



## TOPHYPAC :

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

Programme Évaluation et réduction des risques liés à l'utilisation des Pesticides

Rapport final d'activités : rapport scientifique

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

Jean-François Chiffolleau et Christophe Brach-Papa, IFREMER, partenaires

Philippe Soudant, LEMAR (UBO-CNRS), partenaire

Beatriz Beker, LEMAR, partenaire

Alain Jadas-Hécart, LEESA/Girpa (Université d'Angers), partenaire

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

Date du contrat : 18 novembre 2010





## Sommaire :

Liste des figures : .....	5
Liste des tableaux : .....	7
Résumé .....	8
Abstract .....	9
1. Informations générales .....	10
1.1. Rappel du contexte.....	10
1.2. Rappel des objectifs .....	10
2. Description des tâches .....	11
2.1. Acquisition des données de terrain .....	11
2.1.1. Site expérimental : l'estuaire de la Charente .....	11
2.1.2. Mesures <i>in situ</i> : voir annexe 7.1.1 .....	11
2.1.3. Prélèvements.....	12
2.1.4. Calculs du flushing time et de l'énergie solaire : voir annexe 7.1.2.....	12
2.1.5. Analyses chimiques (sels nutritifs, carbone organique dissous (DOC), azote total (TN), chlorophylle <i>a</i> , métaux, pesticides : voir annexe 7.1.3.....	12
2.2. Analyses des communautés.....	12
2.2.1. Micro-phytoplancton .....	12
2.2.2. Pico-, nano-phytoplancton et bactéries .....	12
2.3. Expérimentations PICT .....	13
2.3.1. Contaminants testés .....	13
2.3.2. Protocole expérimental .....	13
2.3.3. Exploitation des résultats : calcul des CE <sub>10</sub> .....	13
2.4. Traitement des données et analyses statistiques.....	14
3. Résultats du projet .....	14
3.1. Bilan des sorties réalisées et difficultés rencontrées .....	14
3.2. Étude environnementale.....	15
3.2.1. Description de l'environnement physico-chimique étudié .....	15
3.2.1.1. Contexte hydro-climatique .....	15
3.2.1.2. Contexte chimique.....	19
3.2.2. Évolution des communautés microbiennes en lien avec les caractéristiques du milieu .....	23
3.2.2.1. Variations spatio-temporelles des abondances.....	23
3.2.2.2. Études des effets spatiaux et temporels sur les communautés.....	24
3.2.2.3. Relation entre les abondances des communautés phytoplanctoniques et les variables du milieu.....	25
3.2.2.4. Dynamique des communautés.....	28
3.2.2.5. Effet de la contamination chimique ?.....	28
3.3. Exposition des communautés au cuivre et aux pesticides.....	30
3.3.1. Bilan des expérimentations réalisées .....	30
3.3.2. Effets du cuivre.....	30
3.3.3. Effets des pesticides.....	37
3.4. Tolérance des communautés ? .....	38
4. Conclusion et perspectives .....	40
5. Acquis en termes de transfert .....	42
6. Valorisation .....	42
7. Annexes .....	43
7.1. Compléments de méthodologie.....	43
7.1.1. Mesures <i>in situ</i> .....	43
7.1.2. Calculs du flushing time et de l'énergie solaire.....	43
7.1.2.1. Flushing-time.....	43
7.1.2.2. Énergie solaire.....	43
7.1.3. Analyses chimiques .....	44
7.1.3.1. Sels nutritifs, carbone organique dissous (DOC), azote total (TN), chlorophylle <i>a</i> ....	44

7.1.3.2. Métaux.....	44
7.1.3.3. Pesticides.....	44
7.2. Annexe : liste des multi-résidus .....	46
7.3. CE <sub>10</sub> extrapolées par Regtox.....	47
7.4. Références bibliographiques .....	54
7.5. Liste des personnes impliquées dans le projet .....	57

## Liste des figures :

- Figure 1** – Carte du bassin de Marennes-Oléron. .... 11
- Figure 2** – Chroniques des températures (A) et des salinités (B) journalières désaisonnalisées (courbes bleues) à la station Lupin. Les courbes rouges (sommées cumulées des deux variables désaisonnalisées) indiquent les ruptures dans la tendance générale de 2000 à 2014 (résultat du test Mann Kendall en bleu). Le rectangle vert représente la fenêtre temporelle de l'étude (2011 à 2014) pour laquelle les tendances ont été signalées en commentaires verts..... 16
- Figure 3** – Qualification des températures et des salinités journalières de 2011, 2012 et 2013 sur la base des observations depuis l'année 2000 à la station Lupin. Les 68 % de données centrales (situées entre les centiles 16 et 84, zone bleutée) sont qualifiées de "normales". Les zones jaunes (valeurs situées entre les centiles 2.5 et 16 et les centiles 84 et 97.5) qualifient des valeurs "élevées" ou "basses". Les zones roses (2.5 % des données historiques supérieures et 2.5 % des données historiques inférieures) qualifient les valeurs exceptionnelles. .... 17
- Figure 4** – Salinités journalières moyennes mesurées sur la période du projet au niveau de la station 1. La courbe bleue représente le lissage, de type loess (span = 0.05 et degrés = 2) ; les points verts représentent les dates des campagnes et les étoiles rouges correspondent aux dates auxquelles des expérimentations PICT ont été réalisées..... 17
- Figure 5** – Évolution spatio-temporelle des variables environnementales de février 2011 à janvier 2014 sur 3 à 4 stations (représentées d'amont (1) en aval (4) en ordonnée à gauche). L'intensité des valeurs est représentée par des iso-lignes associées à un code couleur visible à droite de chaque graphique. Les données correspondent, de haut en bas, à la température (Temp. en °C), la salinité (Sal.), l'oxygène dissous (O<sub>2</sub> en pourcentage de saturation), la turbidité (Turb. en FNU), le rayonnement en PAR à 1 mètre de profondeur (PAR en W.m<sup>2</sup>.j<sup>-1</sup>), le flushing-time (temps de renouvellement de la masse d'eau comprise entre Lupin et Fontenelles en marée : 1 unité correspond à une durée de 12h25mn, échelle de gauche) et la photopériode en jour (échelle de droite). .... 18
- Figure 6** – Évolution des concentrations mensuelles en nitrates et en phosphates à la station Fontenelles de 1977 à 2014. La courbe bleue représente le lissage de type loess (span = 0.75 et degrés = 2) avec son intervalle de confiance à 95%. Le résultat du test de Mann-Kendall renseigne sur la tendance observée sur la période 1977 à 2014. .... 19
- Figure 7** – Évolution spatio-temporelle des concentrations en nutriments et en métaux traces de février 2011 à janvier 2014 sur les quatre stations (représentées d'amont (1) en aval (4) en ordonnée à gauche). L'intensité des valeurs est représentée par des iso-lignes associées à un code couleur visible à droite de chaque graphique. Les données correspondent, de haut en bas, aux nutriments (DOC, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, Si) en µM ; les métaux : nickel, cuivre, zinc et cadmium en µg.L<sup>-1</sup>. . 20
- Figure 8** – Occurrence mensuelle (en %) de chaque molécule détectée lors de l'étude (en haut à gauche) sur la station 1. Les autres graphiques représentent les distributions mensuelles (par année) des concentrations cumulées (boîtes à moustaches grisées) et des concentrations individuelles (points colorés / code couleur correspondant aux molécules du graphique des occurrences mensuelles) sur les quatre stations..... 21
- Figure 9** – Concentrations cumulées en pesticides (µg.L<sup>-1</sup>) et salinité à la station 1 sur toute la durée du suivi. .... 22
- Figure 10** – Évolution spatio-temporelle de l'abondance des différentes communautés microbiennes (Log10 (cellules.L<sup>-1</sup>)) de février 2011 à janvier 2014 sur 3 à 4 stations (représentées d'amont (1) en aval (4) en ordonnée à gauche). L'intensité des valeurs est représentée par des iso-lignes associées à un code couleur visible à droite de chaque graphique. Les données correspondent, de haut en bas, aux bactéries hétérotrophes, aux cyanobactéries (*Synechococcus* sp.), au pico-, nano- et micro-phytoplancton. .... 23
- Figure 11** – Analyse en Composantes Principales (ACP) inter-groupes. Le graphique de gauche correspond à l'ACP inter-mois (saisonnière), le plan 1-2 représentant 92.6 % de l'inertie. Le graphique de droite correspond à l'ACP inter-stations (stations 2 à 4 d'amont en aval), le plan 1-2 représentant 100 % de l'inertie totale. Les histogrammes gris en haut à gauche de chaque

graphique représentent la contribution (en %) de chaque composante à l'inertie globale de l'analyse.....	25
<b>Figure 12</b> – Représentation graphique des pourcentages d'importance de chaque groupe (bloc) de variables (gauche) et de chaque variable (droite) dans l'explication de l'abondance des communautés phytoplanctoniques. Pour chaque valeur, un intervalle de confiance, issu de 500 simulations bootstrap, est représenté. * indique que le pourcentage est significatif à 95%. .....	26
<b>Figure 13</b> – Préférendum thermique et salin pour les espèces, genres ou familles de micro-phytoplancton observés dans plus de 5% des échantillons de l'étude. Cette liste est triée par salinité décroissante sur la base du 1 <sup>er</sup> quartile représenté par la partie gauche de chaque boîte à moustache (box-plot) de couleur. ....	27
<b>Figure 14</b> – Résidus standardisés des <i>Synechococcus</i> sp. issus de l'analyse K+1 tableaux (gauche) ; le tableau (droite) permet l'identification des dates et des stations pour lesquelles certains résidus (entourés en rouge) sont nettement inférieurs aux résidus constituant le nuage de points principal. ....	29
<b>Figure 15</b> – Évolution des abondances en <i>Synechococcus</i> sp. ( $\text{Log}_{10}$ ), des concentrations cumulées en pesticides ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) et des salinités observées au printemps 2012 sur les trois stations les plus avales (couleurs plus foncées vers l'amont). ....	29
<b>Figure 16</b> – Distribution des $\text{CE}_{10}$ du cuivre, obtenues en 2012 et 2013 pour l'ensemble des paramètres (gauche) et pour l'efficacité de photosynthèse (droite). Les abscisses représentent les concentrations en $\mu\text{g.L}^{-1}$ et les ordonnées correspondent au nombre de valeurs obtenues dans chaque classe. Seules les $\text{CE}_{10}$ inférieures à $200 \mu\text{g.L}^{-1}$ ont été utilisées pour cette analyse.....	32
<b>Figure 17</b> – $\text{CE}_{10}$ obtenues à partir des différents paramètres (cell : cellules.mL <sup>-1</sup> ; chl : fluorescence rouge relative au contenu en chlorophylle ; PAM : efficacité de photosynthèse) pour les communautés (Pico : pico-phytoplancton ; Nano : nano-phytoplancton ; Crypto : cryptophytes ; Syn : <i>Synechococcus</i> sp.) exposées au cuivre au cours de l'ensemble des expérimentations PICT réalisées, pour les trois stations (intervalles de confiance non représentés ; $\text{CE}_{10} > 100 \mu\text{gCu.L}^{-1}$ non représentées). ....	32
<b>Figure 18</b> – Représentation des $\text{CE}_{10}$ calculées à partir de la PAM fluorescence en fonction des concentrations en cuivre mesurées dans le milieu aux dates des expérimentations, toutes stations confondues. Seules sont représentées les $\text{CE}_{10} < 1000 \mu\text{g.L}^{-1}$ (65 valeurs sur les 68 calculées)..	33
<b>Figure 19</b> – Non-metric MultiDimensional Scaling (NMDS) illustrant les dissimilarités de composition des différentes communautés de phytoplancton (en abondances) aux dates (année et mois : aa-mm) correspondant aux expérimentations PICT (cuivre). Le code couleur affecté à chaque date correspond à la classe de $\text{CE}_{10}$ renseignée en légende. Le positionnement des différentes communautés sur chaque dimension est indiqué en vert. ....	34
<b>Figure 20</b> – Abondances cumulées (en cellules.L <sup>-1</sup> ) des quatre sous-communautés (nano-, pico-, micro-phytoplancton et <i>Synechococcus</i> sp.) au niveau des trois stations échantillonnées (stations 2, 3 et 4) dans le cadre des expérimentations PICT réalisées en 2012 et 2013.....	35
<b>Figure 21</b> – Composition spécifique (abondances relatives en %) des stations 2, 3 et 4 en 2012 aux dates des expérimentations PICT. Seules sont représentées les espèces dont les abondances relatives représentent au moins 3 % dans au moins l'un des prélèvements. La courbe représente les abondances totales (cellules.L <sup>-1</sup> ) en échelle logarithmique (axe de droite).....	36
<b>Figure 22</b> – Composition spécifique (abondances relatives en %) des stations 2, 3 et 4 en 2013 aux dates des expérimentations PICT. Seules sont représentées les espèces dont les abondances relatives représentent au moins 3 % dans au moins l'un des prélèvements. La courbe représente les abondances totales (cellules.L <sup>-1</sup> ) en échelle logarithmique (axe de droite).....	37
<b>Figure 23</b> – $\text{CE}_{10}$ ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ , concentrations unitaires) obtenues à partir de la PAM fluorescence au cours de l'année 2013 pour les communautés des trois stations. ....	38
<b>Figure 24</b> – Représentation des $\text{CE}_{10}$ calculées à partir de la PAM fluorescence en fonction des concentrations cumulées en pesticides mesurées dans le milieu aux dates des expérimentations, toutes stations confondues. ....	38

## Liste des tableaux :

<b>Tableau 1</b> – Prélèvements réalisés pour les différentes analyses .....	12
<b>Tableau 2</b> – Répartition du nombre de campagnes de prélèvements et d'expérimentations PICT réalisées au cours des trois années du projet.....	15
<b>Tableau 3</b> – Contribution des variables du milieu pour l'explication des abondances des différentes communautés de phytoplancton, d'après la moyenne des coefficients de régression par communautés et le pourcentage d'importance pour l'ensemble des communautés. * indique que le coefficient de régression est significatif à 95% sur la base des simulations bootstrap.....	26
<b>Tableau 4</b> – CE <sub>10</sub> (en µgCu.L <sup>-1</sup> ) minimales et maximales et intervalles de confiance à 95 % associés, obtenus à l'aide de la macro Regtox pour les différents paramètres mesurés au cours des expérimentations PICT. Le nombre de CE <sub>10</sub> correspond à celles ayant pu être calculées et validées suite à une réponse de type effet-dose pour chacune des variables mesurées, pour un nombre total théorique égal à 72 (24 expérimentations sur trois stations). .....	31
<b>Tableau 5</b> – Valeurs de CE <sub>10</sub> (µgCu.L <sup>-1</sup> ) et intervalles de confiance à 95 % obtenus sur les abondances de bactéries hétérotrophes.....	48
<b>Tableau 6</b> – Valeurs de CE <sub>10</sub> (µgCu.L <sup>-1</sup> ) et intervalles de confiance à 95 % obtenus sur les abondances du pico-phytoplancton (gauche) et sur le contenu relatif en chlorophylle (droite).....	49
<b>Tableau 7</b> – Valeurs de CE <sub>10</sub> (µgCu.L <sup>-1</sup> ) et intervalles de confiance à 95 % obtenus sur les abondances du nano-phytoplancton (gauche) et sur le contenu relatif en chlorophylle (droite).....	50
<b>Tableau 8</b> – Valeurs de CE <sub>10</sub> (µgCu.L <sup>-1</sup> ) et intervalles de confiance à 95 % obtenus sur les abondances de Synechococcus sp. (gauche) et sur le contenu relatif en chlorophylle (droite).....	51
<b>Tableau 9</b> – Valeurs de CE <sub>10</sub> (µgCu.L <sup>-1</sup> ) et intervalles de confiance à 95 % obtenus sur les abondances des cryptophytes (gauche) et sur le contenu relatif en chlorophylle (droite).....	52
<b>Tableau 10</b> – Valeurs de CE <sub>10</sub> et intervalles de confiance à 95 % obtenus sur l'efficacité de photosynthèse des communautés exposées au cuivre (µgCu.L <sup>-1</sup> , gauche) et aux herbicides (µg.L <sup>-1</sup> , concentrations unitaires c.u., droite).....	53

## Résumé

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

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

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

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

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



## Abstract

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

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

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

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

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

# 1. Informations générales

## 1.1. Rappel du contexte

Quelques rappels du contexte sont présentés ci-dessous. Dans un souci de légèreté, le texte se veut synthétique de façon à en restituer uniquement les éléments essentiels. Pour une vision plus détaillée comportant les éléments de la bibliographie, il est suggéré de se reporter à la proposition de projet.

Le bassin versant de la Charente, d'une surface d'environ 10 000 km<sup>2</sup>, s'étend principalement sur les deux départements de Charente et Charente-Maritime (Munaron, 2004). Il est caractérisé par une importante activité agricole avec une Surface Agricole Utile qui représente plus de 75% de sa surface (Agreste, recensement agricole 2010). Cette activité peut ainsi nécessiter l'emploi de phytosanitaires de différentes natures (organiques de synthèse, minéraux) pour la lutte préventive contre les maladies et ravageurs de cultures ; l'entretien des voiries et voies ferrées, ainsi que les jardins particuliers, sont autant d'autres sources d'utilisation de produits phytosanitaires. Une fois épandues, les substances utilisées pour les usages agricoles et non-agricoles peuvent se retrouver dans les écosystèmes aquatiques *via* le transfert atmosphérique, les précipitations et les phénomènes de ruissellement et de lessivage des sols. Ainsi, les études réalisées au cours des années 2000 dans le réseau hydrographique de la Charente, mais également au niveau côtier, ont pu mettre en évidence une contamination des eaux superficielles et, dans une moindre mesure, des eaux côtières, par les phytosanitaires. Le réceptacle final des eaux de la Charente est constitué par la partie nord du bassin de Marennes-Oléron, qui est le bassin conchylicole le plus important de France et d'Europe. L'ostréiculture occupe les deux-tiers du bassin, et place la région Poitou-Charentes en tête de la production française avec 20 000 t d'huîtres creuses (*Crassostrea gigas*) produites en 2010/2011 pour une production nationale de 82 800 t, au premier rang de la production européenne (<http://www.cnc-france.com>). Cette forte productivité est notamment permise grâce à la présence d'une ressource trophique suffisamment abondante et de bonne qualité, constituée pour partie par le phytoplancton. Le phytoplancton joue un rôle fondamental dans les écosystèmes aquatiques puisqu'il représente la voie d'entrée du carbone inorganique dans les réseaux trophiques : grâce à sa fonction de producteur primaire, il soutient le développement des consommateurs et il intervient également dans certains cycles biogéochimiques en lien étroit avec les communautés microbiennes. De par leurs caractéristiques physiologiques proches de celles des végétaux supérieurs, les organismes phytoplanctoniques sont susceptibles d'être impactés par certains herbicides voire par d'autres types de pesticides. Il a été démontré dans différents contextes qu'en plus d'être impactées par les phytosanitaires, les communautés de micro-algues pouvaient développer, en cas d'exposition chronique à ces polluants, une forme de tolérance fonctionnelle supportée par une restructuration de leur composition. Cette tolérance peut être mise en évidence en appliquant le concept du PICT (Pollution Induced Community Tolerance, Blanck *et al.* en 1988 dans Gustavson et Wängberg, 1995). Le PICT a pour but de typer la sensibilité de communautés à un toxique, en fonction de leur milieu d'origine. Cet outil a un degré de signification écologique important et présente un intérêt indéniable comme indice de pollution spécifique basé sur les communautés micro-algales (Bérard et Pelte, 1999).

La contamination chimique par les pesticides, supposée chronique au niveau de l'estuaire de la Charente, et les enjeux économiques, sociétaux et scientifiques qui en découlent ont donc conduit à la construction du projet TOPHYPAC.

## 1.2. Rappel des objectifs

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

Le suivi environnemental a été effectué en quatre points de l'estuaire, définis selon le gradient de salinité. Ce suivi a été mis en oeuvre pendant trois années complètes, à raison d'une campagne de prélèvements toutes les deux semaines. La collecte de données hydrologiques, physico-chimiques et biologiques a permis i) l'acquisition de connaissances et la description de la dynamique des communautés phytoplanctoniques en

relation avec les paramètres environnementaux ; ii) de dresser un état des lieux de la contamination de l'estuaire par les pesticides, en termes de fréquence et de concentrations.

Lors de la seconde phase du projet, les communautés ont été exposées à i) un toxique de référence représenté par le cuivre, et à ii) un mélange de pesticides établi en fonction des substances et concentrations présentes dans le milieu. Le but était de déterminer l'existence éventuelle d'une tolérance des communautés aux contaminants testés, selon le concept du PICT. Cette partie s'est déroulée de façon concomitante au suivi environnemental, au cours de la deuxième et la troisième année du projet : la collecte des échantillons sur le terrain était suivie par une expérimentation PICT en laboratoire. Cette phase a permis d'obtenir des données écotoxicologiques sur des communautés phytoplanctoniques exposées à deux mélanges d'herbicides ainsi qu'au cuivre.

## 2. Description des tâches

Seules sont décrites dans ce chapitre les tâches nécessaires à la compréhension du document. Les autres sont présentées en annexe.

### 2.1. Acquisition des données de terrain

#### 2.1.1. Site expérimental : l'estuaire de la Charente

Les échantillonnages ont été réalisés au niveau de quatre stations dans l'estuaire de la Charente, dont deux stations fixes et deux stations mobiles définies à chaque sortie en fonction du gradient de salinité. Les deux stations fixes (Figure 1) sont Fort Lupin (station 1) ( $45^{\circ}57'13,7''$  N ;  $001^{\circ}03'16,2''$  W), située sur la Charente, au niveau de son embouchure et Fontenelles ( $45^{\circ}58'33,6''$  N ;  $001^{\circ}06'40,1''$  W) qui se trouve dans le chenal de sortie de la Charente. À chaque sortie, deux stations mobiles ont été définies en fonction des conditions hydrologiques : l'objectif était d'obtenir un gradient le plus équilibré possible entre les quatre stations étudiées. Dans ce but, le suivi de salinité *in situ* de la station de Lupin a été utilisé pour définir la position de la station la plus aval de l'estuaire (station 4) : le maximum de salinité rencontré la veille de chaque campagne d'échantillonnage servant de salinité de référence. La position de la deuxième station complémentaire a été déterminée de telle manière à ce que le gradient soit le plus équilibré possible entre les stations successives. Les campagnes ont été réalisées avec un départ à la station 1 à basse-mer, en privilégiant des coefficients de marée moyens compris entre 45 et 95.

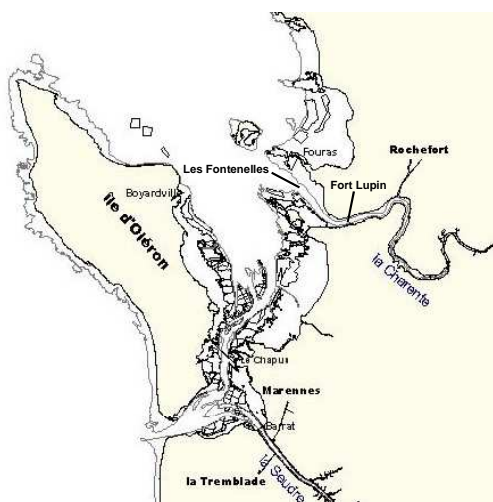


Figure 1 – Carte du bassin de Marennes-Oléron.

#### 2.1.2. Mesures *in situ* : voir annexe 7.1.1

### 2.1.3. Prélèvements

Les prélèvements d'eau ont été réalisés en sub-surface à l'aide de bouteilles Niskin pour l'ensemble des analyses excepté pour les métaux. Dans ce cas, les échantillons ont été prélevés à la main avec un gant en polyéthylène, sous la surface, dans un flacon en polyéthylène préalablement lavé, après 3 rinçages successifs avec l'eau du site (Chiffolleau *et al.*, 2002).

**Tableau 1** – Prélèvements réalisés pour les différentes analyses

	Type d'analyse	Volume	Stations
Chimie	Sels nutritifs, DOC, TN, chl <i>a</i>	2 L	1, 2, 3, 4
Contaminants	Métaux	0.5 L	1, 2, 3, 4
	Pesticides : multi-résidus	1 L	1 systématiquement
	Pesticides : glyphosate et AMPA	1 L	+ 2, 3, 4 si dessalure
Communautés	Micro-phytoplancton : taxonomie	250 mL	2, 3, 4
	Pico-, nano-phytoplancton, bactéries	1.5 mL	
	Expérimentations PICT	4 L	

### 2.1.4. Calculs du flushing time et de l'énergie solaire : voir annexe 7.1.2

### 2.1.5. Analyses chimiques (sels nutritifs, carbone organique dissous (DOC), azote total (TN), chlorophylle *a*, métaux, pesticides : voir annexe 7.1.3

## 2.2. Analyses des communautés

### 2.2.1. Micro-phytoplancton

Les échantillons ont été analysés après fixation au lugol et stockage à l'obscurité et à température ambiante. La détermination de la flore phytoplanctonique (micro-phytoplancton) des échantillons a été réalisée au niveau des espèces lorsque c'était possible avec un microscope inversé en contraste de phase (Wild M40), après sédimentation dans une chambre de sédimentation d'Utermöhl (Hasle, 1978).

### 2.2.2. Pico-, nano-phytoplancton et bactéries

Le dénombrement et la description des flores nano- et picoplanctoniques, des cyanobactéries (genre *Synechococcus* sp.) et des cryptophytes ont été réalisés par cytométrie en flux selon les méthodes décrites dans Trousselier *et al.* (1993) et Marie *et al.* (1997). Pour chaque station, les prélèvements réalisés en triplicats, ont été fixés au glutaraldéhyde (0.25 % final) et congelés à l'azote liquide avant d'être stockés à -80°C jusqu'à l'analyse sur un cytomètre FacsCalibur (Becton Dickinson) au cours de la première année du projet ; ce cytomètre en flux est équipé d'un laser argon (488 nm), de deux détecteurs taille/complexité (FSC/SSC) et de 3 détecteurs de fluorescence (530/30 nm, 585/42 nm et > 670 nm). Au cours des deux années suivantes, l'analyse a été réalisée à l'aide d'un cytomètre FacsVerse (Becton Dickinson) équipé de trois lasers (405/488/640 nm), de deux détecteurs taille/complexité (FSC/SSC) et de 8 détecteurs de fluorescence (527/32 nm, 586/42 nm, 700/54 nm et 783/56 nm pour le laser bleu, 448/45 nm, 528/45 nm pour le laser violet et 660/10 nm, 783/560 nm pour le laser rouge).

Les populations phytoplanctoniques ont été dénombrées et identifiées à l'aide du détecteur de fluorescence rouge (> 670 nm sur le FacsCalibur et 700/54 nm pour le FacsVerse) qui permet d'évaluer la quantité relative de pigments chlorophylliens. L'analyse et le dénombrement des populations bactériennes hétérotrophes ont été réalisés après ajout de SYBR Green dans l'échantillon dilué au 1/10<sup>ème</sup> dans de l'eau de mer filtrée stérile ;

ce fluorochrome jaune/vert marque l'ADN bactérien et est mesurable par le détecteur 530/30 nm du FACS Calibur et par le détecteur 527/32 nm du FACS Verse.

## 2.3. Expérimentations PICT

Les expérimentations PICT ont été réalisées afin d'évaluer l'éventuelle tolérance des communautés phytoplanctoniques à certains contaminants présents dans leur milieu. Initialement, il était prévu de faire les expérimentations PICT en réalisant des mesures de production primaire par incorporation de carbone 14 au laboratoire chaud de l'Houmeau. Comme cela a été expliqué dans le rapport intermédiaire, suite à des problèmes de fermeture de locaux, nous avons été contraints de changer de méthode au profit de la PAM (Pulse Amplitude Modulated) fluorescence. Cette technique non destructive a pour principe de mesurer l'efficacité de photosynthèse des organismes photosynthétiques.

### 2.3.1. Contaminants testés

Compte-tenu de son action directe sur la photosynthèse, de son utilisation en tant que fongicide et algicide, et de sa présence dans le milieu, le cuivre a été choisi comme toxique de référence.

Deux mélanges d'herbicides ont été constitués afin d'y exposer les communautés naturelles : leur composition a été déterminée en fonction des molécules présentes dans le milieu étudié l'année précédente. Ont été choisies les substances les plus fréquemment détectées ainsi que celles présentant des pics de concentration. Le mélange testé en 2012 était ainsi composé de trois herbicides : glyphosate, métolachlore et mésotrione ; le mélange testé en 2013 contenait quant à lui quatre herbicides : glyphosate, S-métolachlore, diméthénamide et métamitron.

### 2.3.2. Protocole expérimental

Les communautés phytoplanctoniques des stations 2, 3 et 4 ont été collectées au cours des prélèvements effectués lors du suivi environnemental et transportées au laboratoire. L'ensemble des étapes expérimentales a été réalisé dans un local climatisé à la même température que celle de l'eau du milieu. Une étape de sédimentation a été effectuée afin d'éliminer des échantillons la majorité des matières en suspension pouvant gêner les mesures de PAM-fluorescence. Les échantillons ont ensuite été répartis dans les unités expérimentales constituées de ballons en verre à raison de 50 mL/ballon. Afin de limiter un biais lié au temps passé par les communautés hors de leur milieu d'origine (temps différent pour chaque station), le temps écoulé entre le prélèvement initial sur site et le début de l'expérimentation a été pris en compte pour chaque station afin d'établir l'ordre chronologique des contaminations. Pour les mêmes raisons, au sein de chaque station, les unités expérimentales des différentes conditions d'exposition ont été contaminées dans un ordre aléatoire. Au cours de chaque expérimentation, chacune des communautés provenant des stations 2, 3 et 4 a été exposée d'une part au cuivre, à quatre à cinq concentrations de  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$  à  $20 \text{mg.L}^{-1}$  ; d'autre part au mélange d'herbicides, à quatre à cinq concentrations de  $0.1 \mu\text{g.L}^{-1}$  à  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$  en concentrations unitaires, le tout en quadruplicats. Une fois contaminés, les ballons ont été incubés en enceintes thermostatées sous éclairage artificiel constant et à la même température que celle du site de prélèvement, pendant 2 h avant la mesure du rendement d'efficacité photosynthétique (Quantum Yield). Trois mesures ont été effectuées pour chaque ballon. Un volume de 1.5 mL a ensuite été prélevé dans chacun des ballons, fixé au glutaraldéhyde (concentration finale de 0.25 %), puis congelé à l'azote liquide pour les analyses des communautés par cytométrie en flux.

### 2.3.3. Exploitation des résultats : calcul des $CE_{10}$

Les résultats obtenus à l'issue des expérimentations PICT (rendement d'efficacité photosynthétique, abondances et niveaux de fluorescence par cytométrie en flux) ont été introduits, lorsqu'ils le permettaient, dans la macro Regtox ([http://www.normalesup.org/~vindimian/fr\\_index.html](http://www.normalesup.org/~vindimian/fr_index.html)) afin d'en extrapoler les  $CE_{10}$ .

## 2.4. Traitement des données et analyses statistiques

Les séries temporelles (journalières) de température et de salinité analysées ont été régularisées par des fonctions de type spline (Grosjean et Ibanez, 2004). Sur ces séries régularisées, ont été effectués, (1) des tests de Mann-Kendall pour déterminer l'existence de tendances en température et en salinité mesurées sur la période 2000-2014 et 2011-2014, et (2) des sommes cumulées (Grosjean et Ibanez, 2004) pour visualiser les périodes de changement de tendance. Des tests de Kruskal-Wallis ont été utilisés pour tester l'influence des facteurs spatiaux (sur la base des quatre stations suivies) et temporels sur les différents paramètres biotiques et abiotiques. Les aspects temporels ont été traités d'une part, en inter-annuel (l'ensemble des valeurs de chaque année étant comparé entre les années), et en inter-mensuel (les valeurs de chaque mois étant comparées entre elles quelle que soit l'année), d'autre part. Des analyses inter-classes (Dolédec et Chessel, 1987 ; 1989) ont été effectuées afin de séparer la variabilité inter-mensuelle (saisonnière) de la variabilité inter-stations des abondances des communautés. Afin de valider les pourcentages d'inertie inter-mensuelle et inter-stations, des tests de permutation ont été réalisés.

Une analyse multibloc de (K+1) tableaux de données (Bougeard *et al.*, 2011 ; Bougeard et Dray, sous presse) a été réalisée pour coupler les données biologiques aux données du milieu dans l'objectif d'estimer les contributions de chaque groupe de variables (blocs) et de chaque variable sur l'ensemble des communautés phytoplanctoniques (globalement et individuellement). Cette analyse est basée sur un modèle de régression PLS multiblocs ; le choix du nombre optimal (ici, trois) de variables latentes (sur la base de la capacité de filtrage et la capacité de prédiction) a été effectué par cross-validation à partir du jeu de données initial séparé en deux : l'un pour l'étalonnage et l'autre pour la validation. Pour une meilleure fiabilité des résultats, cette opération a été renouvelée 100 fois. De plus, des intervalles de confiance sur chaque variable ont été calculés pour tester l'effet significatif de chacune d'entre elles sur les communautés. Ces calculs s'appuient sur la méthode de simulation du bootstrap (500 simulations). Cette analyse a été effectuée sur les tableaux de données suivants : le tableau de données à expliquer (Y) composé des quatre variables phytoplanctoniques (*Synechococcus* sp., pico-, nano- et micro-phytoplancton<sup>1</sup>) et les quatre tableaux de variables explicatives du milieu (X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub> et X<sub>4</sub>) : environnement (température, salinité, turbidité, rayonnement, photopériode, flushing-time), nutriments (nitrates, ammonium, phosphates, silice, N/P, Si/N), métaux (nickel, cuivre, zinc, cadmium) et biologiques (copépodes, ciliés et bactéries hétérotrophes).

Les distributions des valeurs de CE<sub>10</sub> ont été comparées entre les stations et entre les années par un test de Kolmogorov-Smirnov au seuil de 5 %.

Enfin, un positionnement multidimensionnel, de type Non-metric MultiDimensional Scaling (NMDS), a été effectué à partir de la matrice des similarités (méthode Bray-Curtis) des abondances des différentes communautés phytoplanctoniques pour déterminer les similitudes de composition aux dates d'échantillonnage du PICT (Clarke, 1993). Un espace à deux dimensions a été privilégié pour faciliter l'interprétation : ce choix a été validé par les valeurs de Stress, se situant dans une gamme de valeurs associée à une bonne qualité de représentation (Stress <0.1 d'après Clarke, 1993).

Les représentations graphiques et les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide des logiciels R (R development Core Team, 2008), Statgraphics centurion XV.II, et Sigmaplot 10.0.

## 3. Résultats du projet

### 3.1. Bilan des sorties réalisées et difficultés rencontrées

Le projet TOPHYPAC a totalisé 69 campagnes de prélèvements réalisées entre le 9 février 2011 et le 30 janvier 2014 : 24 en 2011, 22 en 2012, 21 en 2013 et deux en 2014 (Tableau 2). Six campagnes n'ont pas pu être effectuées, cinq pour des raisons de conditions météorologiques dangereuses et une pour un problème de panne de bateau. 27 expérimentations PICT ont été réalisées : 13 de février à octobre 2012 et 14 de mars à octobre 2013, réparties principalement sur les saisons de printemps, été et début d'automne.

<sup>1</sup> correspondant au Log<sub>10</sub> des abondances observées.

**Tableau 2** – Répartition du nombre de campagnes de prélèvements et d'expérimentations PICT réalisées au cours des trois années du projet.

	2011		2012		2013		2014	
	Sortie	PICT	Sortie	PICT	Sortie	PICT	Sortie	PICT
janvier			2		2		2	
février	2		2	1	2			
mars	2		2	2	2	2		
avril	2		2	2	1	1		
mai	3		2	2	2	2		
juin	2		2	1	2	2		
juillet	2		2	2	2	2		
août	3		3	2	2	2		
septembre	2		2	0	1	1		
octobre	2		2	1	2	2		
novembre	2		1		1			
décembre	2		0		2			

D'autres difficultés techniques ont pu compromettre l'acquisition et/ou l'enregistrement des données physico-chimiques *in situ* lors de certaines campagnes : problèmes de fonctionnement de sondes multi-paramètres ou du matériel embarqué (ordinateur, logiciel d'acquisition, GPS).

## 3.2. Étude environnementale

### 3.2.1. Description de l'environnement physico-chimique étudié

#### 3.2.1.1. Contexte hydro-climatique

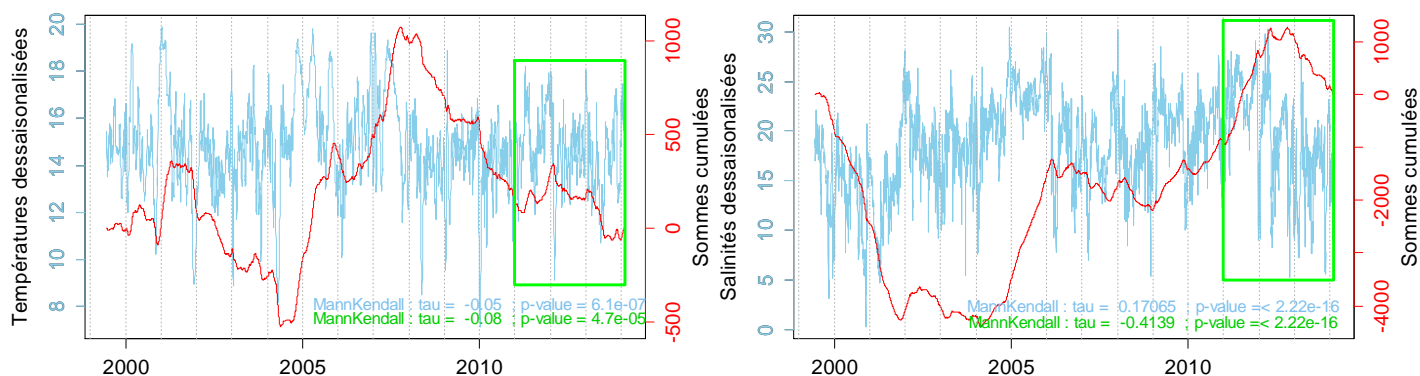
##### 3.2.1.1.1 Situation de l'étude par rapport aux données historiques

Deux des points de la stratégie d'échantillonnage du projet (Lupin et Fontenelles) ont été inclus dans l'étude en raison de leur appartenance à certains réseaux d'observation. Ces stations ont ainsi permis de situer le suivi effectué depuis 2011 par rapport aux données historiques (depuis 2000 pour Lupin et 1977 pour Fontenelles). Ainsi, la station de Lupin (station 1 de l'étude TOPHYPAC) de l'estuaire de la Charente est suivie d'un point de vue physico-chimique<sup>2</sup> grâce à une bouée océanographique qui mesure en continu les températures et les salinités de la couche d'eau de surface. Les données obtenues pour les deux paramètres désaisonnalisés (Figure 2) ont été utilisées pour calculer les sommes cumulées à partir des températures journalières (courbe rouge). Avec cette représentation, il est possible de visualiser les grandes tendances : à la hausse lorsque la courbe augmente, à la baisse lorsque celle-ci diminue. Sur la période 2000-2014, des ruptures importantes sont observées dans les tendances des deux paramètres, notamment :

- une tendance thermique globalement à la hausse entre 2005 et 2008, mais à la baisse entre 2002 et 2005 et à partir de 2008 ; sur les 15 dernières années ces fluctuations montrent une tendance significative en légère baisse (Mann Kendall,  $\tau = -0.05$ ,  $p < 0.0001$ ). La période d'étude fait également apparaître des fluctuations, avec une hausse de la température au cours de la première année, suivie par une tendance à la baisse les deux années suivantes. Globalement sur les trois années du projet, une tendance significative en légère baisse a été mise en évidence (Mann Kendall,  $\tau = -0.08$ ,  $p < 0.0001$ ).
- les valeurs de salinité présentent une tendance à la baisse entre 2000 et 2002 puis deux périodes de hausse, entre 2004 et 2006, puis à partir de 2009. La tendance générale significative sur les 15 dernières années est en légère hausse (Mann Kendall  $\tau = 0.17$ ,  $p < 0.0001$ ). La fenêtre

<sup>2</sup> Données issues du suivi des fluctuations environnementales dans les Pertuis Charentais (SAPERCHAIS/LERPC)

correspondant aux années du projet fait apparaître une augmentation des salinités en 2011, correspondant à un déficit des apports en eau douce et concomitante à l'augmentation des températures. À partir de 2013, la tendance repart à la baisse. Globalement sur les trois années du projet, une tendance significative en baisse a été mise en évidence (Mann Kendall,  $\tau = -0.41$ ,  $p < 0.0001$ ).



**Figure 2** – Chroniques des températures (A) et des salinités (B) journalières désaisonnalisées (courbes bleues) à la station Lupin. Les courbes rouges (sommes cumulées des deux variables désaisonnalisées) indiquent les ruptures dans la tendance générale de 2000 à 2014 (résultat du test Mann Kendall en bleu). Le rectangle vert représente la fenêtre temporelle de l'étude (2011 à 2014) pour laquelle les tendances ont été signalées en commentaires verts.

La présente étude (de 2011 à 2014) s'inscrit donc dans un contexte où les températures paraissent relativement stables, bien qu'une tendance en légère baisse soit observée à la fois pour l'historique et pour la fenêtre du projet ; en revanche, les fluctuations globales de salinité au cours de la période de l'étude sont à l'opposé de celles de l'historique et paraissent plus marquées. Il est important de souligner que les fluctuations observées ici restent néanmoins dans les gammes de variation des quinze dernières années.

Les années de suivi intégrées dans le projet font ainsi apparaître des tendances contrastées : 2011 est marquée par une salinité élevée, due à un déficit d'apports en eau douce. Au contraire, en 2012 et 2013, d'importants apports d'eau douce en hiver et printemps se traduisent par de faibles salinités, accompagnées par des températures inférieures aux normales saisonnières au premier semestre. Il ressort de cette analyse que les tendances globales observées au cours du projet sont fortement influencées par les conditions météorologiques observées en 2012 et 2013.

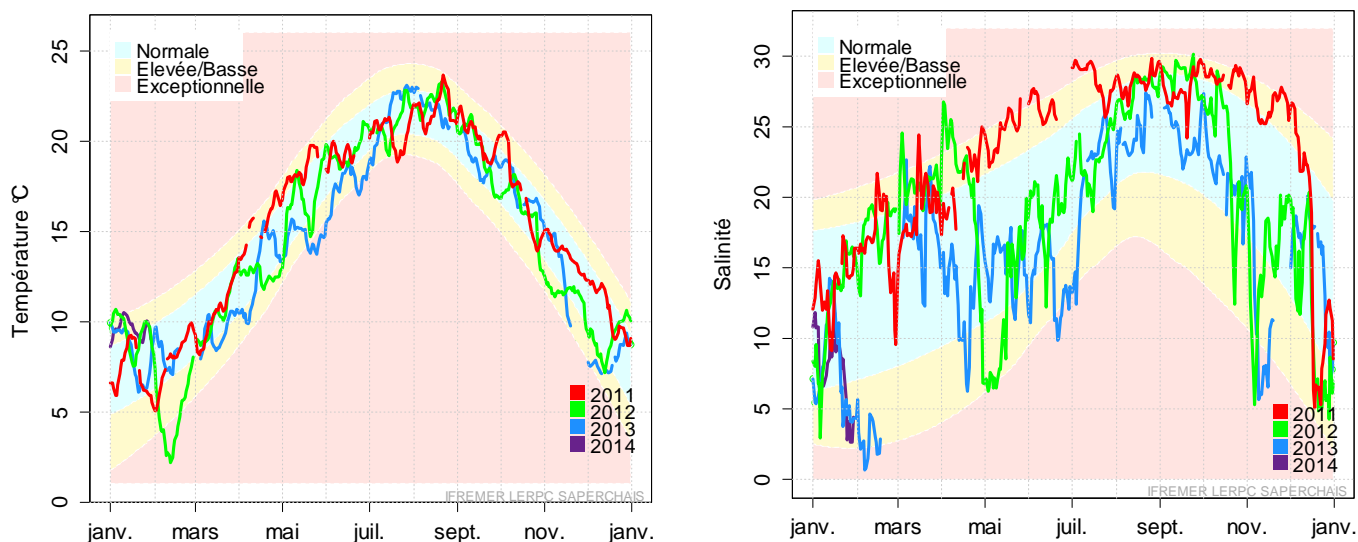
### 3.2.1.1.2 Phénomènes météorologiques « exceptionnels »

La période d'étude a été marquée par des événements météorologiques particuliers, essentiellement liés au régime pluviométrique. Les chroniques de température et salinité enregistrées à la station de référence de Lupin reflètent ces conditions météorologiques (Figure 3). Ainsi, on note parmi les événements :

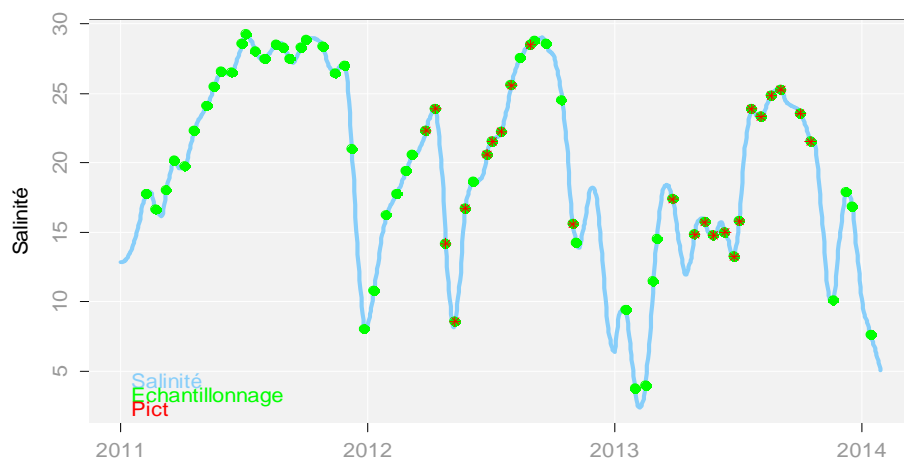
- un pic de froid enregistré en février 2012 (pic à 4°C en dessous de la médiane saisonnière) ;
- une longue période de sécheresse lors du printemps, de l'été et de l'automne 2011, marquée par des salinités particulièrement élevées ;
- d'intenses dessalures aux printemps, étés et automnes 2012 et 2013, ainsi qu'en début d'hiver 2011 et hiver 2013 et 2014.

Il est possible de visualiser l'ensemble des campagnes réalisées associées ou non à des expérimentations PICT, sur les données de salinité représentées pour toute la durée du projet (Figure 4). Ainsi, en 2011 des dessalures de faible intensité sont intervenues au cours de l'été et de l'automne, l'année se terminant par une intense dessalure pré-hivernale caractéristique. En 2012 une période de dessalure intense est observée au cours du printemps, puis à partir de la fin d'été, les dessalures quasiment continues interviennent par paliers jusque début 2013. La dernière année, des dessalures modérées sont visibles au printemps, deux importantes dessalures sont ensuite enregistrées en fin d'été – début d'automne, puis en début d'hiver. Dans la mesure du possible, les campagnes ont été réalisées afin d'intégrer ces dessalures à l'échantillonnage (pic et retour à la « normale »).





**Figure 3** – Qualification des températures et des salinités journalières de 2011, 2012 et 2013 sur la base des observations<sup>3</sup> depuis l'année 2000 à la station Lupin. Les 68 % de données centrales (situées entre les centiles 16 et 84, zone bleutée) sont qualifiées de "normales". Les zones jaunes (valeurs situées entre les centiles 2.5 et 16 et les centiles 84 et 97.5) qualifient des valeurs "élevées" ou "basses". Les zones roses (2.5 % des données historiques supérieures et 2.5 % des données historiques inférieures) qualifient les valeurs exceptionnelles.



**Figure 4** – Salinités journalières moyennes mesurées sur la période du projet au niveau de la station 1. La courbe bleue représente le lissage, de type loess (span = 0.05 et degrés = 2) ; les points verts représentent les dates des campagnes et les étoiles rouges correspondent aux dates auxquelles des expérimentations PICT ont été réalisées.

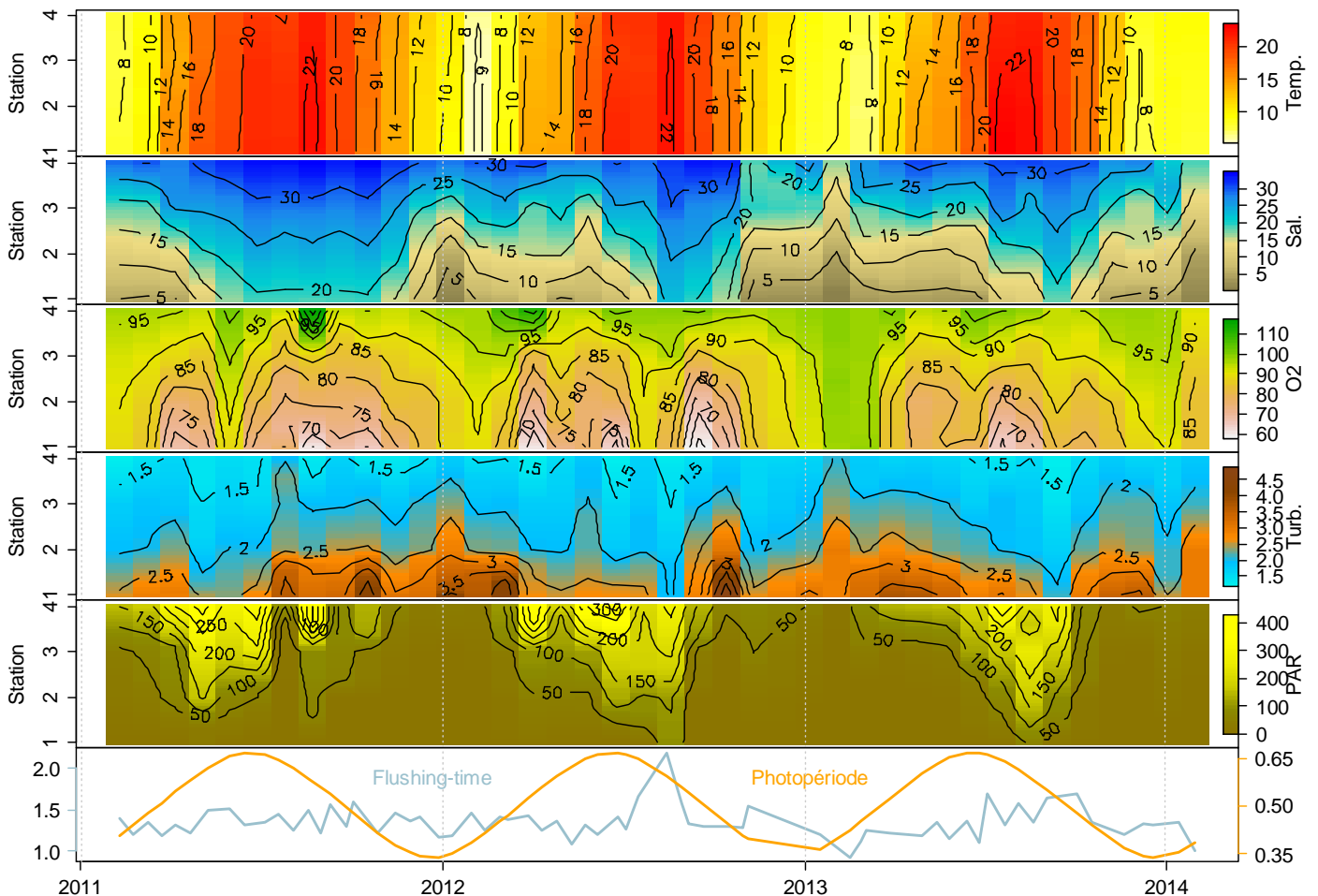
### 3.2.1.1.3 Les conditions environnementales de l'étude

Les mesures *in situ* réalisées au cours des campagnes d'échantillonnage permettent de dresser le cadre des variations des paramètres physico-chimiques (température, salinité, oxygène dissous, turbidité, rayonnement et calcul du temps de renouvellement des masses d'eau) au niveau des quatre stations (Figure 5). Globalement les températures et les salinités varient respectivement de 2.2 à 24.3°C et de 0.3 à 35.4 d'hiver en été. L'oxygène dissous présente ponctuellement des valeurs inférieures à 50 % de saturation sur la station la plus amont à des saturations avoisinant les 130 % sur la station la plus marine. Les turbidités et le rayonnement PAR affichent des variations opposées dont les valeurs se situent respectivement de 7.6 FNU jusqu'à la saturation du turbidimètre, et entre 525 et 0 W.m<sup>-2</sup>.j<sup>-1</sup> d'aval en amont.

L'évolution des variables environnementales fait apparaître que :

<sup>3</sup> Données issues du suivi des fluctuations environnementales dans les Pertuis Charentais (SAPERCHAIS/LERPC)

- les extrêmes thermiques hivernaux et estivaux sont observés sur la partie amont (station 1). Aucune variabilité spatiale et temporelle (à l'échelle inter-annuelle) de la température n'apparaît ( $p > 0.05$ ) ; cependant une saisonnalité à l'échelle mensuelle est clairement identifiée ;
- la salinité présente des variabilités spatiales et temporelles (inter-annuelles et inter-mensuelles) significatives ( $p < 0.05$ ) : les maxima sont observés en période estivale sur la station 4, et les minima en période hivernale sur la station 1 ; les gradients de salinité sont particulièrement marqués en 2012 et 2013 et permettent de visualiser l'effet spatial des arrivées d'eau douce.
- les variables turbidité, rayonnement PAR et oxygène dissous affichent des variabilités spatiales significatives ( $p < 0.05$ ) : l'oxygène dissous et le rayonnement sont plus élevés sur les stations les plus avales contrairement à la turbidité. Au niveau saisonnier, le rayonnement et l'oxygène dissous présentent des dynamiques temporelles variables suivant la station : la saisonnalité étant marquée sur les stations les plus marines pour le rayonnement et sur les stations les plus en amont pour l'oxygène. Aucune différence significative au niveau inter-annuel et inter-mois n'est observée pour la turbidité.
- le flushing-time est caractérisé par des valeurs stables se situant entre 1 et 1.5 marées, notamment en 2011 ; cependant des valeurs atypiques sont observées lors des échantillonnages d'août 2012 (~ 2) et de février 2013 (< 1). La photopériode suit une progression saisonnière avec des valeurs faibles en hiver pour culminer en été, respectivement de ~ 8 h à 16 h de lumière par jour.

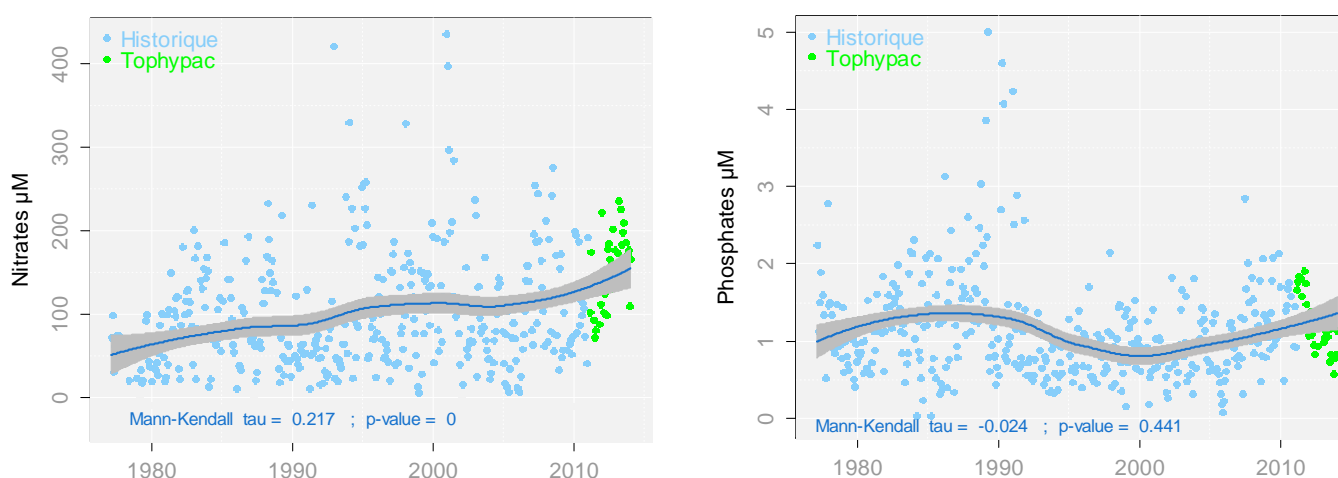


**Figure 5** – Évolution spatio-temporelle des variables environnementales de février 2011 à janvier 2014 sur 3 à 4 stations (représentées d'amont (1) en aval (4) en ordonnée à gauche). L'intensité des valeurs est représentée par des iso-lignes associées à un code couleur visible à droite de chaque graphique. Les données correspondent, de haut en bas, à la température (Temp. en °C), la salinité (Sal.), l'oxygène dissous (O<sub>2</sub> en pourcentage de saturation), la turbidité (Turb. en FNU), le rayonnement en PAR à 1 mètre de profondeur (PAR en W.m<sup>-2</sup>.j<sup>-1</sup>), le flushing-time (temps de renouvellement de la masse d'eau comprise entre Lupin et Fontenelles en marée : 1 unité correspond à une durée de 12h25mn, échelle de gauche) et la photopériode en jour (échelle de droite).

### 3.2.1.2. Contexte chimique

#### 3.2.1.2.1 Évolution des concentrations en nitrates et phosphates : historique et tendance

Le suivi historique des nutriments de la zone d'étude (station Fontenelles, réseau RAZLEC) rend compte de l'évolution des concentrations en nitrates et en phosphates de 1977 à 2014 (Figure 6) : une tendance significative positive est mise en évidence pour les nitrates (Mann Kendall,  $\tau = 0.217$ ,  $p < 0.0001$ ) avec des concentrations moyennes proches de 60-70  $\mu\text{M}$  vers 1980, qui ont doublé après 2010. Aucune tendance particulière n'est constatée pour les phosphates qui laissent apparaître des fluctuations des concentrations moyennes autour de 1  $\mu\text{M}$  ( $p > 0.05$ ). Sur la période d'étude, une situation contrastée est observée pour ces deux variables avec : des concentrations en nitrates globalement inférieures à la tendance moyenne pendant la première partie de l'étude (année 2011 – déficit des apports en eau douce) contrairement aux deux années suivantes avec des valeurs plutôt supérieures (fortes dessalures) ; des concentrations en phosphates plus élevées que la tendance moyenne la première année et plutôt moyennes voire inférieures en 2012 et 2013.



**Figure 6** – Évolution des concentrations mensuelles en nitrates et en phosphates à la station Fontenelles de 1977 à 2014. La courbe bleue représente le lissage de type loess (span = 0.75 et degrés = 2) avec son intervalle de confiance à 95%. Le résultat du test de Mann-Kendall renseigne sur la tendance observée sur la période 1977 à 2014.

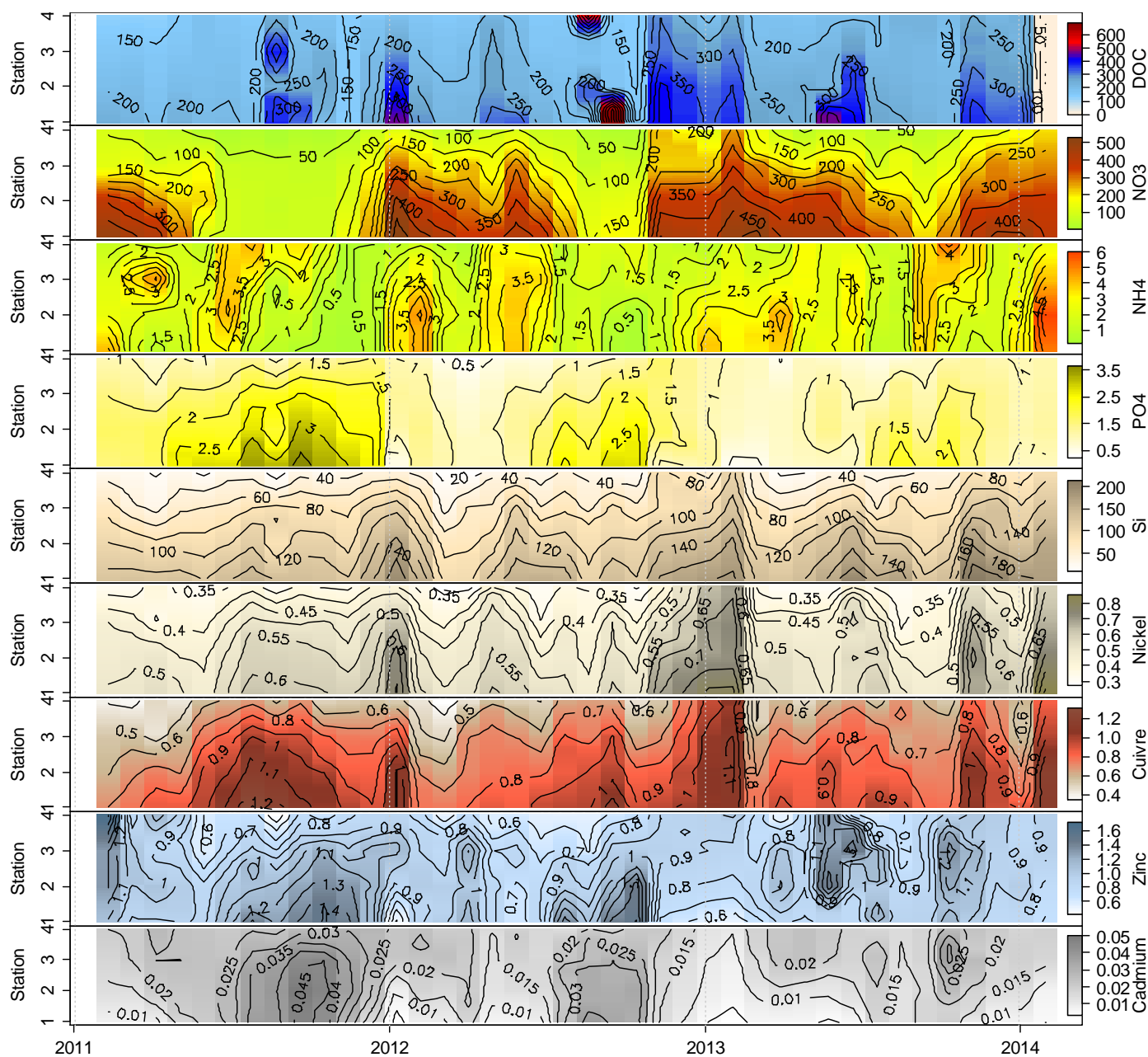
#### 3.2.1.2.2 Les apports en substances chimiques d'origine naturelle et anthropique

Dans le cadre de l'étude, diverses substances chimiques ont été mesurées suite aux prélèvements réalisés au niveau des quatre stations : d'une part, des nutriments, nécessaires à la croissance des communautés microbiennes, et d'autre part, des métaux traces (Figure 7).

Les nutriments présentent des concentrations de l'ordre de la centaine de  $\mu\text{M}$  pour le carbone organique dissous (DOC), les nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) et la silice (Si) à quelques  $\mu\text{M}$  pour l'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) et les phosphates ( $\text{PO}_4^{3-}$ ). La comparaison des profils de nutriments avec ceux des variables environnementales (Figure 5) met en évidence que le profil des nitrates (forme majoritaire de l'azote) est superposable à celui de la salinité : les nitrates semblent ainsi être présents à des concentrations importantes dans l'eau douce du fleuve Charente quelle que soit la période de l'année, tant la dilution avec les masses d'eau marine explique les concentrations révélées. Les pics de silice qui interviennent également à des périodes de faible salinité (sans toutefois suivre ce profil) marquent l'origine terrigène de cet élément.

Certaines fenêtres de faible salinité sont communes avec des concentrations importantes de DOC ; cependant des pics de DOC sont également visibles en dehors de ces périodes. Le DOC serait donc à la fois d'origine exogène, apporté par l'eau douce, et d'origine endogène, produit au sein du milieu par les excréments et la décomposition des organismes. Contrairement aux nutriments décrits précédemment, le profil des phosphates montre des concentrations plus importantes dans les fenêtres de salinité plus élevée : en zone estuarienne, en cas de températures et salinités élevées, avec une faible oxygénation, il peut y avoir une désorption des phosphates à partir des matières en suspension/sédiments (Philipps, 1980). Cela peut expliquer les

concentrations de phosphates dissous plus élevées en période d'été. *A contrario*, en période de crues il peut y avoir adsorption des phosphates dans la partie moins salée de l'estuaire



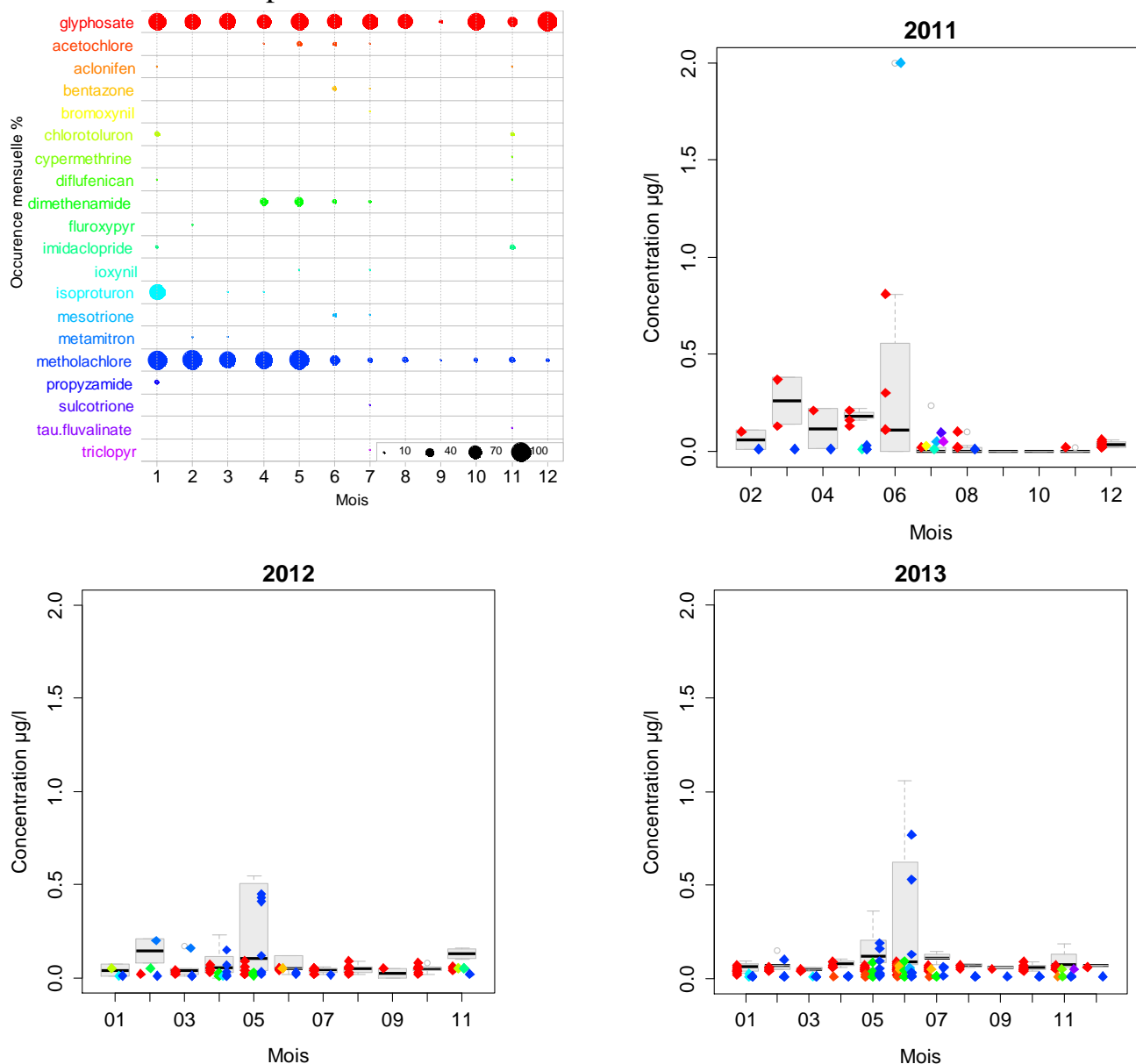
**Figure 7** – Évolution spatio-temporelle des concentrations en nutriments et en métaux traces de février 2011 à janvier 2014 sur les quatre stations (représentées d'amont (1) en aval (4) en ordonnée à gauche). L'intensité des valeurs est représentée par des iso-lignes associées à un code couleur visible à droite de chaque graphique. Les données correspondent, de haut en bas, aux nutriments (DOC, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, Si) en µM ; les métaux : nickel, cuivre, zinc et cadmium en µg.L<sup>-1</sup>.

Les concentrations en métaux sont de l'ordre du µg.L<sup>-1</sup> ou du dixième de µg.L<sup>-1</sup> pour le nickel, le zinc et le cuivre et de l'ordre de dizaines de ng.L<sup>-1</sup> pour le cadmium. Le cuivre et le nickel affichent des profils à l'allure relativement similaire, qui sont aisément comparables au profil de la silice. Le gradient spatial amont/aval est assez marqué pour ces deux métaux. Le zinc et le cadmium comportent des concentrations plus importantes dans les masses d'eau de salinité élevée, avec un gradient spatial amont-aval peu ou pas marqué, parfois inversé (zinc : début 2011, milieu d'année 2013 ; cadmium : printemps et fin 2013). En fonction des conditions environnementales, l'équilibre entre phase dissoute et phase particulaire des métaux peut être influencé par la salinité, la turbidité et la charge en matière organique, ce qui peut expliquer certaines variations observées en particulier pour le zinc et le cadmium.

Globalement, un gradient amont-aval significatif ( $p < 0.05$ ) est observé pour la majorité des molécules à l'exception du  $\text{NH}_4^+$  ( $p = 0.21$ ).

D'un point de vue temporel, le nickel, le cuivre (à l'exception de la station la plus avale) et le  $\text{NH}_4^+$  (sur les deux stations les plus marines) ne présentent pas de variabilité inter-annuelle significative ( $p > 0.1$ ). Le cuivre, les nitrates, les phosphates et la silice affichent globalement une variabilité saisonnière marquée par des différences significatives entre les mois ( $p < 0.05$ ).

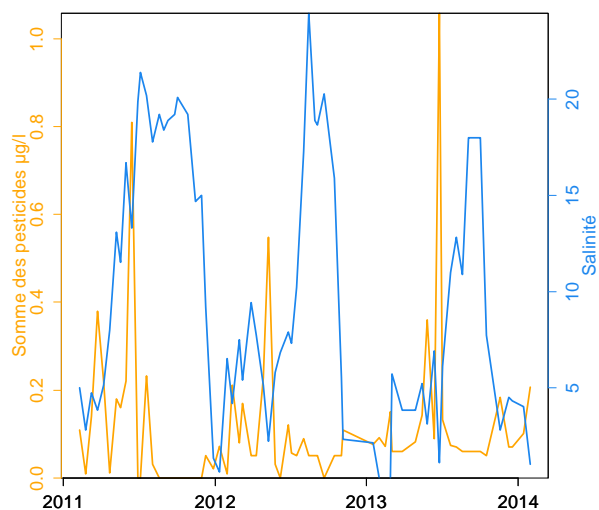
### 3.2.1.2.3 Les pesticides



**Figure 8** – Occurrence mensuelle (en %) de chaque molécule détectée lors de l'étude (en haut à gauche) sur la station 1. Les autres graphiques représentent les distributions mensuelles (par année) des concentrations cumulées (boîtes à moustaches grisées) et des concentrations individuelles (points colorés / code couleur correspondant aux molécules du graphique des occurrences mensuelles) sur les quatre stations.

Parmi la liste des 105 molécules recherchées dans les échantillons, seules 20 molécules ont été détectées (limite de détection :  $0.01$  ou  $0.05 \mu\text{g.L}^{-1}$  en fonction des molécules) (Figure 8). Les concentrations individuelles rencontrées n'ont jamais dépassé les  $2 \mu\text{g.L}^{-1}$  (mésotrione 06/2011). Cette valeur reste néanmoins exceptionnelle car les maxima les plus régulièrement observés se situent entre  $0.2$  et  $0.8 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Ces valeurs concernent exclusivement le glyphosate et le métolachlore qui sont rencontrés tout au long de l'année et notamment en période printanière (au minimum dans 80 % des échantillons). Chaque année, le

printemps est caractérisé par (1) les concentrations les plus élevées (en concentrations individuelles et cumulées) et (2) par une plus grande diversité des molécules. Les mois de mai et juin représentent ainsi la période de plus forte contamination avec parfois un décalage anticipé (avril 2012) ou plus tardif (juillet 2011 et 2013). Néanmoins en fin d'automne (novembre 2012 et 2013), une plus grande diversité de molécules est également observée.



**Figure 9** – Concentrations cumulées en pesticides ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) et salinité à la station 1 sur toute la durée du suivi.

Comme décrit précédemment, la survenue des pics de concentrations en pesticides (principalement des herbicides) a lieu de la fin de l'hiver au début de l'été, de février à juillet (Figure 9), ce qui correspond aux périodes d'utilisation liées au développement des végétaux. La comparaison de ces pics avec les valeurs de salinité fait ressortir le lien avec les dessalures liées aux apports en eau douce, qui véhiculent sur de courtes périodes des quantités plus importantes de pesticides dans l'estuaire. Ainsi les pics de concentrations cumulées supérieures à  $0.2 \mu\text{g.L}^{-1}$  mesurées à la station 1 correspondent à des dessalures plus ou moins importantes (mars, juin et juillet 2011 ; février, mars et mai 2012 ; mai, juin et juillet 2013). Les dessalures massives observées en automne-hiver ne s'accompagnent d'aucun pic majeur de pesticides, ce qui laisse penser que l'utilisation des produits phytosanitaires est certainement plus modérée sur la deuxième partie de l'année.

La stratégie d'échantillonnage pour l'analyse des pesticides était basée sur des prélèvements ponctuels deux fois par mois ; il peut être argumenté qu'une telle approche ne permet pas d'avoir une bonne représentativité des masses d'eau, qui peuvent effectivement comporter une forte hétérogénéité dans le cas présent. Il pourrait être suggéré de combiner cette approche d'échantillonnages ponctuels avec le déploiement d'échantillonneurs passifs de type POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Sampler) (Alvarez *et al.*, 2004) *in situ*, afin d'avoir des données de concentrations intégrées dans le temps : en effet les membranes peuvent être laissées jusqu'à trois semaines dans le milieu. Les données issues de ces échantillonneurs donnent ainsi une idée du niveau de concentration moyen des molécules sur la durée passée par les membranes dans le milieu. Néanmoins de tels dispositifs, outre le fait qu'ils ne puissent pas piéger efficacement toutes les sortes de molécules (cas du glyphosate), comportent l'inconvénient de ne pas pouvoir restituer les concentrations correspondant aux pics ponctuels. De plus, au moment de la proposition du projet TOPHYPAC, cette technologie n'était pas encore au point dans des milieux aussi turbides que l'estuaire de la Charente.

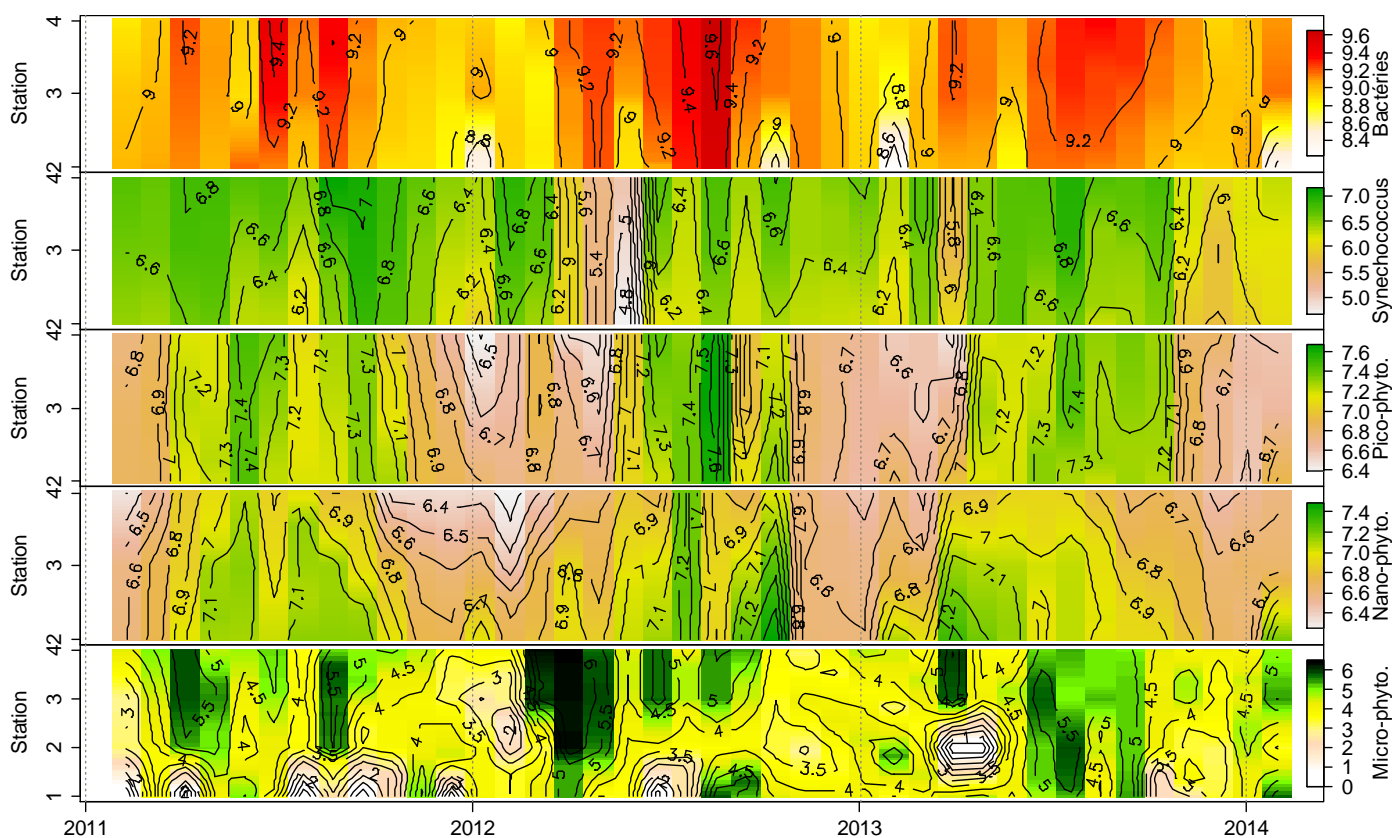
Les données obtenues au cours de ce suivi ont permis de mettre en évidence i) une contamination chronique de l'estuaire par deux herbicides principaux que sont le glyphosate et le métolachlore (molécule dosée mais interdite d'usage, la molécule utilisée étant plus probablement le S-métolachlore impossible à différencier au niveau analytique, mais dont l'usage est autorisé) ; ii) une contamination très ponctuelle par d'autres herbicides dont les usages semblent varier selon les années ; iii) une période critique s'étalant de février à juillet et comportant des pics de concentrations apparemment liés à la survenue de dessalures. Cette période correspond également à une forte productivité au sein de la baie de Marennes-Oléron, avec le développement des communautés phytoplanctoniques, la maturation des gonades des bivalves et leur reproduction suivie de la phase de développement larvaire.

Pour de futures investigations, il serait souhaitable de combiner les deux approches d'échantillonnage ponctuel et passif, en focalisant le suivi sur la période mentionnée ci-dessus mais en élargissant l'échantillonnage au niveau spatial à des stations à proximité des zones de captage et de croissance des bivalves exploités. Cependant, le coût des analyses chimiques représente un frein non négligeable et contraint de manière importante la stratégie et le nombre d'échantillons pouvant être analysés.

## 3.2.2. Évolution des communautés microbiennes en lien avec les caractéristiques du milieu

### 3.2.2.1. Variations spatio-temporelles des abondances

Les analyses réalisées en taxonomie et par cytométrie en flux ont permis de représenter l'évolution spatiale et temporelle de l'abondance des différentes composantes de la communauté étudiée pendant les trois années de suivi (Figure 10). Ces abondances présentent des niveaux différents ; les bactéries hétérotrophes sont les plus représentées avec des abondances de l'ordre du milliard de cellules par litre d'eau. Les compartiments des cyanobactéries (du genre *Synechococcus* sp.), du pico- et du nano-phytoplancton suivent avec des abondances de l'ordre du million à quelques dizaines de millions de cellules par litre. Les communautés micro-phytoplanctoniques sont les moins représentées du compartiment microbien phytoplanctonique avec des abondances maximales de l'ordre du million de cellules par litre mais plus souvent autour de la centaine de milliers de cellules par litre.



**Figure 10** – Évolution spatio-temporelle de l'abondance des différentes communautés microbiennes ( $\text{Log}_{10} (\text{cellules} \cdot \text{L}^{-1})$ ) de février 2011 à janvier 2014 sur 3 à 4 stations (représentées d'amont (1) en aval (4) en ordonnée à gauche). L'intensité des valeurs est représentée par des iso-lignes associées à un code couleur visible à droite de chaque graphique. Les données correspondent, de haut en bas, aux bactéries hétérotrophes, aux cyanobactéries (*Synechococcus* sp.), au pico-, nano- et micro-phytoplancton.

La plupart des communautés présente des variations d'abondance plus au moins marquées suivant la station (confirmées par les tests de Kruskal-Wallis avec des variabilités spatiales significatives,  $p < 0.05$ ). Des différences d'abondance significatives sont observées entre les mois, toutes années confondues, sur l'ensemble des stations : cela dénote des variations liées à la saisonnalité dans l'évolution des abondances des principales

communautés microbiennes. L'évolution spatio-temporelle (Figure 10) est très variable et dépend de la communauté :

- les bactéries hétérotrophes présentent des variations saisonnières avec des maxima centrés sur l'été et un gradient spatial faiblement marqué vers l'océan ;
- les cyanobactéries du genre *Synechococcus* sp. ont une préférence pour les eaux plus salées mais ne présentent pas de saisonnalité particulière ( $p > 0.3$  quelle que soit la station) ; bien que la variabilité inter-annuelle globale des trois stations ne soit pas significative, les stations 2 et 4 semblent plus contrastées ( $p = 0.051$  et  $p = 0.052$ , respectivement). Une période d'abondance nettement réduite est observée au printemps 2012 ;
- le pico-phytoplancton n'affiche pas de préférendum spatial ( $p = 0.60$ ) mais son développement est saisonnier (centré sur l'été à l'image des bactéries hétérotrophes) ;
- les abondances du nano-phytoplancton présentent un gradient amont-aval, dénotant une préférence pour les eaux plus douces. Des variations saisonnières sont également visibles, globalement semblables à celles observées pour le pico-phytoplancton. Certaines variations spatiales sont à l'opposé de celles observées pour les cyanobactéries ;
- les communautés micro-phytoplanctoniques affichent des gradients spatiaux et temporels prononcés avec des préférences pour les eaux marines et pour les périodes printanières et de fin d'été, voire automnales. Aussi, une absence totale de micro-phytoplancton est observée à certaines périodes sur les stations les plus en amont.

D'une manière générale, les abondances des communautés microbiennes (pour chaque station) ne varient pas d'une année sur l'autre (variabilité inter-annuelle non significative,  $p > 0.1$ ). Ces observations indiquent que les conditions hydro-climatiques variables (significativement différentes d'une année à l'autre, cf § 3.2.1.1) des trois années d'étude ont un effet globalement limité sur l'abondance annuelle des communautés microbiennes.

### 3.2.2.2. Études des effets spatiaux et temporels sur les communautés

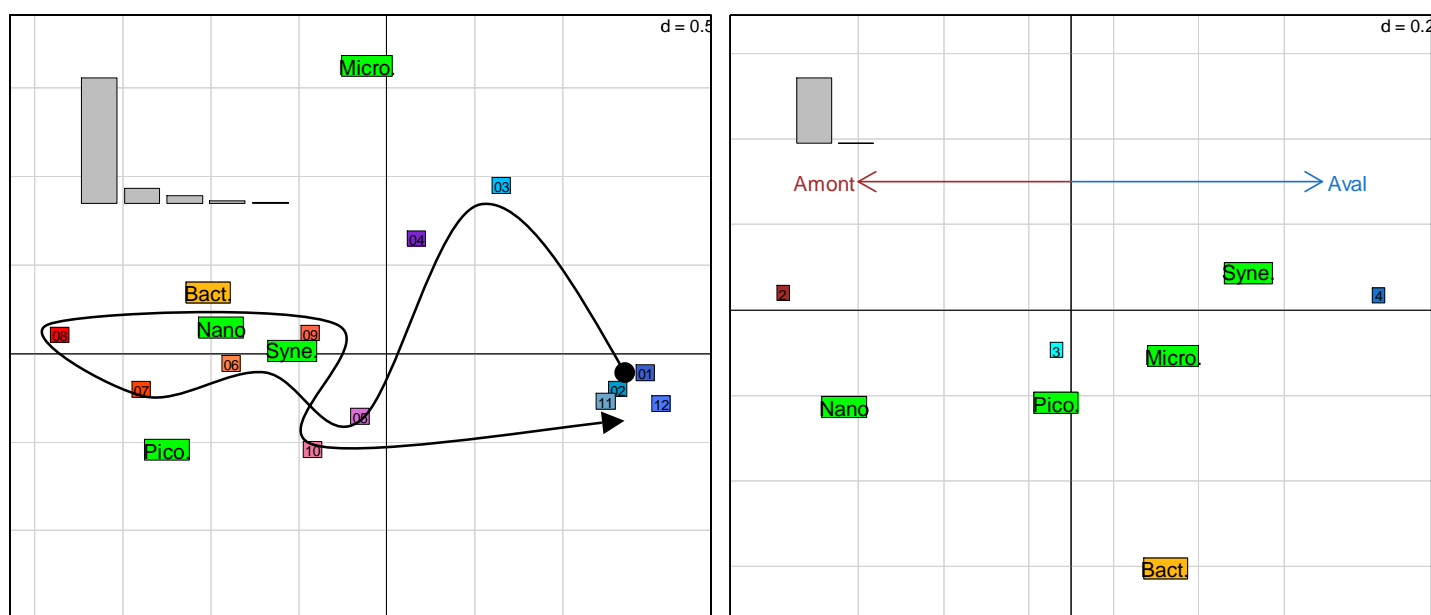
Les données des abondances mensuelles obtenues pour les différentes communautés décrites ci-dessus peuvent être exploitées ensemble au moyen d'une analyse en composantes principales inter-classes (ACP, Figure 11) qui permet de faire ressortir les liens entre les communautés, les saisons et les stations.

L'analyse inter-mois (Figure 11) montre un regroupement des mois d'hiver (de novembre à février) dans la partie positive de l'axe horizontal, ces mois étant nettement séparés des mois d'été représentés à l'opposé. Les mois de printemps et début d'automne sont quant à eux moins bien représentés par cet axe. Cela peut être expliqué par l'importante variabilité des conditions hydro-climatiques aux saisons de printemps et d'automne entre les années 2011 d'une part, et 2012 et 2013 d'autre part, ce qui a pu influencer sur les abondances des communautés. L'analyse permet d'illustrer la rotation saisonnière des différentes communautés. Sur les trois années d'observation, le micro-phytoplancton apparaît comme la communauté la plus précoce avec des valeurs plus fortes rencontrées en début de printemps (pics de mars 2011 avec 1.6 millions de cellules.L<sup>-1</sup>, de mars 2012 avec 10.4 millions de cellules.L<sup>-1</sup>). Les cyanobactéries de type *Synechococcus* sp. semblent moins dépendantes de conditions particulières contrairement aux communautés de nano-, de pico-phytoplancton et de bactéries hétérotrophes qui privilégient la période estivale. L'effet temporel sur l'ensemble des communautés (30.1 % de l'inertie totale ;  $p = 0.0009$ ) est nettement supérieur à l'effet spatial (6.36 % de l'inertie totale ;  $p = 0.00009$ ).

Dans l'espace, trois groupes de communautés se distinguent (Figure 11) : le micro-phytoplancton, *Synechococcus* sp. et les bactéries hétérotrophes (1<sup>er</sup> groupe) présentent des affinités plutôt marines par opposition au nano-phytoplancton (2<sup>ème</sup> groupe). Le troisième groupe, composé du pico-phytoplancton, est moins bien représenté sur l'axe des stations, il semble plus tolérant d'un point de vue spatial.

Ces analyses inter-groupes montrent qu'il existe une variabilité spatiale et temporelle significative sur la structure des communautés dans la partie aval de l'estuaire de la Charente. La combinaison des deux analyses révèle trois groupes distincts qui peuvent être identifiés selon leur distribution spatio-temporelle :





**Figure 11** – Analyse en Composantes Principales (ACP) inter-groupes. Le graphique de gauche correspond à l'ACP inter-mois (saisonniers), le plan 1-2 représentant 92.6 % de l'inertie. Le graphique de droite correspond à l'ACP inter-stations (stations 2 à 4 d'amont en aval), le plan 1-2 représentant 100 % de l'inertie totale. Les histogrammes gris en haut à gauche de chaque graphique représentent la contribution (en %) de chaque composante à l'inertie globale de l'analyse.

- le nano- et micro-phytoplancton ainsi que les bactéries hétérotrophes sont les communautés les plus variables dont les distributions sont à la fois spatiales et temporelles,
- le pico-phytoplancton présente des distributions structurées principalement de façon temporelle,
- la distribution des populations de *Synechococcus* sp. est essentiellement structurée spatialement.

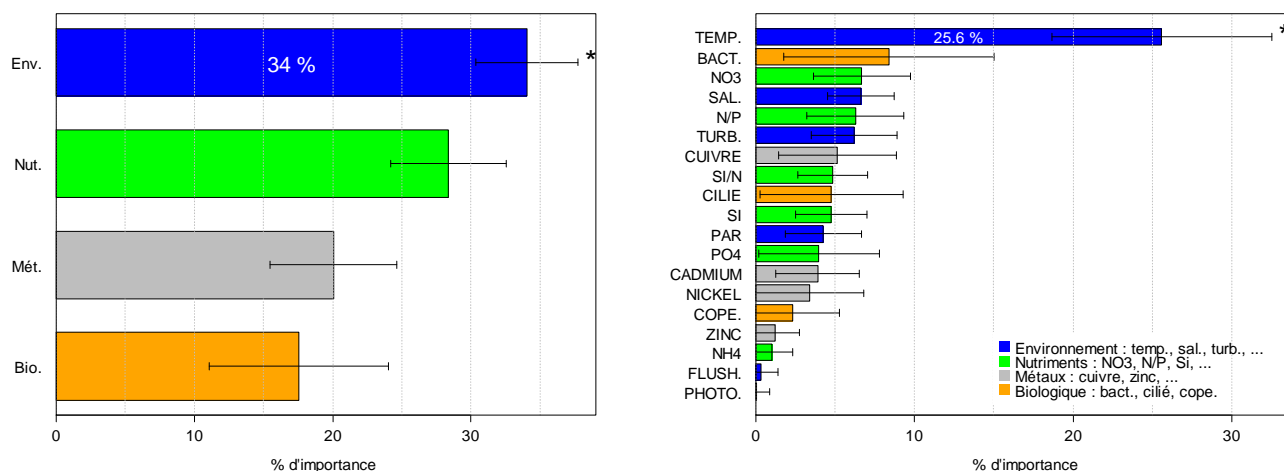
### 3.2.2.3. Relation entre les abondances des communautés phytoplanctoniques et les variables du milieu

Les liens entre les variables du milieu et les abondances des communautés ont été étudiés sur la base d'une analyse multiblocs de (K+1) tableaux de données (cf. Traitement de données et analyses statistiques § 2.4). Cette analyse, réalisée avec trois variables latentes, explique 67 % de la variabilité de l'abondance des communautés phytoplanctoniques (Figure 12). Les résultats montrent que l'abondance globale des communautés est majoritairement liée au groupe de variables environnementales (34 % de l'abondance expliquée par l'analyse, Figure 12, gauche).

Les liens entre l'abondance et chaque variable (Figure 12, droite) indiquent qu'au sein du bloc de variables environnementales, l'abondance du phytoplancton est particulièrement liée à la température qui représente 25.6 % de la variabilité du modèle. Cette analyse sur les abondances globales montre le lien prépondérant entre le phytoplancton et l'environnement ; néanmoins, chacune des communautés étudiées présente des relations spécifiques avec chacune des variables prises en compte dans l'analyse (Tableau 3).

Les communautés de pico- et nano-phytoplancton, les plus abondantes du compartiment phytoplanctonique, sont influencées de façon plus importante par la température (Tableau 3). Leurs pics d'abondances (observés lors des périodes les plus chaudes) montrent que les variations saisonnières de température peuvent influencer la structure des communautés phytoplanctoniques (Paerl *et al.*, 2014), en favorisant l'émergence des communautés composées de cellules de plus petite taille autour de l'été, comme le soulignent les observations de Moran *et al.* (2010) au nord-ouest de l'Atlantique.

Paradoxalement, la salinité, dont la variabilité inter-annuelle est très marquée sur la période d'étude (Figure 2), semble peu modifier la dynamique saisonnière remarquable des communautés (Figure 11). Le gradient de salinité est néanmoins largement reconnu pour structurer les communautés (Marshall *et al.*, 2006) : les espèces obéissent à des préférences de salinité spécifiques (Brand, 1984), à l'image de la Figure 13 pour le micro-phytoplancton.



**Figure 12** – Représentation graphique des pourcentages d'importance de chaque groupe (bloc) de variables (gauche) et de chaque variable (droite) dans l'explication de l'abondance des communautés phytoplanctoniques. Pour chaque valeur, un intervalle de confiance, issu de 500 simulations bootstrap, est représenté. \* indique que le pourcentage est significatif à 95%.

**Tableau 3** – Contribution des variables du milieu pour l'explication des abondances des différentes communautés de phytoplancton, d'après la moyenne des coefficients de régression par communautés et le pourcentage d'importance pour l'ensemble des communautés. \* indique que le coefficient de régression est significatif à 95% sur la base des simulations bootstrap.

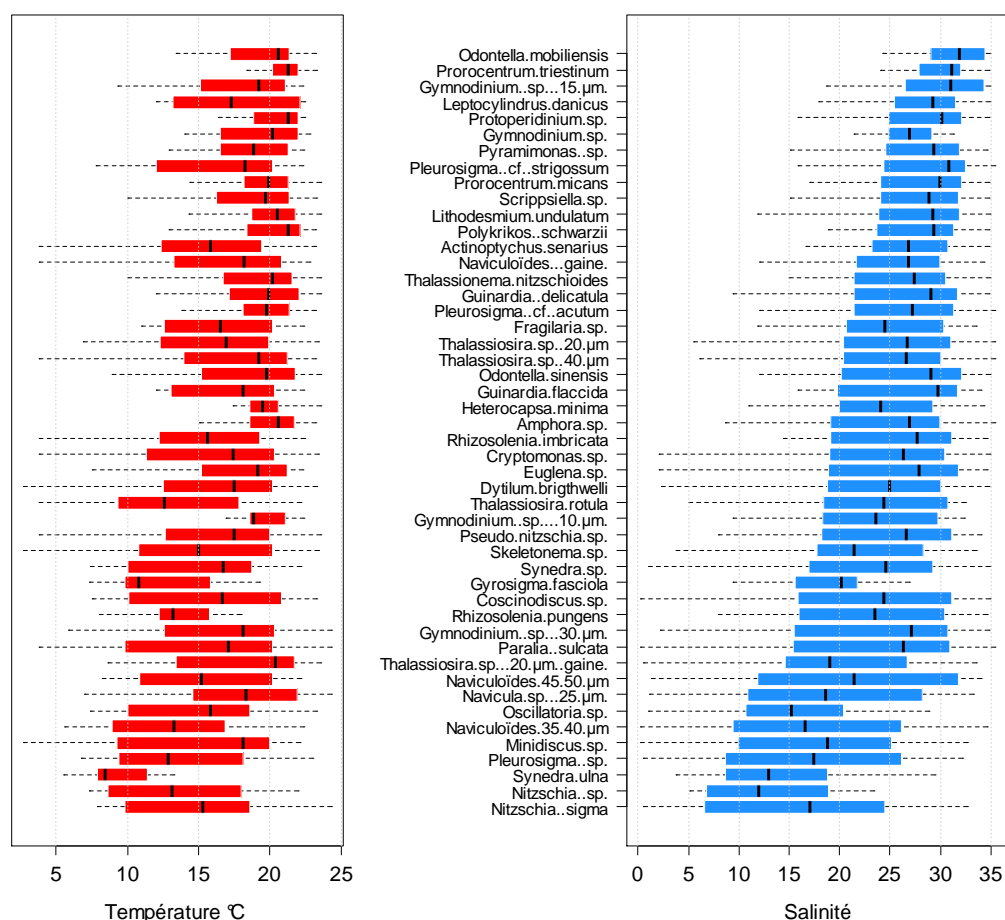
	Coefficients de régression				Importance % Phytoplancton Total
	Pico-phyto.	Nano-phyto.	Synecho.	Micro-phyto.	
<b>Bloc environnement</b>					
Temp.	<b>0.83 *</b>	<b>0.73 *</b>	-0.14	0.18	25.6
Sal.	0	<b>-0.16 *</b>	<b>0.21 *</b>	<b>0.09 *</b>	6.7
Turb.	<b>0.26 *</b>	<b>0.38 *</b>	-0.15	-0.07	6.2
PAR	<b>0.2 *</b>	0.06	0	<b>0.16 *</b>	4.3
Photo.	0.02	0.03	-0.02	0	0
Flush.	0.06	0.04	0.02	0.02	0.3
<b>Bloc nutriments</b>					
NO3	-0.09	0.07	<b>-0.19 *</b>	<b>-0.09 *</b>	6.7
NH4	0.12	0.16	<b>-0.15 *</b>	0.02	1
PO4	<b>0.17 *</b>	<b>0.23 *</b>	0.09	-0.11	4
Si	0.05	<b>0.21 *</b>	<b>-0.14 *</b>	<b>-0.12 *</b>	4.8
N/P	<b>-0.12 *</b>	-0.01	<b>-0.2 *</b>	-0.04	6.3
Si/N	0.12	0.08	<b>0.19 *</b>	-0.04	4.9
<b>Bloc métaux</b>					
Nickel	-0.1	0.07	-0.11	<b>-0.15 *</b>	3.4
Cuivre	<b>0.23 *</b>	<b>0.37 *</b>	-0.12	-0.11	5.2
Zinc	-0.06	0.02	0.08	<b>-0.13 *</b>	1.2
Cadmium	<b>0.14 *</b>	0.1	<b>0.2 *</b>	-0.05	3.9
<b>Bloc biologique</b>					
Cope.	<b>0.23 *</b>	0.2	0.07	0.01	2.3
Cilie.	<b>0.2 *</b>	0.09	<b>0.13 *</b>	0.07	4.8
Bact.	<b>0.44 *</b>	<b>0.27 *</b>	0.01	<b>0.19 *</b>	8.4

Comme l'indiquent Agawin *et al.* (2000) dans leurs travaux, les communautés de pico- et nano-phytoplancton semblent mieux adaptées aux faibles conditions de lumière (corrélation positive avec la turbidité, Tableau 3)

que le micro-phytoplancton (corrélation positive avec le rayonnement solaire, Tableau 3). Domingues *et al.* (2011) montrent en effet que la lumière est un "driver" important de la production primaire (régulateur de biomasse maximale selon Cloern, 2001), notamment pour les diatomées. Il semble donc que les paramètres de salinité et de lumière contribuent à structurer les communautés davantage dans l'espace que dans le temps, à l'image de leurs variations, elles-mêmes plus marquées dans l'espace que dans le temps.

Par ailleurs, l'absence de relation significative entre les abondances de phytoplancton et le temps de renouvellement (flushing-time) montre que l'hydrodynamique de cette partie de l'estuaire n'affecterait pas ou peu la structure des communautés, contrairement aux observations de Trigueros et Orive (2000), Ferreira *et al.* (2005) ou encore Paerl *et al.* (2014). Sur la zone d'étude, le flushing-time est très nettement conditionné par les coefficients de marée. La stratégie d'échantillonnage, conçue pour rester dans une gamme de coefficients moyens, a pu alors biaiser un éventuel effet du temps de renouvellement sur le phytoplancton.

L'absence de corrélation et les corrélations négatives observées entre les différentes communautés de phytoplancton et les nitrates (Tableau 3) laissent penser que les nutriments azotés ne limitent pas ou peu la production primaire de cet environnement charentais. Le lien significatif entre le pico- et nanoplancton et les phosphates (Tableau 3) montre que ces nutriments représentent, quant à eux, un élément favorable à la dynamique de ces communautés. Les travaux de Fang *et al.* (2006), Finkel *et al.* (2006) ou encore Moran *et al.* (2010) confortent cette relation : en effet, ces auteurs mettent en évidence l'importance des phosphates sur la croissance des communautés de pico- et/ou nano-phytoplancton sur la base des concentrations en phosphates (seuil de concentration limitant entre 0.6 et 1  $\mu\text{M}$  suivant l'auteur) et des conditions particulières de lumière. L'estuaire de la Charente présente des caractéristiques proches de celles rencontrées dans ces études avec des concentrations en phosphates comprises entre 0.5 et 3  $\mu\text{M}$  et une grande variabilité de rayonnement solaire suivant la station.



**Figure 13** – Préférendum thermique et salin pour les espèces, genres ou familles de micro-phytoplancton observés dans plus de 5% des échantillons de l'étude. Cette liste est triée par salinité décroissante sur la base du 1<sup>er</sup> quartile représenté par la partie gauche de chaque boîte à moustache (box-plot) de couleur.

Enfin, le pico-phytoplancton et particulièrement les *Synechococcus* sp. semblent présenter plus de sensibilité aux concentrations relatives entre éléments nutritifs : les rapports stœchiométriques (de nitrates/phosphates et de silice/nitrates) étant liés significativement avec ces communautés (Tableau 3). La spécificité des relations entre les éléments ou rapports d'éléments nutritifs et les communautés montre que les nutriments (présentant de fortes variabilités spatio-temporelles, Figure 11) doivent jouer un rôle important dans la structure tant spatiale que temporelle des communautés de phytoplancton.

Des liens s'apparentant à des effets positifs ou négatifs de contaminants chimiques sur les abondances des communautés phytoplanctoniques sont observés, comme ceux du cuivre (oligo-élément et contaminant) sur le pico- et nano-phytoplancton ou ceux du zinc ou du nickel (contaminant) sur le micro-phytoplancton (Tableau 3).

Dans tous les cas, il apparaît (1) que les effets sont spécifiques de la communauté, du genre ou de l'espèce de phytoplancton (Braek *et al.*, 1980 ; Debelius *et al.*, 2009 ; Echeveste *et al.*, 2012), et (2) qu'il peut exister des interactions (de nature additive, synergique voire antagoniste) entre les molécules chimiques (métaux, pesticides, résidus pharmaceutiques, etc.) susceptibles d'affecter les communautés microbiennes aquatiques comme le montrent les travaux de Faust *et al.* (2003), DeLorenzo et Fleming (2008), ou encore Villa *et al.* (2012).

#### 3.2.2.4. Dynamique des communautés

Les communautés phytoplanctoniques apparaissent davantage structurées par le temps que par l'espace ; ce constat tend à renforcer l'effet significatif de la température qui explique plus de 25 % de la variabilité des abondances (Figure 12). La structure du phytoplancton ne se réduit cependant pas aux seules variations saisonnières, d'autant plus que certaines communautés, comme les *Synechococcus* sp., semblent y être relativement indifférentes.

Au début du printemps, dès que le niveau de radiations solaires est suffisant, un développement précoce de micro-phytoplancton intervient jusqu'à ce que le pico- et nano-phytoplancton (moins thermo-tolérants) se développent en relation avec la dynamique thermique et la plus grande disponibilité en phosphates. Ces communautés phytoplanctoniques de petite taille (plus compétitives vis-à-vis des nutriments) ainsi que les bactéries hétérotrophes assimilent très probablement une part importante des ressources nutritionnelles au détriment des autres communautés (défavorable au micro-phytoplancton à cette saison) : la concurrence vis-à-vis des nutriments devient ainsi un élément déterminant de la structure des communautés microbiennes. Dans ce contexte, les conditions environnementales de salinité et de lumière tendent à structurer spatialement les communautés : le nano-phytoplancton privilégie l'amont (moins salé et moins lumineux) en opposition au micro-phytoplancton qui se situe en aval, le pico-phytoplancton étant plus ubiquiste.

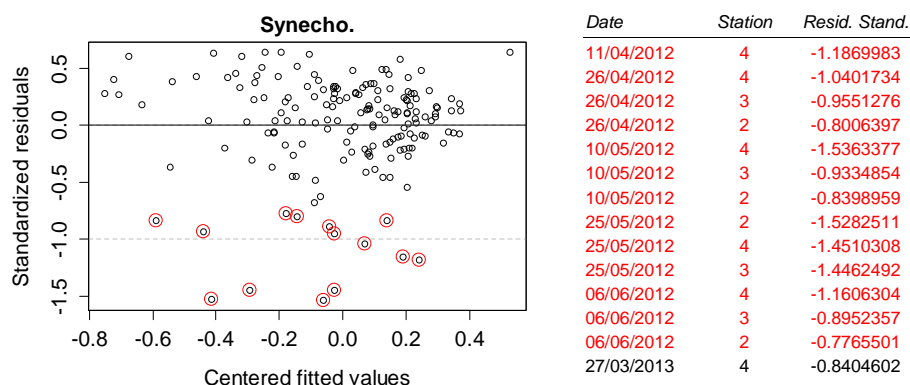
La prédation ciblée des brouteurs et des filtreurs et plus spécifiquement la lyse virale (non prise en compte dans l'étude) contribuent probablement à la structuration des communautés ; une régulation trophique par reminéralisation des nutriments (exsudation, "sloppy feeding", lyse cellulaire, etc.) peut alors bénéficier à l'ensemble des communautés et contribuer à la diversité de l'écosystème.

#### 3.2.2.5. Effet de la contamination chimique ?

Les paragraphes précédents soulignent l'existence de relations entre les communautés phytoplanctoniques et certains métaux pris en compte dans l'étude. Dans le cadre du projet TOPHYPAC, l'effet éventuel des pesticides sur les communautés phytoplanctoniques a été ciblé. Les coûts analytiques de détection de ces molécules n'ayant pas permis de disposer de la même couverture spatio-temporelle de données que pour les autres variables, l'analyse des relations (cf. § 3.2.2.3 Relation entre les abondances des communautés phytoplanctoniques et les variables du milieu) entre le phytoplancton et le milieu ne prend donc pas en compte ces contaminants.

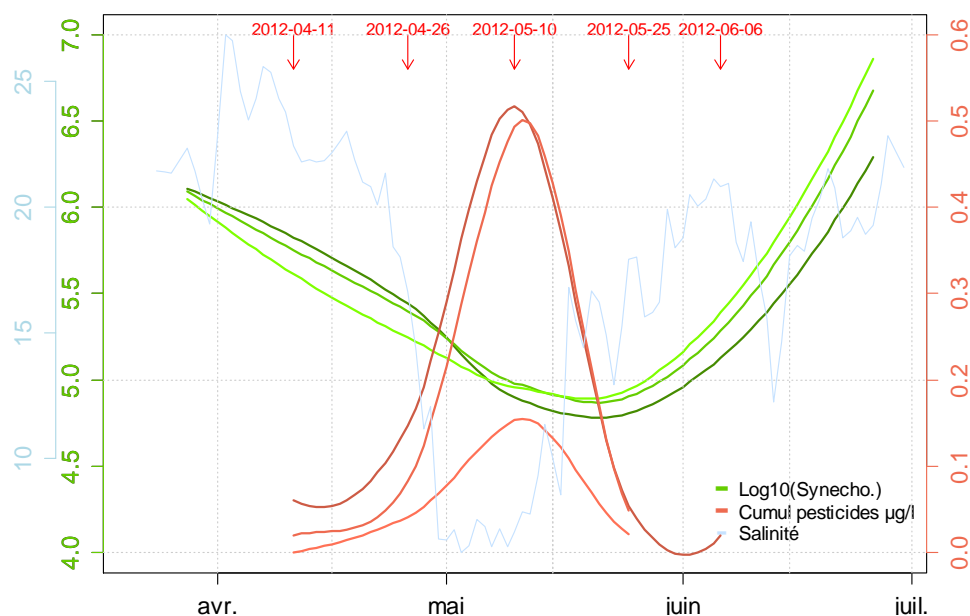
Néanmoins, l'analyse statistique des résultats (modèle établi à partir de l'analyse multiblocs) permet de distinguer des périodes où les abondances de certaines communautés phytoplanctoniques paraissent anormalement basses. On distingue ainsi une période, au printemps 2012, où les résidus du modèle obtenu pour les *Synechococcus* sp. s'écartent du nuage de points principal (Figure 14) : ces résidus négatifs indiquent que le modèle surestime les abondances des *Synechococcus* sp.. Pour expliquer un tel écart, l'hypothèse peut être qu'un événement particulier serait survenu lors du printemps 2012. Cette période a en effet fait l'objet

d'une violente dessalure sur la zone d'étude (Figure 3), traduisant d'importants et intenses apports en eau douce par la Charente.



**Figure 14** – Résidus standardisés des *Synechococcus sp.* issus de l'analyse K+1 tableaux (gauche) ; le tableau (droite) permet l'identification des dates et des stations pour lesquelles certains résidus (entourés en rouge) sont nettement inférieurs aux résidus constituant le nuage de points principal.

La saisonnalité des pesticides présents dans l'estuaire de la Charente (Figure 8) indique que les mois d'avril, mai et juin sont favorables à leur détection, en termes quantitatifs et qualitatifs. Il y a donc lieu de penser que les *Synechococcus sp.* auraient pu réagir à la présence de ces molécules (ici un mélange de glyphosate, de métolachlore, acétochlore, diméthénamide et isoproturon) tant la survenue des évènements est synchrone (Figure 15). Cependant, d'après la littérature, les concentrations individuelles des molécules détectées lors de cette épisode ne semblent pas suffisantes pour affecter les communautés microbiennes aquatiques (Peterson *et al.*, 1994 ; DeLorenzo *et al.*, 2001 ; Stachowski-Haberkorn *et al.*, 2008).



**Figure 15** – Évolution des abondances en *Synechococcus sp.* ( $\text{Log}_{10}$ ), des concentrations cumulées en pesticides ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) et des salinités observées au printemps 2012 sur les trois stations les plus avales (couleurs plus foncées vers l'amont).

Sous réserve que la piste de la contamination chimique puisse contribuer à expliquer les baisses d'abondance des *Synechococcus sp.*, il est probable que des interactions entre molécules chimiques même présentes à faible concentration (entre pesticides, avec des métaux ou encore d'autres types de contaminants tels que les résidus pharmaceutiques) aient pu amplifier leur caractère toxique (Faust *et al.*, 2003 ; Koutsaftis et Aoyama, 2006 ; DeLorenzo et Fleming, 2008 ; Emelogu *et al.*, 2013). Les conditions environnementales ont pu également accentuer les effets éventuels de certaines molécules comme l'indiquent les travaux de Sokolova et Lannig (2008) sur l'interaction température/toxicité des métaux sur différents organismes aquatiques.

Toutefois, les apports massifs d'eau douce constatés au printemps 2012 ont pu s'accompagner d'une importante charge virale : la période printanière et les faibles salinités étant soulignées comme des conditions favorables à la présence de particules virales selon les observations de Bordalo et al. (2005) effectuées dans un estuaire du nord du Portugal. Qui plus est, Auguet *et al.* (2009) indiquent que les virus d'eau douce arrivant de la Charente présenteraient une grande capacité à infecter les bactéries marines. Ainsi, l'activité virale pourrait également contribuer aux diminutions d'abondance observées sur les cyanobactéries de type *Synechococcus* sp. qui sont probablement multi-factorielles.

### 3.3. Exposition des communautés au cuivre et aux pesticides

#### 3.3.1. Bilan des expérimentations réalisées

Parmi les 27 expérimentations PICT réalisées sur les communautés prélevées au niveau des stations 2, 3 et 4, seules 24 ont permis d'obtenir des résultats exploitables qui figurent dans les parties suivantes : 11 en 2012 et 13 en 2013. Avant de présenter le détail des résultats obtenus, il convient d'effectuer un bref rappel des communautés ciblées et des paramètres mesurés :

- la communauté photosynthétique (ou phytoplanctonique) dans son ensemble comprend les organismes du micro-, pico-, nano-phytoplancton ainsi que les *Synechococcus* sp. ;
- le micro-phytoplancton correspond aux organismes déterminés par taxonomie. Il s'agit de cellules de grande taille dont l'abondance ne permet pas une analyse par cytométrie en flux : les cellules sont trop peu concentrées pour former une population (nuage de points suffisamment dense) identifiable par cette technique ;
- le pico-, nano-phytoplancton ainsi que les *Synechococcus* sp. sont des sous-communautés discriminées par cytométrie en flux ;
- l'efficacité de photosynthèse (mesurée par PAM-fluorescence) est un paramètre fonctionnel permettant d'avoir une mesure qui correspond en théorie à l'ensemble de la communauté photosynthétique.

#### 3.3.2. Effets du cuivre

Le cuivre a été utilisé dans ce projet en tant que toxique de référence. Les concentrations d'exposition étaient donc volontairement poussées jusqu'à des valeurs élevées afin de garantir l'obtention d'une inhibition significative et importante de l'efficacité de photosynthèse. Plutôt que de s'intéresser à des concentrations sans effets observés (No Observed Effect Concentration, NOEC) ou aux concentrations les plus faibles entraînant un effet (Lowest Observed Effect Concentration, LOEC) qui sont fortement dépendantes du design expérimental (choix des concentrations testées, du nombre de réplicats, Isnard *et al.*, 2001), il a été décidé d'utiliser des variables de concentrations effectives  $CE_x$  (Concentration Effective causant X % d'inhibition du paramètre considéré). Les résultats obtenus n'ayant pas systématiquement permis l'extrapolation des  $CE_{50}$ , il a paru plus judicieux de considérer les  $CE_{10}$  afin d'avoir un jeu de données plus complet. L'observation des données laisse penser que les valeurs de  $CE_{10}$  pourraient correspondre à un seuil à partir duquel un effet peu être observé, c'est-à-dire entre les NOEC et les LOEC.

Cette approche a permis le calcul des  $CE_{10}$ , à la fois pour les mesures d'efficacité de photosynthèse, mais aussi pour d'autres paramètres mesurés par cytométrie en flux tels que les abondances cellulaires et la fluorescence rouge relative au contenu des cellules en chlorophylle. L'efficacité de photosynthèse correspond ici à la réponse globale de l'ensemble de la communauté des organismes photosynthétiques présents dans l'échantillon, alors que les paramètres analysés par cytométrie en flux permettent une discrimination de plusieurs « populations de points » qui correspondent en réalité à des sous-communautés photosynthétiques (pico-phytoplancton, nano-phytoplancton, cryptophytes, *Synechococcus* sp.).

Les valeurs de  $CE_{10}$  obtenues pour l'ensemble des paramètres mesurés et jugées exploitables sont comprises entre 0 et quasiment  $10\,000\ \mu\text{gCu}\cdot\text{L}^{-1}$  (Tableau 4). Le nombre de  $CE_{10}$  ayant pu être calculées varie beaucoup

selon les paramètres : ainsi seulement trois valeurs ont été extrapolées à partir des concentrations cellulaires de pico-phytoplancton, contre 68 valeurs à partir des mesures d'efficacité de photosynthèse, sur un total de 24 expérimentations réalisées chacune sur trois stations, soit un total de 72 valeurs en théorie. Pour la plupart des paramètres concernés, les résultats manquants sont expliqués par une moindre sensibilité du paramètre considéré, les données collectées ne comportant pas d'effet-dose, elles ne peuvent pas être modélisées par la macro Regtox pour établir une  $CE_{10}$ . C'est le cas notamment pour les concentrations en bactéries hétérotrophes (20 valeurs), en pico-phytoplancton (3 valeurs) et en nano-phytoplancton (22 valeurs). Par contre, pour ces deux dernières communautés la fluorescence relative à la chlorophylle répond de manière dose-dépendante et a permis d'extrapoler 37 et 46 valeurs de  $CE_{10}$ , respectivement. Les *Synechococcus* sp. montrent quant à eux une sensibilité plus marquée au niveau des concentrations cellulaires. Les cryptophytes constituent un cas particulier : en effet, ces organismes ne sont pas fréquemment retrouvés dans les échantillons, ce qui explique le faible nombre de résultats (18 valeurs pour les concentrations cellulaires et 10 pour la fluorescence relative à la chlorophylle).

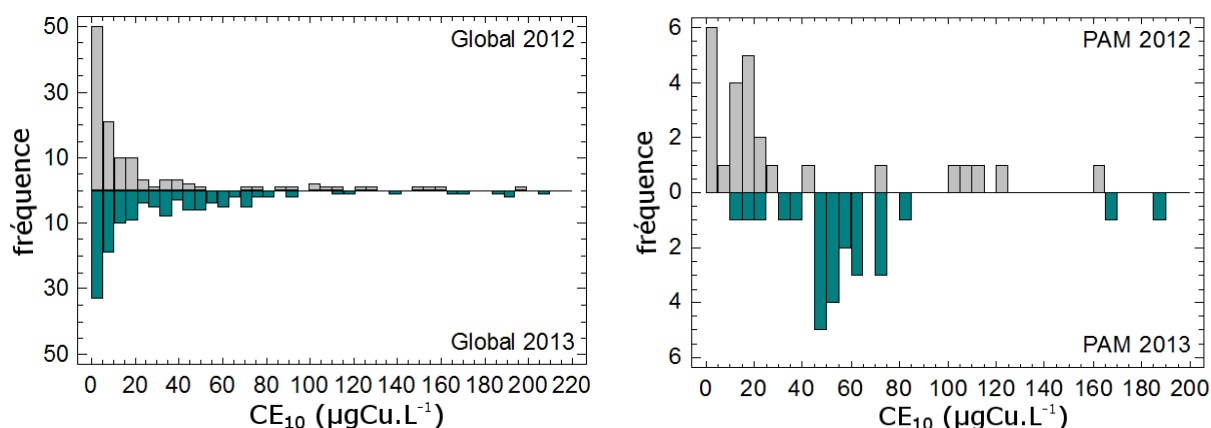
Lorsque les communautés sont exposées au cuivre, l'efficacité de photosynthèse reste le paramètre qui réagit le plus souvent avec une réponse dose-dépendante.

Les  $CE_{10}$  minimales sont proches de zéro pour la majorité des paramètres, à l'exception de la fluorescence relative à la chlorophylle pour le nano-phytoplancton ( $9.1 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) et les cryptophytes ( $4.2 \mu\text{g.L}^{-1}$ ). Les  $CE_{10}$  maximales sont comprises entre  $42 \mu\text{g.L}^{-1}$  (cryptophytes, chlorophylle) et  $9016 \mu\text{g.L}^{-1}$  (efficacité de photosynthèse), faisant apparaître une grande variabilité des réponses obtenues selon les paramètres mesurés. Il est intéressant de remarquer que les valeurs de  $CE_{10}$  les moins élevées sont issues des mesures effectuées sur les cryptophytes et les *Synechococcus* sp., alors que les bactéries hétérotrophes et la communauté photosynthétique dans son ensemble comportent une plage de réponse beaucoup plus large.

**Tableau 4** –  $CE_{10}$  (en  $\mu\text{gCu.L}^{-1}$ ) minimales et maximales et intervalles de confiance à 95 % associés, obtenus à l'aide de la macro Regtox pour les différents paramètres mesurés au cours des expérimentations PICT. Le nombre de  $CE_{10}$  correspond à celles ayant pu être calculées et validées suite à une réponse de type effet-dose pour chacune des variables mesurées, pour un nombre total théorique égal à 72 (24 expérimentations sur trois stations).

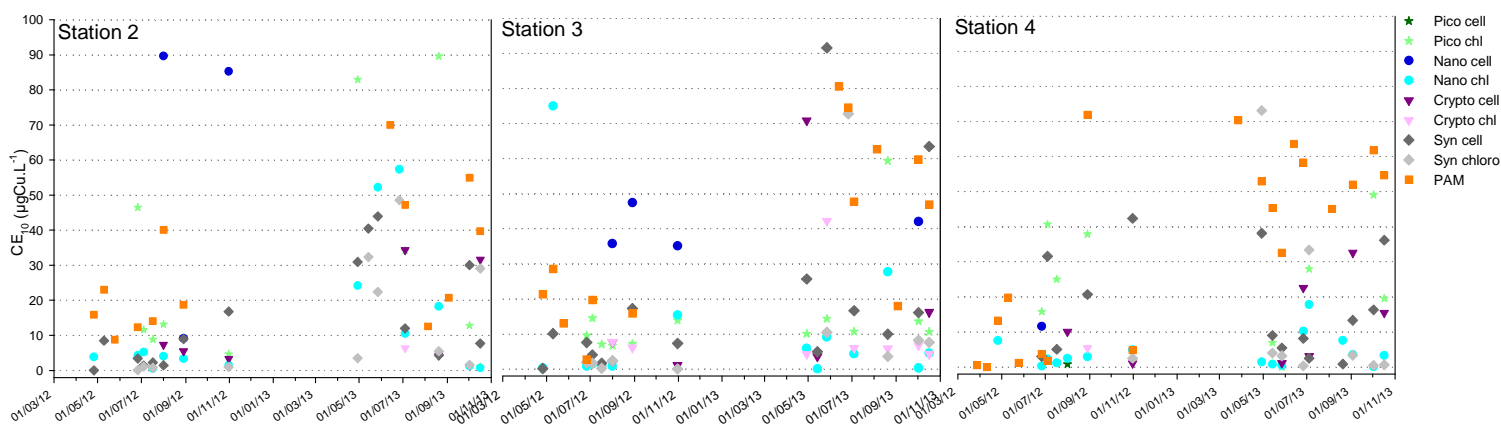
Communauté (paramètre)	$CE_{10}$ minimale ( $\mu\text{gCu.L}^{-1}$ )	$IC_{95}$	$CE_{10}$ maximale ( $\mu\text{gCu.L}^{-1}$ )	$IC_{95}$	Nombre de $CE_{10}$
Communauté photosynthétique (efficacité de photosynthèse)	0	[0 ; 1.76]	9016	[3192 ; 15124]	68/72
Bactéries hétérotrophes ( $\text{cell.mL}^{-1}$ )	0	[0 ; 0.26]	5191	[3483 ; 6132]	20/72
Picophytoplancton ( $\text{cell.mL}^{-1}$ )	0.76	[0 ; 11.3]	699	[296 ; 1095]	3/72
Picophytoplancton (chlorophylle)	0.06	[0.01 ; 0.3]	642	[125 ; 806]	37/72
Nanophytoplancton ( $\text{cell.mL}^{-1}$ )	9.1	[2.8 ; 23.2]	594	[125 ; 746]	22/72
Nanophytoplancton (chlorophylle)	0	[0 ; 0.06]	120	[59 ; 267]	46/72
Cryptophytes ( $\text{cell.mL}^{-1}$ )	1.1	[0 ; 3.1]	71	[6 ; 91]	18/72
Cryptophytes (chlorophylle)	4.2	[0.1 ; 7]	42	[0.1 ; 83]	10/72
<i>Synechococcus</i> sp. ( $\text{cell.mL}^{-1}$ )	0.05	[0 ; 3.6]	113	[78 ; 378]	45/72
<i>Synechococcus</i> sp. (chlorophylle)	0	[0 ; 0.07]	73	[12 ; 83]	30/72

Quelles que soient les stations, une majorité des  $CE_{10}$  présente des valeurs inférieures à  $200 \mu\text{g.L}^{-1}$  : c'est le cas de 84 %, 81 % et 92 % des valeurs pour les stations 2, 3 et 4, respectivement. Ce seuil a donc été choisi pour réaliser une analyse comparative des distributions des  $CE_{10}$  par année et entre les stations. Aucune différence significative n'a été démontrée entre les stations (tous paramètres confondus), que ce soit en 2012 ou en 2013 (Kolmogorov-Smirnov,  $p > 0.05$ , données non représentées). Par contre, une différence significative a été mise en évidence entre les deux années (Figure 16) avec les distributions des  $CE_{10}$  globales, c'est-à-dire celles obtenues pour l'ensemble des paramètres (Kolmogorov-Smirnov,  $p = 0.001$ ). C'est également le cas avec les distributions des  $CE_{10}$  obtenues uniquement à partir des mesures d'efficacité de photosynthèse (Kolmogorov-Smirnov,  $p = 0.0001$ ) correspondant à la réponse fonctionnelle de l'ensemble de la communauté photosynthétique. La distribution globale montre un nombre plus important (50) de  $CE_{10}$  comprises entre 0 et  $5 \mu\text{g.L}^{-1}$  en 2012, par rapport à 2013 (33). Également, 2013 laisse apparaître un étalement plus important des valeurs de  $CE_{10}$  entre 20 et  $80 \mu\text{g.L}^{-1}$ .



**Figure 16** – Distribution des  $CE_{10}$  du cuivre, obtenues en 2012 et 2013 pour l'ensemble des paramètres (gauche) et pour l'efficacité de photosynthèse (droite). Les abscisses représentent les concentrations en  $\mu\text{g.L}^{-1}$  et les ordonnées correspondent au nombre de valeurs obtenues dans chaque classe. Seules les  $CE_{10}$  inférieures à  $200 \mu\text{g.L}^{-1}$  ont été utilisées pour cette analyse.

Les distributions obtenues pour la PAM fluorescence comportent quant à elles une majorité de valeurs entre 0 et  $20 \mu\text{g.L}^{-1}$  en 2012, par rapport aux valeurs 2013 dont la majorité est comprise entre 40 et  $80 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Les communautés exposées au cuivre en 2012 ont donc démontré une sensibilité plus élevée que celles exposées en 2013 ; d'autre part la comparaison des distributions globales et de l'efficacité de photosynthèse montre que les plus faibles valeurs de  $CE_{10}$  obtenues en 2013 (32 dans la classe  $0-5 \mu\text{g.L}^{-1}$  et 14 dans la classe  $5-10 \mu\text{g.L}^{-1}$ , Figure 16, gauche) ne sont pas imputables à la PAM fluorescence (aucune valeur dans ces deux classes, Figure 16, droite).



**Figure 17** –  $CE_{10}$  obtenues à partir des différents paramètres (cell : cellules. $\text{mL}^{-1}$  ; chl : fluorescence rouge relative au contenu en chlorophylle ; PAM : efficacité de photosynthèse) pour les communautés (Pico : pico-phytoplancton ; Nano : nano-phytoplancton ; Crypto : cryptophytes ; Syn : *Synechococcus* sp.) exposées au cuivre au cours de l'ensemble des expérimentations PICT réalisées, pour les trois stations (intervalles de confiance non représentés ;  $CE_{10} > 100 \mu\text{g.Cu.L}^{-1}$  non représentées).

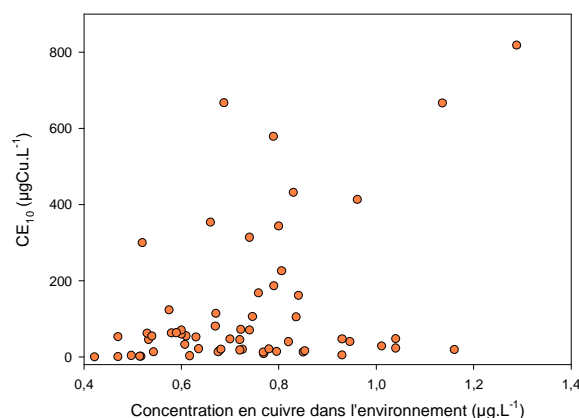
L'examen plus détaillé des paramètres exploités permet de situer les différentes valeurs obtenues par paramètre (Figure 17). Comme il a été constaté avec les distributions des valeurs obtenues par PAM fluorescence, les valeurs les plus basses peuvent être visualisées principalement en 2012 et plus particulièrement au niveau de la station 4 en avril, juin, juillet et fin octobre. De très faibles valeurs sont également observées en 2012 pour les *Synechococcus* sp. (cell et chl, respectivement cellules. $\text{mL}^{-1}$  et fluorescence rouge relative au contenu en chlorophylle), le nanophytoplancton (chl) et les cryptophytes (cell) à la station 2, auxquels s'ajoute le picophytoplancton (chl) à la station 3 ; peu de réponses des *Synechococcus* sp. sont visibles à la station 4. L'année 2013 montre une dispersion nettement plus importante des valeurs de  $CE_{10}$  avec une sensibilité peu marquée au niveau de la station 2 excepté pour quelques dates avec les *Synechococcus* sp. (cell et chl) dont quelques valeurs inférieures à  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$  apparaissent aussi à la station 3 ; cette station est également caractérisée par des faibles valeurs pour le nano-phytoplancton (chl) et les



cryptophytes (chl). Le nano-phytoplancton (chl) et les *Synechococcus* sp. (cell et chl) sont responsables des principales réponses inférieures à  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$  à la station 4.

Cette partie expérimentale, concernant le cuivre, permet de mettre en évidence les effets systématiques de cet élément trace pourtant essentiel, et ce même à partir de concentrations relativement faibles et potentiellement retrouvées dans l'environnement. Les effets du cuivre semblent toucher l'ensemble des communautés analysées, celles-ci comportant différents degrés de sensibilité. L'outil utilisé pour explorer les atteintes fonctionnelles, la PAM fluorescence, semble doté d'une sensibilité très élevée dans certains cas bien particuliers (printemps 2012) ; cependant, comme il s'agit d'une mesure globale, sa sensibilité dépend probablement de la partie de la communauté qui est touchée. Les atteintes parfois mesurées sur les sous-communautés étudiées par cytométrie en flux (exemple de la station 4 en 2013) ne sont pas toujours reflétées par les mesures de PAM fluorescence dont les  $CE_{10}$  sont supérieures : il peut être suggéré que les mesures de PAM fluorescence ne représentent pas la communauté photosynthétique dans son ensemble, mais correspondraient principalement à la réponse du micro-phytoplancton. Cela expliquerait le décalage observé entre les valeurs obtenues à partir de la PAM fluorescence et la cytométrie. L'étude des populations de petite taille avec un outil tel que la cytométrie en flux semble offrir des perspectives intéressantes en termes de détection d'effets, apportant des informations complémentaires à la mesure d'un paramètre global de fonctionnalité tel que la PAM fluorescence.

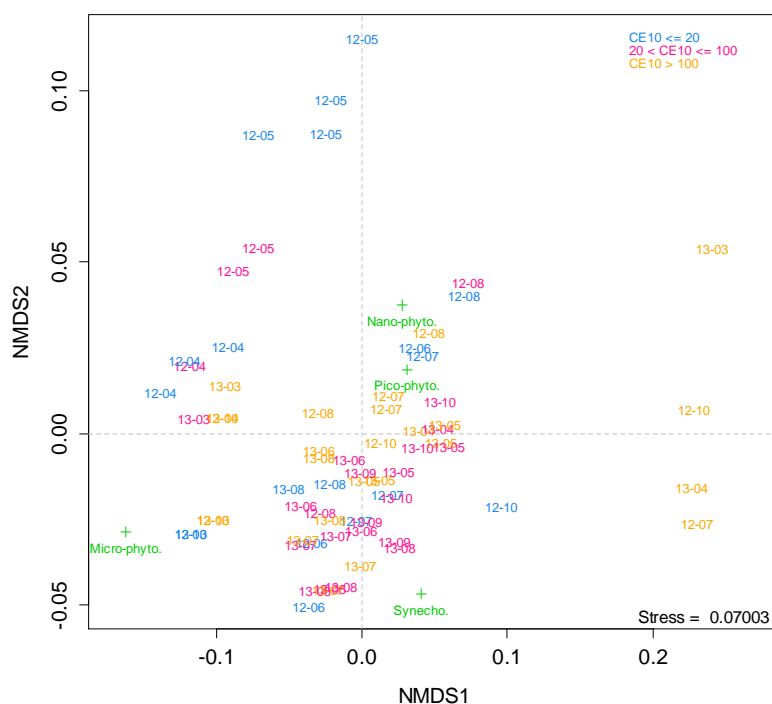
La confrontation des valeurs de  $CE_{10}$  aux concentrations en cuivre mesurées dans le milieu (Figure 18) ne montre aucun lien entre les variables ; il semble donc que la variabilité de la réponse globale des communautés à l'exposition au cuivre ne soit pas expliquée par la présence du cuivre dans leur environnement d'origine. Cela n'est pas surprenant étant donné le faible gradient des concentrations (entre  $0.3$  et  $1.3 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) entre les stations, qui sont de fait peu contrastées pour ce critère.



**Figure 18** – Représentation des  $CE_{10}$  calculées à partir de la PAM fluorescence en fonction des concentrations en cuivre mesurées dans le milieu aux dates des expérimentations, toutes stations confondues. Seules sont représentées les  $CE_{10} < 1000 \mu\text{g.L}^{-1}$  (65 valeurs sur les 68 calculées).

Pour tenter de mieux comprendre le lien éventuel entre les valeurs de  $CE_{10}$  obtenues et les communautés, une analyse de type « Non-metric MultiDimensional Scaling (NMDS) » a été réalisée à partir des abondances des sous-communautés mesurées dans l'environnement au niveau des stations 2, 3 et 4 aux dates des expérimentations PICT (Figure 19). Cette analyse permet de mettre en évidence les dissimilarités entre les abondances des sous-communautés pour l'ensemble des dates considérées.

L'analyse, paramétrée pour une représentation des données sur deux axes uniquement, indique un stress de 7 %, ce qui correspond à un bon ajustement entre les dissimilarités initiales et les distances de Bray-Curtis dans l'espace de représentation (l'idéal étant un stress inférieur à 5 %, Kruskal, 1964). Trois groupes de dates se distinguent : à droite les quatre dates identifiées avec des  $CE_{10}$  supérieures à  $100 \mu\text{gCu.L}^{-1}$  dans la zone du graphique à l'opposé du micro-phytoplancton. Il s'agit de prélèvements de la station 2 dans lesquels aucune espèce de micro-phytoplancton n'a été dénombrée, excepté un groupe de nanoflagellés non identifiés en juillet 2012 ; en partant de l'hypothèse suggérée précédemment (contribution plus importante du micro-phytoplancton aux mesures de PAM-fluorescence), cela peut aussi expliquer que les valeurs de  $CE_{10}$  calculées à ces dates soient fortes. En effet dans ce cas, les mesures réalisées sont proches du seuil de détection de l'appareil, qui ne permet plus de discriminer les effets de façon optimale.

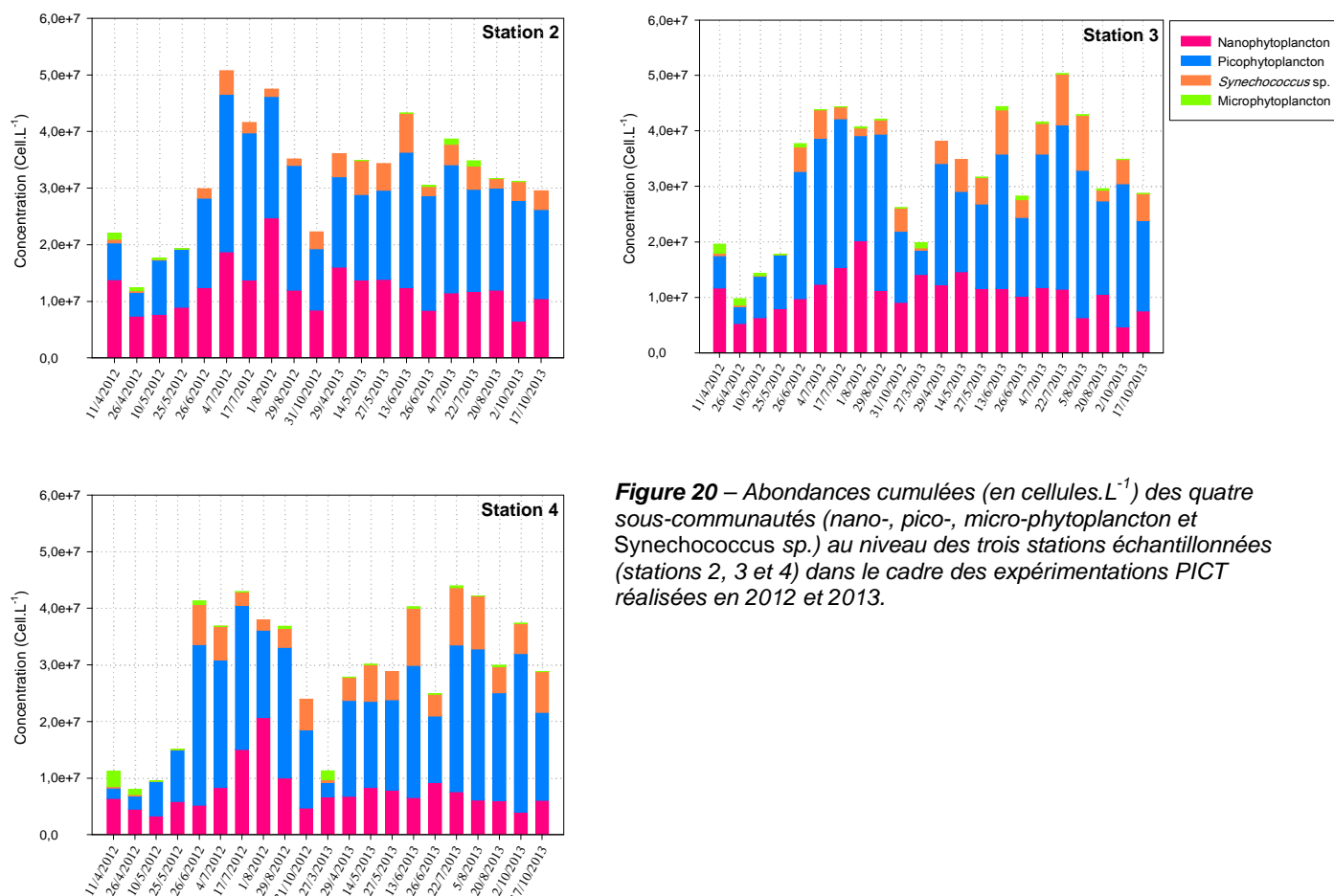


**Figure 19** – Non-metric MultiDimensional Scaling (NMDS) illustrant les dissimilarités de composition des différentes communautés de phytoplancton (en abondances) aux dates (année et mois : aa-mm) correspondant aux expérimentations PICT (cuivre). Le code couleur affecté à chaque date correspond à la classe de  $CE_{10}$  renseignée en légende. Le positionnement des différentes communautés sur chaque dimension est indiqué en vert.

Au centre, un groupe comportant la plupart des dates est visible, avec un mélange de  $CE_{10}$  basses (< 20), intermédiaires (20-100) et élevées (> 100) : ce groupe semble davantage lié aux abondances de nano-, pico-phytoplancton et *Synechococcus* sp., mais est aussi influencé dans la zone négative par le micro-phytoplancton.

Un troisième groupe se détache dans le quart supérieur gauche, formant une diagonale partant de (-0.2 ; 0) jusqu'à (0 ; 0.13). Ce dernier groupe est le plus intéressant car il fait apparaître des dates aux valeurs de  $CE_{10}$  faibles et intermédiaires, obtenues au cours des expérimentations réalisées en avril et mai 2012. Ce groupe est opposé aux *Synechococcus* sp. : comme cela a déjà été évoqué dans le paragraphe 3.2.2.5 « Effet de la contamination chimique » avec la Figure 15, les *Synechococcus* sp. sont extrêmement peu abondants pendant cette période. Le groupe de valeurs tend également à s'opposer au micro-phytoplancton, cette opposition s'accroissant d'avril à mai. Sur cette période, le micro-phytoplancton se trouve dans une dynamique de forte décroissance suite à une efflorescence survenue en mars. L'analyse détaillée de la composition des communautés (abondances et espèces pour le micro-phytoplancton) aux dates figurant dans ce dernier groupe peut être proposée pour essayer de mettre en relation les résultats des expérimentations avec les paramètres du milieu.

L'abondance de la communauté phytoplanctonique dans son ensemble montre deux périodes distinctes en 2012, plus marquées vers l'aval : d'avril à fin mai, l'abondance est faible (entre 10 et 20 millions de cellules.L<sup>-1</sup>) comparé à la deuxième partie de l'année où les valeurs sont autour de 40 millions de cellules.L<sup>-1</sup> en moyenne (Figure 20). Au niveau des sous-communautés, le nano- et le pico-phytoplancton voient leur abondance augmenter fortement d'avril jusqu'à la fin de l'été, alors que l'abondance du micro-phytoplancton diminue de mars à fin mai puis reste à des niveaux relativement bas par rapport aux autres communautés. Les *Synechococcus* sp., comme déjà décrit, sont quasiment absents jusque fin mai. Cette dynamique n'est pas semblable en 2013 où l'abondance totale oscille entre 30 et 40 millions de cellules.L<sup>-1</sup> toute l'année sauf fin mars aux stations avales (3 et 4). Il n'existe pas de périodes distinctes comme cela a été décrit pour l'année 2012. Les abondances des sous-communautés au cours du temps sont également plus homogènes : celles du nano-phytoplancton varient peu ; celles du pico-phytoplancton sont assez élevées tout au long de l'année sauf en mars ; les abondances des *Synechococcus* sp. comportent des variations plus importantes entre les mois, avec une valeur très faible en mars ; enfin, le micro-phytoplancton montre une efflorescence en mars aux stations 3 et 4, puis il reste peu abondant par rapport aux autres sous-communautés. L'étude des abondances de la communauté dans son ensemble et celles des sous-communautés ne laisse entrevoir aucun lien avec les valeurs de  $CE_{10}$ , qu'elles soient basses ou élevées.

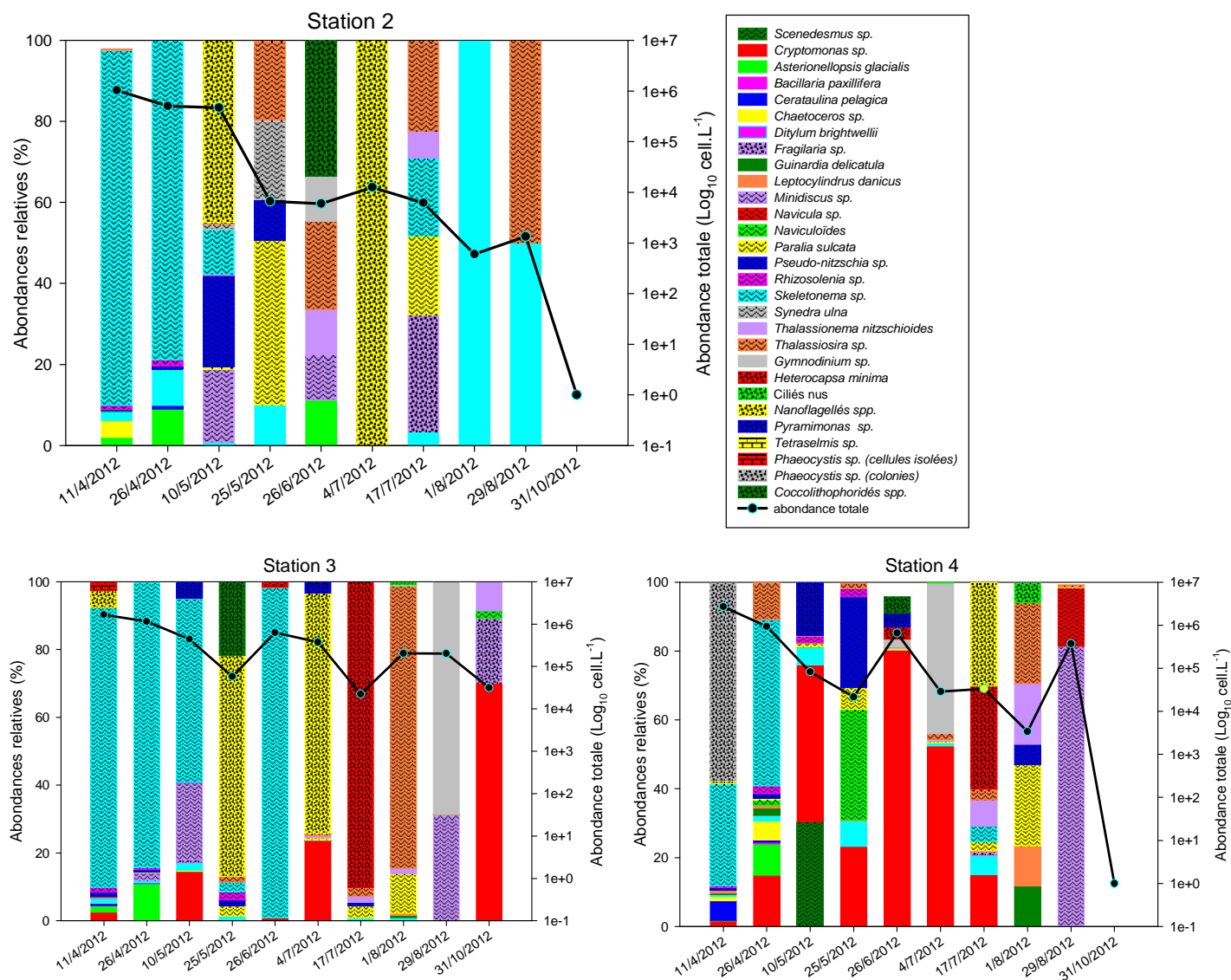


**Figure 20** – Abondances cumulées (en cellules.L<sup>-1</sup>) des quatre sous-communautés (nano-, pico-, micro-phytoplancton et *Synechococcus* sp.) au niveau des trois stations échantillonnées (stations 2, 3 et 4) dans le cadre des expérimentations PICT réalisées en 2012 et 2013.

L'étude détaillée de la composition spécifique du micro-phytoplancton fait ressortir la prédominance d'un nombre réduit de taxons, ainsi le début du printemps 2012 se caractérise par la présence de trois groupes dominants : les nanoflagellés et le genre *Skeletonema* sp. en amont, les stations avalées étant dominées par *Skeletonema* sp. et *Phaeocystis* sp. (Figure 21). D'autres taxons/groupes apparaissent ensuite : les successions sont marquées par une alternance entre des périodes où les communautés sont diversifiées (station 2 : fin mai, fin juin, mi-juillet ; station 4 : fin avril, fin mai, mi-juillet et début août) sauf pour la station 3 qui comporte le plus souvent un ou deux taxons majoritaires, et des périodes où les communautés sont quasiment monospécifiques. Ainsi différentes diatomées sont prédominantes à la station 2 (*Skeletonema* sp., *Paralia sulcata*, *Thalassiosira* sp.) alors que la station 3 où *Skeletonema* sp. est très présente au printemps, comporte également d'autres diatomées (*Minidiscus* sp.), des cryptophytes (*Cryptomonas* sp.), et des dinoflagellés potentiellement toxiques (*Heterocapsa minima*, *Gymnodinium* sp.). La station 4 est globalement plus diversifiée et est souvent dominée par *Cryptomonas* sp., les dinoflagellés (*Heterocapsa minima*, *Gymnodinium* sp.) et les diatomées *Minidiscus* sp., *Thalassiosira* sp. et des naviculoïdes. La composition spécifique des trois stations ne semble pas présenter des profils particuliers aux dates des expérimentations PICT auxquelles les valeurs de CE<sub>10</sub> les plus extrêmes ont été obtenues.

Le début de l'année 2013 est marqué par une absence de la communauté micro-phytoplanctonique au niveau de la station 2 en avril (Figure 22). En mai et début juin, les communautés, quasiment monospécifiques, voient se succéder *Pseudopedinella pyriformis*, *Nitzschia sigma* et *Guinardia delicatula* ; des communautés plus diversifiées apparaissent fin juin début juillet avec *Cryptomonas* sp., *Minidiscus* sp. et *Skeletonema* sp.. Les dinoflagellés (*Heterocapsa minima*, *Gymnodinium* sp. et *Scrippsiella* sp.) sont plus présents en deuxième partie d'année, accompagnés en fin d'été et début d'automne par *Cryptomonas* sp.. La communauté de mi-octobre est composée de *Minidiscus* sp. et *Thalassiosira* sp. Les stations 3 et 4, plus marines, sont composées en début de printemps par des diatomées *Skeletonema* sp. et *Paralia sulcata*, avec aussi pour la station 3 une forte présence de ciliés et nanoflagellés. *Guinardia delicatula* prédomine aussi sur ces stations en juin ; la station 3 est également occupée par *Cryptomonas* sp., *Gymnodinium* sp., *Heterocapsa minima*, et une

communauté peu diversifiée et totalement différente intervient en octobre (*Thalassiosira* sp. et naviculoïdes). La station 4 est plus diversifiée en milieu d'année, quelques genres prédominent en fin d'été et début d'automne : *Gymnodinium* sp., *Cryptomonas* sp., *Lithodesmium undulatum* et *Skeletonema* sp..

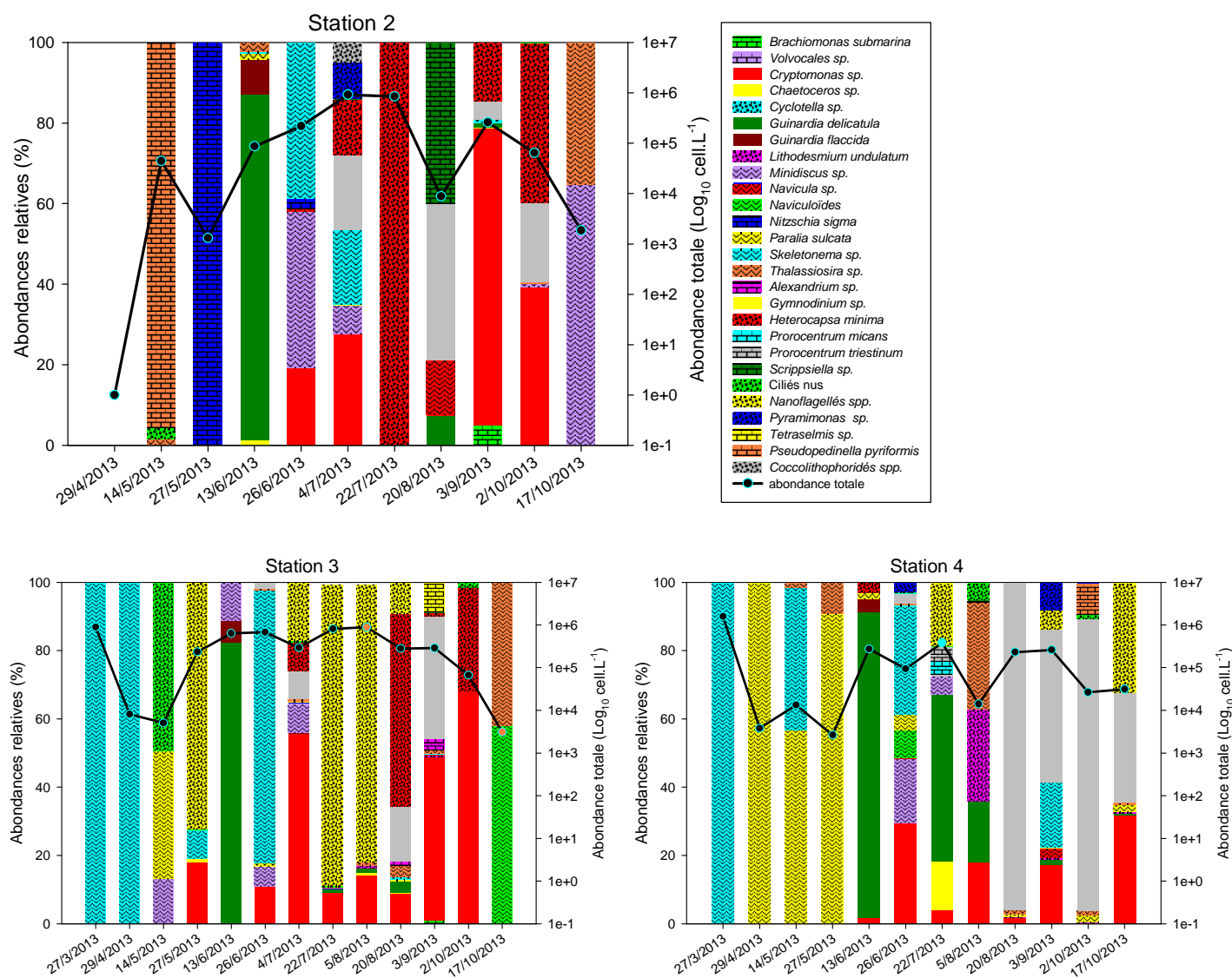


**Figure 21** – Composition spécifique (abondances relatives en %) des stations 2, 3 et 4 en 2012 aux dates des expérimentations PICT. Seules sont représentées les espèces dont les abondances relatives représentent au moins 3 % dans au moins l'un des prélèvements. La courbe représente les abondances totales (cellules.L<sup>-1</sup>) en échelle logarithmique (axe de droite).

Des valeurs de CE<sub>10</sub> plus basses avaient été calculées à l'issue des expérimentations PICT menées en 2012, par rapport aux valeurs calculées en 2013. L'exploration des profils taxonomiques des communautés, très complexe, ne semble pas mettre en évidence d'éléments qui pourraient expliquer cette différence entre les résultats. En particulier, la présence d'espèces dominantes identiques à des dates où des valeurs de CE<sub>10</sub> contrastées ont été obtenues (exemple : station 2 le 11/04/2012 : CE<sub>10</sub> = 580 µgCu.L<sup>-1</sup>, 88 % de *Skeletonema* sp. et 26/04/2012 : CE<sub>10</sub> = 16 µgCu.L<sup>-1</sup>, 79 % de *Skeletonema* sp.; même type d'exemple avec une dominance de *Cryptomonas* sp.) laisse penser que la réponse des communautés exposées au cuivre dans la présente étude ne saurait dépendre de leur composition spécifique.

L'hypothèse d'une sensibilité différente selon les genres/espèces de micro-algues peut être avancée pour expliquer la variabilité des résultats obtenus lors de l'exposition des communautés à des contaminants. La sensibilité des organismes au sein d'une même espèce peut également varier selon l'état physiologique de ceux-ci, mais également en fonction des conditions du milieu dans lequel ils évoluent et de la saison/période de l'année à laquelle ils subissent l'exposition. Il convient donc prendre en compte non seulement des

variables biologiques pouvant intervenir dans la réponse d'une communauté à un toxique, mais également du contexte environnemental dans lequel cette communauté évolue.



**Figure 22** – Composition spécifique (abondances relatives en %) des stations 2, 3 et 4 en 2013 aux dates des expérimentations PICT. Seules sont représentées les espèces dont les abondances relatives représentent au moins 3 % dans au moins l'un des prélèvements. La courbe représente les abondances totales (cellules.L<sup>-1</sup>) en échelle logarithmique (axe de droite).

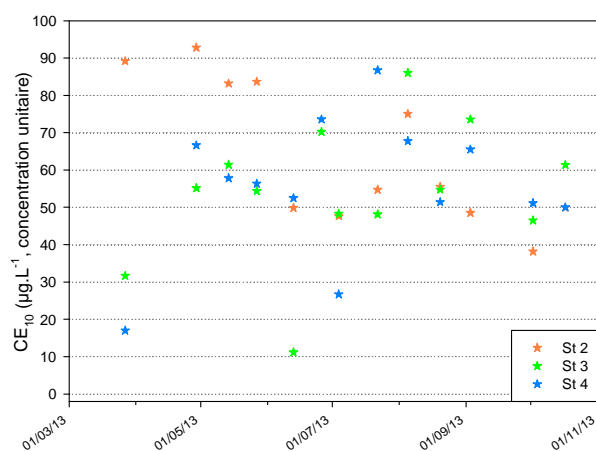
### 3.3.3. Effets des pesticides

Pour rappel, le mélange testé en 2012 (A) était composé de trois herbicides : glyphosate (inhibition de l'EPSP synthèse), métolachlore (inhibition des élongases et des géranyl-pyrophosphate (GGPP) cyclases) et mésotrione (inhibition de l'enzyme 4-hydroxy-phényl-pyruvate-dioxygénase localisée dans le chloroplaste) ; le mélange testé en 2013 (B) contenait quant à lui quatre herbicides : glyphosate, S-métolachlore (mode d'action similaire au métolachlore), diméthénamide (mode d'action similaire au métolachlore) et métamitron (inhibition de la photosynthèse par blocage de la protéine D1 du photosystème II). L'objectif de cette partie était de déterminer l'existence éventuelle d'une tolérance des communautés aux molécules présentes dans le milieu. La gamme de concentrations testées pour les mélanges d'herbicides était donc nettement moins élevée que pour le cuivre. Ainsi, les concentrations testées étaient comprises entre 0.1 µg.L<sup>-1</sup> et 100 µg.L<sup>-1</sup> (en concentrations unitaires, c.u.).

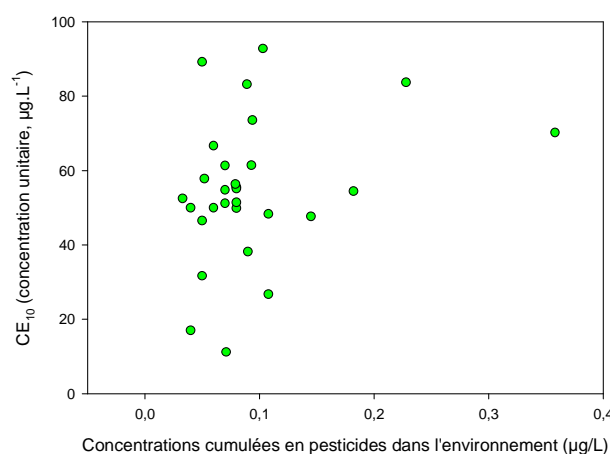
Bien que les résultats obtenus suite à l'exposition des communautés au cuivre et aux herbicides soient présentés séparément dans ce rapport, il convient de rappeler que ces deux types de contaminants étaient testés systématiquement en même temps au cours d'une seule expérimentation. Les mesures ont été effectuées sur les mêmes paramètres lors des expositions.

Le mélange A (2012) n'a permis de mettre en évidence aucun effet significatif sur les communautés, aucune  $CE_{10}$  n'a donc pu être calculée. Cela semble indiquer une relative insensibilité des communautés au mélange de molécules testé. Une période de « vulnérabilité » avait pourtant été identifiée au printemps 2012, où les différentes sous-communautés semblaient particulièrement sensibles au cuivre. Les conditions qui ont conduit à ces réponses face au cuivre ne paraissent pas avoir fragilisé les communautés vis-à-vis des molécules présentes dans le mélange d'herbicides.

Le mélange B testé en 2013, sensiblement différent, a quant à lui entraîné des effets significatifs à chaque expérimentation et de façon relativement peu variable sur les mesures d'efficacité de photosynthèse à  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$  (c.u.). Sur les 13 expérimentations réalisées en 2013, 38 valeurs de  $CE_{10}$  ont été calculées, de 11 [1 ; 49] à 93 [78 ; 102]  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (c.u.). Aucune des mesures réalisées par cytométrie en flux n'a montré de différence significative entre les traitements. Les communautés semblent donc relativement peu sensibles à ce mélange : parmi elles les sous-communautés de petite taille (nano-, pico-phytoplancton et *Synechococcus* sp.) n'ont subi aucun effet sur les densités cellulaires et la fluorescence liée à la chlorophylle. Comparé au mélange testé en 2012, il peut être avancé que les effets mesurés en 2013 sur l'efficacité de photosynthèse sont probablement imputables à l'action du métamitron, inhibiteur de la photosynthèse. L'analyse des distributions des valeurs de  $CE_{10}$  n'ont mis en évidence aucune différence significative entre les stations (Kolmogorov-Smirnov,  $p > 0.05$ , données non représentées). Parmi l'ensemble des valeurs calculées, il ne ressort aucune tendance particulière liée à la saisonnalité (Figure 23). Seules quatre valeurs se détachent du nuage principal, fin mars (17 et 32  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , c.u.), mi-juin (11  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , c.u.) et début juillet (27  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , c.u.), sans toutefois correspondre à des niveaux de concentrations en pesticides retrouvés dans le milieu. De la même manière que pour le cuivre, la confrontation des  $CE_{10}$  calculées avec les concentrations en pesticides mesurées dans le milieu ne permet pas d'établir un lien significatif (Figure 24).



**Figure 23** –  $CE_{10}$  ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ , concentrations unitaires) obtenues à partir de la PAM fluorescence au cours de l'année 2013 pour les communautés des trois stations.



**Figure 24** – Représentation des  $CE_{10}$  calculées à partir de la PAM fluorescence en fonction des concentrations cumulées en pesticides mesurées dans le milieu aux dates des expérimentations, toutes stations confondues.

Les herbicides testés au cours du projet semblent présenter une toxicité relativement modérée, voire faible au regard des paramètres mesurés, comparé au cuivre. Cette toxicité est peu variable, il peut être suggéré que le mélange agit de façon homogène sur les différents composants de la communauté micro-phytoplanctonique, sans influence particulière des paramètres fluctuants de l'environnement.

### 3.4. Tolérance des communautés ?

Les expérimentations PICT réalisées sur des communautés phytoplanctoniques prélevées en trois points de l'estuaire de la Charente avaient pour objectif de déterminer l'existence éventuelle d'une tolérance des communautés aux phytosanitaires présents dans le milieu. Les deux types de contaminants testés, le cuivre et

des herbicides en mélange, ont abouti à des résultats contrastés au cours des 24 expérimentations réalisées en 2012 et 2013. Les réponses des communautés exposées ont été évaluées sur différents paramètres ciblant soit la communauté photosynthétique dans son ensemble (efficacité de photosynthèse par PAM-fluorescence), soit des sous-communautés (abondance et contenu relatif en chlorophylle par cytométrie en flux).

Les mesures effectuées sur les communautés exposées au cuivre ont permis de mettre en évidence :

- une toxicité du cuivre sur la communauté dans son ensemble et sur les communautés de petites cellules (nano-phytoplancton, pico-phytoplancton et *Synechococcus* sp.) ;
- une contribution plus importante du micro-phytoplancton aux réponses mesurées par PAM-fluorescence ;
- aucune variation spatiale de la sensibilité, ce qui correspond probablement à un manque de contraste entre les stations, tant au niveau biologique que physico-chimique (faible gradient de contamination chimique) ;
- aucune variation temporelle de la sensibilité au sein d'une même année : pas d'effet lié à la saisonnalité ;
- une différence significative entre les niveaux de réponses ( $CE_{10}$ ) mesurés en 2012 (principalement au printemps et début d'été) et en 2013, ces derniers étant globalement plus élevés : les communautés exposées au cuivre en 2012 ont donc montré une sensibilité plus importante que celles exposées en 2013 ;
- aucun lien évident entre les valeurs de toxicité, la contamination chimique, les abondances et la composition des communautés phytoplanctoniques.

Le cuivre présente une toxicité avérée pour les communautés phytoplanctoniques. L'utilisation de la cytométrie en flux a permis de montrer une sensibilité accrue chez les petites communautés du genre *Synechococcus* sp. qui peuvent être touchées à des concentrations proches de celles mesurées dans l'environnement. Une période de plus forte sensibilité a été mise en évidence en 2012 sans que les facteurs aggravants aient pu être identifiés.

Les mesures effectuées sur les communautés exposées à deux mélanges d'herbicides ont montré :

- aucun effet du mélange A testé en 2012 ;
- des effets relativement constants, correspondant à une faible toxicité, après exposition au mélange B en 2013 : pas de variation liée aux stations ni aux saisons ;
- une toxicité sur le micro-phytoplancton uniquement, probablement imputable au métamitron, inhibiteur de la photosynthèse ;
- aucun lien évident entre les valeurs de toxicité, la contamination chimique, les abondances et la composition des communautés phytoplanctoniques.

Les herbicides testés sous forme de substances pures n'ont montré qu'une faible toxicité sur les communautés phytoplanctoniques, principalement sur le micro-phytoplancton. La période de vulnérabilité au cuivre identifiée en 2012 n'a pas constitué un facteur fragilisant les communautés face aux herbicides. Les mesures effectuées n'ont pas permis de mettre en évidence une sensibilité particulière du phytoplancton aux concentrations environnementales des herbicides testés.

La pertinence de l'approche mise en oeuvre au cours du projet TOPHYPAC est validée ici par les résultats obtenus avec le cuivre, qui démontrent la toxicité potentielle de cet élément trace à de faibles concentrations. Le nombre d'expérimentations réalisées conforte également les résultats obtenus puisque la variabilité des réponses des communautés a pu être étudiée sur un ensemble de paramètres en ciblant différents éléments au cours de deux années. En comparaison, les résultats issus des expositions aux deux mélanges d'herbicides pourraient être perçus comme moins intéressants car ils ne démontrent pas de réelle atteinte des communautés aux concentrations retrouvées dans l'environnement. Cependant, il faut garder à l'esprit que l'une des difficultés majeures des approches sur les communautés consiste tout d'abord au choix du ou des paramètres à mesurer pour évaluer un effet. Ici, le panel d'outils permettant des mesures sur les communautés

phytoplanctoniques compatibles avec de telles expérimentations est relativement limité. Même s'il est recommandé de cibler des mesures qui correspondent au mode d'action des contaminants testés, dans la pratique les techniques adaptées ne sont pas forcément disponibles. Pour les micro-algues par exemple, le paramètre le plus utilisé dans les études PICT est lié au processus de la photosynthèse (Blanck, 2002). Dans le cas présent, la mesure de l'efficacité de photosynthèse était parfaitement compatible avec l'action du cuivre sur le photosystème, mais pas avec les modes d'action des herbicides testés en mélange (à l'exception du métamitron présent uniquement dans le mélange B en 2013). Cela peut contribuer à expliquer l'absence de résultats significatifs obtenus en 2012, sans toutefois laisser supposer que d'autres types d'effets auraient pu intervenir : en effet, les autres paramètres exploités *via* la cytométrie en flux n'ont permis de voir aucun effet des deux mélanges. Il est envisageable que les herbicides présents dans le mélange dont le glyphosate et le S-métolachlore, représentatifs des herbicides présents en continu dans le milieu sur les premiers mois de l'année, exercent une faible toxicité sur les communautés phytoplanctoniques. Cependant dans le cas présent, les différents herbicides ont été testés en mélanges de molécules pures ; en pratique, ils sont utilisés en formulation commerciale, associés avec des adjuvants dont l'influence peut conduire à une amplification de leur toxicité (IPEM, 2007). La difficulté de ces tests réside alors dans l'incrimination de la source ayant conduit aux effets mesurés.

L'ensemble des résultats obtenus au cours des expérimentations PICT n'a pas permis de démontrer une réponse différentielle des communautés/sous-communautés selon le gradient amont-aval ou les saisons, que ce soit pour le cuivre ou les herbicides : le concept de tolérance lui-même n'est pas supporté par les données produites. Deux éléments peuvent expliquer ce constat : en premier lieu, il est possible que la stratégie d'échantillonnage définie n'ait pas permis d'avoir une « vraie » station de référence à partir de laquelle la tolérance de base, qui correspond à des communautés non affectées par la contamination chimique, aurait pu être déterminée (Blanck, 2002). De ce fait, il est impossible de savoir si les réponses observées au niveau du site d'étude correspondent à celles de communautés ayant déjà été modifiées/sélectionnées par l'action des contaminants étudiés. L'étendue et la dynamique de la zone estuarienne rendent particulièrement difficile, d'un point de vue environnemental et logistique, la définition d'une telle station : c'est pourquoi le compromis a été de choisir une masse d'eau sous influence marine et compatible avec les expérimentations en termes de distance et de temps de navigation. Dans la même logique, l'approche mise en oeuvre a pu souffrir du peu de contraste entre les stations de l'amont et de l'aval au vu du faible gradient de la contamination chimique par les herbicides et le cuivre. Il peut être suggéré que dans le contexte de cette étude, la sensibilité des communautés aux contaminants soit avant tout conditionnée par les fortes variations des paramètres physico-chimiques tels que la température, la salinité et certains nutriments, les contaminants intervenant alors comme des facteurs de stress supplémentaires.

## 4. Conclusion et perspectives

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

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



maximal à ne pas dépasser dans les eaux potables. Les valeurs de cuivre dissous mesurées au cours de cette étude sont comprises entre 0.31 (aval) et 1.32  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (amont), ce qui correspond à des valeurs moyennes par rapport à d'autres estuaires (Chiffolleau et al., 2001b).

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

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

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

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

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

Le milieu estuarien est une zone d'interface relativement complexe à appréhender, sous l'influence des apports d'eau douce continentale et d'eau marine du large. Ces apports induisent de forts gradients physico-chimiques qui interviennent comme autant de contraintes dans la structuration des communautés phytoplanctoniques. Celles-ci représentent la ressource trophique principale des bivalves exploités, qui concentrent de forts enjeux socio-économiques et environnementaux au niveau du bassin de Marennes-Oléron. Ainsi, les différentes sous-communautés phytoplanctoniques, par leurs abondances mais aussi la taille des cellules, sont consommées préférentiellement en fonction du stade de vie des bivalves. Le développement des communautés conditionne la capacité trophique du milieu et sa productivité, c'est pourquoi il est important de pouvoir évaluer les risques qui peuvent peser sur cette ressource. La contamination chimique par les pesticides notamment est soupçonnée de jouer un rôle sur la quantité et la qualité de cette ressource trophique, mais aussi sur les consommateurs tels que les bivalves. Si les pesticides testés dans ce projet ne semblent pas induire d'effets sur les communautés suite à une sur-exposition à des concentrations

environnementales, il n'en reste pas moins que la contamination par le cuivre pourrait les fragiliser dans certaines conditions. L'utilisation de cet élément trace métallique en viticulture et en agriculture biologique pourrait constituer une source d'inquiétude nécessitant un suivi régulier de la contamination du milieu aquatique.

## 5. Acquis en termes de transfert

Les possibilités de transfert offertes par ce projet concernent surtout le partage et la diffusion des résultats pour une meilleure connaissance de ce milieu particulier qu'est l'estuaire de la Charente ; les données produites peuvent ainsi être intégrées dans la base nationale Quadrige<sup>2</sup> dédiée à la surveillance de l'environnement côtier, qui souffre du manque de données concernant la contamination chimique du milieu par les pesticides. Cette base commune à plusieurs structures de recherche, couvre l'ensemble du domaine côtier français et sert à la surveillance, la compréhension et la modélisation du fonctionnement des écosystèmes côtiers.

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

## 6. Valorisation

En raison de la nature de ce projet qui était avant-tout une étude de terrain, la totalité des résultats n'a été disponible que fin mars 2014 : la priorité a été mise sur le traitement des données nécessaire à la rédaction du rapport final. La rédaction des publications scientifiques est donc l'étape suivante de ce travail. Trois publications sont prévues :

Un premier article traitera de la contamination chimique de l'estuaire et sera intitulé : « Charente estuary contamination with pesticides and metals : a three-year survey ». Il pourra être soumis à la revue *Marine pollution bulletin* par exemple.

Un deuxième article sera soumis à la revue *Environmental Science and Pollution Research* en décembre 2014 dans le cadre d'un numéro spécial « écotoxicologie microbienne » suite à la présentation des résultats de TOPHYPAC au cours des Journées d'écotoxicologie microbienne à Banyuls-sur-mer en mai 2014 : il portera sur l'évolution des communautés phytoplanctoniques dans l'estuaire de la Charente.

Un troisième article sera soumis à la revue *Aquatic toxicology* et portera sur les expérimentations sur communautés naturelles exposées au cuivre et aux herbicides.

## 7. Annexes

### 7.1. Compléments de méthodologie

#### 7.1.1. Mesures *in situ*

La température et la salinité ont été mesurées avec une sonde multi-paramètres NKE tps pour la station 1 avec des systèmes de transmission temps-réel et une protection antifouling (chloration localisée, Ifremer ©), et avec une sonde multi-paramètres YSI 6600 pour les autres stations. La turbidité a été mesurée au laboratoire avec un turbidimètre Hach 2100 Afnor 7027. L'ensemble des appareils était raccordé aux étalons internationaux reconnus dans une démarche de qualité (norme ISO CEI 17025), dans des entités accréditées par le COFRAC.

#### 7.1.2. Calculs du flushing time et de l'énergie solaire

##### 7.1.2.1. Flushing-time

Le flushing-time correspond au temps de résidence des masses d'eaux dans une zone déterminée : en zone estuarienne, cette variable dépend du débit d'eau douce du fleuve et du volume d'eau salée apporté par la marée.

Différentes méthodes de calcul du flushing-time existent. L'estuaire de la Charente se situant en zone macro-tidale, la méthode du prisme tidal a été privilégiée. Dans cette méthode, l'approximation est faite que le mélange entre l'eau douce et l'eau de mer est complet (Dyer 1997). Malgré cette approximation, cette méthode reste une façon simple de prendre en compte l'effet de l'hydrodynamique sur les communautés phytoplanctoniques (Ferreira et al., 2005 ; Peierls et al., 2012 ; Paerl et al., 2014). Le calcul a été réalisé d'après la formule suivante, utilisée par Sheldon et Alber (2006) :

$$\tau = \frac{V}{Q_{FW} + Q_{SW}}$$

où V : Volume total de la section considérée de l'estuaire (m<sup>3</sup>)

Q<sub>FW</sub> : Débit d'eau douce par unité de temps (m<sup>3</sup>/t)

Q<sub>SW</sub> : Quantité d'eau mer entrant dans la section par unité de temps (m<sup>3</sup>/t)

Les calculs se sont appuyés sur (1) la bathymétrie de la Charente établie par l'Ifremer (Le Moine, O. et Geairon, P., 2013) permettant de déterminer, pour chaque coefficient de marée, le volume à haute mer et à basse mer pour la section du fleuve comprise entre les stations Lupin et Fontenelles, et (2) les débits de la Charente à Chanier (station R5200010 / source Eaufrance <http://www.hydro.eaufrance.fr>) dont l'effet se ressent à l'échelle d'une journée. Le flushing-time de la section du fleuve considérée a été défini sur la base de temps d'une marée, correspondant à 12h25mn.

##### 7.1.2.2. Énergie solaire

La lumière étant capitale pour la production primaire, la photopériode<sup>4</sup> et l'intensité lumineuse naturelle sont des éléments indispensables à prendre en compte pour évaluer les variables forçantes de l'évolution du phytoplancton. En outre, les importantes quantités de matière en suspension jouent également un rôle prépondérant pour l'accès à la lumière des organismes photosynthétiques. De ce fait, la profondeur de la zone euphotique et le rayonnement solaire ont été calculés.

<sup>4</sup> Données à Paris d'après <http://www.lecalendrier.fr/calendrier-solaire>

La profondeur de la zone euphotique a été estimée à partir de la relation utilisée par Gameiro *et al.* (2011) et Pierson *et al.* (2008) :  $Z_{Eup} = 4.6K_{par}$

où le coefficient d'atténuation de la lumière ( $K_{par}$ ) a été calculé à partir de l'équation établie par Struski (2005) à l'issue de mesures de terrain en différentes stations du bassin de Marennes-Oléron :  $K_{par} = 0.154MES^{0.66}$

où les matières en suspension (MES) ont été déterminées à partir des échantillons de chaque station à chaque campagne d'échantillonnage.

Ces résultats ont été confrontés à ceux calculés d'après la relation établie par Kirk (1985).

Le rayonnement solaire (en radiations photosynthétiques actives, dites PAR) disponible à 1 mètre de profondeur a été calculé à partir du rayonnement global (données journalières à la station La Rochelle Aéroport de Météo France) et du coefficient d'atténuation (calculé ci-dessus) d'après la formule utilisée par Kirk (1985), Peperzak (1993) ou encore Gameiro *et al.* (2011) :  $E_Z = E_0 \exp^{-K_{par}Z}$

où –  $E_0$  correspond au rayonnement reçu à la surface de la masse d'eau (estimé ici à partir des données de rayonnement global de la station Rochelaise de MétéoFrance transformées en radiations photosynthétiques actives grâce à l'équation  $I_{par} = 0.45I$  stipulée dans Meek *et al.* (1984), Peperzak (1993) ou Udo *et al.* (1999).

–  $K_{par}$  correspond au coefficient d'atténuation

–  $Z$  est la profondeur de la couche d'eau pour laquelle on souhaite déterminer le rayonnement (ici 1 mètre correspondant à la profondeur d'échantillonnage).

### 7.1.3. Analyses chimiques

#### 7.1.3.1. Sels nutritifs, carbone organique dissous (DOC), azote total (TN), chlorophylle a

Les nutriments ( $NH_4^+$ ,  $NO_3^-$ ,  $NO_2^-$ ,  $PO_4^{3-}$ ,  $SiO_3^-$ , Urée) ont été analysés en flux continu segmenté, et quantifiés par absorption moléculaire, excepté pour l'ammonium qui a été mesuré par fluorescence. La chaîne analytique SKALAR utilisée, est équipée de détecteurs photométriques à correction de matrice de dernière génération, permettant de s'affranchir des effets de sels, ainsi que d'un détecteur fluorimétrique pour la mesure de l'ammonium. Les quantités de DOC et de TN ont été déterminées simultanément dans les échantillons par oxydation catalytique à haute température (HTCO). L'appareillage utilisé est le TOC-V couplé avec le détecteur d'azote TNM-1 (Shimadzu). Le carbone a été mesuré par infrarouge non dispersif (NDIR) et l'azote par un détecteur de chimiluminescence. La chlorophylle a a été mesurée par fluorimétrie avec un fluorimètre Turner 20 Au. Les protocoles analytiques ont été développés par Aminot et Kérouel (2004) et sont utilisés de manière régulière par les laboratoires d'Ifremer.

#### 7.1.3.2. Métaux

Pour l'analyse des métaux dissous (cuivre, nickel, zinc, cadmium) (Chiffolleau *et al.*, 2001a ; 2002), les échantillons ont été extraits de leur matrice salée par extraction liquide-liquide et pré-concentrés de l'ordre de 100 fois, selon la méthode décrite par Danielsson *et al.* (1982). Ils ont été dosés par ICP-MS (THERMO-ELECTRON X-series).

#### 7.1.3.3. Pesticides

L'analyse de 105 multi-résidus (liste en annexe 7.2) a été effectuée par extraction des résidus par partage liquide/liquide avec un mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle. Le principe est basé sur la polarité des produits phytosanitaires en fonction de leur coefficient de partage octanol/eau. Le dosage des résidus a ensuite été réalisé par chromatographie liquide ou gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en tandem.

L'analyse du glyphosate et de son métabolite l'AMPA a été réalisée après élimination des ions multivalents et dérivation des composés par le chloroformiate de méthyle (FMOC-Cl) suivie d'une concentration et d'une purification. L'extrait obtenu a été analysé par chromatographie en phase liquide sur colonne de type amino couplée à un spectrofluorimètre.

## 7.2. Annexe : liste des multi-résidus

2, 4 MCPA	diclofop methyl	mesotrione
2,4 D	diflufenican	metalaxyl et metalaxyl M
2,4 DB	dimethachlore	metamitron
2,4 MCPB	dimethenamide	metazachlore
acetochlore	dimethomorphe	metconazole
aclonifen	dithianon	methiocarbe
azoxystrobine	diuron	metholachlore
benalaxyl	epoxiconazole	metrafenone
benoxacor	ethoprophos	myclobutanil
bentazone	fenhexamide	napropamide
bifenox	fenoxaprop-p-ethyl	oryzalin
boscalid	fenpropimorphe	oxadiazon
bromoxynil	fluazifop-P-butyl	oxyfluorfe
bromuconazole	fluazinam	pendimethaline
carbendazime	fludioxonil	pirimicarbe
carbetamide	flufenacet	prochloraze
carbofuran	fluoxastrobine	propachlore
carbosulfan	flurochloridone	propiconazole
carboxine	fluroxypyr	propyzamide
carfentrazone ethyl	flurtamone	prosulfocarbe
chlorothalonil	flusilazole	pyraclostrobine
chlorotoluron	imidaclopride	pyrimethanil
chlorpyriphos ethyl	iodosulfuron methyl sodium	quinoxifene
chlorpyriphos methyl	ioxynil	spiroxamine
clethodime	iprodione	sulcotrione
clodinafop-propargyl	iprovalicarbe	tau fluvalinate
clomazone	isoproturon	tebuconazole
cycloxydime	isoxaben	tetraconazole
cymoxanil	isoxaflutole	thifensulfuron methyl
cypermethrine	kresoxim methyl	thiophanate methyl
cyproconazole	linuron	triallate
cyprodinil	mecoprop	triclopyr
dicamba	mefenpyr diethyl	trifloxystrobine
dichlorprop-p	mesosulfuron methyl	trifluraline
		zoxamide

### **7.3. CE<sub>10</sub> extrapolées par Regtox**

**Tableau 5** – Valeurs de  $CE_{10}$  ( $\mu\text{gCu.L}^{-1}$ ) et intervalles de confiance à 95 % obtenus sur les abondances de bactéries hétérotrophes

Bactéries ( $\text{cell.mL}^{-1}$ )				
Date	Station	$CE_{10}$ ( $\mu\text{gCu.L}^{-1}$ )	$IC_{95\%}$ inf.	$IC_{95\%}$ sup.
28/03/2012	2			
11/04/2012				
26/04/2012		4 167,22	3 306,32	5 388,06
10/05/2012				
25/05/2012		330,61	101,92	890,81
26/06/2012				
04/07/2012				
17/07/2012				
01/08/2012		936,55	758,40	1 120,64
29/08/2012		1 011,24	638,67	1 728,42
31/10/2012				
27/03/2013				
14/05/2013		78,05	10,58	512,99
13/06/2013				
26/06/2013		0	0	0,26
22/07/2013				
05/08/2013				
20/08/2013				
03/09/2013				
02/10/2013				
17/10/2013				
28/03/2012	3			
11/04/2012				
26/04/2012		1 880,56	1 069,37	2 836,40
10/05/2012				
26/06/2012				
04/07/2012				
17/07/2012		779,15	341,94	963,75
01/08/2012		895,58	765,55	1 133,92
29/08/2012		18,31	4,42	72,50
31/10/2012				
27/03/2013				
29/04/2013		4 502,17	1 932,20	7 283,02
14/05/2013		0,11	0,01	1,15
13/06/2013				
26/06/2013		533,82	224,86	719,82
22/07/2013				
05/08/2013				
20/08/2013		588,58	432,61	644,61
03/09/2013				
02/10/2013		875,72	611,77	1 187,16
17/10/2013	880,49	557,08	1 189,41	
28/03/2012	4			
11/04/2012				
26/04/2012		3 532,10	2 839,42	4 341,98
25/05/2012				
26/06/2012				
04/07/2012				
17/07/2012				
29/08/2012				
31/10/2012				
27/03/2013				
14/05/2013		5 190,56	3 482,90	6 131,91
27/05/2013		0,18	0,12	1,39
13/06/2013				
22/07/2013				
05/08/2013				
20/08/2013		1 271,78	848,14	1 804,20
03/09/2013				
02/10/2013				
17/10/2013				



**Tableau 6** – Valeurs de  $CE_{10}$  ( $\mu\text{gCu.L}^{-1}$ ) et intervalles de confiance à 95 % obtenus sur les abondances du pico-phytoplancton (gauche) et sur le contenu relatif en chlorophylle (droite)

Pico-phytoplancton ( $\text{cell.mL}^{-1}$ )					
Date	Station	$CE_{10}$ ( $\mu\text{gCu.L}^{-1}$ )	IC <sub>95%</sub> inf.	IC <sub>95%</sub> sup.	
28/03/2012	2				
11/04/2012					
26/06/2012					
04/07/2012					
17/07/2012					
01/08/2012					
29/08/2012					
31/10/2012					
27/03/2013					
29/04/2013					
14/05/2013					
13/06/2013					
26/06/2013					
04/07/2013					
22/07/2013					
05/08/2013					
20/08/2013					
03/09/2013					
02/10/2013					
17/10/2013					
28/03/2012	3				
11/04/2012					
26/04/2012					
25/05/2012					
26/06/2012					
04/07/2012					
17/07/2012					
01/08/2012					
31/10/2012					
27/03/2013					
29/04/2013					
14/05/2013					
13/06/2013					
26/06/2013			692,60	177,16	844,17
22/07/2013					
05/08/2013					
20/08/2013			699,37	295,98	1 095,01
03/09/2013					
28/03/2012		4			
11/04/2012					
26/04/2012					
10/05/2012					
25/05/2012					
04/07/2012					
17/07/2012					
01/08/2012			0,76	0	11,28
29/08/2012					
31/10/2012					
27/03/2013					
14/05/2013					
27/05/2013					
13/06/2013					
26/06/2013					
04/07/2013					
22/07/2013					
05/08/2013					
20/08/2013					
03/09/2013					
02/10/2013					
17/10/2013					

Pico-phytoplancton (chlorophylle)					
Date	Station	$CE_{10}$ ( $\mu\text{gCu.L}^{-1}$ )	IC <sub>95%</sub> inf.	IC <sub>95%</sub> sup.	
28/03/2012	2				
11/04/2012					
26/04/2012					
26/06/2012			46,53	13,05	133,25
04/07/2012			11,62	3,64	31,62
17/07/2012			8,86	2,61	22,58
01/08/2012			13,21	2,03	60,56
29/08/2012			9,40	0,21	85,67
31/10/2012			4,70	0,34	34,89
27/03/2013					
29/04/2013			82,92	26,78	212,60
27/05/2013			193,63	65,53	467,84
13/06/2013					
26/06/2013					
04/07/2013			34,16	3,88	158,61
22/07/2013					
05/08/2013					
20/08/2013			89,59	21,59	271,25
03/09/2013					
02/10/2013		12,83	0,67	99,71	
17/10/2013		1,12	0	29,22	
28/03/2012	3				
11/04/2012					
26/04/2012			0,03	0	5,22
25/05/2012					
26/06/2012			9,60	2,59	27,87
04/07/2012			14,47	2,91	59,22
17/07/2012			7,07	1,50	24,37
01/08/2012			6,67	0,27	64,40
29/08/2012			7,18	1,28	27,99
31/10/2012			13,83	6,53	27,05
27/03/2013					
29/04/2013			10,10	0,50	97,46
14/05/2013					
27/05/2013			14,32	3,10	51,71
13/06/2013					
26/06/2013			642,60	125	806,46
04/07/2013			10,67	1,46	35,55
22/07/2013					
05/08/2013					
20/08/2013		59,38	24,49	127,52	
03/09/2013					
02/10/2013		13,61	1,93	67,99	
17/10/2013		10,63	1,42	63,71	
28/03/2012	4				
11/04/2012					
10/05/2012					
26/06/2012			15,81	6,23	33,08
04/07/2012			40,63	12,76	90,23
17/07/2012			24,97	8,23	64,48
01/08/2012					
29/08/2012			37,83	4,75	235,17
27/03/2013					
14/05/2013			6,88	0,25	54,36
27/05/2013			0,06	0,01	0,28
13/06/2013					
04/07/2013			27,96	6,19	79,67
22/07/2013					
05/08/2013					
02/10/2013			49,08	9,45	197,10
17/10/2013			19,47	1,98	108,26

**Tableau 7 – Valeurs de  $CE_{10}$  ( $\mu\text{gCu.L}^{-1}$ ) et intervalles de confiance à 95 % obtenus sur les abondances du nano-phytoplancton (gauche) et sur le contenu relatif en chlorophylle (droite)**

Nano-phytoplancton ( $\text{cell.mL}^{-1}$ )					Nano-phytoplancton (chlorophylle)							
Date	Station	$CE_{10}$ ( $\mu\text{gCu.L}^{-1}$ )	IC <sub>95%</sub> inf.	IC <sub>95%</sub> sup.	Date	Station	$CE_{10}$ ( $\mu\text{gCu.L}^{-1}$ )	IC <sub>95%</sub> inf.	IC <sub>95%</sub> sup.			
28/03/2012	2				28/03/2012	2						
11/04/2012					11/04/2012							
26/04/2012					26/04/2012			3,85	0,56	14,82		
10/05/2012					10/05/2012			104,58	22,94	409,60		
26/06/2012					26/06/2012			4,26	1,72	9,92		
04/07/2012			487,13	133,63	681,68		04/07/2012		5,22	0,74	19,85	
01/08/2012			89,61	38,86	185,67		17/07/2012		0,53	0,03	3,21	
29/08/2012			9,06	2,81	23,17		01/08/2012		4	1,33	11	
31/10/2012			85,20	30,70	234,68		29/08/2012		3,32	0,01	22,16	
27/03/2013							31/10/2012		1,44	0,01	27,80	
14/05/2013			419,96	41,61	574,32		27/03/2013	2				
27/05/2013			499,35	116,17	1 466,41		29/04/2013			24,14	4,36	95,79
13/06/2013							27/05/2013			52,17	12,65	157,34
26/06/2013							13/06/2013					
22/07/2013							26/06/2013			57,31	38,33	71,73
05/08/2013							04/07/2013			10,53	0,31	57,43
03/09/2013							22/07/2013					
02/10/2013							05/08/2013					
28/03/2012		3					20/08/2013			18,21	9,23	34,28
11/04/2012							03/09/2013					
26/04/2012					02/10/2013		1,25	0,12	7,09			
10/05/2012					17/10/2013		0,65	0	12,50			
04/07/2012			194,06	34,06	661,46	28/03/2012	3					
17/07/2012			151,28	39,64	546,72	11/04/2012						
01/08/2012			35,66	12,59	91,56	26/04/2012			0,33	0,03	1,84	
29/08/2012			47,36	7,12	255,64	10/05/2012			74,94	33,62	153,49	
31/10/2012			35,06	20,26	60,54	25/05/2012						
27/03/2013						26/06/2012			0,80	0,06	4,35	
29/04/2013						04/07/2012			1,40	0,40	3,86	
14/05/2013						17/07/2012			0,82	0,24	2,24	
13/06/2013						01/08/2012			0,79	0,10	3,47	
26/06/2013			584,74	206,64	926,76	31/10/2012			15,31	2,55	67,44	
22/07/2013						27/03/2013						
05/08/2013						29/04/2013			5,88	0,40	65,35	
20/08/2013			586,89	196,95	675,60	14/05/2013			0	0	0,16	
03/09/2013						27/05/2013			9,04	1,10	55,47	
02/10/2013			41,95	5,64	277,25	13/06/2013						
17/10/2013			593,60	124,77	745,65	26/06/2013			119,83	58,81	267,14	
26/06/2013		187,05	92,33	700,32	04/07/2013			4,28	0,11	56,53		
28/03/2012	4				22/07/2013							
11/04/2012					05/08/2013							
26/04/2012					20/08/2013			27,66	14,89	49,92		
10/05/2012					03/09/2013							
26/06/2012			11,55	1,00	69,07	02/10/2013		0,26	0	2,97		
04/07/2012						17/10/2013		4,54	0,67	20,73		
17/07/2012			154,33	41,17	587,95	28/03/2012	4					
29/08/2012						11/04/2012						
27/03/2013						26/04/2012			7,48	0,70	45,25	
29/04/2013			169,77	37,09	595,36	10/05/2012						
13/06/2013						25/05/2012						
26/06/2013			140,70	10,43	683,84	26/06/2012			0,27	0,02	1,72	
22/07/2013						04/07/2012			2,21	0,67	6,20	
05/08/2013						17/07/2012			1,08	0,32	3,07	
20/08/2013			193,43	51,57	613,29	01/08/2012			2,40	0,01	77	
02/10/2013			209,26	13,54	703,95	29/08/2012			2,90	0,09	24,65	
17/10/2013			388,58	27,53	799,14	31/10/2012			4,85	0,27	37,61	
						27/03/2013						
						29/04/2013			1,38	0	16,05	
						14/05/2013			0,75	0,07	4,29	
					27/05/2013			0,33	0,11	0,83		
					13/06/2013							
					26/06/2013			10,15	0,83	47,65		
					04/07/2013			17,73	2,53	62,03		
					22/07/2013							
					05/08/2013							
					20/08/2013		7,53	1,18	26,08			
					03/09/2013		3,48	0,29	19,55			
					02/10/2013		0	0	0,06			
					17/10/2013		3,25	0,66	11,92			

**Tableau 8** – Valeurs de  $CE_{10}$  ( $\mu\text{gCu.L}^{-1}$ ) et intervalles de confiance à 95 % obtenus sur les abondances de *Synechococcus sp.* (gauche) et sur le contenu relatif en chlorophylle (droite)

<i>Synechococcus sp.</i> (cell.mL <sup>-1</sup> )				
Date	Station	$CE_{10}$ ( $\mu\text{gCu.L}^{-1}$ )	IC <sub>95%</sub> inf.	IC <sub>95%</sub> sup.
28/03/2012	2			
11/04/2012				
26/04/2012		0,05	0	3,63
10/05/2012		8,52	0,04	66,84
25/05/2012				
26/06/2012		3,43	1,11	8,69
04/07/2012		1,39	0,37	3,93
17/07/2012		2,24	0,72	6,55
01/08/2012		1,44	0,18	5,35
29/08/2012		8,97	2,42	48,65
31/10/2012		16,80	11,13	27,72
27/03/2013				
29/04/2013		30,89	3,17	48,39
14/05/2013		40,49	23,14	60,41
27/05/2013		43,91	9,75	55,92
13/06/2013				
26/06/2013				
04/07/2013		11,97	9,01	18,28
22/07/2013				
05/08/2013				
20/08/2013	4,33	0,37	42,81	
03/09/2013				
02/10/2013	30,02	13,88	52,60	
17/10/2013	7,70	0,01	62,50	
28/03/2012	3			
11/04/2012				
26/04/2012		0,12	0	15,87
10/05/2012		10,10	0	66,03
25/05/2012				
26/06/2012		7,55	4,36	13,87
04/07/2012		4	1,83	6,94
17/07/2012		1,63	0,12	9,41
01/08/2012		2,25	0,05	6,91
29/08/2012		17,29	1,38	75,85
31/10/2012		7,26	3,37	21,84
27/03/2013				
29/04/2013		25,63	7,20	62,82
14/05/2013		4,90	4,00	5,47
27/05/2013		91,58	65,06	144,13
13/06/2013				
26/06/2013		113,02	77,91	378,24
04/07/2013		16,64	1,26	70,44
22/07/2013				
05/08/2013				
20/08/2013	9,93	4,29	40,65	
03/09/2013				
02/10/2013	16,08	1,38	70,87	
17/10/2013	63,46	20,62	110,25	
28/03/2012	4			
11/04/2012				
26/04/2012				
10/05/2012				
25/05/2012				
26/06/2012		2,92	0,57	7,04
04/07/2012		31,56	10,60	70,72
17/07/2012		5,01	3,70	6,40
01/08/2012				
29/08/2012		20,66	8,48	42,29
31/10/2012		42,32	18,10	112,83
27/03/2013				
29/04/2013		38,09	3,87	71,68
14/05/2013		8,96	2,82	33,82
27/05/2013		5,40	3,86	6,47
13/06/2013				
26/06/2013		8,14	6,13	10,89
04/07/2013		2,46	0,03	25,41
22/07/2013				
05/08/2013				
20/08/2013	0,85	0,05	3,08	
03/09/2013	13,33	4,63	44,79	
02/10/2013	16,26	7,75	59,93	
17/10/2013	36,18	23,92	49,72	

<i>Synechococcus sp.</i> (chlorophylle)				
Date	Station	$CE_{10}$ ( $\mu\text{gCu.L}^{-1}$ )	IC <sub>95%</sub> inf.	IC <sub>95%</sub> sup.
28/03/2012	2			
11/04/2012				
26/04/2012				
10/05/2012				
25/05/2012				
26/06/2012		0,09	0	1,31
04/07/2012		1,11	0,05	9,61
17/07/2012		0,78	0	6,90
01/08/2012				
29/08/2012				
31/10/2012		0,98	0,40	1,83
27/03/2013				
29/04/2013		3,54	0,04	28,02
14/05/2013		32,32	16,30	70,11
27/05/2013		22,38	10,60	61,93
13/06/2013				
26/06/2013		48,52	33,97	64,09
04/07/2013				
22/07/2013				
05/08/2013				
20/08/2013	5,49	3,19	8,14	
03/09/2013				
02/10/2013	1,56	0,26	7,31	
17/10/2013	29,07	0,52	54,78	
28/03/2012	3			
11/04/2012				
26/04/2012				
10/05/2012				
25/05/2012				
26/06/2012		1,87	0,05	17,41
04/07/2012		1,61	0,31	4,13
17/07/2012		0,18	0,01	0,88
01/08/2012		2,25	0,06	7,03
29/08/2012				
31/10/2012		0	0	0,07
27/03/2013				
29/04/2013				
14/05/2013				
27/05/2013		10,45	2,84	30,51
13/06/2013				
26/06/2013		72,73	11,42	80,90
04/07/2013				
22/07/2013				
05/08/2013				
20/08/2013	3,56	0	43,81	
03/09/2013				
02/10/2013	8,26	3,90	24,70	
17/10/2013	7,58	3,90	12,98	
28/03/2012	4			
11/04/2012				
26/04/2012				
10/05/2012				
25/05/2012				
26/06/2012				
04/07/2012				
17/07/2012				
01/08/2012				
29/08/2012				
31/10/2012		2,45	0,13	13,57
27/03/2013				
29/04/2013		73,12	11,55	82,67
14/05/2013		3,93	1,20	9,98
27/05/2013		3,13	2,31	4,93
13/06/2013				
26/06/2013		0,28	0	2,59
04/07/2013		33,37	2,01	62,02
22/07/2013				
05/08/2013				
20/08/2013				
03/09/2013	3,33	0,43	12,72	
02/10/2013	0,45	0,17	0,89	
17/10/2013	0,64	0,30	1,12	

**Tableau 9** – Valeurs de  $CE_{10}$  ( $\mu\text{gCu.L}^{-1}$ ) et intervalles de confiance à 95 % obtenus sur les abondances des cryptophytes (gauche) et sur le contenu relatif en chlorophylle (droite)

Cryptophytes (cell.mL <sup>-1</sup> )					Cryptophytes (chlorophylle)						
Date	Station	$CE_{10}$ ( $\mu\text{gCu.L}^{-1}$ )	IC <sub>95%</sub> inf.	IC <sub>95%</sub> sup.	Date	Station	$CE_{10}$ ( $\mu\text{gCu.L}^{-1}$ )	IC <sub>95%</sub> inf.	IC <sub>95%</sub> sup.		
28/03/2012	2				28/03/2012	2					
11/04/2012					11/04/2012						
26/04/2012					26/04/2012						
10/05/2012					10/05/2012						
25/05/2012					25/05/2012						
26/06/2012					26/06/2012						
04/07/2012					04/07/2012						
17/07/2012					17/07/2012						
01/08/2012			7,35	3,52	9,85		01/08/2012				
29/08/2012			5,55	3,41	11,14		29/08/2012				
31/10/2012			3,38	0,37	9,62		31/10/2012				
27/03/2013							27/03/2013				
29/04/2013							29/04/2013				
14/05/2013							14/05/2013				
27/05/2013							27/05/2013				
13/06/2013							13/06/2013				
26/06/2013							26/06/2013				
04/07/2013		34,37	7,82	46,77	04/07/2013		6,40	2,67	10,52		
22/07/2013					22/07/2013						
05/08/2013					05/08/2013						
20/08/2013		4,25	0,18	39,39	20/08/2013						
03/09/2013					03/09/2013						
02/10/2013					02/10/2013						
17/10/2013		31,58	0	56,91	17/10/2013						
28/03/2012	3				28/03/2012	3					
11/04/2012					11/04/2012						
26/04/2012					26/04/2012						
10/05/2012					10/05/2012						
25/05/2012					25/05/2012						
26/06/2012					26/06/2012						
04/07/2012					04/07/2012						
17/07/2012					17/07/2012						
01/08/2012			7,72	5,31	12,79		01/08/2012		7,72	5,37	11,80
29/08/2012							29/08/2012		6,09	1,24	11,92
31/10/2012			1,12	0	3,12		31/10/2012				
27/03/2013							27/03/2013				
29/04/2013			70,82	5,57	90,81		29/04/2013		4,22	0,10	6,91
14/05/2013			3,58	0,90	7,87		14/05/2013				
27/05/2013							27/05/2013		42,19	0,09	83,22
13/06/2013							13/06/2013				
26/06/2013							26/06/2013				
04/07/2013					04/07/2013		5,96	1,72	10,36		
22/07/2013					22/07/2013						
05/08/2013					05/08/2013						
20/08/2013					20/08/2013		5,79	1,46	8,90		
03/09/2013					03/09/2013						
02/10/2013					02/10/2013		6,77	4,21	9,62		
17/10/2013		16,23	1,93	71,94	17/10/2013		4,24	0,74	6,56		
28/03/2012	4				28/03/2012	4					
11/04/2012					11/04/2012						
26/04/2012					26/04/2012						
10/05/2012					10/05/2012						
25/05/2012					25/05/2012						
26/06/2012					26/06/2012						
04/07/2012					04/07/2012						
17/07/2012					17/07/2012						
01/08/2012			10,01	6,03	40,70		01/08/2012				
29/08/2012							29/08/2012		5,41	1,51	8,79
31/10/2012			1,03	0,02	79		31/10/2012				
27/03/2013							27/03/2013				
29/04/2013							29/04/2013				
14/05/2013							14/05/2013				
27/05/2013			1,09	0,05	6		27/05/2013				
13/06/2013							13/06/2013				
26/06/2013			22,56	7,92	32,10		26/06/2013				
04/07/2013		3,12	0	3,12	04/07/2013						
22/07/2013					22/07/2013						
05/08/2013					05/08/2013						
20/08/2013					20/08/2013						
03/09/2013		32,57	6,61	33,93	03/09/2013						
02/10/2013					02/10/2013						
17/10/2013		15,40	5,92	53,10	17/10/2013						

**Tableau 10** – Valeurs de  $CE_{10}$  et intervalles de confiance à 95 % obtenus sur l'efficacité de photosynthèse des communautés exposées au cuivre ( $\mu\text{gCu.L}^{-1}$ , gauche) et aux herbicides ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ , concentrations unitaires c.u., droite)

PAM-Cu				
Date	Station	$CE_{10}$ ( $\mu\text{gCu.L}^{-1}$ )	$IC_{95\%}$ inf.	$IC_{95\%}$ sup.
28/03/2012	2	666,75	70,91	1 782,62
11/04/2012		578,68	90,57	1 861,84
26/04/2012		15,90	1,65	77,01
10/05/2012		22,98	4,66	75,15
25/05/2012		8,79	1,92	40,31
26/06/2012		12,30	3,56	37,37
04/07/2012		161,39	92,48	549,34
17/07/2012		14,02	5,39	31,93
01/08/2012		40,12	10,91	123,49
29/08/2012		18,70	3,52	70,90
31/10/2012		818,24	682,51	993,47
27/03/2013				
29/04/2013		431,58	299,15	589,34
14/05/2013		225,74	152,33	321,73
27/05/2013		413,11	231,92	758,50
13/06/2013		70,07	22,51	192,78
26/06/2013		737,30	554,48	921,41
04/07/2013		47,19	28,10	78,65
22/07/2013		186,60	78,46	373,32
05/08/2013		12,55	4,67	26,56
20/08/2013				
03/09/2013	20,77	7,02	57,53	
02/10/2013	54,95	29,28	105,55	
17/10/2013	39,76	5,64	199,19	
28/03/2012	3			
11/04/2012		9 015,98	3 192,11	15 123,95
26/04/2012		21,31	1,89	122,52
10/05/2012		28,51	10,54	70,37
25/05/2012		12,99	4,09	34,49
26/06/2012		2,68	0,52	10,48
04/07/2012		19,68	8,83	40,57
17/07/2012		104,76	62,26	201,23
01/08/2012		105,88	48,24	218,06
29/08/2012		15,86	3,23	65,91
31/10/2012		666,51	504,51	821,23
27/03/2013		4 925,56	1 555,27	5 584,32
29/04/2013		353,18	274,81	445,74
14/05/2013		167,56	85,97	287,17
27/05/2013		343,21	145,62	937,90
13/06/2013		80,52	33,26	204,65
26/06/2013		74,51	37,70	152,88
04/07/2013		47,66	21,99	103
22/07/2013		313,78	235,98	402,43
05/08/2013		62,66	17,29	167,19
20/08/2013	391,08	226,39	606,94	
03/09/2013	17,94	2,75	63,09	
02/10/2013	59,70	36,87	125,80	
17/10/2013	46,88	15,96	116,30	
28/03/2012	4	0,50	0,06	1,88
11/04/2012		0	0	1,76
26/04/2012		13,20	1,82	57,11
10/05/2012		19,76	7,33	45,43
25/05/2012		1,19	0,26	3,71
26/06/2012		3,69	1,61	7,08
04/07/2012		1,73	0,45	5,18
17/07/2012		114,17	80,98	184,06
01/08/2012		123,24	69,49	238,91
29/08/2012		71,88	38,35	135,03
31/10/2012		4,86	2,01	9,65
27/03/2013		70,34	19,15	179,22
29/04/2013		52,92	33,67	83,70

PAM-Herbicides				
Date	Station	$CE_{10}$ ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ c.u.)	$IC_{95\%}$ inf.	$IC_{95\%}$ sup.
27/03/2013	2	89	56	112
29/04/2013		93	78	102
14/05/2013		83	78	88
27/05/2013		84	57	105
13/06/2013		50	14	88
26/06/2013				
04/07/2013		48	37	60
22/07/2013		55	33	75
05/08/2013		75	44	90
20/08/2013		56	32	84
03/09/2013	49	38	58	
02/10/2013	38	26	52	
17/10/2013	50	38	64	
27/03/2013	3	32	20	63
29/04/2013		55	35	76
14/05/2013		61	43	77
27/05/2013		54	38	77
13/06/2013		11	1	49
26/06/2013		70	55	82
04/07/2013		48	35	66
22/07/2013		48	29	75
05/08/2013		86	35	112
20/08/2013		55	28	82
03/09/2013	74	58	83	
02/10/2013	47	31	71	
17/10/2013	61	45	75	
27/03/2013	4	17	12	24
29/04/2013		67	26	84
14/05/2013		58	46	73
27/05/2013		56	46	69
13/06/2013		52	15	82
26/06/2013		74	55	82
04/07/2013		27	15	44
22/07/2013		87	29	105
05/08/2013		68	45	84
20/08/2013		51	23	80
03/09/2013	66	48	80	
02/10/2013	51	30	77	
17/10/2013	50	38	63	

## 7.4. Références bibliographiques

- Agawin, N.S., Duarte, C.M., Agusti, S., 2000. Nutrient and temperature control of the contribution of picoplankton to phytoplankton biomass and production. *Limnology and Oceanography* 45, 591–600.
- Agreste, recensement agricole 2010.
- Alvarez DA, Petty JD, Huckins JN, Jones-Lepp TL, Getting DT, Goddard JP, Manahan SE. 2004. Development of a passive, in situ, integrative sampler for hydrophilic organic contaminants in aquatic environments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23, 1640–1648.
- Aminot, A., Kérouel, R., 2004. Hydrologie des écosystèmes marins. Paramètres et analyses. Editions Ifremer, Plouzané, France pp 172–194.
- Auguet, J.C., Montarné, H., Hartmann, H.J., Lebaron, P., Casamayor, E.O., Catala, P., Delmas, D., 2009. Potential Effect of Freshwater Virus on the Structure and Activity of Bacterial Communities in the Marennes-Oléron Bay (France). *Microbial Ecology* 57, 295–306.
- Bérard, A., Pelte, T., 1999. Les herbicides inhibiteurs du photosystème II (PSII), effets sur les communautés algales et leur dynamique. Synthèse bibliographique. *Revue des Sciences de l'Eau* 12, 333–361.
- Blanck, H., 2002. A Critical Review of Procedures and Approaches Used for Assessing Pollution-Induced Community Tolerance (PICT) in Biotic Communities. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 8, 1003–1034.
- Bordalo, A.A., Vieira, M.E.C., 2005. Spatial variability of phytoplankton, bacteria and viruses in the mesotidal salt wedge Douro Estuary (Portugal). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 63, 143–154.
- Bougeard, S., Dray, S., 2012. Analyse de (K+ 1) tableaux avec le logiciel ade4. Application en épidémiologie., in: *Ières Rencontres R*.
- Bougeard, S., Qannari, E.M., Lupo, C., Hanafi, M., 2011. From multiblock partial least squares to multiblock redundancy analysis. A continuum approach. *Informatica*, 22, 11–26.
- Bræk, G.S., Malnes, D., Jensen, A., 1980. Heavy metal tolerance of marine phytoplankton. IV. Combined effect of zinc and cadmium on growth and uptake in some marine diatoms. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 42, 39–54.
- Brand, L.E., 1984. The salinity tolerance of forty-six marine phytoplankton isolates. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 18, 543–556.
- Chiffolleau J.-F., Auger D., Chartier E., Michel P., Truquet I., Ficht A., Gonzalez J.-L. and Romaña L.-A., 2001a. Spatiotemporal changes in cadmium contamination in the Seine estuary (France). *Estuaries*, 24, 1029–1040.
- Chiffolleau, J.-F., Claisse, D., Cossa, D., Fitch, A., Gonzalez, J.-L., Guyot, T., Michel, P., Miramand, P., Oger, C., Petit, F., 2001b. La contamination métallique, Rapport du Programme Scientifique Seine aval, Ifremer, 39 pp.
- Chiffolleau J.-F., Auger D. & Chartier E., 2002. Dosage de certains métaux traces (Cd, Co, Cu, Fe, Ni, Pb, Zn) dissous dans l'eau de mer par absorption atomique après extraction liquide-liquide. *Methodes d'Analyse en Milieu Marin*. Editions IFREMER. 39 pages ISBN 2-84433-104-1.
- Clarke, K.R., 1993. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology*, 18, 117–143.
- Cloern, J.E., 2001. Our evolving conceptual model of the coastal eutrophication problem. *Marine ecology progress series*, 210, 223–253.
- Danielsson L.-G., Magnusson B., Westerlund S. & Zhang K., 1982. Trace metal determinations in estuarine waters by electrothermal atomic absorption spectrometry after extraction of dithiocarbamate complexes into freon. *Analytica Chimica Acta*, 144, 183–188.
- Debelius, B., Forja, J.M., DelValls, T.A., Lubián, L.M., 2009. Toxicity of copper in natural marine picoplankton populations. *Ecotoxicology*, 18, 1095–1103.
- DeLorenzo, M.E., Fleming, J., 2008. Individual and Mixture Effects of Selected Pharmaceuticals and Personal Care Products on the Marine Phytoplankton Species *Dunaliella tertiolecta*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 54, 203–210.
- DeLorenzo, M.E., Scott, G.I., Ross, P.E., 2001. Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: A review. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 84–98.
- Dolédec, S., Chessel, D., 1987. Rythmes saisonniers et composantes stationnelles en milieu aquatique. I: Description d'un plan d'observation complet par projection de variables. *Acta oecologica. Oecologia generalis*, 8, 403–426.

- Dolédéc, S., Chessel, D., 1989. Rythmes saisonniers et composantes stationnelles en milieu aquatique. II: Prise en compte et élimination d'effets dans un tableau faunistique. *Acta oecologica. Oecologia generalis*, 10, 207–232.
- Domingues, R.B., Anselmo, T.P., Barbosa, A.B., Sommer, U., Galvão, H.M., 2011. Light as a driver of phytoplankton growth and production in the freshwater tidal zone of a turbid estuary. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 91, 526–535.
- Dyer, K.R., 1997. *Estuaries: a physical introduction*. 2nd edition. John Wiley and Sons/Wiley & Sons: Chichester. ISBN 0-471-9741-4. xiv, 195 pp.
- Echeveste, P., Agustí, S., Tovar-Sánchez, A., 2012. Toxic thresholds of cadmium and lead to oceanic phytoplankton: Cell size and ocean basin-dependent effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31, 1887–1894.
- Emelogu, E.S., Pollard, P., Dymond, P., Robinson, C.D., Webster, L., McKenzie, C., Dobson, J., Bresnan, E., Moffat, C.F., 2013. Occurrence and potential combined toxicity of dissolved organic contaminants in the Forth estuary and Firth of Forth, Scotland assessed using passive samplers and an algal toxicity test. *Science of The Total Environment*, 461–462, 230–239.
- Fang, T., Li, D., Yu, L., Gao, L., Zhang, L., 2006. Effects of irradiance and phosphate on growth of nanophytoplankton and picophytoplankton. *Acta Ecologica Sinica*, 26, 2783–2789.
- Faust, M., Altenburger, R., Backhaus, T., Blanck, H., Boedeker, W., Gramatica, P., Hamer, V., Scholze, M., Vighi, M., Grimme, L.H., 2003. Joint algal toxicity of 16 dissimilarly acting chemicals is predictable by the concept of independent action. *Aquatic Toxicology*, 63, 43–63.
- Ferreira, J.G., Wolff, W.J., Simas, T.C., Bricker, S.B., 2005. Does biodiversity of estuarine phytoplankton depend on hydrology? *Ecological Modelling*, 187, 513–523.
- Finkel, Z.V., Quigg, A., Raven, J.A., Reinfelder, J.R., Schofield, O.E., Falkowski, P.G., 2006. Irradiance and the elemental stoichiometry of marine phytoplankton. *Limnology and Oceanography*, 51, 2690–2701.
- Gameiro, C., Zwolinski, J., Brotas, V., 2011. Light control on phytoplankton production in a shallow and turbid estuarine system. *Hydrobiologia*, 669, 249–263.
- Grosjean, P., Ibanez, F., 2004. Package for analysis of space-time ecological series. PASTECS version 1.2-0 for R v. 2.0. 0 & version 1.0-1 for S+ 2000 rel 3.
- Gustavson, K., Wängberg, S.L., 1995. Tolerance induction and succession in microalgae communities exposed to copper and atrazine. *Aquatic Toxicology*, 32, 283–302.
- Hasle, G.R., 1978. The inverted microscope method. In: Sournia, A. (Ed.), *Phytoplankton manual*. UNESCO, Paris, pp 88–96.
- IPEM, 2007. Impact des pesticides sur l'environnement marin, rapport final, 200 pp. Programme : Évaluation et réduction des risques liés à l'utilisation des pesticides, Convention de Recherche n°12-C/2003.
- Isnard, P., Flammarion, P., Roman, G., Babut, M., Bastien, P., Bintein, S., Esserméant, L., Féraud, J. F., Gallotti-Schmitt, S., Saouter, E., Saroli, M., Thiébaud, H., Tomassone, R., Vindimian, E., 2001. Statistical analysis of regulatory ecotoxicity tests. *Chemosphere*, 45, 659–669.
- Kirk, J. T. O., 1985. Effects of suspensoids (turbidity) on penetration of solar radiation in aquatic ecosystems. *Perspectives in Southern Hemisphere Limnology, Developments in Hydrobiology*, 28, 195–208.
- Koutsaftis, A., Aoyama, I., 2006. The interactive effects of binary mixtures of three antifouling biocides and three heavy metals against the marine algae *Chaetoceros gracilis*. *Environmental Toxicology* 21, 432–439.
- Kruskal J.B., 1964. Nonmetric multidimensionnal scaling : a numerical method. *Psychometrika*, 29, 115–129.
- Le Moine, O., Geairon, P., 2013. Estimation et caractérisation de la dynamique des flux dans l'estuaire de la Charente. Rapport du projet « Développement durable, pêche et conchyliculture dans les Pertuis Charentais », IFREMER, 31 pp.
- Marie, D., Partensky, F., Jacquet, S., Vaultot, D., 1997. Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green I. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 186–193.
- Marshall, H.G., Lacouture, R.V., Buchanan, C., Johnson, J.M., 2006. Phytoplankton assemblages associated with water quality and salinity regions in Chesapeake Bay, USA. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 69, 10–18.
- Meek, D.W., Hatfield, J.L., Howell, T.A., Idso, S.B., Reginato, R.J., 1984. A generalized relationship between photosynthetically active radiation and solar radiation. *Agronomy journal*, 76, 939–945.
- Morán, X.A.G., López-Urrutia, Á., Calvo-Díaz, A., Li, W.K.W., 2010. Increasing importance of small phytoplankton in a warmer ocean. *Global Change Biology*, 16, 1137–1144.
- Munaron, D., 2004. Etude des apports en herbicides et en nutriments par la Charente : Modélisation de la dispersion de l'atrazine dans le bassin de Marennes-Oléron, Thèse Université Pierre et Marie Curie Paris V, Paris, 341pp.

- Paerl, H.W., Hall, N.S., Peierls, B.L., Rossignol, K.L., Joyner, A.R., 2014. Hydrologic Variability and Its Control of Phytoplankton Community Structure and Function in Two Shallow, Coastal, Lagoonal Ecosystems: The Neuse and New River Estuaries, North Carolina, USA. *Estuaries and Coasts*, 37, 31–45.
- Peierls, B.L., Hall, N.S., Paerl, H.W., 2012. Non-monotonic responses of phytoplankton biomass accumulation to hydrologic variability: a comparison of two coastal plain North Carolina estuaries. *Estuaries and coasts*, 35, 1376–1392.
- Peperzak, L., 1993. Daily irradiance governs growth rate and colony formation of *Phaeocystis* (Prymnesiophyceae). *Journal of Plankton Research*, 15, 809–821.
- Peterson, H.G., Boutin, C., Martin, P.A., Freemark, K.E., Ruecker, N.J., Moody, M.J., 1994. Aquatic phytotoxicity of 23 pesticides applied at expected environmental concentrations. *Aquatic Toxicology*, 28, 275–292.
- Philipps, I., 1980. Qualité des eaux dans l'estuaire de la Gironde. Répartition et comportement des sels minéraux dissous : azote, phosphore et silice. Thèse Université de Bordeaux I, 229 pp.
- Pierson, D.C., Kratzer, S., Strömbeck, N., Håkansson, B., 2008. Relationship between the attenuation of downwelling irradiance at 490 nm with the attenuation of PAR (400 nm–700 nm) in the Baltic Sea. *Remote Sensing of Environment*, 112, 668–680.
- Sheldon, J.E., Alber, M., 2006. The calculation of estuarine turnover times using freshwater fraction and tidal prism models: A critical evaluation. *Estuaries and Coasts*, 29, 133–146.
- Sokolova, I.M., Lannig, G., 2008. Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: implications of global climate change. *Climate research*, 37, 181–201.
- Stachowski-Haberkorn, S., Beker, B., Marie, D., Haberkorn, H., Coroller, L., de la Broise, D., 2008. Impact of Roundup on the marine microbial community, as shown by an in situ experiment. *Aquatic toxicology*, 89, 232–241.
- Struski, C., 2005. Modélisation des flux de matières dans la baie de Marennes-Oléron – couplage de l'hydrodynamisme, de la production primaire et de la consommation par les huîtres. Thèse Université de La Rochelle, 340 pp.
- Trigueros, J.M., Orive, E., 2000. Tidally driven distribution of phytoplankton blooms in a shallow, macrotidal estuary. *Journal of Plankton Research*, 22, 969–986.
- Troussellier, M., Courties, C., Vaquer, A., 1993. Recent applications of flow cytometry in aquatic microbial ecology. *Biology of the Cell*, 78, 111–121.
- Udo, S.O., Aro, T.O., 1999. Global PAR related to global solar radiation for central Nigeria. *Agricultural and Forest Meteorology*, 97, 21–31.
- Villa, S., Migliorati, S., Monti, G.S., Vighi, M., 2012. Toxicity on the luminescent bacterium *Vibrio fischeri* (Beijerinck). II: Response to complex mixtures of heterogeneous chemicals at low levels of individual components. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 86, 93–100.



## **7.5. Liste des personnes impliquées dans le projet**

### ***Ifremer : Laboratoire d'écotoxicologie***

Sabine Stachowski-Haberkorn, Larissa Haugarreau, Dominique Ménard, Julien Rouxel, Alexandra Duchemin, Nathalie Coquillé, Célia Khélifi, Morgane Hubert

### ***Ifremer : Laboratoire de Biogéochimie des Contaminants Métalliques***

Jean-François Chiffolleau, Christophe Brach-Papa, Dominique Auger, Emmanuelle Rozuel

### ***Ifremer : Laboratoire Environnement Ressources des Pertuis Charentais***

Christian Béchemin, Stéphane Guesdon, Céline Vérité, Gabriel Charpentier, Jean-Luc Seugnet, James Grizon, Jean-Michel Chabirand

### ***LEMAR***

Christophe Lambert, Philippe Soudant, Fabienne Le Grand, Nelly Le Goïc, Louis Quiniou, Beatriz Beker,

### ***LEESA***

Alain Jadas-Hécart, Pierre-Yves Communal