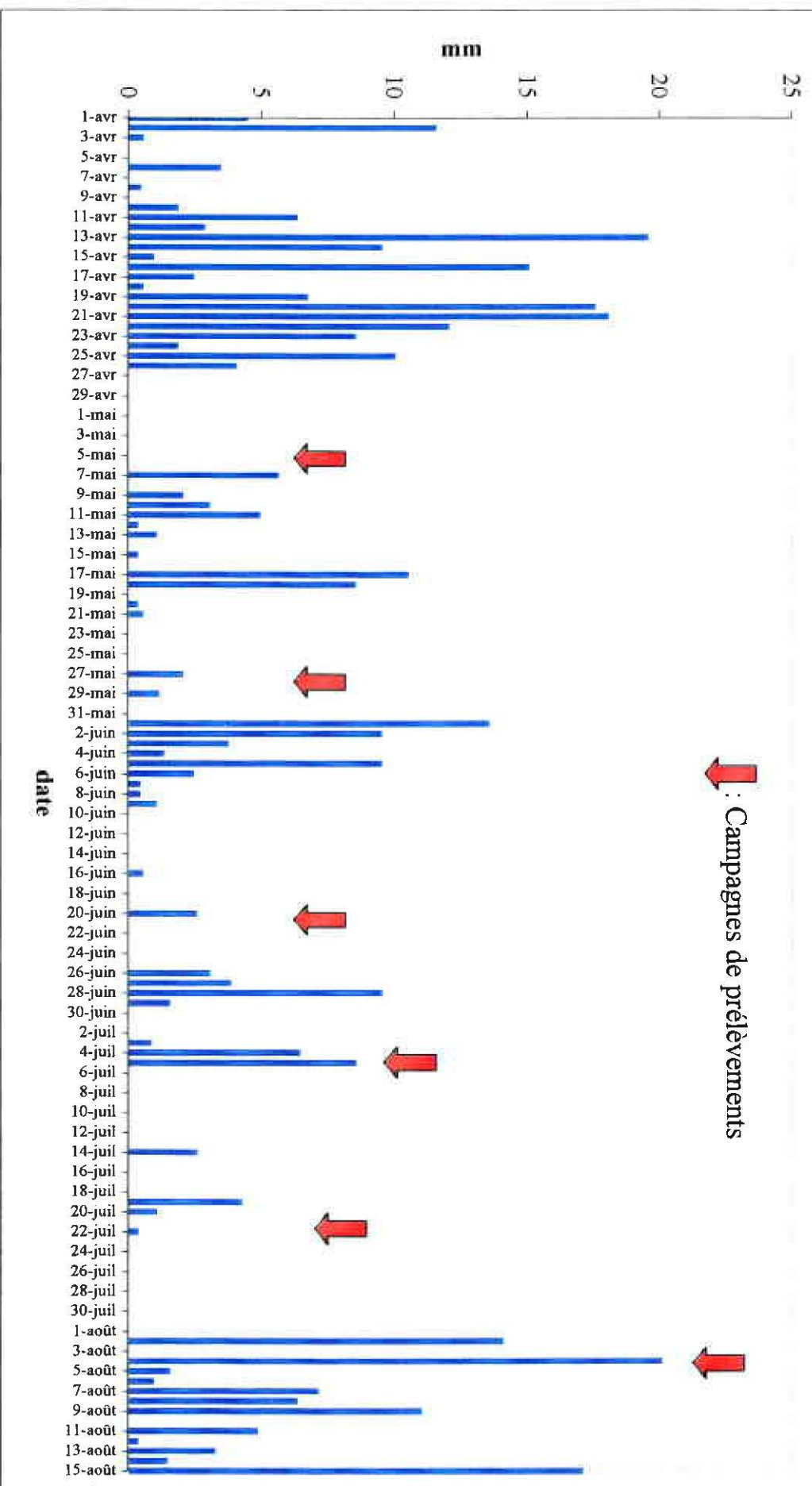


Figure 10b

Pluviométrie à Morlaix en 1999

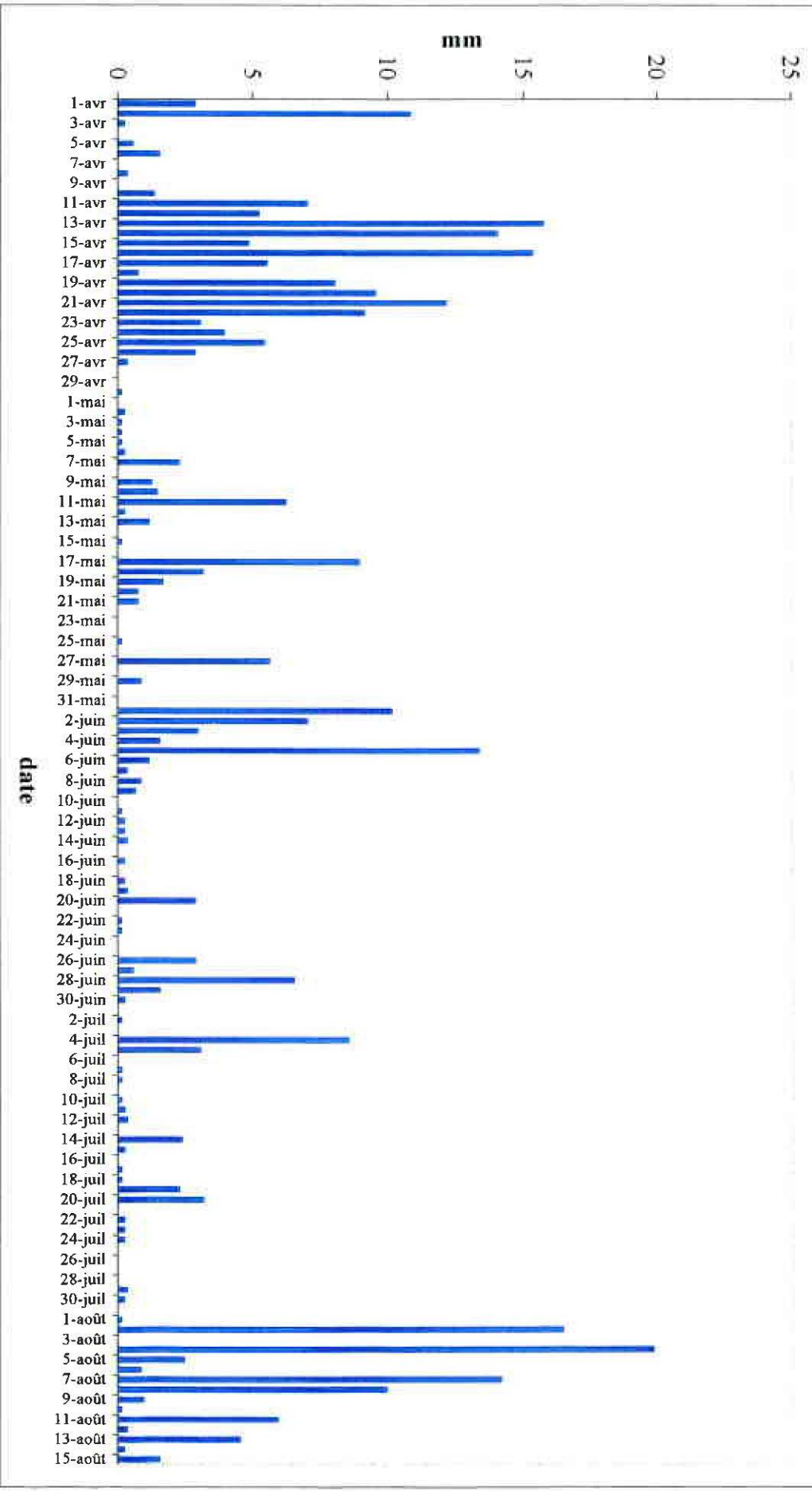


Figure 10c

3.4- Conclusion

Les triazines et le diuron ont été détectées dans les eaux fréquemment lors de ces 2 années de suivi, mais généralement à de faibles concentrations car les prélèvements n'ont été effectués que rarement après des épisodes pluvieux et dans ce cas on voit nettement que le risque est plus important même si ces épisodes ont lieu quelques mois après l'utilisation de ces pesticides. En plus, la pluviométrie de ces deux années n'a pas été exceptionnelle.

Quelques autres pesticides ont été détectés plus ponctuellement, le MCPA en 1998 et à de fortes concentrations, c'est souvent le cas pour cette molécule. Dans des programmes de suivi régulier, cette matière active, quand elle est recherchée apparaît ponctuellement mais à de très fortes concentrations, elle est utilisée en usage agricole (sur céréales) ou en usage non agricole, c'est cette dernière utilisation qui pose plus de risque.

4 – Effet des herbicides sur la croissance *in vitro* d' *Alexandrium minutum*

4.1- Objectif

Déterminer les effets des herbicides utilisés en agriculture et détectés dans les eaux estuariennes et côtières, sur la croissance d'une micro-algue au moyen de bioessais en laboratoire.

Les herbicides sélectionnés sont les plus couramment utilisés sur les cultures intensives : l'atrazine, le 2,4-D, la trifluraline, l'alachlore et le métolachlore, ainsi que le diuron, celui-ci étant appliqué sur les voiries. Les concentrations testées ont été choisies en fonction des résultats d'analyse effectuées dans des eaux côtières soumises à des conditions identiques : la rade de Brest.

L'algue testée est le dinoflagellé toxique *Alexandrium minutum*, qui se développe de façon endémique dans les eaux côtières de la côte Nord-Bretagne principalement (Erard-Le Denn, 1997, Repères Océan- n°13), en particulier en Penzé, et dont les efflorescences provoquent des contaminations de coquillages. Cette algue (souche AM95RM) est cultivée en routine au laboratoire de l'IFREMER depuis son isolement par E.Erard à partir d'une efflorescence en juillet 1995 en rivière de Morlaix.

4.2 Matériel et méthodes

Les tests sont effectués en conditions contrôlées de lumière : $60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, avec un cycle jour-nuit 12h/12h, et à 18°C. Les algues sont cultivées en eau de mer stérilisée par autoclavage et enrichie selon le Tableau 4. Métaux et vitamines sont apportées aux mêmes concentrations qu'en milieu optimum f/2 (Guillard and Ryther, 1962). Les concentrations utilisées en nitrate et phosphate sont celles mesurées dans les eaux de la Penzé à pleine mer, salinité 26 ‰ le 14 avril 1998 (analyses effectuées au laboratoire Hydrologie DEL-EC de l'IFREMER). Ces conditions ont été choisies pour tester l'effet des herbicides, en raison de la correspondance attendue entre teneurs élevées en sels nutritifs et herbicides, tous deux apportés par les eaux de ruissellement.

Tableau 4. Composition nutritive des cultures utilisée en bioessais : milieu riche.

Eléments	NO3	PO4	Métaux	Vitamines
Doses	440 μM	2.5 μM	f/2	f/2

Les herbicides testés sont dissous dans l'eau de mer par agitation magnétique à 20°C durant 3 h puis les solutions sont stérilisées par filtration sur 0.22 μm . Un sous-échantillon de chaque solution est analysé au laboratoire du PAE afin de connaître la concentration exacte de

chacun des herbicides. La trifluraline est utilisée en solution méthanolique en raison de sa faible hydrosolubilité. Le Tableau 5 présente les concentrations testées pour chaque herbicide.

Tableau 5. Concentrations en herbicides testées en bioessais:

Herbicides	Solutions	Concentrations-mères	Concentrations testées
trifluraline	méthanolique	600 mg/L	10-25-50-100-250-500 ng/L -1 µg/L
2,4-D	aqueuse	170.73 mg/L	8.5-21-42-85-170ng/L -0.85-4.25 µg/L
atrazine	aqueuse	6.06 mg/L	10-25-50-100-200-400 ng/L -1-5-20-50 µg/L
diuron	aqueuse	12.26 mg/L	10-25-50-100-400 ng/L -1-5-20 µg/L
alachlore	aqueuse	21.40 mg/L	10-25-50-100-200-500 ng/L -1-2 µg/L
métolachlore	aqueuse	155 mg/L	10-25-50-100-200-500 ng/L -1-2 µg/L

L'effet synergique des herbicides utilisés simultanément a été étudié sur une culture d'*A. minutum* aux concentrations mesurées le 23 juin 1998 au Pont de la Corde, à Pleine Mer dans une eau de salinité 30 ‰ (rappel des résultats PAE tableau 6). Le comportement de ce dinoflagellé a été comparé à celui de *Chaetoceros gracile*, *Heterosigma akashiwo* et *Gymnodinium mikimotoi*, cultivés dans les mêmes conditions. Les enrichissements en éléments nutritifs minéraux ont été ceux utilisés dans les tests ci-dessus. Une expérience identique en milieu plus pauvre simulant une situation estivale a été effectuée. Les concentrations en sels nutritifs (Tableau 7) ont été définies d'après Guillaud et Aminot (1990).

Tableau 6. Concentrations en herbicides ajoutés simultanément dans les bioessais pour les tests de synergie:

Eléments	2,4-D	diuron	atrazine	trifluraline	alachlor	métolachl.
Doses	0.053 µg/L	0.007 µg/L	0.030 µg/L	0.030 µg/L	0.009 µg/L	0.009 µg/L

Tableau 7. Composition des cultures utilisée en bioessais : milieu pauvre.

Eléments	NO3	PO4	Métaux	Vitamines
Doses	50 µM	1 µM	f/2	f/2

L'eau de mer enrichie en éléments nutritifs estensemencée à 1 million cell/L d'*A. minutum*, puis 40 mL de la culture sont répartis dans des tubes borosilicatés stériles, adaptés pour une lecture directe de la fluorescence de la chlorophylle au fluorimètre. Les herbicides sont ajoutés dans les tubes aux concentrations définies ci-dessus, et la croissance des algues est suivie journallement par mesure de la fluorescence, et tous les 2 à 3 jours par comptages afin de compléter les observations. Les tests sont répliqués trois fois, et comparés à des témoins sans ajout d'herbicides. Dans le cas de la trifluraline, les témoins sont constitués de cultures dopées par du méthanol pur à 10⁻³ (40µL de méthanol dans 40 mL de culture)

L'analyse du 2,4-D et de la trifluraline est effectuée dans les cultures dopées aux concentrations maximales à la fin de l'expérience.

4.3 Résultats et discussion

4.3.1 Biomasse chlorophyllienne

Les résultats obtenus sont présentés sous forme de courbes correspondant à la variation de biomasse chlorophyllienne en fonction du temps.

D'après les premières observations, il apparaît que la trifluraline affecte les courbes de croissance d'*A. minutum* en diminuant les maxima de biomasse chlorophyllienne à partir de 100 ng/L tandis que le 2,4-D freine le développement dès 10 ng/L, dans les conditions testées (Figures 11 et 12). L'atrazine à 50 µg/L et le diuron à partir de 5 µg/L abaissent la hauteur des plateaux (Figures 13 et 14). L'alachlor et le métolachlor présentent le même effet : une légère diminution du maximum de production de la biomasse en phase stationnaire (Figures 15 et 16). Le métolachlor à 1 et 2 µg/L produit une inhibition légèrement plus précoce de la croissance du dinoflagellé, détectable dès le 6^{ème} jour de culture. La trifluraline, le diuron et l'atrazine élèvent la fluorescence chlorophyllienne aux concentrations égales ou inférieures à 50 ng/L, 1 et 20 µg/L respectivement.

Présentation des courbes obtenues à partir de la moyenne des trois réplicats, avec écarts-types correspondants.

Effets des herbicides sur la croissance *in vitro* d'*Alexandrium minutum*

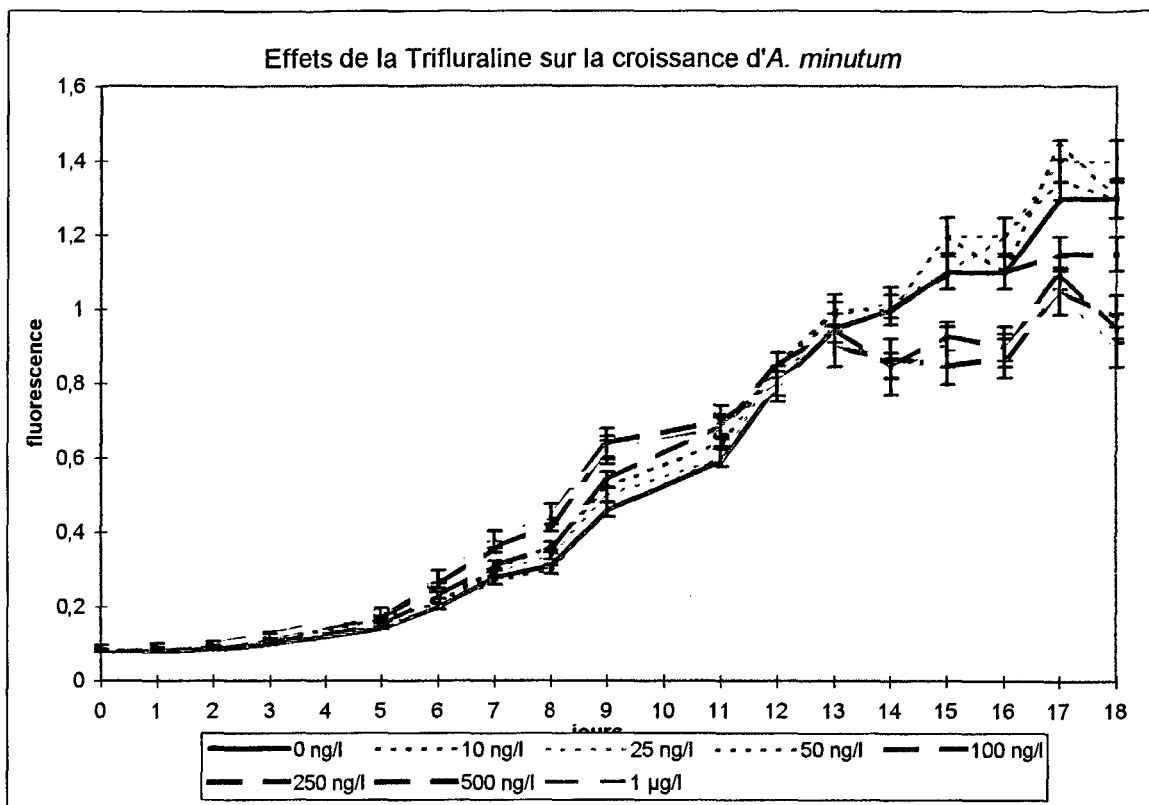


Figure 11

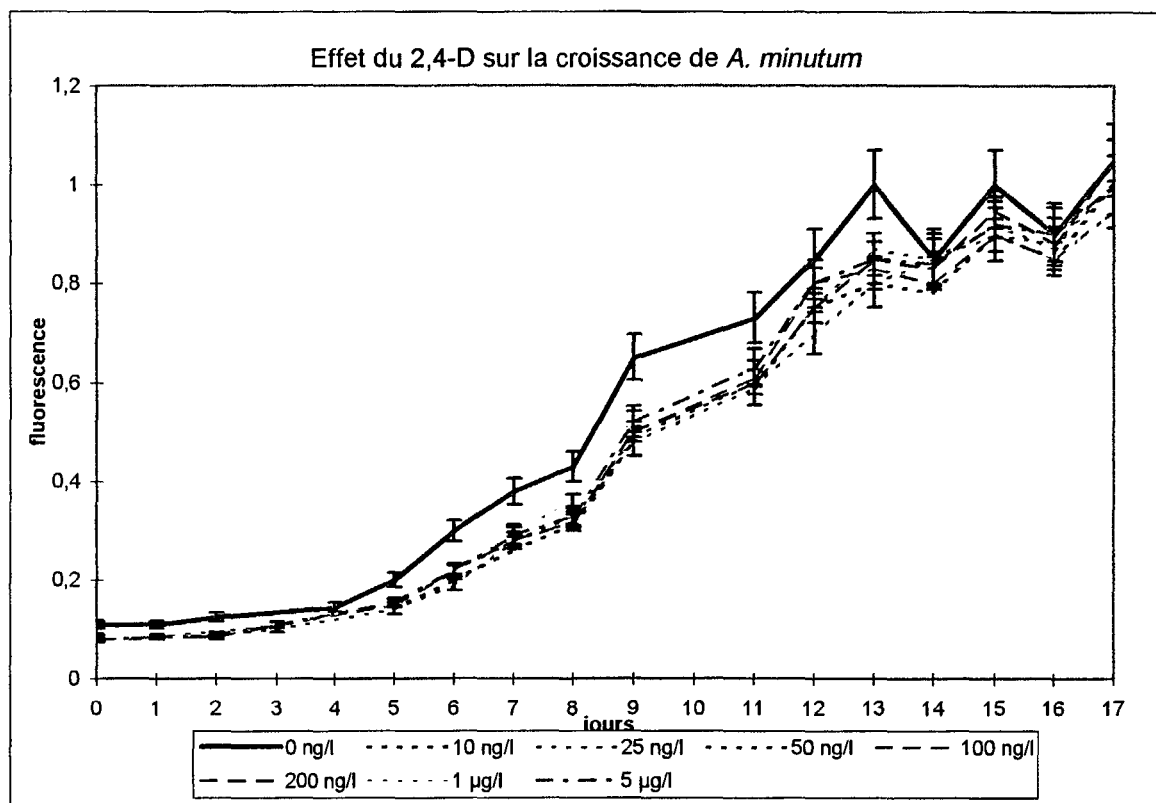


Figure 12

Effets des herbicides sur la croissance *in vitro* d'*Alexandrium minutum*

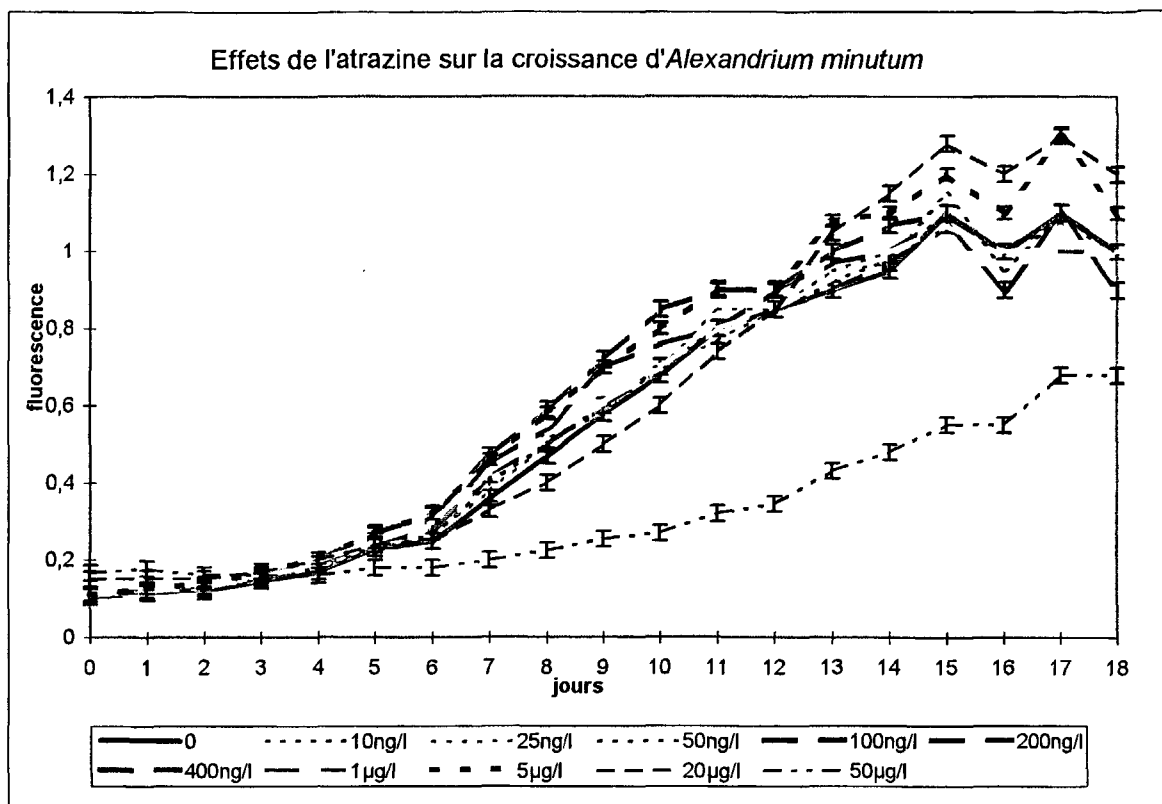


Figure 13

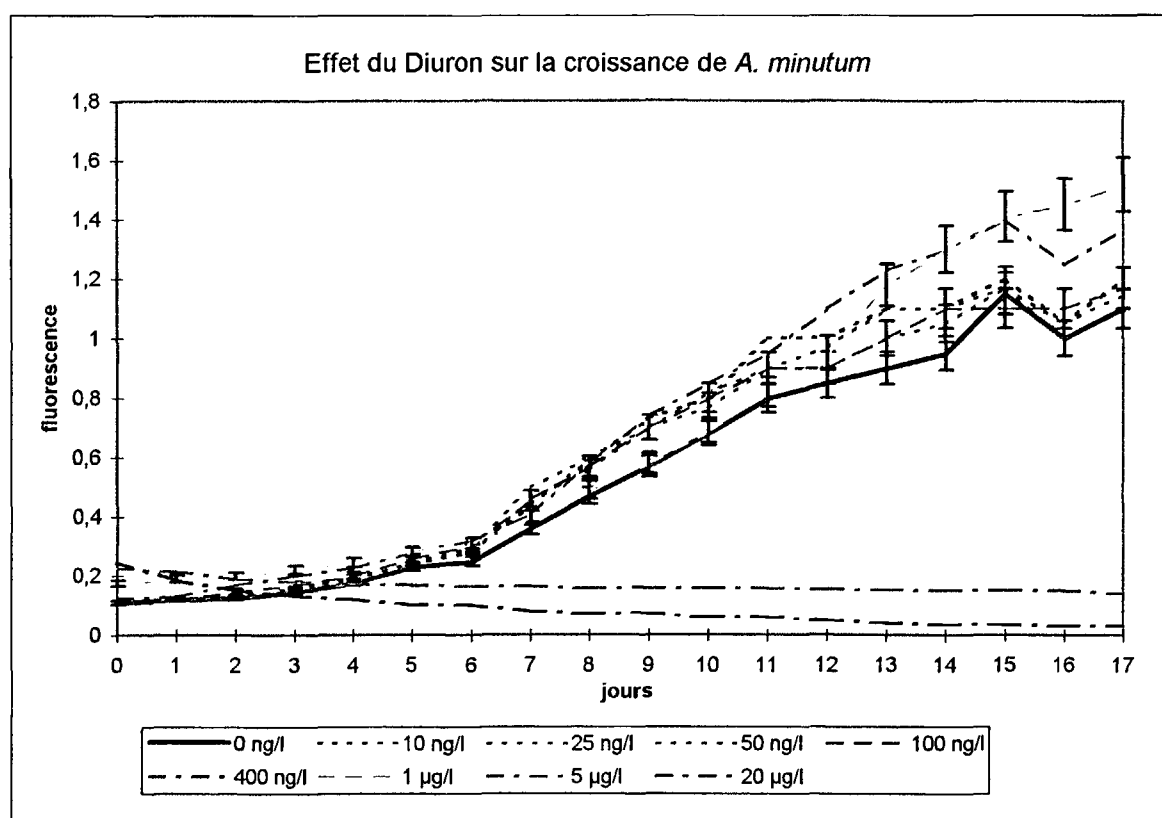


Figure 14

Effets des herbicides sur la croissance *in vitro* d'*Alexandrium minutum*

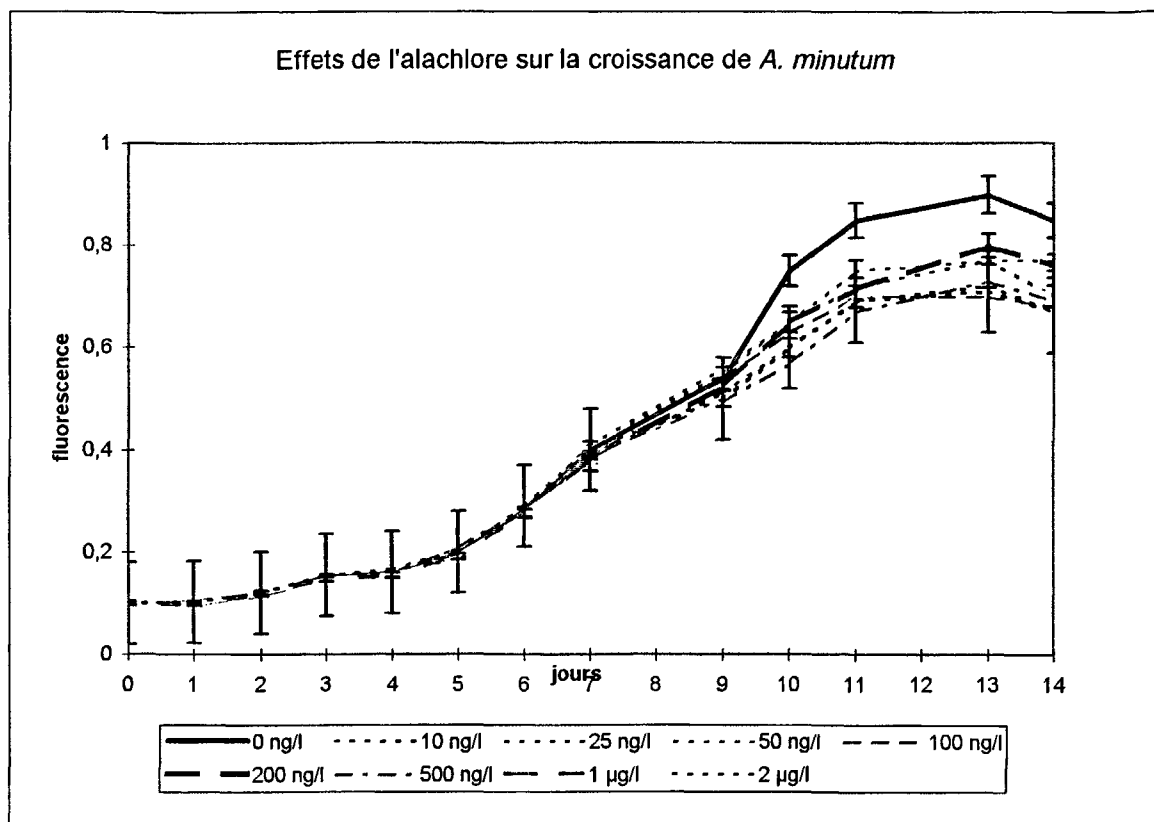


Figure 15

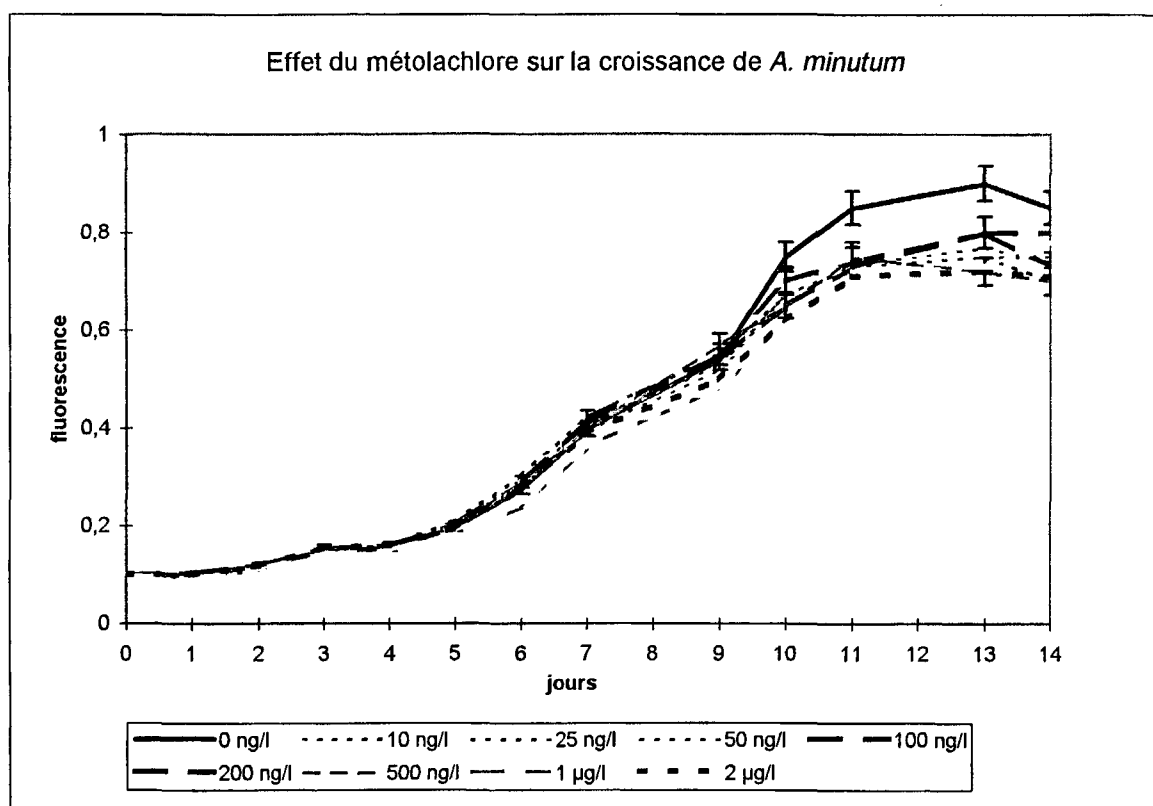
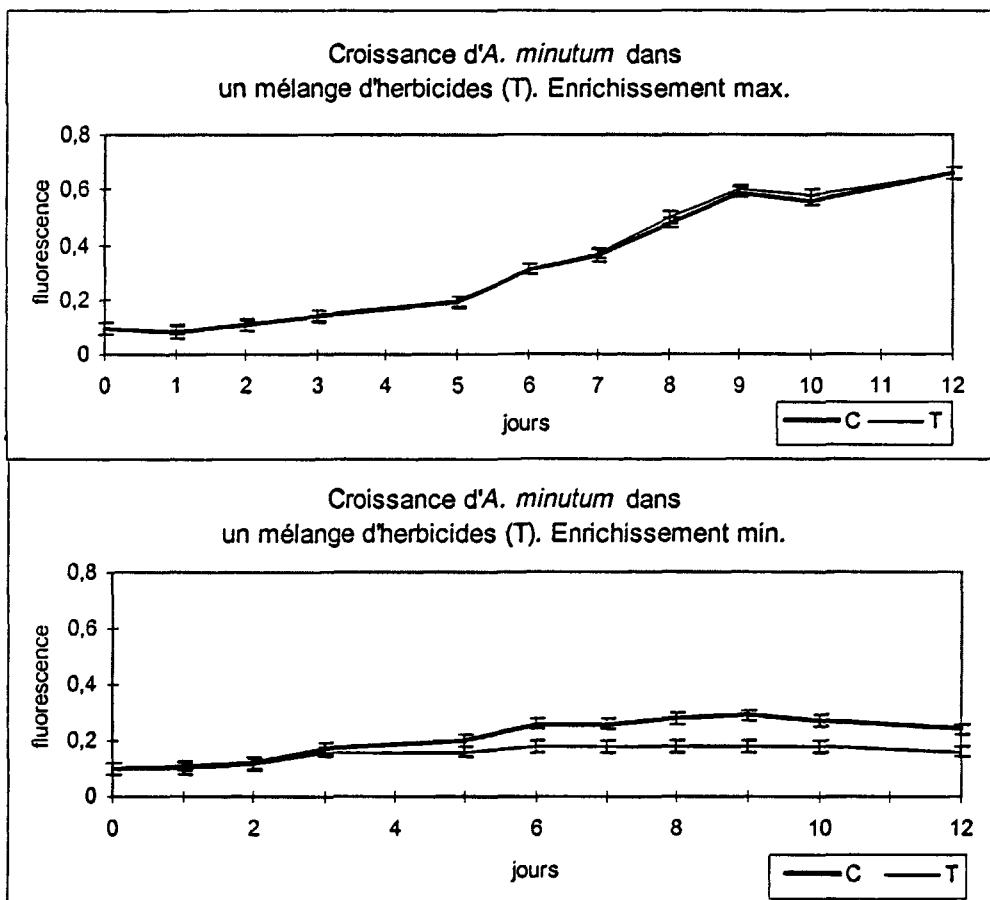
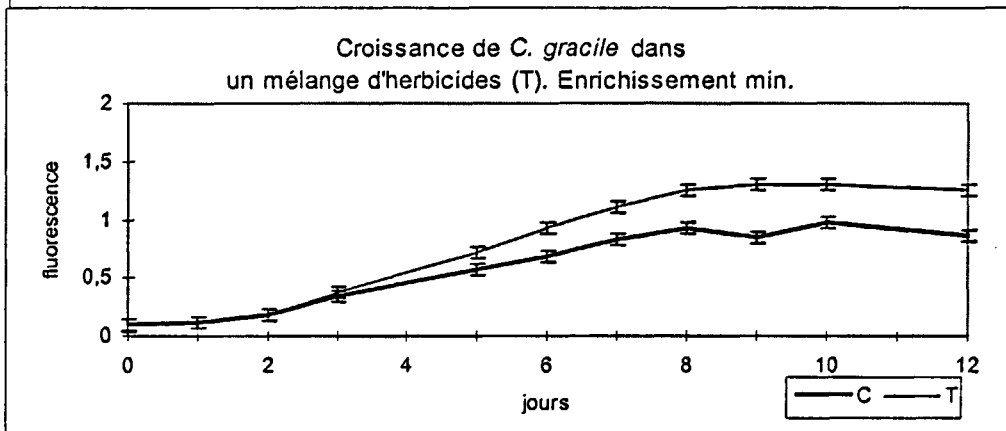
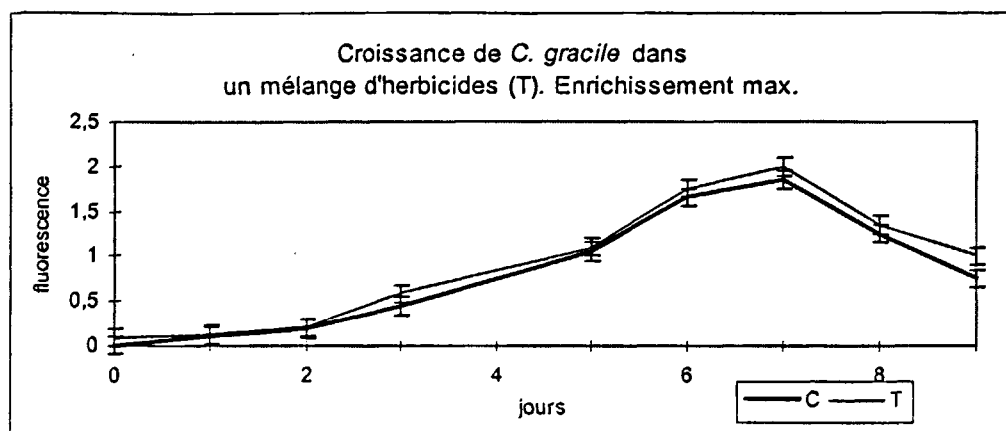


Figure 16

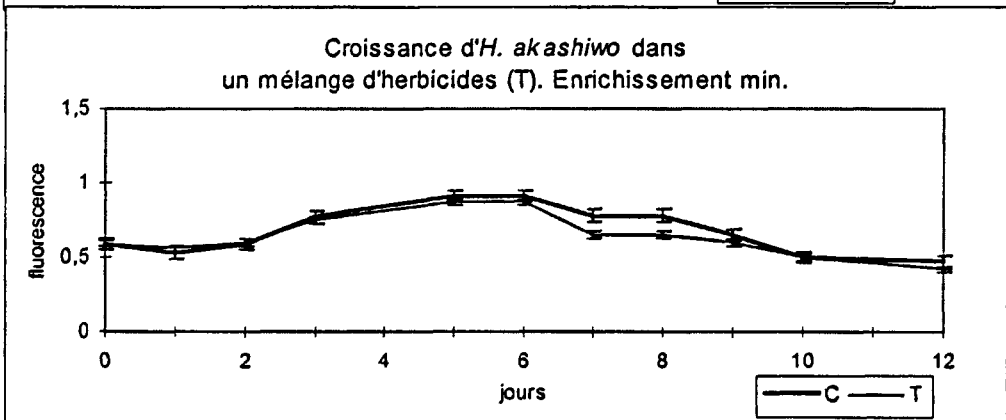
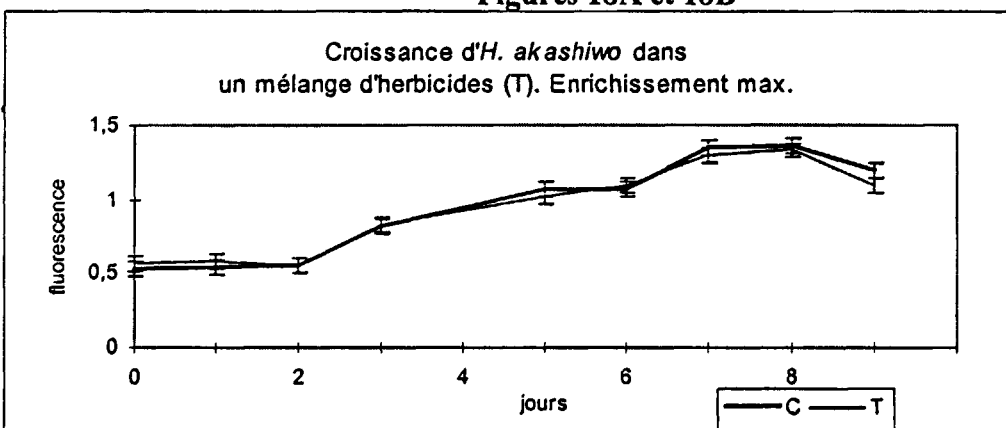
L'effet conjugué des herbicides ajoutés simultanément aux cultures d'*Alexandrium minutum* est présenté sur les figures 17A et 17B. En condition d'enrichissement maximal la croissance d'*A. minutum* n'est pas modifiée. En milieu appauvri la croissance de l'algue est ralentie dès le quatrième jour de culture. Parmi les autres espèces phytoplanctoniques testées : la diatomée *Chaetoceros gracile* est stimulée de façon significative en milieu minimum (figures 18A et 18B). La raphidophycée *Heterosigma akashiwo* est peu ou pas sensible dans les conditions similaires, l'enrichissement en sels nutritifs étant le paramètre principal qui conditionne sa croissance (figures 19A et 19B). La présence des herbicides influence peu le développement du dinoflagellé *Gymnodinium mikimotoi* dans les conditions testées (figures 20A et 20B).



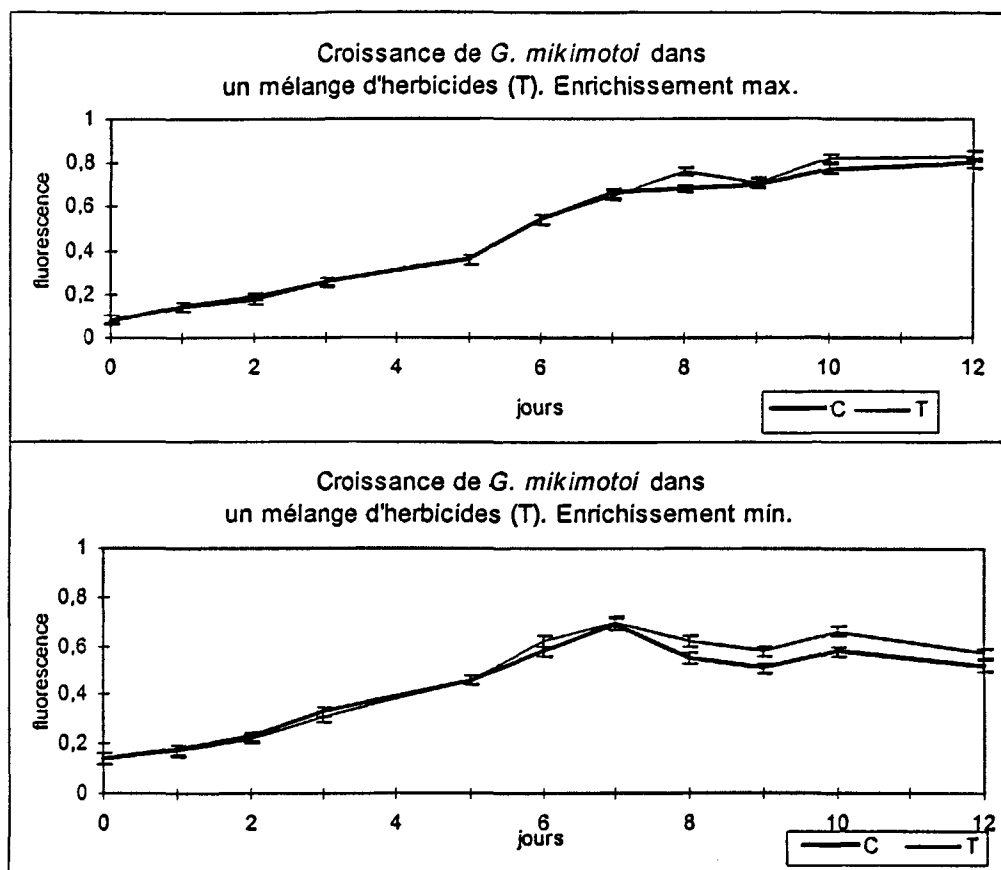
Figures 17A et 17B.



Figures 18A et 18B



Figures 19A et 19B



Figures 20A et 20B

4.3.2 Comptages cellulaires

Les comptages cellulaires ont été effectués sur une série de tubes afin de vérifier l'état des cellules et la correspondance avec les mesures de fluorescence. La concentration des cellules à diverses étapes de la culture et en présence des différentes concentrations est présentée sur les figures 21 à 26. D'après les observations, la présence d'atrazine et de diuron aux concentrations les plus élevées entraîne la formation de cellules algales plus petites.

L'effet inhibiteur de la trifluraline (Figure 21) sur la densité cellulaire apparaît aux concentrations égales ou supérieures à 100 ng/L en fin de phase exponentielle de croissance (jour 14). Le 2,4-D (Figure 22) ne présente pas d'influence significative sur les variations des densités cellulaires. Un faible effet stimulateur de l'atrazine (Figure 23) est détecté de 100 à 400 ng/L en fin de phase exponentielle, tandis qu'une inhibition de la multiplication cellulaire apparaît en milieu de phase exponentielle en présence de 50 et 20 µg/L (jour 8). Il apparaît une « récupération » de la croissance de la population algale en fin de phase exponentielle (jours 12 et 15), en présence de 20 µg/L. Le diuron (Figure 24) a une action inhibitrice sur la croissance de *A. minutum* en milieu de phase exponentielle de croissance aux concentrations égales ou supérieures à 1 µg/L. De même qu'avec l'atrazine, il semble qu'il y ait « récupération » du potentiel de croissance des algues en fin de phase exponentielle, avec 1 µg/L. Alachlor et métolachlor (Figures 25 et 26) n'ont pas d'effets apparents reliables aux concentrations sur les densités cellulaires, à l'exception de 2 µg/L.

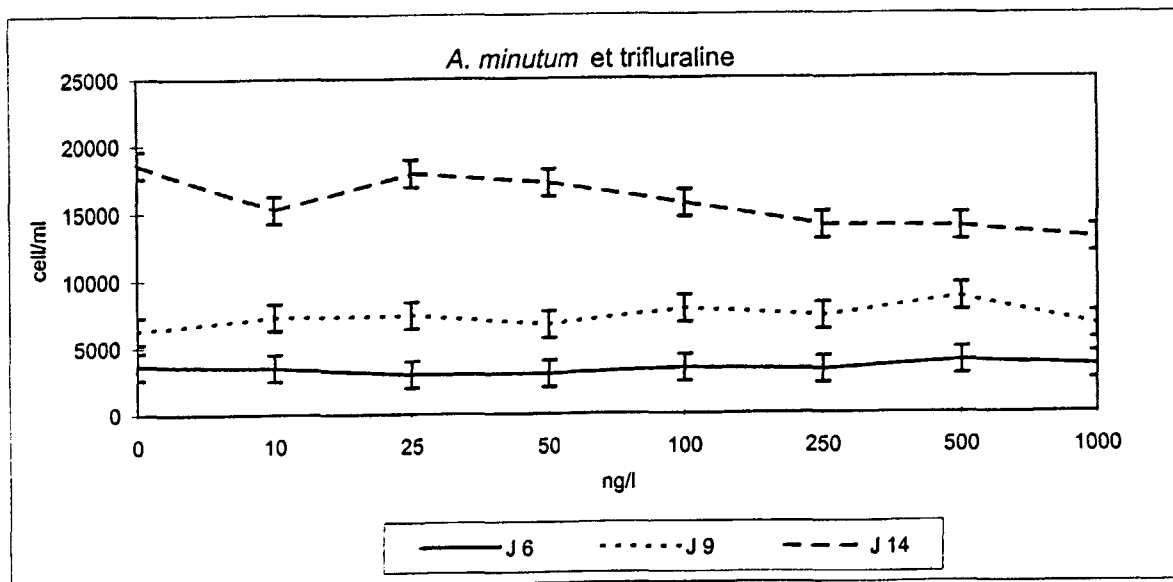


Figure 21

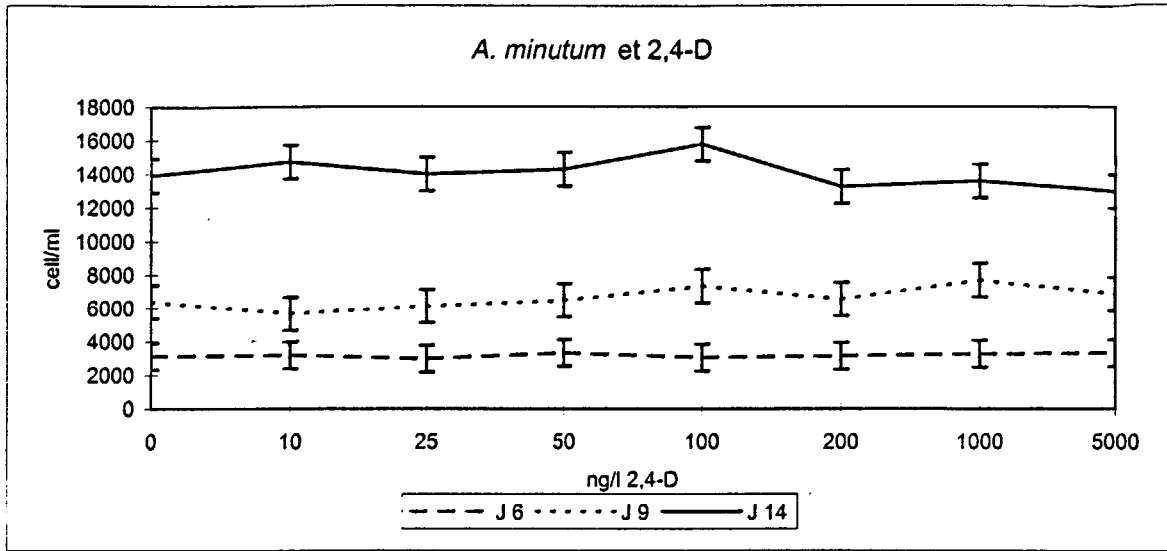


Figure 22

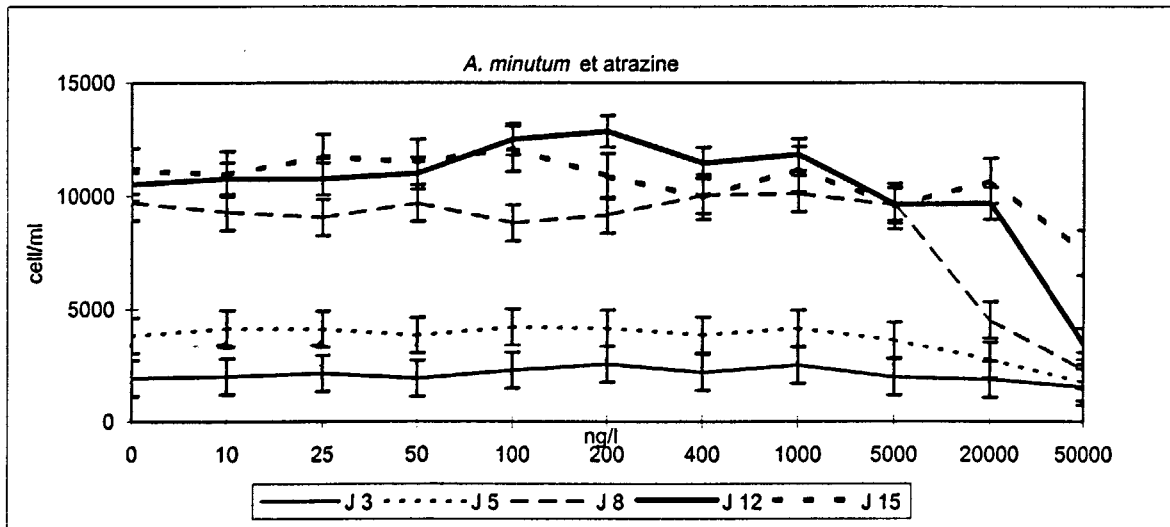


Figure 23

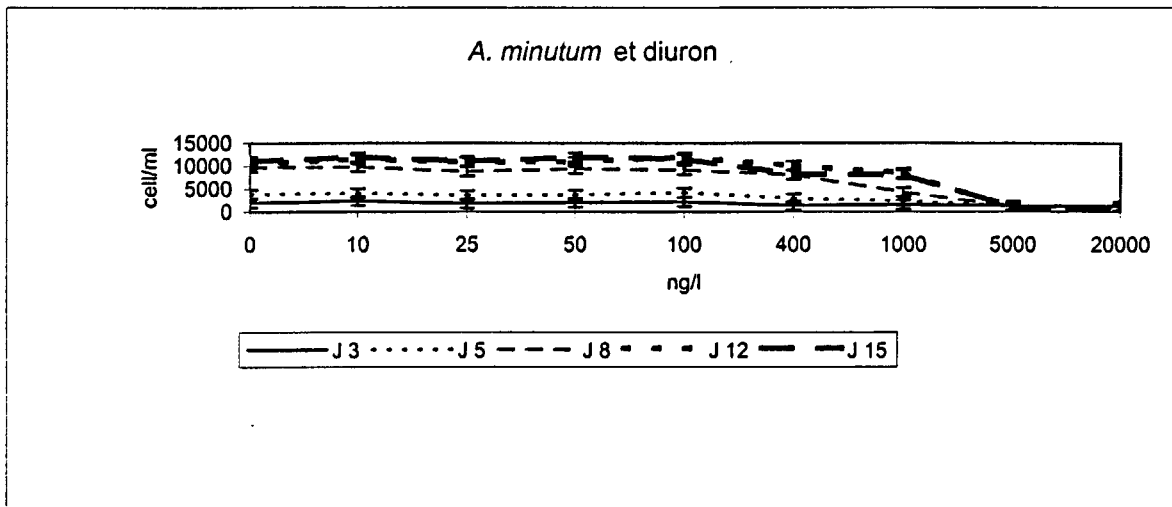


Figure 24

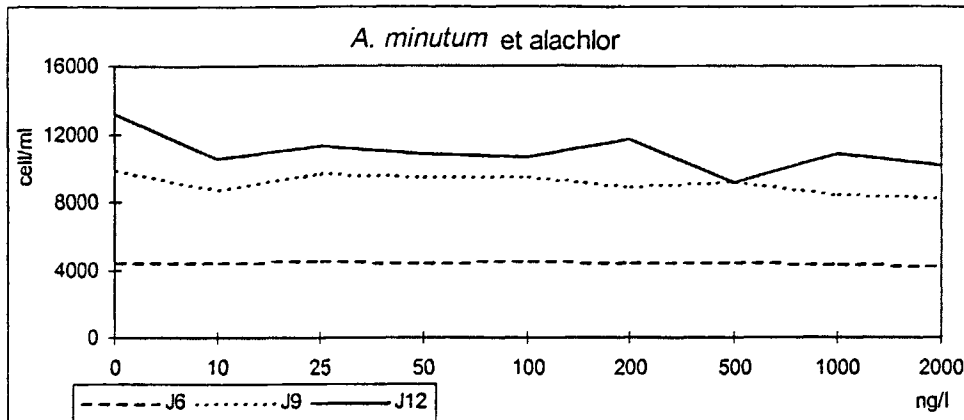


Figure 25

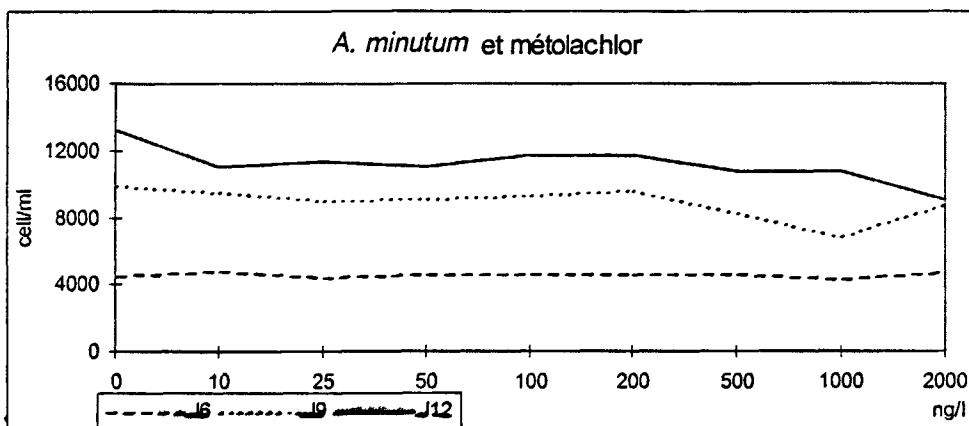


Figure 26

Compte-tenu des lectures de fluorescence et des comptages cellulaires, il est possible de calculer pour chaque test le rapport fluorescence/densité cellulaire (f/d), ce qui correspond à la fluorescence par unité cellulaire. Comparée à la valeur obtenue dans la culture sans ajout, elle permet de contrôler l'influence des substances ajoutées sur le rendement de fluorescence de la chlorophylle. Les valeurs obtenues sont résumées dans le tableau 8. Les teneurs varient légèrement au cours de la croissance des cultures, mais restent d'une façon générale inférieures à 8. Les teneurs obtenues avec les concentrations de diuron égales ou supérieures à 400 ng/L, et à l'atrazine égales ou supérieures à 5 $\mu\text{g/L}$ sont plus élevées. Ceci correspond à la réponse des algues aux effets perturbateurs des herbicides de ce type (DCMU), inhibiteurs de la photosynthèse par blocage du transfert d'électrons (Tissut et Severin, 1984 dans Bérard, sous presse). Il en résulte une élévation du rendement de fluorescence produite par l'algue. Cette réponse est utilisée pour la mise au point de tests visant à estimer le degré de pollution de l'eau ainsi contaminée, à partir de la fluorescence *in vivo* (Wilhem *et al.*, 1996; El Jay *et al.*, 1997).

Tableau 8. Valeurs fluorescence/ densité cellulaire (f/d) x10⁵ calculées pour les échantillons comptés aux stades de développement suivants : latence (L), début (D), milieu (M) et fin (F) de phase exponentielle de croissance.

stades de développement →	trifluraline				2,4-D				atrazine				diuron				alachlor				métolachlor					
	L	D	M	F	L	D	M	F	L	D	M	F	L	D	M	F	L	D	M	F	L	D	M	F		
0 ng/L		6	7	6		6	7	6		7	6	5	8		8	6	5	8		6	6	7		6	6	7
10		7	7	7		6	8	5		7	6	5	8		7	6	5	9		6	6	7		6	6	7
25		7	7	6		7	8	6		7	6	6	8		9	7	6	9		6	6	7		6	6	7
50		7	7	6		6	7	6		8	6	5	8		8	7	6	9		6	6	7		6	6	7
100		8	8	6		8	7	6		7	6	6	7		8	6	7	8		6	6	7		6	6	7
200						7	7	7		6	6	6	6							6	6	7		6	6	7
250		7	7	7																						
400										7	7	6	7		16	10	7	11								
500		7	7	6																6	5	8		6	7	7
1000		8	9	6		7	7	7		6	6	5	7		14	12	11	11		6	6	8		6	6	7
2000																				6	6	8		6	6	7
5000						7	8	7		8	7	6	10		15	12	13	16								
20000										9	9	9	9		10	10	7	6								
50000										10	10	10	10													

4.3.3 Taux de croissance μ_2

L'exploitation de ces résultats peut également se faire par le calcul des taux de croissance μ_2 encore appelé taux de doublement, caractéristiques de la dynamique d'une population.

$$\mu_2 = \frac{\ln(N_2/N_1)}{(t_2-t_1) \ln 2} \quad (\text{Guillard, 1979})$$

N_1 et N_2 sont les concentrations cellulaires présentes aux temps t_1 et t_2 , choisies au niveau de la plus grande pente de la courbe de croissance. C'est ce paramètre qui semble le plus traduire, *in vitro*, la réponse de l'espèce aux signaux extérieurs, et en présence d'autres organismes. Les valeurs de μ_2 obtenues dans les bioessais sont résumés dans le tableau 5.

La comparaison des taux de croissance μ_2 calculés pour les cultures dopées avec ceux des témoins (Figure 27) met en évidence l'absence d'effet significatif du 2,4-D aux concentrations testées, toutes inférieures à 5000 ng/L. D'une façon générale, l'algue n'est pas sensible aux concentrations les plus basses. Les concentrations-limites pour lesquelles apparaît une inhibition significative du développement sont : 500 ng/L pour la trifluraline

(17% d'atténuation du μ_2), 50 $\mu\text{g/L}$ pour l'atrazine (22% d'atténuation), 5 $\mu\text{g/L}$ pour le diuron (100% d'atténuation). Le contrôle de ces calculs par l'observation des courbes de densité cellulaire (Figures 21 à 26) et le tableau 9 ci-dessus montre que l'effet inhibiteur du diuron à 1 $\mu\text{g/L}$ sur la multiplication cellulaire est sensible à partir du 8^{ème} jour.

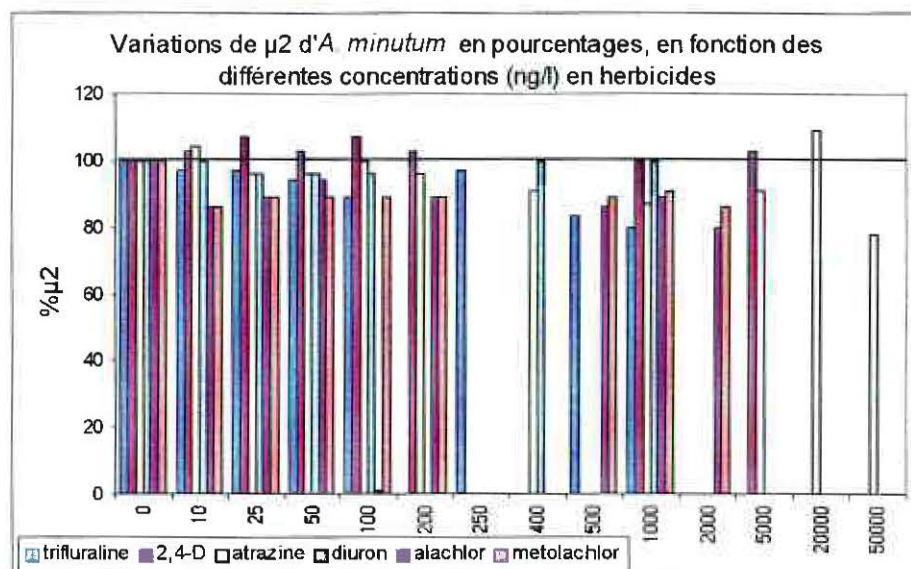


Figure 27

Tableau 9. Récapitulatif des valeurs du taux de croissance μ_2 calculé dans les bioessais pour le dinoflagellé *Alexandrium minutum*.

concentrations en ng/L	trifluraline	2,4-D	atrazine	diuron	alachlor	métolachlor
0	0.35±0.01	0.3±0.03	0.23±0.01	0.24±0.01	0.35±0.02	0.35±0.01
10	0.34±0.02	0.31±0.01	0.24±0.03	0.24	0.3±0.02	0.3±0.02
25	0.34±0.01	0.32±0.01	0.22±0.01	0.23±0.02	0.31±0.01	0.31
50	0.33±0.01	0.31±0.01	0.22±0.01	0.23±0.01	0.33±0.04	0.31±0.01
100	0.31±0.01	0.32±0.01	0.23±0.01	0.23	0.29±0.01	0.31±0.01
200		0.31±0.01	0.22±0.01		0.31	0.31±0.01
250	0.34±0.02					
400			0.21±0.01	0.24±0.01		
500	0.29±0.01				0.3±0.01	0.31±0.01
1000	0.28	0.3	0.2±0.01	0.26±0.01	0.31±0.02	0.32±0.01
2000					0.28±0.01	0.3±0.01
5000		0.31±0.01	0.21±0.01	0		
20000			0.25±0.01	0		
50000			0.18			

L'algue semble retrouver sa croissance normale en fin de culture (15ème jour). L'alachlor et le métolachlor présentent une action inhibitrice peu significative (écarts proches de 2σ) sur la croissance d' *A. minutum*, indépendante de la concentration jusqu'à 2 µg/L. Cependant, en présence d'alachlor à 2 µg/L, la valeur de μ_2 est réduite de 20%.

Les taux de croissance μ_2 calculés dans les cultures contenant la totalité des herbicides sont présentés dans le tableau 10. En milieu enrichi (max) la croissance des algues est peu influencée par l'ajout du mélange d'herbicides, à l'exception de *Gymnodinium mikimotoi* dont le taux de croissance μ_2 s'élève légèrement (16%). En milieu plus pauvre, la stimulation de croissance de cette espèce est peu significative. *Chaetoceros gracile* et *Heterosigma akashiwo* sont favorisés par l'ajout du mélange d'herbicides, et présentent un taux de croissance plus élevé de 18%. A l'opposé la croissance d'*Alexandrium minutum* est diminuée de 43 % dans ces conditions.

Tableau 10. Récapitulatif des valeurs du taux de croissance μ_2 calculé dans les bioessais sur les effets conjugués des herbicides, pour les espèces algales testées.

	μ_2 en milieu maximum			μ_2 en milieu minimum		
	controle	test	% variation	controle	test	% variation
<i>A. minutum</i>	0.36±0.01	0.36±0.01	0	0.28±0.01	0.16±0.02	-43%
<i>C. gracile</i>	0.67±0.01	0.66±0.01	0	0.39±0.03	0.46±0.03	+18%
<i>H. akashiwo</i>	0.25±0.03	0.24±0.01	0	0.16±0.02	0.13±0.02	+18%
<i>G. mikimotoi</i>	0.31±0.02	0.36±0.01	+16%	0.32±0.01	0.34±0.01	+6%

4.3.4 Taux de croissance spécifique μ

Le taux de croissance spécifique est défini par $\mu = \ln(N_{\max}/N_0)/t_{\max}-t_0$ sachant que N_0 et N_{\max} sont les densités cellulaires aux temps t_0 et t_{\max} , choisies respectivement au départ et au maximum de développement de la culture (Guillard, 1979).

Pour une espèce donnée ce paramètre permet de connaître le comportement de l'algue dans un milieu modifié par différents ajouts (Tableau 11).

Tableau 11. Récapitulatif des valeurs du taux de croissance spécifique μ calculé dans les bioessais pour le dinoflagellé *Alexandrium minutum*.

concentrations en ng/L	trifluraline	2,4-D	atrazine	diuron	alachlor	métolachlor
0	0.17±0.01	0.17±0.02	0.15±0.01	0.16±0.01	0.19±0.01	0.19±0.01
10	0.18±0.01	0.18±0.01	0.16±0.02	0.16	0.18±0.01	0.19±0.01
25	0.17±0.01	0.17±0.01	0.15±0.01	0.16±0.01	0.18	0.18
50	0.18±0.01	0.18±0.01	0.15±0.01	0.16±0.01	0.18±0.02	0.18±0.01
100	0.16±0.01	0.18±0.01	0.15±0.01	0.15	0.18±0.01	0.18±0.01
200		0.18±0.01	0.16±0.01		0.18	0.18±0.01
250	0.17±0.01					
400			0.15±0.01	0.16±0.01		
500	0.15±0.01				0.17±0.01	0.18±0.01
1000	0.15	0.17±0.01	0.15±0.01	0.14	0.18±0.01	0.18±0.01
2000					0.14±0.01	0.15
5000		0.18±0.01	0.16±0.01	0		
20000			0.14	0		
50000			0.08			

Les résultats montrent qu'aux concentrations testées, choisies proches des teneurs mesurées dans les eaux estuariennes bretonnes (Thomas et Durand, 1995), les herbicides ne modifient pas la production de biomasse chlorophyllienne à l'exception de la trifluraline à partir de 500 ng/L, l'atrazine à partir de 20 µg/L et le diuron à partir de 1 µg/L. Alachlor et métolachlor agissent à la concentration 2µg/L, nettement supérieurs aux concentrations mesurées jusqu'à maintenant.

Les valeurs obtenues dans le milieu dopé avec la totalité des herbicides en milieu enrichi maximum et minimum, pour les quatre espèces algales testées sont résumées dans le tableau 12. La croissance d'*A. minutum* apparaît peut sensible à la présence du mélange d'herbicides aux concentrations ajoutées, lorsque le milieu est enrichi comme en situation post hivernale. En revanche elle est inhibée à 33% en condition nutritive minimum. En présence d'herbicides, les autres espèces se montrent soit stimulées : *C. gracile* dans toutes les conditions, *H. akashiwo* en milieu enrichi, ou non influencées : *G. mikimotoi*.

Tableau 12. Récapitulatif des valeurs du taux de croissance spécifique μ calculé dans les bioessais sur les effets conjugués des herbicides, pour les quatre espèces algales testées.

	μ en milieu maximum			μ en milieu minimum		
	controle	test	% variation	controle	test	% variation
<i>A. minutum</i>	0.16	0.16	0	0.12	0.08±0.01	-33
<i>C. gracile</i>	0.24±0.02	0.27	+11	0.19±0.01	0.21±0.01	+10
<i>H. akashiwo</i>	0.12	0.10±0.01	+20	0.08±0.01	0.08±0.01	0
<i>G. mikimotoi</i>	0.22±0.01	0.23	0	0.23±0.01	0.23±0.01	0

A partir des valeurs de μ obtenues pour des concentrations données en herbicides il est possible dans certains cas de déduire les caractéristiques suivantes pour chacune des substances (Tableau 13) :

EC50 : concentration en herbicide produisant 50% d'atténuation de μ , obtenu par interpolation (ou extrapolation) des valeurs calculées,

LOEC : concentration testée la plus basse en herbicide, produisant 20 % d'atténuation de la valeur de μ ,

NOEC : concentration testée la plus élevée en herbicide, ne produisant pas d'atténuation de μ . La valeur de référence de μ considérée dans ces calculs est celle du contrôle, et il n'est pas tenu compte de la tendance stimulatrice observée avec les faibles concentrations (hormèse).

Tableau 13. Concentrations en herbicides correspondant à la EC50, LOEC et NOEC, exprimées en ng/L, pour *A. minutum* en milieu maximum simulant la situation post-hivernale.

	diuron	2,4-D	atrazine	trifluraline	alachlor	métolachlor
EC50	2700	/	57000	/	/	/
LOEC	1000	/	20000	500	<2000	<2000
NOEC	>400	>5000	5000	250	>1000	>1000

Les résultats confirment les observations précédentes : 2,4-D, trifluraline, alachlor et métolachlor ont été testés à trop faibles concentrations pour qu'il soit possible, dans nos conditions expérimentales, d'en déterminer les EC50.

4.3.5 Analyse chimique

L'analyse chimique du 2,4-D dans les cultures inoculées à 5 μ g/L a montré qu'il y avait la concentration 6.57 μ g/L après 18 jours de culture (précision), ce qui laisse supposer qu'il n'y a pas eu dégradation de la substance au cours de l'incubation. La trifluraline, inoculée à 1 μ g/L, était à 22 ng/L après la même durée. Dans ce cas il y aurait donc une dégradation de la substance soit par photolyse, ou action biochimique des cellules.

Les travaux de El Dib *et al.* (1989) montrent l'aptitude de *Scenedesmus* à absorber l'atrazine à faible dose, ce qui laisse supposer sa métabolisation à des fins énergétiques.

4.4- Conclusion

Nos résultats montrent la relative insensibilité d'*Alexandrium minutum* à la présence des herbicides utilisés en dopage dans les cultures de laboratoire, aux concentrations mesurées dans les eaux estuariennes de la Baie de Morlaix (salinité 20 à 30). Compte-tenu des concentrations maximales mesurées *in situ* en Baie de Morlaix en 1998, la trifluraline (maximum 40 ng/L), l'atrazine (max 7 ng/L), et 2,4-D n'ont pas d'action significative sur la croissance du dinoflagellé dans les conditions de nos expériences : enrichissements élevés, cultures monospécifiques, éclairage optimum. Le diuron à concentrations inférieures à 1 µg/L (maximum mesuré 250 ng/L) est toujours légèrement stimulant pour la culture. Alachlor et métolachlor exercent une action peu inhibitrice sur le développement de l'algue, en deçà de 2 µg/L.

D'une façon générale les herbicides peuvent agir sur les végétaux au niveau de la photosynthèse comme l'atrazine et le diuron, ou au niveau des divisions cellulaires : c'est le cas par exemple de la trifluraline et du 2,4-D. L'action de ce derniers s'apparente à celle de l'auxine 3-indolacétique, ce qui peut expliquer les variations rapides observées dans la relation effet-dose pour ces produits, lorsque l'intervalle des concentrations testées est faible. D'autres herbicides, comme l'alachlor et le métolachlor, n'ont pas encore un mode d'action bien identifié. Nos résultats montrent que l'ajout simultané des six herbicides en conditions maximales d'enrichissement (situation-type hivernale) n'a pas d'influence sur le développement de la culture d'*Alexandrium minutum* (μ_2 inchangé), tandis que le dinoflagellé ichtyotoxique *Gymnodinium mikimotoi* présente une stimulation de croissance, légère mais significative. En revanche, en condition d'enrichissement minimal correspondant à une situation estivale, *Alexandrium minutum* est fortement inhibé par les herbicides dont les actions toxiques semblent agir en synergie. Les résultats obtenus avec les autres espèces montrent que *Heterosigma akashiwo* (ichtyotoxique) et *Chaetoceros gracile* sont stimulées jusqu'à 18 %, et *G. mikimotoi* à un degré moindre.

Ces résultats montrent que l'espèce *A. minutum* cultivée en laboratoire ne présente pas une grande sensibilité vis-à-vis des herbicides, aux concentrations mesurées jusqu'à présent dans les eaux côtières. Néanmoins, étant donné les sensibilités des autres espèces algales, celle-ci est susceptible de s'adapter au milieu et auprès d'autres populations affaiblies par le stress des herbicides, occuper un espace plus important dans l'écosystème. Ceci est d'autant

plus réalisable que la réponse des organismes varie en fonction des conditions saisonnières (températures, lumières), et physicochimiques (nutriments, salinités, hydrodynamisme) (Bérard, 1997).

4.5- Références

Antia N.J., Harrison P.J., Oliveira L., 1991. Phycological reviews II : The role of dissolved organic nitrogen in phytoplankton nutrition, cell biology and ecology. *Phycologia*, 30, 1-89.

Bérard A., Pelte T., Menthon E., Drart J.C. Bourrain X., 1998. Caractérisation du phytoplancton de deux systèmes limniques vis-à-vis d'un herbicide inhibiteur de la photosynthèse. La méthode PICT(Pollution-Induced Community Tolerance) : application et signification. *Annls Limnol.* 34(3) : 269-282.

Bérard, A., 1999. Les herbicides inhibiteurs du photosystème II, effets sur les communautés algales et leur dynamisme. *Revue des Sciences de l'Eau*, 12, 2, 34p.

Daydier, L. 1996. Interactions toxiques dans les écosystèmes et biotechnologies liées aux toxines. *Stage de DEA- Collège de France Concarneau*. Année 1996-1997. 40p.

El Dib, M.A.; Shehata, S.A.; Abou Waly, H.F., 1989. Response of freshwater alga *Scenedesmus* to triazine herbicides. *Water, Air and Soil Pollution*, 48: 307-316.

El Jay,A., Ducruet, J.M., Duval, J.C., Pelletier, J.P., 1997. A high-sensitivity chlorophyll fluorescence assay for monitoring herbicide inhibition of photosystem II in the chlorophyte *Selenastrum capricornutum* : a comparison with effect on the cell growth. *Arch. Hydrobiol.*, 140, 273-286.

Erard-Le Denn, 1997. *Alexandrium minutum*. Efflorescences algales toxiques des eaux côtières françaises. *Ecologie, écophysiologie, toxicologie*. Berland et Lassus éditeurs. Publ. IFREMER, p 53-65.

Glévarec G., 1999. Effet du nicosulfuron et du glyphosate sur la croissance *in vitro* du phytoplancton marin (*Chaetoceros gracilis*). Rapport de stage de Maîtrise de Biologie Cellulaire et Physiologie, mention Biologie Végétale, Université de Rennes I. Pôle Analytique des Eaux-Plouzané. 18 p. + annexes.

Guillard, R.R.L , 1979. Culture Methods and Growth measurements. *In* : Stein, J.R. (Eds), Handbook of Physiological Methods. Cambridge Univ. Press, pp. 289-311.

Guillard, R.R.L. and Ryther, J.H.,1962. Studies of Marine Planktonic Diatoms. 1 *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve). *Gram. Can. J. Microbiol.* 8 : 229-239.

Guillaud, J.F. et Aminot, A.(1990).Devenir des éléments nutritifs en zone littorale. La mer et les rejets urbains. Actes du colloque, Bendor 13-15 juin. Guillaud et Romana eds. IFREMER publ. p.27-33.

His, E. et Seaman, M., 1993. Effect of twelve pesticides on larvae of oysters (*Crassostrea gigas*) and on two species of unicellular marine algae. *ICES C.M.* 1993/E : 22. 8p.

Schäfer H., Wenzel A. Fritsche U., Röderer G., Traunspurger W., 1993. Long term effects of selected xenobiotica on freshwater green algae : development of a flow-through test system. *The Science of the total Environment*, supplement, 735-929.

Thomas, S.et Durand, G., 1995. Suivi des pesticides dans la rade de Brest. Actes du Colloque 3èmes rencontres scientifiques internationales, 14-15-16 mai 1995, Programme Rade. Vol. 1, pp. 373-380.

Tissut, M., Severin, F., 1984. Plantes Herbicides et Désherbage, bases scientifiques et techniques, edt Acta, 128-131.

Uensal, M., 1992. Effects of herbicides on the growth of marine phytoplankton. Proceedings of the FAO-UNEP-IOC workshop on the biological effects of pollutants on marine organisms. *MAP Rech. Rep. Ser.*, 69, 255-264.

Wilhem, C., Conrad, R., Meitzler,L. and Mühlenweg, A., 1996. Combination of solid phase extraction and microalgal test system based on pulse amplitude modulated fluorescence to detect photosystem II herbicides up to 0.05 µeq/l. *J. Appl. Phycol.*, 8: 171-173.

5- Etude du phytoplancton naturel

L'utilisation massive d'herbicides dans les zones agricoles et urbaines entraîne successivement la contamination des eaux de ruissellement, des rivières, des estuaires voire des eaux marines côtières. Ces apports d'herbicides dans le milieu estuarien et marin peuvent donc agir sur le développement des microalgues. Les résultats de tests réalisés *in vitro*, à partir d'algues cultivées en laboratoire, ont montré en effet une sensibilité différente des espèces algales selon les concentrations d'herbicides utilisées et confirment le rôle sélectif de ces substances dans les développements phytoplanctoniques (Arzul et Durand, 1995). *In situ*, les concentrations de pesticides sont plus faibles que celles testées en laboratoire mais les populations naturelles de phytoplancton peuvent présenter une sensibilité différente en raison d'une part, de leur faible densité cellulaire et d'autre part, de leur état sauvage (Bérard et Pelte, 1999). Afin de cerner de plus près l'impact des herbicides sur la production phytoplanctonique, il importe donc de tester la toxicité des principaux herbicides présents *in situ* sur des populations naturelles plurispécifiques.

Les herbicides choisis pour les tests sont les plus utilisés dans les bassins versants bretons et par conséquent, les plus abondants dans les eaux côtières. Ils sont soit d'usage agricole comme l'atrazine, de loin le plus employé, la triflurarine, l'alachlore et son dérivé, le métolachlore soit d'usage non-agricole comme le 2,4-D et le diuron. L'action de chacun de ces pesticides sur la croissance phytoplanctonique sera étudiée afin de déterminer la sensibilité du phytoplancton naturel à ces substances et les possibles conséquences sur le développement d'espèces intempêtes comme *Alexandrium minutum* dans les estuaires de la Baie de Morlaix. Le développement de ce dinoflagellé toxique est en effet responsable de la contamination des coquillages entraînant la fermeture des zones conchylicoles pendant sa période de développement maximum.

En conséquence, deux périodes d'intervention ont été choisies pour déterminer l'effet des pesticides sur la croissance du phytoplancton : la période printanière au cours de laquelle se développent les diatomées, base de l'alimentation des bivalves filtreurs, et le début de la période estivale au cours du développement d'*Alexandrium minutum*.

5.1- Protocole expérimental

5.1.1- Période printanière (année 1998) : Croissance des diatomées.

Deux séries de bioessais ont été effectuées :

- l'une sur des eaux de surface provenant de l'estuaire de la Penzé, au niveau du Pont de la Corde, d'une salinité de 23,4 ‰ enrichie en sels nutritifs par les apports de la rivière (570

$\mu\text{mol/L}$ de N-NO_3^- et $2.7 \mu\text{mol/L}$ de P-PO_4^{3-}). Ce point a été choisi en raison de l'apparition fréquente d'*Alexandrium minutum* en période estivale

- l'autre sur des eaux marines (salinité de 34,1 ‰) constituant un point de référence situé hors de l'influence de la rivière ($12.14 \mu\text{mol/L}$ de N-NO_3^- et $0.33 \mu\text{mol/L}$ de P-PO_4^{3-}).

Les prélèvements ont été effectués le 21 avril 1998. Chaque prélèvement de 80 litres est réparti dans 8 ballons de culture de 12 L. Pour assurer la croissance phytoplanctonique, les éléments nutritifs ont été ajoutés selon les concentrations utilisées pour les milieux mésotrophes (Maestrini *et al.*, 1984) au point de référence. Compte tenu de l'enrichissement en nitrates des eaux de l'estuaire, cet élément n'a pas été ajouté dans les cultures concernant ces eaux. Les autres éléments nutritifs majeurs (phosphates et silicates) ont été ajoutés en concentration réduite soit $0,8 \mu\text{M}$ de P-PO_4^- et $5 \mu\text{M}$ de Si-Si(OH)_2^- .

Les cultures sont effectuées dans les conditions les plus proches des conditions naturelles soit à une température de 11°C , un éclairage de $110 \mu\text{moles de photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ et une photopériode J/N de 13/11. Les cellules algales sont maintenues en suspension par bullage. Au jour J_0 , des apports de pesticides (valeurs théoriques) ont été effectués dans chaque série de bioessais de la manière suivante:

- sans apport (témoin)
- avec apport soit d'alachlore (200 ng/L)
 - soit d'atrazine (400 ng/L)
 - soit de 2,4-D (200 ng/L)
 - soit de diuron (400 ng/L)
 - soit de métolachlore (200 ng/L)
 - soit de trifluraline (100 ng/L)
 - soit de tous les pesticides précédemment cités et aux concentrations indiquées ci-dessus).

Les dosages de pesticides dans la rivière de Penzé débutant avec cette étude, les concentrations utilisées ci-dessus correspondent à des valeurs moyennes mesurées en Rade de Brest.

5.1.2- Période estivale (année 1999): Croissance d'*Alexandrium minutum*.

Au cours de l'année 1998, *Alexandrium minutum* ne s'est pas développée dans la rivière de Penzé ni plus généralement en Bretagne. L'étude concernant l'effet des herbicides sur cette espèce a donc été reportée à 1999.

Le suivi du développement d'*A. minutum* étant effectué par ailleurs (Contrat Agence de l'Eau Loire-Bretagne / U.B.O. " Développement d'*Alexandrium minutum* dans l'estuaire de la Penzé (baie de Morlaix). Rôle de l'azote et du phosphore); un premier prélèvement d'eau pour

la mise en culture du phytoplancton a été réalisé le 18 juin dans une masse d'eau de salinité voisine de 27 ‰ (26,8 ‰ -27,1 ‰) à une température de 17,2°C. Les concentrations de nitrates et de phosphates étaient de 281 et 2.15 µmol/L, respectivement.

De retour au laboratoire, l'eau prélevée a été répartie dans 16 ballons de culture de 12 L. Les éléments nutritifs ont été ajoutés aux concentrations utilisées en période printanière. Les cultures ont été réalisées à 17°C avec un éclaircissement de 110 µmoles de photons m⁻² s⁻¹ et une photopériode J/N de 15/9. Pour favoriser la croissance des dinoflagellés, les cultures ont été effectuées sans bullage. Pour cette série de bioessais, cinq herbicides ont été testés à trois concentrations chacun. Les pesticides ont été ajoutés aux concentrations suivantes (valeurs théoriques) à raison d'un pesticide et d'une dose par ballon, un ballon sans ajout de pesticide servant de témoin :

- Trifluraline : 10, 55 et 100 ng/L
- 2,4-D : 100, 200 et 400 ng/L
- Alachlore : 50, 100 et 200 ng/L
- Atrazine : 10, 100 et 400 ng/L
- Diuron : 25, 100 et 400 ng/L

Les concentrations de pesticides ajoutées ont été établies d'après les résultats d'Arzul et Durand (1999) obtenus sur des cultures d'*Alexandrium minutum* et des mesures effectuées *in situ*.

Compte tenu du biais possible apporté aux résultats, au cours de la croissance de la culture par l'extrême abondance des diatomées (voir plus loin), un second prélèvement a été effectué le 25 juin lors de l'eau colorée à *Alexandrium minutum* dans une masse d'eau de salinité voisine de 26 ‰ (24,8 ‰-26 ‰). La densité cellulaire de ce dinoflagellé était alors de l'ordre de 20 millions de cellules/L. Pour favoriser la croissance de la population, la suspension algale a été diluée avec de l'eau de mer de salinité 26 ‰ afin d'obtenir une densité cellulaire voisine de 6 millions de cellules/L. Cette nouvelle suspension algale a été répartie dans 16 flacons de culture à raison de 250 mL/flacon. Les herbicides ont été ajoutés aux mêmes concentrations que dans les bioessais précédents. Cette série de cultures sera appelée "minitests" par opposition aux "bioessais" en grand volume.

Au cours de ces différents essais, des prélèvements quotidiens (volume suffisant pour l'ensemble des dosages) ont été effectués sur chaque culture pour déterminer la concentration en chlorophylle *a* (Chl *a*) de la culture (estimation de la croissance) par fluorométrie selon la méthode de Yentsch et Menzel (1963) et les équations de Lorenzen (1966). Des échantillons ont été prélevés tous les jours ou tous les deux jours pour suivre l'évolution de la composition phytoplanctonique (méthode d'Utermöhl, 1931). Dans les bioessais en grand volume, la production primaire a été mesurée par incorporation de NaH¹⁴C₃ (méthode de Steemann Nielsen, 1952).

5.2- Résultats et discussion

5.2.1- Situation printanière

5.2.1.1- Apports de pesticides

Les concentrations de pesticides dosées immédiatement après leur apport dans les différents milieux de culture (Laboratoire d'Analyses de Brest Océan) montrent un écart parfois important avec les valeurs théoriques des ajouts vraisemblablement lié au faible rapport de volume entre herbicide injecté (250 à 500 μL) et culture (10L)(Tab.14). Il est vraisemblable que le métolachlore a été omis dans le mélange de pesticides. Dans le milieu naturel, on n'observe aucune présence d'herbicide dans les eaux marines.

Tableau 14 : Concentrations de pesticides (ng/L) dosées dans les différents milieux de culture.

	Point de Référence	Pont de la Corde				
	1 seul pesticide	Mélange	Témoin	1 seul pesticide	Mélange	Témoin
Alachlore	280	168	0	68	47	0
Atrazine	394	475	0	425	374	20
2,4 D	< 53*	< 53*	0	374	456	0
Diuron	494	1322	0	598	734	50
Métolachlore	399	<2*	0	386	<2*	0
Trifluraline	106	147	0	118	530	0

* limite de détection

Par contre, dans les eaux estuariennes, l'atrazine (20 ng/L) et son dérivé le dééthylatrazine (40 ng/L), le diuron (50 ng/L) et la trifluraline (9 ng/L) ont été détectés.

5.2.1.2- Action des pesticides sur l'évolution des cultures

5.2.1.2.1- Biomasse chlorophyllienne

Au point de référence, les teneurs initiales en chlorophylle sont très faibles (0,9 $\mu\text{g/L}$). La phase de latence des courbes de croissance (Fig.28) dure plus de 48 h suivie d'une phase de croissance en deux temps : du 3^{ème} au 5^{ème} jour de culture, une croissance relativement lente de la communauté phytoplanctonique puis au 6^{ème} jour, une brusque augmentation de la biomasse chlorophyllienne. Le pic de chlorophylle est atteint alors simultanément dans toutes les cultures atteignant 88 $\mu\text{g/L}$ dans le milieu témoin. Au Pont de la Corde, la biomasse chlorophyllienne initiale est deux fois plus élevée qu'au point marin (1,9 $\mu\text{g/L}$). La phase

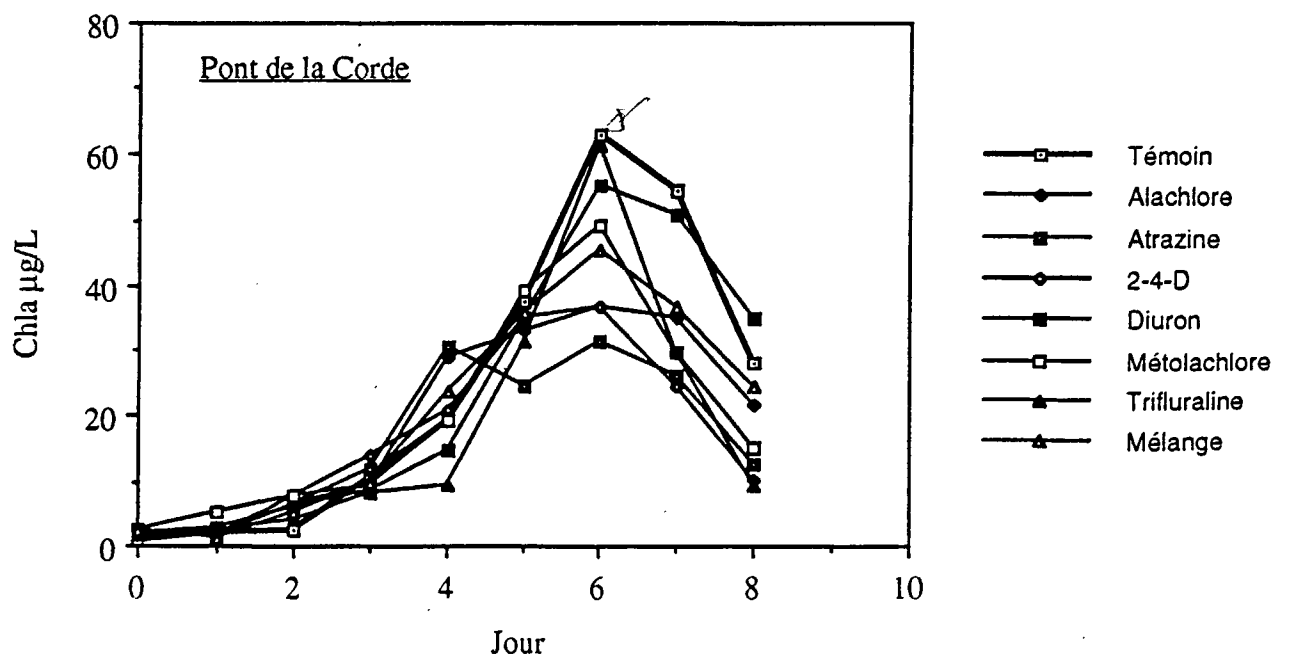
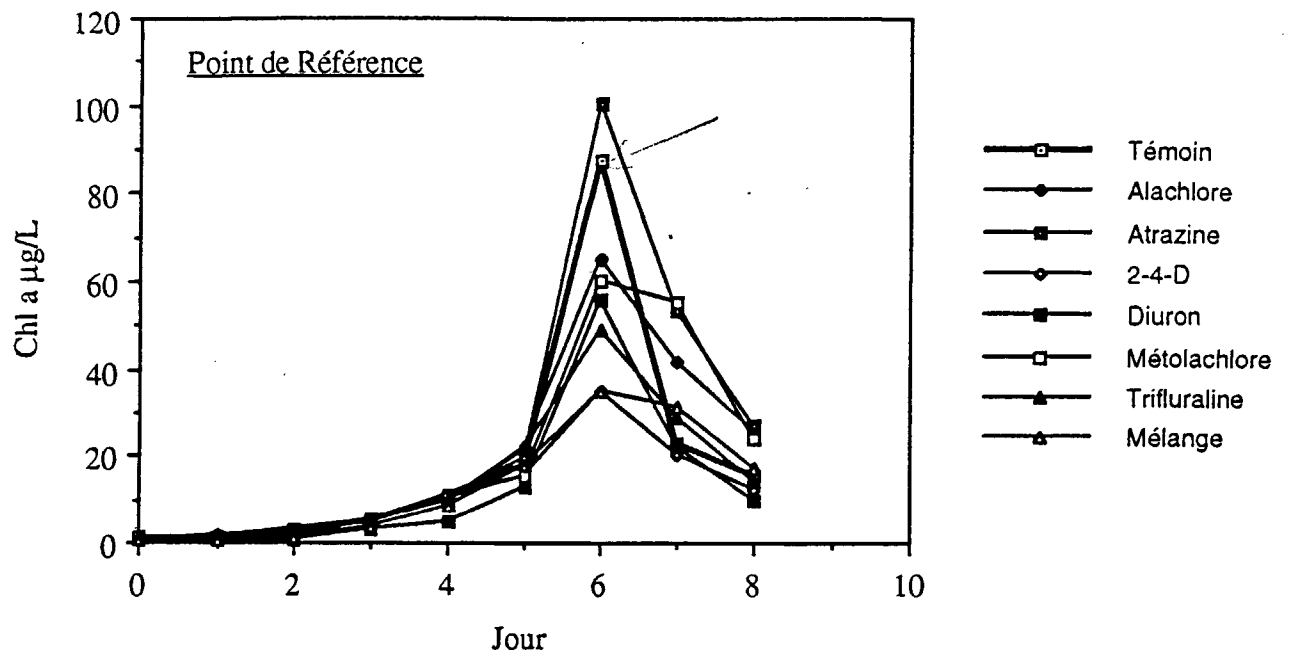


Figure 28 - Evolution de la chlorophylle *a* dans les différents milieux de culture en avril.

exponentielle de croissance débute au 2^{ème} jour de culture et se prolonge jusqu'au 6^{ème} jour dans la plupart des milieux. Le maximum de chlorophylle est obtenu généralement au 6^{ème} jour de la croissance (63 µg/L chez le témoin). Dans les milieux enrichis en alachlore et en atrazine, les valeurs maximales de chlorophylle sont atteintes plus rapidement et restent constantes pendant 3 jours. Après le 7^{ème} jour de culture, les concentrations en chlorophylle chutent rapidement du fait de l'épuisement du milieu en éléments nutritifs.

5.2.1.2.2- Production carbonée

Parallèlement à l'augmentation de biomasse chlorophyllienne, la production en carbone a été suivie dans les différentes cultures (Fig.29). Le maximum de production primaire est atteint plus rapidement (4^{ème} jour) dans la plupart des cultures provenant du milieu estuarien que dans les eaux marines (5^{ème} jour). A cet égard, on peut également noter que les pics de production devancent d'1 jour (point de référence) ou 2 jours (Pont de la Corde) les pics de chlorophylle. Par ailleurs, le pic de production est approximativement deux fois plus élevé pour la culture témoin du Pont de la Corde (123 µg C fixé/L/h) que dans celle du point de référence (70 µg C fixé/L/h).

L'évolution de la production carbonée aussi bien que celle de la biomasse chlorophyllienne dans les différents milieux de culture met en évidence des différences ~~souvent marquées entre la croissance~~ des cultures enrichies en pesticides et celle du milieu témoin. On peut déterminer l'impact de chaque pesticide sur la croissance de la communauté phytoplanctonique en établissant les rapports entre la biomasse ou la production carbonée maximale obtenue dans chacun des milieux testés et celle obtenue dans le milieu témoin (Fig.30). Il est manifeste qu'hormis le diuron, les pesticides testés aux concentrations utilisées ont peu d'influence sur la production de carbone ou la stimulent que ce soit dans les eaux marines ou les eaux estuariennes. Par contre, leur action est bien marquée sur la biomasse chlorophyllienne maximale.

Les résultats précédents concernant la biomasse chlorophyllienne et la production carbonée représentent la réponse de l'ensemble des communautés phytoplanctoniques. Il paraît intéressant d'estimer l'impact de ces herbicides sur les principales espèces représentées dans le milieu.

5.2.1.2.3- Composition spécifique du phytoplancton

A cette époque de l'année, les populations phytoplanctoniques sont composées de diverses diatomées dont l'espèce dominante, au point marin comme au point estuarien, est *Skeletonema*

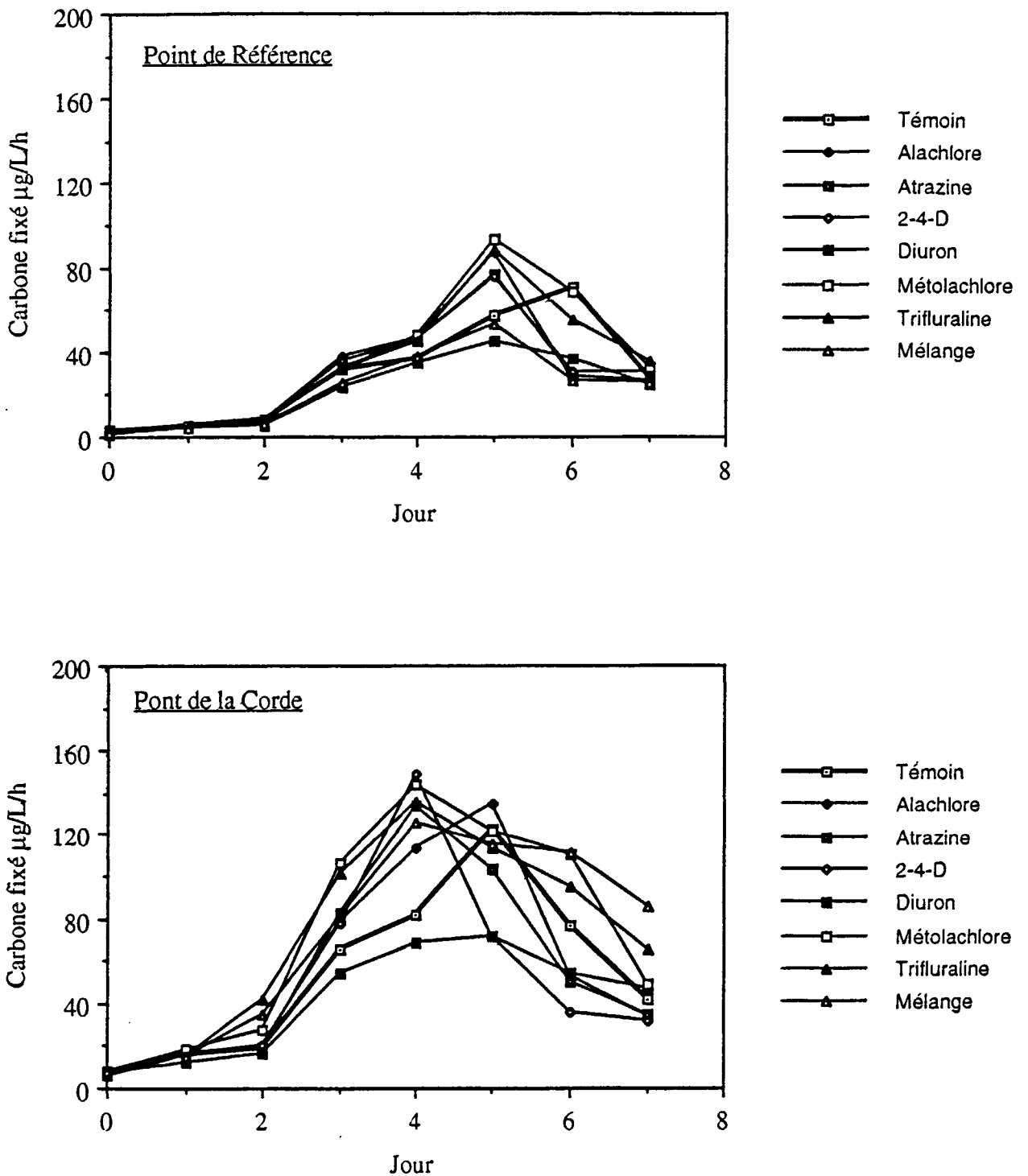


Figure 29 - Evolution de la production primaire dans les différents milieux de culture en avril.

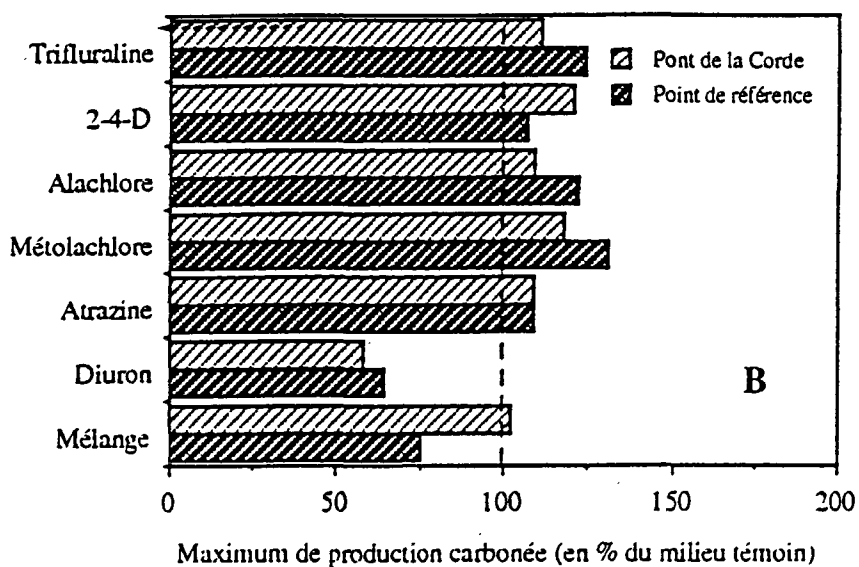
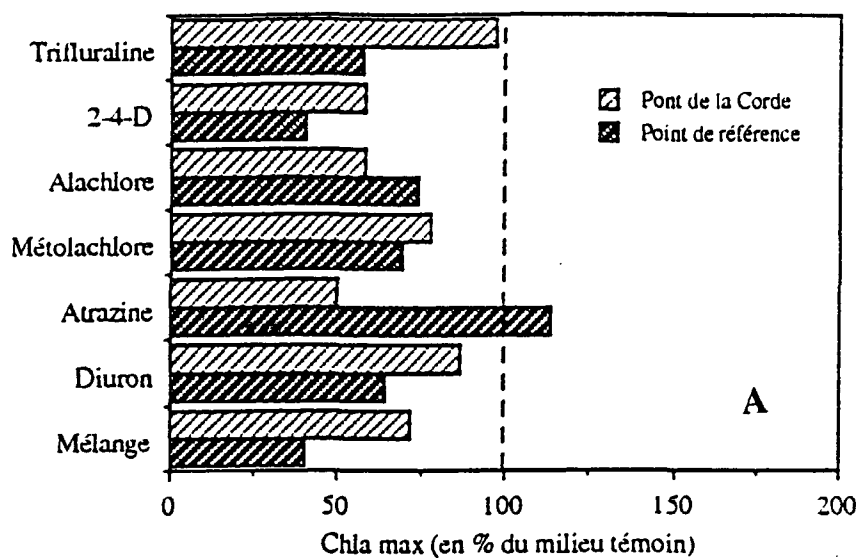


Figure 30 - Pourcentages par rapport au milieu témoin, des maxima de chlorophylle *a* (A) et de production carbonée (B) obtenus dans les milieux dopés.

costatum. Trois espèces du même genre sont également bien représentées, surtout au point estuarien : *Thalassiosira rotula* , *Thalassiosira decipiens* et *Thalassiosira levanderi* (Tab. 15).

Toutes les autres espèces de diatomées sont en nombre ≤ 1200 cellules /L. Trois observations suggèrent que la communauté phytoplanctonique des eaux estuariennes est à un stade de développement plus avancé que celle du milieu marin:

- la plus grande abondance des espèces dominantes,
- la plus faible diversité spécifique,
- l'abondance de petits Gymnodinés.

Enfin, les eaux dessalées sont également caractérisées par une très grande abondance d'unicellulaires hétérotrophes vraisemblablement liée à l'importance de la matière organique dans le milieu.

Tableau 15 : Espèces phytoplanctoniques dénombrées *in situ* , avant la mise en culture, au point de référence et au Pont de la Corde. Les densités cellulaires sont exprimées en cellules/L.

	Point de référence	Pont de la Corde
<u>Diatomées</u>		
<i>Skeletomema costatum</i>	17200	85600
<i>Thalassiosira rotula</i>	3450	30000
<i>Thalassiosira decipiens</i>	1310	64000
<i>Thalassiosira levanderi</i>	1250	14000
Autres diatomées	8500	6600
	(11 espèces)	(6 espèces)
<u>Dinoflagellés</u>		
Gymnodinés < 10 μ m		152300
Autres	780	600
<u>Hétérotrophes</u>		
Ciliés	3570	212000
Autres (non identifiés)		334000

Au cours de l'évolution des cultures, les petits Gymnodinés ont disparu au profit des diatomées, même dans le milieu témoin. L'effet des différents pesticides a été estimé sur les quatre espèces dominantes de diatomées en déterminant leur taux de croissance μ_2 au cours de la phase exponentielle de croissance (μ_2 représente le nombre de divisions par jour de l'espèce considérée)

$$\mu_2 = \ln (D_t / D_{t_0}) / t - t_0 \cdot \ln 2$$

les données en référence
milieu estuarien = augm. du
taux de croissance

où D_t et D_{t_0} sont les nombres de cellules/L comptés respectivement aux temps t et t_0 exprimés en jour. Les taux de croissance ont été déterminés entre le 3ème et 5ème jour de la croissance (Tab. 16).

Dans les milieux témoins, le taux de croissance des petites diatomées *Skeletonema costatum* et en particulier, *Thalassiosira levanderi* est beaucoup plus élevé dans les eaux estuariennes que dans les eaux marines. Ces taux de croissance élevés induisent le pic de chlorophylle observé au 6ème jour de la culture dans le milieu témoin du point de référence.

Pour estimer l'impact des pesticides sur les différentes populations, le taux de croissance de celles-ci a été exprimé en pourcentage de celui des témoins respectifs (Fig.31). Le taux de croissance de *S. costatum* est peu modifié ($\pm 15\%$) quel que soit le pesticide ajouté dans les milieux du point de référence.

Tableau 16 : Taux de croissance (μ_2) des espèces de diatomées dominantes dans les milieux témoins. R = point de référence (Salinité 34 ‰); E = Pont de la Corde (Salinité 23 ‰).

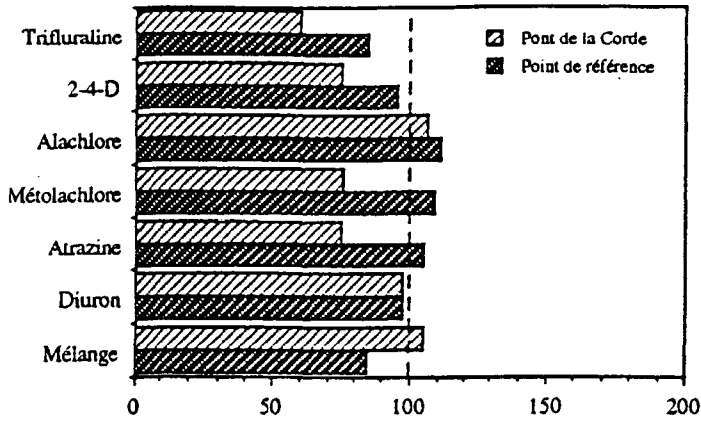
		<i>S. costatum</i>	<i>T. rotula</i>	<i>T. decipiens</i>	<i>T. levanderi</i>
Témoin	R	2,29	1,86	0,97	2,60
	E	1,64	1,50	0,88	0,50

Dans le milieu estuarien, le métolachlore, le 2,4-D et l'atrazine réduisent de 20 à 25% le taux de croissance de cette espèce, la trifluraline ayant une action inhibitrice beaucoup plus marquée (40% de réduction). Dans les deux cas, le diuron n'a aucun effet sur la croissance de *S. costatum*.

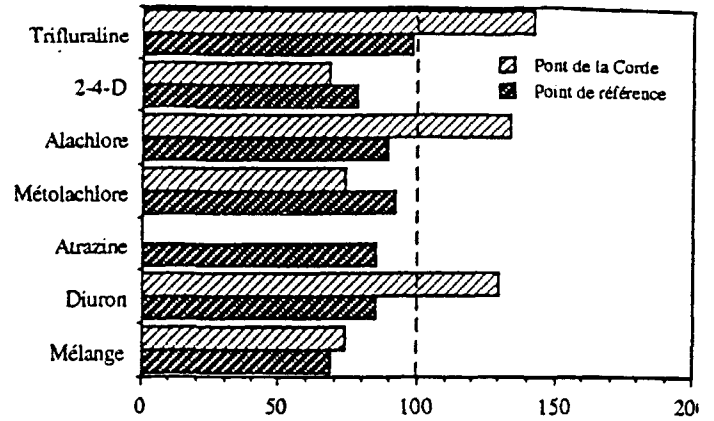
Dans le milieu marin, l'inhibition du taux de croissance de *Thalassiosira levanderi* par chacun des pesticides est faible ou nulle. L'action la plus marquée est celle du 2,4-D qui réduit le taux de croissance de 22% ainsi que le mélange des pesticides qui conduit à une réduction de 30% de ce taux. Aucun effet de stimulation n'est observé au point de référence. Dans le milieu estuarien, l'ajout de trifluraline, d'alachlore et de diuron conduit à une augmentation du taux de croissance de 30 à 40%. Pour ces trois pesticides, seul l'alachlore est ajouté ici en plus faible concentration que dans le milieu marin ce qui peut expliquer la stimulation de croissance. L'action du 2,4-D, du métolachlore et du mélange de pesticides est identique à celle observée au point de référence. Par contre, l'atrazine, à la même concentration que dans les eaux marines, inhibe totalement la croissance de *T. levanderi*.

Les deux autres espèces du genre *Thalassiosira* présentes dans les deux masses d'eau sont des espèces de grande taille. A part le 2,4-D qui modifie peu le taux de croissance de *T. rotula*, les pesticides ont une action inhibitrice marquée sur la population originaire du milieu

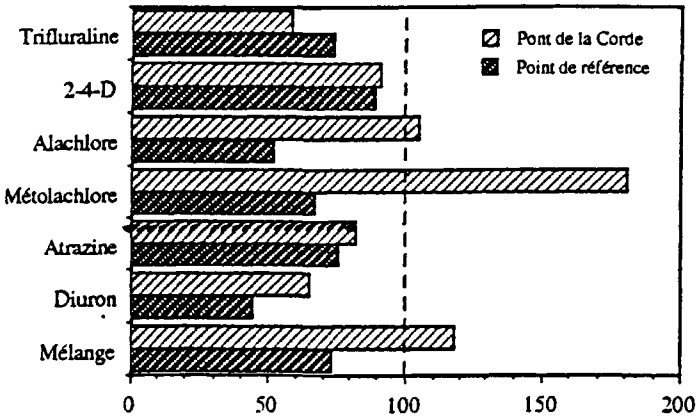
Skeletonema costatum



Thalassiosira levanderi



Thalassiosira rotula



Thalassiosira decipiens

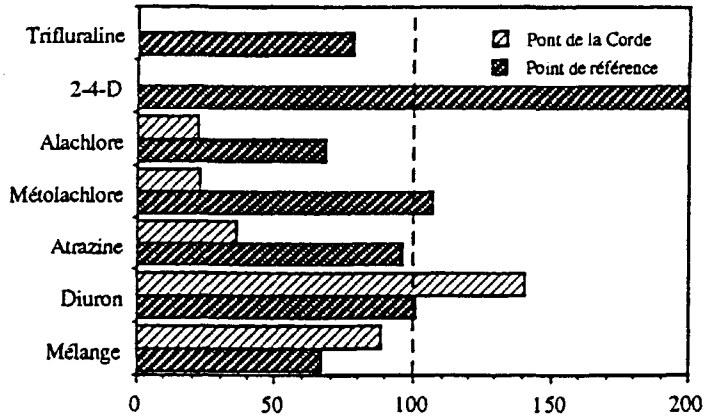


Figure 31 - Pourcentages par rapport au témoin, des taux de croissance obtenus dans les milieux dopés pour les principales espèces de diatomées représentées en avril.

*l'effet déshib. des
pesticides est moins marqué
en milieu estuarien*

marin. Le taux de croissance est en effet réduit de 25 à 30% par la trifluraline, le métolachlore et l'atrazine et d'environ 50% par l'alachlore et le diuron. Dans le milieu estuarien, le 2,4-D est également sans effet sur la croissance de *T. rotula*. L'atrazine et le diuron réduisent la croissance mais dans des proportions inférieures à celles observées dans le milieu marin (20% et 35%, respectivement), la trifluraline ayant une action plus marquée (40% de réduction). La faible dose d'alachlore ajoutée (70 ng /L) ainsi que le mélange de pesticides ne réduisent pas la croissance de *T. rotula*. Par contre, à l'inverse de ce qui est observé au point de référence, l'adjonction de métolachlore provoque une forte stimulation de la croissance puisque le taux de croissance est deux fois plus élevé que celui du témoin. En général, on observe une plus grande réduction du taux de croissance par les pesticides, à concentration égale, dans le milieu marin que dans le milieu estuarien.

La population de *Thalassiosira decipiens* provenant du milieu marin paraît peu sensible à l'ensemble des pesticides. Seule, l'adjonction de trifluraline et d'alachlore provoque une réduction du taux de croissance de 20% et 30%, respectivement. La faible dose de 2,4-D ajoutée (< 0,53 ng /L) induit le doublement du taux de croissance. Par contre, la croissance de la population estuarienne est fortement ralentie par l'atrazine (60% de réduction du taux de croissance), l'alachlore et le métolachlore (80% de réduction). Elle est même complètement inhibée par la trifluraline et le 2,4-D (374 ng /L). Seul le diuron n'a pas d'action sur cette espèce.

En résumé, au point de référence, on n'observe pas d'action significative des différents pesticides sur la croissance des petites espèces *Skeletonema costatum* et *Thalassiosira levanderi*. Une diminution plus importante du taux de croissance (30%) est obtenue par l'alachlore (forte concentration), le métolachlore et le diuron sur *Thalassiosira rotula* et par l'alachlore sur *Thalassiosira decipiens*. La faible concentration de 2,4-D stimule fortement la croissance de *T. decipiens*. Dans l'estuaire, l'action de chacun des pesticides est davantage prononcée en général que dans le milieu marin. Ainsi, tous les pesticides induisent une réduction du taux de croissance de *S. costatum* sauf l'alachlore (en faible concentration) et le diuron (comme en milieu marin). Des effets drastiques sont observés sur la croissance de *T. levanderi* par l'ajout d'atrazine ainsi que sur *T. decipiens* par l'ajout de chacun des pesticides (sauf le diuron). Enfin, dans l'estuaire, on peut observer de fortes stimulations de croissance par la trifluraline, l'alachlore et le diuron chez *T. levanderi*, du métolachlore chez *T. rotula* et de diuron chez *T. decipiens*.

Outre l'effet des doses utilisées pour le 2,4 D et l'alachlore, il est clair que les populations estuariennes sont beaucoup plus sensibles aux pesticides que les populations marines. Il apparaît également que les espèces de grande taille (*T. rotula* et *T. decipiens*) ont une réponse beaucoup plus marquée (notamment *T. decipiens*) à l'ajout de pesticides que les espèces de petite taille (*S. costatum* et *T. levanderi*). Au terme du développement de la

communauté en présence d'herbicides, on risque de voir apparaître une modification de la composition spécifique avec la disparition de certaines espèces comme *Thalassiosira decipiens* au profit d'autres espèces comme *Skeletonema costatum*.

Pour interpréter l'ensemble des résultats, il est nécessaire de considérer le mode d'action de ces différents herbicides particulièrement connus chez les Végétaux Supérieurs (Ashton et Crafts, 1973; Heller *et al.*, 1995; Roberts *et al.*, 1998). On peut les regrouper en deux grandes catégories indépendantes de leur structure chimique, les inhibiteurs de la croissance et les inhibiteurs de la photosynthèse.

Parmi les inhibiteurs de la croissance, on trouve :

- la trifluraline, une dinitroaniline fluorée qui inhibe la synthèse des acides nucléiques et bloque par conséquent la division cellulaire.

- le 2,4-D, une hormone de synthèse agit au niveau cellulaire sur l'activité de la RNase.

- l'alachlore et le métolachlore, amides chlorés, qui inhibent la synthèse des protéines et par conséquent la croissance cellulaire.

Les inhibiteurs de la photosynthèse sont représentés par :

- l'atrazine, une triazine qui en se substituant aux plastoquinones (PSII) inhibe le transfert d'électrons et par conséquent la photosynthèse. Ceci a été également mis en évidence chez des algues unicellulaires. Elle peut, en outre, augmenter ou réduire, selon la dose, la concentration chlorophyllienne cellulaire.

- le diuron (ou DCMU), une diphénylurée qui agit comme l'atrazine au niveau de la photosynthèse.

L'ensemble des résultats concernant les rapports de biomasse chlorophyllienne, de production carbonée et de taux de croissance ont été regroupés dans le Tableau 17.

Parmi les herbicides agissant sur la croissance, c'est incontestablement le 2,4-D qui pour les doses testées (≤ 53 et 374 ng/L) est le plus inhibiteur. Son action se manifeste dès le début de la croissance en réduisant le taux de croissance de 30%. L'effet inhibiteur augmente avec le temps puisque μ diminue de 50 à 90% au terme des cultures, selon l'origine du phytoplancton (cf. Fig.28). Une plus forte inhibition, correspondant à une dose élevée est observée en milieu estuarien, agissant principalement sur *Thalassiosira decipiens*. En conséquence, la biomasse chlorophyllienne finale est réduite de 40 à 60%. L'adjonction d'alachlore (280 et 68 ng/L) dans le milieu a des conséquences analogues mais les cultures sont d'abord stimulées avant d'être inhibées. La biomasse chlorophyllienne produite est réduite de 25 à 40%. On notera que pour ces deux herbicides, on ne relève pas d'effet significatif de la concentration ajoutée sauf pour *Thalassiosira decipiens*. Le métolachlore ajouté à une concentration plus élevée (# 400 ng/L) que l'alachlore a un effet comparable à celui-ci sur les populations marines. Ajoutée en concentration identique (# 110 ng/L) dans le milieu marin et le milieu estuarien, la trifluraline

agit différemment dans les deux milieux testés. Elle entraîne d'abord une stimulation puis un ralentissement de croissance pour les populations marines et inversement pour les populations estuariennes ce qui aboutit à une réduction de 40% de la biomasse chlorophyllienne dans le premier cas et à un effet nul dans le second. Tous ces herbicides ont une influence limitée sur la production carbonée ($\leq 30\%$ d'augmentation) aux concentrations testées.

Dans les bioessais réalisés avec le diuron, on constate que cet herbicide intervient spécifiquement sur la photosynthèse réduisant celle-ci d'environ 40% aux doses testées (494 et 600 ng/L). Le taux de croissance du phytoplancton n'est pas affecté à l'exception de celui de *Thalassiosira rotula*, par contre, la biomasse chlorophyllienne formée est diminuée de 35 à 25%. En effet, en bloquant le transfert d'électrons, le diuron inhibe la formation des molécules d'ATP, molécules riches en énergie et nécessaires à la synthèse de la chlorophylle. Bien qu'ajoutée en concentration identique (# 400 ng/L), l'atrazine induit une réponse différente dans les deux milieux testés. Pour les populations marines, on observe une légère stimulation que ce soit de la photosynthèse, du taux de croissance ou de la biomasse chlorophyllienne.

Tableau 17 : Tableau récapitulatif de l'action des différents herbicides testés sur la biomasse chlorophyllienne maximale, la production carbonée et les taux de croissance des principales espèces de diatomées *Skeletonema costatum* (μ Sc), *Thalassiosira levanderi* (μ Tl), *Thalassiosira rotula* (μ Tr), *Thalassiosira decipiens* (μ Td). Les résultats sont exprimés en % du milieu témoin. R = point de référence (S = 34 ‰); E = Pont de la Corde (S = 23 ‰).

Herbicides		ng /L	Chl. a	C fixé	μ Sc	μ Tl	μ Tr	μ Td
Trifluraline	R	106	57	124	85	100	74	78
	E	118	97	111	60	142	38	0
2,4-D	R	< 53	40	107	94	78	89	200
	E	374	58	121	75	68	91	0
Alachlore	R	280	74	122	111	89	52	68
	E	68	58	109	106	134	105	22
Métolachlore	R	399	69	131	109	92	67	107
	E	386	78	118	76	74	181	23
Atrazine	R	394	114	109	105	85	75	100
	E	425	50	109	75	0	82	36
Diuron	R	494	64	64	100	85	44	100
	E	598	87	58	100	130	65	141
Mélange	R		40	75	85	69	72	68
	E		72	102	100	75	118	89

La photosynthèse du phytoplancton estuarien est légèrement plus élevée. La croissance est stoppée dès le 4ème jour (voir Fig.28) ce qui correspond à l'arrêt de la croissance de *T.levanderi* et de *T.decipiens*. La biomasse chlorophyllienne finale est donc réduite de moitié.

Lorsque tous les pesticides (moins le métolachlore) sont ajoutés aux cultures dans les concentrations indiquées au Tableau 14, on observe une diminution du taux de croissance et de la biomasse chlorophyllienne mais la production carbonée n'est réduite que chez le phytoplancton marin. Au vu des pourcentages d'inhibition, il ne semble pas qu'il y ait d'effet synergique entre ces différents pesticides.

L'ensemble de ces résultats montrent que les pesticides testés dans une gamme de concentrations correspondant à celles mesurées *in situ* dans la Rade de Brest (Arzul et Durand, 1999) provoquent dans la grande majorité des cas une perte de biomasse chlorophyllienne qu'elle soit liée à la diminution du taux de croissance ou à celle de la photosynthèse. Deux pesticides, la trifluraline et l'atrazine donnent des résultats différents selon l'origine des populations or ce sont les seuls avec le diuron qui aient été détectés dans les eaux de l'estuaire. Il est possible que le phytoplancton provenant de ces eaux ait subi une "sensibilisation" à ces produits. En outre, les conditions nutritionnelles initiales étaient différentes et il est possible que l'on retrouve ici l'effet des "milieux minimum et optimum" observé sur la diatomée de culture *Chaetoceros gracile*. ou sur le Dinoflagellé *Gymnodinium mikimotoi*. (Arzul et Durand, 1999)

5.2.2 Situation pré-estivale

5.2.2.1- Bioessais en grand volume

5.2.2.1.1.- Apport des pesticides

L'analyse des pesticides et leur dosage a été faite comme précédemment sur chacun des ballons de culture. Dans le milieu témoin (milieu naturel) seules des triazines ont été décelées : 35 ng/L d'atrazine, 14 ng/L de dééthylatrazine (DEA), 60 ng/L de propazine et 7 ng/L de simazine. Les concentrations de pesticides dosés dans les différentes cultures sont présentées dans le Tableau 18.

Les concentrations de trifluraline, d'alachlore et d'atrazine sont bien dans la gamme des concentrations prévues. On notera que les valeurs élevées d'atrazine mesurées dans les milieux de culture sont liées à la présence de ce pesticide dans le milieu naturel. Comme en situation printanière, les concentrations dosées de 2,4-D et de diuron ne correspondent pas aux valeurs théoriques, la gamme souhaitée n'est pas obtenue.

5.2.2.1.2- Action des pesticides sur l'évolution des cultures

5.2.2.1.2.1. Biomasse chlorophyllienne

La biomasse chlorophyllienne, au moment de la mise en culture, est élevée voisine de 30 µg/L. Les courbes de croissance des communautés phytoplanctoniques sont présentées Fig. 32 et 33 pour chacun des pesticides testés.

Tableau 18 : Concentrations de pesticides dosées dans les différents milieux de culture

Pesticides	Concentration prévue (ng/L)	Concentration dosée (ng/L)
Trifluraline	10	20
	55	90
	100	140
2,4-D	100	170
	200	310
	400	250
Alachlore	50	50
	100	110
	200	200
Atrazine	10	40
	100	150
	400	490
Diuron	25	5
	100	310
	400	300

Dans tous les milieux dopés, le maximum de chlorophylle est inférieur à celui du témoin. Un premier maximum de chlorophylle est atteint dès le premier ou le deuxième jour de la croissance. Le déclin rapide de la biomasse chlorophyllienne correspond à la sédimentation des diatomées (voir ci-dessous). Simultanément, les cellules d'*Alexandrium minutum* se déposaient en couronne sur les parois des flacons de culture. De ce fait, au 5ème jour après la mise en culture, les cellules sédimentées ont été éliminées en transvasant le surnageant dans des flacons propres. 5 µmoles de P-PO₄⁻ ont été ajoutés dans tous les milieux pour assurer la reprise de croissance qui s'opère effectivement dès le 7ème jour. Le second maximum de chlorophylle est atteint au 8ème jour chez le témoin, plus tardivement dans la plupart des milieux dopés. Comme précédemment, le maximum de chlorophylle obtenu dans ces milieux est inférieur à celui du témoin sauf dans le milieu contenant une faible dose de diuron (5 ng/L). Au cours de la première phase de croissance, quels que soient le pesticide et les doses testées, on observe une action drastique sur la biomasse chlorophyllienne puisque le pourcentage de chlorophylle par rapport au témoin varie entre 40

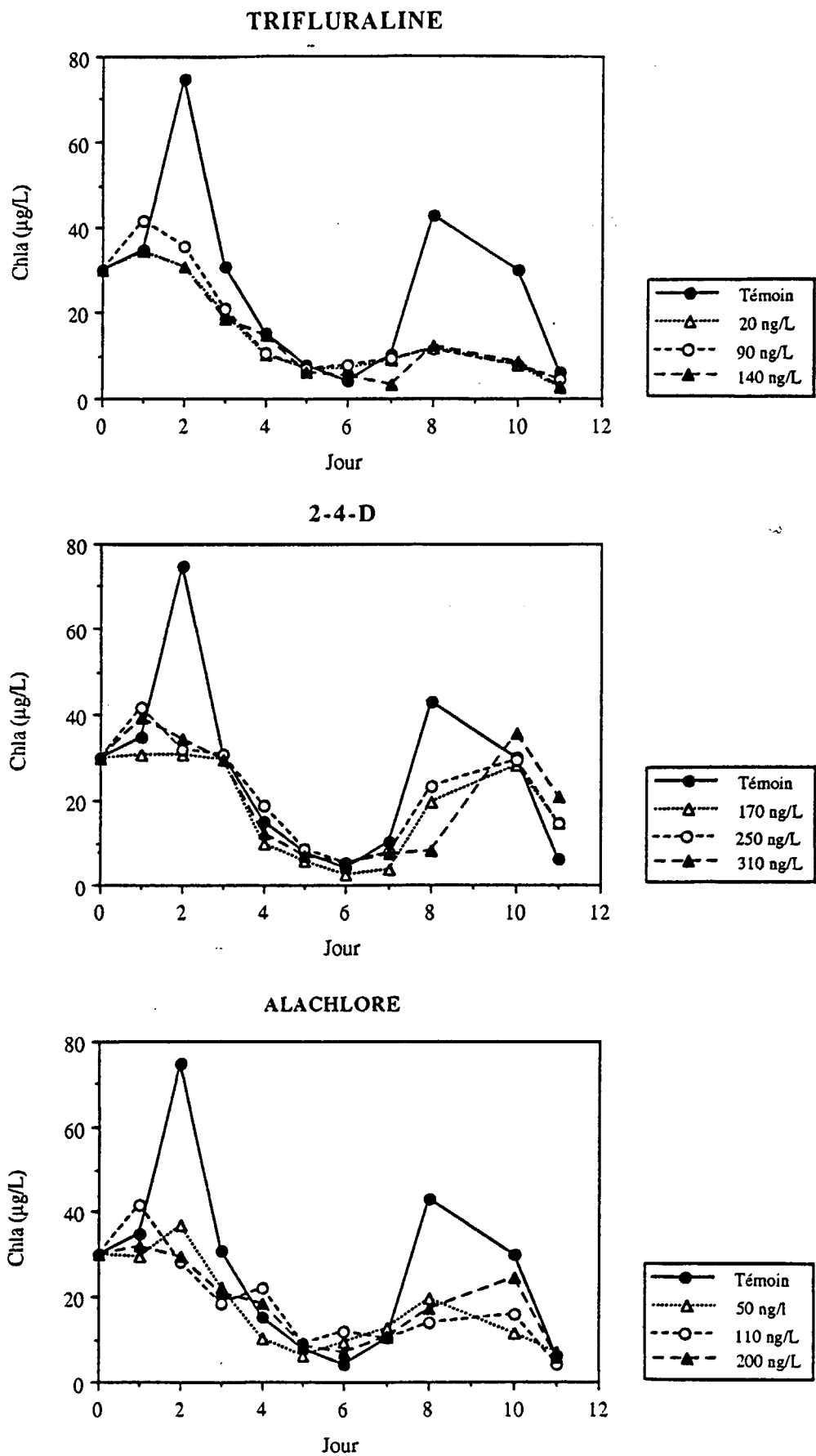


Figure 32 - Evolution de la chlorophylle *a* dans les milieux dopés en trifluraline, 2,4-D et alachlore en juin (bioessais en grand volume).

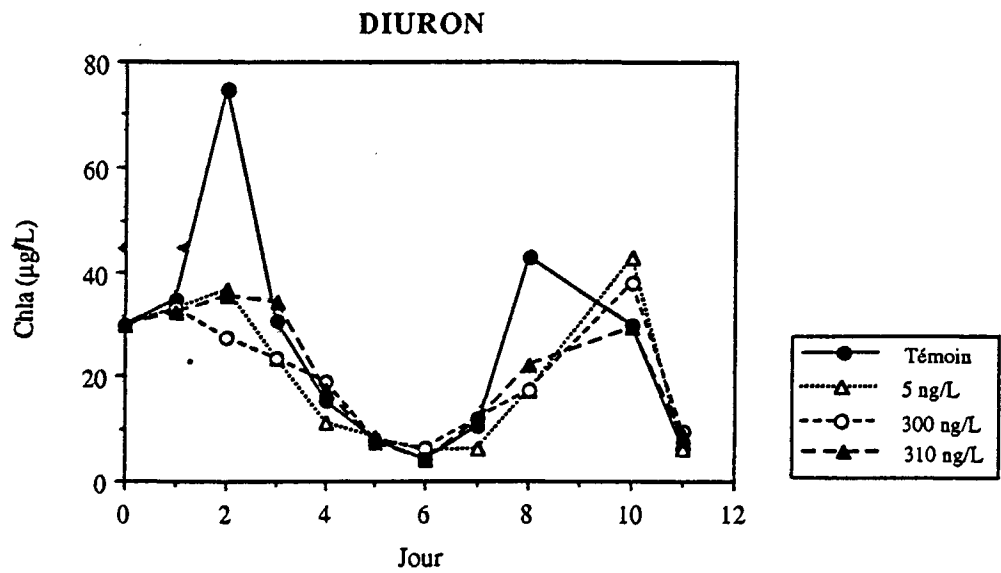
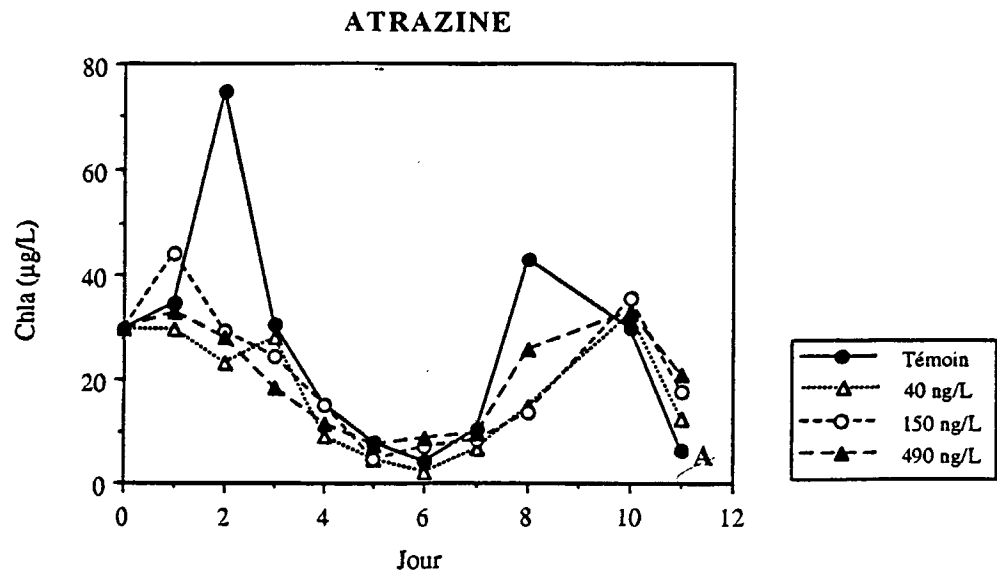


Figure 33 - Evolution de la chlorophylle *a* dans les milieux dopés en atrazine et diuron en juin (bioessais en grand volume).

et 60%. Dans la deuxième partie de la croissance, seules la trifluraline et l'alachlore entraînent une forte diminution de la biomasse chlorophyllienne (Fig.34).

5.2.2.1.2.2- Production carbonée

L'évolution de la production de carbone présente comme dans le cas de la chlorophylle deux pics correspondant aux deux phases de la croissance (Fig. 35 et 36). En début de culture, la production reste inférieure à celle du témoin quel que soit le pesticide. Il en est de même au cours de la seconde phase sauf pour l'alachlore. Dans ce cas, on observe au contraire une stimulation de la production à toutes les concentrations utilisées. Toutefois, les pourcentages d'inhibition de la production au cours de la première phase sont comparables à ceux de la biomasse chlorophyllienne pour la trifluraline, le 2,4-D et l'alachlore, variant de 40 à 75% du témoin alors que la production est moins affectée par l'ajout d'atrazine et de diuron (Fig.37). Inversement, au cours de la seconde phase, le diuron réduit la production de 45% et l'atrazine pour les deux plus fortes concentrations testées, de 25 à 40%.

5.2.2.1.2.3- Composition spécifique du phytoplancton

Dans ce milieu estuarien, riche en éléments nutritifs, les diatomées sont extrêmement abondantes (Tab.19). L'espèce dominante est la petite diatomée *Thalassiosira levanderi* dont le nombre atteint 20 millions de cellules/L. Une autre petite espèce *Skeletonema costatum*, est également bien représentée (1 million de cellules/L). Les plus grosses diatomées *Rhizosolenia delicatula* et *Nitzschia longissima* sont moins abondantes puisque leur nombre n'excède pas 500 000 cellules/L. Parmi les dinoflagellés, *Alexandrium minutum* est le mieux représenté avec 275 000 cellules/L. On note la présence d'autres dinoflagellés comme *Heterocapsa triquetra* en particulier.

Au cours des cultures, *R. delicatula* a disparu rapidement des différents milieux. Nous avons suivi la croissance des trois espèces de diatomées les plus abondantes (*T. levanderi*, *S. costatum* puis *N. longissima*) parallèlement au développement d'*A. minutum*.

Toutes les courbes de croissance (Fig.38 à 42) montrent que le premier pic de chlorophylle observé précédemment correspond principalement au développement de *Thalassiosira levanderi* qui peut atteindre 40 millions de cellules/L au deuxième jour de la culture. Se développent également mais dans une moindre mesure, *Skeletonema costatum* et *Alexandrium minutum*. Dans la seconde partie de l'expérimentation, le pic de chlorophylle est dû essentiellement à la croissance de *Nitzschia longissima*. *A. minutum* et *T. levanderi* reprennent également leur croissance alors que *S. costatum* disparaît progressivement des milieux de culture.

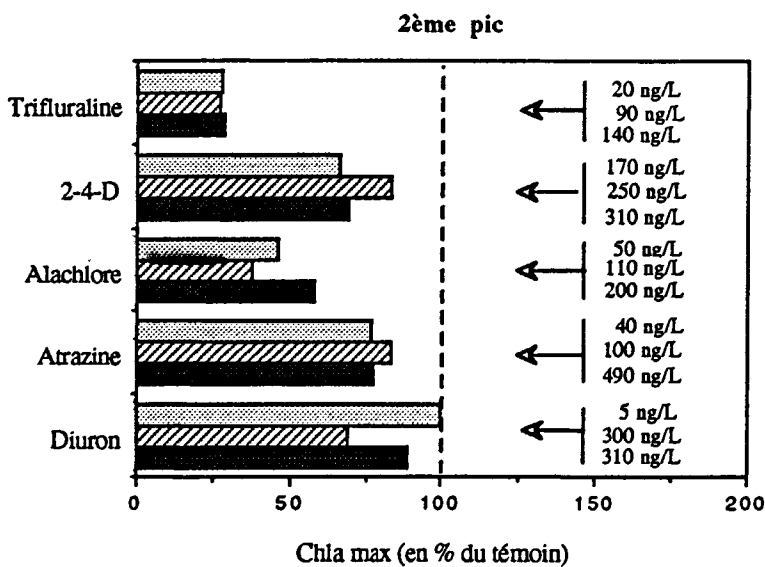
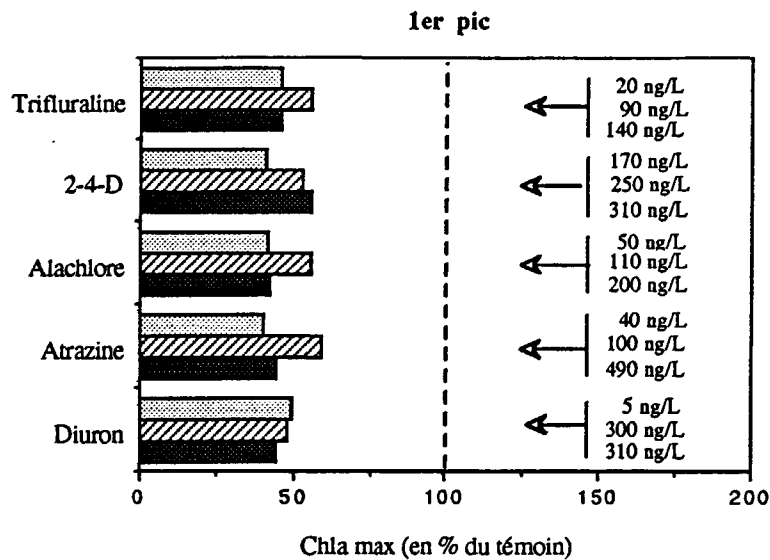


Figure 34 - Pourcentages par rapport au milieu témoin, des maxima de chlorophylle *a* obtenus dans les milieux dopés en juin (bioessais en grand volume).

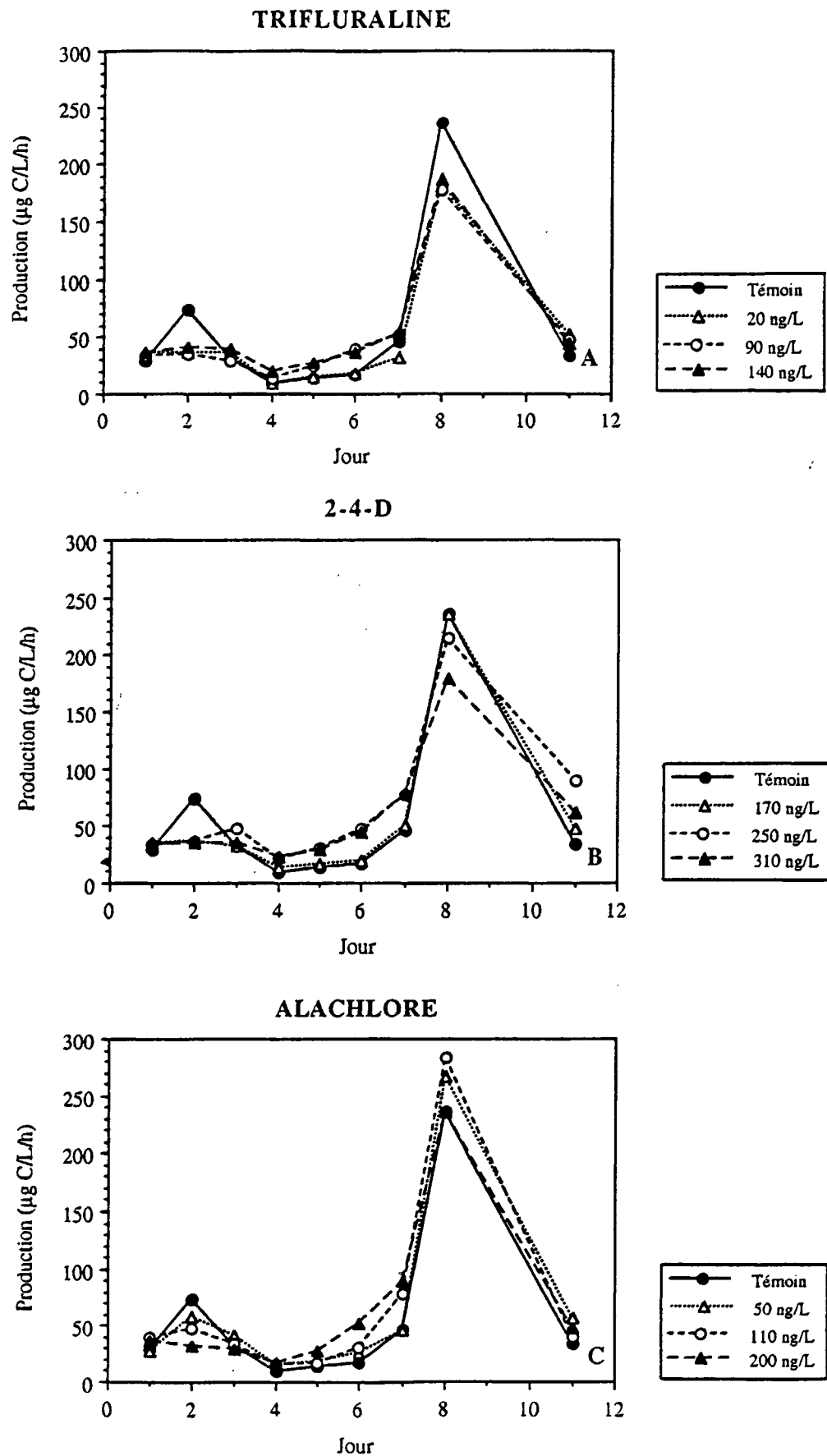


Figure 35 - Evolution de la production primaire dans les milieux dopés en trifluraline, 2,4-D et alachlore, en juin (bioessais en grand volume).

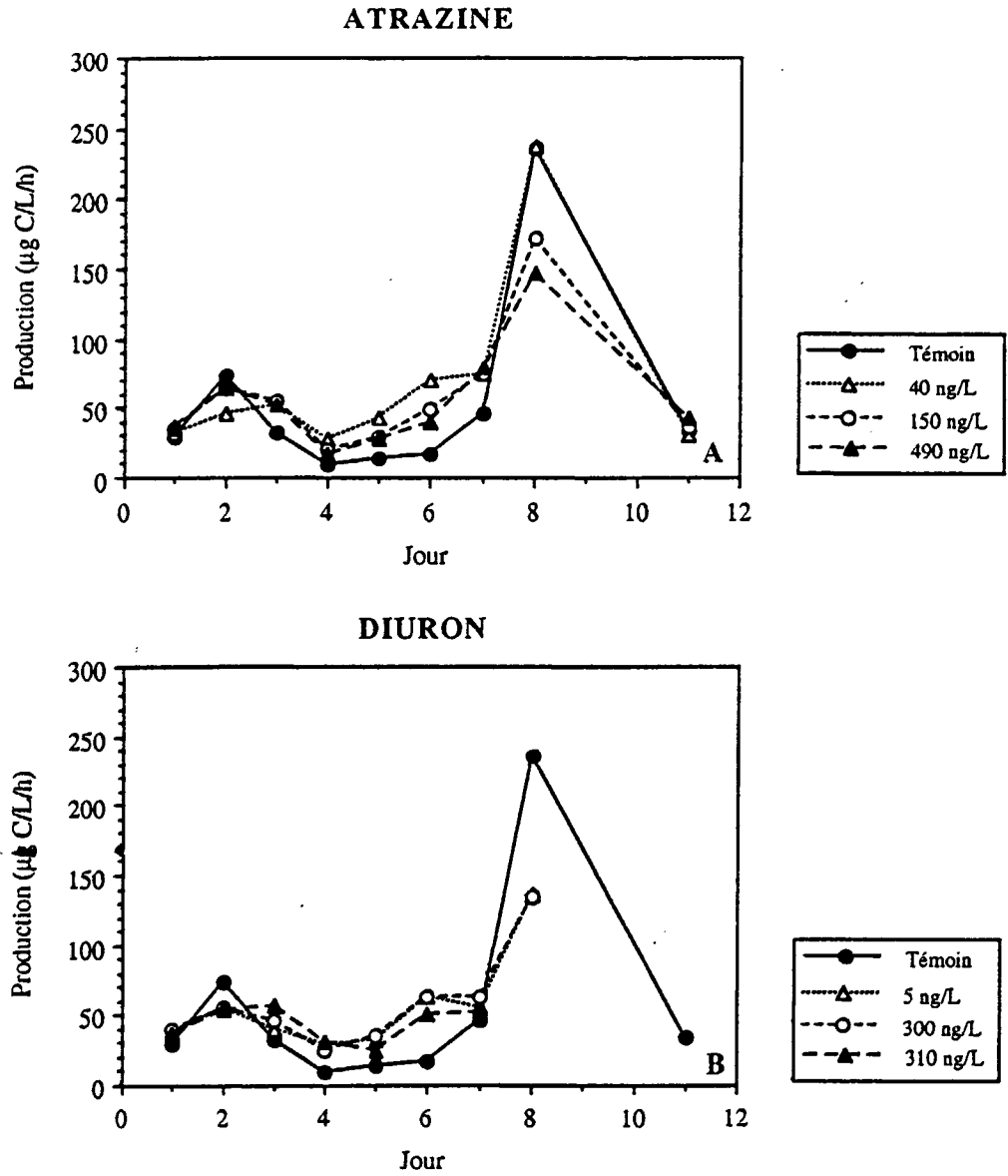


Figure 36 - Evolution de la production primaire dans les milieux dopés en atrazine et diuron en juin (bioessais en grand volume).

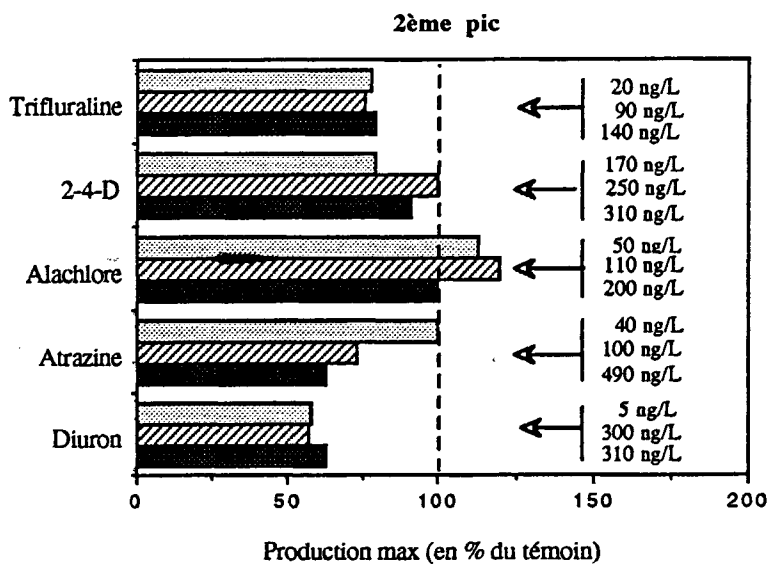
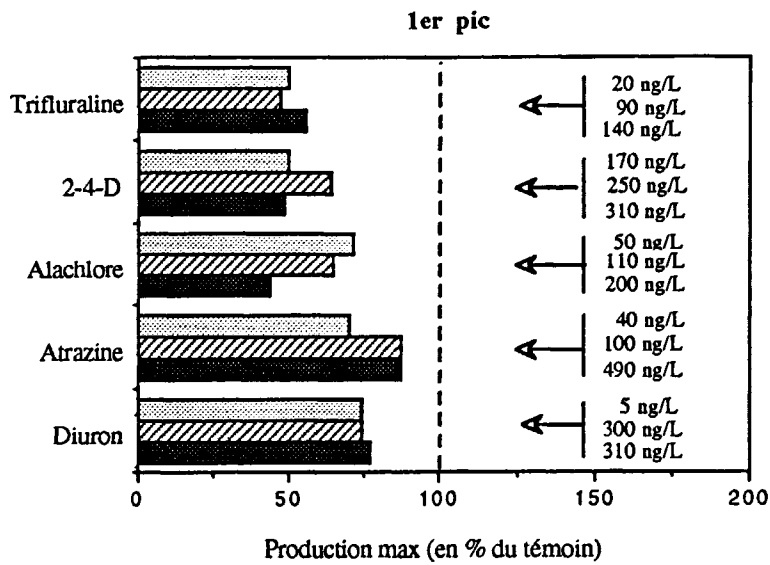


Figure 37 - Pourcentages par rapport au milieu témoin, des maxima de production carbonée obtenus dans les milieux dopés, en juin (bioessais en grand volume).

Tableau 19 : Espèces phytoplanctoniques dénombrées avant la mise en culture.

	nombre de cellules/L
Diatomées	
<i>Thalassiosira levanderi</i>	1,92 10 ⁷
<i>Skeletonema costatum</i>	1,36 10 ⁶
<i>Nitzschia longissima</i>	579600
<i>Rhizosolenia delicatula</i>	153700
<i>Chaetoceros</i> ssp.	9000
Autres diatomées (3 espèces)	5700
Dinoflagellés	
<i>Alexandrium minutum</i>	275000
<i>Heterocapsa triquetra</i>	12000
<i>Scrippsiella trochoïdea</i>	6800
Autres dinoflagellés (3 espèces)	5000

Parmi les pesticides étudiés, seuls l'alachlore et le diuron n'ont pas d'effet drastique sur la croissance d'*A. minutum* au cours de la première phase de croissance. Dans la seconde phase, aucun des milieux dopés ne permet la croissance de ce dinoflagellé.

Les taux de croissance d'*A. minutum* et des trois diatomées ont été déterminés soit sur la première partie de la courbe pour *A. minutum*, *T. levanderi* et *S. costatum* soit sur la seconde partie pour *N. longissima* pour chacun des pesticides aux différentes doses utilisées. Les taux de croissance mesurés sur la culture témoin sont présentés dans le Tab. 20.

Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au témoin (Fig.43). La trifluraline et l'atrazine à faible dose (40 ng/L) réduisent considérablement le taux de croissance d'*A. minutum*. Cette réduction est de 94% pour l'atrazine et varie de 72 à 81% pour la trifluraline. Les fortes concentrations de 2,4-D utilisées (170 à 310 ng/L) réduisent la croissance de 35 à 45%, celles de diuron (5 à 310 ng/L), de 14 à 28%. Seul l'alachlore a peu d'effet sur la croissance de ce dinoflagellé.

Tableau 20 : Taux de croissance (μ_2) d'*A. minutum* et des espèces de diatomées dominantes dans le milieu témoin.

<i>A. minutum</i>	<i>N. longissima</i>	<i>S. costatum</i>	<i>T. levanderi</i>
1,0	2,08	0,78	2,58

La réponse des diatomées varie selon les espèces.

Thalassiosira levanderi n'a son taux de croissance réduit significativement qu'en présence de 2,4-D à 170 ng/L et d'atrazine à 100 ng/L. Il peut même y avoir une stimulation de croissance par adjonction de 110 ng/L d'alachlore. *N. longissima* apparaît peu sensible à

TRIFLURALINE

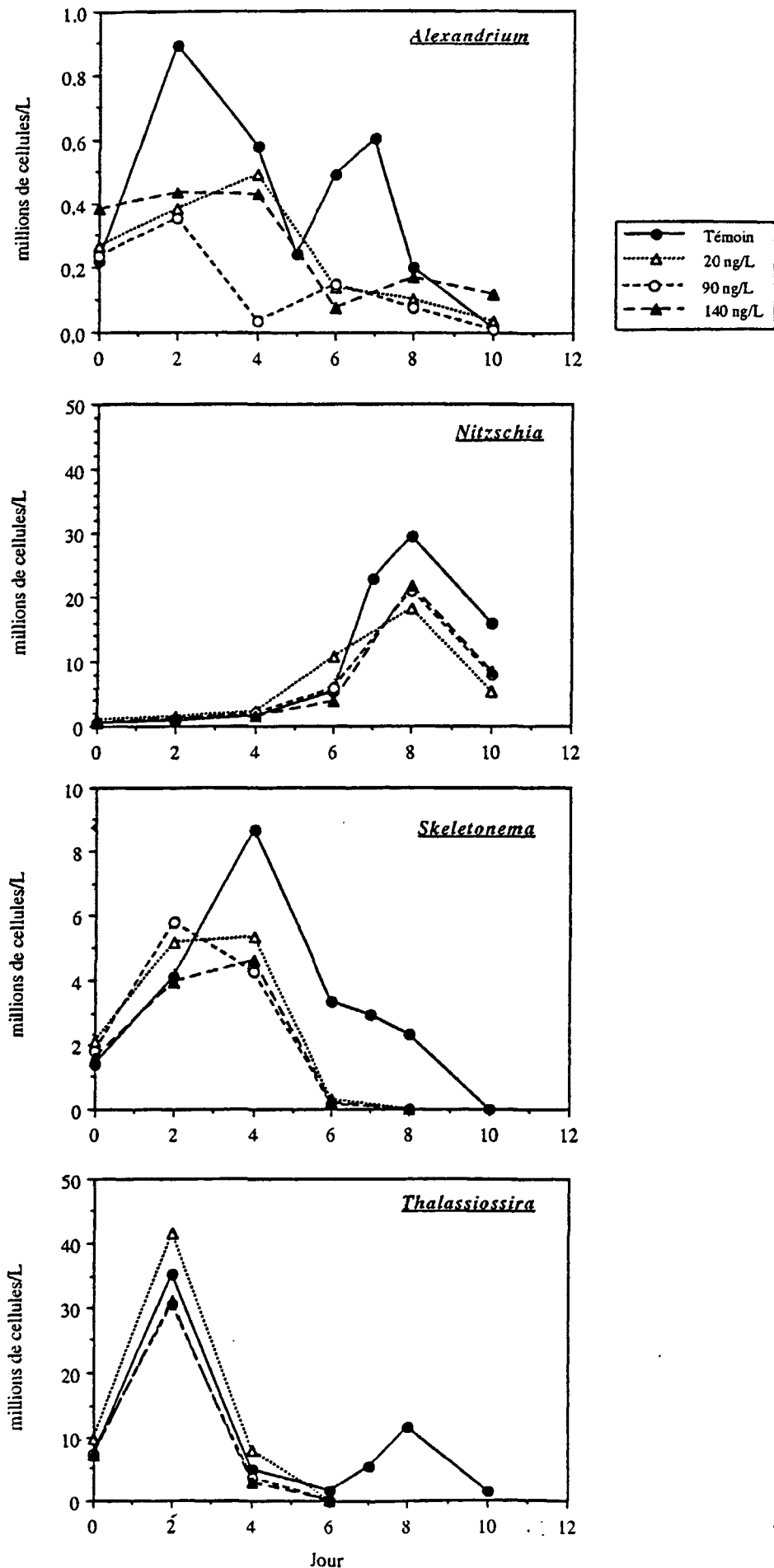


Figure 38 - Evolution des densités cellulaires des principales espèces phytoplanctoniques dénombrées en juin dans les milieux dopés en trifluraline (bioessais en grand volume). Conseil et Expertise en Environnement, Pôle Analytique des Eaux

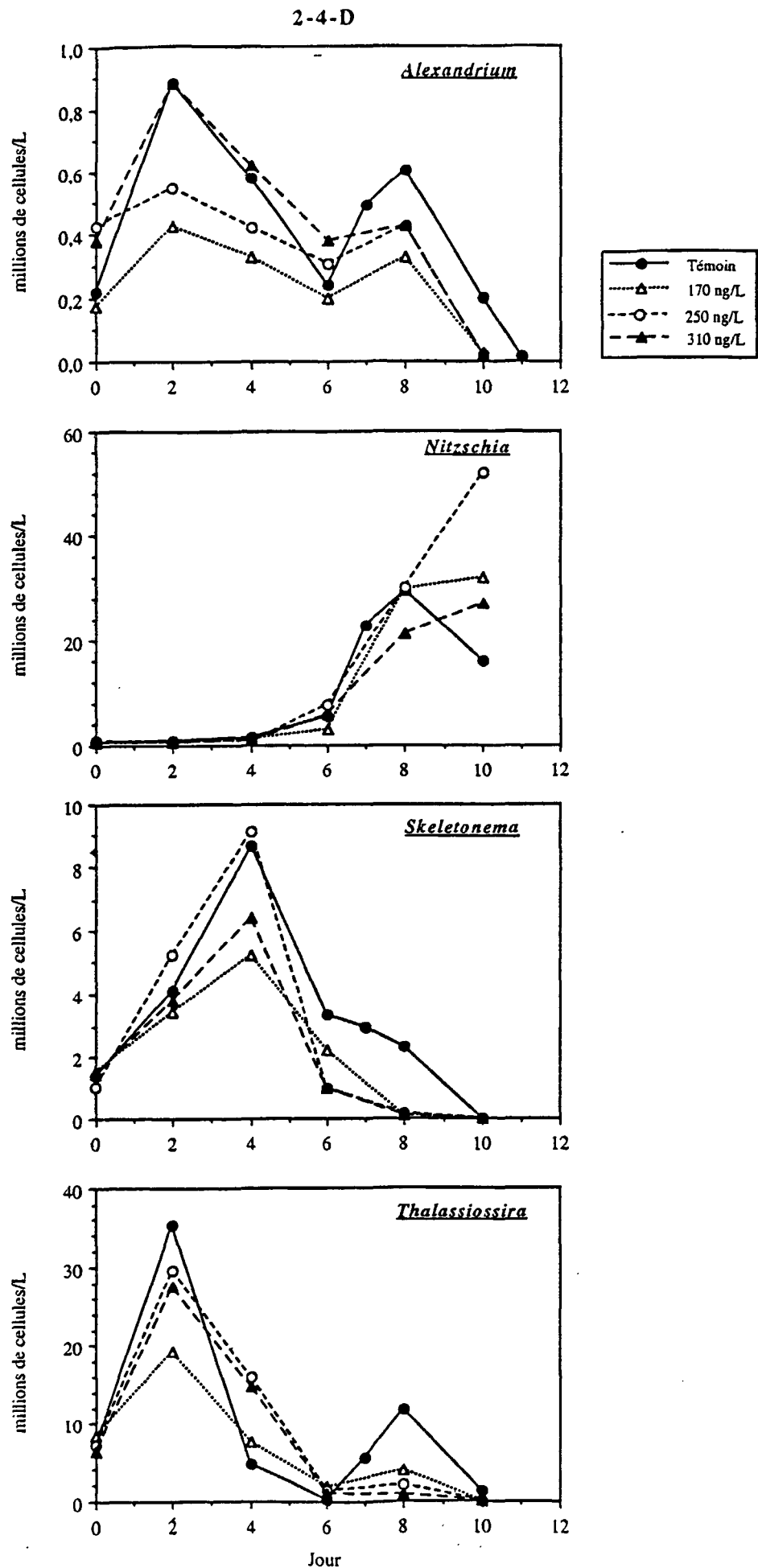


Figure 39 - Evolution des densités cellulaires des principales espèces phytoplanctoniques dénombrées en juin dans les milieux dopés en 2,4-D (bioessais en grand volume) Conseil et Expertise en Environnement, Pôle Analytique des Eaux

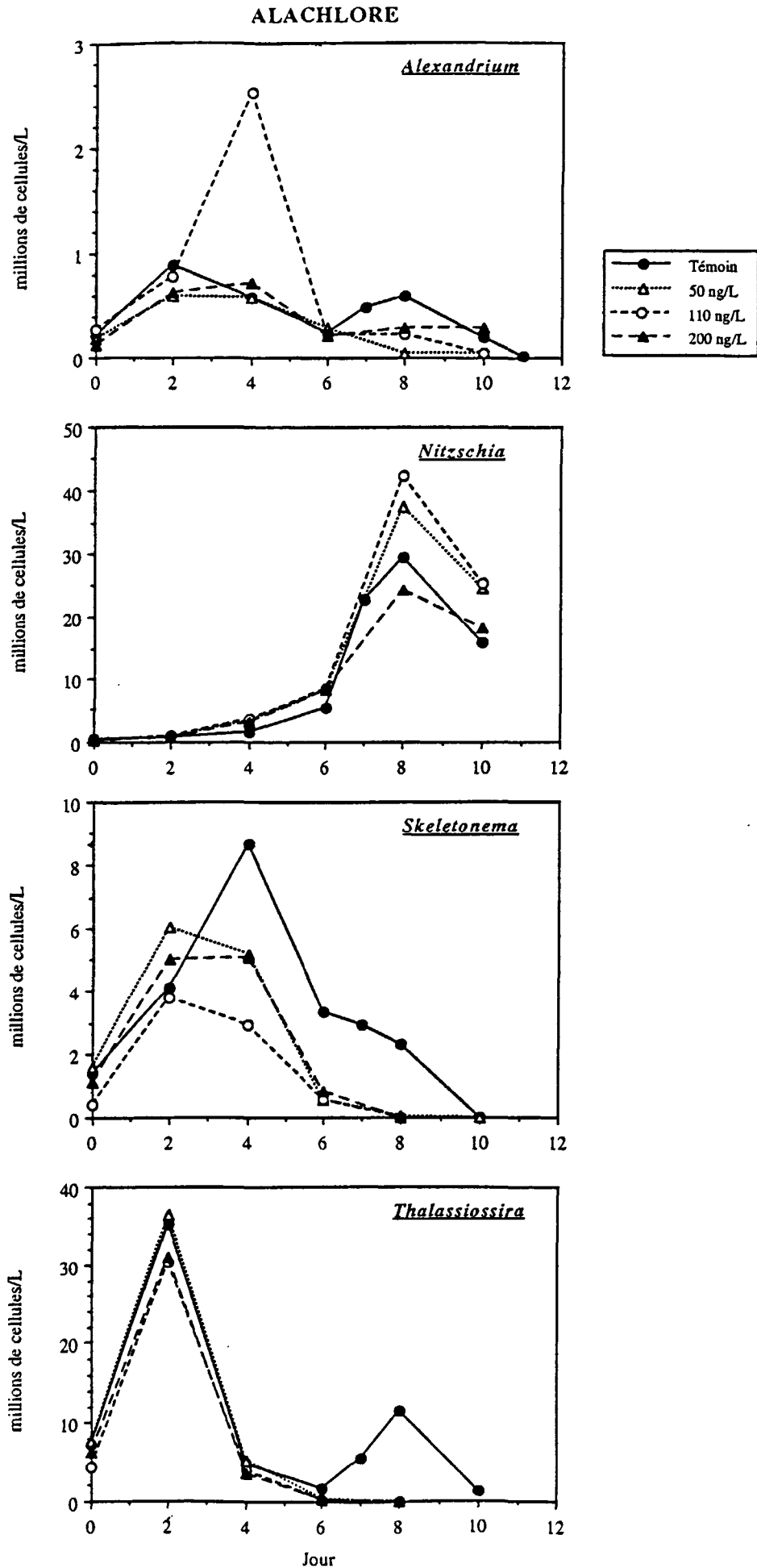


Figure 40 - Evolution des densités cellulaires des principales espèces phytoplanktoniques dénombrées en juin dans les milieux dopés en alachlore (bioessais en grand volume). *Conseil et Expertise en Environnement, Pôle Analytique des Eaux*

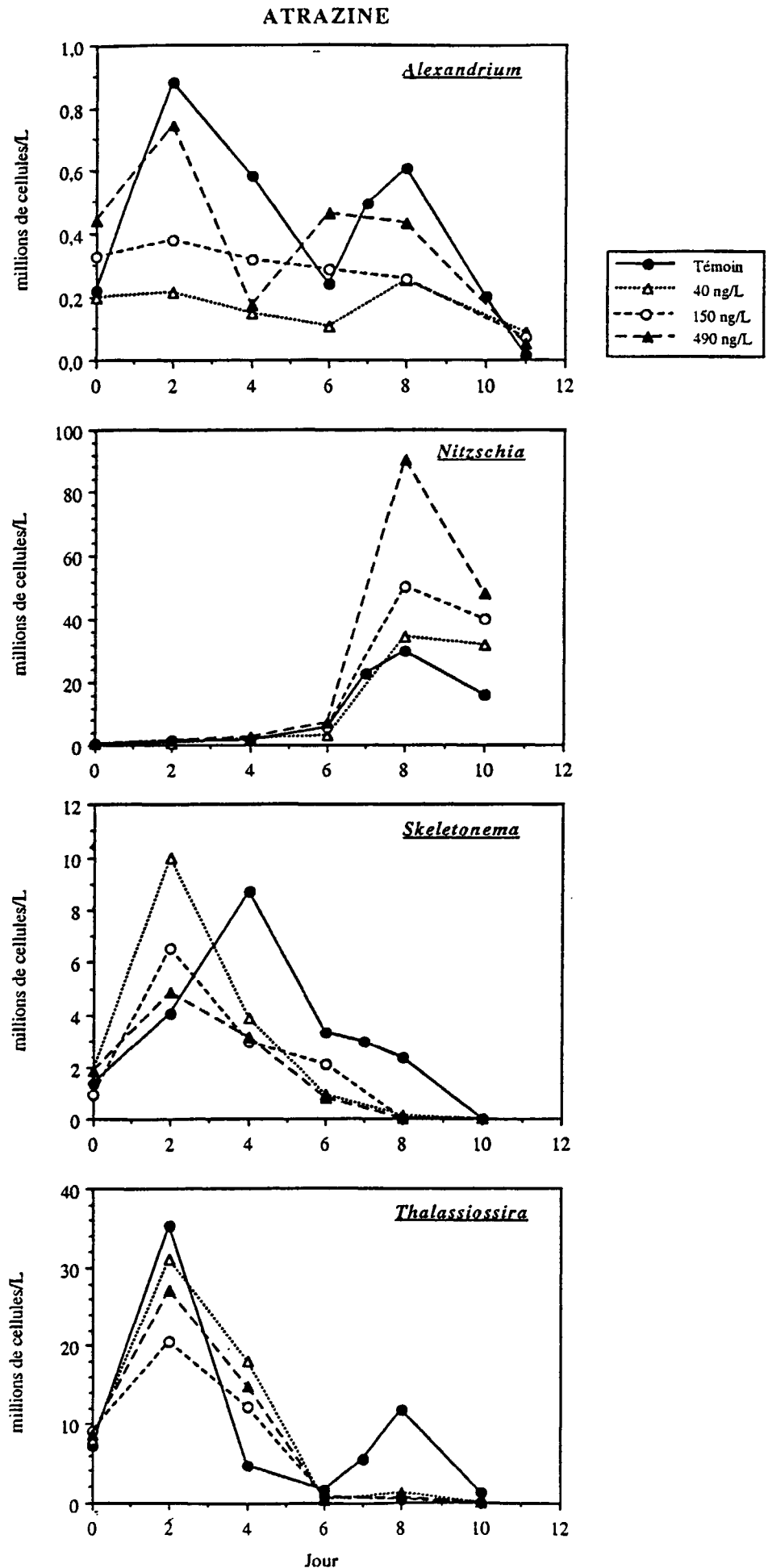


Figure 41 - Evolution des densités cellulaires des principales espèces phytoplanctoniques dénombrées en juin dans les milieux dopés en atrazine (bioessais en grand volume). *Conseil et Expertise en Environnement, Pôle Analytique des Eaux*

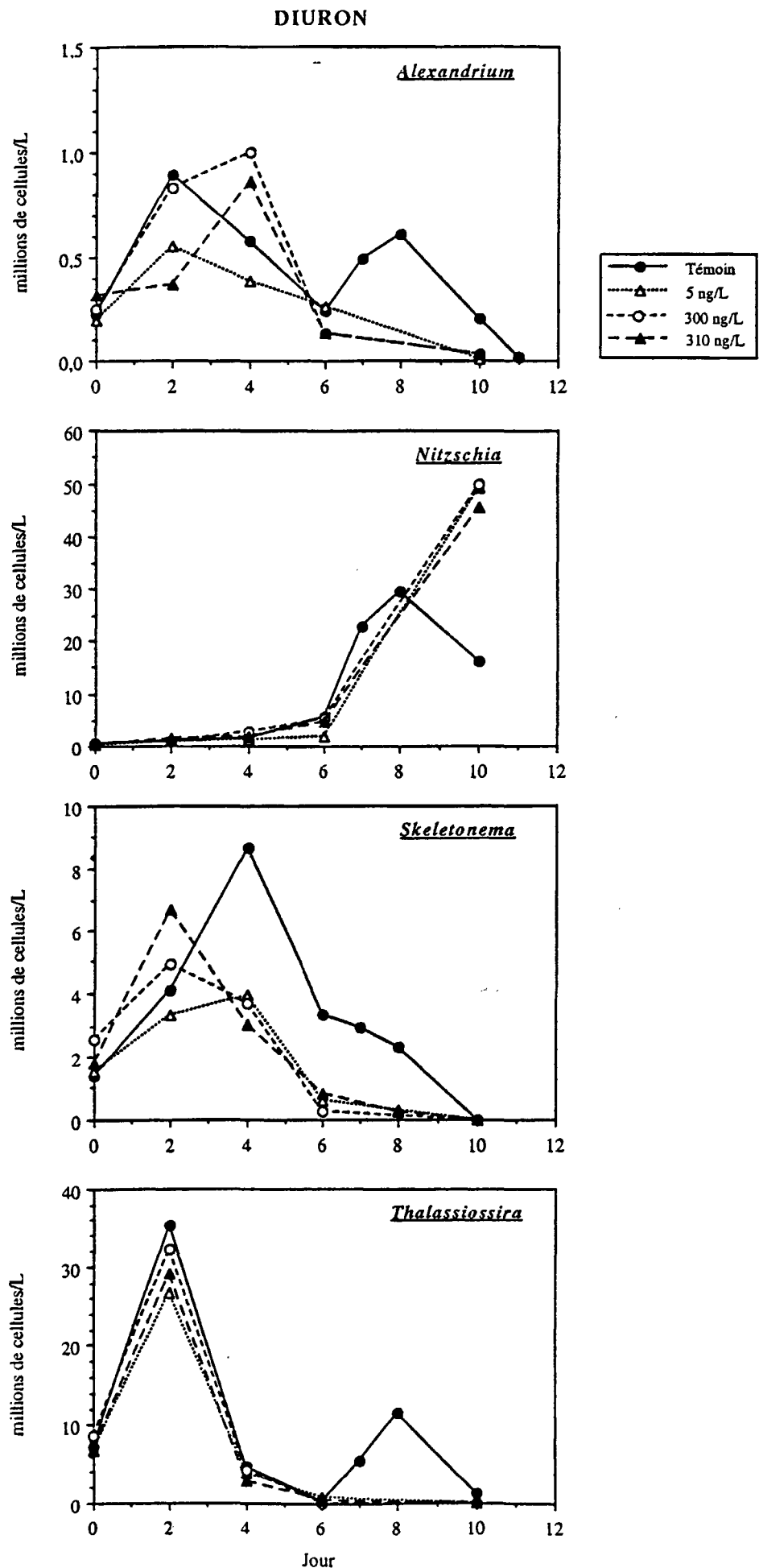


Figure 42 - Evolution des densités cellulaires des principales espèces phytoplanctoniques dénombrées en juin dans les milieux dopés en diuron (bioessais en grand volume). *Conseil et Expertise en Environnement, Pôle Analytique des Eaux*

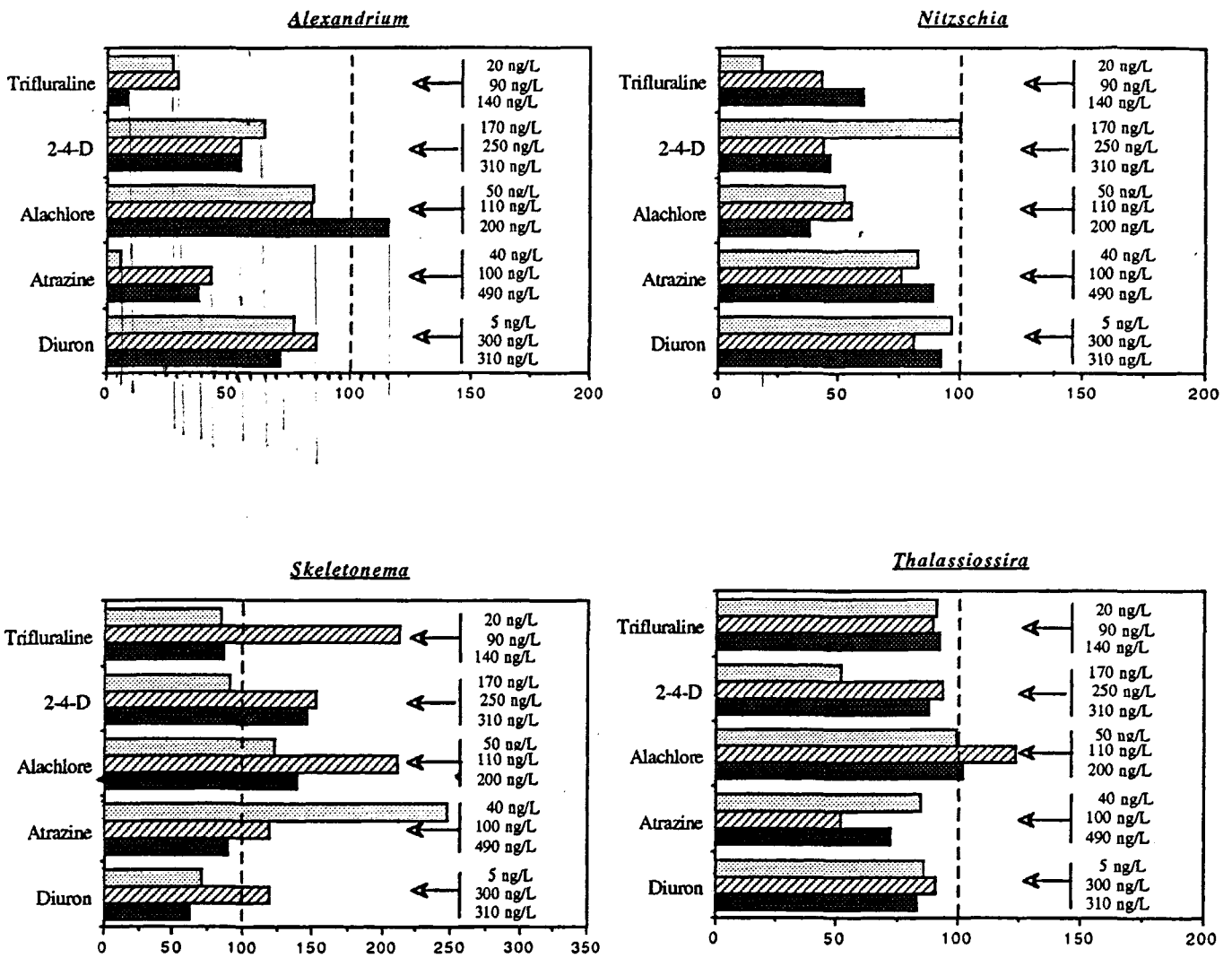


Figure 43 - Pourcentages par rapport au témoin, des taux de croissance obtenus dans les milieux dopés pour les principales espèces phytoplanctoniques représentées en juin (bioessais en grand volume).

l'atrazine, au diuron et à la plus faible dose de 2,4-D. Par contre le taux de croissance de cette espèce est réduit de 80 à 40% par la trifluraline mais la réduction est d'autant plus faible que la dose est forte. L'alachlore diminue également la croissance avec un taux de réduction de 45% aux plus faibles doses (50 et 110 ng/L) et de 62% pour 200 ng/L injectés. Les seules fortes stimulations de croissance sont observées pour *S. costatum*. Le taux de croissance de cette espèce est au moins deux fois plus élevé en présence de 90 ng/L de trifluraline, de 110 ng/L d'alachlore et de 40 ng/L d'atrazine. De façon générale, les pesticides sont sans effet ou stimulent la croissance de *S. costatum* à l'exception du diuron à 310 ng/L qui réduit la croissance de 39%. Il est à noter qu'une dose voisine de 300 ng/L provoque une stimulation.

Contrairement à la situation printanière où le pourcentage de biomasse chlorophyllienne par rapport au témoin variait de 40 à 115% selon les ajouts d'herbicides (cf. Tab.17), on observe ici, dans la première phase de croissance une réduction de la biomasse chlorophyllienne maximum d'environ 50% quels que soient l'herbicide et la dose utilisés (Tab.21). La production primaire est réduite dans les mêmes proportions sauf lorsque les herbicides ajoutés sont connus pour agir sur la photosynthèse (atrazine et diuron). La production primaire n'est alors réduite que de 10 à 30%. Le taux de croissance des deux espèces de diatomées dominantes (*T. levanderi* et *S. costatum*) dans cette première phase est peu affecté par les divers herbicides. Seul *A. minutum* subit parfois une forte diminution de son taux de croissance sous l'action de la trifluraline et de l'atrazine, en particulier.

Les diatomées, compte tenu de leur nombre et de leur contenu cellulaire en chlorophylle constituent quasiment 100% de la biomasse chlorophyllienne. Si leur taux de croissance est faiblement affecté en général, il n'en est pas de même pour les maximum de cellules observés au cours des cultures (voir, par exemple, Fig.38). Or, en toute rigueur, la quantité de sels nutritifs dans les différents milieux étant semblable, la biomasse maximum devrait être identique. Il est vraisemblable que l'action des herbicides ne soit pas instantanée. Le taux de croissance d'une population dopée peut être en effet supérieur à celui de la population témoin mais la croissance peut être stoppée précocement réduisant ainsi la quantité de biomasse formée. Le temps de contact entre les cellules et les herbicides joue probablement un rôle dans l'action de ces molécules (Bérard et Pelte, 1999).

Tableau 21 : Tableau récapitulatif de l'action des différents herbicides testés sur la biomasse chlorophyllienne maximale, la production carbonée et le taux spécifique de croissance des principales espèces de diatomées *Skeletonema costatum* (μ Sc), *Thalassiosira levanderi* (μ Tl), *Nitzschia longissima* (μ Nl) et du dinoflagellé *Alexandrium minutum* (μ Am). Les résultats sont exprimés en % du milieu témoin.

Herbicides	ng /L	Chl. a		C fixé		1er pic		2nd pic	
		1er pic	2nd pic	1er pic	2nd pic	μ Al	μ Tl	μ Sc	μ Nl
Trifluraline	20	46	28	50	57	27	91	83	18
	90	56	27	47	57	29	90	213	43
	140	46	29	55	62	9	92	85	60
2,4-D	170	41	66	49	79	64	52	91	100
	250	53	83	63	100	55	94	152	44
	310	56	68	48	91	55	87	146	46
Alachlore	50	41	46	71	112	85	99	123	52
	110	56	37	65	120	84	124	211	55
	200	42	57	44	100	116	102	134	38
Atrazine	40	40	76	70	100	6	85	248	83
	150	59	83	87	73	43	52	120	76
	490	44	77	87	62	37	72	89	89
Diuron	5	49	100	74	57	77	86	70	96
	300	47	68	74	57	66	91	120	81
	310	44	89	77	62	72	83	61	92

Les critères définissant l'action des herbicides sur la croissance phytoplanctonique sont complexes. La production carbonée peut être proportionnelle à la biomasse chlorophyllienne : il en est ainsi pour les ajouts de trifluraline, 2,4-D et alachlore en période estivale, mais elle peut être également indépendante de cette biomasse lorsque les herbicides agissent sur la photosynthèse (atrazine, diuron) ou même pour l'ensemble des herbicides testés en période printanière (cf. Fig.31).

Les variations de la biomasse chlorophyllienne intègrent l'ensemble des variations intraspécifiques sans révéler la spécificité d'action des herbicides sur chaque type de population.

Enfin, les variations du taux de croissance de chaque espèce sont vraisemblablement le critère le plus valable bien qu'elles ne tiennent pas compte de l'action à moyen terme des herbicides. Le taux de croissance d'une population dopée peut être en effet supérieur à celui de la population témoin mais la croissance peut être stoppée précocement réduisant ainsi la quantité de biomasse formée.

5.2.2.2.- Tests en petit volume

Dans cette version simplifiée des bioessais, seules la biomasse chlorophyllienne et la composition spécifique des cultures ont été déterminées au cours du temps.

5.2.2.2.1- Biomasse chlorophyllienne

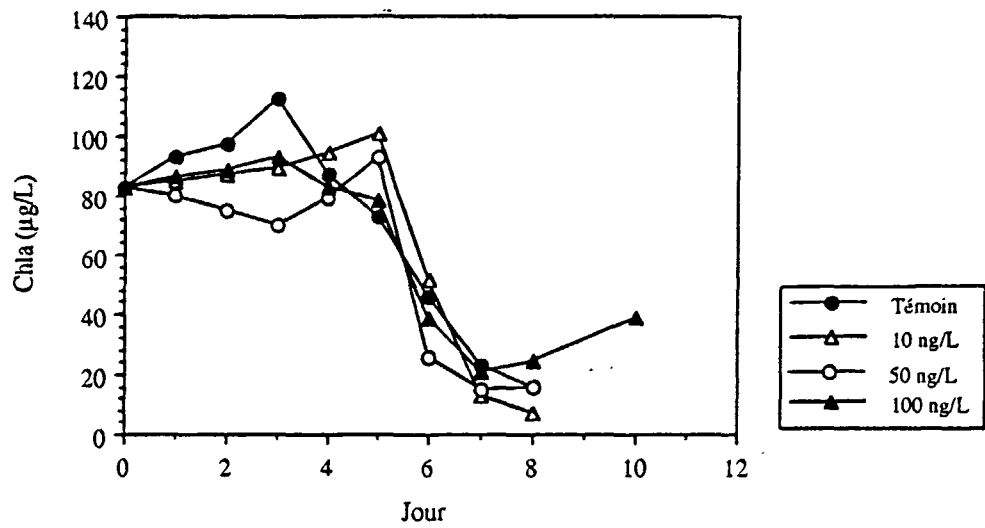
Dès le début des cultures, la biomasse chlorophyllienne est élevée (80 µg/L) malgré la dilution du milieu initial. L'augmentation est lente, les maximums étant atteints au 3ème jour voire dans certains milieux au 6ème jour de la culture (Fig. 44 et 45). Les biomasses maximums obtenues sont réduites de 20% par la trifluraline, par l'addition de 100 et 400 ng/L de 2,4-D, de 25% pour un ajout de 200 ng/L d'alachlore, de 100 ng/L d'atrazine et de 100 ng/L de diuron. Elles sont augmentées en présence de 10 et 400 ng/L d'atrazine, de 5 et 400 ng/L de diuron.

4.2.2.2.2- Composition spécifique

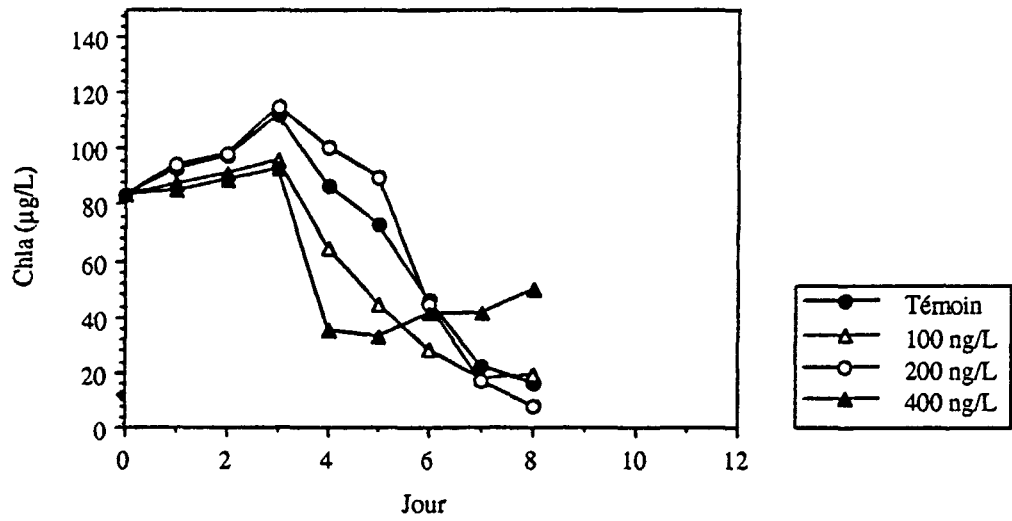
Ces mini-tests ont été effectués sur une eau colorée à *A. minutum* dont le stade de développement était très avancé. La communauté phytoplanctonique initiale dans les cultures est quasi-monospécifique quant aux dinoflagellés avec 6,8 millions d'*Alexandrium minutum*. Toutefois, on observe également la présence de *Nitzschia longissima* (4,5 millions de cellules/L), de *Chaetoceros* (2 millions de cellules/L) et de *Rhizosolenia delicatula* (80000 cellules /L). Au cours de l'évolution des cultures y compris de la culture témoin, les *Chaetoceros* et les *Rhizosolenia* disparaissent très rapidement. Seule l'évolution d'*A. minutum* et de *N. longissima* a été suivie (Fig 46 à 48).

Le pic de chlorophylle observé au 3ème jour de la culture correspond au nombre maximum des deux espèces. Les taux de croissance de ces deux espèces ont été déterminés à partir de ces courbes au cours de la phase exponentielle. Le nombre de divisions par jour d'*A. minutum* dans la culture témoin est alors de 0,39 et celui de *N. longissima* de 0,75, beaucoup plus faible que dans les bioessais en grand volume (1,0 et 2,08). Les résultats sont comme précédemment exprimés en pourcentage par rapport au témoin (Fig.49). Les doses de trifluraline testées tendent à augmenter le taux de croissance d'*A. minutum* puisque celui-ci peut atteindre 50% de plus que celui du témoin en présence de 50 ng/L. A faible dose, le 2,4-D (100 ng/L) n'a pas d'effet sur la croissance du dinoflagellé mais utilisé à plus forte concentration (200 et 400 ng/L), cet herbicide a un fort pouvoir inhibiteur allant jusqu'à une réduction de 70% du taux de croissance. Comme le 2,4-D, l'alachlore et l'atrazine n'ont pas d'effet à faible concentration (50 et 10 ng/L, respectivement), ces molécules ont un effet inhibiteur aux concentrations intermédiaires (100 ng/L) et ont, par contre, une action

TRIFLURALINE



2,4-D



ALACHLORE

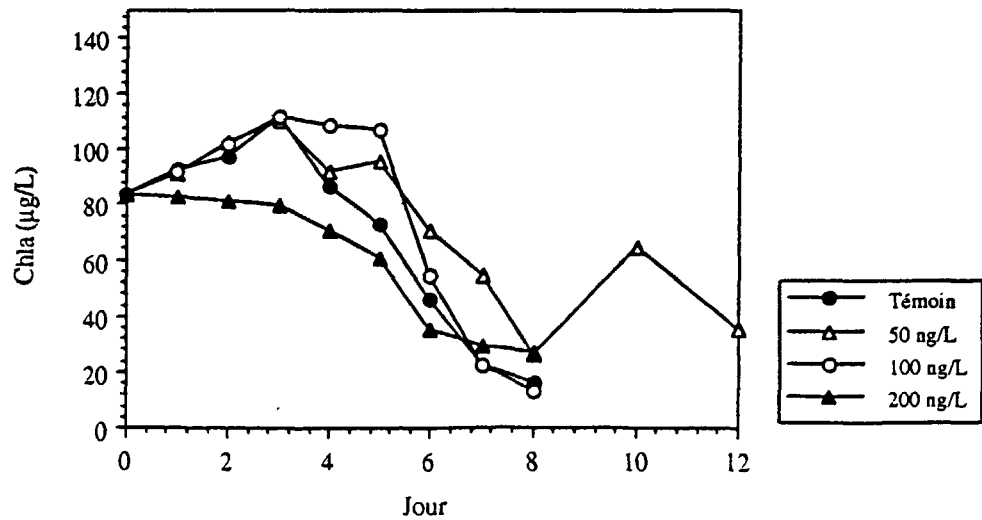


Figure 44 - Evolution de la chlorophylle *a* dans les milieux dopés en trifluraline, 2,4-D et alachlore en juin (mini-tests).

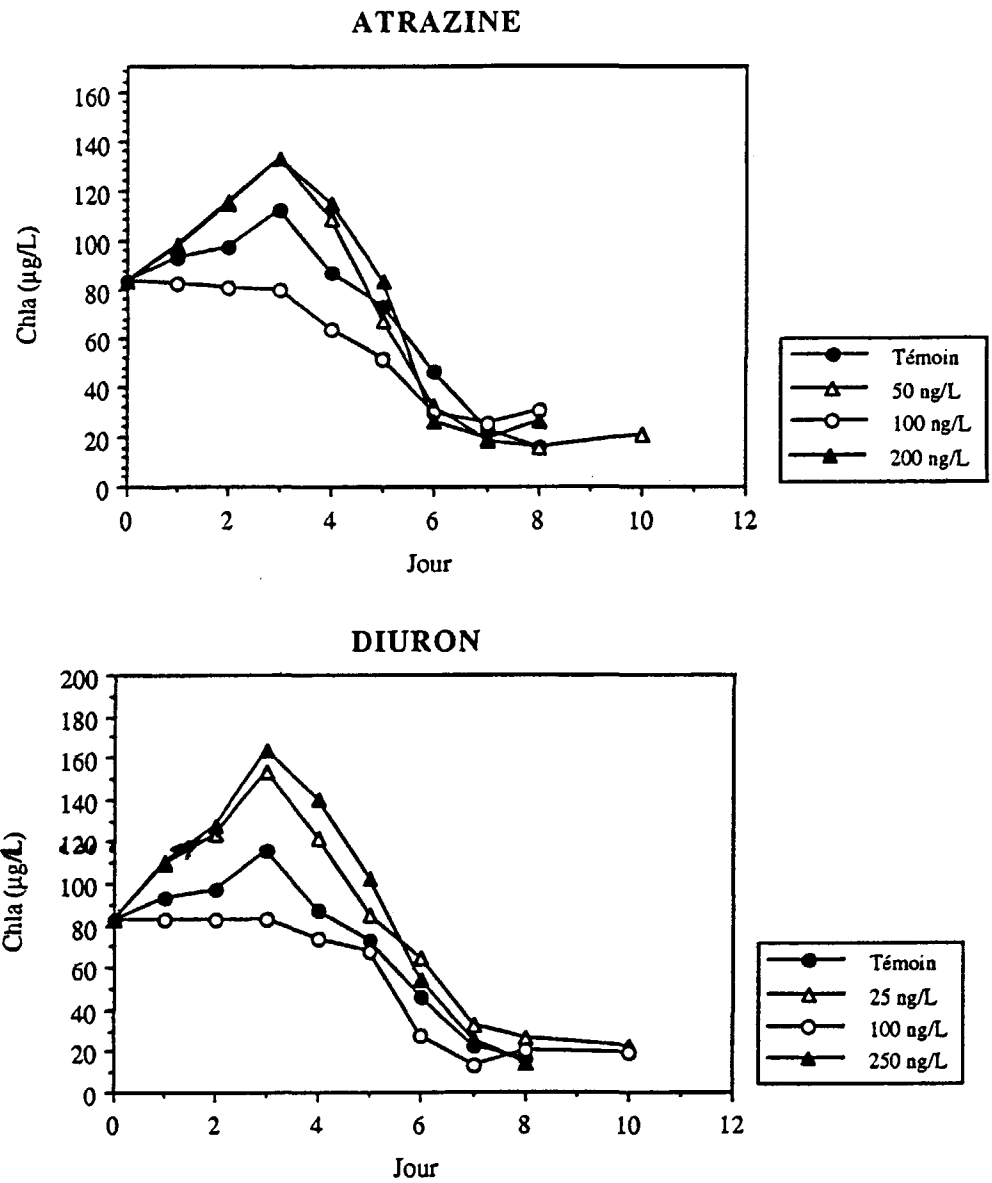


Figure 45 - Evolution de la chlorophylle *a* dans les milieux dopés en atrazine et diuron en juin (mini-tests).

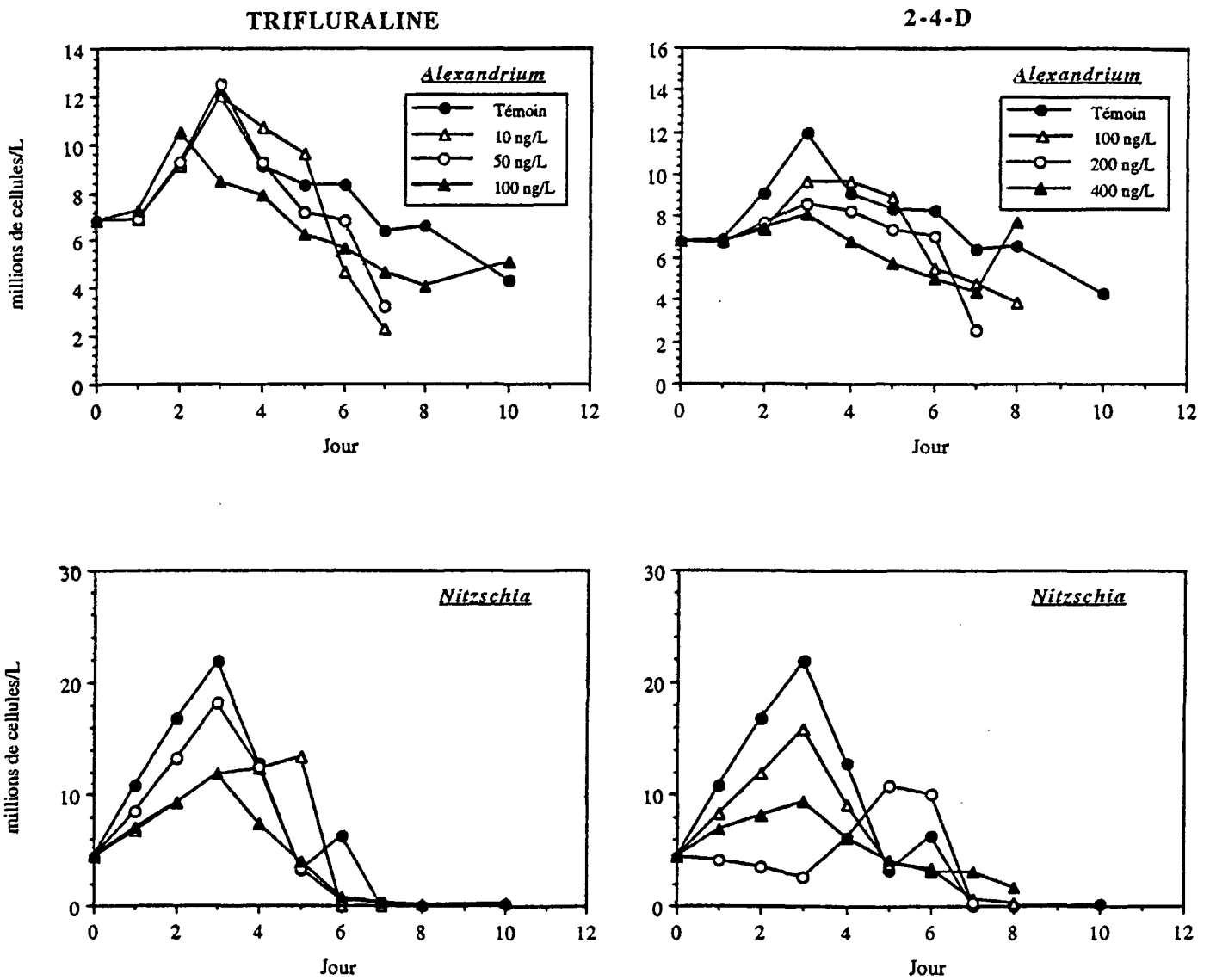


Figure 46 - Evolution des densités cellulaires des deux principales espèces représentées en juin dans les mini-tests dans les milieux dopés en trifluraline et 2,4-D.

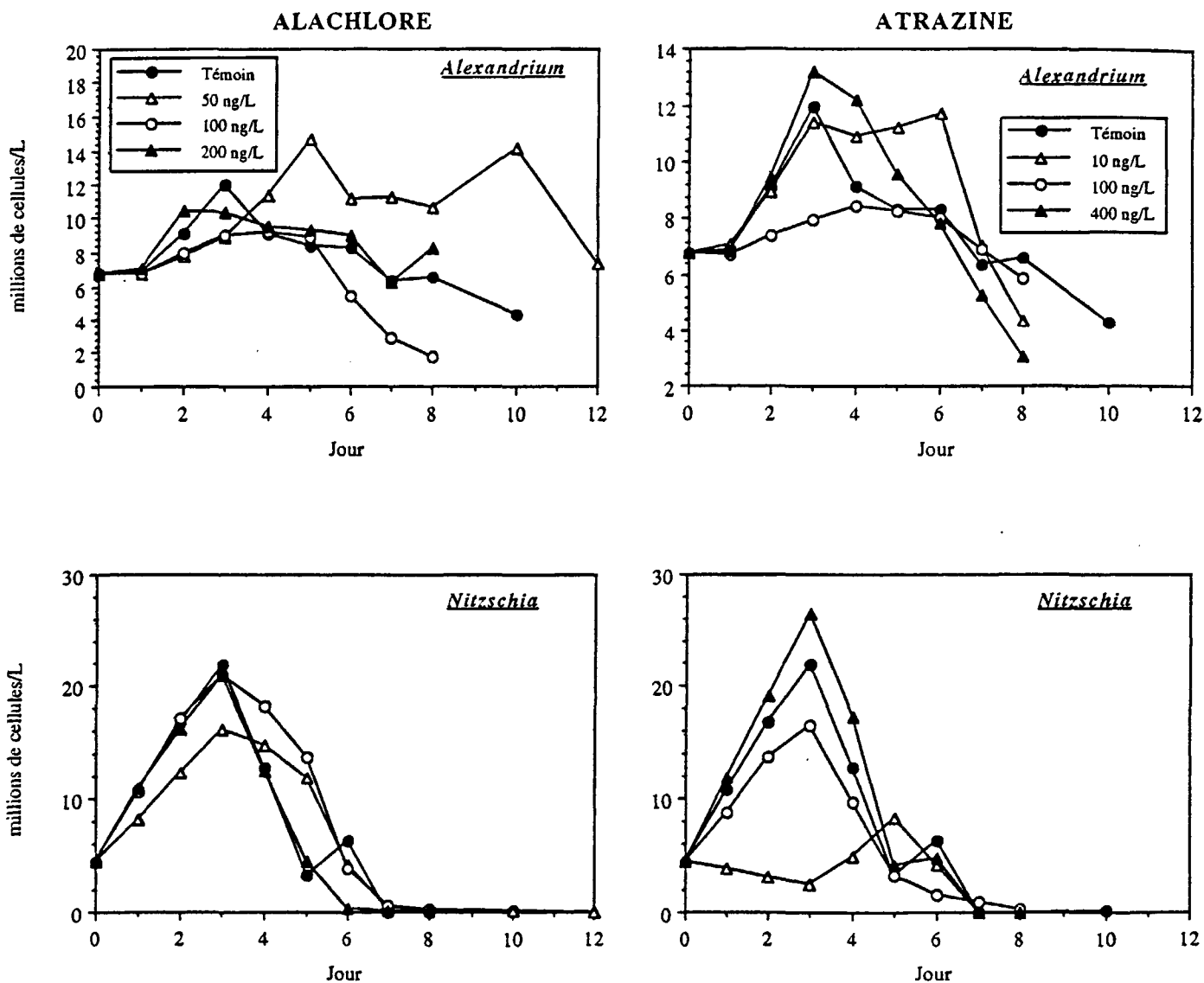


Figure 47 - Evolution des densités cellulaires des deux principales espèces représentées en juin dans les mini-tests dans les milieux dopés en alachlore et atrazine.

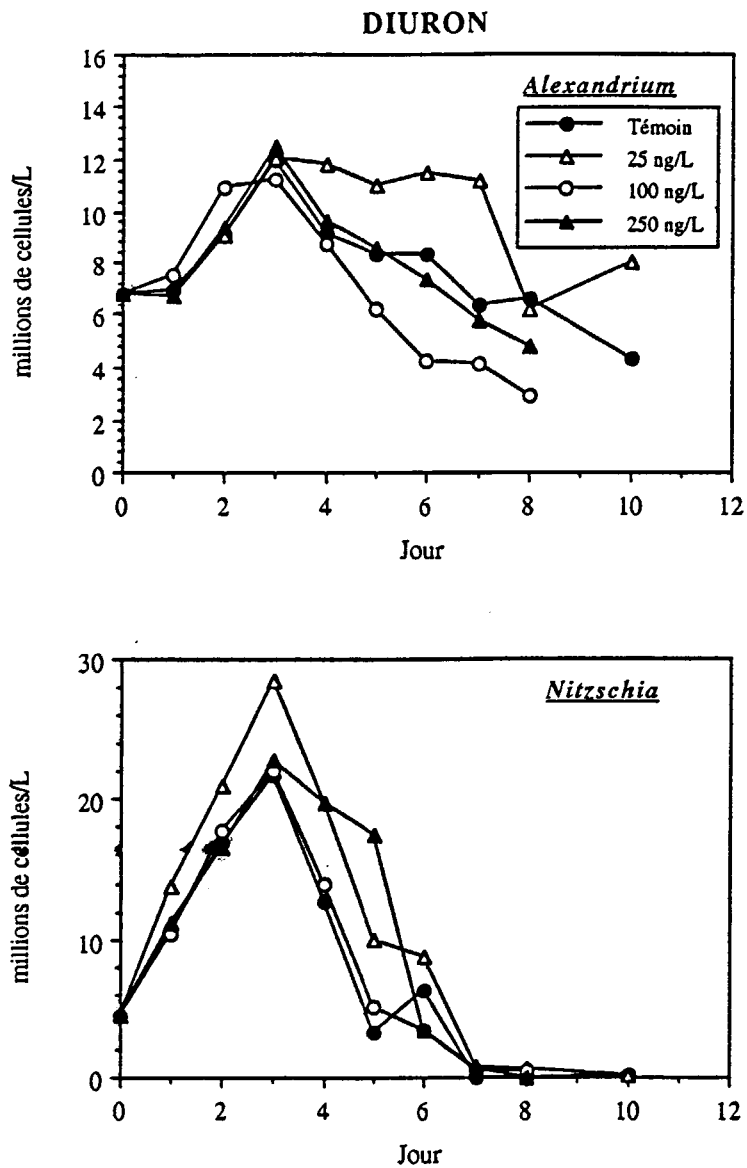


Figure 48 - Evolution des densités cellulaires des deux principales espèces représentées en juin dans les mini-tests dans les milieux dopés en diuron.

stimulatrice aux doses les plus élevées. Enfin, quelle que soit la dose utilisée, le diuron induit une stimulation de la croissance d'*A. minutum* en fin de développement. Il est à noter que l'on observe une reprise de croissance après 8 à 10 jours d'exposition aux fortes doses de 2,4-D, de trifluraline et d'alachlore.

La trifluraline et le 2,4-D entraînent quelle que soit la dose utilisée une diminution de la croissance de *N. longissima*. L'alachlore et le diuron n'ont aucun effet. Une forte réduction de la croissance (50%) est obtenue à la plus faible concentration d'atrazine (10 ng/L) alors que des concentrations plus élevées modifient peu le taux de croissance de cette diatomée.

La comparaison des résultats obtenus entre les deux séries de tests est intéressante. Nous prendrons comme exemple, l'action des herbicides non seulement sur *A. minutum* mais également sur la diatomée accompagnatrice dans les deux séries de tests, *Nitzschia longissima*. (Fig.50; voir aussi Tab.23). En effet, lors des bioessais en grand volume, ces deux espèces étaient à un stade précoce de développement avec de faibles densités cellulaires et un fort taux de croissance (1,0 et 2,08, respectivement). Les mini-tests ont été, par contre, effectués sur des populations provenant d'une eau colorée bien établie, à forte densité cellulaire et faible taux de croissance (0,39 et 0,75, respectivement) arrivant, par conséquent, au terme de leur développement.

Pour les deux espèces, l'action du diuron est peu marquée quels que soient la dose injectée et le stade de développement. On observe toutefois, une tendance au ralentissement de croissance en début de développement et inversement à une stimulation de la croissance sur les populations vieillissantes.

L'atrazine et la trifluraline sont les deux herbicides les plus inhibiteurs de la croissance des jeunes populations d'*A. minutum*, alors que la trifluraline quelle que soit la dose utilisée et l'atrazine à forte concentration augmentent le taux de croissance de cette espèce en fin de développement. La réponse de *N. longissima* est différente de celle d'*A. minutum* : en début ou fin de développement, la diatomée apparaît peu sensible à l'atrazine sauf lorsque celle-ci est ajoutée à très faible dose (10 ng/L), il y a alors blocage de la croissance pendant 3 jours avant une lente reprise (cf. Fig.47). La trifluraline réduit dans tous les cas la croissance de la diatomée.

Le taux de croissance d'*A. minutum* est peu modifié par les ajouts d'alachlore quels que soient le stade de développement et la dose utilisée à l'exception de la dose moyenne de 150 ng/L qui le réduit de 50%. On observe par contre, une forte inhibition de la croissance de *N. longissima* en début de développement alors que cet herbicide reste sans effet sur la population à faible taux de croissance.

Enfin, il semble que l'action du 2,4-D soit davantage liée à la dose injectée qu'au stade de développement des deux espèces. Sans effet marqué sur les deux espèces à faible

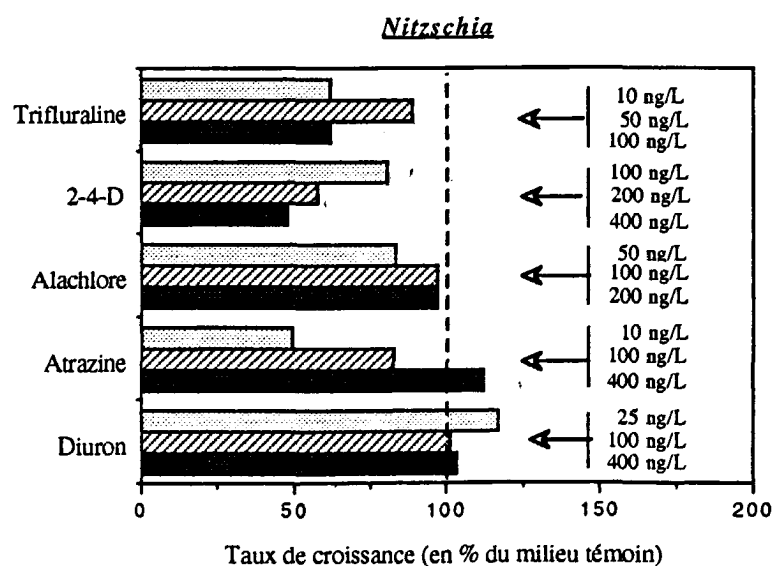
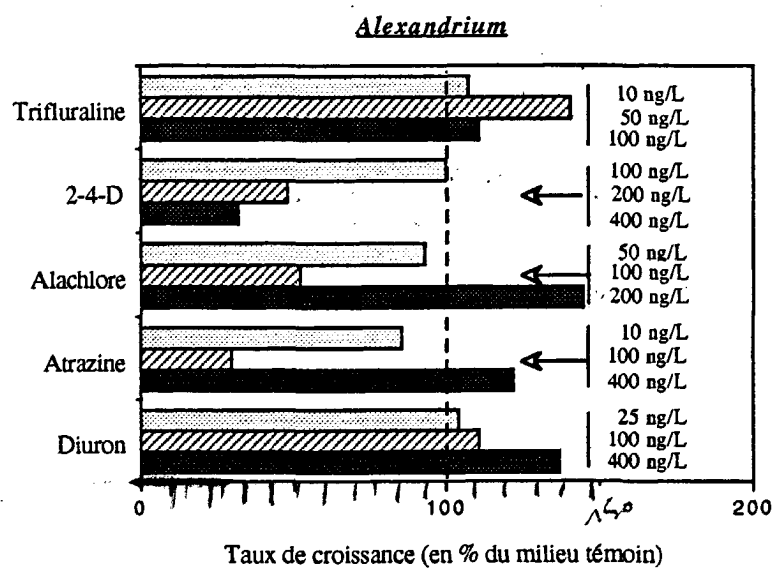
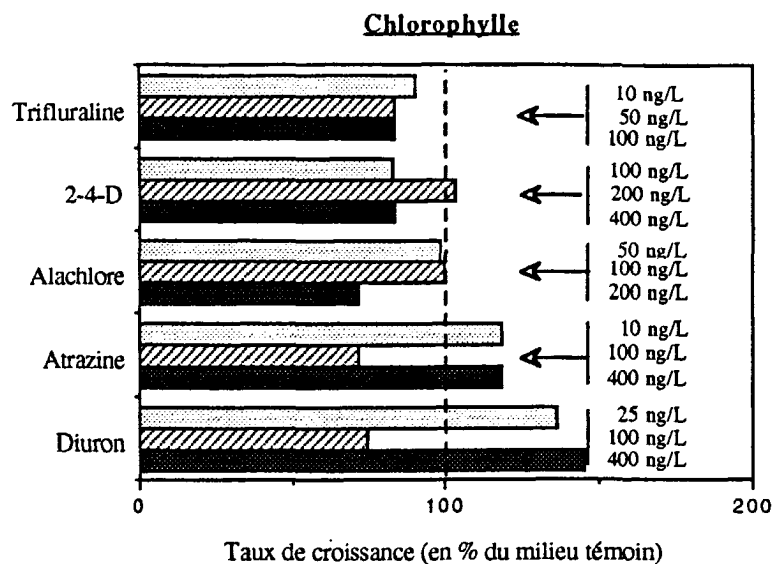
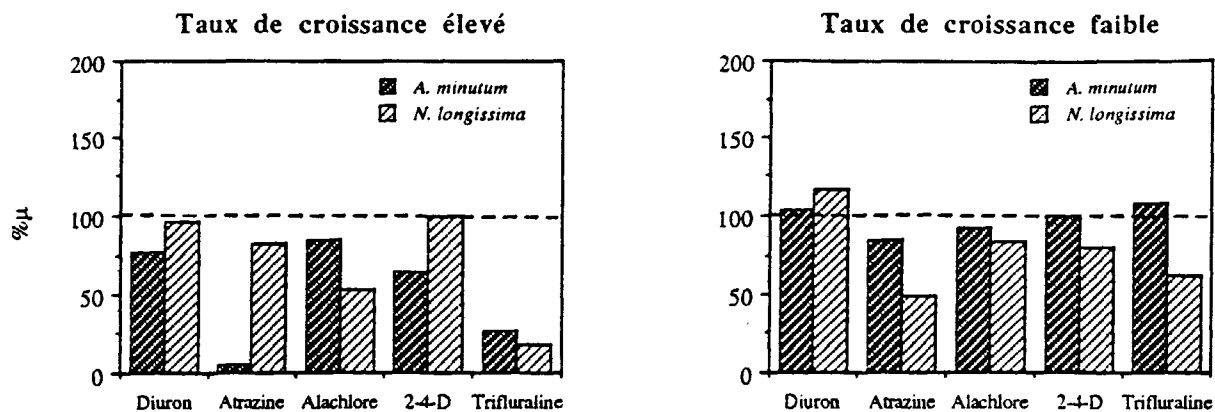
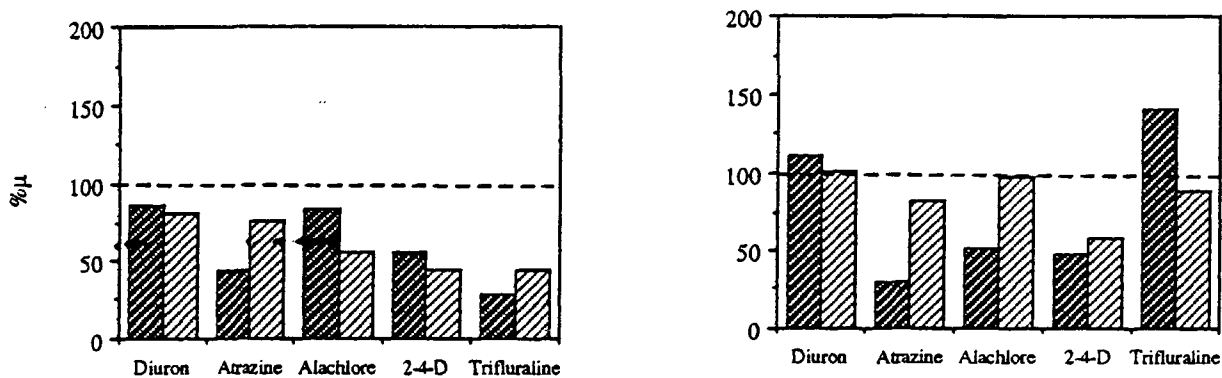


Figure 49 - Pourcentage par rapport au milieu témoin, des maxima de chlorophylle et des taux de croissance des deux principales espèces obtenus dans les milieux dopés (mini-tests).

Faibles concentrations



Concentrations moyennes



Fortes concentrations

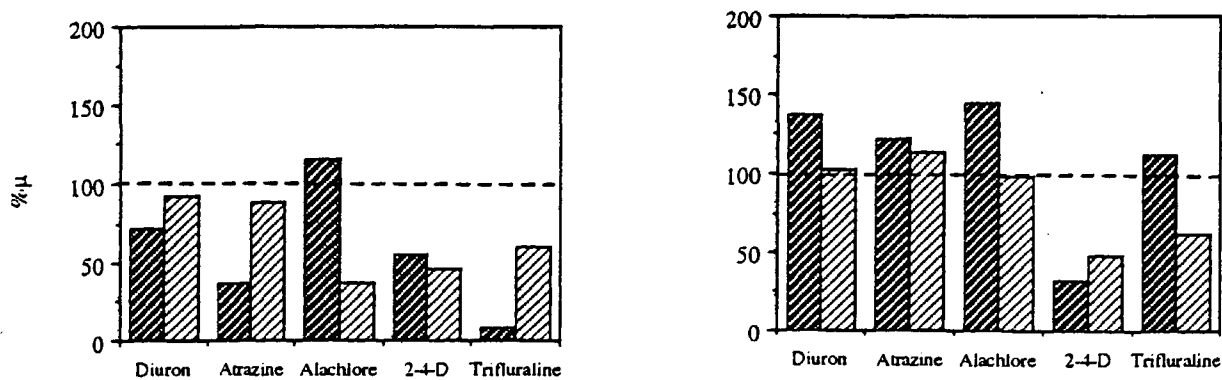


Figure 50 - Pourcentage par rapport au milieu témoin, des taux de croissance d'*Alexandrium minutum* et de *Nitzschia longissima* selon le taux de croissance initial des deux populations.

concentration (100 ng/L), le 2,4-D réduit d'autant plus la croissance des deux microalgues que la dose injectée est élevée. L'inhibition de croissance atteint 75% chez *A. minutum* et 60% chez *N. longissima* pour un ajout de 400 ng/L.

En résumé, les populations d'*A. minutum* à un stade précoce de développement présentent à quelques exceptions près une plus grande sensibilité aux différents herbicides testés que les populations âgées. Quand le taux de croissance est élevé, tous les herbicides sont inhibiteurs à l'exception de l'alachlore en forte concentration. Quand le taux de croissance est faible, tous les herbicides à faible concentration n'ont pas d'effet sur la croissance du dinoflagellé. A forte concentration, seul le 2,4-D a un effet drastique sur la croissance d'*A. minutum*. Les doses moyennes d'atrazine, d'alachlore et de 2,4-D employées dans cette étude induisent une plus forte inhibition de la croissance chez les populations âgées que sur les populations en début de développement. A cette exception près, la plus grande sensibilité des populations jeunes est liée évidemment à leur état physiologique mais aussi vraisemblablement à leur densité cellulaire. En effet, dans un milieu où les cellules sont peu nombreuses, il est possible que la quantité d'herbicide disponible par cellule soit supérieure à ce qu'elle est dans un milieu où les cellules sont abondantes. Dans les expériences décrites ici, les cellules d'*A. minutum* étaient 30 fois plus nombreuses dans la population vieillissante que dans la population jeune.

Il peut être intéressant également de comparer la réponse aux herbicides des populations sauvages d'*A. minutum* (cette étude) à celle des populations cultivées en milieu "maximum" (Arzul et Durand, 1999).

Nous avons comparé les résultats obtenus dans la seconde série d'essais (mini-tests) car les conditions de croissance étaient proches de celles des cultures. Malgré une densité cellulaire plus faible (1 million de cellules/L), les taux de croissance dans les cultures témoins variaient de 0,23 à 0,35 (Arzul, comm.pers.), valeurs proches de celles déterminées dans les mini-tests (0,39). Il est évident que l'action des différents herbicides sur le taux de croissance d'*A. minutum* "cultivé" est beaucoup plus faible que sur le taux de croissance de la population sauvage (Tab.22).

Tableau 22 : Pourcentage de variations du taux de croissance des populations sauvages et des cultures d'*A. minutum* selon les herbicides testés et les doses utilisées (ng/L).

Herbicides	Ajout (ng/L)	<i>A. minutum</i> "sauvage"	<i>A. minutum</i> "cultivé"
Trifluraline	10	107	97 (± 10)
	50	141	94 (± 10)
	100	111	-
	200	-	97 (± 10)
2,4-D	50	-	103 (± 10)
	100	100	-
	200	48	103 (± 10)
	400	32	-
Alachlore	50	93	94 (± 10)
	100	52	-
	200	144	88 (± 10)
Atrazine	10	85	-
	50	-	104 (± 10)
	100	30	96 (± 10)
	200	-	96 (± 10)
	400	122	-
Diuron	10	-	100 (± 10)
	25	104	-
	50	-	96 (± 10)
	100	11	-
	400	137	-

Les résultats sont concordants pour le diuron et pour les plus faibles doses d'herbicides utilisées. Les cultures d'*A. minutum* sont moins sensibles aux divers herbicides à forte concentration. Les cellules cultivées de longue date sur des milieux très enrichis acquièrent un métabolisme différent des cellules "sauvages" et sont beaucoup plus résistantes aux stress auxquels elles peuvent être soumises.

5.3- Conclusions

Au cours de la dernière partie de l'étude, il est apparu que non seulement les herbicides testés agissaient différemment selon la dose utilisée et l'espèce phytoplanctonique impliquée mais aussi selon le stade de croissance des populations. Ce dernier point semble généralisable à l'ensemble des populations étudiées (Tab.23). Ces résultats permettent également d'établir un classement des herbicides selon l'importance de leur nocivité vis-à-vis du phytoplancton.

De tous les herbicides testés, le **diuron** s'avère dans une large gamme de concentrations (5 à 600 ng/L), être le moins actif quelle que soit l'espèce phytoplanctonique. L'**alachlore** vient ensuite qui réduit uniquement la croissance des grosses diatomées telles que *Thalassiosira rotula*, *Thalassiosira decipiens* et *Nitzschia longissima* (en début de

croissance) pour des concentrations variant de 50 à 280 ng/L. L'atrazine testée dans une gamme de concentrations de 10 à 490 ng/L, diminue faiblement la croissance des diatomées mais a une action drastique sur *Alexandrium minutum* en début de croissance. Dans une eau colorée, seule la concentration intermédiaire de 100 ng/L réduit fortement la croissance de cette espèce. La trifluraline (de 10 à 140 ng/L) agit principalement sur les diatomées de grande taille ainsi que sur *Alexandrium minutum* en réduisant fortement leur taux de croissance. Enfin, le 2,4-D semble être l'herbicide le plus toxique pour l'ensemble du phytoplancton en réduisant le taux de croissance de toutes les diatomées (sauf de *Skeletonema costatum* en fin de croissance) et d'*Alexandrium minutum* pour des doses variant de 170 à 400 ng/L.

La variabilité des résultats obtenus ici n'est pas un cas isolé. Comme le soulignent Bérard et Pelte (1999), les concentrations d'herbicides induisant 50% de réduction de la biomasse algale (CE50) peuvent présenter une variabilité importante même dans des cultures monospécifiques.

On notera que les seules stimulations de la croissance observées concernent, dans la grande majorité des cas, les populations vieillissantes qu'il s'agisse des diatomées ou d'*Alexandrium minutum*. Ceci peut à terme modifier *in situ* la composition des communautés phytoplanctoniques et générer un déséquilibre écologique, en particulier, en favorisant le développement d'espèces de qualité trophique moins intéressante pour les conchylicultures. Ainsi, non seulement les herbicides constituent un facteur de sélection des espèces phytoplanctoniques comme l'ont souligné Arzul et Durand (1999) mais leur action est d'autant plus complexe qu'ils n'agissent pas tous de la même façon selon le stade de développement des communautés phytoplanctoniques. Ce dernier point est à rapprocher des observations faites en milieu lacustre où la saison semble intervenir sur la sensibilité des microalgues (Bérard et Pelte, 1996 ; Bérard *etal.*, 1999).

Tableau 23 : Variations du taux de croissance de toutes les espèces de diatomées étudiées au cours des périodes printanière et pré-estivale (Sc = *Skeletonema costatum*, Tl = *Thalassiosira levanderi*, Tr = *Thalassiosira rotula*, Td = *Thalassiosira decipiens*, Nl = *Nitzschia longissima*) et du dinoflagellé *Alexandrium minutum*. (Am) en fonction du taux de croissance du témoin. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à la culture témoin. (en tenant compte d'une limite de significativité de $\pm 20\%$, les stimulations sont représentées en bleu et les inhibitions en rouge)

	DIATOMEES										Am		
	Sc			Tl		Tr		Td		Nl			
Nbre de divisions/jour	0,78	1,64	2,30	0,72	2,60	1,50	1,90	0,88	0,97	0,73	2,08	0,39	1,00
Trifluraline	10	-	-	-	-	-	-	-	-	61	-	107	-
ng/L	20	83	-	-	-	91	-	-	-	-	18	-	27
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	88	-	141	-
	90	213	-	-	-	90	-	-	-	-	43	-	29
	100	-	-	<u>85</u>	-	<u>98</u>	-	<u>74</u>	-	<u>78</u>	61	-	111
	118	-	60	-	142	-	38	-	0	-	-	-	-
	140	85	-	-	-	92	-	-	-	-	60	-	9
2,4-D	< 50	-	-	<u>94</u>	-	<u>78</u>	-	<u>89</u>	-	<u>203</u>	-	-	-
ng/L	100	-	-	-	-	-	-	-	-	80	-	100	-
	170	91	-	-	-	52	-	-	-	-	100	-	64
	200	-	-	-	-	-	-	-	-	58	-	48	-
	250	152	-	-	-	94	-	-	-	-	44	-	55
	310	146	-	-	-	87	-	-	-	-	46	-	55
	374	-	75	-	68	-	91	-	0	-	-	-	-
	400	-	-	-	-	-	-	-	-	47	-	32	-
Alachlore	50	123	-	-	-	99	-	-	-	83	52	93	85
ng/L	68	-	106	-	134	-	105	-	22	-	-	-	-
	110	211	-	-	-	124	-	-	-	97	55	52	84
	200	134	-	-	-	102	-	-	-	97	38	144	116
	280	-	-	<u>111</u>	-	<u>89</u>	-	<u>52</u>	-	<u>68</u>	-	-	-
Métolachlore	400	-	76	<u>109</u>	74	<u>92</u>	181	<u>67</u>	23	<u>107</u>	-	-	-
ng/L													
Atrazine	10	-	-	-	-	-	-	-	-	49	-	85	-
ng/L	40	248	-	-	-	85	-	-	-	-	83	-	6
	100	-	-	-	-	-	-	-	-	82	-	30	-
	150	120	-	-	-	52	-	-	-	-	76	-	43
	400	-	-	<u>105</u>	-	<u>85</u>	-	<u>76</u>	-	<u>96</u>	112	-	122
	425	-	75	-	0	-	82	-	36	-	-	-	-
	490	89	-	-	-	72	-	-	-	-	89	-	37
Diuron	5	70	-	-	-	86	-	-	-	-	96	-	77
ng/L	25	-	-	-	-	-	-	-	-	117	-	104	-
	100	-	-	-	-	-	-	-	-	101	-	111	-
	300	120	-	-	-	91	-	-	-	-	81	-	66
	310	61	-	-	-	83	-	-	-	-	92	-	72
	400	-	-	<u>97</u>	-	<u>85</u>	-	<u>44</u>	-	<u>101</u>	103	-	137
	598	-	100	-	130	-	65	-	141	-	-	-	-

Les valeurs soulignées correspondent à celles obtenues sur les populations marines

5.4- Références

- ARZUL, G. ET G. DURAND, 1995 - Effet des herbicides détectés en Rade de Brest, sur la croissance *in vitro* d'une diatomée et d'un dinoflagellé. Actes du Colloque CORPEP "Qualité des eaux et produits phytosanitaires: du diagnostic à l'action", Rennes, le 27 novembre 1995, p. 186-195.
- ARZUL, G. ET G. DURAND, 1999 - Effet des herbicides sur la croissance *in vitro* du phytoplancton marin. Colloque IFREMER-INRA, 23-24 septembre 1999, Saint-Brieuc (soumis à "Pollution diffuses").
- ASHTON, F.M. ET A.S. CRAFTS, 1973 - "Mode of Action of Herbicides". John Wiley & Sons, Ed., 504 p.
- BERARD A. ET T. PELTE, 1996 - Effets de l'atrazine sur l'évolution des peuplements phytoplanctoniques lacustres. Etude en enceintes expérimentales *in situ*. *Ecologie*, 27, p.195-201.
- BERARD A. ET T. PELTE, 1999 - The impact of Photosystem II (PS II) inhibitors on algae communities and dynamics. *Revue des Sciences de l'Eau*, 12 (2), p.333-361.
- BERARD A., LÉBOULANGER C. ET T. PELTE, 1999 - Tolerance of *Oscillatoria limnetica* Lemmermann to Atrazine in Natural Phytoplankton Populations and in Pure Culture : Influence of Season and temperature. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 37 (4), p.1-9.
- HELLER, R., ESNAUT, R. ET C. LANCE, 1995 - "Physiologie végétale. 2-développement". Masson, Ed, 5ème édition, 315 p.
- LORENZEN, C.J., 1966 - A method for the continuous measurement of *in vivo* chlorophyll concentration. *Deep-Sea Res.*, 16, p.45-57.
- MAESTRINI S., BONIN D.J. ET M.R. DROOP, 1984 - Phytoplankton ad indicators of sea water quality: bioassays approaches and protocols. In "Algae as ecological indicators", *Acad. Press*, London, p. 71-132.
- ROBERTS, T.R., HUTSON, D.H., NICHOLLS, P.H. ET J.R. PLIMMER, 1998 - "Metabolic Pathways of Agrochemicals. Part 1/ Herbicides and Plant Growth Regulators", *The Royal Society of Chemistry*, 849 p.
- STEMMANN NIELSEN, E., 1952 - The use of radioactive carbon (^{14}C) for measuring organic production in the sea. *J. Cons. Int. Explor. mer*, 18, p. 117-140.
- UTERMÖLH, H., 1931 - Neue Wege in der quantitativen Erfassung des Planktons (mit besonderer Berücksichtigung des Ultraplanktons). *Verh. int. Ver. theor. angew. Limnol.*, 5, p. 567-596.
- YENTSCH, C.S. ET D.W. MENZEL, 1963 - A method for determination of phytoplankton chlorophyll and phaeophytin by fluorescence. *Deep-Sea Res.*, 10, p. 221-231.

Conclusion - Synthèse

Au cours des deux années d'étude, les seuls herbicides qui ont été retrouvés dans l'eau de la Penzé sont l'atrazine, la trifluraline et le diuron en 1998, l'atrazine et le diuron en 1999. La trifluraline apparaît ponctuellement à la mi-mai et à la fin juillet c'est-à-dire hors de la période de développement d'*Alexandrium minutum*, à des concentrations < 30 ng/L. La présence quasiment constante d'atrazine et de diuron est observée au cours des deux cycles d'étude. Les concentrations varient de 0 à 70 ng/L pour l'atrazine et de 0 à 250 ng/L pour le diuron en 1998 et de 0 à 620 ng/L et de 0 à 110 ng/L, respectivement en 1999.

En s'appuyant sur les observations faites en rivière de Penzé concernant le développement d'*Alexandrium minutum* (Convention de recherche AELB/UBO : Développement d'*Alexandrium minutum* dans l'estuaire de la Penzé (baie de Morlaix). Rôle de l'azote et du phosphore ; en prép.), nous avons tenté d'établir le rôle des herbicides dans le déterminisme des eaux colorées à *Alexandrium minutum*.

En 1998, les dosages d'herbicides correspondant à la période de développement du dinoflagellé (fin mai-fin juin) ont été effectués au Pont de la Corde dans des eaux de salinité voisine de 33 ‰. Ces fortes salinités sont mal tolérées par *Alexandrium minutum* qui se développe préférentiellement dans des salinités variant de 21 à 30 ‰, le maximum de cellules étant localisé dans des eaux de salinité voisine de 26 ‰.

En 1999, l'atrazine a été constamment présente dans la Penzé pendant toute la période de développement d'*A. minutum* à des concentrations variant de 20 à 35 ng/L. Mais, il est à noter que l'atrazine n'est pas la seule triazine présente dans la rivière puisque des produits tels que la simazine, la propazine et la dééthylatrazine (DEA) sont également dosés (Tableau 24) (les concentrations peuvent être parfois bien supérieures à celle de l'atrazine (1998). En outre, on observe la présence ponctuelle de diuron à des concentrations voisines de 30 ng/L.

Tableau 24 : Concentrations d'herbicides (ng/L) dosés dans la rivière de Penzé (Pont de la Corde), en 1999, au cours de la formation de l'eau colorée à *Alexandrium minutum* (cellules/L) dans des eaux de salinité variant de 24 à 29‰.

Date	<i>A. minutum</i>	Atrazine	DEA	Propazine	Simazine	Total triazines	Diuron
28/5	1200	16	8	7	11	42	27
18/6	9.10 ⁵	35	14	60	7	116	0
21/6	2.10 ⁷	27	10	10	0	47	37
5/7	1000	21	0	0	0	21	0
5/7		620	55	0	295	970	0

La dernière ligne du tableau montre les concentrations retrouvées à la même date mais en amont du Pont de la Corde, au Pont ferroviaire.

Or, dans les cultures monospécifiques d'*A. minutum*, les concentrations de 25 à 50 ng/L d'atrazine ou de diuron ne modifient pas la croissance du dinoflagellé. Dans les populations naturelles, on observe une forte inhibition au début du développement du bloom pour un ajout de 10 ng/L d'atrazine. En fin de croissance, le même ajout n'a pas d'effet sur la population d'*A. minutum*. Cette différence peut être imputée à plusieurs causes :

- la concentration des autres polluants : on note, en effet, de fortes concentrations de triazines (120 ng/L) et l'absence de diuron en début de croissance. La propazine en particulier (60 ng/L) pourrait avoir un effet synergique avec l'atrazine à faible dose. A la fin du bloom, les concentrations de triazines totales sont réduites à 50 ng/L mais par contre, le diuron est présent à raison de 40 ng/L. Or, même à cette faible concentration, cet herbicide a un effet plutôt stimulateur, effet qui compenserait l'action de l'atrazine.

- l'état physiologique des populations lié au stade de développement: l'ensemble des résultats montrent que les populations vieillissantes seraient moins sensibles aux toxiques que les populations en cours d'établissement.

- les effets indirects liés au nombre de cellules :

- il est possible que pour une même concentration d'atrazine, la quantité disponible par cellule soit d'autant plus grande que le nombre de cellules est faible ;

- par ailleurs, il n'est pas exclu que l'auto-ombrage (self-shading) induit par les fortes densités cellulaires atténue l'effet de l'atrazine dont l'action est liée à la photosynthèse et, par conséquent, à l'éclairement.

- la composition spécifique initiale : selon le principe de sélection par les herbicides extrapolé des observations faites en milieu lacustre (Bérard et Pelte, 1999), les espèces phytoplanctoniques résistantes à l'atrazine devraient entrer en compétition avec le dinoflagellé plus sensible et l'éliminer. Les deux espèces de diatomées dominantes,

Skeletonema costatum et *Thalassossira levanderi* au début du développement d'*A. minutum*, sont en fin de croissance (faible taux de division, forte densité cellulaire). Bien que résistantes à l'atrazine, elles disparaissent naturellement du milieu. Une autre diatomée, *Nitzschia longissima*, se développe alors en même temps qu'*A. minutum*. Moins résistante que le dinoflagellé, elle n'entre pas en compétition avec celui-ci. Toutefois, dans ce milieu estuarien enrichi en nitrates et phosphates, il est peu probable que la compétition pour les nutriments soit nécessaire sauf si l'un des éléments devient limitant.

- **La durée d'exposition des populations à l'atrazine:** les populations d'*A. minutum* qui ont atteint le stade d'eau colorée en 1999 ont été soumises dès le début de leur croissance et de façon constante pendant 1 mois à des concentrations d'atrazine voisines de 30 ng/L. Il est possible que la phase finale du développement (eau colorée) avec une moindre sensibilité au toxique, soit due à un phase de « récupération » comme cela a pu être mis en évidence dans les cultures mono spécifiques. Ce phénomène est également observé chez les populations naturelles soumises à d'autres toxiques (2,4-D, trifluraline et alachlore aux plus fortes doses testées).

Les incertitudes qui pèsent sur ces interprétations, comme dans la plupart des études de ce type, nécessitent une étude complémentaire qui serait axée sur les interactions entre polluants, facteurs environnementaux et compétition interspécifique.

Propositions prospectives :

"In vitro"

Une étude prospective complémentaire a été effectuée *in vitro* sur la diatomée *Chaetoceros gracilis* (choisie comme représentant les algues fourrages du bloom printanier) cultivée en présence, d'une part d'un herbicide utilisé pour remplacer l'atrazine : le nicosulfuron, d'autre part d'un herbicide couramment appliqué : le glyphosate (Glévarec, 1999). Les résultats ont montré que, aux concentrations testées allant de 50 à 1000 ng/L, le nicosulfuron agit en inhibiteur de croissance tandis que le glyphosate n'a pas d'effet significatif. De plus, les tests effectués en conditions « enrichies » et « appauvries » (voir nos conditions pour tests sur mixage des herbicides) ont révélé que les teneurs plus élevées en sels nutritifs atténuent les effets des herbicides sur la croissance de la diatomée. Ces premières observations montrent l'intérêt d'effectuer une étude complémentaire similaire sur *Alexandrium minutum* avec les deux herbicides, et éventuellement d'autres substances nouvelles mises sur le marché.

Afin de mieux interpréter les résultats obtenus *in situ* et les relier plus étroitement aux résultats obtenus *in vitro*, il paraît utile de tester les effets de quatre herbicides de modes d'action différents sur la viabilité de *A. minutum*. Les tests effectués à différents stades de développement de la population (Schäfer *et al.*, 1993) cultivée en présence des substances herbicides à différentes concentrations, et en deux conditions d'éclairage (Antia *et al.*, 1991), seraient basés sur l'étude de la production primaire comme indicateur (Bérard *et al.*, 1998). Ainsi il serait possible d'améliorer l'estimation de l'impact des contaminations par les herbicides en eaux côtières, sur la croissance de l'algue toxique.

"In situ"

Parmi les différents points à approfondir, il paraît intéressant :

- de faire un suivi serré des contaminations par les herbicides de la Penzé, pendant la période potentielle de développement d'*A. minutum*,
- de préciser la compétition interspécifique liée à l'action des herbicides et, en particulier, avec un autre dinoflagellé non toxique *Heterocapsa triquetra*, espèce accompagnatrice d'*A. minutum* pendant la mise en place du bloom. Cette espèce peut devenir dominante et évincer *A. minutum* (1998),
- d'étudier le rôle de la lumière sur la sensibilité d'*A. minutum* afin de tester la potentialité d'hétérotrophie de cette espèce.

Ce suivi sera exécuté dans la rivière de Penzé depuis l'initiation du bloom (fin mai) jusqu'au stade d'eau colorée (fin juin). Les prélèvements seront effectués à la salinité de 26 ‰ au maximum de concentration cellulaire dans un pas de temps suffisamment court (1 à 3 jours) pour suivre l'évolution de la composition phytoplanctonique et la contamination du milieu. A chaque prélèvement, on déterminera la concentrations d'herbicides dans le milieu ainsi que la concentration en sels nutritifs. Des tests de croissance des populations phytoplanctoniques naturelles dopées en herbicides seront effectués au laboratoire (température et éclairage contrôlés) par comptages cellulaires. Ces tests seront effectués à la lumière et à l'obscurité en présence de cultures témoins soit pour un seul herbicide à deux concentrations soit pour deux herbicides à une concentration, compte-tenu de la multiplicité des échantillons (6 flacons par prélèvement).

La présence d'atrazine étant constante dans la rivière de Penzé, il est indispensable d'en voir les effets dans les conditions précitées. Les dopages ponctuels seront effectués à raison de 400 ng/L, concentration qui détermine les effets les plus nets sur les différentes espèces précédemment étudiées. Ces tests pourront également permettre d'appréhender l'influence du temps d'exposition aux faibles concentrations d'atrazine sur la réponse à des apports ponctuels de ce toxique dans la mesure où ce sera la même population d'*A. minutum* qui sera étudiée pendant le temps du suivi.

Si une seule concentration d'atrazine est retenue, il semble opportun de tester également l'effet d'un autre herbicide : le diuron, bien qu'interdit, est toujours présent dans le milieu. (il présente l'avantage d'avoir été déjà testé) ; le glyphosate appelé à remplacer le diuron ou bien encore le nicosulfuron. Pour ces deux derniers herbicides, nous n'avons pas d'indications sur les doses à tester.

Dans la mesure où ce suivi serait effectué sans qu'il y ait apparition d'eau colorée à *A. minutum*, cette étude constituerait une situation de référence.

Annexe 1 :
Résultats analytiques

Annexe 1 : Tableau récapitulatif des analyses effectuées en baie de Morlaix

LIEU DE PRÉLEVEMENT	DATE	HEURE	PARAMÈTRES PHYSICO-CHIMIQUES			RESULTAT ANALYSE (en µg/L)													
			(POUR MILLE SALINITE)	(°C) TEMPÉRATURE	(m) FONDEUR AU SITE	TRIFLURALINE	ATRAZINE	CYANAZINE	DESOPROPYLATRAZINE	DEETHYLATRAZINE	PROPАЗINE	SIMAZINE	TERBUTHYLAZINE	METOLACHLORE	ALACHLORE	MECOPROP	2,4 D	MCPA	
Rivière du Pont Loquenoté Pont de la Corde Penzé	15/04/1998	16:50	1,1	9		<0,001	<0,002	<0,008	<0,004	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,009	<0,047	<0,053	<0,048
	15/04/1998	17:10	13,6	9		<0,001	0,020	<0,008	<0,004	0,060	<0,002	0,025	<0,002	<0,002	<0,009	<0,047	<0,053	<0,048	
	15/04/1998		0	8,9		<0,001	<0,002	<0,006	<0,004	<0,002	<0,002	0,020	<0,002	<0,002	<0,009	<0,047	<0,053	<0,048	
Chenal Pont de la Corde	21/04/1998		34,1	10,5	19,5	<0,001	<0,002	<0,006	<0,004	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,009	<0,047	<0,053	<0,048	
	21/04/1998		23,4	10,9	10,5	<0,001	0,020	<0,006	<0,004	0,040	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,009	<0,047	<0,053	<0,048	
Loquenoté Pont de la Corde Penzé	12/05/1998	15:20	13,6	19,3		0,016	0,012	0,017	<0,004	0,017	0,005	0,005	0,005	<0,002	<0,009	<0,047	<0,053	1,963	
	12/05/1998	15:55	25,7	16,2		0,013	0,009	0,006	<0,004	0,012	0,004	0,003	0,011	<0,002	<0,009	<0,047	<0,053	0,876	
	12/05/1998	16:15	0	17,2		<0,001	0,012	0,073	<0,004	0,067	<0,002	<0,002	0,041	<0,002	<0,009	<0,047	<0,053	0,146	
Chenal Pont de la Corde Pont ferroviaire	22/05/1998	16:35	34,6	14,7	10	<0,001	<0,002	<0,006	<0,004	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,009	<0,047	<0,053	<0,048	
	22/05/1998	16:55	33	16	7,7	<0,001	0,008	<0,006	<0,004	0,023	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,009	<0,047	<0,053	<0,048	
	22/05/1998	17:00	32,2	15,4	1,6	<0,001	0,008	<0,006	<0,004	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,009	<0,047	<0,053	<0,048	
Loquenoté Pont de la Corde Penzé	09/06/1998	17:30	34,5	15,5		0,018	0,079	<0,006	<0,004	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,009	<0,047	<0,053	0,048	
	09/06/1998	17:55	33	15,6		<0,001	<0,002	<0,006	<0,004	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,009	<0,047	<0,053	0,548	
	09/06/1998	17:45	2,9	15,4		<0,001	<0,002	<0,006	<0,004	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,009	<0,047	<0,053	4,638	
Chenal Dourduff Pont de la Corde Loquenoté	23/06/1998	16:20	35	15,7	5,1	0,030	0,004	<0,006	<0,004	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,009	<0,047	<0,053	<0,048	
	23/06/1998		34,9	16,6	6,6	<0,001	0,004	<0,006	<0,004	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,009	<0,047	<0,053	<0,048	
	23/06/1998		34,2	18,4	marée haute	0,006	0,030	<0,006	<0,004	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,009	<0,047	<0,053	<0,048	
Rivière de Morlaix à Port de Morlaix	23/06/1998		22,7	18,9															
	23/06/1998		0	15,9															
Port de Morlaix Loquenoté Pont de la Corde	15/07/1998	11:20	0	14,6	1,3	0,030	0,023	<0,006	<0,004	0,017	0,003	0,003	<0,002	<0,002	<0,009	<0,047	<0,053	<0,048	
	15/07/1998	14:25	26,4	16,8	1	0,040	0,008	<0,006	<0,004	0,005	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,009	<0,047	<0,053	<0,048	
	15/07/1998	14:45	30,8	16,9	marée haute	0,029	0,008	<0,006	<0,004	0,004	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,009	<0,047	<0,053	<0,048	
Port de Morlaix Loquenoté Pont de la Corde Penzé	05/05/1999	10:30	0	12,2	1,1	<0,001	0,018	<0,006	<0,004	0,038	0,005	0,004	<0,002	<0,002	<0,009	<0,05	<0,05	<0,05	
	05/05/1999	10:40	33,7	13,2	4 anneaux	<0,001	0,003	<0,006	<0,004	0,003	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,009	<0,05	<0,05	<0,05	
	05/05/1999	11:00	30,8	13,8	1 anneau	<0,001	0,005	<0,006	<0,004	0,004	0,003	0,003	<0,002	<0,002	<0,009	<0,05	<0,05	<0,05	
	05/05/1999	11:10	2,5	12,9	3 barres échelées	<0,001	0,037	<0,006	<0,004	0,006	0,004	0,006	<0,002	<0,002	<0,009	<0,05	<0,05	<0,05	
Port de Morlaix Loquenoté Pont de la Corde Penzé	28/05/1999	9:30	0	13,9	1,1	<0,001	0,058	<0,006	<0,004	0,043	0,017	0,013	<0,002	<0,002	<0,009	<0,050	<0,050	<0,050	
	28/05/1999	9:50	23,3	15,2	1,1	<0,001	0,015	<0,006	<0,004	0,018	0,014	0,010	<0,002	<0,002	<0,009	<0,050	<0,050	<0,050	
	28/05/1999	10:10	26,2	15,3	8 anneaux	<0,001	0,016	<0,006	<0,004	0,008	0,007	0,011	<0,002	<0,002	<0,009	<0,050	<0,050	<0,050	
	28/05/1999	10:35	0,1	14,2	sous échelle	<0,001	0,062	<0,006	<0,004	0,060	0,009	0,009	<0,002	<0,002	<0,009	<0,050	<0,050	<0,050	
Port de Morlaix Loquenoté Pont de la Corde Penzé	21/06/1999	9:30	0	13,3	1,1	<0,001	0,255	<0,006	<0,004	0,032	0,064	<0,002	<0,002	<0,002	<0,009	<0,05	<0,05	<0,05	
	21/06/1999	9:45	25	16,2	10 anneaux	<0,001	0,019	<0,006	<0,004	<0,002	0,028	<0,002	<0,002	<0,002	<0,009	<0,05	<0,05	<0,05	
	21/06/1999	10:15	29,6	16,6	5 anneaux	<0,001	0,027	<0,006	<0,004	0,010	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,009	<0,05	<0,05	<0,05	
	21/06/1999	10:30	0,1	13,7	sous échelle	<0,001	0,060	<0,006	<0,004	0,019	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,009	<0,05	<0,05	<0,05	
Chenal Pont de la Corde Pont ferroviaire Loquenoté	05/07/1999	15:20	34,8	16,8	3	<0,001	<0,002	<0,006	<0,004	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,009	<0,05	<0,05	<0,05	
	05/07/1999	15:40	28	18,6	6,1	<0,001	0,021	<0,006	<0,004	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,009	<0,05	<0,05	<0,05	
	05/07/1999	15:50	24	18,6	1,7	<0,001	0,625	<0,006	<0,004	0,063	<0,002	0,291	<0,002	<0,002	<0,009	<0,05	<0,05	<0,05	
	06/07/1999	8:20	29,9	17,5	1,4	<0,001	0,021	<0,006	<0,004	<0,002	0,023	<0,002	<0,002	<0,002	<0,009	<0,05	<0,05	<0,05	
Chenal Pont de la Corde Pont Ferroviaire Dourduff	21/07/1999	15:25	34,3	17	9	<0,001	<0,002	<0,006	<0,004	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	0,09	0,06	<0,05		
	21/07/1999	14:50	33,2	18,2	8,5	<0,001	<0,002	<0,006	<0,004	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,009	<0,05	<0,05	<0,05	
	21/07/1999	15:00	31,3	18,8	4,5	<0,001	<0,002	<0,006	<0,004	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,009	<0,05	0,15	<0,05	
	21/07/1999	16:00	34,4	17,8	2,1	<0,001	<0,002	<0,006	<0,004	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,009	<0,05	0,07	<0,05	
Chenal Pont de la Corde Pont Ferroviaire Dourduff	04/08/1999	14:50	35,1	17	4,7	<0,001	<0,002	<0,006	<0,004	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,009	<0,05	<0,05	<0,05	
	04/08/1999	15:30	30	19	7,3	<0,001	0,027	<0,006	<0,004	0,004	<0,002	0,042	<0,002	<0,002	<0,009	<0,05	<0,05	<0,05	
	04/08/1999	15:40	27,4	19,5	2,8	<0,001	0,135	<0,006	<0,004	0,007	<0,002	0,166	<0,002	<0,002	0,014	<0,05	<0,05	<0,05	
	04/08/1999	14:20	35	17,8	2,8	<0,001	0,008	<0,006	<0,004	<0,002	<0,002	0,025	<0,002	<0,002	<0,009	<0,05	<0,05	<0,05	

Annexe 1 : Tableau récapitulatif des analyses effectuées en baie de Morlaix

PRELEVEMENT		DICHLOROPROP	DICAMBA	FLUAZOP BUTHYL	DICLOFOP METHYL	BENTAZONE	CHLORTOLURON	DIURON	ISOPROTURON	LINURON	NEBURON	IRGAROL	PROPICONAZOLE
NABELLE DU BOMI	DATE												
Locquénoët	15/04/1998	<0,055	<0,055	<0,076	<0,050		<0,005	0,246	<0,005	<0,005			
Pont de la Corde	15/04/1998	<0,055	<0,055	<0,076	<0,050		<0,005	0,041	0,053	<0,005			
Penzé	15/04/1998	<0,055	<0,055	<0,076	<0,050		<0,005	<0,005	<0,005	<0,005			
Chenal	21/04/1998	<0,055	<0,055	<0,076	<0,050		<0,005	<0,005	<0,005	<0,005			
Pont de la Corde	21/04/1998	<0,055	<0,055	<0,076	<0,050		<0,005	0,050	<0,005	<0,005			
Locquénoët	12/05/1998	<0,055	<0,055	<0,076	<0,050		<0,005	0,115	<0,005	<0,005			
Pont de la Corde	12/05/1998	<0,055	<0,055	<0,076	<0,050		<0,005	0,027	<0,005	<0,005			
Penzé	12/05/1998	<0,055	<0,055	<0,076	<0,050		<0,005	0,029	<0,005	<0,005			
Chenal	22/05/1998	<0,055	<0,055	<0,076	<0,050		<0,005	<0,005	<0,005	<0,005			
Pont de la Corde	22/05/1998	<0,055	<0,055	<0,076	<0,050		<0,005	0,018	<0,005	<0,005			
Pont Ferroviaire	22/05/1998	<0,055	<0,055	<0,076	<0,050		<0,005	<0,005	<0,005	<0,005			
Locquénoët	09/06/1998	<0,055	<0,055	<0,076	<0,050	<0,030	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005			
Pont de la Corde	09/06/1998	<0,055	<0,055	<0,076	<0,050	<0,030	<0,005	0,054	<0,005	<0,005			
Penzé	09/06/1998	<0,055	<0,055	<0,076	<0,050	<0,030	<0,005	0,110	<0,005	<0,005			
Chenal	23/06/1998	<0,055	<0,055	<0,076	<0,050	<0,030	<0,005	0,006	<0,005	<0,005			
Dourduff	23/06/1998	<0,055	<0,055	<0,076	<0,050	<0,030	<0,005	0,009	<0,005	<0,005			
Pont de la Corde	23/06/1998	<0,055	<0,055	<0,076	<0,050	<0,030	<0,005	0,007	<0,005	<0,005			
Locquénoët	23/06/1998	<0,055	<0,055	<0,076	<0,050	<0,030	<0,005	0,010	<0,005	<0,005			
Rivière de Morlaix à Port de Morlaix	23/06/1998 23/06/1998												
Port de Morlaix	15/07/1998	<0,055	<0,055	<0,076	<0,050	<0,030	<0,005	0,083	<0,005	<0,005			
Locquénoët	15/07/1998	<0,055	<0,055	<0,076	<0,050	<0,030	<0,005	0,055	<0,005	<0,005			
Pont de la Corde	15/07/1998	<0,055	<0,055	<0,076	<0,050	<0,030	<0,005	0,022	<0,005	<0,005			
Port de Morlaix	05/05/1999	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,005	0,027	0,028	<0,005	<0,005		
Locquénoët	05/05/1999	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005		
Pont de la Corde	05/05/1999	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,005	0,028	<0,005	<0,005	<0,005		
Penzé	05/05/1999	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,005	0,023	<0,005	<0,005	<0,005		
Port de Morlaix	28/05/1999	<0,050	<0,050	<0,050	<0,050	<0,050	<0,005	0,039	<0,005	<0,005	<0,005		
Locquénoët	28/05/1999	<0,050	<0,050	<0,050	<0,050	<0,050	<0,005	0,057	<0,005	<0,005	<0,005		
Pont de la Corde	28/05/1999	<0,050	<0,050	<0,050	<0,050	<0,050	<0,005	0,027	<0,005	<0,005	<0,005		
Penzé	28/05/1999	<0,050	<0,050	<0,050	<0,050	<0,050	<0,005	0,027	<0,005	<0,005	<0,005		
Port de Morlaix	21/06/1999	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,005	0,055	<0,005	<0,005	<0,005		
Locquénoët	21/06/1999	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,005	0,065	<0,005	<0,005	<0,005		
Pont de la Corde	21/06/1999	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,005	0,037	<0,005	<0,005	<0,005		
Penzé	21/06/1999	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,005	0,024	<0,005	<0,005	<0,005		
Chenal	05/07/1999	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,005	0,026	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	
Pont de la corde	05/07/1999	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	
Pont Ferroviaire	05/07/1999	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	
Locquénoët	06/07/1999	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	
Chenal	21/07/1999	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,005	<0,005	0,009	<0,005	<0,005	<0,005	
Pont de la Corde	21/07/1999	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,005	0,015	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	
Pont Ferroviaire	21/07/1999	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,005	0,026	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	
Dourduff	21/07/1999	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,005	0,011	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	
Chenal	04/08/1999	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,005	0,073	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,002
Pont de la Corde	04/08/1999	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,005	0,069	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,002
Pont Ferroviaire	04/08/1999	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,005	0,109	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,002
Dourduff	04/08/1999	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,005	0,020	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,002