ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA MER
Une approche pluridisciplinaire du milieu océanique

Université de Bretagne Occidentale

Thèse présentée par **Sabine STACHOWSKI-HABERKORN**

Soutenue le **11 septembre 2008**

pour obtenir le grade de **Docteur de l'université de Bretagne occidentale**

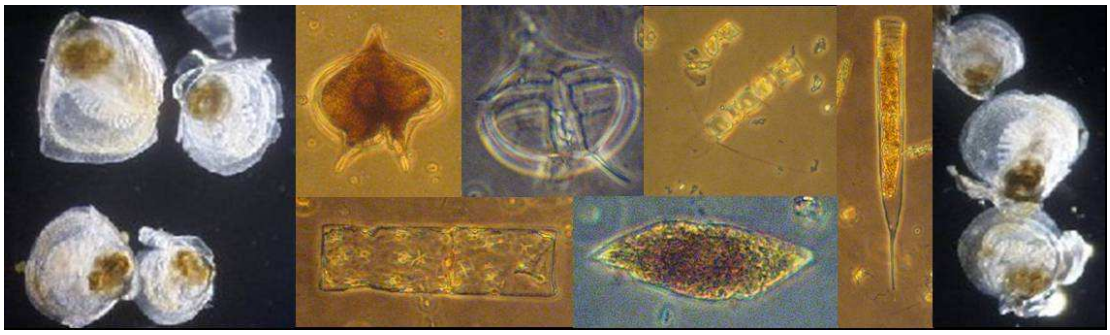
discipline **Océanologie biologique**

Méthodes d'évaluation de l'impact de pesticides sur le phytoplancton marin et le naissain d'huître creuse

Composition du jury

Rapporteurs	Professeur François LEBOULENGER, Université du Havre. Docteur Christophe LEBOULANGER, IRD, Université Montpellier II, UMR 5119.
Directeur de thèse	Docteur Denis de la BROISE, HDR, Université de Bretagne Occidentale.
Examinateurs	Professeur Annick HOURMANT, Université de Bretagne Occidentale. Professeur Jean LAROCHE, Université de Bretagne Occidentale, UMR 6539. Docteur Nathalie SIMON, Université Pierre et Marie Curie, UMR 7144 .
Membre invité	Docteur Geneviève ARZUL, Ifremer Brest.

Méthodes d'évaluation de l'impact de pesticides sur le phytoplancton marin et le naissain d'huître creuse



Sabine STACHOWSKI-HABERKORN

11 septembre 2008

Océanologie biologique

À mes parents

Remerciements

Mes premiers remerciements vont aux organismes qui ont financé ce travail : merci au MINISTERE DE L'ÉCOLOGIE ET DU DEVELOPPEMENT DURABLE, qui a financé le projet IPEM, ce qui a permis, entre autres, la réalisation des expériences de terrain. Merci à la RÉGION BRETAGNE, qui a accordé le financement pour le projet IMPESPHY, incluant mon salaire pour les trois années de thèse.

Merci à François LEBOULENGER et Christophe LEBOULANGER, d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. C'est pour moi un honneur d'être évaluée par vous deux.

Merci aux autres membres du jury, Geneviève ARZUL, Annick HOURMANT, Jean LAROCHE et Nathalie SIMON, d'avoir accepté de participer à ce jury.

Je remercie le Professeur Ivan LEGUÉRINEL, alias Herr Direktor Kayakator, de m'avoir accueillie au LUMAQ-LUBEM dans le cadre de cette thèse. Ivanoff, merci pour ton accueil, ta sympathie, merci pour ton soutien et ton aide, merci pour ta « cool attitude », et merci pour les séances de piscine qui m'ont bien aidée dans ma phase d'apprentissage de la natation !

Spéciale dédicace au boss, Denis de la BROISE, alias Le Deun's, pour m'avoir supportée pendant ces presque cinq années de DEA, thèse et échanges à distance : un immense MERCI. Tu mériterais un chapitre…Merci pour ta disponibilité, ta patience, ta bonne humeur, merci pour tout ce que tu m'as appris et apporté au niveau professionnel et humain. Merci de m'avoir poussée et appris à repousser mes limites, merci pour ton soutien, tes encouragements. Je te remercie pour toutes les séances de débats, de psychanalyse, de partage (surtout les casse-croûtes) et de fous-rires. Ce n'était pas tous les jours facile, même quand on allait se faire bronzer aux Glénan (bronzer ou brûler oui, mais pas affalés sur le sable chaud !), mais j'ai énormément apprécié ces aventures. Merci d'avoir tenté de m'inculquer les rudiments de la voile, merci de m'avoir appris au moins 10 fois à faire les nœuds de chaise…Merci aussi d'avoir essayé de m'apprendre à parler correctement, en vain ! (Même ma mère a laissé tomber…) Nos échanges m'ont beaucoup enrichie. J'ai adoré bosser avec toi et je suis prête à recommencer. Tu es un boss exceptionnel !

Merci à Geneviève ARZUL, Gaël DURAND, Annick HOURMANT, Françoise QUINIOU, et Nathalie SIMON, d'avoir suivi le déroulement de cette thèse, ainsi que les orientations choisies, en tant que membres de mon comité de thèse. Merci à toutes pour votre contribution à ce travail. J'ajoute aussi à l'attention de Dame Geneviève, Dame Gaël, Dame Annick, Dame Françoise, Dame Gwendolina et Uncle Deun's, que j'ai vraiment beaucoup apprécié notre petite escapade à Reims en novembre dernier. C'était un plaisir de passer ces journées en votre compagnie !

Un merci particulier pour Dame Geneviève : les quelques semaines passées avec vous à Ifremer ont été très agréables et très enrichissantes. Vous m'avez accueillie chez vous comme si je faisais partie de la famille, j'ai beaucoup apprécié ces moments d'échanges non-professionnels et de partage. Merci pour votre gentillesse, sympathie, disponibilité, merci pour votre soutien et votre bonne humeur. Je suis très heureuse d'avoir côtoyé une personne de votre qualité ! Merci pour tout !

Merci à Morgane NÉDÉLEC et Pierre MOLLO du Cempama de Beg-Meil d'avoir participé aux expériences avec les huîtres. Merci pour votre disponibilité, votre motivation, votre savoir-faire, votre sympathie et le temps que vous avez passé à dorloter les petits bébés huîtres. Ça a été pour moi un réel plaisir de faire votre connaissance et de pouvoir travailler avec vous.

Toujours dans les huîtres, merci à René ROBERT et à l'équipe Ifremer d'Argenton, d'avoir fourni et élevé les larves d'huîtres. Sans vous, l'expérience qui a donné lieu à mon premier bébé d'article n'aurait pas pu avoir lieu. Je vous suis très reconnaissante de nous avoir fait bénéficier de vos compétences d'écloseurs.

Un grand merci à Dominique MARIE de m'avoir permis de faire mes analyses en cytométrie à Roscoff. Merci pour le temps que tu as passé avec moi, merci de m'avoir fait partager tes connaissances et tes compétences, merci pour ta sympathie et ta disponibilité.

Un immense MERCI à Beatriz BECKER. Merci à toi Bea pour les analyses, toi aussi tu m'as sauvée ! Je te suis très reconnaissante pour ce grand service que tu m'as rendu, avec efficacité et rapidité.

Merci aux chimistes, Dorthée HUREAU et Gwendolina LIMON, d'avoir réalisé les dizaines d'analyses de pesticides de nos expériences de terrain.

Un grand merci à mon beau Chevalier aquatique préféré, LE CHEVALIER Patrick. Avant de te connaître, je pensais que le monde sous-marin était inaccessible pour moi. Tu m'as fait découvrir ce monde merveilleux et je ne pourrai jamais te remercier assez pour ce que tu m'as apporté. Je n'oublierai pas nos exercices d'entraînement à la piscine (surtout un…tu vois lequel ?), ni les plongées que j'ai pu faire en ta compagnie. Merci pour tous les moments que nous avons partagés. Quel honneur d'avoir côtoyé La Star MF2 de Quimper ! J'espère avoir à nouveau l'occasion de plonger avec toi. PLC !

Restons dans le milieu aquatique : merci à Jean-Louis qui m'a appris à nager, merci à Michel BEUCHER qui m'a enseigné la plongée avec Ivan et PLC.

Merci aux cinq stagiaires qui ont participé aux travaux de recherche menés pendant cette thèse : Harold ANSEAUME, Gabriel DIEUSET, Camille KERROS, Yann LE FLOCH, Éléonore CHÉ. C'est avec plaisir que j'ai travaillé en votre compagnie, encadré et corrigé certains d'entre vous. Cela m'a beaucoup enrichie. Merci beaucoup pour votre contribution à ce travail de thèse.

Merci à mes amis thésards de Quimper, Hana BEN YAGHLÈNE, Diane DEFER, Delphine LAROQUE, Aurélie CHABEAUD, Zakia BOUBECHICHE, Brice MVOU et Kashif ZEESHAN. Merci pour les repas au RU, moments de détente, de confidences, de délire total aussi ! Merci Hana, Zakia, Brice et Kashif de m'avoir permis d'apprendre à connaître vos cultures respectives. Merci à vous tous pour les moments partagés, au labo et ailleurs, dans l'eau, en soirée, en voiture, aux courses…Mes sincères et affectueuses félicitations à toi Aurélie pour l'obtention de ton doctorat (Merci pour ton aide avec l'HPLC !). Je vous souhaite bon courage à tous pour la suite et/ou fin de vos thèses. Et, pourquoi pas, vous revoir un jour au Pakistan, Gabon, Tunisie, Algérie et Bretagne bien sûr !

Merci Anne LEVANT, pour nos « salut » criés du matin ! Merci pour toutes nos discussions, merci d'avoir baby-sitté mes plantes et merci pour les œufs bio-fluos ! Merci pour ton efficacité, tes compétences, pour tous les services rendus et risqués parfois ! Merci aussi pour ta bonne humeur et ta sympathie.

Merci à toi Louis COROLLER, l'homme qui ne dit jamais NON, toujours disponible, souriant, de bonne humeur, plein d'humour, tu es une crème ! Merci pour tous les services que tu m'as rendus, les séances sur Matlab… merci pour ta gestion du labo. Ne change pas !

Merci à Yannick FLEURY de m'avoir permis d'utiliser l'HPLC à temps plein pendant plusieurs mois, merci pour l'aide précieuse que tu m'as apportée lorsqu'elle me causait des soucis !

Un merci général à tous les autres membres de l'ex-LUMAQ, pour les échanges que nous avons pu avoir : Pierre MAFART, Émile BÉLIARD, Sophie CLIQUET, Anne-Gabrielle MATHOT, Myriam DUPUIS, Estelle BELLANGER, et Georges ROBREAU.

Je remercie aussi sans les citer, les nombreux stagiaires que j'ai rencontrés au cours de ces années et avec qui j'ai pu avoir des échanges très intéressants, ainsi que beaucoup de fous-rires. Merci en particulier aux stagiaires du printemps 2007 de m'avoir fait passer un dernier été de folie !

Merci à Jacques BARON, Mathieu CASTEX, Sophie CLIQUET et Louis QUINIOU, pour vos explications et conseils en statistiques.

Un GRAND MERCI à Christine LE PAUL, pour son aide précieuse dans la mise en forme de ce document. Merci Christine d'avoir toujours répondu très rapidement et très efficacement à mes préoccupations de forme. Merci de m'avoir appris les usages de la typographie, merci pour tout le temps passé avec moi sur cette thèse, tu m'as sauvée !

Je remercie mes collègues et amis d'Ifremer Nantes, Thierry BURGEOT, Farida AKCHA, Dominique MÉNARD, Émilie FARCY (merci pour tous tes conseils avisés, ton aide et la révolution de l'ADN 18S !), Nathalie WESSEL, Alice JAMES (merci pour ta relecture !), Anaï, Maude et Jeremaï, pour leur soutien, leurs encouragements, et leur suivi de ma double-vie ! Merci à Thierry et Farida de m'avoir donné ma chance et d'avoir pris le risque…Merci à vous tous pour la qualité des relations humaines au sein de ce groupe, merci pour les délires du midi, pour les soirées aussi ! Je tiens à signaler que l'ambiance au labo d'écotox est à la hauteur de l'ambiance à l'ex- LUMAQ, défi difficile à relever ! J'apprécie énormément mon quotidien avec vous, pourvu que ça dure !

Je souhaite remercier Philippe et Joëlle Stachowski, pour l'aide qu'ils m'ont apportée dans la recherche de certains chiffres. Vous voir lors de ma soutenance serait un grand plaisir !

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à mes Beaux-P', Dédé et Marie-Clémentine, de m'avoir toujours encouragée et soutenue, malgré mes humeurs maussades, merci pour votre soutien sans failles.

Merci à ma sœur Ariane Duc de Bed, à mon frère Carol M&M&M's, à leurs conjoints, à mes neveux et nièces, pour leur foi en moi, pour ces grains que nous partageons, qui ont un pouvoir de germination infini et qui se transmettent avec les générations. Ah la génétique…c'est beau ! Mes moments les plus fous ont été vécus avec vous, que de souvenirs à pleurer de riran ! C'est auprès de vous tous que je peux me changer les idées, me défouler, me ressourcer quand ça déborde là-dedans. Merci pour tout ça, vous êtes mon bol de gaz hilarant.

À mon biw Hansy, qui me supporte depuis que nous avons entrepris cette ascension à l'IUT de Thionville : tu m'as donné des ailes, c'est toi qui a fait de moi un papillon épanoui ! Mon âme-sœur, je te remercie infiniment de m'avoir soutenue, épaulée, encouragée et aidée chaque fois que tu le pouvais. Tu as contribué à l'aboutissement de ce travail, tu l'as vécu au quotidien et tu m'as sauvée à maintes reprises. Merci à toi d'être toujours là pour moi, tu es mon Bonheur.

À mes parents adorés, sans écrire un roman, je voudrais dire : vous êtes pour moi les meilleurs parents du monde. Vous avez toujours cru en moi, vous m'avez laissé prendre mes décisions en me faisant confiance et en me soutenant, vous m'avez toujours encouragée. Je mesure les sacrifices que vous avez consentis pour me permettre d'atteindre mes objectifs, en particulier le sacrifice quotidien de la distance, que je ressens aussi cruellement, depuis sept ans déjà. J'ai énormément de chance d'avoir des parents comme vous, sans parler du patrimoine génétique de la Capen-mania, unique au monde ! Cette thèse, je l'ai faite pour moi bien sûr, mais au fond de mon cœur, je l'ai faite pour vous. Pendant ces vingt dernières années, vous avez été ma source de motivation. J'éprouve pour vous une reconnaissance et un amour infinis.

Valorisation scientifique

Articles

Stachowski-Haberkorn, S., Quiniou, F., Nédélec, M., Robert, R., Limon, G., De la Broise, D., 2008. In-situ microcosms, a tool for assessment of pesticide impacts on oyster spat (*Crassostrea gigas*). Ecotoxicology, **17**(4): 235-245.

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

Stachowski-Haberkorn, S., Beker, B., Marie, D., Haberkorn, H., Quiniou, L., de la Broise, D., 2008. Comparative study of three analysis methods (TTGE, flow cytometry and HPLC) for xenobiotic impact assessment on phytoplankton communities. Soumis à la revue Ecotoxicology

De la Broise, D., Stachowski-Haberkorn, S. Impact assesment of herbicides on marine phytoplankton communities using multiple in situ microcosms. In prep.

Présentations orales

Utilisation de microcosmes *in situ* pour évaluer la toxicité de pesticides sur du naissain d'huîtres *Crassostrea gigas*

S. Stachowski-Haberkorn, F. Quiniou, M. Nédélec, R. Robert, G. Limon, D. de La Broise

Ce travail a fait l'objet de deux présentations :

38e congrès annuel du Groupe Français des Pesticides – Brest, 21-23 mai 2008

11e colloque annuel du Chapitre Saint-Laurent SRA-SETAC, – Rimouski (Québec), 28-29 mai 2007
Prix de la meilleure présentation

Assessment of pollution impact on marine phytoplankton : development and test of experimental tools

de La Broise, D., Cerceau, C., Durand,G., Stachowski, S.

1er Congrès Méditerranéen en Océanologie – Alger (Algérie), 20-22 novembre 2006

Posters

Action du Basamaïs (herbicide) sur la croissance et le métabolisme de la diatomée marine, *Chaetoceros gracilis*

Amara, A., Hourmant, A., Stachowski, S., Arzul, G., Quiniou, F., Durand, G.

UOF, Union des Océanographes de France
31e colloque annuel, Santé et Environnement Marin – Nantes, 2-3 novembre 2006

In situ microcosms, a tool to assess pesticide impacts on natural marine phytoplankton communities

Stachowski, S., Dieuset, G., Hureau, D., Durand, G., de la Broise, D.

UOF, Union des Océanographes de France (prix du meilleur poster)
EMECS 7, Environmental Management of Enclosed Coastal Areas – Caen, 9-12 mai 2006

Effects of pesticides on cellular ATP concentration in marine phytoplankton

Stachowski, S., Amara, A., Colmagro, E., Pothier, J., Hourmant, A., Arzul, G., Quiniou, F.

UOF, Union des Océanographes de France
EMECS 7, Environmental Management of Enclosed Coastal Areas – Caen, 9-12 mai 2006

Impact des Pesticides sur le phytoplancton marin.

Durand, G., Hureau, D., Arzul, G., Quiniou, F., Leturque, C., Jan, B., de la Broise, D., Stachowski, S., Anseaume, H.

Colloque Évaluation des risques liés à l'utilisation des pesticides, Ministère de l'écologie et du développement durable – Avignon, 14-16 novembre 2005

How can we study pesticide impacts on marine phytoplankton ?

Stachowski, S., Anseaume, H., Hureau, D., Durand, G., de la Broise, D.

ICSR 8, International Conference on Shellfish Restoration – Brest, 22-25 octobre 2005

sommaire

Résumé ... 17
Abstract ... 18
Avant-propos ... 19

Introduction générale et objectifs de l'étude ... 21

Chapitre 1 – Contexte scientifique ... 25

1. Phytoplancton ... 27
   1.1. Présentation ... 27
      1.1.1. Définition ... 27
      1.1.2. Principales classes algales ... 27
   1.2. Phytoplancton et écotoxicologie ... 30
      1.2.1. Écotoxicologie : définition et principe ... 30
      1.2.2. Tests monospécifiques ... 31
      1.2.3. Tests plurispécifiques ... 33
   1.3. Conclusion ... 42
2. Méthodes d'analyse appliquées au phytoplancton naturel ... 45
   2.1. Mesures de la fonction des communautés ... 45
      2.1.1. Évolution de la biomasse algale ... 45
      2.1.2. Efficacité de la photosynthèse ... 46
      2.1.3. Production primaire ... 46
   2.2. Mesures de la structure des communautés ... 46
      2.2.1. Identification et dénombrement au microscope ... 46
      2.2.2. Empreintes pigmentaires ... 47
      2.2.3. Cytométrie en flux ... 48
      2.2.4. Empreintes génétiques ... 49
   2.3. Analyse de la tolérance des communautés par PICT ... 51
   2.4. Conclusion ... 52
3. Huître creuse *Crassostrea gigas* ... 53
   3.1. Biologie ... 53
   3.2. Développement ... 53
   3.3. Production ... 54
   3.4. Huître et écotoxicologie ... 54
4. Pesticides ... 55
   4.1. Herbicides ... 55
      4.1.1. Bentazone ... 55
      4.1.2. Diméthénamide ... 56
      4.1.3. Glyphosate ... 57
      4.1.4. Nicosulfuron ... 57
   4.2. Fongicide : époxiconazole ... 59
   4.3. Insecticide : chlorpyrifos-éthyl ... 59
   4.4. Conclusion ... 59

Chapitre 2 – Matériels et Méthodes ... 61

1. Localisation des sites expérimentaux ... 63
   1.1. Archipel de Glénan ... 63

1.2. Baie de Port-la-Forêt ... 64
2. Dispositif expérimental ... 65
2.1. Microcosmes : phytoplancton (2004, 2005, 2006) ... 65
2.2. Microcosmes : phytoplancton et naissain d'huîtres (2006) ... 65
2.3. Structure supportant les microcosmes ... 66
3. Traitement des échantillons ... 69
3.1. Communautés phytoplanctoniques ... 69
3.1.1. Extraction d'ADN ... 69
3.1.2. Amplification de l'ADN ... 69
3.1.3. Empreintes génétiques ... 70
3.1.4. Cytométrie en flux ... 70
3.1.5. Empreintes pigmentaires par HPLC ... 70
3.1.6. Identification et dénombrement au microscope ... 70
3.1.7. Analyses statistiques ... 70
3.2. Naissain d'huîtres ... 71
3.2.1. Production et fixation des larves ... 71
3.2.2. Répartition des plaques en microcosmes ... 71
3.2.3. Évaluation de la mortalité ... 72
3.2.4. Évaluation de la croissance ... 72
3.2.5. Mesure de la matière organique et des cendres ... 72
3.2.6. Mesure de la chlorophylle *a* ... 72
3.2.7. Analyses statistiques ... 72
3.3. Pesticides ... 72
3.3.1. Glyphosate et AMPA ... 72
3.3.2. Autres pesticides testés ... 72

Chapitre 3 – Impact des pesticides sur le phytoplancton naturel et le naissain d'huîtres ... 73

1. Comparaison de trois méthodes d'analyse des communautés : impact du fongicide Opus ... 75
1.1. Introduction ... 75
Article 1 – Comparative study of three analysis methods (TTGE, flow cytometry and HPLC) for xenobiotic impact assessment on phytoplankton communities ... 76
1.2. Synthèse ... 99
2. Impact du Roundup sur les communautés microbiennes marines ... 101
2.1. Introduction ... 101
Article 2 – Impact of Roundup on the marine microbial community, as shown by an *in situ* microcosm experiment ... 102
2.2. Synthèse ... 112
3. Utilisation de microcosmes *in situ* pour évaluer l'impact de pesticides sur du naissain d'huître creuse ... 115
3.1. Introduction ... 115
Article 3 – *In situ* microcosms, a tool for assessment of pesticide impacts on oyster spat (*Crassostrea gigas*) ... 116
3.2. Synthèse ... 127
4. Synthèse générale ... 129
4.1. Expériences réalisées ... 129
4.2. Herbicides ... 131
4.2.1. Basamaïs® (bentazone) ... 131

4.2.2. Frontier® (diméthénamide) ... 133
4.2.3. Roundup® (glyphosate) ... 136
4.2.4. Milagro® (nicosulfuron) ... 138
4.3. Fongicide : Opus® (époxiconazole) ... 140
4.4. Insecticide : Dursban 4® (chlorpyrifos) ... 142
4.5. Discussion générale ... 144

Conclusion générale et perspectives ... 147

Bibliographie ... 151

Glossaire ... 167

Liste des abbréviations ... 169

Table des illustrations ... 171

Nouveau chapitre de la thèse – 2007 ... 173

Résumé

L'objectif principal de cette thèse était d'étudier l'impact de pesticides sur les communautés naturelles de phytoplancton côtier et sur le naissain d'huître creuse, en microcosmes *in situ*. Les communautés microbiennes (<200 µm) ont été exposées à six pesticides (quatre herbicides, un insecticide et un fongicide) à 0.1, 1, 10 et 100 µg/L de substance active, lors de dix expérimentations *in situ*. Le contenu des microcosmes a été analysé par trois méthodes :

- la « Temporal Temperature Gradient gel Electrophoresis » (TTGE), ou gel d'éléctrophorèse avec gradient de température dans le temps, permettant d'obtenir les empreintes génétiques des communautés procaryotes (avec l'ADN codant pour l'ARN ribosomal 16S) et eucaryotes (avec l'ADN codant pour l'ARN ribosomal 18S) ;
- la cytométrie en flux, qui permet de discriminer certaines populations photosynthétiques en fonction, notamment, de leurs signaux d'autofluorescence ;
- la Chromatographie Liquide Haute Pression (HPLC), permettant d'obtenir les empreintes pigmentaires des communautés photosynthétiques.

Des observations microscopiques ont complété l'analyse de certaines expériences. Les principaux résultats obtenus suggèrent une meilleure sensibilité de la TTGE pour la détection d'effets sur la structure de l'ensemble des communautés eucaryotes ou procaryotes, comparée aux deux autres méthodes qui concernent plus spécifiquement les communautés photosynthétiques.

Parmi les six formulations commerciales testées à 0.1 µg/L, aucun effet n'est détecté. Par contre, quatre formulations sont susceptibles de représenter un danger pour les communautés microbiennes à partir de 1 µg/L : les herbicides Basamaïs (bentazone), Roundup (glyphosate), Frontier (diméthénamide), ainsi que l'insecticide Dursban 4 (chlorpyrifos).

L'herbicide Basamaïs et le fongicide Opus ont été testés sur le naissain d'huître creuse, seuls à 10 et 70 µg/L, et en mélange à 10 µg/L chacun, au cours d'une expérimentation *in situ*. Les résultats obtenus démontrent un effet synergique des deux pesticides en mélange à 10 µg/L : la croissance du naissain est réduite de moitié, alors qu'elle n'est pas affectée par les pesticides seuls à 10 µg/L.

Cette thèse permet d'illustrer les dangers potentiels représentés par certains pesticides en milieu côtier, en particulier par le Roundup dont les effets apparaissent pour des concentrations testées proches des concentrations environnementales. Les résultats obtenus sur le naissain posent la question des interactions entre molécules et donc de la pertinence des seuils de toxicité réglementaires pour les substances seules, alors même que ces seuils peuvent être différents lorsque des interactions se produisent dans l'environnement.

***Mots-clés** : pesticides, phytoplancton, communautés microbiennes, naissain, TTGE, HPLC, cytométrie en flux, microcosmes in situ.*

Abstract

The main goal of this work was the study of pesticide effects on natural communities of coastal phytoplankton and oyster spat, using *in situ* microcosms. Microbial communities (<200 µm) were exposed to six pesticides (four herbicides, one insecticide and one fongicide) at four concentrations (0.1, 1, 10 and 100 µg/L of active substance) during ten *in situ* experiments. The microcosm content was analysed using three methods:

– Temporal Temperature Gradient gel Electrophoresis (TTGE) provides prokaryote (16S DNA) and eukaryote (18S DNA) community genetic fingerprints;
– flow cytometry allows the discrimination of photosynthetic populations according to their scatter and fluorescence signals;
– High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) provides pigment fingerprints of the photosynthetic communities.

Microscopic observations were carried out for some experiments in order to provide further information. The main results suggest TTGE as the most sensitive method to detect pesticide effects on the whole prokaryote and eukaryote community structure, compared with the two others methods that only focus on photosynthetic communities.

No effect was detected when communities were exposed to the lowest concentration (0.1 µg/L) of each six pesticides. However, the three herbicides Basamaïs (bentazon), Roundup (glyphosate), Frontier (dimethenamid), and the insecticide Dursban 4 (chlorpyrifos) are likely to represent a danger for microbial communities from1 µg/L.

Young oyster spat was exposed *in situ* to the herbicide Basamaïs and the fongicide Opus separately at 10 and 70 µg/L, and to a mixture of Basamaïs and Opus at 10 µg/L each. The results show a synergistic effect of the mixture on spat growth, with treated spat growth being half the control value, when no effects were detected when both pesticides were tested separately at 10 µg/L.

This work shows that some pesticides can generate possible adverse effects in coastal areas. Roundup effects must be pointed out as they were detected at environmentally realistic concentrations. The results observed using oyster spat raise the issue of interactions between chemicals in the natural environment. Therefore, the relevance of reglementary toxicity thresholds, that do not include such possible substance interactions, should be re-examined.

Keywords*: pesticides, phytoplankton, microbial communities, oyster spat, TTGE, HPLC, flow cytometry, in situ microcosms.*

Avant-propos

La France est l'un des principaux pays utilisateurs de pesticides. De nombreux milieux sont contaminés par ces substances, dont les eaux continentales superficielles et profondes, mais aussi les eaux estuariennes et côtières. Face à ce constat, le Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement a initié en 1999 un programme de recherche visant à l'évaluation et à la réduction des risques liés à l'utilisation des pesticides. Ce programme concerne trois domaines :

– Dynamique des pesticides dans l'environnement ;
– Évaluation des effets des pesticides sur des systèmes biologiques complexes ;
– Nouvelles approches visant à réduire les risques liés à l'usage des pesticides.

Le sujet de cette thèse s'inscrit dans le deuxième domaine de l'appel à propositions initié en 2002, qui concerne notamment des expérimentations portant sur des assemblages d'espèces placées dans des conditions environnementales réalistes. Cette thèse est une partie d'un projet plus vaste financé par le Ministère : IPEM (Impact des Pesticides sur l'Environnement Marin). Ce projet est le résultat d'une collaboration entre le Laboratoire d'Écotoxicologie d'Ifremer (Brest-Nantes), le Laboratoire de Biotechnologie et Physiologie Végétales de l'UBO (Université de Bretagne Occidentale, Brest), le Laboratoire Idhesa (Brest) et le Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Écologie Microbienne (LUBEM, UBO, Quimper). Un financement complémentaire incluant mon salaire de thèse a été obtenu de la Région Bretagne : c'est le projet IMPESPHY (IMpact des PESticides sur le PHYtoplancton marin côtier et les jeunes stades de développement des bivalves).

La thèse (2004-2007) a été effectuée sous la direction de Denis de la Broise, au LUBEM à Quimper, laboratoire qui rassemble des thématiques variées autour de l'interaction des organismes microbiens (champignons, phytoplancton, bactéries alimentaires et marines) avec leur environnement. Cependant, l'équipement et les savoir-faire présents au laboratoire correspondaient aux domaines de la microbiologie classique et de la biochimie. Les études écotoxicologiques en milieu marin étaient de développement récent (2000-2003) lors de mon arrivée, c'est pourquoi les expérimentations *in situ* et certains des outils analytiques utilisés (microcosmes, TTGE) ont été développés ou optimisés dans le cadre du projet IPEM et/ou de la thèse.

Les projets IPEM et IMPESPHY se sont achevés en 2007.

Introduction générale et objectifs de l'étude

En milieu océanique, le phytoplancton joue un rôle essentiel en tant que producteur primaire : grâce à l'énergie lumineuse, il métabolise le dioxyde de carbone atmosphérique pour fabriquer de la matière organique. Il est à la base des réseaux trophiques océaniques.

Dans le domaine hauturier, la production phytoplanctonique est principalement limitée par les concentrations en sels nutritifs de la couche euphotique. En zones côtières, les apports continentaux véhiculés par les fleuves enrichissent le milieu : si ces zones ne représentent que 8% de la surface des océans (Hoch, 1998), elles jouent un rôle important dans la production biologique océanique. Les concentrations élevées en sels nutritifs favorisent la production phytoplanctonique : elles permettent ainsi le développement de réseaux trophiques riches et complexes. Les zones côtières regroupent des habitats uniques et variés, fournissant à de nombreuses espèces aquatiques des espaces de refuge, de reproduction, de ponte, et des nourrisseries pour les larves et les juvéniles. 80% des ressources vivantes marines mondiales y sont exploitées (Hoch, 1998). Elles fournissent 25 à 50% du carbone organique marin (Hoch, 1998), mais sont soumises à une forte pression anthropique : elles subissent les nuisances et pollutions provenant des rejets urbains, des industries, de l'agriculture, du tourisme et des multiples usages (pêche, aquaculture, activités nautiques) qui y coexistent. En effet, 39% de la population mondiale sont concentrés sur une bande côtière de 100 km (source : http://earthtrends.wri.org).

Les rejets générés par les activités humaines contiennent des contaminants nocifs pour l'environnement parmi lesquels figurent les pesticides. Ces substances peuvent se retrouver dans les écosystèmes aquatiques via les précipitations et les phénomènes de ruissellement et de lessivage des sols (Figure 1).

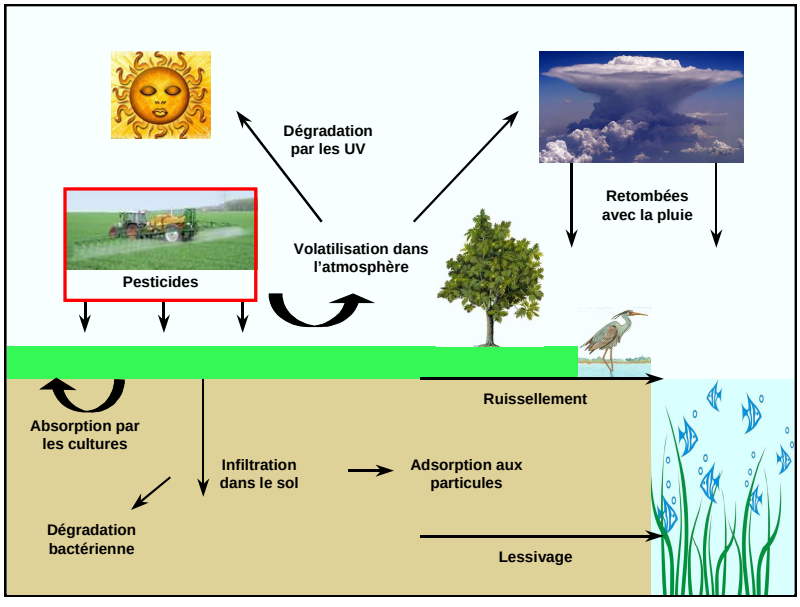


Figure 1 - Cycle des pesticides

Au niveau aquatique, les pesticides sont susceptibles d'affecter le phytoplancton, qui a un rôle majeur dans le maintien des écosystèmes. Ces organismes photosynthétiques ont des caractéristiques physiologiques proches de celles des végétaux supérieurs et sont donc susceptibles d'être impactés par certains herbicides ; le phytoplancton peut aussi représenter une cible inattendue pour d'autres types de pesticides, comme les fongicides, les insecticides…

Les organismes phytoplanctoniques ayant des temps de génération relativement courts (de l'ordre du jour), des expositions même brèves à certains pesticides sont susceptibles de modifier l'équilibre de ces communautés. Les conséquences possibles sont une perturbation de la boucle microbienne, qui joue un rôle très important dans le recyclage des nutriments. Les niveaux supérieurs des réseaux trophiques peuvent eux aussi être impactés, en particulier les consommateurs primaires constitués par les brouteurs.

L'objectif principal de ce travail de thèse était d'étudier l'impact de pesticides sur les communautés naturelles de phytoplancton marin côtier, en développant un outil basé sur des microcosmes *in situ* et qui permette de maintenir les communautés dans des conditions proches de l'environnement naturel. Le but était de réaliser des expositions à différentes périodes de l'année, au cours du printemps et de l'été, en testant des concentrations de pesticides allant de 0.1 µg/L à 100 µg/L. Les pesticides testés, sous forme de formulations commerciales, sont quatre herbicides (bentazone, diméthénamide, glyphosate et nicosulfuron), un fongicide (époxiconazole) et un insecticide (chlorpyrifos-éthyl). Trois méthodes d'analyse de la structure des communautés ont été appliquées aux microcosmes :

– la TTGE (Temporal Temperature Gradient gel Electrophoresis) ;
– l'HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) des pigments ;
– la cytométrie en flux.

Une analyse microscopique des communautés phytoplanctoniques a été effectuée sur certains échantillons afin de compléter les données obtenues avec les trois autres méthodes.

Afin d'appréhender les effets des pesticides sur les mollusques bivalves, un protocole d'exposition de naissain d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* a été développé en utilisant les microcosmes *in situ*.

Le premier chapitre de ce mémoire est consacré au contexte scientifique de l'étude. Il présente le phytoplancton et son écotoxicologie, les méthodes d'analyses appliquées aux communautés naturelles, l'huître creuse et enfin les pesticides testés.

Le second chapitre présente les matériels et méthodes : sites expérimentaux, dispositif des microcosmes *in situ* et analyses appliquées aux échantillons.

Le troisième chapitre intègre, sous la forme de trois articles et d'une synthèse générale, les résultats obtenus suite à l'exposition des communautés microbiennes et du naissain d'huître creuse à différents pesticides.

Une conclusion générale ainsi que des perspectives sont présentées à la fin du document.

Le Nouveau Chapitre de la Thèse, réalisé en partenariat avec l'Association Bernard Gregory, est présenté comme chapitre annexe : il s'agit d'un état des lieux extra-disciplinaire. Cet

exercice de valorisation vise à faire le point sur les compétences et savoir-faire professionnels développés au cours des trois années de thèse, ainsi que sur la répartition du temps et les aspects financiers. La forme et le contenu correspondent à un modèle imposé qui incite le doctorant à se mettre en valeur en tant que principal acteur dans le projet de thèse.

Chapitre 1 – Contexte scientifique

1. Phytoplancton

1.1. Présentation

1.1.1. Définition

Le phytoplancton (du grec *phuton*, plante, végétal et *plagktos*, errant) correspond aux organismes photosynthétiques, de taille microscopique, vivant en suspension dans l'eau et soumis aux mouvements des masses d'eau. Ces microalgues peuvent, grâce aux radiations photosynthétiquement actives (PAR) du rayonnement lumineux, métaboliser le dioxyde de carbone atmosphérique pour fabriquer de la matière organique. C'est ainsi qu'au niveau aquatique et donc océanique, le phytoplancton est le principal producteur primaire, source de matière organique, qui soutient le développement des maillons du réseau trophique océanique.

On distingue trois classes de taille en écologie phytoplanctonique (Sieburth *et al*., 1978) :

– le microphytoplancton : 20-200 µm

– le nanophytoplancton : 2-20 µm

– le picophytoplancton : 0.2-2 µm

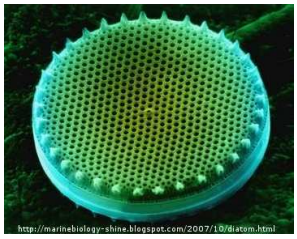
Au niveau marin, on estime qu'il existe environ 4000 espèces de phytoplancton (Sournia *et al*., 1991), réparties dans environ 490 genres. Les principales classes rencontrées sont décrites brièvement ci-après.

1.1.2. Principales classes algales

d'après Sournia, 1986 ; Ricard, 1987 ; Chrétiennot-Dinet, 1990 ; Jeffrey *et al*., 1997 ; Lampert, 2001

Les communautés phytoplanctoniques sont constituées d'assemblages d'espèces aux caractéristiques biologiques (taille, forme…) et physiologiques (nutrition, croissance…) variées (Smayda, 1997a), et forment un ensemble hétérogène. Les cellules sont majoritairement autotrophes, mais certaines espèces peuvent être temporairement hétérotrophes, chez les dinoflagellés notamment. Les deux classes de phytoplancton marin les plus représentées sont les diatomées et les dinoflagellés.

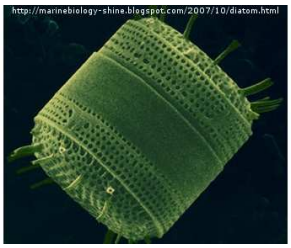
Diatomées (Bacillariophycées)



Les diatomées représentent le groupe le mieux connu parmi les microalgues. Elles font partie des fractions nano- et microphytoplanctoniques et sont constituées d'un frustule siliceux avec deux valves, l'hypothèque et l'épithèque. Selon la symétrie du frustule, on distingue deux ordres de diatomées : les diatomées Centrales et les Pennales. Les diatomées peuvent se présenter sous la forme de cellules individualisées, mais elles peuvent aussi former des chaînes.

Les diatomées sont représentées dans tous les océans du globe. Dans les zones tempérées, ce sont généralement les premières à apparaître au printemps, lorsque les conditions de lumière

et de température ne sont plus limitantes pour leur développement. Elles profitent ainsi de conditions nutritives idéales, les apports continentaux ayant enrichi les zones côtières durant l'hiver.

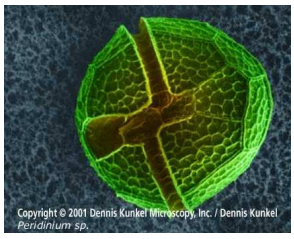


Les pigments majoritairement présents chez les diatomées, déterminés à partir de 51 espèces marines, sont les chlorophylles *a*, c_1 et c_2 et les caroténoïdes fucoxanthine, diadinoxanthine, diatoxanthine et le β,β-carotène. Chez un petit pourcentage de diatomées, la chlorophylle c_3 remplace la c_1 (Stauber et Jeffrey, 1988).

Dinoflagellés (Dinophycées)

Les dinoflagellés sont des algues unicellulaires flagellées qui peuvent être autotrophes ou hétérotrophes. Ces organismes se trouvent en majorité dans les fractions nano- et microphytoplanctoniques et sont équipés de deux flagelles. Certaines espèces sont pourvues d'une thèque cellulosique, d'autres sont nues. La plupart sont retrouvées sous forme de cellules individualisées, mais certaines peuvent aussi former des chaînes.

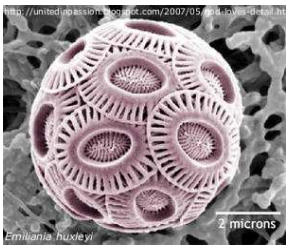
Les dinoflagellés se rencontrent dans tous les océans du globe, et peuvent être responsables d'efflorescences toxiques (ex : marées rouges) préjudiciables aux activités de pêche et d'aquaculture notamment. On les retrouve dans 75% des efflorescences toxiques (Smayda, 1997b). Dans les zones tempérées, le développement des dinoflagellés suit celui des diatomées, lorsque l'acide silicique nécessaire à ces dernières pour la constitution de leur frustule devient limitant.



Au niveau du contenu pigmentaire, la plupart des dinoflagellés photosynthétiques contiennent les chlorophylles *a* et c_2 et les caroténoïdes β,β-carotène, péridinine, dinoxanthine et diadinoxanthine (Jeffrey *et al*., 1997).

Prymnésiophycées

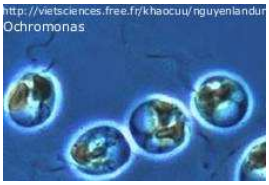
Les prymnésiophycées sont des flagellés unicellulaires appartenant à la fraction nanophytoplanctonique. On les retrouve dans toutes les eaux du globe, même s'ils sont plus abondants dans les océans tropicaux et subtropicaux. Les plus connus sont les coccolithophoridés équipés de plaques calcaires et qui constituent les sédiments de la Mer du Nord ainsi que les falaises blanches de la Manche. Certaines prymnésiophycées interviennent aussi dans des efflorescences toxiques. Dans les zones tempérées, leur développement peut faire suite à celui des diatomées, une fois que l'acide silicique est devenu limitant pour ces dernières.



Quatre types de contenus pigmentaires ont été déterminés à partir de 29 espèces de prymnésiophycées (Jeffrey et Wright, 1994). Les pigments majoritaires sont les chlorophylles *a*, c_1 ou c_3, c_2, le β,β-carotène, la fucoxanthine et/ou la 19'-hexanoyloxyfucoxanthine, la 19'-butanoyloxyfucoxanthine, la diadinoxanthine et la diatoxanthine.

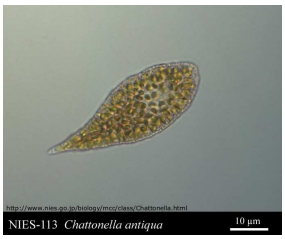
Chrysophycées

Les chrysophycées sont des algues unicellulaires ou coloniales, le plus souvent flagellées. Il existe trois types de chrysophycées marines : les silicoflagellés (microphytoplancton), les pélagophycées (picophytoplancton) et les parmales (nanophytoplancton). Leurs pigments majoritaires sont les chlorophylles *a*, c_1, c_2, la fucoxanthine, la 19'-butanoyloxyfucoxanthine et la diadinoxanthine.



Raphidophycées

La classe des raphidophycées est peu fournie, avec un ou deux genres marins. Les raphidophycées font partie du microphytoplancton et ont deux flagelles. Les cellules sont nues, fragiles et déformables. Leurs pigments majoritaires sont les chlorophylles *a*, c_1, c_2, la fucoxanthine, le β,β-carotène et la violaxanthine.



Cryptophycées

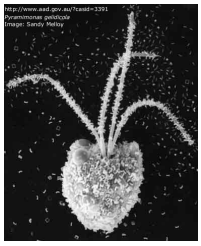
Les cryptophycées sont largement représentées en milieu marin. Ce sont des cellules nano-phytoplanctoniques, ovoïdes et asymétriques, possédant deux flagelles. Elles possèdent les chlorophylles *a* et c_2, le β,ε-carotène, l'alloxanthine et la monadoxanthine.

Chlorophycées

Les chlorophycées sont des algues vertes largement répandues, mais peu de représentants sont à la fois unicellulaires, planctoniques et marins. Les formes unicellulaires sont flagellées, mobiles et nues, et appartiennent en majorité à la fraction nanophytoplanctonique. Elles contiennent les chlorophylles *a* et *b*, le β,β-carotène, la lutéine, la violaxanthine et la néoxanthine.

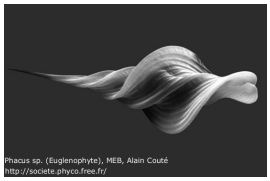
Prasinophycées

Les prasinophycées constituent un ensemble hétérogène de flagellés verts primitifs, recouverts de petites écailles organiques. Elles sont unicellulaires ou en colonies. On les retrouve dans toutes les classes de taille. Elles peuvent contenir les mêmes pigments que les chlorophycées, d'autres prasinophycées peuvent aussi posséder la MgDVP, la prasinoxanthine et la zéaxanthine.



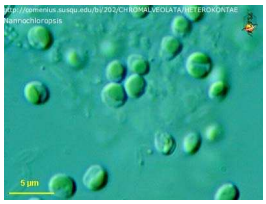
Eugénophycées

Les euglénophycées sont peu répandues en milieu marin. La plupart des espèces marines sont de grands flagellés fusiformes microphytoplanctoniques. Elles peuvent utiliser les composés organiques dissous pour leur croissance. Leur présence peut donc être



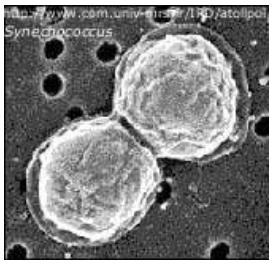
une indication de pollution organique. Elles contiennent des chlorophylles *a* et *b*, de la diadinoxanthine du β,β-carotène, de la néoxanthine et de la zéaxantine.

Eustigmatophycées



Les eustigmatophycées sont des microalgues généralement coccoïdes, appartenant au nanophytoplancton. Cette classe récente (Hibberd, 1981) n'a qu'une seule famille connue en milieu marin. Ces cellules contiennent de la chlorophylle *a*, du β,β-carotène, de la violaxanthine et de l'ester de vauchériaxanthine.

Cyanobactéries



Les cyanobactéries sont des procaryotes de la fraction picophytoplanctonique. On en trouve dans tous les océans du globe. Ce sont les plus anciens organismes photosynthétiques, qui sont à l'origine de l'apparition du dioxygène sur notre planète. Les cyanobactéries peuvent être unicellulaires, filamenteuses ou coloniales. Le genre *Prochlorococcus* (Chisholm *et al*, 1992) constitue le groupe d'organismes photosynthétiques le plus abondant sur Terre (Partensky *et al*, 1999). Le genre dominant dans nos eaux est *Synechococcus*, qui a été découvert tardivement (Waterbury, 1979). Le contenu pigmentaire des cyanobactéries regroupe la chlorophylle *a*, le β,β-carotène, la zéaxanthine et des phycobiliprotéines.

1.2. Phytoplancton et écotoxicologie

1.2.1. Écotoxicologie : définition et principe

L'écotoxicologie recouvre les domaines de l'écologie et de la toxicologie. Cette science étudie les impacts des agents polluants sur la structure et le fonctionnement des écosystèmes (Ramade, 2007).

L'écotoxicologie peut s'appliquer à différents niveaux d'organisation biologiques, allant de la cellule à la communauté, voire à l'écosystème. Elle intègre ainsi les interactions entre ses composants et les facteurs abiotiques (Boudou et Ribeyre, 1997). Cela permet d'évaluer des effets toxiques sur des systèmes de complexité variable, selon le nombre de niveaux trophiques intégrés d'une part, et selon le degré de représentativité environnementale d'autre part, avec des conditions physico-chimiques contrôlées ou naturelles.

L'écotoxicologie appliquée au phytoplancton fait intervenir au minimum une population, cultivée en conditions contrôlées en laboratoire pour réaliser des tests monospécifiques ; mais l'impact d'une substance peut aussi être étudié sur une communauté naturelle, en présence ou non d'autres éléments du réseau trophique.

Les études écotoxicologiques qui étudient les relations dose-effet permettent d'obtenir certaines concentrations critiques qui peuvent être définies de la manière suivante (E.C., 2003) :

– la toxicité aiguë d'un contaminant est exprimée en CE_X, c'est-à-dire la concentration efficace de la substance qui entraîne une réduction du paramètre mesuré de X% par rapport à un témoin ;
– la concentration la plus faible provoquant un effet ou « Lowest Observed Effect Concentration » (LOEC), est la plus faible concentration testée pour laquelle un effet de plus de 10% est observé (lorsque des analyses statistiques sont réalisées ; sinon, la LOEC correspond à un pourcentage d'effets compris entre 20 et 30%) ;
– la Concentration Sans Effet Observé (CSEO) ou « No Observed Effect Concentration » (NOEC), est la plus forte concentration testée pour laquelle le résultat n'est pas significativement différent de celui obtenu pour les témoins (lorsque des analyses statistiques sont réalisées ; sinon, c'est la concentration la plus forte pour laquelle 10% d'effets ou moins sont observés (CE_{10})).

1.2.2. Tests monospécifiques

Les tests monospécifiques représentent l'approche la plus simple et la plus pratique à mettre en oeuvre lorsqu'il s'agit d'étudier la toxicité d'une substance sur le phytoplancton. En effet, le principe consiste à cultiver une espèce dans des conditions physiques (lumière, température) et chimiques (pH, sels nutritifs, contaminant) prédéfinies et contrôlées. Qu'ils soient normalisés ou non, ces tests offrent les avantages suivants : rapidité de réponse (24 à 96h), possibilité d'avoir de nombreux réplicats et de tester facilement la reproductibilité des résultats.

Les tests monospécifiques les plus simples consistent à tester une substance sur une seule espèce. Ces bioessais sont très utilisés dans le domaine des pesticides. Ainsi Soukupova *et al*. (1999) ont testé le diuron sur la diatomée marine *Phaeodactylum tricornutum*, tandis que Yang *et al*. (2002) ont testé le 2,4-dichlorophénol (utilisé pour la production de l'herbicide 2,4-D) sur la diatomée marine *Skeletonema costatum*, et González-Barreiro *et al*. (2004) ont testé l'effet de l'herbicide atrazine sur la cyanobactérie d'eau douce *Synechococcus elongatus*.

Certains auteurs (Pennington et Scott, 2001) ont même réalisé l'exposition répétée d'une espèce (*Pavlova* sp.) à l'atrazine, mettant ainsi en évidence l'importance de l'historique de l'exposition des organismes. En effet, dans cette étude, l'exposition répétée de *Pavlova* sp. à une concentration d'atrazine sans effet observé, suivie d'une exposition aiguë, aboutit à une sensibilité plus marquée de l'espèce à l'herbicide. Cette étude soulève d'importantes questions quant aux limites des tests monospécifiques : l'espèce testée va-t-elle réagir différemment en fonction de son environnement d'origine (pollué ou sain) ? La sensibilité des organismes soumis à des expositions répétées varie-t-elle toujours dans le même sens ? Il semble que les souches issues d'environnements contaminés puissent développer des mécanismes de tolérance ou de résistance. Par exemple, Seguin *et al*. (2001) ont testé l'atrazine sur deux souches d'une même espèce (*Chlorella vulgaris*), dont l'une provenait d'un site pollué. La CE_{50} de cette dernière s'est révélée 40 fois plus élevée que celle de la souche provenant du site non pollué. Parmi les autres facteurs susceptibles d'influencer la réponse des organismes à un toxique, on peut citer la température : Bérard *et al*. (1999a) ont montré que la sensibilité d'*Oscillatoria limnetica* à l'atrazine était deux fois plus importante à basse température, en

laboratoire comme en microcosmes *in situ*, soulignant l'importance de ce paramètre dans la réponse d'une espèce à une exposition. Les conditions d'enrichissement du milieu de culture jouent aussi un rôle dans la sensibilité de l'espèce testée : par exemple, Arzul et Durand (1999) ont montré que le taux de croissance de la diatomée marine *Chaetoceros gracilis* était réduit de 70% lorsque l'algue était exposée à 0.025 µg/L d'atrazine, avec un enrichissement nutritif pauvre correspondant à des conditions estivales. Par contre, l'espèce cultivée en conditions d'enrichissement maximal, correspondant à la fin de l'hiver, ne montrait un taux de croissance réduit qu'à partir de 20 µg/L d'atrazine. Cette étude illustre l'importance des facteurs environnementaux, aussi bien physiques, comme la température, que chimiques, dans la réponse d'un organisme à un toxique.

L'intérêt de ces tests faciles à réaliser est aussi de pouvoir tester plusieurs substances sur une même espèce, afin d'établir une « échelle » de toxicité pour l'espèce considérée. Ainsi, l'algue d'eau douce *Scenedesmus quadricauda* exposée à trois herbicides, le glyphosate, le 2,4-D et le paraquat, s'est montrée plus sensible au paraquat dans les conditions de l'expérience de Wong (2000). *Chlorella vulgaris* est plus sensible au terbutryn qu'à l'isoproturon, avec une $CE_{50\text{-}96h}$ deux fois plus élevée pour l'isoproturon (Rioboo *et al*., 2002). D'autres auteurs (Santín-Montanayá *et al*., 2007) ont démontré l'intérêt des tests monospécifiques pour faire une évaluation comparative de la sensibilité d'une espèce marine, *Dunaliella primolecta*, à quatre herbicides. Ils ont développé un test optimisé en microplaques de 96 puits, ce qui permet donc de tester plusieurs substances simultanément tout en conservant un nombre de réplicats suffisants pour une exploitation statistique des résultats.

Réalisés dans les mêmes conditions d'exposition, d'enrichissement et d'ensemencement, mais sur différentes espèces de phytoplancton, ces tests apportent une comparaison des sensibilités de ces dernières. De cette manière, plusieurs auteurs ont pu illustrer la grande variabilité inter-spécifique de la sensibilité aux contaminants. Par exemple, la toxicité comparée de l'atrazine et du nicosulfuron sur sept espèces de microalgues d'eau douce révèle que l'atrazine est bien plus toxique que le nicosulfuron, les espèces les plus sensibles étant *Chlorella vulgaris* Léman et *Scenedesmus acutus* (Seguin *et al*. 2001). Cette étude a mis en évidence une grande variabilité de la sensibilité des espèces testées, la moins sensible ayant une CE_{50} 100 fois plus élevée que la plus sensible. La toxicité plus importante de l'atrazine sur les microalgues d'eau douce par rapport au nicosulfuron est confirmée par Leboulanger *et al*. (2001), qui ont testé ces molécules sur quatre espèces, les plus sensibles étant *Oscillatoria limnetica* et *Chlorella vulgaris*. Dans la même lignée, Bérard *et al*. (2003) ont testé l'irgarol 1051 et l'atrazine sur 9 espèces d'eau douce, et en concluent que les espèces testées étaient beaucoup plus sensibles à l'irgarol 1051 qu'à l'atrazine. Les trois plus sensibles à l'irgarol étaient *Navicula accomoda*, *Nitzschia* sp. et *Chlamydomonas intermedia*. Les plus sensibles à l'atrazine étaient *Chlorella vulgaris*, *Chlamydomonas intermedia* et *Scenedesmus acutus*. Cette étude illustre le fait que les espèces très sensibles à une substance peuvent avoir une sensibilité moindre pour d'autres substances. De nombreuses études ont été réalisées, testant plusieurs pesticides sur plusieurs espèces de phytoplancton marin ou d'eau douce (Bengtson Nash *et al*., 2005 ; González-Barreiro *et al*., 2006). Nyström *et al*. (1999) ont testé l'inhibition de croissance de 20 espèces d'algues d'eau douce et 20 espèces marines par les herbicides chlorsulfuron et metsulfuron. Les CE_{50} allaient de 0.045 µM à 770 µM pour le chlorsulfuron chez les espèces d'eau douce

et de 5 à 1003 µM pour les espèces marines. Elles étaient comprises entre <0.001 et 320 µM pour le metsulfuron chez les espèces d'eau douce et entre <0.001 et >1000 µM pour les espèces marines. On voit ici l'étendue de la variabilité inter-spécifique de la sensibilité qui, dans ce dernier cas, couvre six ordres de grandeur. On comprend aisément qu'en fonction de l'espèce testée, la toxicité de la substance peut facilement être sous-estimée, puisqu'il n'y a pas une seule espèce qui serait très sensible à toutes les substances (Cairns 1986). En vertu du principe de précaution, il vaut mieux se baser sur les sensibilités les plus marquées pour évaluer les risques posés par une substance. Récemment, Gatidou et Thomaidis (2007) ont démontré que le diuron et l'irgarol 1051 représentent un risque environnemental, puisque les CE_{50} déterminées pour les espèces marines *Dunaliella tertiolecta* et *Navicula forcipata* sont dans les gammes de concentrations retrouvées en milieu marin pour ces substances. De plus, les auteurs insistent sur l'intérêt d'étudier la toxicité des substances et/ou de leurs métabolites en mélange, une exposition simultanée à plusieurs substances pouvant générer des effets additifs, antagonistes ou synergiques.

La sensibilité des espèces aux polluants est-elle également influencée par leur mode de conservation (repiquages réguliers ou congélation, conditions de lumière, température et nutriments) ? Dans le cas d'une conservation classique par repiquages, puisque l'évolution du patrimoine génétique de la souche n'est plus soumise aux contraintes environnementales naturelles, est-ce que la souche testée a encore les mêmes propriétés que la souche de départ isolée à partir du milieu naturel ? Quelle est l'influence des éventuels traitements anti-bactériens sur la sensibilité des espèces aux contaminants ? Dans quelle mesure ces facteurs interagissent-ils avec la réponse des cellules à un toxique ? C'est parce que tous ces facteurs ont une influence sur le comportement des cellules qu'il est nécessaire de bien définir les conditions de l'expérience. Dans ce cas, quelle est la valeur environnementale des sensibilités ou des toxicités démontrées ?

Le but de l'écotoxicologie est d'évaluer l'impact d'un contaminant dans l'environnement naturel. Étant donné la complexité des phénomènes qui influencent l'expression d'une toxicité au niveau d'une population phytoplanctonique, la recherche s'est tournée vers des systèmes simplifiés à l'extrême : les tests monospécifiques en conditions contrôlées. Cependant, il apparaît évident que le seuil de toxicité démontré en laboratoire et en conditions parfaitement contrôlées, n'est pas forcément représentatif du seuil de toxicité qui peut intervenir en milieu naturel, au niveau de communautés. C'est pourquoi Seguin *et al.* (2001) recommandent l'utilisation de tests sur des communautés naturelles en micro- et mésocosmes pour obtenir des données fiables sur la toxicité d'une substance au niveau d'écosystèmes aquatiques.

1.2.3. Tests plurispécifiques

Afin de pallier aux inconvénients des tests monospécifiques, depuis 40 ans les écotoxicologues ont développé des approches plus complexes et plus intégratives. Les systèmes expérimentaux mis en place, de taille et complexité variables, ont pour objectif de fournir une description plus réaliste du devenir et des impacts des contaminants au niveau d'écosystèmes simplifiés ou miniaturisés. Ces micro- et mésocosmes offrent la possibilité de tester des xénobiotiques seuls ou en mélange, sur une ou plusieurs composantes des

écosystèmes naturels qu'ils tendent à mimer. Les termes microcosmes et mésocosmes n'ont pas de définition précise, la distinction entre les deux peut être faite en fonction de leur taille et/ou de leur complexité. Caquet *et al*. (1996) proposent l'emploi du terme « mésocosme » pour les systèmes artificiels placés en conditions environnementales naturelles, et qui affichent une complexité et une stabilité suffisantes pour être viables et s'auto-entretenir. Dans ce travail de thèse, le terme mésocosme est employé pour les unités expérimentales volumineuses situées à l'extérieur et incluant plusieurs niveaux trophiques. Giddings et Eddlemon (1979) décrivent les microcosmes comme des unités expérimentales uniques pour évaluer le comportement de contaminants au niveau écologique, permettant de combler les lacunes entre les tests d'écotoxicité normalisés et les études de terrain. De plus, ces systèmes préservent la complexité écologique et la stabilité caractéristique des environnements naturels. Une grande variété de systèmes a été décrite dans la littérature scientifique, mais nous nous focalisons ici principalement sur les systèmes d'étude incluant le compartiment phytoplanctonique ou périphytique, si possible exposé à un pesticide ou à un biocide.

Microcosmes "indoor"

Les microcosmes indoor sont des unités expérimentales situées hors du contexte écologique naturel, en laboratoire ou en serres. Le volume des unités, la durée de l'expérience, le nombre de maillons trophiques, ainsi que l'origine des organismes et de l'eau utilisée sont très variables et dépendent notamment des objectifs des études, mais aussi des facteurs logistiques, financiers et humains.

Une approche assez simple du point de vue écologique et certainement peu coûteuse, a été mise en place par Gustavson *et al*. (2003) pour évaluer l'effet du temps d'exposition de quatre herbicides sur du périphyton. Après deux à trois semaines de colonisation du périphyton naturel de ruisseau sur des petits disques en verre, les disques ont été incubés en tubes de 10 mL enrichis afin de favoriser la croissance du périphyton. L'expérience, réalisée sur 48 h et à deux moments de l'année, a permis de montrer une grande variabilité de réponse des communautés périphytiques, selon la saison et donc la composition de la communauté, et le temps d'exposition aux herbicides. Les auteurs soulignent qu'un test de ce type réalisé sur des communautés composées d'espèces tolérantes aux herbicides pourrait conduire à une sous-estimation du risque. En effet, des expériences ont été réalisées sur des communautés naturelles de phytoplancton et périphyton, prélevées sur plusieurs sites plus ou moins pollués du Lac Léman (Bérard *et al*., 2003). Ces communautés, maintenues en laboratoire en bouteilles de 500 mL et enrichies en nutriments, ont été exposées à l'irgarol 1051 pendant cinq jours. Ce système expérimental a permis de mettre en évidence une restructuration des communautés provoquée par l'irgarol, certaines espèces étant stimulées, d'autres inhibées. Il y a donc une variabilité espèces-dépendante de la sensibilité, avec une tolérance plus élevée démontrée pour les communautés provenant des sites les plus pollués. Une autre étude sur du périphyton et phytoplancton naturel de rivière, avec incubation au laboratoire en bouteilles de 3 L et exposition au diuron pendant six jours, a permis de démontrer la sensibilité de ces communautés, avec une inhibition du développement algal intervenant à une concentration en diuron réaliste du point de vue environnemental (Pesce *et al*., 2006). Les communautés peuvent réagir assez rapidement à la présence d'un contaminant, mais elles peuvent aussi

« récupérer » la fonction perturbée en quelques jours, d'où l'importance du pas de temps pour l'échantillonnage. Ainsi, Larsen *et al*. (2003) ont exposé une communauté naturelle de phytoplancton côtier à l'antifouling DCOI en microcosmes de 5 L pendant 16 jours. Les échantillonnages intermédiaires ont permis aux auteurs de constater, aux concentrations les plus élevées, une inhibition de la photosynthèse qui n'était plus visible à la fin de l'expérience. L'application de l'outil PICT (Pollution-Induced Community Tolerance) leur a en outre permis de détecter une tolérance accrue de ces communautés, tolérance qui a persisté pendant les 15 jours suivants.

Phytoplancton et périphyton peuvent aussi être maintenus dans des systèmes plus volumineux, ayant peut être une stabilité plus importante et permettant un échantillonnage régulier, sans risquer de perturber le fonctionnement ou la structure du micro-écosystème par des prélèvements trop importants. Avec des aquariums de 22 L remplis d'eau de mer, colonisés par du périphyton et soumis à un courant continu d'eau de mer pompée du milieu, Dahl et Blanck (1996) ont pu démontrer qu'une exposition au TBT pendant deux à trois semaines, pouvait générer une tolérance accrue des communautés exposées. De plus, les auteurs ont déterminé un seuil d'effet à long terme du TBT sur les communautés périphytiques marines (0.5 nM). Cette concentration seuil est identique à celle déterminée par les mêmes auteurs sur du périphyton marin lors d'une étude de terrain. Les auteurs concluent donc que leur système de microcosmes indoor en aquariums est suffisamment réaliste pour produire des données fiables d'un point de vue écologique. Même si les systèmes indoor ne permettent pas de mimer l'ensemble des conditions naturelles, il semble que dans certains cas les résultats obtenus puissent correspondre aux effets détectés dans le milieu naturel. On sait que les communautés naturelles, une fois confinées en microcosmes, pâtissent de l'effet bouteille, qui peut agir comme une pression de sélection en éliminant certains taxons. Cependant, dans certains cas l'exposition nécessite une période d'acclimatation des communautés aux conditions de laboratoire, ce qui peut encore accentuer la « dérive » de la communauté par rapport à sa composition initiale. Partant du postulat que les réponses de microcosmes dérivés de communautés naturelles devraient être indépendantes de leur composition initiale, Stay *et al*. (1989) ont appliqué un protocole d'exposition en incluant une longue période d'acclimatation. Les communautés planctoniques prélevées dans quatre lacs différents ont été acclimatées en aquariums de 37 L pendant deux mois, puis en bouteilles d'1 L pendant six semaines avec un enrichissement nutritif. L'exposition des communautés à l'atrazine pendant les 42 jours suivants a montré que l'une des communautés était moins sensible à l'herbicide. Malgré cela, les valeurs de toxicité trouvées par les auteurs étaient du même ordre de grandeur que celles de la littérature.

La sélection exercée par les étapes d'acclimatation ne risque-t-elle pas de favoriser les espèces les plus tolérantes à des modifications physico-chimiques de leur environnement naturel ? En modifiant la composition spécifique des communautés par une telle procédure, peut-on considérer que la communauté exposée est encore représentative de celle prélevée dans le lac ? Alors que les microcosmes sont censés prédire au mieux les réponses des systèmes naturels à un contaminant, ne devrait-on pas éviter au maximum de perturber ou modifier l'équilibre des communautés prélevées, que ce soit par des enrichissements nutritifs ou de longues périodes d'acclimatation ? Quand ces périodes sont nécessaires, leur durée devrait

être déterminée en fonction du temps de génération du phytoplancton, afin d'éviter une pression de sélection trop importante sur la communauté avant l'exposition.

Les études portant sur les communautés naturelles de phytoplancton ou de périphyton, peuvent difficilement s'affranchir du compartiment bactérien, même si les mesures réalisées n'en tiennent pas toujours compte. Par contre, lorsque l'on s'y intéresse de plus près, les effets des pesticides sur le phytoplancton peuvent aussi avoir des conséquences sur la boucle microbienne, si importante dans les flux de matière. Les substrats artificiels utilisés pour la colonisation du périphyton, incluent forcément des bactéries qui vont constituer le biofilm permettant au périphyton de se développer. DeLorenzo *et al*. (1999a) ont utilisé des substrats en mousse de polyuréthane, placés en estuaire pour permettre la colonisation d'organismes microbiens nageants et sessiles. Les supports, installés en aquariums de 4 L au laboratoire, ont ensuite été exposés à trois pesticides, qui ont affecté la structure et les fonctions de la chaîne microbienne. Soulignant la possibilité d'impacts sur les niveaux trophiques supérieurs, DeLorenzo *et al*. (1999b) ont reproduit une expérience plus complexe en incluant ces derniers. Toujours avec ces supports colonisés par les communautés microbiennes naturelles et validés par de précédentes expériences, les auteurs ont pu soumettre les communautés à des variations de salinité et de courant de marée reproduites en serre, afin de simuler l'apport d'atrazine par une source d'eau douce dans un estuaire. Là encore, la boucle microbienne dans son ensemble a été impactée de façon significative par l'herbicide.

Le design des microcosmes peut devenir très rapidement assez compliqué, selon le nombre de niveaux trophiques à inclure, mais aussi selon le nombre de modalités d'exposition, ce qui tend à complexifier les interprétations possibles. Dans l'environnement naturel, les organismes sont en général soumis à des cocktails de contaminants, qui peuvent avoir des effets additifs, synergiques ou antagonistes. Peu d'études se sont risquées à tester plusieurs pesticides en même temps, bien que tout le monde s'accorde à en relever la nécessité. Hartgers *et al*. (1998) ont testé un mélange de trois herbicides sur des communautés comprenant des organismes planctoniques et des macro-invertébrés, en microcosmes indoor de 600 L pendant 28 jours. L'exposition chronique a conduit à un changement de la composition de la communauté phytoplanctonique ainsi qu'à une perturbation temporaire de son métabolisme. Réalisant l'exposition simultanée de communautés zoo- et phytoplanctoniques à deux insecticides en microcosmes indoor pendant quatre semaines, Van den brink *et al*. (2002) ont aussi montré des atteintes de la composition de la communauté phytoplanctonique aux plus fortes concentrations en insecticide.

Ces systèmes de microcosmes indoor se veulent plus réalistes que les tests monospécifiques. Ils ont pour but de pouvoir contrôler un certain nombre de facteurs physico-chimiques intervenant dans l'exposition à un toxique (température, éclairage, nutriments, pH, salinité, etc). Toute une variété de systèmes existe du point de vue de la représentativité environnementale : la température, la salinité peuvent être ajustées à celles du milieu naturel, l'eau du milieu sert parfois à remplir les microcosmes. La luminosité est plus rarement représentative de l'éclairage naturel, car il est difficile de reproduire le spectre de la lumière du soleil en incluant les variations quantitatives et qualitatives liées aux conditions météorologiques. Au niveau biologique, les microcosmes peuvent être colonisés par des

organismes « de laboratoire » (poissons, macrophytes…) ou provenant du site d'étude. Concernant le phytoplancton et périphyton, il s'agit le plus souvent de communautés naturelles.

Ces systèmes sont donc plus représentatifs des conditions naturelles que les tests monospécifiques et plus simples que les écosystèmes réels. Le contrôle d'un certain nombre de paramètres permet aussi de simplifier les interprétations possibles des effets observés, mais l'extrapolation à d'autres types d'écosystèmes n'est pas appropriée. Certains auteurs considèrent que leurs systèmes peuvent suffire pour déterminer des seuils de sécurité pour certaines substances (Giddings et Eddlemon, 1979 ; Van Wijngaarden *et al*., 2005), mais dans les limites physico-chimiques et climatiques correspondantes.

Ces approches peuvent donc paraître insuffisantes, c'est pourquoi de nombreuses études sont faites sur des systèmes de micro- ou mésocosmes « outdoor », c'est-à-dire placés à l'extérieur, voire *in situ*.

Microcosmes "outdoor"

Les microcosmes outdoor sont des unités expérimentales placées *in situ*, dans des ruisseaux, étangs, lacs, mais aussi au niveau marin côtier ; il peut aussi s'agir de bassins artificiels expérimentaux placés à l'extérieur et exposés à la lumière et à la température ambiantes.

En général, les études focalisées sur le phytoplancton peuvent être réalisées avec des contenants peu volumineux, le plus souvent des bouteilles de volumes variables, remplies avec l'eau du milieu filtrée à 140-250 µm, afin d'éliminer les grands brouteurs, mais aussi les débris divers.

Bérard *et al*. (1999b) ont réalisé 12 expériences identiques réparties sur quatre années, au printemps, début et fin d'été, avec le dispositif expérimental suivant : les communautés phytoplanctoniques naturelles étaient prélevées, mises en bouteilles de 5 L et placées *in situ* dans le Lac Léman pendant 10 à 21 jours. L'expérience était stoppée avant que les communautés témoins n'atteignent la phase stationnaire. Les microcosmes étaient sous bullage continu afin d'éviter la sédimentation des algues et l'épuisement des carbonates. Selon les expériences, il y avait trois à cinq réplicats pour les microcosmes témoins et pour les microcosmes exposés à 10 µg/L d'atrazine. Cette série d'expériences a permis aux auteurs d'observer des variations considérables dans l'effet de l'herbicide sur les espèces et la communauté entière. Dans certains cas, les microcosmes contaminés avaient une densité cellulaire plus importante, due à des espèces ou groupes d'espèces particulièrement tolérants à l'atrazine. Il a été montré que cet herbicide pouvait inhiber les espèces sensibles et augmenter la croissance des espèces plus tolérantes, réduisant ainsi la compétition entre espèces. Le toxique peut donc exercer une pression de sélection sur la communauté. Au cours des quatre années d'expérience, il y a eu des réactions opposées de certaines espèces et des variations de la restructuration des communautés, qui semblent être associées aux variations saisonnières. En effet, les variations saisonnières des paramètres environnementaux vont conditionner la composition et la succession des communautés, ainsi que les interactions entre espèces, le tout pouvant affecter la réponse des communautés au polluant. Par exemple, avec le même dispositif expérimental, Bérard *et al*. (1999a) ont montré que dans la communauté exposée à

l'atrazine, l'une des espèces, *Oscillatoria limnetica*, était inhibée en conditions froides (début du printemps) alors qu'elle était stimulée en conditions chaudes (été). Cela illustre qu'une espèce donnée, en fonction des paramètres environnementaux et de la composition de la communauté à laquelle elle appartient, peut se comporter différemment face à un toxique. Les tests plurispécifiques peuvent inclure des interactions écologiques importantes et mieux prédire le risque écotoxicologique des contaminants dans les systèmes aquatiques. Toujours avec le même dispositif expérimental appliqué à différentes périodes de l'année, Bérard et Benninghoff (2001) ont évalué la tolérance des communautés phytoplanctoniques induite par l'atrazine. L'approche utilisée était celle du PICT (Pollution-Induced Community tolerance, Blanck *et al*., 1988 in Gustavson et Wängberg, 1995). Partant du postulat que la tolérance des communautés exposées chroniquement à un herbicide est supposée plus grande que celle d'une communauté comparable n'ayant jamais été exposée, Bérard et Benninghoff (2001) ont testé le PICT sur les microcosmes témoins et exposés à l'atrazine. En associant le concept du PICT avec des analyses microscopiques afin de caractériser précisément la composition des communautés, les auteurs ont constaté que l'atrazine a conduit à une restructuration de la communauté en perturbant sa composition spécifique, avec un effet très variable en fonction des saisons. Parmi les communautés exposées à l'atrazine, l'induction d'une tolérance chez certaines d'entre elles est intervenue après deux à trois semaines d'exposition. De nombreux facteurs peuvent influencer la sensibilité des communautés à un toxique, mais aussi leur tolérance.

Étant donné les variations de réponses des communautés pour un composé, il peut être difficile de classer les contaminants selon la toxicité démontrée. Il est nécessaire de réaliser plusieurs expériences sur des communautés, englobant différentes conditions physico-chimiques et biologiques, pour mieux évaluer la toxicité d'une substance par rapport à une autre. Par exemple, Leboulanger *et al*. (2001) avaient démontré une toxicité plus importante de l'atrazine comparée au nicosulfuron, avec des tests monospécifiques. L'expérience a aussi été réalisée *in situ* sur des communautés naturelles exposées à 10 µg/L d'atrazine ou de nicosulfuron, avec le protocole expérimental de Bérard *et al*. (1999b) décrit plus haut. L'analyse spécifique des communautés révèle une action différente des deux herbicides, avec une perturbation plus importante de la composition des communautés exposées à l'atrazine. Cette dernière semble donc plus toxique que le nicosulfuron sur les communautés naturelles, bien qu'aucun effet massif n'ait été détecté. La différence de toxicité des deux composés est ici moins nette qu'en tests monospécifiques. Ces résultats sont confirmés par Seguin *et al*. (2001) qui ont réalisé cette exposition *in situ* à sept reprises : ils ont montré que l'atrazine inhibait plus d'espèces que le nicosulfuron, même si les cibles étaient différentes. Même si la variabilité importante des résultats obtenus à différentes saisons rend compte de la difficulté de conclure avec ce type d'approche, ces expériences permettent de reproduire fidèlement la pression de sélection exercée par un toxique sur une communauté. Cependant, les auteurs soulignent les biais induits par l'absence des niveaux trophiques supérieurs comme les brouteurs (dans cette étude, les brouteurs contenus dans l'eau filtrée à 250 µm étaient éliminés par un bullage à l'azote), qui exercent eux-mêmes une pression de sélection en consommant préférentiellement certains taxons.

Les systèmes de microcosmes *in situ* développés par Annette Bérard sont relativement simples et semblent pratiques à manipuler. Cependant ils sont limités dans la durée, par la croissance de la communauté phytoplanctonique. En effet, comme les nutriments ne sont pas renouvelés, l'atteinte de la phase stationnaire est le signal d'arrêt de l'expérience. De plus, l'évolution des communautés confinées en microcosmes n'a pas été comparée à celle des communautés présentes sur le site expérimental. On ne sait donc pas dans quelle mesure cette évolution est représentative de la réalité. Or, les dynamiques de populations observées en microcosmes révèlent souvent l'apparition d'efflorescences (Petersen et Gustavson, 1998 ; Bérard et Benninghoff, 2001), ce qui peut être très différent des dynamiques observées dans le milieu environnant (de la Broise et Palenik, 2007). Au niveau marin, de la Broise et Palenik (2007) ont développé un système de microcosmes en bouteilles d'1 L remplies avec de l'eau du milieu filtrée à 225 µm et incluant une phase gazeuse. Ils ont montré qu'en appliquant un renouvellement du milieu équivalent à 5% du volume par jour, les fluctuations de *Synechococcus* dans les microcosmes étaient dans les mêmes gammes que celles observées dans l'eau environnante. Les picoeucaryotes quant à eux, présentaient des fluctuations de concentration plus importantes que le milieu environnant. Néanmoins, le modèle proposé semble satisfaisant pour maintenir les communautés phytoplanctoniques sur deux semaines, en évitant la formation d'une efflorescence.

Des systèmes nettement plus volumineux ont aussi été mis en œuvre pour étudier l'effet de toxiques sur le phytoplancton. Ainsi, Gustavson et Wängberg (1995) ont utilisé 12 enceintes cylindriques de polyéthylène d'environ 6 m^3, de 3.5 m de profond, remplies avec l'eau naturelle et mises *in situ* dans un lac mésotrophe. Leur but était d'exposer les communautés phytoplanctoniques au cuivre et à l'atrazine, afin de déterminer si cela entraînait une tolérance accrue des communautés pendant les 20 jours de l'expérience. Les auteurs ont réalisé un suivi de certains paramètres du lac au cours de l'expérience (chl *a*, pH, nutriments, carbone organique particulaire et azote organique particulaire) afin de les comparer aux enceintes : excepté pour la biomasse algale (chl *a*) et le pH, les auteurs ont déterminé que les fluctuations des autres paramètres étaient à peu près similaires. De plus, à la fin de l'expérience, les valeurs de pH et de chl *a* mesurées dans le lac et les enceintes étaient à nouveau semblables. Les enceintes peuvent donc être considérées comme de bons modèles représentatifs de l'écosystème lacustre. Souhaitant améliorer la sensibilité de l'outil PICT pour détecter une tolérance accrue des communautés exposées à un contaminant, Petersen et Gustavson (1998) ont utilisé le même dispositif expérimental. Des communautés phytoplanctoniques ont été exposées pendant trois semaines au TBT, et le PICT a été appliqué sur des fractions de tailles de phytoplancton obtenues par filtration à différentes porosités. Les auteurs ont pu montrer que le microphytoplancton avait développé une tolérance au TBT, alors que ni le picophytoplancton, ni la communauté dans son ensemble n'avaient montré de tolérance. L'hypothèse émise dans d'autres études et validée dans celle-ci est que la réponse à un stress toxique dans les communautés se traduit par un changement de composition des espèces vers des algues plus petites, qui auraient un avantage sélectif dû à leur rapide colonisation des niches vacantes générées par le toxique. Ainsi est né le concept du SF-PICT pour Size-Fractionated PICT, qui a été 1000 fois plus sensible pour la détection du stress lié au TBT, que le PICT appliqué à la communauté entière. En utilisant le même système expérimental, la

validation du SF-PICT a été reproduite sur une autre expérience d'exposition du phytoplancton au TBT pour comparer la Concentration Sans Effets ainsi obtenue avec celles obtenues par d'autres mesures (Petersen et Gustavson, 2000).

Les microcosmes outdoor, quelle que soit leur taille, apportent une meilleure représentativité environnementale, puisqu'ils sont soumis à l'éclairage naturel et à la température du milieu, et sont généralement constitués par l'eau du milieu contenant les organismes à tester. Les systèmes de petite taille permettent de prévoir un nombre de réplicats compatibles avec une validation statistique des résultats, ce qui est moins aisé avec les systèmes plus volumineux. Par contre, les fluctuations observées dans le milieu environnant peuvent être difficiles à reproduire à l'intérieur des microcosmes, notamment le brassage des masses d'eau et les flux d'organismes et de nutriments. Les systèmes décrits permettent de mieux caractériser les effets des polluants sur les communautés phytoplanctoniques, par contre, dans certains cas l'absence des organismes brouteurs conduit à une interprétation biaisée des phénomènes observés. C'est pourquoi certains systèmes expérimentaux ont été développés, contenant une plus grande variété d'organismes et de niveaux trophiques : les mésocosmes.

Mésocosmes

Les mésocosmes décrits ci-après sont des systèmes caractérisés par la présence de plusieurs niveaux trophiques, ce qui permet d'étudier les effets directs et indirects des substances testées, au regard des interactions trophiques. Ainsi, Yasuno *et al*. (1993) ont développé des systèmes de sacs souples flottants d'environ 2 m^3, en polyéthylène, disposés *in situ* dans un étang. Ces systèmes souples permettent le mélange de la masse d'eau par la transmission des mouvements de l'eau environnante. Les communautés phytoplanctoniques et zooplanctoniques ont été exposées à l'insecticide pyraclofos pendant 56 jours et les auteurs ont pu montrer des effets indirects de l'insecticide sur le phytoplancton, par la suppression de certains éléments du zooplancton.

Les mésocosmes, de par leur taille et leur complexité, peuvent être considérés comme de véritables écosystèmes artificiels. Ils représentent aussi l'outil idéal pour étudier et caractériser une pollution. Cependant, s'ils remplissent le critère de représentativité, certains auteurs ont pu montrer que la variabilité entre réplicats était importante. Lozano *et al*. (1992) ont utilisé 12 bassins littoraux contenant du périphyton, du phytoplancton, des macrophytes, des micro-invertébrés, des macro-invertébrés et des poissons. Ces communautés ont été exposées à l'insecticide esfenvalerate, avec deux réplicats par condition, pendant huit semaines. Les auteurs ont observé une grande variabilité entre réplicats, mais cela n'est pas surprenant avec seulement deux réplicats par condition. Une étude a été réalisée, sur la colonisation naturelle du phytoplancton dans 12 bassins expérimentaux identiques de 517 m^3 (Rosenzweig et Buikema, 1994). La première année de colonisation, les successions phytoplanctoniques entre les bassins étaient globalement similaires, cependant le détail du suivi fait apparaître des variations du nombre et de la densité des taxons présents entre les bassins et dans le temps. Ces systèmes, plus réalistes au niveau environnemental, sont donc difficiles à répliquer car leur variabilité est très importante. La succession phytoplanctonique intervient aussi dans cette variabilité car elle est influencée par les nutriments et la température. Les auteurs ont évalué la

précision des paramètres mesurés sur la communauté en fonction du nombre de réplicats : ils considèrent qu'il faut prévoir au moins six réplicats par traitement.

D'autres études ont montré les mêmes problèmes de variabilité des communautés entre réplicats : utilisant des bassins circulaires de 8 m^3, avec des sédiments et plusieurs niveaux trophiques, Caquet *et al*. (2001) ont observé une variabilité des paramètres biologiques entre réplicats. Ils l'expliquent par une évolution asynchrone des communautés et des différences dans les procédés de structuration des communautés. Des différences de dynamique du phytoplancton entre mésocosmes pourraient aussi expliquer cette variabilité. Les auteurs ont aussi trouvé que les paramètres structuraux des communautés étaient plus variables que les paramètres fonctionnels, ce qui peut aussi biaiser l'interprétation des données. Dans le même genre d'étude, Seguin *et al*. (2001) ont utilisé 15 bassins de 5 m^3 remplis avec de l'eau non polluée, des sédiments, du phytoplancton, du zooplancton et des macrophytes. Ils ont exposé ces organismes aux herbicides atrazine et nicosulfuron pendant deux mois. Les auteurs soulignent que l'évaluation statistique des effets est compliquée par la variabilité importante entre réplicats. Par exemple, pour le phytoplancton, des blooms peuvent intervenir mais pas exactement au même moment, et l'intervalle d'échantillonnage ne permet pas toujours de voir ces phénomènes. Les successions saisonnières du phytoplancton interviennent aussi car elles ne sont pas forcément identiques dans les réplicats. Dans cette expérience, les auteurs ont pu constater une restructuration plus importante des communautés phytoplanctoniques exposées à l'atrazine, par rapport au nicosulfuron. Ils confirment ainsi les effets déjà observés en microcosmes *in situ* dans la même étude. Ces systèmes sont encore plus représentatifs des écosystèmes naturels, mais ils sont moins aisés à répliquer et la variabilité importante entre réplicats peut gêner la détection d'effets dus au contaminant.

Les mésocosmes permettent d'identifier simultanément les effets directs et indirects et de voir les réponses à différents niveaux d'organisation biologique (Caquet *et al*., 2000). Ce sont des systèmes complexes, volumineux, nécessitant le plus souvent des temps de stabilisation, et probablement moins soumis aux effets parois que les microcosmes *in situ* de petit volume. Mais les contraintes techniques et économiques limitent les possibilités de réplication (Forbes et Forbes, 1997).

Les études en mésocosmes sont probablement les plus réalistes du point de vue environnemental. Mais c'est ce réalisme qui rend chaque unité expérimentale unique, de par sa variabilité biologique et son évolution. La complexité qui caractérise les mésocosmes, avec le réseau d'interactions trophiques et de compétition entre les composants, augmente la difficulté d'interprétation des résultats de ce type d'étude. La variabilité importante entre les réplicats d'une même condition, peut aussi masquer certains effets provoqués par un contaminant (Barry et Logan, 1998). Dans certains cas, l'outil expérimental mis en place peut, de par ses caractéristiques propres, desservir ses objectifs. Les mésocosmes restent tout de même des modèles réalistes permettant d'appréhender les effets des toxiques au niveau environnemental, ce qui aide à mieux comprendre et interpréter les données issues des études de terrain.

Études de terrain

Les tests mono- et plurispécifiques nous ont appris que la réponse du phytoplancton à un contaminant peut être influencée par une multitude de facteurs physiques, chimiques et biologiques. Cette réponse est aussi conditionnée par les éventuelles expositions simultanées à d'autres contaminants et/ou par des expositions précédentes. C'est probablement la raison pour laquelle très peu d'études de terrain sont disponibles concernant la composition des communautés phytoplanctoniques en relation avec la pollution de sites.

Une étude a été réalisée sur les communautés naturelles de périphyton et phytoplancton d'une rivière (Dorigo *et al*., 2004) échantillonnées d'amont en aval, le long d'un gradient de pollution. Les auteurs ont mesuré la tolérance des communautés à l'atrazine et à l'isoproturon : les communautés périphytiques provenant du site le moins pollué, étaient plus sensibles aux deux herbicides que les communautés provenant du site le plus pollué. Les communautés phytoplanctoniques ont, elles aussi, montré une tolérance induite associée au gradient de pollution, et visible pendant plusieurs semaines. Les auteurs précisent que le gradient de tolérance a persisté même en dehors des périodes de contamination des sites. Une autre étude sur une petite rivière (Pesce *et al*., 2008) réalisée sur 11 mois a permis de montrer une perturbation des communautés phytoplanctoniques juste après les pics de pollution dus aux pesticides. La difficulté de ce type d'étude réside dans l'incrimination des effets observés : un suivi de contamination des sites doit être réalisé, ce qui conduit à faire des analyses régulières et très coûteuses sur des dizaines de résidus. Il faut ensuite tenter d'associer les effets à tel ou tel type de polluant, en considérant aussi les variations éventuelles des autres paramètres physico-chimiques. Il faut aussi déterminer un site de référence non pollué. Si ce critère peut être trouvé facilement dans le cas de petits ruisseaux, au niveau côtier cela peut s'avérer plus compliqué. Au vu de ces difficultés, on peut comprendre que peu d'études de terrain visant à caractériser les effets de pollutions sur des communautés indigènes aient été faites.

1.3. Conclusion

Nous avons vu que le phytoplancton est constitué d'organismes très variés que ce soit au niveau de la morphologie, des besoins nutritifs, du contenu pigmentaire… Les successions phytoplanctoniques dans le milieu naturel sont régies par de nombreux facteurs qui dépendent du climat, des apports nutritifs et des interactions avec les autres organismes de l'écosystème. De par la position du phytoplancton dans les réseaux trophiques, sa perturbation pourrait entraîner des conséquences sur d'autres niveaux trophiques. L'étude de l'impact des pesticides sur le phytoplancton révèle une grande diversité de réponses, allant d'une grande sensibilité avec inhibition de croissance, à une tolérance importante avec stimulation de la croissance, selon les espèces considérées. Les tests mis en place pour évaluer le risque posé par les pesticides sur le compartiment phytoplanctonique ont permis à la communauté scientifique de prendre conscience de l'inadéquation des tests monospécifiques pour prévoir la réaction d'une espèce donnée face à un contaminant dans l'environnement. À contrario, l'intégration de tous les facteurs physico-chimiques et biologiques au protocole expérimental induit une variabilité qui peut finalement masquer les effets recherchés. C'est pourquoi, lorsque l'on souhaite

étudier les effets d'une ou plusieurs substances sur le phytoplancton, il faut trouver le meilleur compromis entre représentativité environnementale du protocole expérimental, réplicabilité, validation statistique des effets observés et possibilité d'interprétation de ces effets.

La mise en évidence d'éventuels effets de contaminants dépend également des méthodes analytiques qui seront appliquées à la communauté phytoplanctonique. Les principales méthodes appliquées aux communautés naturelles et présentées dans la littérature sont décrites dans la partie suivante.

2. Méthodes d'analyse appliquées au phytoplancton naturel

La caractérisation des communautés naturelles de phytoplancton peut être basée sur des paramètres de fonction et/ou de structure. Les principales analyses relevées dans la littérature scientifique sont décrites ci-après.

2.1. Mesures de la fonction des communautés

Les mesures les plus communément appliquées pour étudier les fonctions des communautés phytoplanctoniques portent sur la biomasse algale, la photosynthèse et la production primaire.

2.1.1. Évolution de la biomasse algale

La mesure la plus répandue dans la littérature concernant le phytoplancton, est la quantification de la chlorophylle *a* (chl *a*). Ce pigment est généralement considéré comme un bon représentant de la biomasse algale, puisqu'il est présent chez toutes les espèces de phytoplancton (Jeffrey *et al*., 1997). Il est communément admis que l'évolution de la concentration en chl *a* au cours d'une expérience permet d'évaluer la croissance globale de la communauté. Cependant certains auteurs considèrent que ce paramètre n'est pas forcément représentatif de la biomasse, puisque le contenu cellulaire en chl *a* peut varier entre les espèces, mais aussi en fonction des conditions nutritives (Kruskopf et Flynn, 2006) et de l'éclairage (Rodríguez *et al*., 2006).

La mesure de la chl *a* repose sur ses caractéristiques spectroscopiques : absorption de la lumière (spectrophotométrie) ou fluorescence (fluorimétrie). Les deux méthodes nécessitent le plus souvent de réaliser une concentration préalable de la biomasse suivie d'une extraction des pigments.

La méthode spectrophotométrique est la plus utilisée dans les études sur les communautés phytoplanctoniques exposées à un contaminant (Gustavson et Wängberg, 1995 ; Dahl et Blanck, 1996 ; Hartgers *et al*., 1998 ; Leboulanger *et al*., 2001 ; Seguin *et al*., 2001 ; Van den brink *et al*., 2002 ; Van Wijngaarden *et al*., 2005 ; Pesce *et al*., 2006 ; 2008).

Quelques études font appel à la fluorimétrie (DeLorenzo *et al*., 1999a ; 1999b) qui est plus sensible que la spectrophotométrie d'au moins un ordre de grandeur. Cette méthode d'analyse est particulièrement recommandée dans le cas des zones oligotrophes, car elle évite d'avoir à filtrer des volumes trop importants (Aminot et Kérouel, 2004).

La fluorimétrie peut aussi être appliquée in vivo : c'est une mesure de la fluorescence de la chlorophylle présente à l'intérieur même des cellules phytoplanctoniques vivant dans le milieu, sans extraction (Aminot et Kérouel, 2004). Cette mesure fournit donc une indication immédiate, voire continue, de l'abondance du phytoplancton. Elle est très utile pour suivre en direct l'évolution de microcosmes et a été appliquée lors de certaines expériences (Yasuno *et al*., 1993 ; Bérard *et al*., 1999a ; 1999b ; Bérard et Benninghoff, 2001 ; Seguin *et al*., 2001 ; Bérard *et al*., 2003).

2.1.2. Efficacité de la photosynthèse

L'efficacité de la photosynthèse peut être mesurée avec la méthode de PAM (Pulse Amplitude Modulated) fluorescence, dont le principe est le suivant : les cellules phytoplanctoniques sont incubées à l'obscurité afin que les photosystèmes II (PS II) soient au repos. Elles sont ensuite exposées à un pulse de lumière saturante, qui excite les PS II. Ceux-ci reviennent à leur état normal en émettant de la fluorescence. En fonction de l'état physiologique des cellules, cette fluorescence peut varier. Ce paramètre est particulièrement intéressant à exploiter, notamment dans le cas d'expositions des communautés à des herbicides inhibiteurs de la photosynthèse, agissant au niveau du PS II, comme l'irgarol 1051, l'isoproturon, le diuron et l'atrazine (Hartgers *et al*., 1998 ; Dorigo et Leboulanger, 2001 ; Bérard *et al*., 2003 ; Dorigo *et al*., 2004).

2.1.3. Production primaire

Pour évaluer l'état fonctionnel des communautés, il est possible de mesurer la production primaire. Le principe est d'incuber les communautés phytoplanctoniques avec une solution de bicarbonates contenant du ^{14}C marqué. Après un temps défini, l'incorporation du carbone est stoppée et le surplus de bicarbonates extracellulaires marqués est évacué. L'ajout d'une solution scintillante permet ensuite de mesurer la radioactivité incorporée par les cellules avec un compteur à scintillation. Cette mesure, appliquée à des communautés exposées à des contaminants, permet de vérifier si leur intégrité fonctionnelle est maintenue. Elle est utilisée dans un grand nombre d'études impliquant des pesticides (Gustavson et Wängberg, 1995 ; Dahl et Blanck, 1996 ; Petersen et Gustavson, 1998 ; DeLorenzo *et al*., 1999a ; 1999b ; Petersen et Gustavson, 2000 ; Caquet *et al*., 2001 ; Seguin *et al*., 2001 ; Gustavson *et al*., 2003 ; Larsen *et al*., 2003).

2.2. Mesures de la structure des communautés

Les études réalisées sur la structure des communautés naturelles s'appuient souvent sur des analyses classiques, comme l'identification des taxons et leur comptage au microscope, associés ou non au calcul d'indices de diversité. Mais d'autres types d'analyses, apparus dans les années 1980-1990, permettent d'appréhender plus rapidement la structure des communautés. Ces méthodes exploitent des caractéristiques morphologiques (cytométrie en flux), pigmentaires (HPLC) ou génétiques (méthodes d'empreintes génétiques).

2.2.1. Identification et dénombrement au microscope

Les études réalisées sur la structure des communautés naturelles peuvent difficilement s'affranchir des analyses taxonomiques à partir d'observations au microscope. C'est l'analyse la plus fréquemment retrouvée dans les articles scientifiques, elle permet de caractériser la composition spécifique de la communauté sur laquelle porte l'étude.

Le principe consiste à fixer les échantillons de la communauté, par exemple avec du Lugol, ce qui permet de préserver l'intégrité des cellules pour la plupart des espèces. Cet échantillon est laissé en sédimentation dans une chambre d'Utermöhl, puis l'observateur identifie et

dénombre les taxons présents au microscope optique inversé. Certains taxons peuvent nécessiter une identification plus précise au microscope électronique (ex : prasinophycées).

Cette analyse permet d'identifier les taxons éventuellement affectés par des pesticides (Gustavson et Wängberg, 1995 ; Dahl et Blanck, 1996 ; Bérard *et al*., 1999a ; 1999b ; Bérard et Benninghoff, 2001 ; Leboulanger *et al*., 2001 ; Seguin *et al*., 2001 ; Van den brink *et al*., 2002 ; Bérard *et al*., 2003 ; Dorigo *et al*., 2004 ; Pesce *et al*., 2006, 2008).

Malheureusement, ces analyses font appel à des spécialistes de la taxonomie, qui se raréfient dans la communauté scientifique, et qui sont très sollicités pour leurs compétences. Il peut donc être difficile de faire toutes les analyses souhaitées, d'autant plus qu'en général il faut compter quelques heures de travail par échantillon. Les scientifiques se sont tournés vers d'autres méthodes, qui, si elles ne permettent pas toujours d'identifier les organismes avec le même degré de précision, sont plus rapides et permettent tout de même de voir des modifications dans la communauté.

2.2.2. Empreintes pigmentaires

Les communautés phytoplanctoniques peuvent aussi être caractérisées par leurs empreintes pigmentaires. Depuis la fin des années 60, les scientifiques ont développé des méthodes ayant pour but de séparer les pigments photosynthétiques, en utilisant d'abord la chromatographie sur couche mince (Jeffrey *et al*., 1997). Cette technique, appliquée aux pigments jusque dans les années 80, a permis la séparation et l'identification de plus de 25 chlorophylles, caroténoïdes et produits de dégradation.

A partir des années 80, l'application de la chromatographie liquide haute pression (HPLC) aux pigments phytoplanctoniques a rendu possible les premières études des communautés phytoplanctoniques à grande échelle (Jeffrey *et al*., 1999). Le pouvoir résolutif des séparations a été augmenté grâce à l'utilisation de méthodes en phase inverse, de détecteurs à barrettes de diodes et de gradient de solvants. Ainsi, Wright *et al*. (1991) ont pu séparer plus de 50 caroténoïdes, chlorophylles et dérivés à partir de cultures d'espèces de phytoplancton marin et valider leur méthode sur des échantillons naturels. Le remplacement des colonnes C_{18} par des colonnes C_8 a aussi permis la séparation de certains pigments dont les pics étaient confondus (Goericke et Repeta, 1993). En 1999, grâce à l'amélioration des méthodes, le nombre de pigments pouvant être séparés à partir d'échantillons naturels passait à 68 (Jeffrey *et al*., 1999). L'utilisation de colonnes C_8 avec une phase mobile contenant de la pyridine a aussi permis d'augmenter la résolution obtenue sur certains pics (Zapata *et al*., 2000).

L'étude de nombreuses souches de phytoplancton a permis aux scientifiques de constater que certaines classes de phytoplancton contiennent des empreintes pigmentaires particulières (Jeffrey *et al*., 1997). Ainsi, ils ont pu constituer une liste de pigments considérés comme des marqueurs des classes algales. Cependant, dans certains cas les pigments marqueurs ont été déterminés à partir de peu d'espèces. C'est pourquoi il faut tenir compte de ce biais dans l'interprétation des données. De plus, les pigments marqueurs ne sont pas exclusifs d'une classe algale, certains pigments étant communs à plusieurs classes algales (Jeffrey *et al*., 1997).

L'étude de ces pigments marqueurs peut tout de même nous renseigner sur les classes algales potentiellement présentes ou impactées par un toxique. En chémotaxonomie, les rapports chl *a*:marqueur sont utilisés pour déterminer les abondances phytoplanctoniques par classe algale : ils sont associés à une détermination taxonomique, et à des algorithmes mathématiques (Lampert, 2001).

De nos jours, l'HPLC est couramment utilisée pour la séparation, l'identification et la quantification des pigments des communautés phytoplanctoniques. C'est une méthode de choix, du fait de sa grande sensibilité pour la détection et la quantification (Jeffrey *et al*., 1999 ; Zapata *et al*., 2000 ; Kwan Wong and Kim Wong, 2003) des pigments.

L'étude de la structure des communautés phytoplanctoniques par les empreintes pigmentaires est rapportée dans de nombreuses études, qui concernent les dynamiques phytoplanctoniques spatiales et/ou temporelles (Stoń *et al*., 2002 ; Furuya *et al*., 2003 ; Estrada *et al*., 2004 ; Marie *et al*., 2006 ; Wänstrand et Snoeijs, 2006), mais aussi les expériences d'enrichissements nutritifs (Suzuki *et al*, 2005 ; Wong et Crawford, 2006). Dans le cas des études écotoxicologiques, l'analyse des empreintes pigmentaires sert à caractériser les communautés étudiées et/ou à démontrer un effet de la substance testée sur la structure des communautés (Petersen et Gustavson, 2000 ; Gustavson *et al*., 2003 ; Dorigo *et al*., 2004 ; Readman *et al*., 2004 ; Devilla *et al*., 2005). Cet outil a aussi été appliqué avec succès pour une étude de surveillance de la qualité de l'eau (Sherrard *et al*., 2006).

Cette méthode, qui informe sur la structure des communautés, nécessite certes un appareillage coûteux et sophistiqué, mais il est possible d'analyser les échantillons plus rapidement qu'en microscopie. Même si le degré de précision des résultats quant à la composition de la communauté est moindre, ne permettant d'aller que jusqu'à la classe algale, la possibilité de multiplier les échantillons permet de limiter la variabilité des résultats, par rapport à des analyses microscopiques.

2.2.3. Cytométrie en flux

Le principe de la cytométrie en flux consiste à entraîner une suspension cellulaire dans un capillaire, grâce à un liquide de gaine sous pression. L'action du liquide de gaine permet d'aligner les cellules, qui, lors de leur passage au travers du capillaire, passent une à une devant un laser. La plupart des systèmes utilisés en océanologie sont équipés d'un laser Argon qui émet une lumière bleue à 488 nm. Quand une particule passe devant le faisceau du laser, elle diffracte la lumière en fonction de sa taille, sa surface, sa structure interne et son indice de réfraction. La diffraction axiale et aux petits angles de la lumière est mesurée par une photodiode et donne une mesure appelée Forward Scatter (FSC), qui renseigne sur la taille des particules. La diffraction latérale et aux grands angles de la lumière donne une mesure appelée Side Scatter (SSC) qui est fonction de la complexité ou granulosité de la cellule. La cellule excitée par le laser réémet également à des longueurs d'ondes supérieures, en fonction de son contenu en composés fluorescents. La lumière ainsi émise est collectée sur un banc optique équipé de filtres sélectifs permettant de récupérer plusieurs fluorescences notamment dans le vert, l'orange (phycoérythrine) et le rouge (chlorophylle).

Cette autofluorescence des cellules due à leurs pigments, permet leur analyse en cytométrie en flux, directement sur des échantillons frais ou après fixation et conservation adéquates (Vaulot *et al*., 1989). Les données obtenues par cytométrie en flux à partir de communautés naturelles de phytoplancton, peuvent être utilisées pour identifier et classer des populations phytoplanctoniques en fonction de leurs caractéristiques optiques et pigmentaires. Les populations couramment considérées en océanologie sont les cyanobactéries *Synechococcus* et *Prochlorococcus*, les petits et les grands eucaryotes (Collier et Campbell, 1999).

La cytométrie en flux est une méthode d'analyse à très haut débit : les appareils peuvent enregistrer des milliers d'évènements par seconde. Cette méthode est particulièrement intéressante pour l'analyse d'organismes microscopiques abondants (>10^2 cellules/mL), qui sont plus petits que 50 µm (Collier et Campbell, 1999). En effet, le diamètre de la cellule analytique étant généralement inférieur à 80 µm, et le volume analysé d'environ 250-300 µL, seules les cellules de petite taille et relativement abondantes peuvent être discriminées. Cela correspond au picophytoplancton (0.2-2 µm) et au petit nanophytoplancton (2-10 µm). Le grand nanophytoplancton (10-20 µm) et le microphytoplancton (20-200 µm) ne sont généralement pas détectés en cytométrie en flux, du fait de leur taille et/ou de leur concentration.

Ces caractéristiques, inhérentes à la cytométrie en flux, apportent donc une vision biaisée des communautés phytoplanctoniques. Cette technique est toutefois complémentaire des analyses au microscope, qui ne permettent pas l'identification et le comptage précis des petites espèces de phytoplancton.

Comme les analyses sont faites sur des temps très courts (quelques minutes) et de petits volumes d'échantillons, un grand nombre de réplicats peut être considéré, ce qui permet une bonne validation statistique des résultats obtenus.

L'utilisation de la cytométrie en flux est très répandue en océanologie, elle apporte des informations sur les populations naturelles, et leur abondance (Hofstraat *et al*., 1994 ; Jonker *et al*., 1995 ; Marie *et al*., 1999 ; Rutten *et al*., 2005). Elle permet la caractérisation de communautés naturelles, ou de leur variabilité spatiale et/ou temporelle (Simon *et al*., 1994 ; Mackey *et al*., 2002 ; Sosik et Olson, 2002 ; Cunningham *et al*., 2003 ; Estrada *et al*., 2004 ; Veldhuis et Kraay, 2004 ; Marie *et al*., 2006 ; Tarran *et al*., 2006). Mais son application aux études d'écotoxicologie impliquant les communautés naturelles de phytoplancton n'apparaît que dans un nombre limité d'études (Readman *et al*., 2004 ; Devilla *et al*., 2005 ; Zamora-Ley *et al*., 2006 ; de la Broise and Palenik, 2007).

2.2.4. Empreintes génétiques

Les analyses de communautés naturelles peuvent aussi être réalisées au niveau moléculaire, en établissant un profil ou une empreinte génétique, à partir d'un gène de la communauté.

Les techniques d'empreintes génétiques telles que la DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) (Muyzer *et al*., 1993) ou la TTGE (Temporal Temperature Gradient gel Electrophoresis) (Yoshino *et al*., 1991), appliquées aux communautés, sont basées sur le principe suivant : l'ADN total de la communauté est extrait, puis un gène commun à la

communauté est amplifié par PCR. Les légères différences existant entre les espèces pour ce gène permettront la séparation sur gel des fragments amplifiés du gène.

Amplification : l'une des deux amorces utilisée pour la PCR est flanquée d'un GC-clamp, qui est une séquence de 30 à 50 nucléotides, et qui permet d'éviter une dénaturation totale des produits PCR lors de l'électrophorèse dénaturante. Les amorces sont définies de telle manière que leurs séquences fassent partie des domaines très conservés au cours de l'évolution, mais elles encadrent une partie du gène qui est plus variable entre les espèces : ce sont des amorces universelles. De cette façon, une seule paire d'amorce permet théoriquement d'amplifier l'ensemble des séquences de la communauté, même si des variations existent au sein de ces séquences en fonction des organismes. Les produits de PCR obtenus contiennent donc en théorie les fragments amplifiés à partir de chaque espèce présente dans la communauté, soit un mélange de fragments ayant des variations de séquences. Dans le cas des communautés, le gène le plus couramment amplifié est le gène codant pour l'ARNr 16S pour les procaryotes, et le gène codant pour l'ARNr 18S pour les eucaryotes.

Séparation : la DGGE et la TTGE sont des électrophorèses dénaturantes, par gradient chimique de dénaturant dans l'espace du gel pour la DGGE, et par gradient thermique durant le temps de migration pour la TTGE. Le pouvoir dénaturant du gel est augmenté en ajoutant de l'urée lors de sa fabrication. Ces techniques permettent la séparation de fragments d'ADN de même taille. Les produits PCR sont chargés sur le gel, et soumis à un champ électrique qui permet la migration des fragments amplifiés. La vitesse et la distance de migration des fragments dépendent de leur degré de dénaturation (Muyzer, 1999), qui dépend lui-même des séquences et de leur température de fusion. Autrement dit, des fragments de même taille sont séparés par leurs différences de séquence. En fonction de leur séquence, les fragments s'arrêtent à différents endroits du gel. On obtient donc, pour un produit PCR d'une communauté, un profil avec une multitude de bandes.

Ces méthodes permettent d'obtenir une image de la communauté à un instant t, incluant les organismes non cultivables, qui peuvent représenter jusqu'à 90% des micro-organismes (Ward *et al*., 1990). Pour autant, elles ne sont pas dépourvues de biais. Lors de l'extraction, certains types cellulaires peuvent être extraits de façon préférentielle par rapport à d'autres (par exemple, les cellules de phytoplancton nues vs équipées d'une thèque ou paroi). Au niveau de la PCR, certaines séquences peuvent aussi être amplifiées préférentiellement (Reysenbach *et al*., 1992), la taille du génome ainsi que le nombre de copies du gène peuvent aussi influencer la quantité de produits PCR obtenus (Farrelly *et al*., 1995 ; Suzuki et Giovannoni, 1996). Enfin, au niveau de la migration, seules les bandes issues d'organismes représentant plus d'1% de la communauté peuvent être visualisées (Muyzer *et al*., 1993). Il se peut aussi que certains fragments migrent au même endroit (Muyzer et Smalla, 1998), ce qui peut conduire à ce qu'une bande, en apparence unique, corresponde à plus d'un organisme. Il se peut aussi qu'une espèce produise plusieurs bandes, du fait de l'hétérogénéité des gènes codant pour l'ARNr 18S ou 16S (Van Hannen *et al*., 1998).

Malgré ces biais, la DGGE et la TTGE sont considérées comme des méthodes sensibles et fiables, qui donnent une vision globale de la diversité génétique d'une communauté (Muyzer and Smalla, 1998 ; Gillan, 2004 ; Kostanjšek *et al*., 2005). Ces méthodes ont été appliquées

avec succès pour la description de la diversité de communautés microbiennes aquatiques procaryotes ou eucaryotes (Murray *et al*., 1996 ; Van Hannen *et al*., 1998 ; Bernard *et al*., 2000 ; Díez *et al*., 2001 ; Schäfer *et al*., 2001 ; Estrada *et al*., 2004 ; Zeidner et Béjà, 2004 ; Marie *et al*., 2006). Elles ont aussi permis de détecter des perturbations de communautés microbiennes exposées à des pollutions (Petersen *et al*., 2004 ; Kostanjšek *et al*., 2005 ; Pesce *et al*., 2006 ; 2008).

2.3. Analyse de la tolérance des communautés par PICT

La tolérance des communautés à un polluant peut être due à une modification de leur structure et/ou à une adaptation physiologique fonctionnelle.

Cette tolérance peut être mesurée avec la méthode PICT : Pollution-Induced Community Tolerance. Ce concept, initialement proposé par Blanck *et al.* en 1988 (Gustavson et Wängberg, 1995) est basé sur les principes suivants :

- la sensibilité des individus et des espèces d'une communauté à un toxique est variable ;
- si la communauté est exposée à une concentration en toxique pouvant affecter certains organismes, la substance va agir comme un agent structurant de la communauté. Les organismes les plus sensibles vont décliner, et les plus tolérants vont dominer. Finalement, la tolérance globale de la communauté vis-à-vis de la substance va augmenter ;
- les individus peuvent s'adapter physiologiquement au stress du contaminant. L'augmentation de la tolérance peut être mise en évidence par des tests physiologiques de court terme. En complément, l'analyse taxonomique des peuplements de la communauté permet aussi de caractériser la restructuration provoquée par le toxique (Bérard *et al*., 1998).

Le principe de cette analyse est le suivant : des communautés sont échantillonnées (par exemple : communautés naturelles provenant de différents sites plus ou moins pollués, communautés issues de micro- ou méso-cosmes témoins et contaminés). Chaque communauté (correspondant à chaque site, ou condition testée) est ensuite divisée en un nombre défini de sous-échantillons, qui sont soumis, sur des temps relativement courts (en général 2 h maximum) à des concentrations géométriquement croissantes en contaminant dont on veut tester la tolérance. Une mesure de production primaire (dans la plupart des cas) est alors effectuée (en général 2 h maximum) sur l'ensemble des sous-échantillons exposés et non-exposés. De cette manière, pour chaque communauté initialement prélevée, une courbe dose-effet peut être obtenue, ce qui permet le calcul des CE_{50}, NOEC, LOEC. La comparaison de ces paramètres, obtenus pour différents sites de prélèvements, ou différentes conditions expérimentales, permet d'évaluer la tolérance des communautés. En général, les résultats attendus sont une CE_{50} plus élevée pour les communautés issues de sites pollués ou de conditions expérimentales avec le contaminant, comparé aux sites non pollués ou à la condition expérimentale témoin, respectivement.

La mesure de PICT sur la production primaire a été appliquée sur des communautés phytoplanctoniques en microcosmes *in situ* (Gustavson et Wängberg 1995 ; Bérard *et al*.,

1998 ; Petersen et Gustavson 1998 ; Petersen et Gustavson 2000 ; Bérard et Benninghoff, 2001), et sur du périphyton en microcosmes indoor (Dahl et Blanck 1996). Dorigo *et al*. (2004) ont mesuré la tolérance de communautés naturelles de phytoplancton et périphyton par l'efficacité de la photosynthèse : ils ont montré une tolérance accrue des communautés issues de sites plus pollués. La plupart de ces études montrent une tolérance accrue des communautés qui ont déjà été exposées au contaminant étudié, et mettent en évidence leur restructuration sous l'effet de la pression de sélection exercée par le toxique.

2.4. Conclusion

En dehors de toutes considérations matérielles et financières pouvant limiter la mesure des paramètres fonctionnels ou structuraux lors d'études écotoxicologiques sur des communautés naturelles de phytoplancton, les questions importantes sont : quelles variables sont les indicateurs les plus sensibles d'un stress subi par une communauté exposée à un contaminant ? Quelle méthode est la mieux adaptée pour la détection des effets induits ?

Certains auteurs suggèrent que les variables correspondant à des fonctions de la communauté seraient moins sensibles au stress que des variables de structure de la communauté (Odum, 1985, Schindler, 1987, Pratt, 1990 in Dahl et Blanck, 1996). En effet, les organismes les plus sensibles peuvent être remplacés par d'autres plus tolérants, qui vont pouvoir maintenir les fonctions de la communauté. Ainsi, Dahl et Blanck (1996), en exposant des communautés au TBT, ont constaté que les indicateurs de croissance (par la mesure de la biomasse) et de photosynthèse, après une chute consécutive à l'exposition au polluant, étaient revenus à leurs valeurs initiales en fin d'expérience. À l'opposé, les indicateurs de structure et de tolérance révélaient une perturbation de la communauté, même en fin d'expérience. Petersen et Gustavson (2000) ont fait le même type d'observations. De même, Caquet *et al*. (2001) indiquent que des changements structuraux significatifs des communautés peuvent se produire sans que les fonctions ne soient affectées. Les indicateurs fonctionnels ne seraient pas appropriés pour la détection d'effets à long terme sur le phytoplancton, à partir du moment ou l'expérience dure assez longtemps pour permettre à la communauté de se restructurer. Aussi, Caquet *et al*. (2001) recommandent que le choix des paramètres utilisés pour évaluer les effets des contaminants soit fait en considérant leur sensibilité envers le toxique, et leur fiabilité écologique.

Les paramètres de fonction des communautés sont apparemment plus adaptés à la détection d'effets rapides, pouvant intervenir au bout de quelques heures, ou jours. Alors que les paramètres de structure peuvent répondre au-delà, même lorsque les fonctions sont restaurées.

Les expériences qui ont été réalisées au cours de cette thèse ont duré en général de 7 à 14 jours. C'est pourquoi nous avons choisi d'exploiter des paramètres relatifs à la structure des communautés, afin de voir si une exposition de moyen terme pouvait perturber cette structure. Afin d'apporter un élément de réponse à la question posée plus haut « quelle méthode est la mieux adaptée à la détection des effets induits ? », nous avons testé trois méthodes sur les communautés (TTGE, HPLC et cytométrie en flux), avec pour quelques échantillons une analyse taxonomique au microscope.

3. Huître creuse *Crassostrea gigas*

Afin d'évaluer les effets de pesticides sur un consommateur primaire du réseau trophique, nous avons choisi d'exposer du naissain d'huître creuse à deux pesticides en microcosmes *in situ*. Cette partie présente rapidement les aspects biologiques et économiques qui nous ont conduit à choisir cet organisme pour réaliser nos tests.

3.1. Biologie

L'huître est un mollusque bivalve filtreur, qui se nourrit essentiellement de phytoplancton. Son mode de vie post-larvaire est sédentaire et fixé. L'huître *Crassostrea gigas* peuple des substrats situés dans les zones intertidales et infralittorales. Cet organisme est qualifié d'eurytherme et euryhalin, car il peut supporter des variations importantes de température et salinité.

3.2. Développement

L'huître est un organisme à reproduction externe, avec libération et fécondation des gamètes dans le milieu. Vingt-quatre heures après la fécondation (Figure 2), l'embryon est une larve trochophore nageante, qui va se différencier en larve D, puis en larve véligère qui se nourrit de phytoplancton. La larve développe ensuite un pied qui va lui permettre de ramper pour trouver un substrat. Une fois qu'elle a trouvé un substrat convenable, elle peut s'y fixer et se métamorphoser. La métamorphose va faire passer l'animal de la vie pélagique nageuse à la vie benthique sédentaire : on parle alors de naissain. En milieu naturel, l'huître va rester fixée toute sa vie à ce substrat.

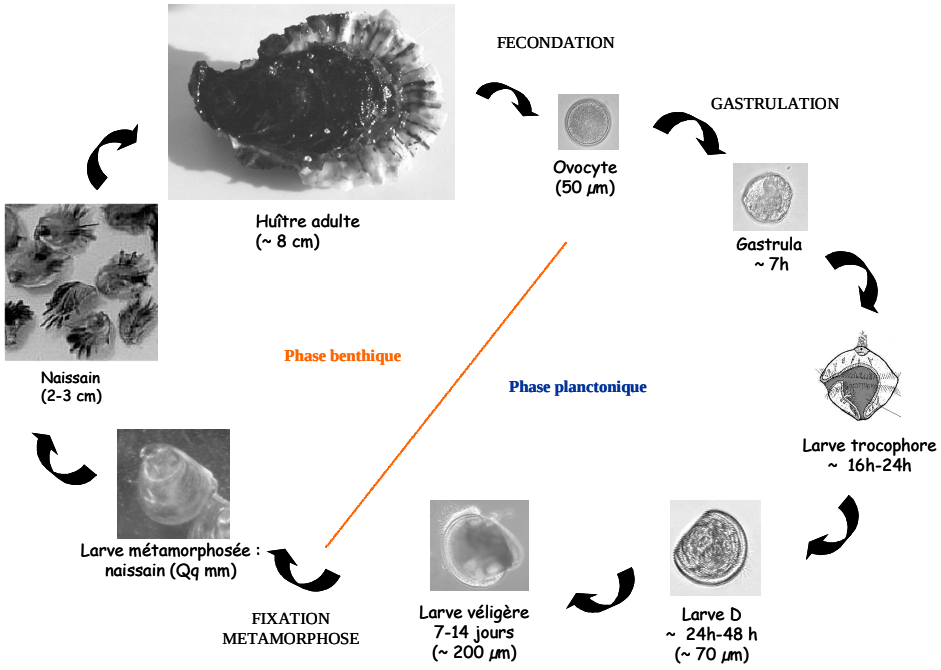


Figure 2 - Cycle de développement de l'huître *Crassostrea gigas* (Fabioux, 2004)

3.3. Production

L'huître creuse *Crassostrea gigas*, encore appelée huître japonaise ou huître du Pacifique, a été introduite en France en 1971, à la suite d'épizooties qui ont décimé les populations de l'huître indigène *Ostrea edulis* et de l'huître portugaise *Crassostrea angulata*. *Crassostrea gigas* représente plus de 98% de la production ostréicole française sur la période 2000-2006 (FAO) et sa production est basée à 84% sur le captage naturel de naissain (Girard *et al*., 2005). La France est le premier producteur d'huîtres en Europe et le quatrième au niveau mondial, avec une production annuelle moyenne d'environ 117 000 tonnes sur la période 2000-2006 (FAO).

3.4. Huître et écotoxicologie

Du fait de leur mode de vie sédentaire et de leur alimentation par filtration, les huîtres sont particulièrement exposées aux modifications des conditions environnementales, notamment les pollutions, auxquelles elles ne peuvent pas échapper. Elles représentent donc des organismes sentinelles, utilisés pour évaluer la toxicité d'un grand nombre de contaminants au niveau aquatique.

De nombreuses études écotoxicologiques ont été réalisées en laboratoire, sur des embryons ou larves exposés à des contaminants divers (His *et al*., 1999 ; Nice *et al*., 2000 ; Geffard *et al*., 2003 ; Damiens *et al*., 2004 ; Losso *et al*., 2007 ; Paixão *et al*., 2007). Le stade adulte est très étudié aussi, au niveau des dommages immunitaires (Auffret and Oubella, 1997 ; Gagnaire *et al*., 2004) ou génétiques (Bouilly *et al*., 2004 ; Tanguy *et al*., 2005 ; Bouilly *et al*., 2007) provoqués par certaines substances.

Certaines études évaluant l'impact de polluants ont été effectuées *in situ*, en systèmes ouverts, sur des larves (Geffard *et al*., 2001 ; Quiniou *et al*., 2007), des juvéniles (Arnold *et al*., 2004 ; Bolton-Warberg *et al*., 2007) et des adultes (Avery and Dunstan, 1996 ; Amiard-Triquet *et al*., 1998 ; Riedel and Valette-Silver, 2002 ; Clara Reboucas do Amaral *et al*., 2005).

Cependant, les études en systèmes ouverts ne peuvent qu'évaluer l'impact de contaminants déjà présents dans le milieu. Afin d'étudier les effets de polluants dans des conditions réalistes du point de vue environnemental, il est nécessaire de développer des systèmes fermés, permettant d'exposer les organismes aux substances et concentrations souhaitées. Le manque d'informations sur la sensibilité du naissain jeune nous a conduit à mettre en place un système de microcosmes *in situ* adapté à ces organismes, pour évaluer la toxicité de deux pesticides en conditions naturelles.

4. Pesticides

La France est le 3ème consommateur mondial de pesticides et le 1er utilisateur en Europe (Aubertot *et al*., 2005) avec 71 600 tonnes de substances actives vendues en 2006 (UIPP, 2007). Les fongicides et herbicides sont les plus utilisés et représentent respectivement 49% et 34% des tonnages vendus en France en 2004 (Aubertot *et al*., 2005).

Les pesticides testés dans cette étude, ainsi que leurs effets sur le phytoplancton, sont décrits brièvement dans les paragraphes suivants.

Bien qu'il existe un suivi de la contamination des eaux douces par les pesticides consultable sur le site de l'IFEN, au niveau marin les seules données accessibles proviennent d'études spécifiques et souvent localisées, en particulier au niveau des grands estuaires. Dans le Finistère, la Rade de Brest fait l'objet d'un suivi de la pollution par les contaminants organiques, depuis 1993. Ces analyses, réalisées par le Laboratoire Idhesa, sont accessibles au grand public (http://www.rade-brest.fr/) et concernent des dizaines de substances actives de pesticides, dont les quatre herbicides présentés ci-après. Pour chacun d'entre eux, les concentrations maximales détectées dans la Rade de Brest entre 1999 et 2007 ont été relevées.

4.1. Herbicides

Quatre herbicides ont été testés au cours d'expérimentations *in situ*.

4.1.1. Bentazone

Cet herbicide, commercialisé par BASF AG depuis 1972, appartient à la famille des thiadiazines. Il agit en bloquant le transport d'électrons au niveau du photosystème II lors de la photosynthèse (Tomlin, 2003). La formulation commerciale testée dans cette étude est le Basamaïs®.

Les analyses réalisées par le laboratoire Idhesa en Rade de Brest de 1999 à 2007 (source : http://www.rade-brest.fr/) ont révélé des concentrations maximales de bentazone de 0.01 à 0.045 µg/L.

Les impacts de cet herbicide sur le phytoplancton ont été peu étudiés (Tableau 1).

Rappel : la CE_x correspond à la concentration effective de la substance qui entraîne une réduction du paramètre mesuré de X% par rapport à une culture témoin. La LOEC, « Lowest Observed Effect Concentration », correspond à la concentration la plus faible provoquant un effet.

Tableau 1 - Effets de la bentazone sur le phytoplancton

Organisme	Origine	Expérience	Paramètre	CE_{50}	LOEC	Référence
Skeletonema costatum	Marine	Culture monospécifique	Efficacité de photosynthèse Croissance	13 mg/L 24 mg/L	2.81 mg/L 22.5 mg/L	Macedo *et al*., 2008
Chaetoceros gracilis	Marine	Culture monospécifique	Croissance (substance pure) Croissance (formulation)	150 mg/L 60 µg/L		Hourmant *et al*., in press
Communauté naturelle	Marine	Prélèvement *in situ*	Production primaire		0.1 µM	Nielsen et Dahllöf, 2007

L'espèce marine *Skeletonema costatum* ne semble pas très sensible à la bentazone en culture monospécifique, puisque les valeurs de CE_{50} et de LOEC sont en mg/L (Macedo *et al*., 2008). La diatomée marine *Chaetoceros gracilis* semble encore moins sensible que *Skeletonema costatum* à la substance pure, avec une CE_{50} égale à 150 mg/L (Hourmant *et al*., in press). Par contre, lorsque la bentazone est testée en formulation commerciale Basamaïs, la CE_{50} chute de quatre ordres de grandeur, à 60 µg/L. Cela illustre l'influence des adjuvants sur les résultats des études de toxicité et l'intérêt d'étudier l'impact des pesticides sous leur forme commerciale. Lorsque des communautés naturelles marines sont exposées à cet herbicide à 0.1 µM (Nielsen et Dahllöf, 2007), ce qui correspond à 24 µg/L ($MM_{bentazone}$ = 240.3 g/mol), un effet de l'herbicide sur la production primaire est visible. Bien que cette concentration ne soit pas représentative de la contamination des zones côtières, le seul fait de travailler sur les communautés donne des valeurs de LOEC 100 fois moins élevées qu'avec *Skeletonema costatum*. Même si le paramètre mesuré n'est pas le même dans les deux cas, il semble que la communauté soit plus sensible qu'une espèce cultivée en conditions contrôlées.

4.1.2. Diméthénamide

Cet herbicide a été introduit sur le marché par Sandoz AG au début des années 90, mais il est aujourd'hui commercialisé par BASF. C'est un chloroacétamide qui perturbe la différenciation des tissus, la division et l'élongation cellulaires. Il perturbe la synthèse des lipides en inhibant l'élongation des chaînes d'acides gras (Tomlin, 2003). La formulation commerciale testée dans cette étude est le Frontier®. Les effets de cet herbicide sur le phytoplancton n'ont quasiment pas été étudiés. Couderchet *et al*. (1998) ont montré que l'exposition de l'espèce d'eau douce *Scenedesmus acutus* à 5 µM (soit 1.38 mg/L, $MM_{diméthénamide}$ = 275.8 g/mol) de diméthénamide entraînait une inhibition de croissance de 60% ; à 0.1 µM (soit 27.6 µg/L), l'incorporation de l'acide linoléique par cette algue était inhibée de 41%. Cette étude illustre bien qu'en fonction du paramètre considéré, l'effet induit par l'herbicide peut être détecté pour des concentrations inférieures de deux ordres de grandeur.

En Rade de Brest, cet herbicide était présent entre 1999 et 2007 à des concentrations maximales de 0.003 µg/L à 0.037 µg/L (source : http//www.rade-brest.fr/).

4.1.3. Glyphosate

Le glyphosate a été introduit par Monsanto en 1974. Il inhibe l'enzyme 5-enolpyruvoyl-shikimate-3-phosphate synthase (EPSPS), impliquée dans la voie métabolique de synthèse des acides aminés aromatiques (Tomlin, 2003). La formulation commerciale testée dans cette étude est le Roundup®.

Le glyphosate est un herbicide non sélectif très utilisé, aussi bien en agriculture que par les particuliers et les services de voiries. Cet herbicide, ainsi que son métabolite l'AMPA, sont des contaminants régulièrement détectés en Rade de Brest : entre 1999 et 2007, les concentrations maximales de glyphosate mesurées étaient comprises entre 0.08 et 0.41 µg/L ; celles d'AMPA étaient comprises entre 0.16 et 0.64 µg/L (source : http://www.rade-brest.fr/).

Les études réalisées sur le phytoplancton exposé au glyphosate (Tableau 2), en cultures monospécifiques, révèlent des effets de cet herbicide sur les paramètres de croissance, photosynthèse et chl *a*, pour des concentrations en mg/L. La réponse de la seule algue marine testée est dans le même ordre de grandeur que celle des espèces d'eau douce.

Tableau 2 - Effets du glyphosate sur le phytoplancton (PEO : Pas d'Effet Observé)

Organisme	Origine	Expérience	Paramètre	Effet	Référence
Scenedesmus quadricauda	Eau douce	Culture monospécifique	Taux de croissance Photosynthèse Contenu chl a	↓ 2 mg/L ↓ 2 mg/L ↓ 2 mg/L	Wong, 2000
Chlorella pyrenoidosa	Eau douce	Culture monospécifique	CE_{50} croissance	3.53 mg/L	Ma *et al*., 2001
Selenastrum capricornutum *Skeletonema costatum*	Eau douce Marine	Culture monospécifique Culture monospécifique	CE_{50} croissance CE_{50} croissance	5.81 mg/L 1.85 mg/L	Tsui et Chu, 2003
Communauté naturelle	Eau douce	Microcosmes *in situ*	Nombre d'espèces	↓ 1 µg/L	Abdel-Hamid *et al*., 1996
Communauté naturelle	Marine	Prélèvement *in situ*	Production primaire	PEO	Nielsen et Dahllöf, 2007

Par contre, le nombre d'espèces présentes dans une communauté naturelle d'eau douce exposée au glyphosate, a chuté de façon significative dès 1 µg/L (Abdel-Hamid *et al*., 1996). Bien qu'il s'agisse d'une communauté d'eau douce, cette étude montre que de faibles concentrations en glyphosate, de l'ordre de celles retrouvées en milieu naturel côtier, peuvent affecter la diversité des communautés phytoplanctoniques. De plus, on peut aussi constater que la communauté d'eau douce est beaucoup plus sensible que ne le sont les espèces cultivées en monospécifique et en conditions contrôlées. La communauté naturelle marine testée par Nielsen et Dahllöf (2007) n'a pas montré d'effet du glyphosate sur la production primaire, pour une gamme de concentrations de 0.1 µM (soit 16.9 µg/L, $MM_{glyphosate}$ = 169.1 g/mol) à 10 µM (soit 1.69 mg/L), dans les conditions de l'expérience.

4.1.4. Nicosulfuron

Le nicosulfuron a été introduit en 1990 par Du Pont de Nemours, c'est une sulfonylurée qui inhibe la biosynthèse des acides aminés essentiels valine et isoleucine. Il stoppe donc la

division cellulaire et la croissance de la plante (Tomlin, 2003). La formulation commerciale testée dans cette étude est le Milagro®.

Les concentrations maximales détectées en Rade de Brest de 1999 à 2007 (source : http://www.rade-brest.fr/) sont comprises entre 0.006 et 0.025 µg/L. Cet herbicide n'est apparemment pas un contaminant majeur de la Rade.

Les effets du nicosulfuron ont été évalués sur des espèces de phytoplancton et des communautés naturelles d'eau douce (Tableau 3).

Rappel : la NOEC, « No Observed Effect Concentration », ou CSEO « Concentration Sans Effet Observé », est la concentration la plus forte pour laquelle aucun effet n'est observé.

Tableau 3 - Effets du nicosulfuron sur le phytoplancton (PEO : Pas d'Effet Observé)

Organisme	Origine	Expérience	Paramètre	Effet	Référence
Chlorella pyrenoidosa	Eau douce	Culture monospécifique	CE_{50} croissance	2.2 mg/L	Ma *et al*., 2001
Chlorella vulgaris Léman	Eau douce	Culture monospécifique	CE_{50} croissance LOEC	>256 mg/L >256 mg/L	Seguin *et al*., 2001
Chlorella vulgaris Villaumur			CE_{50} croissance LOEC	>256 mg/L 256 mg/L	
Navicula accomoda			CE_{50} croissance LOEC	>256 mg/L >256 mg/L	
Pseudokirchneriella subcapitata			CE_{50} croissance LOEC	>256 mg/L 256 mg/L	
Scenedesmus acutus			CE_{50} croissance LOEC	>256 mg/L 2 mg/L	
Nitzschia sp.			CE_{50} croissance LOEC	>256 mg/L 62 mg/L	
Asterionella formosa			CE_{50} croissance LOEC	>256 mg/L 1 mg/L	
Communauté naturelle		Microcosmes *in situ*	Biomasse	↑ 10 µg/L (2 exp/7)	
Chlorella vulgaris	Eau douce	Culture monospécifique	CE_{50} taux de croissance NOEC	PEO PEO	Leboulanger *et al*., 2001
Navicula accomoda			CE_{50} taux de croissance NOEC	PEO 50 mg/L	
Oscillatoria limnetica			CE_{50} taux de croissance NOEC	2.4 mg/L 0.4 mg/L	
Pseudokirchneriella subcapitata			CE_{50} taux de croissance NOEC	PEO PEO	
Communauté naturelle		Microcosmes *in situ*	Biomasse maximale	↓ 10 µg/L	

Les espèces testées ne semblent pas très sensibles au nicosulfuron, puisque les valeurs de CE_{50}, LOEC ou NOEC qui ont été déterminées sur les cultures monospécifiques sont en mg/L. Par contre, dans les deux études où l'herbicide a été testé à 10 µg/L sur les communautés, un effet opposé est détecté sur la biomasse : dans un cas elle augmente (Seguin *et al*., 2001) alors que dans l'autre cas elle diminue (Leboulanger *et al*., 2001). Il semble donc que là aussi, les communautés soient plus sensibles à l'herbicide que les monocultures, avec un effet détectable à 10 µg/L.

4.2. Fongicide : époxiconazole

Le seul fongicide testé dans cette étude est l'époxiconazole, qui est commercialisé par BASF depuis 1993. C'est un triazole qui inhibe la C-14-déméthylase impliquée dans la synthèse des stérols (Tomlin, 2003). La formulation commerciale testée dans cette étude est l'Opus®. La seule étude trouvée sur ce fongicide et une espèce de phytoplancton (Akcha *et al*., 2008) rapporte une augmentation significative du nombre de cassures de brins d'ADN lorsque le dinoflagellé marin *Karenia mikimotoï* est exposé à 100 µg/L d'époxiconazole (formulation Opus). Aucune génotoxicité n'est démontrée à 1 et 10 µg/L.

4.3. Insecticide : chlorpyrifos-éthyl

Le seul insecticide testé dans cette étude est le chlorpyrifos-éthyl, qui est commercialisé par Dow AgroSciences depuis 1965. Il appartient à la famille des organophosphorés, et agit au niveau du système nerveux des insectes, en inhibant l'acétylcholinestérase (Tomlin, 2003). La formulation commerciale testée dans cette étude est le Dursban 4®.

Tableau 4 - Effets du chlorpyrifos sur le phytoplancton

Organisme	Origine	Expérience	Paramètre	Effet	Référence
Pseudokirchneriella subcapitata	Eau douce	Culture monospécifique	CE_{10} photosynthèse	5.9 mg/L	Bengtson *et al*., 2005
Ankistrodesmus falcatus	Eau douce			3.8 mg/L	
Scenedesmus quadricauda	Eau douce			0.51 mg/L	
Chlorella vulgaris	Eau douce			0.22 mg/L	
Monoraphidium arcuatum	Eau douce			0.19 mg/L	
Scenedesmus subspicatus	Eau douce			0.15 mg/L	
Phaeodactylum tricornutum	Marine			0.13 mg/L	
Dunaliella tertiolecta	Marine			41 µg/L	
Nitzschia closterium	Marine			38 µg/L	
Karenia mikimotoï	Marine	Culture monospécifique	Cassures ADN	1 µg/L	Akcha *et al*., 2008

Les espèces exposées au chlorpyrifos en monocultures, révèlent des CE_{10} en mg/L, ou centaines de µg/L, sauf pour les deux dernières espèces marines dont les valeurs sont proches de 40 µg/L. L'étude de Bengtson *et al*. (2005) semble indiquer une plus grande sensibilité des espèces marines à cet insecticide.

D'autres études ont été réalisées sur l'impact du chlorpyrifos et incluant les communautés phytoplanctoniques (DeLorenzo *et al*., 1999a ; Van Wijngaarden *et al*., 2005), mais les microcosmes étaient aussi composés d'autres éléments du réseau trophique. Les effets observés sur le phytoplancton ayant été identifiés comme indirects et dus à la perturbation d'autres composants, ces études ne sont pas inclues dans le tableau.

4.4. Conclusion

Les pesticides que nous avons choisis de tester dans cette thèse, ont été relativement peu étudiés quant à leurs effets potentiels sur le phytoplancton. Parmi eux, le glyphosate semble le plus étudié.

Ces pesticides, hormis le chlorpyrifos et l'époxiconazole, ont fait l'objet d'un suivi au niveau de la Rade de Brest, depuis 1993. Les valeurs maximales relevées entre 1999 et 2007 font apparaître deux tendances : les herbicides bentazone, diméthénamide et nicosulfuron ne sont jamais détectés au-delà de 0.045 µg/L. Leurs concentrations maximales restent donc inférieures à la valeur symbolique de 0.1 µg/L qui correspond à la norme de potabilité des eaux pour les substances prises individuellement. Par contre, le glyphosate et son métabolite l'AMPA ont été détectés à des concentrations maximales de 0.41 µg/L et 0.64 µg/L respectivement, ce qui est certainement révélateur de l'usage important de cet herbicide sur le bassin versant de la Rade de Brest. On peut penser que la Rade est sujette à une contamination répétée par le glyphosate et l'AMPA, ce qui est assez inquiétant au niveau écologique.

D'une manière générale, il faut garder à l'esprit que ces valeurs correspondent à des échantillonnages ponctuels, qui, même s'ils sont réguliers, ne permettent pas de rendre compte de la dynamique de contamination de la Rade par ces pesticides, ni de leur temps de résidence ou de leur vitesse de dilution. Il est fort probable que ces mesures ne soient pas représentatives des pics de contamination pouvant intervenir lors des épisodes pluvieux qui suivent les périodes d'application de ces substances.

Les travaux réalisés sur les pesticides étudiés dans cette thèse, même s'ils sont peu nombreux, permettent tout de même d'aboutir à plusieurs constats :

- la sensibilité des espèces testées en monocultures ne semble pas dépendre de leur milieu d'origine (eau douce ou marine) ;
- cette sensibilité dépend de la méthode d'analyse appliquée, et la différence peut être de plusieurs ordres de grandeur ;
- il semble que les communautés soient beaucoup plus sensibles que les espèces testées individuellement, avec là aussi une réponse qui intervient plusieurs ordres de grandeurs avant la réponse monospécifique.

C'est pourquoi, pour ce travail de thèse, nous avons choisi de travailler sur des communautés phytoplanctoniques marines, dont la sensibilité aux pesticides a été relativement peu étudiée. Les niveaux de contamination des eaux côtières nous ont conduit à travailler avec des concentrations représentatives de celles retrouvées (0.1 µg/L) ou correspondant à un pic de pollution (1 µg/L). Mais les besoins de validation des outils et méthodes appliqués nous ont aussi conduit à tester des concentrations plus élevées, qui pourraient intervenir lors d'un pic exceptionnel de pollution en estuaire, mais plus proche des concentrations relevées en eau douce (10 µg/L). La concentration la plus élevée que nous avons testée (100 µg/L), n'est pas du tout représentative des niveaux de contamination en milieu naturel, mais elle était destinée à obtenir des « témoins positifs » de nature à valider les méthodes appliquées.

Chapitre 2 – Matériels et Méthodes

1. Localisation des sites expérimentaux

Trois séries d'expériences de terrain ont été réalisées, sur deux sites expérimentaux dans le sud du Finistère (Figure 3) :

– l'archipel de Glénan en 2004 et 2005

– la baie de Port-la-Forêt en 2006.

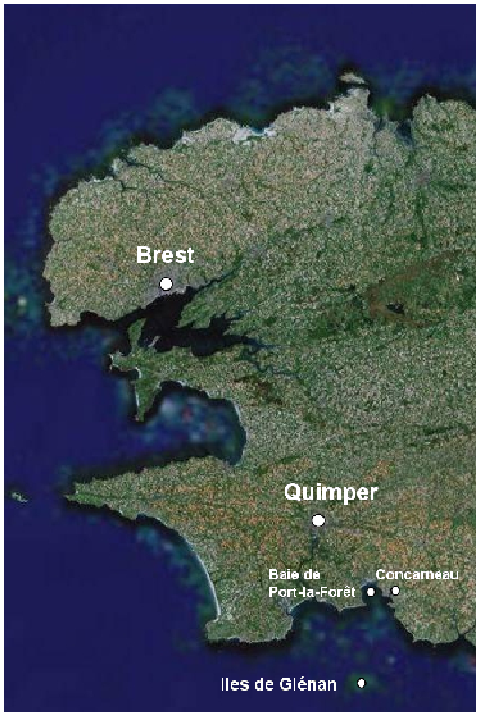


Figure 3 - Localisation des sites expérimentaux

1.1. Archipel de Glénan

Cet archipel qui fait partie de la commune de Fouesnant est situé à 47°43′N 04°00′W, à environ 9 milles marins au sud de Concarneau. Il est constitué de 9 îles et de nombreux îlots (Figure 4). L'île principale, Saint-Nicolas, compte quelques habitations qui sont surtout occupées pendant la belle saison. Le classement d'une partie de l'archipel en Réserve Naturelle y proscrit l'usage de pesticides. Ce site a été choisi en raison de son éloignement des côtes et de l'absence de sources majeures de pollution anthropique. Les pollutions potentielles peuvent provenir des nombreux bateaux qui y transitent ou y séjournent durant la saison touristique. Les principales zones de mouillage sont La Pie et La Chambre, respectivement à l'est et au sud de St-Nicolas.

Le site expérimental est situé au nord de St-Nicolas et à l'ouest de l'île de Brunec. La profondeur est comprise entre 8 et 12 m en fonction de l'heure et du coefficient de marée.

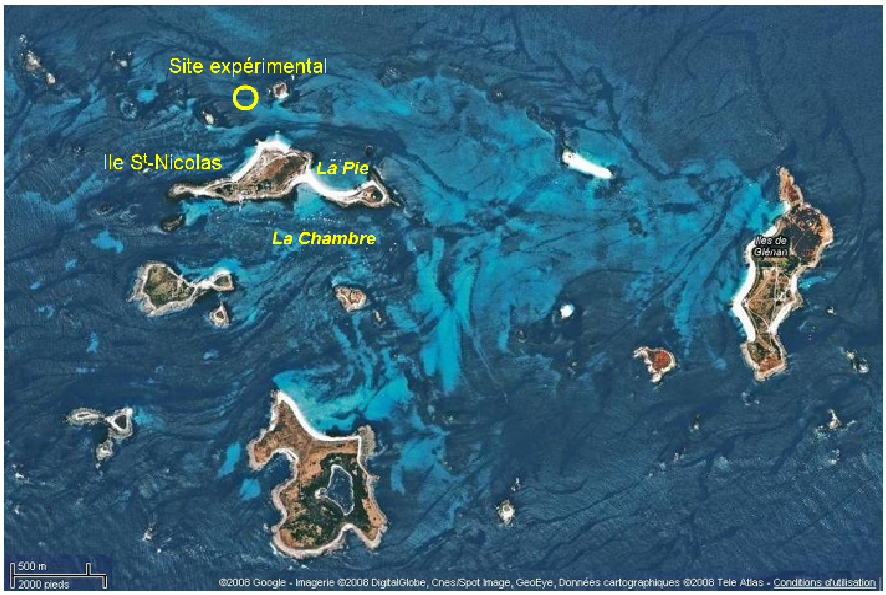


Figure 4 - Emplacement du site expérimental dans l'archipel de Glénan

1.2. Baie de Port-la-Forêt

Le second site expérimental est situé dans la baie de Port-la-Forêt (Figure 5), à environ 700 m de la côte de Beg-Meil, sur une ancienne concession ostréicole (47°52'12"N, 03°58'35"W). Ce site est davantage soumis aux apports anthropiques par rapport au site de l'archipel : les zones de mouillage y sont plus nombreuses et plus importantes (Beg-Meil, Cap-Coz, La Forêt Fouesnant, Concarneau), et la baie, très fréquentée en période touristique, est entourée de parcelles agricoles.

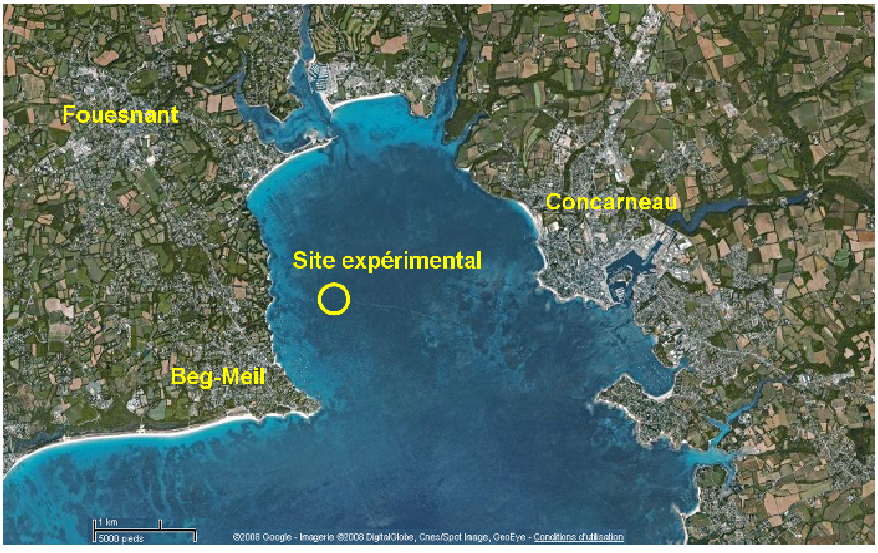


Figure 5 - Emplacement du site expérimental dans la baie de Port-la-Forêt

2. Dispositif expérimental

Les microcosmes *in situ* étaient constitués de flacons en verre de 2.3 L fermés hermétiquement et disposés sur des structures en inox immergées dans le milieu naturel. Au cours des expériences réalisées sur le phytoplancton et le naissain d'huîtres, les réplicats (4 à 6) de chaque condition testée étaient répartis uniformément sur tout le pourtour des structures en inox.

2.1. Microcosmes : phytoplancton (2004, 2005, 2006)

Afin de tester l'impact des pesticides sur les communautés naturelles de phytoplancton, les bouteilles étaient remplies avec 2 L d'eau de surface du site expérimental filtrée à 200 µm. Cette filtration avait pour but d'éliminer les débris et particules grossières. Les microcosmes contenaient donc les communautés microbiennes eucaryotes et procaryotes, ainsi que le zooplancton de taille inférieure à 200 µm et 300 mL d'air.

Au cours des expériences, un renouvellement partiel du contenu des microcosmes était effectué tous les deux à quatre jours (de la Broise et Palenik, 2007), en fonction des conditions météorologiques, afin de reproduire au mieux les fluctuations des masses d'eau. Le renouvellement était réalisé avec de l'eau de surface du site expérimental filtrée à 200 µm, à raison de 5% du volume par jour : ainsi, après deux, trois ou quatre jours en immersion, 200 mL, 300 mL ou 400 mL de chaque microcosme étaient collectés dans des bidons et remplacés par le même volume d'eau de surface du site expérimental filtrée à 200 µm.

Les six formulations commerciales décrites dans le chapitre 1, partie « 4. Pesticides » ont été testées sur les communautés naturelles de phytoplancton, à 0.1 µg/L, 1 µg/L, 10 µg/L et 100 µg/L de substance active ajoutée.

2.2. Microcosmes : phytoplancton et naissain d'huîtres (2006)

Ces microcosmes étaient constitués de la même manière que les microcosmes phytoplanctoniques. Chaque microcosme contenait en plus une plaque de PVC sur laquelle le naissain d'huîtres avait été « capté » au préalable (Figure 6 et Figure 7).

Lors de l'expérience avec le naissain, la seule nourriture apportée à ce dernier était constituée par le phytoplancton naturel présent dans l'eau. Afin de garantir des apports suffisants, tous les deux jours le contenu des microcosmes en eau était complètement récupéré en bidons et remplacé par de l'eau de surface du site expérimental. À chaque renouvellement complet, une dose de pesticide était ajoutée aux microcosmes contaminés.

Deux formulations commerciales ont été testées sur le naissain : l'herbicide Basamaïs (bentazone) et le fongicide Opus (époxiconazole).

Figure 6 - Photo d'un microcosme contenant le phytoplancton naturel et le naissain d'huîtres

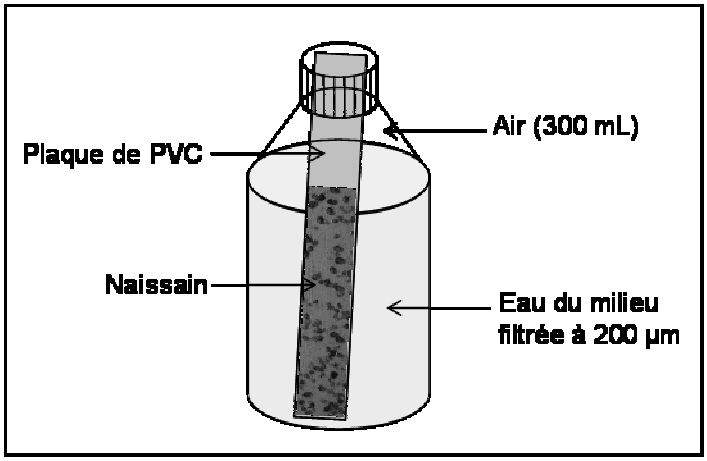


Figure 7 - Schéma d'un microcosme contenant le phytoplancton naturel et le naissain d'huîtres

2.3. Structure supportant les microcosmes

Les microcosmes étaient disposés sur trois structures en inox (Figure 8), pouvant chacune porter 36 microcosmes. Ces structures, de 3 m de diamètre et 2 m de hauteur, étaient constituées de la manière suivante : les emplacements pour les microcosmes étaient situés sur un cercle supporté par quatre tiges cintrées équipées de flotteurs. Le tout était fixé à une chaîne (Figure 9), elle-même suspendue à une bouée de surface et reliée à un corps-mort en béton de 400 kg au niveau du sol. Le système était conçu avec une longueur de chaîne suffisante pour que les microcosmes soient maintenus à 4 m (Site Glénan) ou 6 m (Site Port-la-Forêt) de la surface, quelles que soient les conditions de marnage.

Figure 8 - Photo de la structure en inox servant de support aux microcosmes

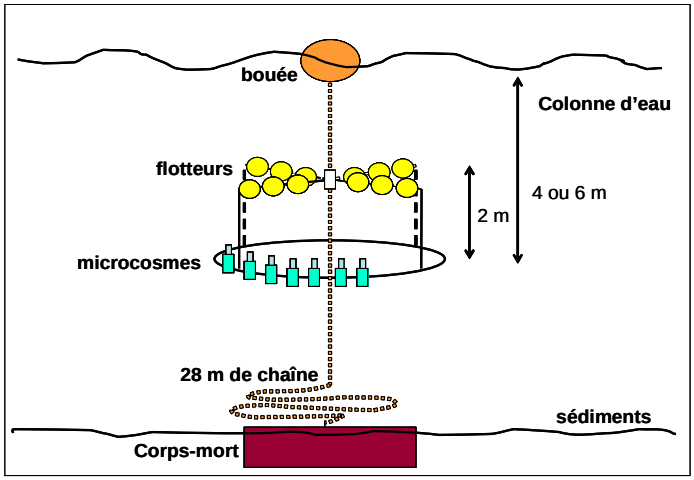


Figure 9 - Schéma représentant la structure en inox *in situ*

Lors des interventions sur site, les trois structures étaient successivement remontées à la surface grâce à un système de cordages. Chaque structure était ensuite hissée sur la proue d'une prame (Figure 10). Sa forme circulaire permettait de la faire tourner autour de la proue, afin d'effectuer le renouvellement des microcosmes en évitant une exposition prolongée de toutes les bouteilles au soleil. De cette manière, la stabilité de l'ensemble (prame et structure) était maintenue, le centre de gravité étant situé sous la prame.

Pour chaque expérience, le contenu des microcosmes était collecté au jour final pour analyses.

Figure 10 - Manipulation de la structure

3. Traitement des échantillons

Le dernier jour des expériences, l'ensemble des bouteilles était récupéré et acheminé au laboratoire. Les bouteilles étaient maintenues à l'obscurité lors des étapes de transport et filtration, jusqu'à la congélation des échantillons.

3.1. Communautés phytoplanctoniques

Les analyses effectuées lors des expériences sur les communautés phytoplanctoniques sont résumées ci-dessous (Figure 11).

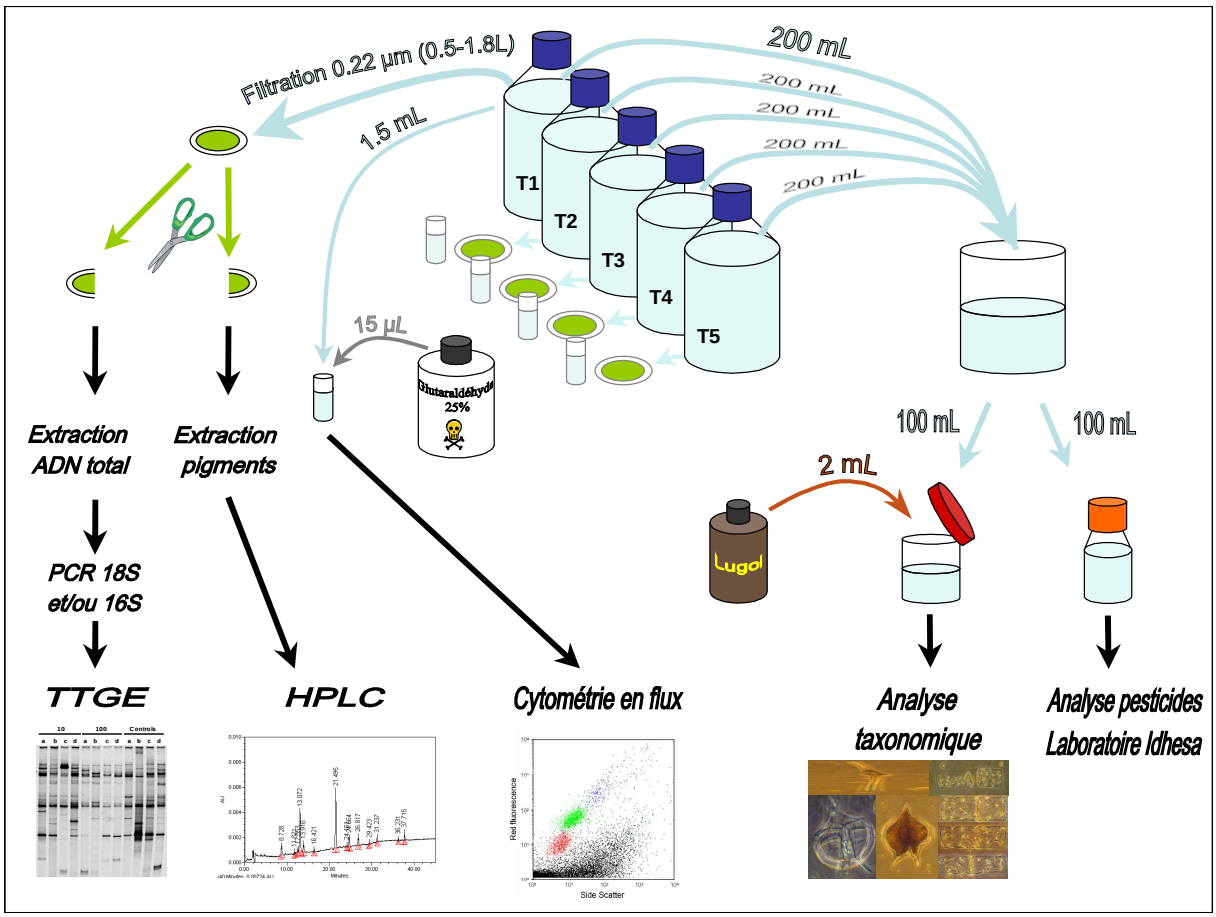


Figure 11 - Traitement des microcosmes contenant les communautés phytoplanctoniques

3.1.1. Extraction d'ADN

Ce protocole est décrit dans la partie «Materials and methods: nucleic acid extraction» de l'Article 1 – Comparative study of three analysis methods (TTGE, flow cytometry and HPLC) for xenobiotic impact assessment on phytoplankton communities p.104.

3.1.2. Amplification de l'ADN

Ce protocole est décrit dans la partie « Materials and methods: PCR » de l'Article 1 – Comparative study of three analysis methods (TTGE, flow cytometry and HPLC) for xenobiotic impact assessment on phytoplankton communities p.104.

3.1.3. Empreintes génétiques

Ce protocole est décrit dans la partie « Materials and methods : TTGE » de l'Article 1 – Comparative study of three analysis methods (TTGE, flow cytometry and HPLC) for xenobiotic impact assessment on phytoplankton communities p.105.

3.1.4. Cytométrie en flux

Ce protocole est décrit dans la partie « Materials and methods : flow cytometry » de l'Article 1 – Comparative study of three analysis methods (TTGE, flow cytometry and HPLC) for xenobiotic impact assessment on phytoplankton communities p.104.

3.1.5. Empreintes pigmentaires par HPLC

Ce protocole est décrit dans la partie « Materials and methods : HPLC of pigments » de Article 1 – Comparative study of three analysis methods (TTGE, flow cytometry and HPLC) for xenobiotic impact assessment on phytoplankton communities , p. 81.

3.1.6. Identification et dénombrement au microscope

Ce protocole est décrit dans la partie « Materials and methods : species determination » de l'Article 1 – Comparative study of three analysis methods (TTGE, flow cytometry and HPLC) for xenobiotic impact assessment on phytoplankton communities p.104.

3.1.7. Analyses statistiques

Ce protocole est décrit dans la partie « Materials and methods : statistical analysis » de l'Article 1 – Comparative study of three analysis methods (TTGE, flow cytometry and HPLC) for xenobiotic impact assessment on phytoplankton communities p.105.

3.2. Naissain d'huîtres

Les analyses effectuées lors des expériences sur le naissain d'huîtres sont résumées dans la Figure 12

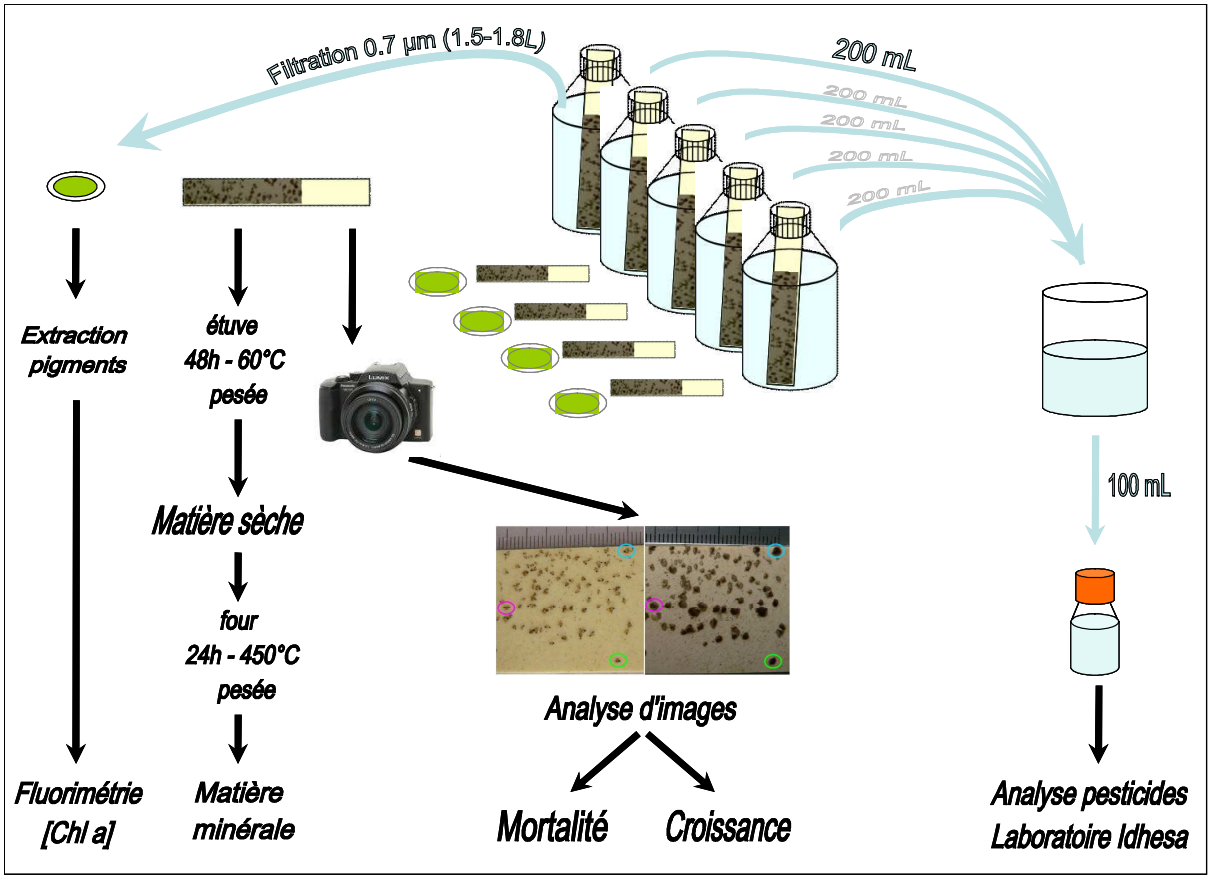


Figure 12 - Traitement des microcosmes contenant les communautés phytoplanctoniques et le naissain d'huîtres

3.2.1. Production et fixation des larves

Ce protocole est décrit dans la partie « Materials and methods : production of pediveligers » de l'Article 3 – *In situ* microcosms, a tool for assessment of pesticide impacts on oyster spat (Crassostrea *gigas)*, p.117.

3.2.2. Répartition des plaques en microcosmes

Ce protocole est décrit dans la partie « Materials and methods : preparation of spat plates » de l'Article 3 – *In situ* microcosms, a tool for assessment of pesticide impacts on oyster spat (Crassostrea *gigas)*, p.118.

3.2.3. Évaluation de la mortalité

Ce protocole est décrit dans la partie « Materials and methods : image analysis of oysters » de l'Article 3 – *In situ* microcosms, a tool for assessment of pesticide impacts on oyster spat (Crassostrea *gigas)*, p.119.

3.2.4. Évaluation de la croissance

Ce protocole est décrit dans la partie « Materials and methods : image analysis of oysters » de l'Article 3 – *In situ* microcosms, a tool for assessment of pesticide impacts on oyster spat (Crassostrea *gigas)*, p.119-120.

3.2.5. Mesure de la matière organique et des cendres

Ce protocole est décrit dans la partie « Materials and methods : spat OW content » de l'Article *3 – In* situ microcosms, a tool for assessment of pesticide impacts on oyster spat *(Crassostrea gigas)*, p.120.

3.2.6. Mesure de la chlorophylle *a*

Ce protocole est décrit dans la partie « Materials and methods : chlorophyll *a* » de l'Article 3 – *In situ* microcosms, a tool for assessment of pesticide impacts on oyster spat (Crassostrea *gigas)*, p.119.

3.2.7. Analyses statistiques

Ce protocole est décrit dans la partie « Materials and methods : statistical analysis » de l'Article 3 – *In situ* microcosms, a tool for assessment of pesticide impacts on oyster spat (Crassostrea *gigas)*, p.120.

3.3. Pesticides

3.3.1. Glyphosate et AMPA

Ce protocole est décrit dans la partie « Materials and methods : pesticide » de Article 2 – Impact of Roundup on the marine microbial community, as shown by an *in situ* microcosm experiment

3.3.2. Autres pesticides testés

Ce protocole est décrit dans la partie « Materials and methods : Pesticides » de l'Article 3 – *In situ* microcosms, a tool for assessment of pesticide impacts on oyster spat (Crassostrea *gigas)*, p.119.

Chapitre 3 – Impact des pesticides sur le phytoplancton naturel et le naissain d'huîtres

1. Comparaison de trois méthodes d'analyse des communautés : impact du fongicide Opus

1.1. Introduction

Lorsque des communautés sont exposées à un contaminant pouvant affecter certaines fonctions physiologiques, il se peut que la fonction mesurée au niveau de la communauté entière ne permette pas la mise en évidence d'effets toxiques. En effet, les membres de la communauté qui ne sont pas affectés par le contaminant peuvent compenser les effets de ce dernier et maintenir le fonctionnement de la communauté (Dahl et Blanck, 1996 ; Petersen et Gustavson, 2000 ; Caquet *et al*., 2001). C'est pourquoi nous avons choisi, pour nos expériences sur les communautés phytoplanctoniques, d'appliquer des méthodes d'analyse de la structure des communautés et non de leurs fonctions.

Les variations naturelles des communautés peuvent masquer les perturbations occasionnées par les toxiques (Barry et Logan, 1998). La sensibilité des méthodes appliquées pour détecter un effet est donc un critère primordial pour conclure quant à la toxicité de la substance étudiée. Cette sensibilité dépend aussi de la variable analysée pour étudier la structure des communautés.

Dans l'étude qui suit, des communautés microbiennes (<200 µm) naturelles ont été exposées en microcosmes *in situ* au fongicide Opus (époxiconazole), à 1, 10 et 100 µg/L de substance active, pendant 12 jours.

Trois méthodes d'analyse de la structure des communautés ont été choisies, afin de comparer leurs sensibilités respectives dans la détection d'effets liés à l'exposition au fongicide :

- la TTGE, qui permet d'obtenir une empreinte génétique représentant la diversité d'un gène au sein d'une communauté (ici le gène codant pour l'ARN ribosomal eucaryote 18S) ;
- la cytométrie en flux, qui permet de discriminer certaines populations photosynthétiques en fonction de critères liés à la morphologie et au contenu en chlorophylle et phycoérythrine ;
- l'HPLC des pigments, qui permet d'obtenir une empreinte pigmentaire de la communauté photosynthétique.

Article 1 – Comparative study of three analysis methods (TTGE, flow cytometry and HPLC) for xenobiotic impact assessment on phytoplankton communities

Version corrigée re-soumise à la revue Ecotoxicology

Sabine Stachowski-Haberkorn[a], Louis Quiniou[b], Beatriz Beker[c], Hansy Haberkorn[b], Dominique Marie[d], Denis de la Broise[a,*]

[a] Université Européenne de Bretagne, LUBEM (EA3882), UBO, 6 rue de l'université, 29334 Quimper, France.

[b] Université Européenne de Bretagne, LEMAR (UMR 6539), UBO, IUEM, Place Nicolas Copernic, Technopôle Brest Iroise, 29280 Plouzané, France

[c] Centre d'Océanologie de Marseille, rue de la Batterie des Lions, 13007 Marseille, France.

[d] Station Biologique de Roscoff, UMR7144, CNRS et Université Pierre et Marie Curie, Place G. Teissier, 29682, Roscoff, France

* Corresponding author. Tel.: +33 2 98 10 00 61; Fax: +33 2 98 10 00 62.

E-mail: denis.de-labroise@univ-brest.fr

Abstract

The impacts of the fungicide Opus® (epoxiconazole) on marine phytoplankton communities were assessed in a 12–day field experiment using in situ microcosms maintained underwater at 6 m depth.

Three community analysis methods were compared for their sensitivity threshold in fungicide impact detection. When phytoplankton communities were exposed to 1 µg L^{-1} of epoxiconazole, no effects could be demonstrated using TTGE (Temporal Temperature Gradient gel Electrophoresis), flow cytometry or HPLC. When exposed to 10 µg L^{-1}, TTGE fingerprints from PCR amplified 18S rDNA of communities exhibited significant differences compared with controls (ANOSIM, $p = 0.028$). Neither flow cytometry counts, nor HPLC pigment profiles allowed to show significant differences in microcosms exposed to 10 µg L^{-1} of epoxiconazole.

When exposed to 100 µg L^{-1}, all three methods allowed to detect significant differences in treated microcosms, as compared to controls. The TTGE analysis appears in this study as the most sensitive method for fungicide impact assessment on eukaryote microbial communities.

Keywords: microcosm, phytoplankton community, epoxiconazole, TTGE, flow cytometry, HPLC.

Introduction

The massive use of pesticides induces acute or chronic contamination of aquatic biotas, via spray drift, leaching and run-off from urban and agricultural treated areas. Such contaminants can generate adverse effects on non-target organisms, including phytoplankton, involved in the microbial loop. This can ultimately affect the workings of the ecosystem, as the microbial food web plays a critical role in nutrient cycling and transfer of nutrients to higher trophic levels (DeLorenzo et al. 1999; Downing et al. 2004).

Numerous studies have been published about pesticide toxicity assessment on phytoplankton, using single-species tests (DeLorenzo et al. 2004; Gatidou and Thomaidis 2007; Rioboo et al. 2002; Santin-Montanya et al. 2007; Weiner et al. 2004). But such tests are subjected to high variability in the sensitivity of tested species (Cairns, 1986). Furthermore, Bérard et al. (1999a) demonstrated that single-species tests may fail to predict indirect or system responses, such as changes in the population distribution overtime. Studies focusing on the whole natural community and based on biological parameters measured at the community level, provide more reliable predictions about pesticide safety in aquatic environments (Barry and Logan, 1998; Bérard et al. 1999a).

Studies on natural phytoplankton community can be carried out using in situ microcosms. Such systems give a view of the whole community, including populations that are hard to maintain; they can thus provide a wider survey of organism sensitivity for toxicants (Yasuno et al. 1993). Leboulanger et al. (2001) and Seguin et al. (2001) pointed out the need for reliable toxicity data from such microcosm systems.

As significant perturbations of communities may be difficult to detect in background variations (Barry and Logan, 1998), studies should deal with several community variables using various methods.

In the 1980s, the development of automated High Performance Liquid Chromatography (HPLC) methods for pigment separations allowed the first large scale studies of phytoplankton communities (Jeffrey et al. 1999). HPLC phytoplankton analysis was reported in studies involving spatial and/or temporal community dynamics (Furuya et al. 2003; Wänstrand and Snoeijs 2006) and in enrichment experiments (Suzuki et al. 2005; Wong and Crawford 2006). This tool was also successfully applied in a water-quality monitoring study (Sherrard et al. 2006) and in ecotoxicological studies assessing herbicide effects on phytoplankton community (Devilla et al. 2005; Dorigo et al. 2004; Readman et al. 2004).

Flow cytometry can also provide informations about the distribution of natural microbial populations (Marie et al. 1999; Rutten et al. 2005). Toxicity assessment using flow cytometry was reported in studies involving either phytoplankton cultures (Lage et al. 2001; Stauber et al. 2005; Yu et al. 2007) or natural photosynthetic communities (de la Broise and Palenik 2007; Readman et al. 2004; Stachowski-Haberkorn et al. 2008; Zamora-Ley et al. 2006).

Community changes can also be assessed at the molecular level: genetic fingerprinting techniques, such as Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) (Muyzer et al. 1993) or Temporal Temperature gradient Gel Electrophoresis (TTGE) (Yoshino et al. 1991) provide an

overview of the whole community composition, including unculturable strains, which can account for 90% of microorganisms (Ward et al. 1990). When DGGE is run using a denaturing chemical gradient in the gel space at a constant temperature, TTGE is run using a homogeneous denaturing concentration and the temperature is enhanced during migration to ensure DNA denaturation. In the present study, the TTGE was applied because, as there is no need for a chemical gradient in the gel, analyses are easier to perform (Marie et al. 2006). Both DGGE and TTGE methods have been useful tools to describe the diversity of the whole prokaryote and eukaryote microbial communities in aquatic environments (Díez et al. 2001; Marie et al. 2006; Schäfer et al. 2001; Van Hannen et al. 1998). More recently, these methods were successfully applied to detect disturbances in microbial communities exposed to pollution (Kostanjšek et al. 2005; Pesce et al. 2006, 2008; Petersen et al. 2004; Stachowski-Haberkorn et al. 2008).

Even though HPLC, flow cytometry and fingerprinting techniques have proven their efficiency and reliability in toxicity assessment on phytoplankton communities, there is a lack of knowledge about the sensitivity thresholds of such analyses. However, the detection of an effect, and thus the conclusion of a research study, depends on the method(s) applied. Therefore, comparative data are essential to avoid misleading conclusions.

Among studies of pesticide toxicity assessment, fungicide impact studies on phytoplankton are very scarce. However, some species can be highly sensitive to fungicides (Abdel-Hamid et al. 1996). As far as we know, only one study reported adverse effects of epoxiconazole on a phytoplankton species: after a 24 h exposure to 100 $\mu g\ L^{-1}$ of its commercial formulation Opus, the dinoflagellate *Karenia mikimotoï* had significantly increased extent of DNA strand breaks (Akcha et al. 2008). This also highlights the potential genotoxicity of this fungicide. No data on epoxiconazole concentration in marine waters was available. However, pesticide concentrations encountered in estuarine areas are usually below 1 $\mu g\ L^{-1}$ (Lehotay et al. 1999; Oros et al. 2003; Steen et al. 2001).

In the present study, natural marine microbial communities were exposed to the fungicide Opus at 1, 10 and 100 μgL^{-1} of the active ingredient epoxiconazole, using in situ microcosms, in order to compare three analytical methods (TTGE, flow cytometry and HPLC analysis of pigments) for their sensitivity threshold in xenobiotic impact assessment.

Materials and Methods

In order to assess the effects of Opus on marine phytoplankton communities, a set of microcosms containing natural surrounding filtered seawater was exposed to the fungicide and immersed in situ. The genetic fingerprints of microcosm eukaryote communities were obtained from the whole community DNA amplified extracts, using Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TTGE) analysis. Pigment analyses were made from biomass collected on filters, and microcosm subsamples were also analysed using flow cytometry, and microscopic species determination.

Fungicide

The pesticide tested in this study was the commercial formulation of the fungicide epoxiconazole, cis-1-[[3-(2-chlorophenyl)-2-(4-fluorophenyl)oxiranyl]methyl]-=1H-1,2,4-triazole, (Opus®, BASF). Concentration values represent those of the pure active substance. The fungicide stock solution (10 mg L^{-1} epoxiconazole) was prepared in 0.22 µm filtered seawater, previously autoclaved for 20 min at 121°C. The solution was then agitated for 48 h using a magnetic stirrer, and stored at -24 °C.

Freshly melted stock solution was added directly into the microcosm bottles just before immersion. Fungicide concentrations were analyzed on the last day of the experiment, on pooled water samples from all the replicate bottles of each treatment. Samples were frozen until analysis. Fungicide analyses were performed by the Idhesa Laboratory (Brest, France), using on-line solid-phase extraction coupled with liquid chromatography and electrospray ionisation-tandem mass spectrometry (HPLC Waters separation module 2690, Waters photodiode array 996 detector; Micromass® Quattro Ultima™ mass spectrometer). The detection limit was 0.005 µg L^{-1}.

Microcosms

The outdoor experiment took place in summer 2006, in Port-la-Forêt Bay, south Brittany, France (47°52'12"N, 03°58'35"W), from 16th to 28th June, over a 2-week period (de la Broise and Palenik 2007). Microcosms consisted of hermetically closed 2.3 L glass bottles. These bottles were filled with 2 L of 200 µm filtered fresh seawater from the surface layer at the field site, containing natural microbial communities, and enclosed with about 300 mL of air (de la Broise and Palenik 2007).

Sixteen microcosms were prepared: four replicates for the control and each of the three different treatments (Opus 1 µg L^{-1}, 10 µg L^{-1} and 100 µg L^{-1}). In order to validate the three analytical methods, it was decided to increase the concentrations using a factor of ten, as did Bengtson Nash et al. (2005).

Microcosms were hung on a 3 m diameter circular stainless steel frame that was anchored to the sea floor, on a 400 kg concrete block, and suspended from a surface buoy that allowed the bottles to remain at 6 m depth (mid depth of the water column), regardless of the tide. The replicate microcosm bottles of each treatment were distributed alternately all around the frame.

On days 2, 4, 7, 9 and 11, the frame was hauled out of the water and 200 mL (except for day 7, 300 mL) of the 2 litre-seawater content of each bottle were collected in a tank for proper disposal, replaced with the same volume of fresh 200 µm-filtered surrounding seawater, and the frame was re-immersed (de la Broise and Palenik 2007). No analysis was carried out on these 200 mL samples. Bottles were finally collected on day 12 for analyses.

One litre of water from each microcosm was filtered through a 0.22 µm polysulfone filter, that was then stored at -80°C until DNA extraction and HPLC pigment analyses. For cytometry

analyses, 1.5 mL from each microcosm were fixed into a cryotube with glutaraldehyde (final concentration 0.25%). Cryotubes were vortexed and left 15 minutes at room temperature before freezing in liquid nitrogen. Samples were stored at -80°C until analysis.

DNA extraction and purification

The extraction and purification protocol was previously described in Stachowski-Haberkorn et al. (2008).

PCR

Eukaryotic 18S rDNA primers were used. The primers were Euk1A and Euk516r-GC (Díez et al. 2001), which amplify a fragment of approximately 560 bp. The PCR program (Díez et al. 2001) included an initial denaturation step at 94°C for 130 s and 35 cycles as follows: denaturation at 94°c for 30 s, annealing at 56°C for 45 s and extension at 72°C for 130 s. After the last cycle, a final extension step was performed for 7 min at 72°C.

Approximately 15 ng of extracted DNA (estimated using spectrophotometry) were used as a template: the reaction mixture (50 µL) contained sterile nuclease-free water, each primer at a final concentration of 0.3 µM, Bovine Serum Albumin (final concentration 0.2 µg μL^{-1}) and Promega PCR Master Mix, (in which the final concentrations were: deoxynucleoside triphosphates (dNTPs) 200 µM each; $MgCl_2$ 1.5 mM; and Taq polymerase 25 units mL^{-1}) supplied in a reaction buffer (pH 8.5).

PCR products were checked on a 1% agarose gel before loading on TTGE gel.

TTGE

Denaturing gels (30 mL) were prepared composed of 6% polyacrylamide (stock solution: acrylamide/bis-acrylamide 37.5:1), 7 M urea, 1.25×TAE and 2 % glycerol. The stacking gel (5 mL) contained only TAE 1.25× and 6% polyacrylamide. Ammonium persulfate 10% (respectively 150 and 25 µL for the denaturing and the stacking gels) and TEMED (respectively 30 and 5 µL) were added before casting and the gel was left to polymerize at 20°C for 3-4 h. The gel dimensions were 16 cm×16 cm×1mm.

The TTGE was performed by using a Dcode universal mutation system (Bio-Rad), modified to improve accuracy and repeatability of the temperature gradient kinetics: the electrophoresis part of the Dcode system was immersed in a modified buffer tank (15 L). The tank was connected to an external temperature control unit (Cryostat Julabo, Seelbach, Germany) using 20 mm diameter tubing. Electrophoresis was performed for 18 h at 70 V in 1.25× TAE buffer. Gradual temperature increase was 57 to 62 °C. Gels were stained with SYBR Gold 1×, rinsed in 1× TAE buffer, and photographed on a UV transillumination table. Band detection on TTGE gel images was performed using the LabImage software v2.7 (Kapelan GmbH, Halle, Germany). On the basis of a band presence/absence matrix from each gel, a dendrogram was

constructed applying the Dice coefficient and the unweighted pair group method of averages (UPGMA) using the Matlab software v6.1 (The Mathworks, Natik, MA).

Flow cytometry

Samples were run using a FACSort flow cytometer equipped with a 488-nm argon laser and standard filter setup (Becton Dickinson, San Jose, CA). Two populations of photosynthetic organisms were discriminated in microcosms samples, on the basis of their scatter signals and their natural red (>630 nm) and orange fluorescence (580 ± 20 nm): *Synechococcus* and small eukaryotes (<20 µm). Usually, picoplankton is considered to range from 0.2 µm to 2 µm, and nanoplankton from 2 µm to 20 µm. For more precise analysis, a clear sub-population of pico-eukaryotes was detected as part of the overall eukaryotic distribution (Figure 13). Cells belonging to this sub-population have been identified by flow cytometric sorting in marine samples from various geographic locations, as prasinophytes (D. Marie, unpublished data) and for this reason, they were cited as "prasinophyte-like" in the following text. The other eukaryotes are nano-eukaryotes. Data were analysed using the WinMDI v2.9 software (J. Trotter, http://facs.Scripps.edu/).

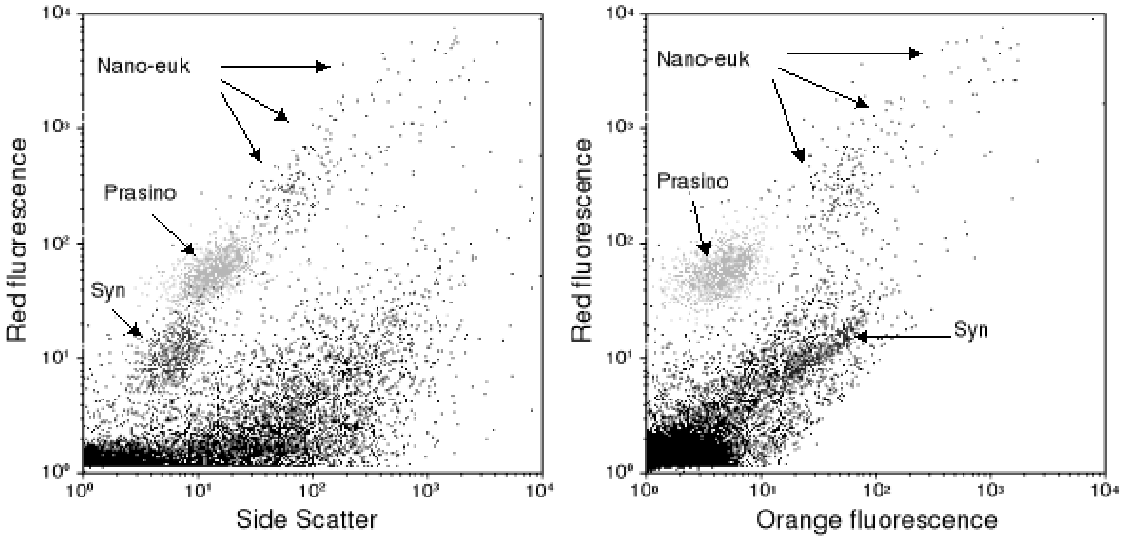


Figure 13 - Cytograms of side scatter and fluorescence of a seawater sample, showing the populations of *Synechococcus*, prasinophyte-like, and nano-eukaryotes.

HPLC of pigments

Pigments from half of each frozen 0.22 µm polysulfone filter were extracted in the dark, in 1 mL of 95% methanol as follows: the half-filter was ground for 3 min using a stainless steel spatula and sonicated on ice for 30 s. The solution was then filtered through a 0.22-µm PVDF syringe filter to remove debris. Aliquots (200 µL) were injected into the HPLC system (Waters 600 S controller, 616 pump, 600 column heater and 996 diode-array detector). Pigments were separated through a Waters Symmetry-C8 reverse-phase column maintained at 30°C (150×4.6 mm, 3.5 µm particle size, 100 Å pore size). The mobile phase was a gradient

mixture of 4 solvents: methanol (100%), acetonitrile (100%), acetic acid (100%) and aqueous pyridine solution (0.25M). Whereas Zapata et al. (2000) used two eluents each constituted of two solvents, in the present study the four single solvents were directly used for gradient elution. This allowed an improved analysis repeatability.

The peaks were identified based on their retention time and absorption spectra compared with those of published pigments spectra (Jeffrey et al. 1997) and with those of pigments extracts prepared from clonal cultures with known pigment composition, obtained from the Roscoff Culture Collection (Vaulot et al. 2004): the dinoflagellate *Amphidinium carterae* (RCC 88), the chlorophyte *Dunaliella tertiolecta* (RCC 6), the prymnesiophytes *Emiliania huxleyi* (RCC 174), *Pavlova lutheri* (RCC 180) and *Phaeocystis globosa* (RCC 187), the chrysophyte *Pelagococcus subviridis* (RCC 98), the diatom *Skeletonema costatum* (RCC 70) and the cyanophyte *Synechococcus sp.* (RCC 752).

The pigment profile of a sample was defined as the set of sample pigment ratios (sample-pigment X_{area} / sample-chl a_{area}) at 440 nm. Chl *a* concentration was also calculated in every sample, using a chl *a* standard solution (SIGMA, Chlorophyll *a* from spinach for HPLC Ref 10865).

The pigments detected and the associated abbreviated names are listed in table 5.

Table 5 - List of pigments detected – abbreviated names

Chlorophylls	
Chlorophyll *a*, *b*, c_1, c_2, c_3	Chl *a*, *b*, c_1, c_2, c_3
Chlorophyllide *a*	Chlide *a*
Mg 2,4-divinyl pheoporphyrin a_5 monomethyl ester	MgDVP
monovinyl chlorophyll c_3	MV chl c_3
Carotenoids	
19'-Butanoyloxyfucoxanthin	But-fuco
Diadinoxanthin	Diadino
Fucoxanthin	Fuco
19'-Hexanoyloxyfucoxanthin	Hex-fuco
Neoxanthin	Neo
Peridinin	Perid
Prasinoxanthin	Pras
Violaxanthin	Viola
Zeaxanthin	Zea

Species determination

In order to provide an insight into the phytoplankton community before exposure to the fungicide, 100 mL of the surrounding seawater used to fill microcosms on the first day of experiment were fixed using acid Lugol's iodine solution (2%, final concentration) and kept in the dark.

Determination and quantification of micro- and nano-phytoplankton cells were carried out at the species level as follows: a sub-sample of 50 mL was settled into an Utermöhl settling chamber (Hasle 1978) and counted using a Wild M40 phase contrast inverted microscope. Counts were carried out on partial or whole bottom surface of the chamber, depending on the size and the abundance of the species (Lund et al. 1958), at × 200 to × 400 magnification. When possible, 400 cells were counted to ensure that the error in estimation of cellular abundance remained within the limits of ± 10% (Uehlinger 1964).

Statistical analysis

The pigment and flow cytometry data were first tested for homogeneity of variances (Bartlett's test) and normal distributions (Kolmogorov-Smirnov test). As several variables did not fulfill both conditions, a parametric analysis could not be used. Therefore, following the statistical procedures given in Sokal and Rohlf (1995), a Kruskal-Wallis rank test was used to check for significant differences in multiple treatment sets, and when the answer was positive a Mann-Whitney test was run for pairwise comparisons. Statistical tests were performed using the Statgraphics® Plus v5.1 software.

In order to test for significant differences between the genetic fingerprints obtained from different treatments, analyses of similarity (Clarke, 1993) were performed on binary matrixes from gel image analysis using the one-way ANOSIM function in the Past v1.77 software (Hammer *et al.*, 2001).

Results

Fungicide analysis

The surrounding water used to prepare the microcosms on the first day of experiment did not contain detectable epoxiconazole concentration (data not shown), neither did the control on the last day of experiment. As medium renewal was 10% every other day, the remaining fungicide concentration after twelve days should be approximately 56% of the nominal amount added.

On the last day of experiment, epoxiconazole value in 100 $\mu g\ L^{-1}$ treated microcosms was 44 $\mu g\ L^{-1}$, close to the expected value (44% instead of 56%). For the 10 $\mu g\ L^{-1}$ treatment, this value was much lower than expected (24%) at 2.4 $\mu g\ L^{-1}$, and higher (84%) at 0.84 $\mu g\ L^{-1}$ for the 1 $\mu g\ L^{-1}$ treatment.

Opus impacts on eukaryote and photosynthetic communities

TTGE of the eukaryote community

Image analysis of the TTGE gel from control and 1 µg L^{-1} Opus treated microcosms (Figure 14) allowed the detection of 34 different bands on the whole gel. 15 to 20 bands were detected for the control microcosms and 16 to 24 for 1 µg L^{-1} Opus treated microcosms.

The cluster analysis (Figure 14) did not point out any grouping of the patterns in relation with the treatment, and the ANOSIM results did not indicate significant difference between control and treated microcosms.

These data illustrate that 1 µg L^{-1} of Opus does not induce detectable effects on the eukaryotic communities in microcosms.

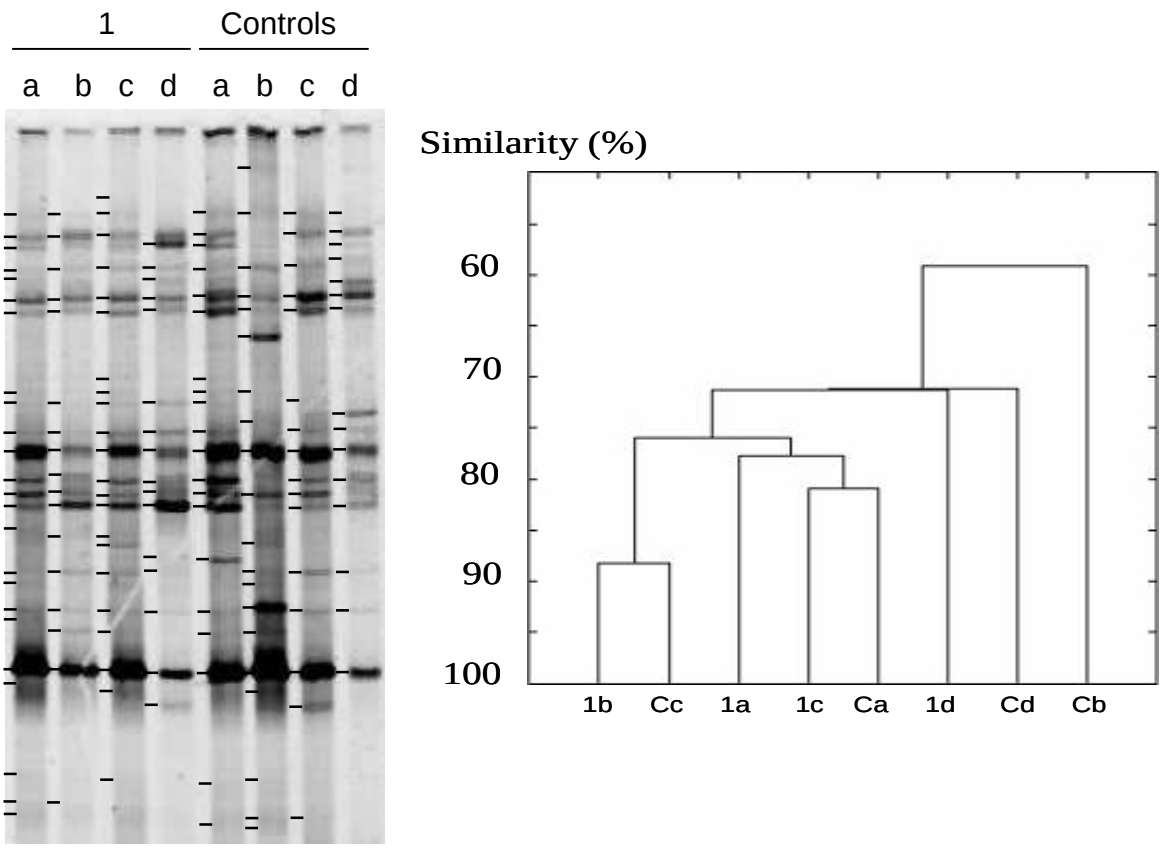


Figure 14 - TTGE gel profiles from 18S rDNA PCR products and UGPMA cluster analysis of Dice similarity matrix calculated from the banding patterns. C = Control; 1 = Opus 1 µg L^{-1}; a,b,c,d = replicates (on the left of each lane, dashes indicate the bands detected)

Image analysis of the TTGE gel from control, 10 µg L^{-1} and 100 µg L^{-1} Opus treated microcosms (Figure 15) allowed the detection of 45 different bands on the whole gel. 18 to 25 bands were detected for the control microcosms, 14 to 19 for microcosms treated with 10 µg L^{-1} of Opus and 8 to 15 for microcosms treated with 100 µg L^{-1} of Opus. The band counts were significantly different between the latter and the control microcosms (Mann-

Whitney, p = 0.03). No difference in these counts was demonstrated for the Opus 10 µg L^{-1} treatment as compared with controls (p = 0.11).

The cluster analysis (Figure 15) showed 3 groups of fingerprints: the first group includes three control replicates, the second group includes the four Opus 10 µg L^{-1} replicates and the third group includes the four Opus 100 µg L^{-1} replicates and one control replicate. The ANOSIM p-values point out significant differences between the control and both Opus treatments (p = 0.028 and p = 0.029 for Opus 10 and 100 µg L^{-1} treatments, respectively). The R values of the treatments versus control (R = 0.58 and R = 0.67 for Opus 10 and 100 µg L^{-1}, respectively) illustrate that similarities within each condition are higher than similarities between conditions (Clarke 1993).

These data illustrate that microcosms exposed to 10 and 100 µg L^{-1} of Opus exhibit a modification of the community fingerprints.

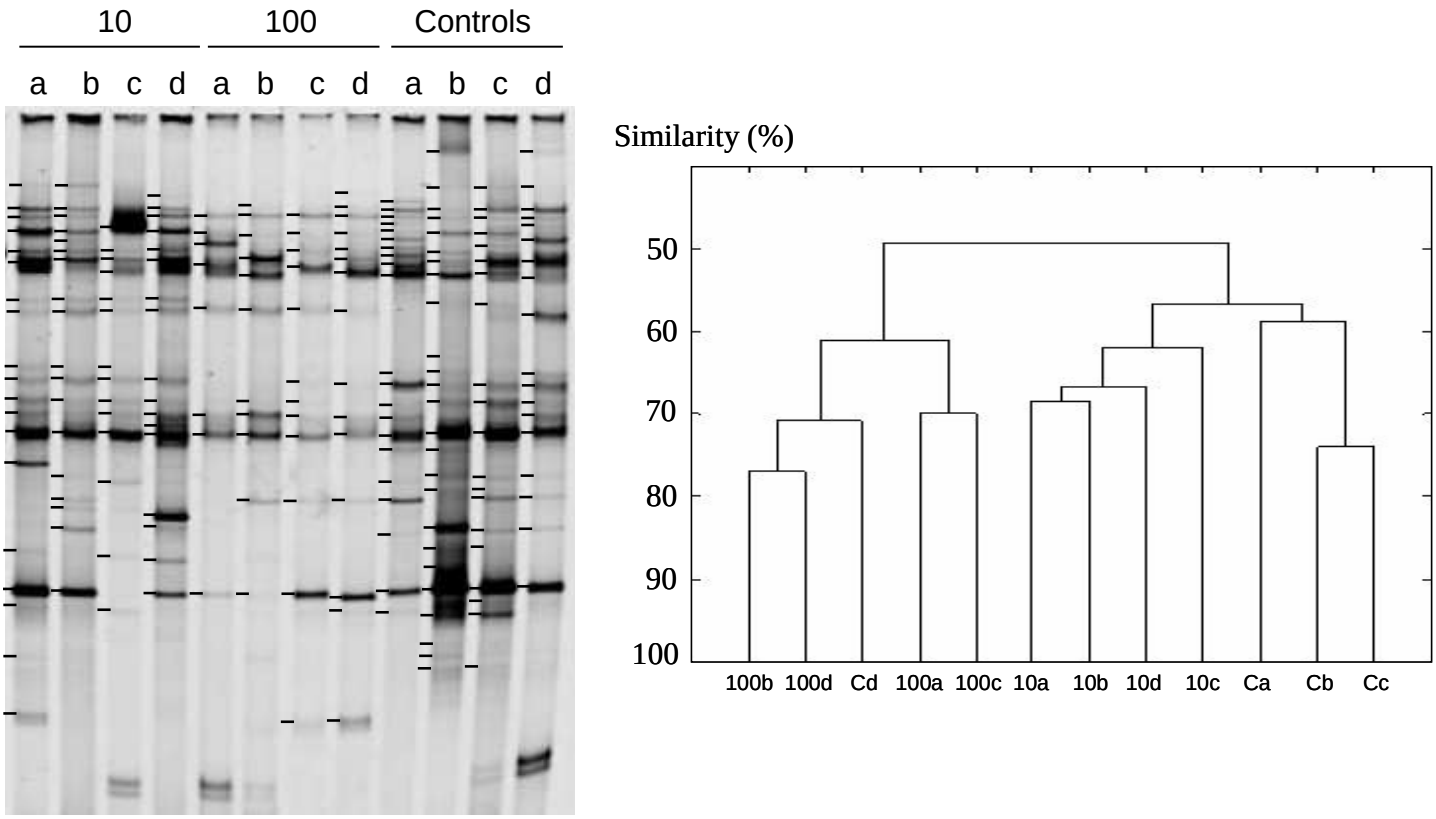


Figure 15 - TTGE gel profiles from 18S rDNA PCR products and UGPMA cluster analysis of Dice similarity matrix calculated from the banding patterns. C = Control; 10 = Opus 10 µg L^{-1}; 100 = Opus 100 µg L^{-1};
a,b,c,d = replicates (on the left of each lane, dashes indicate the bands detected)

Flow cytometry

Three populations were discriminated using flow cytometry: the pico-eukaryotes mostly composed by species belonging to the class Prasinophyceae, the nano-eukaryotes and the prokaryote *Synechococcus*. The cumulative counts in control microcosms, were not significantly different from the ones in treated microcosms.

Counts of the nano-eukaryotes for 1 µg L^{-1}, 10 µg L^{-1} and 100 µg L^{-1} Opus treatments were not significantly different from control (Figure 13).

The prasinophyte-like counts of microcosms exposed to 100 µg L^{-1} of Opus dropped dramatically to less than 2% of the control values ($p = 0.012$), whereas no significant effect could be shown on this population exposed to 1 and 10 µg L^{-1}. The *Synechococcus* counts were not significantly higher in Opus 1 µg L^{-1} and 10 µg L^{-1} treatments. However, when exposed to 100 µg L^{-1}, the *Synechococcus* counts were significantly ($p = 0.02$) enhanced, to approximately 260 % of the control values.

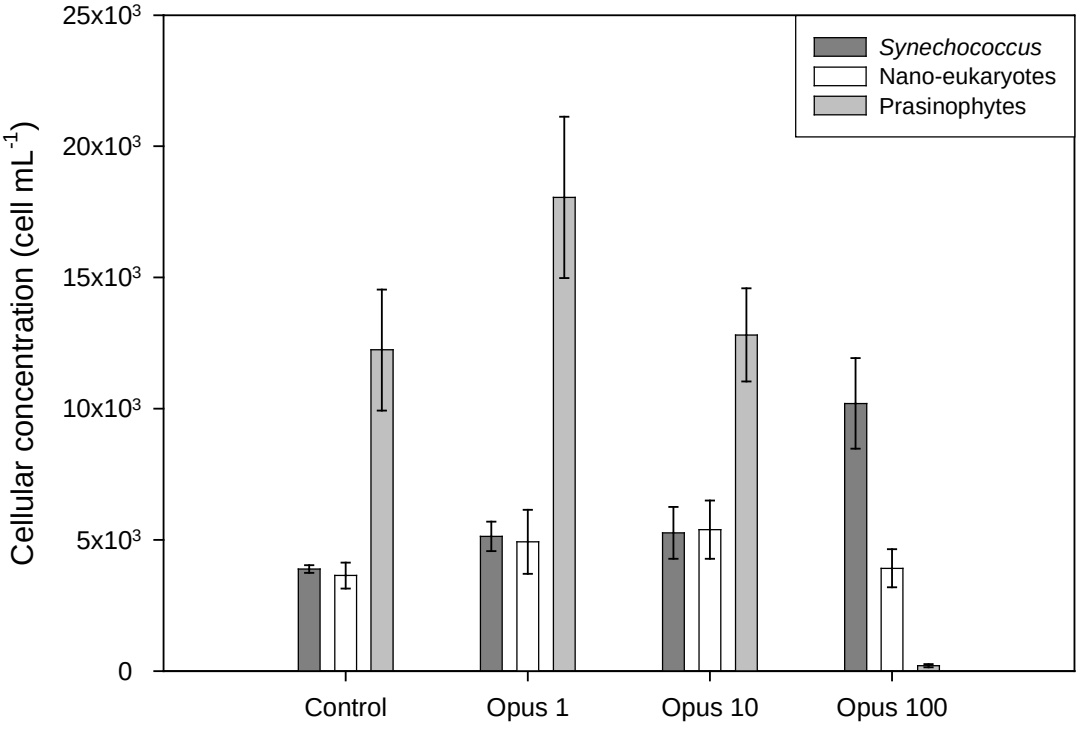


Figure 16 - Cellular concentrations (cell mL^{-1}) of the photosynthetic populations in microcosms on the last day of experiment, discriminated using flow cytometry (mean ± standard error, SE)

Hplc

HPLC analysis of phytoplankton pigments allowed to detect 17 different pigments (Table 5): 8 chlorophylls: chl *a*, *b*, c_1, c_2, c_3, chlide *a*, MgDVP, MV chl c_3; and 9 carotenoids: but-fuco, diadino, fuco, hex-fuco, neo, perid, pras, viola and zea.

Among these 17 pigments, chl *a* was quantified using a standard, when the others were analysed using their area ratios relative to chl *a*.

Pigment ratios

The Principal Component Analysis (PCA) of pigment ratios shows that about 74% of the total variance is explained by the first two axes (Figure 17).

The projection of observations on the two axes exhibits two clearly separated groups: the first group of observations includes Control, Opus 1 µg L^{-1} and Opus 10 µg L^{-1}, and can be projected on the positive side of the first axis. The second group, Opus 100 µg L^{-1} replicates, can be projected on the negative part of the first axis with values lower than -3.

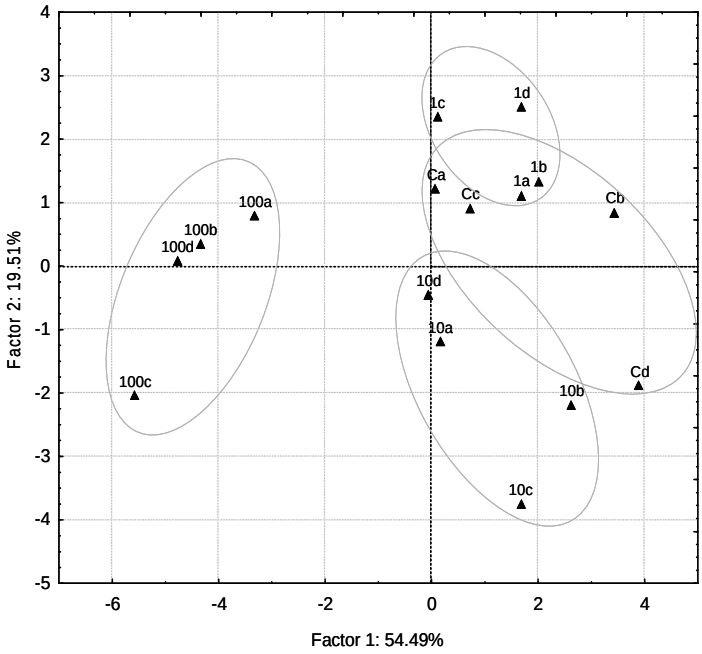


Figure 17 - PCA analysis of pigment ratios in microcosms: projection of the observations (microcosms).

For each pigment, pairwise comparisons of pigment ratios were carried out between control and Opus treatments. The comparisons of pigment ratios between controls and microcosms exposed to 1 µg L^{-1} and 10 µg L^{-1} of Opus did not point out any significant difference (Mann-Whitney, $p>0.05$, data not shown). However, the comparison of pigment ratios between the control and the microcosms exposed to 100 µg L^{-1} of Opus (Figure 18) showed important differences: six of the 16 pigments observed in controls were not detected when phytoplankton was maintained with 100 µg L^{-1} of Opus: pras, neo, viola, perid, chl *b* and chlide *a*.

Among the 10 other pigments, 7 were shown to have significantly different ratios (Mann-Whitney, $p<0.05$) in microcosms exposed to 100 µg L^{-1} of Opus:

– hex fuco, chl c_3 and MV chl c_3 ratios were enhanced 2.5 times, 2 times and 10 times, respectively,

– fuco, but-fuco and MgDVP were half the control value,

– chl c_1 ratio was 5-fold lower compared to the control.

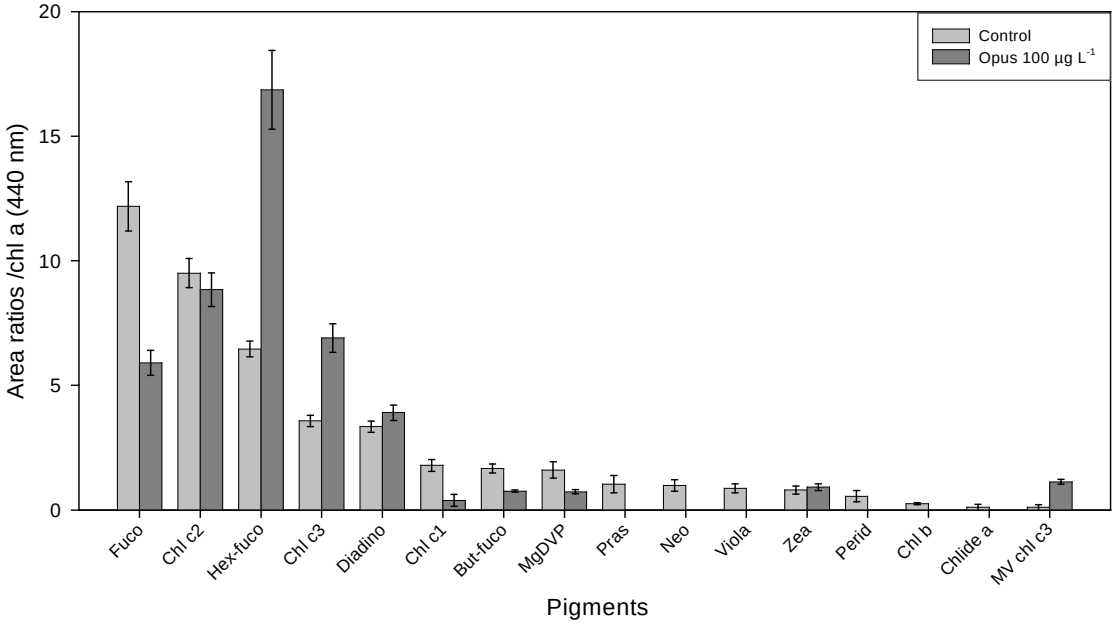


Figure 18 - Pigment ratios in controls and in 100 µg L^{-1} Opus treatments (mean ± standard error, SE).

Chlorophyll a quantification

When microcosms were exposed to 1 µg L^{-1} and 10 µg L^{-1} of Opus, no significant difference in chl *a* concentration could be demonstrated, as compared with control ($p = 0.06$ and $p = 0.07$, respectively) (Figure 19). Nonetheless, the chl *a* concentration in microcosms treated with 100 µg L^{-1} of Opus was significantly increased to 177% of the control value ($p = 0.037$).

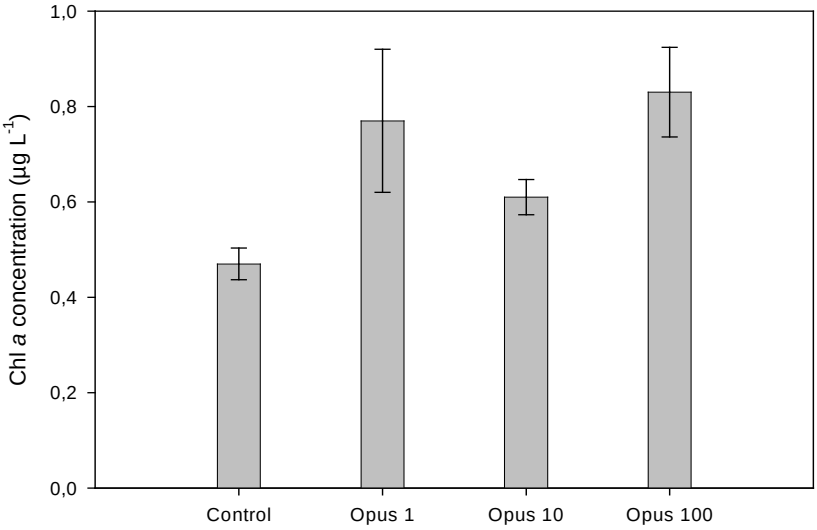


Figure 19 - Chl *a* concentrations (µg L^{-1}) in microcosms on the last day of experiment (mean ± standard error).

Species determination

The microscopic species determination allowed to identify 28 species in the surrounding water on day 0. Among them, *Chaetoceros sp*., nano-flagellates and cryptophytes accounted respectively for 59.2%, 36% and 4.4% of the total cell counts (data not shown).

Discussion

The microcosm system used here, with partial medium renewal and an air overlay, was previously validated as representative of the natural surrounding water, for *Synechococcus* and picoeukaryote counts (de la Broise and Palenik 2007; Stachowski-Haberkorn et al. 2008).

Fungicide exposure

Epoxiconazole analyses in 100 µg L^{-1} treated microcosms on the last day of experiment showed a concentration in the range of the one expected. For the lower Opus concentrations, analyses exhibited lower or higher concentrations than expected, for 10 µg L^{-1} and 1 µg L^{-1} respectively. This could be due to the possible adsorption/desorption during the dilution process, on bottle walls and/or on the organic matter present in seawater, and to accuracy of analysis at such low values.

No data on epoxiconazole concentration in marine waters was available. However, as pesticide concentrations encountered in estuarine areas are usually below 1 µg L^{-1} (Lehotay et al. 1999; Oros et al. 2003; Steen et al. 2001), we can consider the lowest concentration tested to be likely representative of peak pollution in coastal areas. The 10 µg L^{-1} value would perhaps be encountered in freshwater or estuarine areas in case of exceptional and extreme pollution. The higher concentration tested is obviously non realistic for a marine environment. It was however included in this experiment to insure detectable adverse effects using the methods assessed here.

TTGE

The TTGE was based on 18S rDNA amplification from the whole eukaryotic community present in microcosms. These eukaryotic organisms include photosynthetic phytoplankton, but also heterotrophic unicellular eukaryotes and pluricellular grazers.

The observation of TTGE gels reveals two kinds of variability:

– on the first gel (Figure 14), controls displayed 15 to 20 distinct bands, whereas there are 18 to 25 bands for controls on the second gel (Figure 15). These 2 gels were simultaneously run on the two sides of the Dcode system, showing that even with an improved control system for temperature kinetic, migrations were not rigorously identical. So it is recommended to load control samples on each gel and to avoid gel to gel comparisons. The whole sample set could not be run simultaneously on the same gel. Therefore the same controls were run on both gels, allowing data treatment using samples/control comparisons.

In spite of this drawback, several studies reported the high sensitivity and reliability of this method that yields a picture of the genetic diversity of the community as a whole (Gillan 2004; Muyzer and Smalla 1998), both in prokaryote (Kostanjšek et al. 2005; Pesce et al. 2006; 2008) and eukaryote (Doaré-Lebrun et al. 2006; Nieguitsila et al. 2007) community studies. Furthermore, only species at low relative abundance (<1%) are usually undetected on such fingerprints (Muyzer et al. 1993).

– when replicates were submitted simultaneously to similar experimental conditions, they exhibited differences in band intensities and/or locations. We can hypothesize a non-deterministic community structuring process as the cause of such difference, as already reported in Drake et al. (1996). Variability between replicates was also reported in studies including phytoplankton communities (Caquet et al. 2001; Rosenzweig and Buikema 1994), and in an ecotoxicological study with aquatic microbial communities in microcosms analysed using DGGE (Brandt et al. 2004).

For data analysis of such diverging microcosms, it is recommended to use multivariate techniques on multiple replicate experiments (Kedwards et al. 1999; van Wijngaareden et al. 1995). These allow to reveal toxicant effects even with a small number of replicates (Kedwards et al. 1999). In that aim, we applied on a four replicate data set, the Dice/UPGMA cluster analysis on the presence/absence binary matrix, supported by the ANOSIM test. In this study, R values obtained from Opus 10 and 100 µg L^{-1} treatments (0.58 and 0.67 respectively) illustrate that similarity within treatment replicates is higher than similarity between treatments and controls (Clarke 1993). Besides, the ANOSIM p-values <0.05 indicate the significance of the cluster analysis results, in other words communities exposed to 10 and 100 µg L^{-1} of Opus display significantly different fingerprints compared to the control ones.

When microcosms were exposed to 100 µg L^{-1} of Opus, significantly fewer bands were detected in the TTGE fingerprints. Even though a band can consist of more than one sequence (Eichner et al. 1999; Muyzer et al. 1993; Muyzer and Smalla 1998), and can thus correspond to more than one species, a significant drop in the number of bands at 100 µg L^{-1} can anyway be interpreted as a loss of diversity in relation with fungicide exposure. Besides, this kind of response is considered as a direct toxic effect (Brandt et al. 2004) of the fungicide on the community.

The use of 18S rDNA sequences appears as relevant to detect shifts in communities exposed to a fungicide.

Flow cytometry

Autofluorescence of phytoplankton cells allows their analysis using flow cytometry, directly after sampling or later, after adequate fixing and conservation of samples (Vaulot et al. 1989). This method, as applied in the present study, allows to show only photosynthetic phytoplankton populations, including eukaryote and prokaryote organisms. Flow cytometry analyses allow a rapid count of cells (a few minutes) and are run on approximately 250-300 µL of sample. Thanks to these two main assets, a large number of replicates can be

considered, along with the statistical validation of results; and the small sample volumes needed allow simplified protocol design.

However, as the flow cytometer used in this study only allows the analysis of cells with diameter below 80 µm, small cells (<20 µm) at high concentrations can be discriminated, which usually correspond to picophytoplankton (0.2-2 µm) and nanophytoplankton (2-20 µm). The larger planktonic cells (20-200 µm) are not detected using flow cytometry (Collier and Campbell 1999). Thus, flow cytometry provides only a partial view of the community.

Even though flow cytometry allows rapid acquisition of data about photosynthetic populations, until now its application to ecotoxicological studies on phytoplankton communities is still limited. A few studies involving flow cytometry reported the toxicity of Irgarol 1051® on phytoplankton communities (Devilla et al. 2005; Readman et al. 2004; Zamora-Ley et al. 2006).

In the present study, this tool, applied to natural phytoplankton communities, allows to point out significant effects of the fungicide Opus at 100 µg L^{-1} on the prasinophyte-like and the *Synechococcus* populations, with opposite effects. When prasinophyte-like counts dropped dramatically, *Synechococcus* were enhanced, whereas no change was observed in the larger eukaryote counts. The *Synechococcus* may either be stimulated by the fungicide, or take advantage of the ecological niche left by the prasinophyte-like population.

HPLC

Nowadays, HPLC is a commonly used method for separation, identification and quantification of photosynthetic pigments from phytoplankton communities (Furuya et al. 2003; Seoane et al. 2006; Wänstrand and Snoeijs 2006). This method focuses on photosynthetic pigments of the phytoplankton community, as does flow cytometry. But whereas flow cytometry allows to analyse only small cells at relatively high concentrations, HPLC results are obtained from pigments of the whole photosynthetic community, including eukaryotes and prokaryotes. The HPLC analysis of pigments is a method of choice, due to its high sensitivity for detection and quantification of pigments (Jeffrey et al. 1999; Kwan Wong and Kim Wong, 2003; Zapata et al. 2000). However, its application to ecotoxicological studies is still scarce: to our knowledge only three studies involving HPLC were reported in works on herbicide effects on phytoplankton communities (Devilla et al. 2005; Dorigo et al. 2004; Readman et al. 2004).

In this ecotoxicological study, as the aim was to compare control and treated samples, we chose to work on relative data sets. Pigments were extracted and identified from strain cultures. And only chl *a* of the samples was quantified from standard injection. The peak area values from other pigments were divided by the chl *a* peak area value, for each sample. This allows ratio comparisons between samples, in order to assess their variation in relation to chl *a*.

Applying this data treatment, we showed changes in several pigment ratios of communities, when exposed to 100 µg L^{-1} of Opus. As a change in the ratio value could hide a chl *a* variation, a distinct statistical treatment was applied on chl *a* concentrations, in order to

highlight and quantify the significant variations of this pigment, and to avoid misleading conclusions. As chl *a* concentration almost doubled in 100 µg L^{-1} treated microcosms, we considered, when pigment ratio were two-fold lower than controls (fuco, but-fuco and MgDVP), that the corresponding pigment concentration was not different from control. Then, compared to the controls, communities exposed to 100 µg L^{-1} of Opus still exhibited two kinds of changes:

- six pigments observed in control were not detected anymore in treated microcosms. Two of them, chl *b* and chlide *a* were already very close to the detection threshold in controls. The four other pigments were: prasinoxanthin, a prasinophyte marker (Jeffrey et al. 1997); neoxanthin, a marker of chlorophytes, prasinophytes and euglenophytes (Jeffrey et al. 1997); violaxanthin, a marker of chlorophytes, prasinophytes and eustigmatophytes (Jeffrey et al. 1997); and peridinin, a dinoflagellate marker (Jeffrey et al. 1997). Among these pigments, the prasinoxanthin, neoxanthin and violaxanthin reductions tend to confirm the drop in prasinophyte counts observed using flow cytometry.
- four other pigments exhibited significant variations in their ratios as compared with controls: chl c_1 dropped and the 3 others were enhanced (hex fuco, chl c_3 and MV chl c_3).

When chl c_1 dropped 5-fold, this may suggest an impact of the fungicide on diatoms, prymnesiophytes or raphidophytes (Jeffrey et al. 1997). Pigments for which ratios where enhanced in the presence of 100 µg L^{-1} of Opus, reveal an increase of their concentrations: hexfuco which is a marker of prymnesiophytes and some dinoflagellates, like chl c_3 which is also found in some diatoms (Jeffrey et al. 1997).

Chl *a* concentration almost doubled: as chl *a* is ubiquitous in phytoplankton taxa, except in prochlorophytes (Jeffrey et al. 1997), its increase could be attributed, either to an enhancement of its intracellular concentration and/or to the enhanced cellular density of some taxa.

These information, arising from chemotaxonomy, provide an approximation, only at the class level, of the taxa possibly impacted by the fungicide and do not allow to determine more precisely the organisms impacted. Furthermore, as some pigments are found across several classes (Jeffrey et al. 1999), and as these taxa do not inevitably occur in the environment during the experiment, hypotheses should be considered cautiously.

Using for each pigment, ratio related to chl a, we demonstrated significant fungicide effects on the phytoplankton community exposed to 100 µg L^{-1} of Opus. These results clearly indicate a perturbation of the community, and the "loss" of several pigments suggests a lower diversity, probably in favor of taxa more tolerant to the fungicide.

Comparison of TTGE, flow cytometry and HPLC

Among the three overlapping methods applied here on community analysis, the genetic fingerprints revealed significant differences between controls and microcosms for Opus concentration as low as 10 µg L^{-1}, whereas flow cytometry and HPLC only revealed significant differences when microcosms were exposed to 100 µg L^{-1} of Opus.

The comparison of the 18S rDNA fragment fingerprints appears thus as a more sensitive indicator of community disturbance, when compared to flow cytometry and pigment analysis. As a matter of fact, 18S rDNA amplified fragments, visualized using fingerprinting techniques, can be related to species (Kostanjšek et al. 2005) whereas cytometry analysis and pigment contents data can only be related to the class level or higher. This could explain that, when microcosms are exposed to 10 µg L^{-1} of Opus, an effect on several species can be detected using TTGE, whereas no effect can be seen on the community using flow cytometry or HPLC. However, phytoplankton are not the only target of 18S rDNA analysis, as heterotrophic eukaryotes and/or grazers can also be present in microcosms, and thus appear in the genetic fingerprints.

Two main hypotheses could explain community modification when exposed to 10 µg L^{-1} of Opus:

- the selection pressure exerted by the fungicide could reduce the population of some photosynthetic taxa, what can benefit to the more tolerant ones (Bérard et al. 1999a; 1999b; Bérard and Benninghoff 2001)
- as 18S rDNA fingerprints possibly include some grazers, the fungicide could also act on some grazer taxa, and thus disturb the complex microbial ecosystem interactions.

Brandt et al. (2004) compared, on microbial prokaryotic communities exposed to linear alkylbenzene sulfonates, the sensitivity of DGGE with other structural and functional analytical methods. The structural methods were community-level physiological profiling, using Biolog Eco-Plate™ and Pollution-induced community tolerance, and the functional ones were the dynamics of inorganic nutrients N and P and the incorporation of [^{3}H]leucine. They also found the fingerprinting technique to be the most sensitive-one, and recommended the use of such techniques for community-level toxicity assessment.

Conclusion

The aim of this study was the comparison of the relative sensitivity of three overlapping methods for fungicide impact assessment on phytoplankton community. The detection methods tested here were focussed on the detection of modification in the community composition, as such changes are believed to be more sensitive to toxic stress than functional ones (Petersen and Gustavson 2000).

This work highlighted the sensitivity of photosynthetic organisms to the fungicide epoxiconazole when exposed to 100 µg L^{-1}, whether this effect is direct or indirect.

When the first step in ecotoxicological studies is usually the characterization of an impact threshold, no method can provide a full overview of structural changes induced after exposure to xenobiotics. Among the three methods tested here for community analysis, TTGE appeared the most sensitive for impact detection: only TTGE allowed to show community modifications when exposed to Opus concentration as low as 10 µg L^{-1}. TTGE focussed on the whole eukaryotic community, including non-photosynthetic organisms when flow cytometry and HPLC of photosynthetic pigments focussed only on phytoplankton.

In the search for improved tools for the evaluation of impact threshold, the present work underlines the fact that the definition of a threshold value depends not only on the significant effect of the toxicant, but also on the sensitivity of the analytical method applied.

Acknowledgements

We wish to thank the "Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable", and the "Région Bretagne", who financially supported this research. We also thank the "Capitainerie de Beg-Meil", city of Fouesnant and Patrick Le Coz for their technical assistance, Louis Coroller, Gaël Durand, Gwendolina Limon, James Devillers and Geneviève Arzul.

References

Abdel-Hamid, M.I., Källqvist, T., Hessen, D.O., Berge, D., 1996. The use of enclosure experiments to study the effects of pesticides on lake plankton. Lakes Reserv. Res. Manage. 2, 199-209.

Akcha, F., Arzul, G., Rousseau, S., Bardouil, M., 2008. Comet assay in phytoplankton as biomarker of genotoxic effects of environmental pollution. Mar. Environ. Res. Doi:10.1016/j.marenvres.2008.02.022.

Barry, M.J., Logan, D.C., 1998. The use of temporary pond microcosms for aquatic toxicity testing: direct and indirect effects of endosulfan on community structure. Aquat. Tox. 41, 101-124.

Bengtson Nash SM, Quayle PA, Schreiber U, Muller JF (2005). The selection of a model microalgal species as biomaterial for a novel aquatic phytotoxicity assay. Aquat Toxicol 72: 315–326.

Bérard, A., Leboulanger, C., Pelte, T., 1999a. Tolerance of *Oscillatoria limnetica* Lemmermann to Atrazine in Natural Phytoplankton Populations and in Pure Culture: Influence of Season and Temperature. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 37, 472-479.

Bérard, A., Pelte, T., Druart, J.C., 1999b. Seasonal variations in the sensitivity of Lake Geneva phytoplankton community structure to atrazine. Arch. Hydrobiol. 145, 277-295.

Bérard, A., Benninghoff, C., 2001. Pollution-induced community tolerance (PICT) and seasonal variations in the sensitivity of phytoplancton to atrazine in nanocosms. Chemosphere 45, 427-437.

Brandt, K.K., Jorgensen, N.O.G., Nielsen, T.H., Winding, A., 2004. Microbial community-level toxicity testing of linear alkylbenzene sulfonates in aquatic microcosms. FEMS Microbiol. Ecol. 49, 229-241.

Cairns, J.J., 1986. The myth of the most sensitive species. Bioscience 36, 670-672.

Caquet, T., Lagadic, L., Monod, G., Lacaze, J.C., Couté, A., 2001. Variability of Physicochemical and Biological Parameters between Replicated Outdoor Freshwater Lentic Mesocosms. Ecotoxicology 10, 51-66.

Clarke, K.R., 1993. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. Austral Ecol. 18, 117-143.

Collier, J.L., Campbell, L., 1999. Flow cytometry in molecular aquatic ecology. Hydrobiologia 401, 34-54.

de la Broise, D., Palenik, B., 2007. Immersed in situ microcosms: A tool for the assessment of pollution impact on phytoplankton. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 341, 274-281.

DeLorenzo, M.E., Lauth, J., Pennington, P.L., Scott, G.I., Ross, P.E., 1999. Atrazine effects on the microbial food web in tidal creek mesocosms. Aquat. Toxicol. 46, 241-251.

DeLorenzo, M.E., Leatherbury, M., Weiner, J.A., Lewitus, A.J., Fulton, M.H., 2004. Physiological factors contributing to the species-specific sensitivity of four estuarine microalgal species exposed to the herbicide atrazine. Aquatic Ecosystem Health and Management 7, 137-146.

Devilla, R.A., Brown, M.T., Donkin, M., Readman, J.W., 2005. The effects of a PSII inhibitor on phytoplankton community structure as assessed by HPLC pigment analyses, microscopy and flow cytometry. Aquat. Toxicol. 71, 25-38.

Diez, B., Pedros-Alio, C., Marsh, T.L., Massana, R., 2001. Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) To Study the Diversity of Marine Picoeukaryotic Assemblages and Comparison of DGGE with Other Molecular Techniques. Appl. Environ. Microbiol. 67, 2942-2951.

Doaré-Lebrun, E., El Arbi, A., Charlet, M., Guerin, L., Pernelle, J.J., Ogier, J.C., Bouix, M., 2006. Analysis of fungal diversity of grapes by application of temporal temperature gradient gel electrophoresis - potentialities and limits of the method. J. Appl. Microbiol. 101, 1340-1350.

Dorigo, U., Bourrain, X., Berard, A., Leboulanger, C., 2004. Seasonal changes in the sensitivity of river microalgae to atrazine and isoproturon along a contamination gradient. Sci. Total Environ. 318, 101-114.

Downing, H.F., DeLorenzo, M.E., Fulton, M.H., Scott, G., Madden, C.J., Kucklick, J.R., 2004. Effects of the agricultural pesticides Atrazine, Chlorothalonil, and Endosulfan on south Florida microbial assemblages. Ecotoxicology 13, 245-260.

Drake, J.A., Huxel, G.R., Hewitt, C.L., 1996. Microcosms as models for generating and testing community theory. Ecology 77, 670-677.

Eichner, C.A., Erb, R.W., Timmis, K.N.,Wagner-Döbler, I., 1999. Thermal Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Bioprotection from Pollutant Shocks in the Activated Sludge Microbial Community. Appl. Environ. Microbiol. 65, 102-109.

Furuya, K., Hayashi, M., Yabushita, Y., Ishikawa, A., 2003. Phytoplankton dynamics in the East China Sea in spring and summer as revealed by HPLC-derived pigment signatures. Deep Sea Research Part II 50, 367-387.

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

Gillan, D.C., 2004. The effect of an acute copper exposure on the diversity of a microbial community in North Sea sediments as revealed by DGGE analysis--the importance of the protocol. Mar. Pollut. Bull. 49, 504-513.

Gustavson, K., Mohlenberg, F., Schlüter, L., 2003. Effects of exposure duration of herbicides on natural stream periphyton communities and recovery. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 45, 48-58.

Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. Palaeontologia Electronica 4(1): 9pp. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm

Hasle, G.R., 1978. The inverted microscope method. In: Sournia, A. (Ed.), Phytoplankton manual. UNESCO, Paris, pp 88-96.

Jeffrey, S.W., Mantoura, R.F.C., Wright, S.W., 1997. Phytoplankton pigments in oceanography, UNESCO, Paris, pp 661.

Jeffrey, S.W., Wright, S.W., Zapata, M., 1999. Recent advances in HPLC pigment analysis of phytoplankton. Mar. Freshwater Res. 50, 879-896.

Kedwards, T.J., Maund, S.J., Chapman, P.F., 1999. Community level analysis of ecotoxicological field studies. II. Replicated-design studies. Environ. Toxicol. Chem. 18, 158-166.

Kostanjšek, R., Lapanje, A., Drobne, D., Nikcevic, S., Perovic, A., Zidar, P., Štrus, J., Hollert, H., Karaman, G., 2005. Bacterial Community Structure Analyses to Assess Pollution of Water and Sediments in the Lake Shkodra/Skadar, Balkan Peninsula. Environ. Sci. & Pollut. Res. 12, 361-368.

Kwan Wong, C., Kim Wong, C., 2003. HPLC pigment analysis of marine phytoplankton during a red tide occurrence in Tolo Harbour, Hong Kong. Chemosphere 52, 1633-1640.

Lage, O.M., Sansonetty, F., O'Connor, J.E., Parente, A.M., 2001. Flow cytometric analysis of chronic and acute toxicity of copper(II) on the marine dinoflagellate *Amphidinium carterae*. Cytometry 44, 226-235.

Leboulanger, C., Rimet, F., Hème de Lacotte, M., Bérard, A., 2001. Effects of atrazine and nicosulfuron on freshwater microalgae. Environ. Int. 26, 131-135.

Lehotay, S.J., Harman-Fetcho, J.A., McConnell, L.L., 1998. Agricultural pesticide residues in oysters and water from two Chesapeake bay tributaries. Mar. Pollut. Bull. 37, 32-44.

Lund, J.W.G., Kipling, C., Le Cren, E.D., 1958. The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. Hydrobiologia 11, 143-170.

Marie, D., Brussaard, C., Partensky, F., Vaulot, D., 1999. Flow cytometric analysis of phytoplankton, bacteria and viruses. In: Current Protocols in Cytometry. John Wiley & Sons, Inc. 11.11.1-11.11.15.

Marie, D., Zhu, F., Balagué, V., Ras, J., Vaulot, D., 2006. Eukaryotic picoplankton communities of the Mediterranean Sea in summer assessed by molecular approaches (DGGE, TTGE, QPCR). FEMS Microbiol. Ecol. 55, 403-415.

Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 59, 695-700.

Muyzer, G., Smalla, K., 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Antonie van Leeuwenhoek 73, 127-141.

Nieguitsila, A., Deville, M., Jamal, T., Halos, L., Berthelemy, M., Chermette, R., Latouche, S., Arné, P., Guillot, J., 2007. Evaluation of fungal aerosols using Temporal Temperature Gradient Electrophoresis (TTGE) and comparison with culture. J. Microbiol. Methods 70, 86-95.

Oros, D.R., Jarman, W.M., Lowe, T., David, N., Lowe, S., Davis, J.A., 2003. Surveillance for previously unmonitored organic contaminants in the San Francisco estuary. Mar. Pollut. Bull. 46, 1102-1110.

Pesce, S., Fajon, C., Bardot, C., Bonnemoy, F., Portelli, C., Bohatier, J., 2006. Effects of the phenylurea herbicide diuron on natural riverine microbial communities in an experimental study. Aquat. Toxicol. 78, 303-314.

Pesce, S., Fajon, C., Bardot, C., Bonnemoy, F., Portelli, C., Bohatier, J., 2008. Longitudinal changes in microbial planktonic communities of a French river in relation to pesticide and nutrient inputs. Aquat. Toxicol. 86, 352-360.

Petersen, S., Gustavson, K., 2000. Direct Toxic Effects of TBT on Natural Enclosed Phytoplankton at Ambient TBT Concentrations of Coastal Waters. Ecotoxicology 9, 273-285.

Petersen, D.G., Dahllof, I., Nielsen, L.P., 2004. Effects of zinc pyrithione and copper pyrithione on microbial community function and structure in sediments. Environ. Toxicol. Chem. 23, 921-928.

Readman, J.W., Devilla, R.A., Tarran, G., Llewellyn, C.A., Fileman, T.W., Easton, A., Burkill, P.H., Mantoura, R.F.C., 2004. Flow cytometry and pigment analyses as tools to investigate the toxicity of herbicides to natural phytoplankton communities. Mar. Environ. Res. 58, 353-358.

Rioboo, C., Gonzalez, O., Herrero, C., Cid, A., 2002. Physiological response of freshwater microalga (*Chlorella vulgaris*) to triazine and phenylurea herbicides. Aquat. Toxicol. 59, 225-235.

Rosenzweig, M.S., Buikema, A.L.Jr, 1994. Phytoplankton colonization and seasonal succession in new experimental ponds. Environ. Toxicol. Chem. 13, 599-605.

Rutten, T.P.A., Sandee, B., Hofman, A.R.T., 2005. Phytoplankton monitoring by high performance flow cytometry: A successful approach? Cytom. Part A 64A, 16-26.

Santin-Montanya, I., Sandin-Espana, P., Garcia Baudin, J.M., Coll-Morales, J., 2007. Optimal growth of *Dunaliella primolecta* in axenic conditions to assay herbicides. Chemosphere 66, 1315-1322.

Schäfer, H., Bernard, L., Courties, C., Lebaron, P., Servais, P., Pukall, R., Stackebrandt, E., Trousselier, M., Guindulain, T., Vives-Rego, J., Muyzer, G., 2001. Microbial community dynamics in Mediterranean nutrient-enriched seawater mesocosms: changes in the genetic diversity of bacterial populations. FEMS Microbiol. Ecol. 34, 243-253.

Seguin, F., Leboulanger, C., Rimet, F., Druart, J.C., Bérard, A., 2001. Effects of atrazine and nicosulfuron on phytoplankton in systems of increasing complexity. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 40, 198-208.

Seoane, S., Laza, A., Orive, E., 2006. Monitoring phytoplankton assemblages in estuarine waters: The application of pigment analysis and microscopy to size-fractionated samples. Estuar. Coast. Shelf Sci. 67, 343-354.

Sherrard, N.J., Nimmo, M., Llewellyn, C.A., 2006. Combining HPLC pigment markers and ecological similarity indices to assess phytoplankton community structure: An environmental tool for eutrophication? Sci. Total Environ. 361, 97-110.

Sokal R.R., Rohlf, F.J., 1995. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. 3rd edition. W. H. Freeman and Co., New York.

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 microcosm experiment. Aquat Toxicol 89, 232-241

Stauber, J., Adams, M., 2005. Microalgal toxicity tests using flow cytometry. Small-Scale Freshwater Toxicity Investigations 1, 203-241.

Steen, R.J.C.A., van der Vart, J., Hiep, M., Van Hattum, B., Cofino, W.P., Brinkman, U.A.T., 2001. Gross fluxes and estuarine behaviour of pesticides in the Scheldt Estuary (1995-1997) Environ. Pollut.115, 65-79.

Suzuki, K., Hinuma, A., Saito, H., Kiyosawa, H., Liu, H., Saino, T.,Tsuda, A., 2005. Responses of phytoplankton and heterotrophic bacteria in the northwest subarctic Pacific to in situ iron fertilization as estimated by HPLC pigment analysis and flow cytometry. Prog. Oceanogr. 64, 167-187.

Uehlinger, V., 1964. Etude statistique des méthodes de dénombrement planctonique. Arch. Sci. 17, 11-223.

Van Hannen, E.J., Van Agterveld, M P., Gons, H.J., Laanbroek, H.J., 1998. Revealing genetic diversity of eukaryotic microorganisms in aquatic environments by denaturing gradient gel electrophoresis. J. Phycol. 34, 206-213.

Van Wijngaarden, R.P.A., van den Brink, P.J., Oude Voshaar, J.H., Leeuwangh, P., 1995. Ordination techniques for analysing response of biological communities to toxic stress in experimental ecosystems. Ecotoxicology 4, 61-77.

Vaulot, D., Courties, C., Partensky, F., 1989. A simple method to preserve oceanic phytoplankton for flow cytometric analyses. Cytometry 10**,** 629-635.

Vaulot, D., Le Gall F., Marie D., Guillou L., Partensky F. 2004. The Roscoff Culture Collection (RCC): a collection dedicated to marine picoplankton. Nova Hedwigia 79:49-70.

Wänstrand, I., Snoeijs, P., 2006. Phytoplankton community dynamics assessed by ships-of-opportunity sampling in the northern Baltic Sea: A comparison of HPLC pigment analysis and cell counts. Estuar. Coast. Shelf Sci. 66, 135-146.

Ward, D.M., Weller, R., Bateson, M.M., 1990. 16 S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. Nature 345, 63-65.

Weiner, J.A., DeLorenzo, M.E., Fulton, M.H., 2004. Relationship between uptake capacity and differential toxicity of the herbicide atrazine in selected microalgal species. Aquat. Toxicol. 68, 121-128.

Wong, C.S., Crawford, D.W., 2006. Evolution of phytoplankton pigments in an in-situ iron enrichment experiment in the subarctic NE Pacific. Deep Sea Research Part II 53, 2152-2167.

Yasuno, M., Asaka, A., Kono, Y., 1993. Effects of pyraclofos (an organophosphorus insecticide) on nutrient enriched ecosystems. Chemosphere 27, 1813-1824.

Yoshino, K., Nishigaki, K., Husimi, Y., 1991. Temperature sweep gel electrophoresis: a simple method to detect point mutations. Nucl. Acids Res. 19, 3153.

Yu, Y., Kong, F., Wang, M., Qian, L., Shi, X., 2007. Determination of short-term copper toxicity in a multispecies microalgal population using flow cytometry. Ecotox. Environ. Safe. 66, 49-56.

Zamora-Ley, I.M., Gardinali, P.R., Jochem, F.J., 2006. Assessing the effects of Irgarol 1051 on marine phytoplankton populations in Key Largo Harbor, Florida. Mar. Pollut. Bull. 52**,** 935-941.

Zapata, M., Rodríguez, F., Garrido, J.L., 2000. Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: a new HPLC method using a reversed phase C8 column and pyridine-containing mobile phases. Mar. Ecol. Prog. Ser. 195, 29-45.

1.2. Synthèse

Le but de l'étude décrite dans ce premier article était d'exposer des communautés microbiennes naturelles au fongicide Opus (époxiconazole) à 1, 10 et 100 µg/L, en microcosmes *in situ*.

Les microcosmes étaient uniquement constitués par les communautés microbiennes naturelles (<200 µm) procaryotes et eucaryotes, autotrophes et hétérotrophes, prélevées directement sur le site expérimental. Afin de maintenir une composition de la communauté comparable à l'environnement naturel, une partie du contenu des microcosmes était renouvelée tous les deux jours (200 mL) avec de l'eau du site expérimental filtrée à 200 µm.

L'exposition des communautés a duré 12 jours. Les analyses ont été réalisées uniquement sur le contenu des microcosmes au dernier jour de l'expérience. Trois méthodes d'analyse des communautés ont été appliquées :

- l'analyse d'image des gels de TTGE, effectuée sur les communautés eucaryotes, a permis de mettre en évidence un changement significatif des empreintes génétiques des communautés exposées à 10 et 100 µg/L d'Opus, par rapport aux communautés témoins. De plus, le nombre de bandes détectées à 100 µg/L était significativement moindre ;
- la cytométrie en flux a été appliquée aux échantillons sans marquage préalable : n'étaient donc visibles que les populations auto-fluorescentes, c'est-à-dire la communauté photosynthétique. Aucun effet de l'Opus n'a été démontré à 1 et 10 µg/L, mais deux populations étaient significativement différentes des témoins à 100 µg/L : la population de *Synechococcus* (procaryote) avait une abondance égale à 260% de sa valeur dans les témoins, alors que l'abondance des prasinophycées a chuté à 2% de la valeur observée dans les témoins ;
- l'analyse des pigments par HPLC a permis de montrer une perturbation de la communauté photosynthétique, mais seulement à 100 µg/L d'Opus : quatre pigments n'étaient plus détectés alors que quatre autres présentaient un ratio par rapport à la chl *a* significativement différent de celui des témoins.

Aucune des trois méthodes utilisées pour analyser les communautés microbiennes n'a permis de détecter des effets de l'Opus à 1 µg/L. D'un point de vue environnemental, il semblerait donc que ce fongicide ne représente pas un grand risque pour l'équilibre des communautés microbiennes au niveau côtier. Cependant, il serait intéressant de tester cette substance à d'autres périodes de l'année et/ou sur d'autres types de communautés (ex : estuariennes) avant de conclure quant à son impact.

La TTGE a donc permis de détecter des différences dans les empreintes génétiques des communautés exposées à 10 µg/L d'Opus, par rapport aux témoins, alors qu'aucun effet n'est visible par la cytométrie ou l'HPLC. Cette différence peut s'expliquer par deux hypothèses :

- la TTGE serait plus sensible pour détecter un effet, du fait du critère utilisé. En effet, la diversité génétique des séquences du gène codant pour l'ARNr 18S peut être reliée aux espèces présentes. En cytométrie (morphologie, chlorophylle et phycoérythrine) et HPLC (contenu pigmentaire), les critères de discrimination

correspondent à des niveaux taxonomiques plus élevés, relatifs aux genres, classes ou autres. De ce fait, la TTGE apporterait une vision plus fine des modifications de structure des communautés ;

– il se peut aussi que les éléments affectés par l'Opus à 10 µg/L soient des eucaryotes non photosynthétiques, ce qui expliquerait que les modifications soient visibles en TTGE et pas avec les deux autres méthodes d'analyse ciblées sur les organismes photosynthétiques. Comme les bandes discriminantes n'ont pas pu être excisées et séquencées, cette hypothèse n'a pas pu être vérifiée.

Ces effets de l'Opus à 10 µg/L pourraient être directs, sur quelques éléments photosynthétiques non majoritaires, et/ou sur des éléments hétérotrophes. Mais il pourrait aussi s'agir d'effets indirects, par l'intermédiaire de procaryotes hétérotrophes.

Lorsque les communautés sont exposées à 100 µg/L d'Opus, des effets sont détectés avec les trois méthodes et révèlent des impacts importants. Cette concentration, non réaliste de point de vue environnemental, a été mise en œuvre afin de générer des effets massifs détectables par les trois méthodes. Il semble que les éléments de la communauté sont impactés de manière différente, ainsi les prasinophytes voient leur abondance décliner tandis que l'abondance de *Synechocccus* augmente fortement. Certains pigments disparaissent ou diminuent alors que d'autres augmentent. Ces effets résultent probablement d'actions directes et indirectes du fongicide sur les éléments eucaryotes, procaryotes, photosynthétiques et hétérotrophes. Il en résulte une restructuration des relations de compétition et de prédation au sein de la communauté dans son ensemble, avec certains taxons pouvant occuper les niches écologiques laissées vacantes par d'autres.

Cette première étude suggère une plus grande sensibilité de la TTGE pour la détection d'effets de contaminants sur la structure des communautés microbiennes. Cette méthode d'analyse a été appliquée lors d'une seconde étude d'impact d'un herbicide, le Roundup (glyphosate), mais cette fois en ciblant aussi les communautés procaryotes avec le gène codant pour l'ARNr 16S.

2. Impact du Roundup sur les communautés microbiennes marines

2.1. Introduction

Le glyphosate est un herbicide à large spectre, très utilisé dans le monde, mais dont les effets sur les communautés microbiennes marines n'ont quasiment pas été étudiés. Pourtant, ce pesticide est susceptible de représenter un risque en milieu marin, du fait de son utilisation importante pour les usages agricoles, mais aussi par les services de voirie et les particuliers. Parmi les six substances testées dans cette thèse, le glyphosate est celle dont les concentrations en Rade de Brest sont les plus importantes. Ainsi, des concentrations maximales de 0.41 µg/L de glyphosate, et 0.64 µg/L d'AMPA, son métabolite, ont été relevées par le Laboratoire Idhesa entre 2002 et 2004, sur des masses d'eau de salinité 27 ‰ ou plus (source : http://www.rade-brest.fr/). Dans la baie de Marennes-Oléron (salinité 33 ‰), c'est une concentration d'1.2 µg/L de glyphosate qui a été mesurée sur une période de 11 jours en 2004 (Burgeot *et al*., 2007).

Pour évaluer les effets éventuels du glyphosate sur les communautés microbiennes en milieu côtier, les communautés naturelles (<200 µm) ont été exposées, en microcosmes *in situ*, à la formulation commerciale Roundup (1 et 10 µg/L de glyphosate), pendant sept jours. Afin de mimer les fluctuations de l'environnement naturel, une partie du contenu des microcosme était renouvelée tous les deux jours (200 mL) avec de l'eau du site expérimental filtrée à 200 µm.

Ce deuxième article avait deux objectifs :

- valider le système expérimental utilisé par rapport au milieu naturel, en comparant les communautés des microcosmes à celles du milieu environnant ;
- exposer les communautés microbiennes en microcosmes *in situ*, au Roundup à des concentrations réalistes du point de vue environnemental afin d'en évaluer les effets en analysant les communautés par TTGE et cytométrie en flux.

Article 2 – Impact of Roundup on the marine microbial community, as shown by an *in situ* microcosm experiment

Aquatic Toxicology 89 (2008) 232–241

Contents lists available at ScienceDirect

Aquatic Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aquatox

Impact of Roundup on the marine microbial community, as shown by an in situ microcosm experiment

Sabine Stachowski-Haberkorn[a], Beatriz Becker[b], Dominique Marie[c], Hansy Haberkorn[d], Louis Coroller[a], Denis de la Broise[a,*]

[a] Université Européenne de Bretagne, LUBEM (EA3882), UBO, 6 rue de l'université, 29334 Quimper, France
[b] Centre d'Océanologie de Marseille, rue de la Batterie des Lions, 13007 Marseille, France
[c] Station Biologique de Roscoff, UMR7144, CNRS et Université Pierre et Marie Curie, Place G. Teissier, 29682 Roscoff, France
[d] Université Européenne de Bretagne, LEMAR (UMR 6539), UBO, IUEM, Place Nicolas Copernic, Technopôle Brest Iroise, 29280 Plouzané, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 16 April 2008
Received in revised form 13 June 2008
Accepted 8 July 2008

Keywords:
Microcosm
Marine microbial communities
Glyphosate
TTGE
Flow cytometry

ABSTRACT

The effects of the herbicide Roundup® (glyphosate) on natural marine microbial communities were assessed in a 7-day field experiment using microcosms. Bottles were maintained underwater at 6 m depth, and 10% of their water content was changed every other day.

The comparison of control microcosms and surrounding surface water showed that the microcosm system tested here can be considered as representative of the natural surrounding environment. A temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) was run on 16S and 18S rDNA-amplified extracts from the whole microbial community. Cluster analysis of the 16S gel showed differences between control and treatment fingerprints for Roundup at 1 $\mu g\,L^{-1}$ (ANOSIM, $p = 0.055$; $R = 0.53$), and 10 $\mu g\,L^{-1}$ (ANOSIM, $p = 0.086$; $R = 0.40$). Flow cytometry analysis revealed a significant increase in the prasinophyte-like population when Roundup concentration was increased to 10 $\mu g\,L^{-1}$.

This study demonstrates that a disturbance was caused to the marine microbial community exposed to 1 $\mu g\,L^{-1}$ Roundup concentration, a value typical of those reported in coastal waters during a run-off event.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The massive use of pesticides induces acute or chronic contamination of aquatic biota via spray drift, leaching or runoff from urban and agricultural areas. Herbicides in estuarine areas have been reported at concentrations ranging from several 10s to 100s of $ng\,L^{-1}$ (Lehotay et al., 1998; Chesworth et al., 2004; Steen et al., 2001; Oros et al., 2003). These contaminants can negatively impact non-target organisms, including microbial eukaryotes and prokaryotes. In microbial aquatic communities, phytoplankton are potentially vulnerable to herbicides, due to their physiological homologies with terrestrial plants (DeLorenzo et al., 2001; Dorigo et al., 2004). Furthermore, impacts of pesticides on this microbial community could seriously damage the workings of the ecosystem, as the microbial food web plays a critical role in nutrient cycling and transfer of nutrients to higher trophic levels (DeLorenzo et al., 1999a).

Numerous studies have been published about pesticide toxicity assessment on phytoplankton, using single-species tests (Sabater and Carrasco, 2001; Rioboo et al., 2002; Sabater et al., 2002; Weiner et al., 2004; Gatidou and Thomaidis, 2007; Santin-Montanya et al., 2007). But Bérard et al. (1999) demonstrated that single-species tests may fail to predict indirect or system responses to toxicants, such as changes in population competition or succession. According to these authors, studies focusing on the whole natural community provide more reliable predictions about herbicide safety in aquatic environments.

Toxicity effects on natural communities can be assessed in several ways: by sampling at different natural sites and/or times to look for pollution-related characteristics (Kostanjsek et al., 2005; Pesce et al., 2008); by sampling natural communities from the field and maintaining them in microcosms under controlled laboratory conditions (DeLorenzo et al., 1999b; Seguin et al., 2001) and, finally, by running studies using in situ microcosms. Recently, de la Broise and Palenik (2007) showed that such microcosms immersed in "average water column conditions", with partial water renewal, can be considered as good experimental models for natural nano- and picophytoplankton from coastal waters. Such in situ micro- or mesocosm experiments provide the best aspects of both laboratory

* Corresponding author. Tel.: +33 2 98 10 00 61; fax: +33 2 98 10 00 62.
E-mail address: denis.de-labroise@univ-brest.fr (D. de la Broise).

0166-445X/$ – see front matter © 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi: 10.1016/j.aquatox.2008.07.004

and open field systems, as this experimental setup allows both the testing of multiple replicates and ecological realism (van den Brink et al., 2002). Microcosms setup in natural environments allows a wider species spectrum to be tested, including populations that are hard to maintain, and can thus provide a wider survey of prokaryote and eukaryote susceptibility to toxicants (Yasuno et al., 1993). Seguin et al. (2001) and Leboulanger et al. (2001) pointed out the need for reliable toxicity data using such microcosm systems.

Genetic fingerprinting techniques, such as denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) (Muyzer et al., 1993) or temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) (Yoshino et al., 1991) can provide an overview of whole community composition, including unculturable strains, which can account for 90% of microorganisms (Ward et al., 1990). Both DGGE and TTGE methods have been useful as tools to describe the diversity of the whole prokaryote or eukaryote microbial communities in aquatic environments (Murray et al., 1996; van Hannen et al., 1998; Bernard et al., 2000; Diez et al., 2001; Schäfer et al., 2001; Marie et al., 2006).

More recently, these methods were successfully applied to detect disturbances in microbial communities exposed to pollution (Petersen et al., 2004; Kostanjsek et al., 2005; Pesce et al., 2006, 2008).

Besides genetic fingerprinting techniques, flow cytometry can also provide information about natural microbial community populations, and their abundances (Hofstraat et al., 1994; Jonker et al., 1995; Marie et al., 1999; Rutten et al., 2005). Toxicity assessment using flow cytometry was reported in studies involving either phytoplankton cultures (Cid et al., 1995, 1996; Lage et al., 2001; Stauber and Adams, 2005; Yu et al., 2007) or natural photosynthetic communities (de la Broise and Palenik, 2007).

Glyphosate is the most commonly used herbicide in the world, for both agricultural and non-agricultural weed control (Woodburn, 2000). The use of this non-selective and broad-spectrum herbicide increased dramatically after the introduction of genetically modified glyphosate-resistant crops in 1997 (Giesy et al., 2000). The main formulation of glyphosate is Roundup, where glyphosate is present as an isopropylamine (IPA) salt and its efficiency is enhanced by addition of the surfactant polyoxyethylene amine (POEA) (Tsui and Chu, 2003).

As receivers of terrestrial pollution, coastal areas can suffer glyphosate contamination over episodes of several days: for instance, glyphosate was detected over a 11-day period at a peak value of 1.2 $\mu g\,L^{-1}$ in the Marennes–Oléron bay (Atlantic coast, France) in late spring 2004 (Burgeot et al., 2007). However, little is known about its impact on natural aquatic microbial communities. To our knowledge only one study has revealed significant disturbance in the sediment bacterial community from a lake, exposed to environmentally relevant glyphosate concentrations (Widenfalk et al., 2008).

To examine the effects of Roundup on marine microbial communities, the objectives of this study were

1. To compare microbial communities in microcosms and in surrounding water in order to evaluate the relevance of in situ microcosms.
2. To expose microbial communities to Roundup at environmentally relevant concentrations, in microcosms in situ.
3. To assess the pesticide impacts using flow cytometry and TTGE for analysis of prokaryote and eukaryote natural communities.

2. Materials and methods

In order to assess the effects of Roundup on eukaryote and prokaryote marine microbial communities, a set of microcosms containing natural surrounding filtered seawater was placed in situ and exposed to Roundup. The genetic fingerprints of microcosm communities were obtained from the whole community DNA amplified extracts, using TTGE analysis. Chlorophyll *a* (chl *a*) measurements were made from biomass collected on filters, and microcosm subsamples were also analysed using flow cytometry, and species determination by microscopy.

2.1. Pesticide

The pesticide tested in this study is the commercial formulation of the herbicide glyphosate (Roundup®, Monsanto, Saint-Louis, MO, USA). Concentration values represent those of the pure active substance. The pesticide stock solution (10 mg L^{-1} glyphosate) was prepared in 0.22-μm filtered seawater, previously autoclaved for 20 min at 121 °C. After agitation for 48 h using a magnetic stirrer, the solution was kept at −24 °C.

Freshly thawed stock solution was added directly into the microcosm bottles just before immersion. Pesticide concentrations were analyzed on the first day of the experiment, on one additional microcosm for each treatment, and on the last day of experiment on pooled water samples from all the replicate bottles of each treatment. Samples were frozen until analysis.

Pesticide analyses were performed by Idhesa Laboratory (Brest, France). The determination of glyphosate and its metabolite aminomethylphosphonic acid (AMPA) residues was performed using liquid chromatography with fluorescence detection after liquid–liquid extraction and derivatization with 9-fluorenylmethylchloroformate (FMOC–Cl). Detection limit was 0.05 $\mu g\,L^{-1}$.

2.2. Microcosms

The outdoor experiment took place in summer 2006, in Port-la-Forêt Bay, south Brittany, France (47°52′12″N, 03°58′35″W), from July 27 to August 3. This bay is submitted to tide amplitude of 3–5 m, and maximum tidal currents are up to 0.5 m s^{-1} at the experimental site. Light at 6 m depth was measured twice during the experiment (spherical quantum sensor LI-193 SA from LICOR corporation), and showed about 10-fold intensity reduction as compared to surface light, indicating low turbidity waters. Microcosms consisted of hermetically closed 2.3-L glass bottles. These bottles were filled with 2 L of 200-μm filtered fresh seawater from the surface layer at the field site, containing natural phytoplankton communities, and enclosed with about 300 mL of air (de la Broise and Palenik, 2007).

Fifteen microcosms were prepared: five replicates each of the three treatments: control and two different concentrations of Roundup (1 and 10 $\mu g\,L^{-1}$).

Microcosms were hung on a 3-m diameter circular stainless steel frame that was anchored to the sea floor, on a 400 kg concrete block, and suspended from a surface buoy that allowed the bottles to remain at 6 m depth, regardless of the tide (Fig. 1). The replicate microcosm bottles of each treatment were distributed alternately all around the frame.

On days 2, 4 and 6, the frame was hauled out of the water and 200 mL of the 2 L seawater content of each bottle was collected in a tank for proper disposal, and replaced with the same volume of fresh 200-μm filtered surrounding seawater and the frame was re-immersed. No analysis was carried out on these 200 mL samples. Bottles were finally collected on day 7 for analyses.

On the first and last days of experiment, five samples of surrounding surface seawater (2 L) were also collected for analysis.

One litre of water from each microcosm and one from the surrounding seawater sample were filtered through 0.22-μm polysulfone filters. These filters were stored at −80 °C until DNA

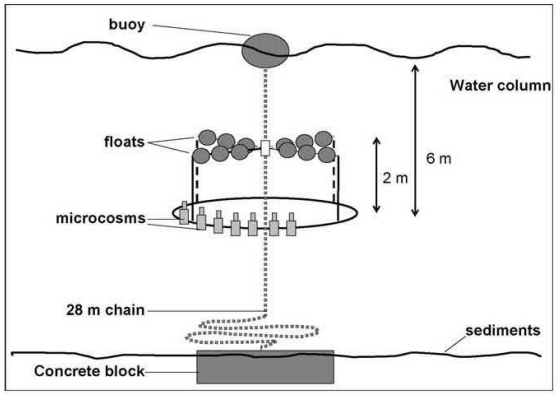


Fig. 1. Schematic figure of the frame holding the microcosms.

extraction and chl *a* quantification. For cytometry analyses, samples (1.5 mL) were dropped into cryotubes and fixed with glutaraldehyde (final concentration 0.25%). Cryotubes were vortexed and left for 15 min at room temperature before freezing in liquid nitrogen. Samples were stored at −80 °C until analysis. For algae species determination, replicate bottles were pooled (200 mL each), and 100 mL of the pooled samples were fixed using acid Lugol's iodine solution (2%, final concentration) and kept in the dark.

2.3. HPLC chl a quantification

Half of each frozen 0.22-μm polysulfone filter was extracted in the dark, in 1 mL of 95% methanol as follows: the filter was ground for 3 min using a stainless steel spatula and sonicated on ice for 30 s. The solution was then filtered through a 0.22-μm PVDF syringe filter to remove debris. Aliquots (200 μL) were injected into the HPLC system (Waters 600 S controller, 616 pump, 600 column heater and 996 diode-array detector). Pigments were separated through a Waters Symmetry-C8 reverse-phase column maintained at 30 °C (150 mm × 4.6 mm, 3.5 μm particle size, 100 Å pore size). The mobile phase was a gradient mixture of four solvents: methanol (100%), acetonitrile (100%), acetic acid (100%) and aqueous pyridine solution (0.25 M), as described in Zapata et al. (2000). The eluent gradient program was adapted from Zapata et al. (2000), but whereas Zapata used two eluents prepared from mixed solvents, four single solvents were used in the present study. Chl *a* concentration, measured at 440 nm, was calibrated against a chl *a* standard solution (SIGMA, chlorophyll *a* from spinach for HPLC Ref. 10865).

2.4. Flow cytometry

Samples were run using an FACSort flow cytometer equipped with a 488-nm argon laser and standard filter setup (Becton Dickinson, San Jose, CA). Two populations of photosynthetic organisms were discriminated in microcosms samples, on the basis of their scatter signals and their natural red (>630 nm) and orange fluorescence (580 ± 20 nm): *Synechococcus* and pico-eukaryotes (<10 μm). Usually, picoplankton is considered to range from 0.2 μm to 2 μm, and nanoplankton from 2 μm to 20 μm. But here, using flow cytometry, the term "pico-eukaryotes" is used for cells <10 μm.

For more precise analysis, a clear sub-population of small eukaryotes was considered as part of the overall picoeukaryotic distribution (Fig. 2). Cells belonging to this sub-population have been identified by flow cytometric sorting in marine samples from different geographic locations, as prasinophytes (D. Marie, unpublished data) and for this reason, we call them prasinophyte-like in the following text. Data were analysed using the WinMDI v2.9 software (J. trotter, http://facs.Scripps.edu/).

2.5. Species determination

Determination and quantification of micro- and nanophytoplankton cells were carried out at species level as follows: sub-samples of 50 mL were settled into Utermöhl settling chambers (Hasle, 1978) and counted using a Wild M40 phase contrast inverted microscope. Counts were carried out on partial or whole bottom surface of the chamber, depending on the size and the abundance of the species (Lund et al., 1958), at 200× to 400× magnification. When possible, 400 cells were counted to ensure that the error in estimation of cellular abundance remained within the limits of ±10% (Uehlinger, 1964).

The Shannon–Wiener diversity index H' was calculated using the formula:

$$H' = \sum p_i \log_2(p_i)$$

where p_i is the proportion of the total count arising from the ith species.

2.6. DNA extraction and purification

Half of each polysulfone filter (0.22 μm pore size) was cut into small pieces and put in 5-mL polypropylene tubes. Sterile glass beads (0.5 g, 0.1 mm diameter, SIGMA, Ref. G8893) and 500 μL of TNE buffer (10 mM Tris–Cl, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, pH 8) were added. Tubes were vortexed for 1 min in order to disrupt the cells.

2.6.1. Nucleic acid extraction

Lysozyme was added (final concentration, 2 mg mL^{-1}) and tubes were then kept at 37 °C for 45 min. Proteinase K (final concentration, 0.5 mg mL^{-1}) and sodium-dodecyl-sulfate (SDS, final concentration, 1%) were then added, and tubes incubated at 37 °C for 30 min. The lysates were purified twice by extraction with an equal volume of phenol–chloroform–isoamyl alcohol (25:24:1), and the residual phenol was removed by two extractions with an equal volume of chloroform–isoamyl alcohol (24:1). Two volumes of isopropanol and sodium acetate (10% of the total volume, 3 M, pH 5.2) were added to the aqueous phase. After precipitation (1 h at room temperature), the tubes were centrifuged for 15 min at 13,000 rpm. The supernatant was discarded and 1.5 mL of 70% ethanol were added. Tubes were centrifuged for 10 min at 13,000 rpm, and the supernatant discarded. The tubes were then left for a few minutes at room temperature to ensure ethanol evaporation, and nucleic acids were resuspended into 300 μL of TE buffer (10 mM Tris–HCl, 1 mM EDTA, pH 8).

2.6.2. RNA digestion

Pre-incubated RNase (10 min at 80 °C) was added (final concentration, 20 μg mL^{-1}), and tubes were incubated for 30 min at 37 °C.

2.6.3. DNA purification

This procedure was carried out as for the nucleic acid extraction described above, except that proteinase K and SDS final concentrations were 50 μg mL^{-1} and 0.1%, respectively. DNA pellets were suspended in 0.1× TE buffer.

2.7. PCR

Two PCRs were run for each DNA extract.

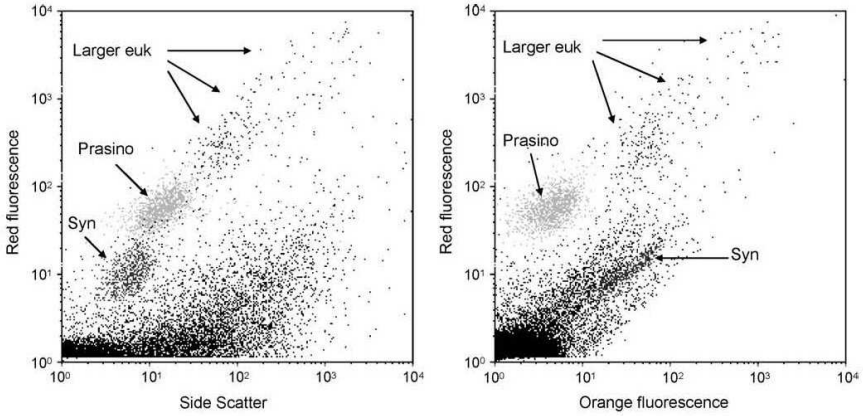


Fig. 2. Cytograms of side scatter and fluorescence of a seawater sample, showing the populations of *Synechococcus*, prasinophyte-like and larger eukaryotes.

For the first PCR, eukaryotic 18S ribosomal DNA (rDNA) universal primers were used. The primers were Euk1A and Euk516r-GC (Diez et al., 2001), which amplify a fragment of approximately 560 bp. The PCR program (Diez et al., 2001) included an initial denaturation step at 94 °C for 130 s and 35 cycles as follows: denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 56 °C for 45 s and extension at 72 °C for 130 s. After the last cycle, a final extension step was performed for 7 min at 72 °C.

For the second PCR set, prokaryotic 16S rDNA universal primers were used. The primers were 341F-GC (Muyzer et al., 1993) and 907RC (Schäfer et al., 2001). The PCR program (Massana and Jürgens, 2003) included an initial denaturation step at 94 °C for 5 min, followed by 10 touchdown cycles including denaturation at 94 °C for 1 min, annealing for 1 min (starting at 65 °C and decreasing by 1 °C per cycle), and extension at 72 °C for 3 min. The next 20 cycles were composed of denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 55 °C for 1 min and extension at 72 °C for 3 min. A final extension step was performed for 5 min at 72 °C.

For both PCRs, approximately 15 ng of extracted DNA (estimated using spectrophotometry) were used as a template: the reaction mixture (50 μL) contained sterile nuclease-free water, each primer at a final concentration of 0.3 μM, bovine serum albumin (final concentration 0.2 μg μL^{-1}) and Promega PCR Master Mix (in which the final concentrations were deoxynucleoside triphosphates (dNTPs) 200 μM each; $MgCl_2$ 1.5 mM and *Taq* polymerase 25 units mL^{-1}) supplied in a reaction buffer (pH 8.5).

PCR products were verified on a 1% agarose gel before loading on TTGE gel.

2.8. TTGE

Denaturing gels (30 mL) were prepared composed of 6% polyacrylamide (stock solution:acrylamide/bis-acrylamide 37.5:1), 7 M urea, 1.25× TAE and 2% glycerol. The stacking gel (5 mL) contained only TAE 1.25× and 6% polyacrylamide. Ammonium persulfate 10% (150 μL and 25 μL for the denaturing and the stacking gels, respectively) and TEMED (30 μL and 5 μL, respectively) were added before casting and the gel was left to polymerize at 20 °C for 3–4 h. The gel dimensions were 16 cm × 16 cm × 1 mm.

The TTGE was performed by using a Dcode universal mutation system (Bio-Rad), modified to improve accuracy and repeatability of the temperature gradient kinetics: the electrophoresis part of the Dcode system was immersed in a modified buffer tank (15 L). The tank was connected to an external temperature control unit (Cryostat Julabo, Seelbach, Germany) using 20 mm diameter tubing. Electrophoresis was performed for 18 h at 70 V in 1.25× TAE buffer. Gradual temperature increases were 57–62 °C for 18S PCR products, and 63–68 °C for 16S PCR products. Gels were stained with SYBR Gold 1×, rinsed in 1× TAE buffer, and photographed on a UV transillumination table. Band detection on TTGE gel images was performed using the LabImage software v2.7 (Kapelan GmbH, Halle, Germany). On the basis of a band presence/absence matrix from each gel, a dendrogram was constructed applying the Dice coefficient and the unweighted pair group method of averages (UPGMA) using the Matlab software v6.1 (The Mathworks, Natik, MA).

For practical reasons, only four replicates for control and three replicates for each pesticide treatment were processed for TTGE analysis.

2.9. Statistical analysis

The chl *a* and flow cytometry data were first tested for homogeneity of variances (Bartlett's test) and normal distributions (Kolmogorov–Smirnov test). As several variables did not fulfill both conditions, a parametric analysis could not be used. Therefore, following the statistical procedures given in Sokal and Rohlf (1995), a Kruskal–Wallis test was used to check for significant differences in multiple treatment sets, and when the answer was positive a Mann–Whitney test was run for pair wise comparisons. Statistical tests were performed using the Statgraphics® Plus v5.1 software.

In order to test for significant differences between the genetic fingerprints obtained from different treatments, analyses of similarity (Clarke, 1993) were performed on binary matrixes using the one-way ANOSIM function in the Past v1.77 software (Hammer et al., 2001).

3. Results

3.1. Comparison between control and surrounding water

The chl *a* concentration in the surrounding water (Fig. 3) ranged from 0.93 ± 0.07 μg L^{-1} (mean ± S.E.) on day 0 to 1.71 ± 0.097 μg L^{-1} on day 7, showing almost a twofold increase. In controls on day 7, the chl *a* concentration had increased up to 1.31 ± 0.16 μg L^{-1}, but this was not significantly lower than the level in surrounding water on the same day ($p = 0.11$).

Table 1
Number of species and Shannon–Wiener index calculated from microscopic analyses of samples from the surrounding water (SW) and the microcosm experiment

	SW Day 0	SW Day 7	Control	Roundup 1 ($\mu g\,L^{-1}$)	Roundup 10 ($\mu g\,L^{-1}$)
Number of species	31	30	32	24	26
H'	2.12	2.29	1.99	1.59	1.87

Five pooled samples were used for each analysis.

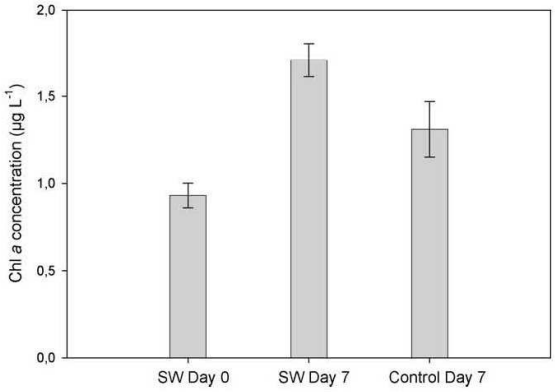


Fig. 3. Chl *a* concentrations ($\mu g\,L^{-1}$) in surrounding water on the first and last day of experiment (SW day 0 and SW day 7), and in control microcosms on the last day (control day 7).

Similarly, the total cellular concentration obtained using flow cytometry analysis (Fig. 4) ranged from 5667 ± 306 cell mL^{-1} (mean ± S.E.) on day 0 to $11\,268 \pm 131$ cell mL^{-1} on day 7, showing a twofold increase. The value obtained for control microcosms on day 7 ($9\,943 \pm 480$ cell mL^{-1}) was not significantly different from that of surrounding seawater on the same day.

The *Synechococcus* cellular concentration in the surrounding water (Fig. 4) did not increase significantly between day 0 and day 7 (3152 ± 180 and 3467 ± 138 cell mL^{-1}, respectively). This population was significantly lower in the control microcosms on day 7 (1454 ± 131 cell mL^{-1}, Mann–Whitney, $p < 0.05$) compared to the surrounding water.

The total pico-eukaryote cellular concentration in the surrounding water (Fig. 4) increased from 2515 ± 164 cell mL^{-1} on day 0, to 7801 ± 200 cell mL^{-1} on day 7 and values were not significantly different between control microcosms (8489 ± 562 cell mL^{-1}) and surrounding water on day 7 ($p = 0.27$).

On the first day of experiment, 31 species were identified in the algal community of the surrounding water using microscope. On the last day of experiment, 30 were found. A similar value (32 species) was observed in the control on the last day. The Shannon–Wiener diversity indexes (H') were also close in surrounding water on the first and last days, and in control microcosms on the last day (Table 1).

Nine main groups composed the surrounding water and control communities on the first and last days of experiment (Fig. 5). Relative abundance of diatoms increased from 31% in the surrounding water on the first day to 84% on the last day, while it accounted for 63% in the control. The diatom group was mostly represented by the genus *Chaetoceros* (25% of the total abundance on the first day, 53% on the last day and 50% in the control), and the species *Leptocylindrus danicus* (2.5% of the total abundance on the first day, 21% on the last day and 10% in the control). Dinoflagellate relative abundances were not higher than 12% in the surrounding water on the first day (11% *Gymnodinium spp.*), but they dropped to 0.8% by the last day, and accounted for 1.2% in the control. The most abundant group, undetermined flagellates, represented 57% of the total abundance in surrounding water on the first day, 15% on the last day and 36% in the control.

From these data, it appears that the abundances of these four main groups observed in the control match the range of abundances observed in the surrounding water between the first and the last day of the experiment.

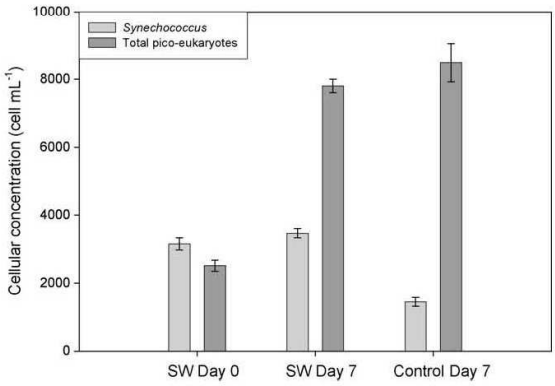


Fig. 4. Cellular concentrations of the *Synechococcus*, and total pico-eukaryote populations discriminated by flow cytometry analysis on surrounding water samples taken on the first and last day of experiment (SW day 0 and SW day 7), and in control microcosms on the last day (control day 7).

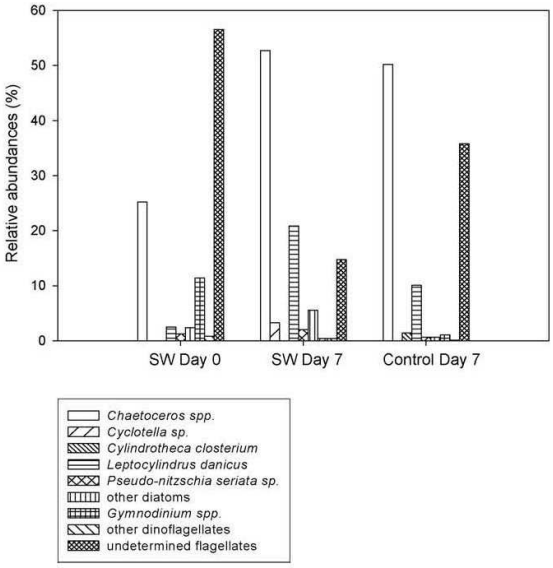


Fig. 5. Relative abundances of the main phytoplankton groups identified by microscopy in surrounding water on the first and last day of experiment (SW day 0 and SW day 7), and in control microcosms on the last day of experiment (control day 7).

Table 2
Glyphosate ($\mu g\,L^{-1}$) detected in microcosms and surrounding water on the first and last days of experiment

Day	Surrounding seawater	Control	Roundup 1 ($\mu g\,L^{-1}$)	Roundup 10 ($\mu g\,L^{-1}$)
0	<0.05	<0.05	0.11	3.56
7	<0.05	<0.05	0.13	3.08

Detection limit: 0.05 $\mu g\,L^{-1}$.

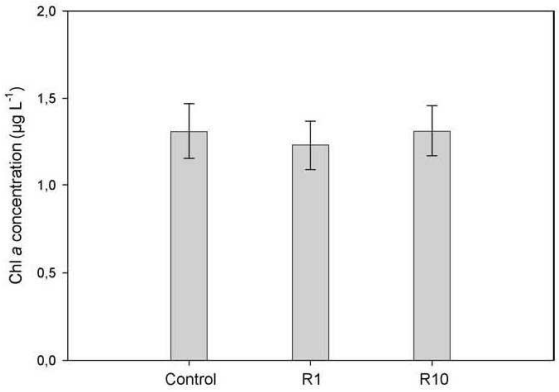


Fig. 6. Chl *a* concentrations ($\mu g\,L^{-1}$) in microcosms on the last day of experiment.

3.2. Microbial community exposure to Roundup

3.2.1. Pesticide exposure

The control microcosms and the surrounding seawater did not contain detectable glyphosate during the experiment (Table 2). The concentrations detected for Roundup-treated microcosms on the first day of experiment ranged from 11% of the nominal amount added for the 1 $\mu g\,L^{-1}$ treatment, to 36% for the 10 $\mu g\,L^{-1}$ treatment. At the end of the experiment, levels ranged from 13% to 31% for the 1 and 10 $\mu g\,L^{-1}$ treatments, respectively. The metabolite AMPA was not detected in any of the samples.

3.2.2. Chlorophyll *a* in microcosms

The chl *a* concentration ($1.31 \pm 0.16\ \mu g\,L^{-1}$ in control microcosms, Fig. 6) was not affected by the Roundup exposure, either at 1 or 10 $\mu g\,L^{-1}$ (Mann–Whitney, $p = 0.99$ and 0.71, respectively).

3.2.3. Roundup effects on prokaryote communities

Image analysis of the TTGE gel from the 16S PCR products (Fig. 7a) allowed the detection of 12–16 major bands for the control microcosms, 14–17 for microcosms treated with 1 $\mu g\,L^{-1}$ of Roundup, and 10–16 for the 10 $\mu g\,L^{-1}$ exposure. A total of 23 different bands was detected on the whole gel.

The dendrogram generated from this banding pattern (Fig. 7b) exhibited a clear separation of the control microcosms on the one hand, and the herbicide-treated microcosms on the other. Only one sample fingerprint (a 10 $\mu g\,L^{-1}$ Roundup replicate) was situated outside of these two clusters. The ANOSIM from the cluster analysis between the control group and the Roundup treatments showed *p*-values of 0.055 and 0.086 for the Roundup at 1 and 10 $\mu g\,L^{-1}$, respectively. The *R*-values obtained were 0.53 for Roundup 1 $\mu g\,L^{-1}$ and 0.40 for Roundup 10 $\mu g\,L^{-1}$. There was no evidence of a difference in the effect of 1 and 10 $\mu g\,L^{-1}$ treatments on these communities, as fingerprints from both treatments were grouped together.

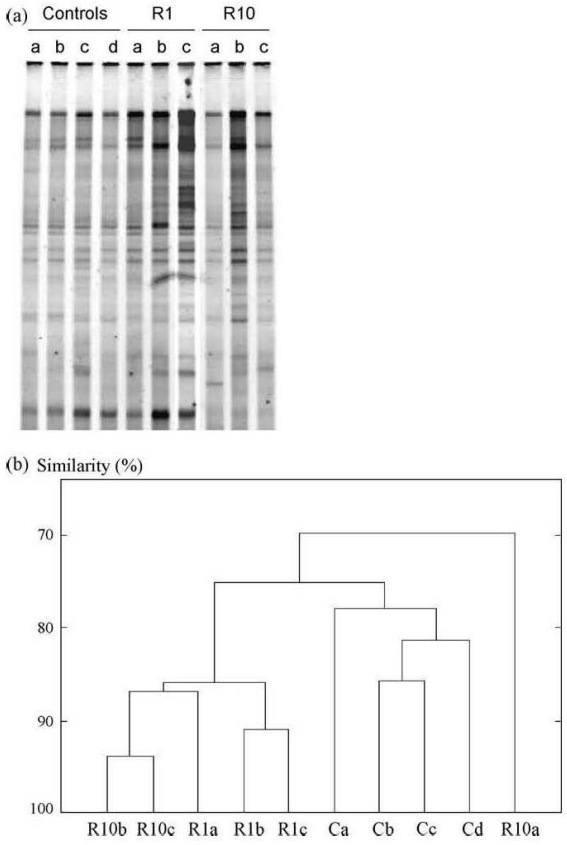


Fig. 7. (a) TTGE profiles from 16S PCR products. C = control; R1 = Roundup 1 $\mu g\,L^{-1}$; R10 = Roundup 10 $\mu g\,L^{-1}$; a–d = replicates. (b) UPGMA cluster analysis of Dice similarity matrix calculated from 16S-TTGE banding patterns. C = control; R1 = Roundup 1 $\mu g\,L^{-1}$; R10 = Roundup 10 $\mu g\,L^{-1}$; a–d = replicates.

When the control group was tested against both treatments together, a *p*-value of 0.021 ($R = 0.44$) was observed.

The prokaryotic *Synechococcus* counts in microcosms, obtained from flow cytometry analysis (Fig. 8) did not show significant differences between the controls and either Roundup treatment.

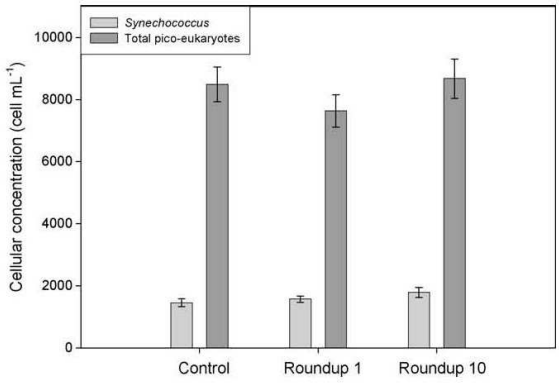


Fig. 8. Cellular concentrations of the photosynthetic populations in microcosms on the last day of experiment, discriminated using flow cytometry.

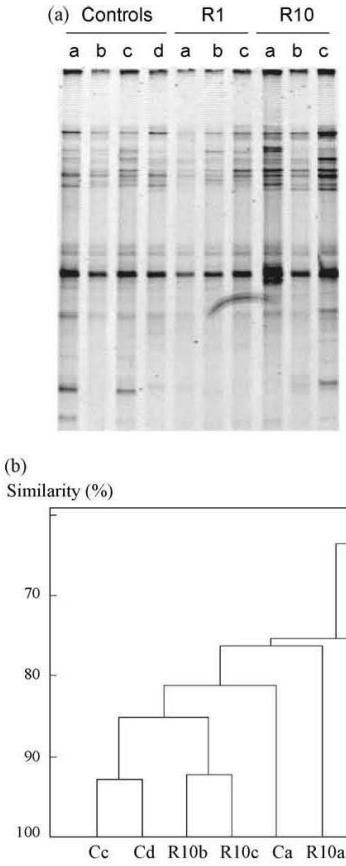


Fig. 9. (a) TTGE profiles of 18S PCR products. C = control; R1 = Roundup 1 μg L^{-1}; R10 = Roundup 10 μg L^{-1}; a–d = replicates. (b) UPGMA cluster analysis of the Dice similarity matrix calculated from 18S-TTGE banding patterns. C = control; R1 = Roundup 1 μg L^{-1}; R10 = Roundup 10 μg L^{-1}; a–d = replicates.

Roundup does not show any significant effect on *Synechococcus* relative fluorescence values (data not shown).

3.2.4. Roundup effects on eukaryote communities

Image analysis of the TTGE gel from the 18S PCR products (Fig. 9a) allowed the detection of 9–14 major bands for the control microcosms, 7–12 for microcosms treated with 1 μg L^{-1} of Roundup and 13–17 for the 10 μg L^{-1} exposure. A total of 22 different bands were detected on the whole gel.

The cluster analysis (Fig. 9b) revealed no clear separation of the patterns, even for the highest pesticide concentration, and the ANOSIM results did not indicate significant differences ($p > 0.10$, data not shown).

Flow cytometry analysis revealed no significant difference in total pico-eukaryote counts (Fig. 8) or fluorescence (data not shown) between the control microcosms (8489 ± 562 cell mL^{-1}, mean ± S.E.) and either 1 μg L^{-1} (7638 ± 522 cell mL^{-1}) or 10 μg L^{-1} (8675 ± 635 cell mL^{-1}) Roundup treatment.

However, though the prasinophyte-like cell count was not significantly enhanced (Mann–Whitney, $p = 0.06$) for the 1 μg L^{-1} treatment, it was significantly higher at 10 μg L^{-1} Roundup, with a cellular concentration increase of 43% (Fig. 10).

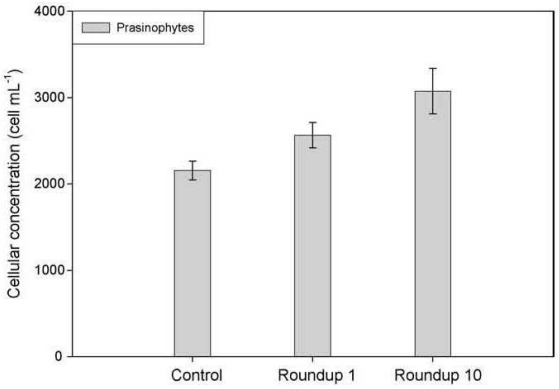


Fig. 10. Cellular concentrations of the prasinophyte-like population in microcosms on the last day of experiment, discriminated using flow cytometry.

The microscopic observation of samples allowed the identification of 32 species for the control, but only 24 and 26 for the Roundup treatments at 1 and 10 μg L^{-1}, respectively. The associated Shannon–Wiener diversity indexes also dropped in treatments compared with the control (Table 1). Although a statistical treatment cannot be applied to such data, the quantification of the main groups (Fig. 11) suggests, in treated microcosms during the experiment, a higher decrease of *L. danicus* and a lower increase of *Chaetoceros sp.* cells than in control microcosms and in surrounding waters (Fig. 5). Undetermined flagellates were maintained at values much higher in treated microcosms than in control or in surrounding waters.

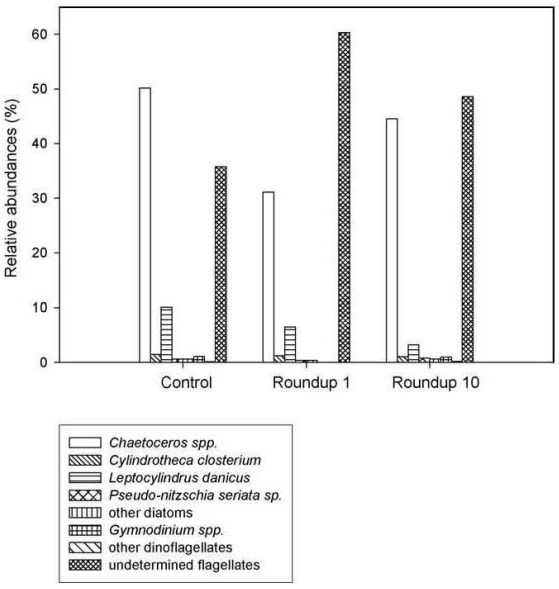


Fig. 11. Relative abundances of the main phytoplankton groups identified by microscopy in microcosms on the last day of experiment.

4. Discussion

4.1. Are microcosm contents representative of the mixed layer?

For practical reasons, seawater for renewal was collected in the 50-cm surface layer. The mixed layer of ocean surface waters is estimated to fluctuate from several meters depth in very calm conditions, to 100 meters or more in strong wind and wave conditions (Bendtsen et al., 2006; Nilsen and Falck, 2006). Therefore, at the beginning of experiment, the water content of such microcosms can be considered as representative of coastal surface waters. The in situ microcosms used in the present study were exposed to natural underwater temperature and light conditions. Following previous experiments, it was decided to renew 10% of the bottle content every other day in order to mimic the change of the surrounding water, and an air overlay was also included to simulate gas exchanges occurring in free seawater (de la Broise and Palenik, 2007).

The chl *a* measurements in controls on day 7 exhibited values that were not significantly different from the surrounding water on the same day. Total abundances and pico-eukaryotes were greatly increased during the experiment, both in surrounding water and in controls. Only 27% of the microcosm water content was changed overall during this period. However, control and surrounding water values were quite close on day 7. Only *Synechococcus* counts were clearly lower in controls on day 7 compared with surrounding seawater. However, the abundance of this cyanobacterium is known to fluctuate rapidly over a wide range in coastal waters. Li et al. (2006) reported daily variations of *Synechococcus* biomass in the Yellow Sea, ranging from 2 to 8 mg C m^{-3}. Uysal and Koksalan (2006) reported a fourfold increase of *Synechococcus* counts over a 6-day period in a survey on eastern Mediterranean Sea coastal waters. The authors found that the observed fluctuations were characteristic of shallow coastal waters, with rapidly changing environmental conditions. Therefore, based on its reported natural variations, the present result showing a *Synechococcus* concentration reduced by half in controls compared with surrounding water does not seem surprising.

The number of species and diversity index showed similar values for control and surrounding water at the end of experiment. Furthermore, the three major groups identified were also the same.

These data suggest that the environmental conditions that drive short-term fluctuations were realistic enough in microcosms for the maintenance of a phytoplankton community representative of natural water in the area.

4.2. Pesticide exposure

As medium renewal was 10% every other day, the pesticide loss in microcosms after 7 days should be approximately 27% of the nominal amount added. Data from glyphosate analyses on the first and last days of experiment showed concentrations much lower than those expected. This could be due to an underestimation of the glyphosate present in the samples, or to its possible adsorption to the bottle walls and/or on the organic matter or multivalent cations present in seawater. Indeed, Freuze et al. (2007) demonstrated that the FMOC method applied in this study could underestimate both glyphosate and AMPA in the presence of multivalent cations. They also showed that only free forms of AMPA and glyphosate were able to react with the FMOC reagent. Overall, the authors indicate that the efficiency of the method depends on the water sample type and content (cations, organic matter etc.).

No detectable concentrations of AMPA were observed in treatments on day 7. This could be explained by AMPA concentrations being below the detection limit, by the same adsorption mechanism described for glyphosate or as a result of slow glyphosate degradation kinetics, under such conditions.

To our knowledge, very few reports on glyphosate concentrations in coastal waters are available. This lack of data may be linked to the high polarity of the molecule, close in structure to many naturally occurring amino acids, that makes its detection difficult in water samples (Skark et al., 1998; Rubio et al., 2003). This difficulty is probably made more pronounced by the low concentrations occurring in coastal waters. A peak value of 1.2 μg L^{-1} over a 11-day period was detected in the Marennes-Oléron bay (salinity 33‰) (Atlantic coast, France) in late spring 2004 (Burgeot et al., 2007). Analyses performed by Idhesa Laboratory (Brest, France) reported maximal concentrations in the Bay of Brest (2002–2004), of 0.41 μg L^{-1} for glyphosate and 0.64 μg L^{-1} for AMPA, in salinity 27‰ or higher (Gaël Durand, personnal communication). While the highest concentration tested in the present experiment (10 μg L^{-1} added, 3.6 μg L^{-1} detected on day 0) can be found in rivers or may represent an outstanding pollution peak in estuarine areas, the lowest concentration tested (1 μg L^{-1} added, 0.11 μg L^{-1} detected on day 0) is representative of coastal pollution.

4.3. Roundup impact on prokaryote communities

Comparison of TTGE fingerprints from control and Roundup-treated communities revealed significant differences (*p*-values in the range 0.05–0.1). The *R*-values were 0.53 and 0.40, for Roundup 1 and 10 μg L^{-1}, respectively, indicating that the two treated groups separate from the control group in the high dimensional space defined by the similarity matrix (Clarke, 1993). The *p*-value was reduced to 0.021 when both treatments were tested together against the control. This increased discrimination when treatments were grouped is probably due to the fact that such a non-parametric analysis is not very powerful, especially with small samples. These results clearly show a change in the prokaryote community composition, even with 1 μg L^{-1} (0.11 μg L^{-1} detected on day 0). Other studies have been reported that used TTGE from 16S PCR products to monitor pesticide toxicity on natural riverine microbial communities, using either pooled DNA extracts from replicates before PCR (Pesce et al., 2006), or no replication (Pesce et al., 2008). In our study, three or four replicates per treatment were extracted, amplified and separated. This allowed the statistical tool ANOSIM to be applied to test for significant differences between groups of fingerprints. As far as we know this is the first time that the ANOSIM has been applied to an ecotoxicological study using TTGE gel cluster analysis, and its relevance was clearly illustrated.

In spite of this significant difference observed in Roundup treatments compared to controls, no difference was observed in the number of bands detected: the prokaryote diversity might have been disturbed qualitatively, rather than quantitatively. The changes in the TTGE patterns cannot be precisely interpreted, since no sequencing of discriminating bands or other measurement on the bacterial compartment were done. Flow cytometry data show that *Synechococcus* was apparently not affected by Roundup. As *Synechococcus* is the major autotrophic prokaryote in mesotrophic and coastal areas (Olson et al., 1988; Partensky et al., 1996), we can then hypothesize that the impacted organisms were either heterotrophic prokaryotes or other minor autotrophs that could not be discriminated using flow cytometry.

Various hypotheses could explain this result: the Roundup could affect some prokaryote populations and thus allow the increase of their competitors, or some populations could even be stimulated (el Fantroussi et al., 1999). The changes could also indicate modified grazing pressure due to the possible pesticide impact on heterotrophic eukaryotes. TTGE changes could even indicate

modified nutrient sources for prokaryotes, due to Roundup disturbance on other organisms of the microbial loop. Working on bacterial community composition of Lake Erken (Sweden) sediments, Widenfalk et al. (2008) recently reported significant changes in microbial communities of sediments exposed to 150 $\mu g\,kg^{-1}$ (dry weight) of glyphosate, using the terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis. Unfortunately, such data are scarce in the literature, and should be complemented with further studies.

4.4. Roundup impact on eukaryote communities

The whole eukaryote community, including autotroph and heterotroph planktonic cells, as well as grazers (<200 μm), was targeted in the18S-TTGE analytical procedure. The cluster analysis of the 18S community fingerprints did not indicate any impact of Roundup on eukaryotes. However, the trophic diversity of organisms targeted, together with the possible bias introduced by the heterogeneity of 18S rRNA gene and its amplification (preferential amplification of some sequences, gene copy number per cell, van Hannen et al., 1998), can complicate the detection of potential effects. Based on these aspects, we can hypothesize that a slight effect on a reduced number of eukaryotic components would probably not be detected using this method. Flow cytometry analyses revealed a significant increase in the cellular concentration of the prasinophyte-like population. This indicates that the growth of these organisms had been stimulated, which may have occurred directly, or indirectly by an effect on a potential competitor. This effect could also be explained by a possible impact on grazers, inducing a modified grazing pressure, or changes in nutrient sources. It should be noted that the *p*-value of the test for prasinophyte-like concentration at 1 $\mu g\,L^{-1}$ of Roundup was 0.06. This suggests that the effect of Roundup on prasinophyte-like concentration starts as low as 1 $\mu g\,L^{-1}$.

In this case flow cytometry analyses seem more sensitive than TTGE for detecting the impact of Roundup on the eukaryote community.

Flow cytometry analyses are run on approximately 250–300 μL of sample and the diameter of the flow cell is below 80 μm. So only small cells (<10 μm) at relatively high concentrations can be discriminated, which usually correspond to the smallest part of the nanophytoplankton (2–20 μm) and picophytoplankton (0.2–2 μm). The larger nanophytoplankton cells and the microphytoplankton cells (20–200 μm) are not detected using flow cytometry because of their size and/or their low concentration in natural samples. This is the reason why qualitative and quantitative analyses of species, using microscopy, are required: they provide additional information and give a wider view of the eukaryote communities.

For practical reasons, the microscopic determination of species was run only on one pooled sample for each condition, and therefore no statistical treatments could be applied. However, data suggest that less species might be present in the treated microcosms compared with the control, and that the distribution of some species could be modified.

5. Conclusion

In situ microcosms were demonstrated to be a realistic model for toxicity studies on coastal waters. Our results show that the herbicide Roundup can affect natural coastal microbial communities after a 7-day exposure at 1 $\mu g\,L^{-1}$ (0.13 $\mu g\,L^{-1}$ detected) for prokaryotes and at 10 $\mu g\,L^{-1}$ (3.1 $\mu g\,L^{-1}$ detected) for some picoeukaryotes. This effect was detected for glyphosate concentrations typical of those already observed in polluted coastal areas. It leads us to conclude that glyphosate pollution during run-off events can modify microbial communities in some coastal areas. Effects could be attributed to impacts on competitors for nutrients, leading to community reorganisation and to colonization of empty ecological niches. But these effects could also be attributed to changes in nutrient sources or to modified grazing pressure by the heterotrophic eukaryotes. This study provides information about the high sensitivity of planktonic microorganisms to glyphosate exposure in environmentally relevant conditions. As AMPA is also found in coastal waters, its impact on microbial communities along with the impact of other pesticides should also be assessed.

Further experiments would be needed in order to identify the organisms impacted and their contribution to the global equilibrium of the microbial system. It will also be necessary to clarify whether such effects could occur during other periods of the year.

Acknowledgements

We wish to thank the "Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable", and the "Région Bretagne", who financially supported this research. We also thank the "Capitainerie de Beg-Meil", city of Fouesnant and Patrick Le Coz for their technical assistance, Geneviève Arzul, James Devillers, Gaël Durand, Marcel Koken, Gwendolina Limon, Nicolas Chomérat and Louis Quiniou. We are especially grateful to Bob Clarke for his precious advice about ANOSIM.

References

Bendtsen, J., Gustafsson, K.E., Petersen, J.K., 2006. Modelling vertical mixing in the surface boundary layer using artificial age tracers. J. Mar. Syst. 60, 115–128.

Bérard, A., Leboulanger, C., Pelte, T., 1999. Tolerance of *Oscillatoria limnetica* Lemmermann to atrazine in natural phytoplankton populations and in pure culture: influence of season and temperature. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 37, 472–479.

Bernard, L., Schäfer, H., Joux, F., Courties, C., Muyzer, G., Lebaron, P., 2000. Genetic diversity of total, active and culturable marine bacteria in coastal seawater. Aquat. Microb. Ecol. 23, 1–11.

Burgeot, T., Gagnaire, B., Renault, T., Haure, J., Moraga, D., David, E., Boutet, I., Sauriau, P.G., Malet, N., Bouchet, V., Le Roux, A., Lapègue, S., Bouilly, K., Le Moullac, G., Arzul, G., Knoery, J., Quiniou, F., Bacher, C., Soletchnik, P., 2007. Summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. In: Samain, J.F., McCombie, H. (Eds.), The Morest Project. Ifremer/Quæ, Versailles, France, pp. 107–151.

Chesworth, J.C., Donkin, M.E., Brown, M.T., 2004. The interactive effects of the antifouling herbicides Irgarol 1051 and Diuron on the seagrass *Zostera marina* (L.). Aquat. Toxicol. 66, 293–305.

Cid, A., Herrero, C., Torres, E., Abalde, J., 1995. Copper toxicity on the marine microalgae *Phaeodactylum tricornutum*: effects on photosynthesis and related parameters. Aquat. Toxicol. 31, 165–174.

Cid, A., Fidalgo, P., Herrero, C., Abalde, J., 1996. Toxic action of copper on the membrane system of a marine diatom measured by flow cytometry. Cytometry 25, 32–36.

Clarke, K.R., 1993. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. Aust. Ecol. 18, 117–143.

de la Broise, D., Palenik, B., 2007. Immersed in situ microcosms: a tool for the assessment of pollution impact on phytoplankton. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 341, 274–281.

DeLorenzo, M.E., Lauth, J., Pennington, P.L., Scott, G.I., Ross, P.E., 1999a. Atrazine effects on the microbial food web in tidal creek mesocosms. Aquat. Toxicol. 46, 241–251.

DeLorenzo, M.E., Scott, G.I., Ross, P.E., 1999b. Effects of the agricultural pesticides atrazine, deethylatrazine, endosulfan, and chlorpyrifos on an estuarine microbial food web. Environ. Toxicol. Chem. 18, 2824–2835.

DeLorenzo, M.E., Scott, G.I., Ross, P.E., 2001. Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: a review. Environ. Toxicol. Chem. 20, 84–98.

Diez, B., Pedros-Alio, C., Marsh, T.L., Massana, R., 2001. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. Appl. Environ. Microbiol. 67, 2942–2951.

Dorigo, U., Bourrain, X., Bérard, A., Leboulanger, C., 2004. Seasonal changes in the sensitivity of river microalgae to atrazine and isoproturon along a contamination gradient. Sci. Total Environ. 318, 101–114.

el Fantroussi, S., Verschuere, L., Verstraete, W., Top, E.M., 1999. Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA

gene fingerprints and community-level physiological profiles. Appl. Environ. Microbiol. 65, 982–988.
Freuze, I., Jadas-Hecart, A., Royer, A., Communal, P.Y., 2007. Influence of complexation phenomena with multivalent cations on the analysis of glyphosate and aminomethyl phosphonic acid in water. J. Chromatogr. A 1175, 197–206.
Gatidou, G., Thomaidis, N.S., 2007. Evaluation of single and joint toxic effects of two antifouling biocides, their main metabolites and copper using phytoplankton bioassays. Aquat. Toxicol. 85, 184–191.
Giesy, J.P., Dobson, S., Solomon, K.R., 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 167, 35–120.
Hammer Ø, Harper D.A.T., Ryan P.P.D., 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis, vol. 4, no. 1. Palaeontologia Electronica, p. 9, http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm.
Hasle, G.R., 1978. The inverted microscope method. In: Sournia, A. (Ed.), Phytoplankton Manual. UNESCO, Paris, pp. 88–96.
Hofstraat, J.W., van Zeijl, W.J.M., de Vreeze, M.E.J., Peeters, J.C.H., Peperzak, L., Colijn, F., Rademaker, T.W.M., 1994. Phytoplankton monitoring by flow cytometry. J. Plankton Res. 16, 1197–1224.
Jonker, R.R., Meulemans, J.T., Dubelaar, G.B.J., Wilkins, M.F., Ringelberg, J., 1995. Flow cytometry: a powerful tool in analysis of biomass distributions in phytoplankton. Water Sci. Technol. 32, 177–182.
Kostanjsek, R., Lapanje, A., Drobne, D., Nikcevic, S., Perovic, A., Zidar, P., Štrus, J., Hollert, H., Karaman, G., 2005. Bacterial community structure analyses to assess pollution of water and sediments in the Lake Shkodra/Skadar Balkan Peninsula. Environ. Sci. Pollut. Res. 12, 361–368.
Lage, O.M., Sansonetty, F., O'Connor, J.E., Parente, A.M., 2001. Flow cytometric analysis of chronic and acute toxicity of copper(II) on the marine dinoflagellate *Amphidinium carterae*. Cytometry 44, 226–235.
Leboulanger, C., Rimet, F., Hème de Lacotte, M., Bérard, A., 2001. Effects of atrazine and nicosulfuron on freshwater microalgae. Environ. Int. 26, 131–135.
Lehotay, S.J., Harman-Fetcho, J.A., McConnell, L.L., 1998. Agricultural pesticide residues in oysters and water from two Chesapeake bay tributaries. Mar. Pollut. Bull. 37, 32–44.
Li, H., Xiao, T., Ding, T., Lu, R., 2006. Effect of the Yellow Sea cold water mass (YSCWM) on distribution of bacterioplankton. Acta Ecol. Sin. 26, 1012–1019.
Lund, J.W.G., Kipling, C., Le Cren, E.D., 1958. The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. Hydrobiologia 11, 143–170.
Marie, D., Brussaard, C., Partensky, F., Vaulot, D., 1999. Flow cytometric analysis of phytoplankton, bacteria and viruses. In: Current Protocols in Cytometry. John Wiley & Sons, Inc, pp. 11.11.1–11.11.15.
Marie, D., Zhu, F., Balagué, V., Ras, J., Vaulot, D., 2006. Eukaryotic picoplankton communities of the Mediterranean Sea in summer assessed by molecular approaches (DGGE, TGGE, QPCR). FEMS Microbiol. Ecol. 55, 403–415.
Massana, R., Jürgens, K., 2003. Composition and population dynamics of planktonic bacteria and bacterivorous flagellates in seawater chemostat cultures. Aquat. Microb. Ecol. 32, 11–22.
Murray, A.E., Hollibaugh, J.T., Orrego, C., 1996. Phylogenetic compositions of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. Appl. Environ. Microbiol. 62, 2676–2680.
Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 59, 695–700.
Nilsen, J.E.O., Falck, E., 2006. Variations of mixed layer properties in the Norwegian sea for the period 1948–1999. Prog. Oceanogr. 70, 58–90.
Olson, R.J., Chisholm, S.W., Zettler, E.R., Armbrust, E.V., 1988. Analysis of *Synechococcus* pigment types in the sea using single and dual beam flow cytometry. Deep Sea Res. 35, 425–440.
Oros, D.R., Jarman, W.M., Lowe, T., David, N., Lowe, S., Davis, J.A., 2003. Surveillance for previously unmonitored organic contaminants in the San Francisco estuary. Mar. Pollut. Bull. 46, 1102–1110.
Partensky, F., Blanchot, J., Lantoine, F., Neveux, J., Marie, D., 1996. Vertical structure of picophytoplankton at different trophic sites of the tropical northeastern Atlantic Ocean. Deep Sea Res. 43, 1191–1213.
Pesce, S., Fajon, C., Bardot, C., Bonnemoy, F., Portelli, C., Bohatier, J., 2006. Effects of the phenylurea herbicide diuron on natural riverine microbial communities in an experimental study. Aquat. Toxicol. 78, 303–314.
Pesce, S., Fajon, C., Bardot, C., Bonnemoy, F., Portelli, C., Bohatier, J., 2008. Longitudinal changes in microbial planktonic communities of a French river in relation to pesticide and nutrient inputs. Aquat. Toxicol. 86, 352–360.
Petersen, D.G., Dahllof, I., Nielsen, L.P., 2004. Effects of zinc pyrithione and copper pyrithione on microbial community function and structure in sediments. Environ. Toxicol. Chem. 23, 921–928.
Rioboo, C., Gonzalez, O., Herrero, C., Cid, A., 2002. Physiological response of freshwater microalga (*Chlorella vulgaris*) to triazine and phenylurea herbicides. Aquat. Toxicol. 59, 225–235.
Rubio, F., Veldhuis, L.J., Clegg, B.S., Fleeker, J.R., Hall, J.C., 2003. Comparison of a direct ELISA and an HPLC method for glyphosate determinations in water. J. Agric. Food Chem. 51, 691–696.
Rutten, T.P.A., Sandee, B., Hofman, A.R.T., 2005. Phytoplankton monitoring by high performance flow cytometry: a successful approach? Cytometry 64A, 16–26.
Sabater, C., Carrasco, J.M., 2001. Effects of pyridaphenthion on growth of five freshwater species of phytoplankton. A laboratory study. Chemosphere 44, 1775–1781.
Sabater, C., Cuesta, A., Carrasco, R., 2002. Effects of bensulfuron-methyl and cinosulfuron on growth of four freshwater species of phytoplankton. Chemosphere 46, 953–960.
Santin-Montanya, I., Sandin-Espana, P., Garcia Baudin, J.M., Coll-Morales, J., 2007. Optimal growth of *Dunaliella primolecta* in axenic conditions to assay herbicides. Chemosphere 66, 1315–1322.
Schäfer, H., Bernard, L., Courties, C., Lebaron, P., Servais, P., Pukall, R., Stackebrandt, E., Trousselier, M., Guindulain, T., Vives-Rego, J., Muyzer, G., 2001. Microbial community dynamics in Mediterranean nutrient-enriched seawater mesocosms: changes in the genetic diversity of bacterial populations. FEMS Microbiol. Ecol. 34, 243–253.
Seguin, F., Leboulanger, C., Rimet, F., Druart, J.C., Bérard, A., 2001. Effects of atrazine and nicosulfuron on phytoplankton in systems of increasing complexity. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 40, 198–208.
Skark, C., Zullei-Seibert, N., Schottler, U., Schlett, C., 1998. The occurrence of glyphosate in surface water. Int. J. Environ. Anal. Chem. 70, 93–104.
Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 1995. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research, 3rd ed. W.H. Freeman and Co., New York.
Stauber, J., Adams, M., 2005. Microalgal toxicity tests using flow cytometry. Small-Scale Freshwater Toxic. Invest. 1, 203–241.
Steen, R.J.C.A., van der Vart, J., Hiep, M., van Hattum, B., Cofino, W.P., Brinkman, U.A.T., 2001. Gross fluxes and estuarine behaviour of pesticides in the Scheldt Estuary (1995–1997). Environ. Pollut. 115, 65–79.
Tsui, M.T.K., Chu, L.M., 2003. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. Chemosphere 52, 1189–1197.
Uehlinger, V., 1964. Etude statistique des méthodes de dénombrement planctonique. Arch. Sci. 17, 11–223.
Uysal, Z., Koksalan, I., 2006. The annual cycle of *Synechococcus* (cyanobacteria) in the northern Levantine Basin shelf waters (Eastern Mediterranean). Mar. Ecol. 27, 187–197.
van den Brink, P.J., Hartgers, E.M., Gylstra, R., Bransen, F., Brock, T.C.M., 2002. Effects of a mixture of two insecticides in freshwater microcosms. Part II. Responses Plankton Ecol. Risk Assess. Ecotoxicol. 11, 181–197.
van Hannen, E.J., van Agterveld, M.P., Gons, H.J., Laanbroek, H.J., 1998. Revealing genetic diversity of eukaryotic microorganisms in aquatic environments by denaturing gradient gel electrophoresis. J. Phycol. 34, 206–213.
Ward, D.M., Weller, R., Bateson, M.M., 1990. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. Nature 345, 63–65.
Weiner, J.A., DeLorenzo, M.E., Fulton, M.H., 2004. Relationship between uptake capacity and differential toxicity of the herbicide atrazine in selected microalgal species. Aquat. Toxicol. 68, 121–128.
Widenfalk, A., Bertilsson, S., Sundh, I., Goedkoop, W., 2008. Effects of pesticides on community composition and activity of sediment microbes—responses at various levels of microbial community organization. Environ. Pollut. 152, 576–584.
Woodburn, A., 2000. Glyphosate: production, pricing and use worldwide. Pest Manage. Sci. 56, 309–312.
Yasuno, M., Asaka, A., Kono, Y., 1993. Effects of pyraclofos (an organophosphorus insecticide) on nutrient enriched ecosystems. Chemosphere 27, 1813–1824.
Yoshino, K., Nishigaki, K., Husimi, Y., 1991. Temperature sweep gel electrophoresis: a simple method to detect point mutations. Nucl. Acids Res. 19, 3153.
Yu, Y., Kong, F., Wang, M., Qian, L., Shi, X., 2007. Determination of short-term copper toxicity in a multispecies microalgal population using flow cytometry. Ecotoxicol. Environ. Safety 66, 49–56.
Zapata, M., Rodríguez, F., Garrido, J.L., 2000. Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: a new HPLC method using a reversed phase C8 column and pyridine-containing mobile phases. Mar. Ecol. Prog. Ser. 195, 29–45.

2.2. Synthèse

Le but de l'étude décrite dans ce deuxième article était d'exposer des communautés microbiennes naturelles à des concentrations réalistes de glyphosate sous la forme commerciale Roundup, en microcosmes *in situ*.

L'utilisation de communautés naturelles exposées *in situ* répond à un objectif : obtenir des résultats extrapolables à l'environnement naturel. Or, le simple confinement des communautés dans un volume réduit peut aboutir à une dérive quantitative et/ou qualitative de celles-ci, du fait de « l'effet bouteille ». L'extrapolation de données issues de microcosmes *in situ* nécessite donc de s'assurer que les communautés en microcosmes sont représentatives des communautés de l'environnement naturel au même moment. Au premier et au dernier jour de l'expérience, nous avons effectué des analyses sur l'eau de surface du site expérimental, que nous avons comparé aux microcosmes témoins au dernier jour de l'expérience.

Il apparaît que le système testé permet de maintenir, sur le temps de l'expérience, les communautés en microcosmes dans les gammes de fluctuations observées pour les communautés du milieu environnant, pour les paramètres d'abondance des picoeucaryotes, pour la chl *a* et pour les analyses microscopiques (nombre d'espèces, indices de Shannon, abondances relatives des principaux groupes ou taxons).

Les principaux résultats obtenus révèlent un effet du Roundup à 1 et 10 µg/L sur les empreintes génétiques des communautés procaryotes (TTGE). Le procaryote photosynthétique *Synechococcus* ne paraît pas affecté par le Roundup, comme indiqué par les analyses de cytométrie en flux. Les procaryotes impactés seraient donc probablement des hétérotrophes.

Une augmentation significative de l'abondance des prasinophycées est détectée par cytométrie en flux à 10 µg/L, mais cette tendance est suspectée dès 1 µg/L ($p = 0.06$). Cet effet est probablement lié à l'occupation d'une niche écologique laissée vacante. Comme les empreintes génétiques du 18S ne semblent pas modifiées par l'herbicide, on peut penser que les changements intervenus au niveau des prasinophycées sont minimes et invisibles sur une empreinte pouvant représenter des organismes très variés (cellules autotrophes et/ou hétérotrophes, brouteurs).

Le Roundup a un impact significatif sur les communautés microbiennes marines à partir de 1 µg/L. Étant donné que tous les éléments de la boucle microbienne sont liés les uns aux autres, les effets observés peuvent être directs ou indirects, résulter d'effets sur la physiologie des organismes, sur les nutriments via la compétition trophique, ou encore sur la pression de prédation.

Cette étude a permis de montrer que le système de microcosmes utilisé est comparable au milieu environnant sur le temps de l'expérience. Le Roundup est susceptible de perturber les communautés microbiennes procaryotes dès 1 µg/L (0.13 µg/L détectés dans les microcosmes), une concentration représentative de la pollution par cet herbicide en zone côtière. Pour des concentrations plus élevées, l'herbicide pourrait entraîner des réactions en

cascade, impliquant aussi certains éléments photosynthétiques de la communauté eucaryote. Il est donc nécessaire de continuer à étudier les effets du Roundup sur les communautés microbiennes marines, afin de mieux caractériser les cibles, les mécanismes d'action ainsi que les effets potentiels sur des niveaux trophiques supérieurs.

3. Utilisation de microcosmes *in situ* pour évaluer l'impact de pesticides sur du naissain d'huître creuse

3.1. Introduction

L'apport de pesticides en milieu côtier et estuarien est susceptible de perturber la structuration des communautés microbiennes procaryotes et/ou eucaryotes (DeLorenzo *et al*., 1999a ; 1999b) et leur fonctionnement. Cela peut aussi affecter la quantité et/ou la qualité des nutriments qui transitent par cette boucle microbienne et qui sont transmis aux niveaux trophiques supérieurs (DeLorenzo *et al*., 1999a).

Parmi les niveaux trophiques supérieurs, les organismes filtreurs comme les huîtres se nourrissent principalement de phytoplancton. Leur survie et leur croissance dépendent en partie de la qualité des cellules ingérées (Brown et MacCausland, 2000). Ces organismes sont particulièrement exposés aux polluants, dont les pesticides, en raison de leur nutrition par filtration et de leur mode de vie fixé sur un substrat. Ils ne peuvent pas « fuir » les conditions défavorables et sont donc soumis aux variations physiques, chimiques et biologiques de leur environnement.

Les huîtres sont des organismes sentinelles, car intégrateurs de la pollution environnante. Bien que leur utilisation pour des tests d'écotoxicité soit largement répandue, la plupart des études sont réalisées en laboratoire, sur des organismes aux stades embryo-larvaire (His *et al*., 1999 ; Lyons *et al*., 2002 ; Geffard *et al*., 2003 ; Losso *et al*., 2007 ; Wessel *et al*., 2007) ou adulte (Auffret and Oubella, 1997 ; Gagnaire *et al*., 2004 ; Bouilly *et al*., 2007). Certaines études *in situ* ont permis d'évaluer la toxicité de polluants sur des larves (Geffard *et al*., 2001 ; Quiniou *et al*., 2007), juvéniles (Arnold *et al*., 2004 ; Bolton-Warberg *et al*., 2007) et adultes (Christl *et al*., 2004). Le jeune naissain est quasiment absent des études écotoxicologiques. Or ce stade présente l'avantage d'être fixé, moins fragile que les stades précoces, et sa taille réduite permet d'inclure un nombre important d'organismes dans chaque unité expérimentale. De plus, les tests peuvent être conduits sur de plus longues périodes que les tests sur des larves, qui durent généralement 24 à 72 h.

C'est pourquoi nous avons choisi d'intégrer du naissain d'huîtres dans nos microcosmes, afin de réaliser l'exposition simultanée des communautés microbiennes et des filtreurs à deux pesticides, en conditions naturelles. L'étude présentée dans le troisième et dernier article avait trois objectifs principaux :

- développer un outil permettant d'exposer du naissain *in situ*, en conditions naturelles, avec une faible mortalité et une croissance significative ;
- évaluer la toxicité de l'herbicide bentazone (Basamaïs®, BASF) et du fongicide époxiconazole (Opus®, BASF) sur la mortalité, la croissance et le contenu en matière organique du naissain d'huître creuse *Crassostrea gigas* ;
- réaliser en parallèle un test en laboratoire pour déterminer si le système de microcosmes est transposable à des conditions contrôlées mais proches des conditions naturelles.

Article 3 – *In situ* microcosms, a tool for assessment of pesticide impacts on oyster spat (*Crassostrea gigas*)

Ecotoxicology (2008) 17:235–245
DOI 10.1007/s10646-007-0190-9

In-situ microcosms, a tool for assessment of pesticide impacts on oyster spat (*Crassostrea gigas*)

Sabine Stachowski-Haberkorn · Françoise Quiniou · Morgane Nedelec · René Robert · Gwendolina Limon · Denis de la Broise

Accepted: 17 December 2007 / Published online: 31 January 2008
© Springer Science+Business Media, LLC 2008

Abstract Effects of the herbicide Basamaïs (bentazon) and the fungicide Opus (epoxiconazole) on oyster spat (*Crassostrea gigas*) were assessed using in-situ microcosms in a field experiment lasting 13 days. Six-week-old hatchery spat (mean size 1.1 mm), previously collected on PVC plates, was immersed in glass bottles filled with 200 μm filtered seawater. Bottles were maintained underwater at 6 m depth and their water content changed every other day. Growth, measured as shell area index increase, was 126 ± 4% in the control bottles. While no growth differences were observed between control and individual pesticide treatments at 10 μg l^{-1}, oysters treated with a mix of 10 μg l^{-1} Opus and 10 μg l^{-1} Basamaïs showed a 50% growth reduction compared with the control ($P < 0.0001$), suggesting a synergistic effect of these contaminants. Laboratory controls in microcosms maintained in a water bath with filtered natural light, were not significantly different from in-situ microcosm controls in the field, for organic weight content or growth. This in-situ experiment in microcosms allowed us to conclude that: (1) oyster spat can achieve significant growth in bottles immersed in situ without supplementary food; (2) this microcosm system is reliable and easy to use for environmental toxicity tests with *C. gigas* spat; (3) such microcosm systems can also be run in a laboratory water bath instead of more technically difficult immersed field experiments; (4) the synergistic effect observed here, at a concentration simulating a peak agricultural runoff event, suggests that the impacts of pesticides could be a real threat for oysters in estuarine areas.

Keywords Microcosm · Oyster · Toxicity · Pesticide · Bentazon · Epoxiconazole

S. Stachowski-Haberkorn · D. de la Broise (✉)
Lumaq, Université de Bretagne Occidentale,
6 rue de l'université, Quimper 29334, France
e-mail: denis.de-labroise@univ-brest.fr

F. Quiniou
Département Biogéochimie et Ecotoxicologie, IFREMER-Centre de Brest, BP 70, Plouzane 29280, France

M. Nedelec
Agrocampus site de Beg-Meil, La Cale, Beg-Meil, Fouesnant 29170, France

R. Robert
Laboratoire de Physiologie des Invertébrés Marins, IFREMER, Presqu'île du Vivier, Landunvez 29840, France

G. Limon
Laboratoire Idhesa, Technopôle Brest-Iroise, 120 avenue Alexis de Rochon, BP 52, Plouzane 29280, France

Introduction

Among aquatic organisms, bivalves and, especially, oysters are frequently used as sentinel organisms to assess the toxicity of a large variety of contaminants in marine and estuarine water or sediments. Their sedentary life and filter-feeding behaviour particularly expose them to changes of environmental conditions (salinity, temperature, nutrients, etc.) and to contamination by pollutants. France is the largest producer of oysters in Europe and the fourth largest in the world. Among the 130,000 tons produced per year, about 84% are issued from natural settlement of oyster larvae at metamorphosis (spat) (Girard et al. 2005). Many laboratory studies have been published on the earlier development stages where oyster embryos and larvae were used for toxicity tests with a focus on shape abnormality criteria (His et al. 1999;

Lyons et al. 2002; Geffard et al. 2003, 2004; da Cruz et al. 2007; Losso et al. 2007; Paixão et al. 2007). Other parameters analysed in larval toxicity bioassays include: biochemical biomarkers (Damiens et al. 2004), delays in D-shape development (Nice et al. 2000), contaminant accumulation and metallothionein induction (Geffard et al. 2003), and success of metamorphosis (His et al. 1997). On adult oysters, other parameters have been measured to assess pollutant toxicity: haemocyte activity (Auffret and Oubella 1997; Gagnaire et al. 2004), genetic damage such as aneuploidy (Bouilly et al. 2004, 2007) and effects on down or up-regulation of genes (Tanguy et al. 2005). Accumulation of toxicants has also been monitored in various tissues of adult oysters (Li et al. 1997; Oliver et al. 2001), and histopathological evaluation made of gametogenesis in relation to toxicant exposure (Wintermeyer and Cooper 2007). However, there is a lack of information on spat sensitivity to pollutants currently detected in marine environments, and only a few studies on oyster spat have been reported. Oyster spat provides the ability to work with settled organisms that are easier to handle and less fragile than larvae. Spat thus allows longer exposure periods to toxicants compared with larvae for which tests can only be run for 24 to 72-h periods. Although many studies have demonstrated the toxicity of pollutants, most were done indoors, in controlled conditions. As such laboratory studies do not really simulate the physical and chemical conditions of the natural environment, it should be asked how representative their experimental data are of natural conditions, and thus to what extent we can apply the conclusions of these experiments to natural systems. A few studies have been published on in-situ pollution impact experiments in open systems on larvae (Geffard et al. 2001; Quiniou et al. 2007) and juveniles (Arnold et al. 2004; Bolton-Warberg et al. 2007). Some in-situ studies in open systems were also made on adult oysters (Christl et al. 2004), although many of these only dealt with bioaccumulation (Avery and Dunstan 1996; Amiard-Triquet et al. 1998; Riedel and Valette-Silver 2002; Clara Reboucas do Amaral et al. 2005). One possible complication of in-situ experiments using open systems is that shellfish are exposed to pollutants already found in the local environment in addition to any tested in an experiment. In-situ open systems can be used to test the possible toxicity of chemicals prior to their use, as shown by His et al. (1996) who found no toxic effect of a novel antifouling material on oyster culture. However, such studies imply the experimental pollution of a site with the chemical under test. Other approaches are therefore needed to evaluate the toxicity of xenobiotics in uncontaminated areas, using non-open systems, maintained under conditions as close to natural as possible.

Numerous pollutants can be found in marine environments including: polycyclic aromatic hydrocarbons, gasoline formulations, organophosphates, polychlorinated biphenyls, heavy metals, antifouling paints, and pesticides. Pesticides are widely used throughout the world and often encountered in coastal waters. Herbicides and fungicides can arrive in the sea following spray-drift, leaching or run-off from urban and farming-treated areas. Mixtures of such compounds can result in synergistic, antagonistic, or additive effects, as described by Fernandez-Alba et al. (2001). Banks et al. (2005), for example, suggested synergistic toxicity of atrazine and diazinon on the daphniidae *Ceriodaphnia dubia* at environmentally representative concentrations.

To address the question of pesticide effects on oyster spat exposed in natural conditions, the purposes of this study were:

1. The development and evaluation of an in-situ tool, which could simulate the natural surrounding conditions and allow the maintenance of young and sensitive oyster spat with low mortality and efficient growth.
2. The assessment of the toxic effects of two pesticides, the fungicide epoxiconazole (Opus, BASF) and the herbicide bentazon (Basamaïs, BASF) on *Crassostrea gigas* spat mortality, growth, and organic weight (OW) content.
3. A laboratory trial to determine whether this type of microcosm could be used in indoor experiments under controlled but close to natural conditions.

Materials and methods

To assess the impact of pesticides on oysters, six-week-old spat was maintained in bottles immersed in situ and exposed to Opus and Basamais at 10 or 70 μg l^{-1} (pure active substance), or to a mixture containing each at 10 μg l^{-1}. The final dry weight, ash content, and increase in shell area were evaluated. Spat mortality during the experiment was also assessed by oyster counts at the beginning and end of the experiment. Chlorophyll *a* (Chl *a*) content of the bottles was measured over a two-day period to assess food availability.

Biological material

Production of pediveligers

Diploid oyster spawning was induced at IFREMER experimental hatchery of Argenton (Brittany, France), during the first week of May 2006. Initial D larvae density was 220 larvae ml^{-1}; larvae developed at 25°C in 450 l

tanks with a 50 l h^{-1} throughflow of 5 μm filtered seawater enriched with phytoplankton ad libitum. Nine days after spawning, young umboned larvae were collected by sieving, thinned to 110 larvae ml^{-1}, and maintained for 10 days. Forty million pediveligers were thus obtained.

Preparation of spat plates

To reduce the risk of losing the whole larval batch, it was split into two and settled simultaneously at two sites: the IFREMER experimental hatchery at Argenton and the Agrocampus experimental hatchery at Beg-Meil (Brittany, France). Settlement was achieved in the following manner at each site: 19 days after spawning, 60 sand-papered ivory PVC plates (dimensions: 255-mm length, 28-mm width, 2-mm thickness), were hung in a 200 l larval rearing tank to allow settlement at 20–22°C.

In Argenton, 5 days after the end of the settlement (29 days after spawning), the 60 PVC plates were transferred into a 100-l open water flow tank (50 l h^{-1} renewal), and the spat was fed daily with cultures of *Isochrysis aff. galbana* and *Chaetoceros calcitrans* at a 1:2 ratio. Four days before the beginning of the outdoor experiment, temperature was gradually decreased to 18°C, by 1°C day^{-1}.

In Beg-Meil, the 60 plates were maintained in the 200-l rearing tank at 20°C, with a renewal of 100 l 1 μm filtered sea water every other day, until the beginning of the outdoor experiment. They were fed daily with *Isochrysis aff. galbana* and *Skeletonema costatum*, at a 9:1 ratio.

Six weeks after spawning (14 June 2006), groups of four or six plates, including two or three from each settlement site, were prepared to go in the microcosms. Some oysters were detached from the plates using a razor blade so as to retain animals on a single 150 mm × 28 mm surface (100–800 oysters per plate). The plates were then transported to the experimental site, maintaining damp conditions during transport.

Microcosms

Microcosms consisted of 2.3-l glass bottles filled with 2 l of 200 μm filtered fresh seawater from the surface layer at the field site, enclosed with approximately 300 ml air. Pesticides were added to the appropriate treatment bottles, and spat plates were placed inside (1 plate/bottle) (Fig. 1). Plate dimensions were designed based on bottle height and bottleneck diameter in order to trap plates and avoid any movement. This system limited any damage to oyster spat during experiments. One plate was put in each bottle, the groups of (four or six) plates therefore now corresponded to groups of bottles which were subsequently used as sets of

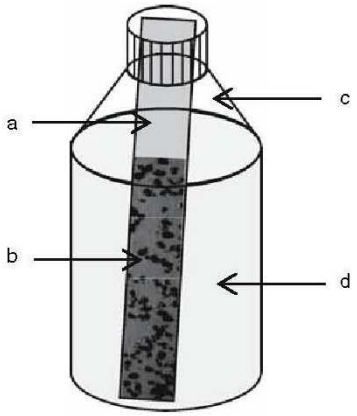


Fig. 1 Scheme of the microcosm. (**a**) PVC plate; (**b**) spat; (**c**) air overlay; (**d**) 200 μm filtered seawater

replicate microcosms for the different treatments. Forty microcosms were prepared: 36 for the outdoor experiment in situ (six controls, and 6 × 5 pesticide tests), and four for the indoor experiment (laboratory control).

Outdoor "in situ" experiment

Microcosms were hung on a 3-m diameter circular stainless steel frame, which could carry 36 bottles. The frame was anchored to the sea floor, on a 400 kg concrete block, and suspended from a surface buoy that allowed the bottles to remain at 6-m depth, regardless of the tide. The frame was located in Port-la-Forêt Bay, south Brittany, France (47°52′12″N, 03°58′35″W). The six replicate microcosm bottles of each treatment were distributed all around the frame.

Every other day (on days 2, 4, 6, 9 and 11), the frame was hauled out of the water. The entire seawater content of each bottle was collected in a tank for proper disposal, and replaced with fresh 200 μm filtered seawater. Pesticides were added to the appropriate treatment microcosms, and the frame was re-immersed. Bottles were finally collected on day 13 for full analysis.

Indoor experiment

On the first day of the experiment, four control microcosms were immersed at 18°C in a thermostat-regulated glass water-bath in the laboratory. In order to simulate underwater light conditions at 5–10-m depth, this tank was placed behind a south-facing window equipped with two filters: a UV filter #3114 and a blue Aquamarine Supergel filter #363, both from Rosco Laboratories (Stamford, CT, USA). The seawater content was changed in the same manner as for the outdoor experiment.

Pesticides

Pesticides tested in this study were commercial formulations of the fungicide epoxiconazole (Opus, BASF) and the herbicide bentazon (Basamaïs, BASF). These pesticides were selected, and their test concentrations defined according to preliminary tests run on *C. gigas* larvae and embryos (unpublished data). Concentrations given represent those of the pure active substances. Pesticide stock solutions (10 mg l^{-1}) were prepared in seawater that had been filtered through a 0.22 µm membrane and autoclaved for 20 min at 121°C. Formulations of the commercial brand products were diluted directly in this seawater and agitated for 48 h using a magnetic stirrer. These solutions were sampled for analysis and immediately frozen. Doses of freshly thawed stock solutions were added directly to microcosm bottles just before immersion. Pesticide concentrations in the microcosms were analysed on pooled water samples from the six replicate bottles of each treatment at the end of the experiment. These samples were kept frozen until analysis.

Pesticide analyses were performed by the Idhesa Laboratory (Brest, France), using on-line solid-phase extraction coupled with liquid chromatography and electrospray ionization-tandem mass spectrometry (Waters 2690 HPLC separation module, Waters 996 photodiode array detector; Micromass Quattro Ultima mass spectrometer). The detection limit was 0.005 µg l^{-1}.

Chlorophyll *a*

In order to assess in-situ microcosm feeding conditions, food availability was evaluated from Chl *a* measurements, first in the surface water used for medium renewal in bottles, and then two days later in the bottles.

Two litres of surface seawater (200 µl filtered) and then 2 l of water from the microcosms were filtered through 0.7-µm GF/F Whatman glass microfibre filters. Filters were stored in the freezer (−24°C) until Chl *a* extraction could be performed. Working in the dark, filters were cut into small pieces and put in 15 ml centrifuge tubes together with 10 ml 90% acetone. Filters were crushed using a glass rod and Chl *a* was extracted overnight at 4°C. Tubes were then centrifuged for 1 min at 2,000*g* before removing the pieces of filter, then centrifuged again for 10 min at 2,000*g*. Chl *a* determination was made on the supernatants using a Perkin-Elmer LS 50B spectrofluorimeter (slit width 2.5 nm; integration time 60 s; excitation/emission wavelengths 432 nm/671 nm). Supernatant fluorescence was measured before and after acidification (10 µl of 0.3 mol l^{-1} HCl) and Chl *a* concentration was calculated using the formula of Aminot and Kerouel (2004):

$$\text{Chl } a\ (\mu g \cdot l^{-1}) = [K * R_{max}/(R_{max} - 1)] * (F^{NA} - F^{A}) * [v/(1000 * V)],$$

where K is the calibration coefficient and R_{max} is the maximum acidification ratio. K and R_{max} were calculated from the fluorimeter calibration procedure. F^{NA} is the non-acidified sample fluorescence, F^{A} is the acidified sample fluorescence, v is the acetone volume (ml) and V is the volume of filtered water (l).

Image analysis of oyster

Photographs of each plate including a measurement scale (Fig. 2) were taken on the first and last day of the experiment using a Lumix Panasonic DMC-FZ20 five-megapixel camera.

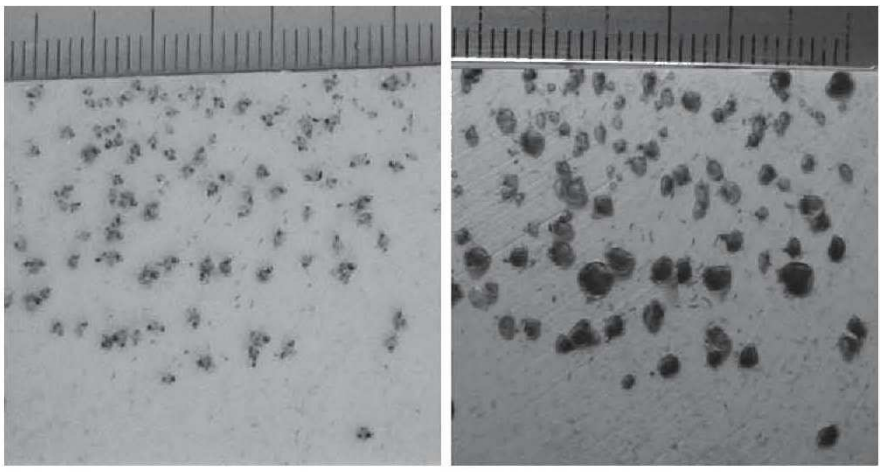


Fig. 2 Partial view of a control plate on the first and last days of the experiment

For mortality assessment, at least 100 oysters per plate were individually compared in the first and last-day photographs. Mortality was defined as the percentage of oyster disappearance or total transparency on the last day of experiment, compared with the first day.

For size measurements, the two longest perpendicular shell widths (l and L) of 50 oysters were measured using Gimp 2 software on photographs taken of each plate on the first day. The same measurements were taken on the same organisms on the last day photographs. For each oyster, the equation $l*L$ was used to obtain two "area indexes" (Ai), for the first and last days of the experiment. For each oyster, the increase of the area index during the experiment was defined as growth (G):

$$G(\%) = [(\mathrm{Ai}_{\mathrm{last\ day}} - \mathrm{Ai}_{\mathrm{first\ day}})/\mathrm{Ai}_{\mathrm{first\ day}}] * 100.$$

Spat OW content

On the last day of the experiment, after taking photographs, the plates were rinsed twice with distilled water and the oysters were collected using a razor blade. Dry weight was measured after 48 h at 60°C, and organic matter was determined by weight loss after 24 h at 450°C in a muffle furnace. OW content was expressed as the OW percentage of the dry weight.

Light measurements

Photosynthetically active radiation (PAR) was measured using the spherical quantum sensor LI-193SA from LI-COR Corporation. In the laboratory, light conditions were compared between the glass tank with the microcosms and outside the laboratory building. In situ, light conditions were measured at the depth of the microcosms and at the sea surface.

Statistical analysis

The first step of our data treatment was to test for significant differences using one-way ANOVA. For this purpose, the data first needed to be tested for homogeneity of variances and normal distributions. Bartlett's test for homogeneity and the Kolmogorov–Smirnov test for normality were applied. As several variables did not fulfil both conditions, the ANOVA test could not be applied. Therefore, following the statistical procedures given in Sokal and Rohlf (1995), a Kruskal–Wallis test was used to test for significant differences in multiple treatment sets, and when the answer was positive, a Mann–Whitney test was run for pairwise comparisons. Statistical tests were performed using Statgraphics Plus v5.1 software.

Results

Food availability

On the 11th day of the experiment, our tests show that the new water put in the microcosms, which came from the surface, contained 2.1 µg l^{-1} Chl a. Chl a in the in-situ controls 2 days later was 1.27 ± 0.15 µg l^{-1} (Fig. 3) (67% remaining), showing that there was still Chl a available.

Oysters in microcosms

At the beginning of the experiment, oysters were six weeks old. Mean shell dimensions of controls (Table 1), ranged from 0.87 to 1.07 mm on the first day and had reached 1.31–1.53 mm by the end of the experiment, showing a 126 ± 4.1% (mean ± SE) Ai increase for controls over the 13-day period.

Mortality observed in controls was 19.5 ± 8.1% (mean ± SE) after 13 days (Fig. 4).

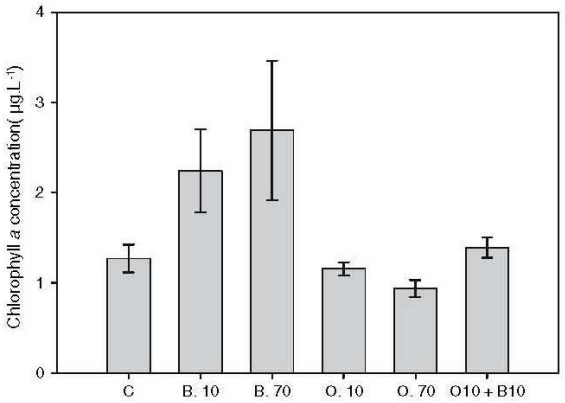


Fig. 3 Chlorophyll a concentration (mean ± SE, µg l^{-1}) in bottles (six replicates) on day 13: *C*, controls; *B. 10*, Basamaïs 10 µg l^{-1}; *B. 70*, Basamaïs 70 µg l^{-1}; *O. 10*, Opus 10 µg l^{-1}; *O. 70*, Opus 70 µg l^{-1}; *O10 + B10*, Opus 10 µg l^{-1} + Basamaïs 10 µg l^{-1}

Table 1 Shell perpendicular lengths (l and L) and area index (Ai) (mean ± SE), of oysters on control plates on the first and last days of the experiment (values are means of 290 oysters on six plates)

	l (mm)	L (mm)	Ai (mm^2)
First day	0.89 ± 0.02	1.05 ± 0.02	1.01 ± 0.03
Thirteenth day	1.33 ± 0.02	1.51 ± 0.02	2.14 ± 0.07

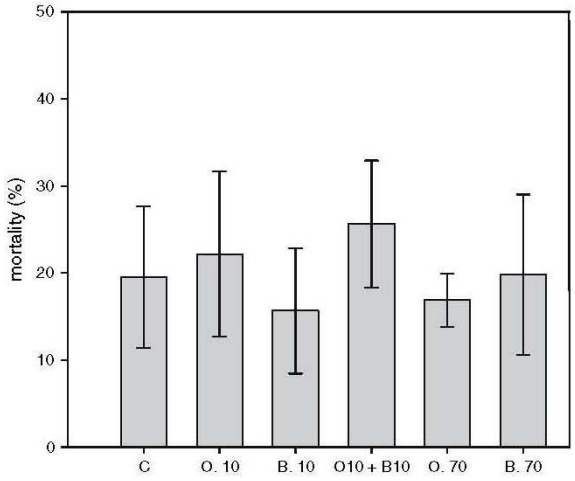


Fig. 4 Oyster spat mortality (mean ± SE) during the experiment (six replicates). *C*, controls; *O. 10*, Opus 10 µg l $^{-1}$; *B. 10*, Basamaïs 10 µg l $^{-1}$; *O10 + B10*, Opus 10 µg l $^{-1}$ + Basamaïs 10 µg l $^{-1}$; *O. 70*, Opus 70 µg l $^{-1}$; *B. 70*, Basamaïs 70 µg l $^{-1}$

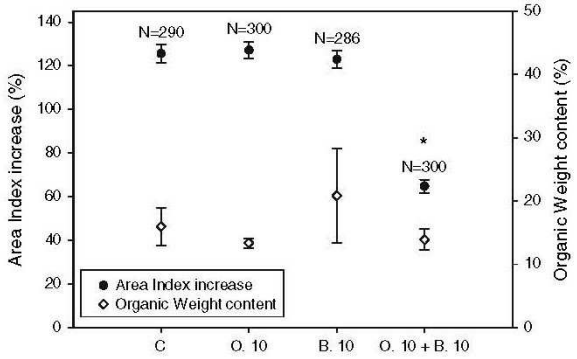


Fig. 5 Oyster spat shell area index increase (mean ± SE, six replicates) and OW content (mean ± SE) after 10 µg l $^{-1}$ pesticide contamination: *C*, controls; *O. 10*, Opus 10 µg l $^{-1}$; *B. 10*, Basamaïs 10 µg l $^{-1}$; *O10 + B10*, Opus 10 µg l $^{-1}$ + Basamaïs 10 µg l $^{-1}$. * A significant difference compared with the control ($P < 0.0001$) and *N* is the number of oysters measured for each treatment

Pesticide effects on oyster spat

Concentrations detected for Basamaïs ranged from 58 to 69% of the nominal amount added, and from 64 to 85% for Opus (Table 2).

Opus and Basamaïs at 10 µg l^{-1} were tested alone and combined in a mixture containing 10 µg l^{-1} of each.

Despite higher Chl *a* mean value for Basamais treatments (Fig. 3), no significant difference among treatments could be demonstrated (Kruskall–Wallis, $P > 0.05$). No significant difference in mortality (Fig. 4) was detected. OW content values (Fig. 5) ranged from 13 to 20.8%, and no significant differences were detected among the treatments (Kruskall–Wallis, $P > 0.05$).

Opus and Basamaïs tested alone resulted in 127 ± 3.9% and 123 ± 4% spat growth, respectively (mean ± SE) (Fig. 5), which is close to the control result (126 ± 4.1%) and therefore showing no evidence of significant differences between treatments (Mann–Whitney, $P > 0.05$). Nevertheless, with 10 µg l^{-1} of each of Opus and Basamaïs combined, growth was reduced by almost half (65 ± 3%). This highly significant reduction in growth (Mann–Whitney, $P < 0.0001$) suggests a synergistic effect.

As size increase was evaluated individually, we were able to draw an area index increase distribution bar chart for the combined Opus and Basamaïs treatment (Fig. 6). The shape of the bar chart appears similar to that of the controls, but the distribution is significantly different and exhibits lower values (Kolmogorov–Smirnov, $P < 0.05$). This result suggests that the combination of these two pesticides affects oysters by reducing growth of the whole population.

Both pesticides were also tested at the higher concentration of 70 µg l^{-1} (Fig. 7).

Growth of spat exposed to 70 µg l^{-1} of Basamaïs was slightly lower than in the controls (108 ± 4.5%) (Mann–Whitney, $P = 0.0049$). A highly significantly lower oyster growth (49 ± 2%) was observed when 70 µg l^{-1} Opus was added, which was 2.5 times lower than for the controls (126 ± 4.1%) (Mann–Whitney, $P < 0.0001$). In the Opus 70 µg l^{-1} treatment, the growth distribution (Fig. 8) was significantly different from the controls (Kolmogorov–Smirnov $P < 0.05$) and the shape was narrower: no

Table 2 Pesticide concentration added and detected in microcosms and seawater

	Surface water	Outdoor controls	Basamaïs 70 µg l $^{-1}$ added	Basamaïs 10 µg l $^{-1}$ added	Opus 70 µg l $^{-1}$ added	Opus 10 µg l $^{-1}$ added	Basamaïs + Opus 10 + 10 µg l $^{-1}$ added	Laboratory controls
Detected epoxiconazole (µg l $^{-1}$)	ND	ND	ND	ND	44.55	8.69	8.29	ND
Detected bentazone (µg l $^{-1}$)	ND	ND	45.76	7.04	ND	ND	6.84	ND

ND not detected (<0.005 µg l $^{-1}$). Basamaïs concentration in µg l $^{-1}$ bentazone, Opus concentration in µg l $^{-1}$ epoxiconazole

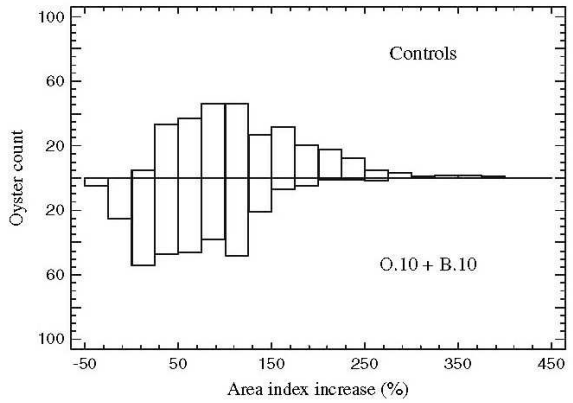


Fig. 6 Comparison of area index increase distributions established for controls and Opus 10 µg l $^{-1}$ + Basamaïs 10 µg l $^{-1}$ treatment

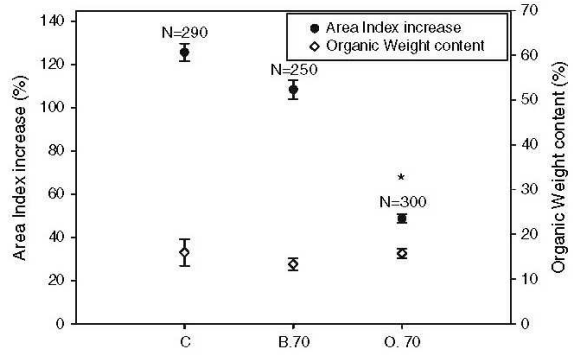


Fig. 7 Oyster spat area index increase (mean ± SE) and OW content (mean ± SE) after 70 µg l $^{-1}$ pesticide treatments (six replicates). *C*, controls; *B. 70*, Basamaïs 70 µg l $^{-1}$; *O. 70*, Opus 70 µg l $^{-1}$. * A significant difference compared with controls ($P < 0.0001$) and *N* is the number of oysters measured for each treatment

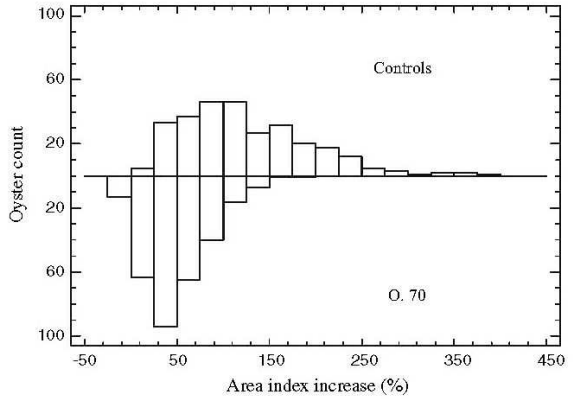


Fig. 8 Comparison of area index increase distribution for controls and Opus 70 µg l $^{-1}$ treatment

individual growth was greater than 150%, leading to a drastic reduction in median growth.

No significant difference in OW was observed among the 70 µg l^{-1} pesticide treatments and controls (Kruskall–Wallis, $P > 0.05$, Fig. 7).

Comparison between in-situ controls and indoor bottles

As such field microcosm experiments are time-consuming and subject to unpredictability of the weather, a simplified protocol was tested where microcosms were maintained in a laboratory water bath under simulated underwater light conditions.

During this indoor microcosms experiment, no significant difference in mortality could be demonstrated compared with outdoor in-situ controls (Mann–Whitney, $P > 0.05$): indoor spat suffered 32.5 ± 14% mortality whereas in-situ control mortality was 19.5 ± 8%. Indoor spat showed growth of 121 ± 5.6% (Fig. 9a), with no

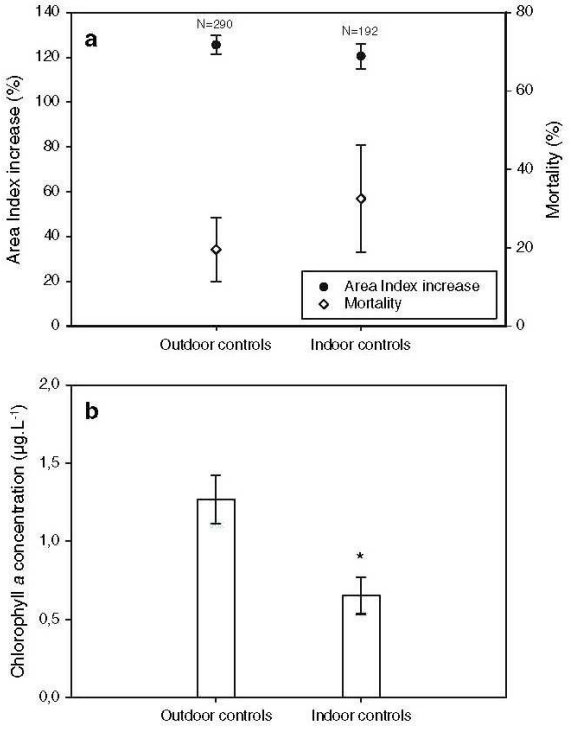


Fig. 9 (**a**) Oyster area index increase (mean ± SE) and mortality (mean ± SE) for spat in outdoor (six replicates) and indoor (four replicates) controls. (**b**) Chlorophyll *a* concentration (µg l $^{-1}$) in bottles on the last day of the experiment (mean ± SE) for outdoor control (six replicates) and indoor control (four replicates). * Significant difference compared with controls ($P < 0.05$)

Table 3 Photosynthetic active radiation ratios measured in sunny and cloudy weather conditions

	Outside/laboratory tank	Outside/underwater
Sunny weather	24	11
Cloudy weather	19	10

Ratios were calculated: (1) between PAR measurements taken outside the laboratory and within the glass tank inside the laboratory, and (2) between the water surface and 6-m depth at the field site

evidence of a significant difference from in-situ controls (126 ± 4.1%) (Mann–Whitney, $P > 0.05$). No difference was observed in OW content (Mann–Whitney, $P > 0.05$), which was 16 ± 3% for in-situ controls and 20.8 ± 6.6% for indoor controls (data not shown).

The mean Chl *a* value (Fig. 9b) observed in laboratory bottles (0.65 ± 0.12 µg l^{-1}) was significantly lower than the value from in-situ control bottles (1.27 ± 0.15 µg l^{-1}) (Mann–Whitney, $P = 0.02$).

The water temperature at the experimental site was 18°C (±1°C) during the experiment. This temperature was applied in the indoor tank to mimic the outdoor conditions.

For both laboratory and in-situ experiments, light intensity was compared between positions close to the microcosms and those outside these light environments. PAR measurements in the laboratory water bath (Table 3) were more than 20 times lower than just outside the laboratory. Measurements at 6-m depth under water were only approximately ten times lower than those at water surface. This indicates that indoor bottles received half the mean PAR compared with the in-situ field site bottles.

Discussion

Microcosms

The in-situ microcosms used in this study were exposed to natural underwater temperature and light conditions. Natural seawater phytoplankton was the unique nutrient source for these oyster spat. Following preliminary experiments it was decided to totally renew the content of the bottles every other day in order to supply a sufficient amount of phytoplankton. For practical reasons, seawater for renewal was collected in the surface 50 cm. The mixed layer of ocean surface waters is in fact estimated to fluctuate from several meters depth in very calm conditions to 100 m or more in strong wind and wave conditions (Bendtsen et al. 2006; Nilsen and Falck 2006), meaning that the water added to our microcosms can be considered as representative of coastal surface waters surrounding natural oyster populations. An air overlay was also included in our microcosms to simulate gas exchanges occurring in free seawater (de la Broise and Palenik 2007). By measuring Chl *a* at renewal and after 2 days in the microcosms, we showed that the concentration had only decreased from 2.1 to 1.27 µg l^{-1}. This suggests that the renewal rate we used was sufficient to avoid starvation. Brown and MacCausland (2000) showed that food supply, temperature, and salinity were the main factors affecting oyster spat growth and Ponis et al. (2003a) reported a shell length increment of approximately 11% for starved *C. gigas* juveniles in a 4-week feeding trial starting with an initial shell length of 1,400 µm. In the current experiment, the oysters started at an average size of 1,050 µm and showed a 44% length increase within 13 days (Table 1). This result corresponds to a length increase rate eight times higher than that observed by Ponis et al. (2003a), again suggesting that food had not become limiting in our experiment.

Shellfish growth is usually based either on weight (Child and Laing 1998; Laing and Chang 1998; Collet et al. 1999; Brown and Mc Causland 2000; Brown and Robert, 2002), volumetric analysis (Brown and Mc Causland 2000; Brown and Robert 2002), or length measurement of just one side of the oyster (Collet et al. 1999; Brown and Robert 2002; Ponis et al. 2003a, b). However, at this early spat stage, oysters tend to grow unevenly between the axes, and surface area is more representative of their development. Moreover, for studies involving oyster larvae, size measurements are usually made on different individuals sampled at the beginning and at the end of experiments. In our case, the fact that oysters had settled on the plates, and the use of photographs, allowed us to measure the same specimens at different points in time. Thus, we could obtain the individual growth distributions for each treatment, which described the impacts on the population more precisely.

This approach is therefore particularly useful for estimating whether a toxicant acts homogeneously on the whole population.

As larval settlement was carried out at two different locations, this increased the diversity in morphological and physiological states of the oysters and therefore improved the relevance of the results. On the other hand, this undoubtedly induced more variability in the data collected, although it was still possible to detect highly significant differences in growth between treatments.

Considering the early stage of development, their high density on the plates, and possible effects of the change in feeding conditions from hatchery to microcosm, the mortality of control spat was relatively low. Together with the 126% growth observed within 13 days, these data illustrate that the in-situ immersed microcosms tested here allowed oyster spat to be maintained successfully for two weeks in natural temperature, light, and nutrient conditions in an enclosed environment. This microcosm system is thus

relevant for experiments on oyster spat in these environmental conditions, and thus provides a method for running toxicity tests.

Pesticide effects on oyster spat

Pesticide concentrations detected in microcosm samples were lower than the nominal amounts added to the bottles. Similar results were reported by Damiens et al. (2004), who observed an average loss of 55% for carbofuran, and less for malathion. Bouilly et al. (2004) recorded atrazine concentrations in agreement with those expected just after pesticide addition, but a 20% decrease after 24 h. Such results could be explained by pesticide adsorption by the bottle/container walls and/or on the organic matter in seawater.

To assess pesticide toxicity on oyster spat, three parameters were analysed: mortality, OW content, and growth. Mortality and OW content variables were not affected or not sensitive enough to show differences between treatments, whereas growth measurements revealed highly significant differences. The very low *P*-values obtained through the different tests ($P < 0.0001$) indicate that similar results would have been obtained with a much smaller number of measurements. Such analyses could probably be run successfully with either fewer replicates or fewer than 50 oysters measured per plate.

While growth (measured as area index increase) seems to represent a better parameter for toxicity assessment than mortality and OW content, other more precise analyses could also be performed, such as measurement of biomarker levels (acetylcholinesterase activity, thiobarbituric acid reactive substances, glutathione *S*-transferase, and catalase activity) as used by Damiens et al. (2004) and Quiniou et al. (2007). However, shell area index increase is both a simple and reliable method.

Pesticides at a concentration of 10 $\mu g\ l^{-1}$ did not have any significant effect on spat growth when tested alone. However, the combination of 10 $\mu g\ l^{-1}$ of each of Opus and Basamaïs caused a dramatic reduction in growth after exposure for 13 days. As no significant reduction was noticed for Chl *a* in this combined treatment, the hypothesis of the reduction of feed availability acting negatively on oyster growth can be rejected. The combined pesticide effect could be due either to a specific reduction of some distinctive phytoplankton species important for oyster growth, or to a direct effect of pesticides on oyster physiology. Cedergreen et al. (2006) also noticed synergistic effects of mixed esfenvalerate (insecticide) and prochloraz (fungicide) on *Daphnia magna*: the esfenvalerate concentration required to immobilize 50% of the daphnia was reduced from 3 to less than 0.5 $\mu g\ l^{-1}$ when prochloraz was added. Such results highlight the need to further investigate the toxicity threshold of such contaminant combinations in natural conditions.

When higher concentrations (70 $\mu g\ l^{-1}$) were tested, Basamaïs induced a slight growth reduction but Opus strongly reduced growth. This strong negative effect affected a large proportion of the oyster population, as can be seen on the distribution bar chart (Fig. 8). Further studies should be carried out to better characterize mechanisms involved in this Opus toxicity.

Pesticide concentrations encountered in estuarine areas are usually below 1 $\mu g\ l^{-1}$ (Lehotey et al. 1998; Steen et al. 2001; Oros et al. 2003). The 10 $\mu g\ l^{-1}$ values tested here could represent an extreme environmental peak value in such areas. Our result illustrates that pesticide combination, which often occurs in natural environment due to runoff, could possibly seriously damage oyster spat growth in natural areas such as estuaries, and also in hatcheries located in estuarine areas. This suggests that pesticides should not be considered as isolated molecules, but as parts of mixtures involved in complex chemical and biological interactions.

Comparison between in-situ controls and indoor bottles

As in-situ experiments are time-consuming and subject to unpredictable weather, we evaluated a laboratory protocol to simulate the natural environment. A critical element of such indoor experiments, which involve phytoplankton, is the light conditions: it is difficult to mimic in-situ light spectra and intensity fluctuations. Using natural light through specific filters, the microcosms could experience diurnal intensity fluctuations and also the unpredictable fluctuations due to clouds. PAR reduction in the laboratory experiment compared with outside was greater than for the in-situ reduction between PAR at the depth of the microcosms and the surface. Outdoors, the in-situ bottles received double the PAR on average compared with the indoor bottles. This difference in light intensity could explain the differences detected for Chl *a* concentration between laboratory (0.65 $\mu g\ l^{-1}$) and in situ (1.27 $\mu g\ l^{-1}$) bottles on the last day of the experiment. Indeed, it should be noted that the phytoplankton concentration in bottles is not only depleted, due to oyster filtration and small grazers, but also augmented by photosynthetic growth that is highly light-dependant (de la Broise and Palenik 2007). The laboratory microcosms system could be improved by increasing PAR reaching the bottles. However, as the laboratory tank was located just behind a south-facing window, it appears difficult to further increase light intensity. Another possibility would be to increase the water renewal rate up to daily frequency.

Despite this difference between indoor and outdoor conditions, no significant difference could be observed in growth, mortality, or OW content of spat. These results suggest that our indoor microcosm system allows experiments on oyster spat, as an alternative to the outdoor microcosm system.

Conclusion

The enclosed microcosm system presented here, with air overlay, total medium renewal, and exposure to natural temperature and light conditions, led to acceptable oyster spat survival and high growth throughout a 13-day experiment, in in-situ field conditions and in the laboratory. Numerous microcosms can be easily handled simultaneously, which can allow the simultaneous testing of different molecules and concentrations with adequate replication for an objective statistical treatment. Such closed systems could probably be used for ecotoxicity tests with other mollusks.

The analysis of the shell area index increase revealed a synergistic effect of Basamaïs and Opus when present together at 10 $\mu g\ l^{-1}$, a value that simulates a peak environmental concentration in estuarine conditions. This last result illustrates the high sensitivity of *C. gigas* spat to pesticides, and thus the ecological relevance of this developmental stage for toxicity assessment. It also highlights the need for further studies testing sensitivity threshold and dealing with the mechanisms involved in synergistic effects.

Acknowledgements We wish to thank the "Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable", and the "Région Bretagne", who financially supported this research. We thank the Capitainerie de Beg-Meil, city of Fouesnant and Patrick Le Coz for their technical assistance; Xavier Caisey, Pierre Mollo and Christian Mingant who provided assistance with spat settlement; Hansy Haberkorn, Gaël Durand, Geneviève Arzul, Louis Coroller, and Jacques Baron.

References

Amiard-Triquet C, Altmann S, Amiard JC, Ballan-Dufrançais C, Baumard P, Budzinski H, Crouzet C, Garrigues P, His E, Jeantet AY, Menasria R, Mora P, Mouneyrac C, Narbonne JF, Pavillon JF (1998) Fate and effects of micropollutants in the Gironde estuary, France: a multidisciplinary approach. Hydrobiologia 373–374:259–279

Aminot A, Kérouel R (2004) Hydrologie des écosystèmes marins. Paramètres et analyses. Editions Ifremer, Plouzané, pp 172–194

Arnold GL, Luckenbach MW, Unger MA (2004) Runoff from tomato cultivation in the estuarine environment: biological effects of farm management practices. J Exp Mar Biol Ecol 298(2):323–346

Auffret M, Oubella R (1997) Hemocyte aggregation in the oyster *Crassostrea gigas*: in vitro measurement and experimental modulation by xenobiotics. Comp Biochem Physiol 118A(3):705–712

Avery EL, Dunstan RH (1996) The detection of pollutant impact in marine environments: condition index, oxidative DNA damage, and their associations with metal bioaccumulation in the Sydney Rock oyster *Saccostrea commercialis*. Arch Environ Contam Toxicol 31(2):192–198

Banks KE, Turner PK, Wood SH, Matthews C (2005) Increased toxicity to *Ceriodaphnia dubia* in mixtures of atrazine and diazinon at environmentally realistic concentrations. Ecotoxicol Environ Safe 60(1):28–36

Bendtsen J, Gustafsson KE, Petersen JK (2006) Modelling vertical mixing in the surface boundary layer using artificial age tracers. J Mar Syst 60:115–128

Bolton-Warberg M, Coen LD, Weinstein JE (2007) Acute toxicity and acetylcholinesterase inhibition in grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) and oysters (*Crassostrea virginica*) exposed to the organophosphate dichlorvos: laboratory and field studies. Arch Environ Contam Toxicol 52(2):207–216

Bouilly K, McCombie H, Leitão A, Lapègue S (2004) Persistence of atrazine impact on aneuploidy in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. Mar Biol 145(4):699–705

Bouilly K, Bonnard M, Gagnaire B, Renault T, Lapègue S (2007) Impact of diuron on aneuploidy and hemocyte parameters in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Arch Environ Contam Toxicol 52(1):58–63

Brown MR, McCausland MA (2000) Increasing the growth of juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* by supplementary feeding with microalgal and dried diets. Aquac Res 31(8–9):671–682

Brown M, Robert R (2002) Preparation and assessment of microalgal concentrates as feeds for larval and juvenile Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). Aquaculture 207(3–4):289–309

Cedergreen N, Kamper A, Streibig JC (2006) Is prochloraz a potent synergist across aquatic species? A study on bacteria, daphnia, algae and higher plants. Aquat Toxicol 78(3):243–252

Child AR, Laing I (1998) Comparative low temperature tolerance of small juvenile European, *Ostrea edulis L.*, and Pacific oysters, *Crassostrea gigas Thunberg*. Aquac Res 29:103–113

Christl TJ, Pennington P, DeLorenzo M, Karnaky KJ, Scott GI (2004) Effect of multiple atrazine exposure profiles on hemocyte DNA integrity in the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). Bull Environ Contam Toxicol 73(2):404–410

Clara Reboucas do Amaral M, de Freitas Rebelo M, Paulo Machado Torres J, Christian Pfeiffer W (2005) Bioaccumulation and depuration of Zn and Cd in mangrove oysters (*Crassostrea rhizophorae*, Guilding, 1828) transplanted to and from a contaminated tropical coastal lagoon. Mar Environ Res 59(4):277–285

Collet B, Boudry P, Thebault A, Heurtebise S, Morand B, Gerard A (1999) Relationship between pre- and post-metamorphic growth in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). Aquaculture 175(3–4):215–226

da Cruz ACS, Couto BC, Nascimento IA, Pereira SA, Leite MBNL, Bertoletti E, Zagatto P (2007) Estimation of the critical effect level for pollution prevention based on oyster embryonic development toxicity test: the search for reliability. Environ Int 33(4):589–595

Damiens G, His E, Gnassia-Barelli M, Quiniou F, Romeo M (2004) Evaluation of biomarkers in oyster larvae in natural and polluted conditions. Comp Biochem Physiol 138C(2):121–128

de la Broise D, Palenik B (2007) Immersed in-situ microcosms: a tool for the assessment of pollution impact on phytoplankton. J Exp Mar Biol Ecol 341(2):274–281

Fernandez-Alba AR, Guil LH, Lopez GD, Chisti Y (2001) Toxicity of pesticides in wastewater: a comparative assessment of rapid bioassays. Anal Chim Acta 426(2):289–301

Gagnaire B, Thomas-Guyon H, Renault T (2004) In vitro effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes. Fish Shellfish Immunol 16(4):501–512

Geffard O, His E, Budzinski H, Seaman M, Garrigues P (2001) Qualité biologique de l'eau de mer évaluée in situ par le test embryo-larvaire de *Crassostrea gigas* et *Mytilus galloprovincialis*. In situ monitoring of sea water quality with the embryo-larval bioassay of *Crassostrea gigas* and *Mytilus galloprovincialis*. Comptes Rendus de l'Academie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie 324(12):1149–1155

Geffard O, Geffard A, His E, Budzinski H (2003) Assessment of the bioavailability and toxicity of sediment-associated polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals applied to *Crassostrea gigas* embryos and larvae. Mar Pollut Bull 46(4):481–490

Geffard O, His E, Budzinski H, Chiffoleau JF, Coynel A, Etcheber H (2004) Effects of storage method and duration on the toxicity of marine sediments to embryos of *Crassostrea gigas* oysters. Environ Pollut 129(3):457–465

Girard S, Perez-Agundez JA, Miossec L, Czerwinski N (2005) Recensement de la conchyliculture 2001. Cahiers (conchyliculture) n°1. Les productions Agreste, Paris

His E, Beiras R, Quiniou F, Parr ACS, Smith MJ, Cowling MJ, Hodgkiess T (1996) The non-toxic effects of a novel antifouling material on oyster culture. Water Res 30(11):2822–2825

His E, Budzinski H, Geffard O, Beiras R (1997) Action d'un sédiment pollué par les hydrocarbures sur la métamorphose de l'huître japonaise, *Crassostrea gigas* (Thunberg). Effects of a hydrocarbon-polluted sediment on *Crassostrea gigas* (Thunberg) metamorphosis. Comptes Rendus de l'Academie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie 320(10):797–803

His E, Heyvang I, Geffard O, de Montaudouin X (1999) A comparison between oyster (*Crassostrea gigas*) and sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larval bioassays for toxicological studies. Water Res 33(7):1706–1718

Laing I, Chang RM (1998) Hatchery cultivation of Pacific oyster juveniles using algae produced in outdoor bloom-tanks. Aquac Int 6(4):303–315

Lehotey SJ, Harman-Fetcho JA, McConnell LL (1998) Agricultural pesticide residues in oysters and water from two Chesapeake bay tributaries. Mar Pollut Bull 37(1–2):32–34

Li Q, Osada M, Takahashi K, Matsutani T, Mori K (1997) Accumulation and depuration of tributyltin oxide and its effect on the fertilization and embryonic development in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Bull Environ Contam Toxicol 58(3):489–496

Losso C, Novelli AA, Picone M, Marchetto D, Pantani C, Ghetti PF, Ghirardini AV (2007) Potential role of sulfide and ammonia as confounding factors in elutriate toxicity bioassays with early life stages of sea urchins and bivalves. Ecotox Environ Safe 66(2):252–257

Lyons BP, Pascoe CK, McFadzen IRB (2002) Phototoxicity of pyrene and benzo[*a*]pyrene to embryo-larval stages of the pacific oyster *Crassostrea gigas*. Mar Environ Res 54(3–5):627–631

Nice HE, Thorndyke MC, Morritt D, Steele S, Crane M (2000) Development of *Crassostrea gigas* larvae is affected by 4-nonylphenol. Mar Pollut Bull 40(6):491–496

Nilsen JEO, Falck E (2006) Variations of mixed layer properties in the Norwegian sea for the period 1948–1999. Prog Oceanogr 70:58–90

Oliver LM, Fisher WS, Winstead JT, Hemmer BL, Long ER (2001) Relationships between tissue contaminants and defense-related characteristics of oysters (*Crassostrea virginica*) from five Florida bays. Aquat Toxicol 55(3–4):203–222

Oros DR, Jarman WM, Lowe T, David N, Lowe S, Davis JA (2003) Surveillance for previously unmonitored organic contaminants in the San Francisco estuary. Mar Pollut Bull 46:1102–1110

Paixão JF, Nascimento IA, Pereira SA, Leite MBL, Carvalho GC, Silveira JSC Jr, Reboucas M, Matias GRA, Rodrigues ILP (2007) Estimating the gasoline components and formulations toxicity to microalgae (Tetraselmis chuii) and oyster (Crassostrea rhizophorae) embryos: an approach to minimize environmental pollution risk. Environ Res 103(3):365–374

Ponis E, Robert R, Parisi G (2003a) Nutritional value of fresh and concentrated algal diets for larval and juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). Aquaculture 221(1–4):491–505

Ponis E, Robert R, Parisi G, Tredici M (2003b) Assessment of the performance of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) larvae fed with fresh and preserved Pavlova lutheri concentrates. Aquac Int 11(1):69–79

Quiniou F, Damiens G, Gnassia-Barelli M, Geffard A, Mouneyrac C, Budzinski H, Romeo M (2007) Marine water quality assessment using transplanted oyster larvae. Environ Int 33(1):27–33

Riedel GF, Valette-Silver N (2002) Differences in the bioaccumulation of arsenic by oysters from Southeast coastal US and Chesapeake Bay: environmental versus genetic control. Chemosphere 49(1):27–37

Sokal RR, Rohlf FJ (1995) Biometry: the principles and practice of statistics in biological research, 3rd edn. W. H. Freeman and Co., NY

Steen RJCA, van der Vart J, Hiep M, Van Hattum B, Cofino WP, Brinkman UAT (2001) Gross fluxes and estuarine behaviour of pesticides in the Scheldt Estuary (1995–1997). Environ Pollut 115:65–79

Tanguy A, Boutet I, Laroche J, Moraga D (2005) Molecular identification and expression study of differentially regulated genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in response to pesticide exposure. FEBS J 272(2):390–403

Wintermyer ML, Cooper KR (2007) The development of an aquatic bivalve model: evaluating the toxic effects on gametogenesis following 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (2,3,7,8-TCDD) exposure in the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). Aquat Toxicol 81(1):10–26

3.2. Synthèse

L'étude décrite dans cet article avait pour but d'exposer du naissain d'huître creuse *Crassostrea gigas*, à deux pesticides, l'herbicide bentazone (Basamaïs) et le fongicide époxiconazole (Opus) en conditions naturelles en microcosmes *in situ*. Le naissain a été exposé *in situ* aux deux pesticides seuls à 10 et 70 µg/L, ainsi qu'à un mélange des deux pesticides, chacun à 10 µg/L. Simultanément, quatre microcosmes témoins étaient maintenus au laboratoire dans un aquarium thermostaté à 18°C (température du milieu au moment de l'expérience) et exposés à la lumière naturelle tamisée.

Afin de garantir au naissain un apport nutritif suffisant, le contenu des microcosmes était renouvelé en totalité tous les deux jours, avec de l'eau du milieu. De cette façon, nous avons obtenu, en 13 jours, une augmentation moyenne de la longueur des coquillages de 44%. Ponis *et al*. (2003), travaillant sur du naissain privé de nourriture, ont observé une croissance du naissain de 11% en quatre semaines d'expérience, soit huit fois moins que dans notre expérience. Cela suggère que nos conditions expérimentales n'étaient pas limitantes en nourriture pour les huîtres.

Étant donné que la croissance du naissain n'est pas forcément équivalente selon les deux axes de la coquille, nous avons choisi de l'évaluer en fonction de l'évolution de la surface des coquilles. Les plaques de tous les microcosmes ont été photographiées au premier et dernier jour de l'expérience, de cette façon nous avons pu mesurer la croissance sur les mêmes organismes au jour 0 et au jour final. De même la mortalité a été évaluée de manière individuelle.

Les conditions expérimentales ont permis d'obtenir pour les témoins *in situ* une mortalité d'environ 20% et une croissance d'environ 126% sur les 13 jours de l'expérience. Ces résultats illustrent qu'il est possible de maintenir du naissain en conditions naturelles de lumière, température et nourriture, sans aboutir à une mortalité massive et avec une croissance très significative, pendant deux semaines. Cela permet de valider l'outil des microcosmes *in situ* pour la réalisation de tests de toxicité en milieu naturel.

Les paramètres de mortalité et contenu en matière organique n'ont pas permis de montrer des différences significatives sur le naissain exposé aux différents traitements de pesticides, par rapport aux témoins. Par contre, l'évaluation de la croissance des coquilles a permis de mettre en évidence des différences très significatives : alors que la croissance du naissain exposé aux pesticides seuls à 10 µg/L est équivalente à celle des témoins, le naissain exposé au mélange des deux pesticides à 10 µg/L a vu sa croissance réduite de moitié. Il s'agit d'un effet synergique des deux pesticides.

La comparaison des témoins *in situ* avec les témoins de laboratoire n'a mis en évidence aucune différence significative pour les paramètres mesurés sur le naissain.

Cette étude visait à étudier les effets de deux pesticides sur des herbivores, en présence de communautés microbiennes naturelles (<200 µm), exposés aux conditions naturelles de l'environnement. La méthodologie proposée a permis le maintien du naissain pendant deux semaines, avec une survie acceptable et une croissance importante. Le système décrit pourrait

être utilisé pour tester tous types de substances sur des organismes juvéniles fixés. Il permet de tester simultanément plusieurs molécules et/ou concentrations, avec un nombre de réplicats suffisant pour une validation statistique des résultats.

Le résultat principal est un effet synergique des deux pesticides sur la croissance du naissain lorsqu'il est exposé à un mélange de 10 µg/L d'Opus et 10 µg/L de Basamaïs. Le protocole appliqué n'avait pas pour objectif de caractériser la cause des effets observés, effets qui pourraient être directs et/ou indirects :

- effet direct du mélange sur la physiologie des huîtres ;
- effet indirect du mélange sur la qualité et/ou la quantité de la communauté phytoplanctonique, source alimentaire du naissain ;

Les éléments à notre disposition ne nous permettent pas de conclure quant à l'origine des effets observés.

L'effet synergique des deux pesticides à 10 µg/L sur la croissance des huîtres soulève la question du seuil de toxicité de ce mélange. En effet, si la concentration appliquée pourrait éventuellement correspondre à un pic ponctuel et exceptionnel de pollution au niveau de l'amont d'un estuaire, elle n'est pas représentative de la pollution couramment détectée au niveau estuarien et côtier. Il aurait été intéressant de tester ce mélange à des concentrations inférieures, afin de déterminer un seuil de toxicité. Même si la réponse des organismes n'est pas forcément linéaire en fonction des concentrations d'exposition, il est très probable que l'effet de réduction de la croissance intervienne pour un mélange de concentrations inférieures à 10 µg/L. Cela pourrait éventuellement représenter un risque pour des organismes soumis aux pollutions lors des épisodes importants de lessivage des sols.

Cette étude illustre que le seuil de toxicité d'un pesticide seul est susceptible d'être modifié en fonction des autres substances présentes dans le milieu. Ainsi, si nous n'avions pas testé le mélange, nous aurions conclu à une absence d'effet de chacun des deux pesticides à 10 µg/L sur la croissance du naissain. Les tests réalisés avec une substance seule peuvent donc, dans certains cas, sous-estimer la toxicité environnementale de la substance. La synergie démontrée dans cet étude n'est pas la seule interaction possible entre pesticides : les effets peuvent aussi être antagonistes ou additifs. Même s'il n'est pas réaliste de tester toutes les substances avec toutes les combinaisons possibles, dans l'environnement naturel les organismes sont exposés à une multitude de molécules. Il serait donc plus pertinent de considérer, pour les études écotoxicologiques, les molécules retrouvées dans le milieu naturel, aux plus fortes concentrations et/ou fréquences, afin de tester leurs impacts en mélange sur divers éléments du réseau trophique.

4. Synthèse générale

Les trois articles présentés ne rapportent qu'une partie des résultats obtenus pendant cette thèse, mais ils décrivent la démarche analytique appliquée aux échantillons et illustrent les traitements appliqués aux données. L'ensemble des expériences réalisées, ainsi que les résultats obtenus sont présentés ci-après sous forme synthétique.

L'un des objectifs de cette thèse était de prendre en compte l'évolution temporelle des assemblages microplanctoniques dans les expériences d'exposition aux pesticides. C'est pourquoi les expériences se sont déroulées de la fin du printemps jusqu'à la fin de l'été (Tableau 6). La possibilité d'extrapolation des résultats obtenus dans ce genre d'études dépend de la représentativité des conditions expérimentales par rapport à l'environnement naturel. Dans certains cas, une comparaison entre les microcosmes témoins et l'eau libre de surface du site expérimental a été réalisée, afin d'évaluer si les communautés confinées montraient une évolution comparable aux fluctuations observées dans l'environnement naturel.

Les concentrations en pesticides doivent également être choisies pour leur représentativité environnementale. En milieu côtier, bien que peu de données soient disponibles concernant les concentrations détectées en pesticides, ceux-ci sont généralement retrouvés à moins d'1 µg/L (Lehotay *et al*., 1999 ; Steen *et al*., 2001 ; Oros *et al*., 2003). En Rade de Brest, seuls le glyphosate et son métabolite l'AMPA ont parfois été détectés à des concentrations proches de 0.5 µg/L. Quelle que soit la substance, on peut considérer que la concentration maximale à ne pas dépasser dans les eaux destinées à la potabilisation, soit 0.1 µg/L, représente une pollution susceptible d'intervenir en milieu côtier. Une concentration d'1 µg/L représente, quant à elle, plus probablement un pic ponctuel de pollution. Des concentrations supérieures ont été testées afin d'obtenir des « témoins positifs d'effets » pour valider les méthodes appliquées à l'analyse de structure des communautés.

Dans le milieu naturel, les communautés ne sont généralement pas exposées à une seule molécule à la fois, mais à des mélanges complexes de substances de plusieurs types, ce qui peut générer des effets additifs, antagonistes ou synergiques. Ces mélanges sont susceptibles d'abaisser les seuils de toxicité des molécules testées, aussi l'évaluation des effets provoqués par les mélanges est primordiale. Cet aspect a été inclus dans une partie des expériences.

De plus, les expositions ont été réalisées à partir de formulations commerciales des pesticides et non avec les substances actives seules. En effet, les adjuvants ajoutés aux substances actives favorisent leur action et en particulier améliorent la pénétration des molécules dans les organismes cibles. Il était donc important de les inclure dans les études d'évaluation de la toxicité, afin de ne pas sous-estimer cette dernière.

4.1. Expériences réalisées

Dix expériences ont été réalisées, dont huit sur le site de Glénan en 2004 et 2005, et deux sur le site de Port-la-Forêt en 2006 (Tableau 6). Les expériences, étalées de juin à septembre, ont duré 8 à 14 jours. Les plus courtes (C et J) ont été stoppées prématurément du fait de mauvaises conditions météorologiques. En particulier, l'expérience J a été arrêtée lorsque les

structures ont été endommagées suite à un coup de vent, ce qui a mis un terme à ces expériences *in situ*.

Lors de ces expériences, les communautés phytoplanctoniques du site de Glénan ont été exposées aux six pesticides, à 0.1 µg/L et 1 µg/L, seuls et en mélange. En 2004, chaque pesticide a seulement été testé à 0.1 µg/L, mais avec 12 réplicats par condition : quatre réplicats étaient prélevés au jour 4 et au jour 8, afin d'obtenir des cinétiques de l'effet des pesticides en s'appuyant sur les analyses par HPLC et cytométrie en flux.

Le faible nombre de réplicats ne permettait pas de conclure efficacement quant aux effets éventuels des pesticides. Nous avons donc décidé, pour les années 2005 et 2006, de ne faire les prélèvements qu'au dernier jour de l'expérience, ce qui nous a permis d'augmenter le nombre de réplicats par condition (cinq ou six en 2005 et 2006) et de tester également les pesticides à 1, 10 et 100 µg/L.

Tableau 6 - Synthèse des expériences réalisées pendant la thèse : site, période et durée. Les chiffres correspondent au nombre de microcosmes testés par pesticide et par concentration. Les couleurs correspondent aux microcosmes exploités dans les articles 1 (vert), 2 (bleu) et 3 (rouge). Les cases grisées correspondent aux conditions n'ayant pas été testées.

						Herbicides				Fongicide	Insecticide	
Année	Site	Concentration (µg/L)	Expérience	Période	Durée (jours)	*Basamais* (Bentazone)	Frontier (Diméthénamide)	Round'up (Glyphosate)	Milagro (Nicosulfuron)	Opus (Epoxiconazole)	Dursban (Chlorpyrifos)	Mélange
2004	Glénan	0,1	A	mi-juin	14	12	12		12		12	
			B	début juillet	14	12	12	12	12		12	12
			C	début août	8	12	12	12	12	12	12	12
			D	mi-septembre	14	12	12	12	12	12	12	12
2005	Glénan	0,1	E	début juin	12	6		6	6			6
			F	fin juin-début juillet	14	6	6	6	6	6	6	6
			G	mi-août	12	6	6	6	6	6	6	6
			H	début septembre	13	6	6		6		6	6
		1	F	fin juin-début juillet	14	6	6	6	6	6	6	6
			G	mi-août	12	6	6	6	6	6	6	6
			H	début septembre	13	6	6	6	6	6	6	6
2006	Port-la-Forêt	1	I	fin juin	13		5			5		
			J	fin juillet-début août	9	5		5	5		5	
		10	I	fin juin	13	6	5			5 + 6		6
			J	fin juillet-début août	9	5		5	5		5	
		70	I	fin juin	13	6				6		
		100	I	fin juin	13		5			5		
			J	fin juillet-début août	9	5		5	5		5	

Les résultats obtenus pour les expériences réalisées en 2004 et 2005 n'ayant pas permis de détecter des effets significatifs des pesticides sur les communautés phytoplanctoniques, il a été décidé d'augmenter les concentrations testées en 2006.

Parmi les huit expériences réalisées au cours de 2004 et 2005, l'expérience A, ayant servi de « rodage », n'a pas été analysée. Les autres ont toutes été analysées par HPLC et certaines par cytométrie en flux. Les critères d'abondance et taille cellulaires (cytométrie), de contenu pigmentaire relatif des populations (chlorophylle et phycoérythrine, en cytométrie) ou communautés (chlorophylles et caroténoïdes, en HPLC), n'ont pas été modifiés de façon significative, par rapport aux témoins (Kruskall-Wallis, $p>0.05$), excepté dans un cas (Expérience F, Dursban, 1 µg/L). Aucune de ces deux méthodes n'a permis de détecter un effet significatif des pesticides en mélange sur les communautés phytoplanctoniques du site de Glénan, aux périodes considérées.

Rappel : lors des analyses pigmentaires, seul un standard de chlorophylle *a* était injecté. C'est donc le seul pigment quantifié. Pour l'interprétation des données, les aires obtenues pour les autres pigments ont été divisées par l'aire de la chl *a*, afin d'obtenir des ratios pigmentaires pour tous les pigments (excepté la chl *a*) de chaque échantillon. Les concentrations en chl *a* obtenues pour chaque traitement ont été comparées aux concentrations dans les témoins, de même pour les ratios de chaque pigment détecté. Les différences détectées sur les ratios ont ensuite été interprétées en fonction des éventuelles variations des concentrations en chl *a*. Dans les tableaux de synthèse présentés ci-après pour chaque pesticide testé, n'apparaissent que les pigments pour lesquels les différences détectées n'étaient pas imputables aux variations de concentration en chl *a*.

Du fait de l'optimisation laborieuse de la TTGE et de la lourdeur de ce type d'analyse, cette méthode n'est devenue effective au laboratoire que fin 2006. Seul un nombre restreint d'échantillons a donc été analysé par cette méthode.

4.2. Herbicides

4.2.1. Basamaïs® (bentazone)

Les dosages de bentazone au premier jour dans les microcosmes contaminés ont révélé des concentrations comprises entre 44% (100 µg/L) et 83% (1 µg/L) de la concentration théoriquement ajoutée. Cette différence peut résulter de phénomènes d'adsorption de la substance aux parois des microcosmes ou à la matière organique présente dans le milieu.

Le Basamaïs a été testé à 0.1 µg/L lors de sept expériences (Tableau 7) sans effets détectés et à 1 µg/L lors de quatre expériences, avec des effets détectés par HPLC et cytométrie dans un cas, sur les communautés de la baie de Port-la-Forêt en 2006 (expérience J). Des effets significatifs ont également été détectés lorsque ces communautés étaient exposées à 10 et 100 µg/L.

La concentration en chl *a* n'a pas été affectée par le Basamaïs à 1 et à 10 µg/L. Les effets provoqués par cet herbicide à 1 et 10 µg/L sont comparables, avec une diminution des ratios pigmentaires sur les mêmes pigments, excepté pour la butfuco qui ne diminue qu'à 1 µg/L. De

même, la cytométrie montre une diminution significative de la concentration des grands eucaryotes à 1 et 10 µg/L.

Les pigments impactés sont caractéristiques de plusieurs classes algales, dont les diatomées, prymnésiophycées, dinoflagellés, raphidophycées, cryptophycées, chlorophycées, prasinophycées et euglénophycées (Jeffrey *et al*., 1997). La diminution des ratios pigmentaires et de l'abondance des grands eucaryotes suggère un effet assez large de l'herbicide sur la communauté phytoplanctonique, dès 1 µg/L. Cet herbicide étant un inhibiteur du photosystème II, il est possible que certaines espèces soient inhibées par une action directe de la substance sur leur physiologie ; cependant, comme les communautés présentes dans les microcosmes sont composées de tous les organismes de taille inférieure à 200 µm, des effets indirects par l'intermédiaire des brouteurs et/ou procaryotes, ne peuvent pas être exclus.

Pour les communautés exposées à 100 µg/L de Basamaïs, les effets détectés diffèrent : seuls deux pigments voient leur ratio diminuer. La zéa est un marqueur des cyanophycées (Jeffrey *et al*., 1997), pourtant l'abondance de *Synechococcus* n'est pas affectée à 100 µg/L. Quant à la diadino, elle est retrouvée dans de nombreuses classes algales. L'abondance des grands eucaryotes n'est pas affectée non plus, mais celle des prasinophycées augmente significativement : elle double par rapport aux témoins. Le Basamaïs pourrait agir sur un ou plusieurs des compartiments présents dans les microcosmes, et induire les effets observés de manière directe ou indirecte. La stimulation observée sur les prasinophycées pourrait résulter de l'occupation par ces dernières d'une niche écologique laissée vacante par d'autres groupes, ou alors d'un effet dopant sur leur physiologie.

Les microcosmes exposés à cet herbicide n'ayant pu être analysés par TTGE, la question des effets détectables sur les empreintes génétiques des communautés reste en suspens. Les résultats obtenus avec ces expériences montrent que le Basamaïs ne semble pas présenter de risque pour les communautés phytoplanctoniques côtières exposées à 0.1 µg/L. Par contre, il est susceptible d'entraîner des effets importants sur ces communautés si elles sont exposées à 1 µg/L, bien que ces effets ne se produisent pas à chaque expérience. Les résultats dépendent probablement de la composition des communautés exposées et/ou des paramètres physico-chimiques de leur milieu. Ces aspects sont toutefois à approfondir. En effet, même si les concentrations en bentazone détectées en Rade de Brest sont inférieures à 0.1 µg/L, il est probable que dans certains cas des communautés phytoplanctoniques puissent être exposées à des concentrations supérieures lors d'épisodes de lessivage important. Il est donc primordial de continuer à étudier cet herbicide afin de mieux caractériser les risques de perturbation des communautés naturelles.

Tableau 7 - Synthèse des résultats obtenus pour le Basamaïs (PED = Pas d'Effet Détecté). Les cases grisées correspondent aux analyses n'ayant pas été réalisées

Concentration µg/L	Expérience	Méthode	Variable	Effet
0,1	B	HPLC		PED
		cytométrie		
	C	HPLC		PED
		cytométrie		
	D	HPLC		PED
		cytométrie		PED
	E	HPLC		PED
		cytométrie		
	F	HPLC		PED
		cytométrie		
	G	HPLC		PED
		cytométrie		PED
	H	HPLC		PED
		cytométrie		
1	F	HPLC		PED
		cytométrie		
	G	HPLC		PED
		cytométrie		PED
	H	HPLC		PED
		cytométrie		
	J	HPLC	Chl c_3, c_2, c_1, butfuco, fuco, néo, hexfuco, diadino	diminution des ratios
		cytométrie	Grands eucaryotes	diminution de la concentration
10	J	HPLC	Chl c_3, c_2, c_1, fuco, néo, hexfuco, diadino	diminution des ratios
		cytométrie	Grands eucaryotes	diminution de la concentration
100	J	HPLC	Diadino, zéa	diminution des ratios
		cytométrie	Prasinophycées	augmentation de la concentration

4.2.2. Frontier® (diméthénamide)

Les dosages de diméthénamide au premier jour dans les microcosmes contaminés ont révélé des concentrations comprises entre 19% (10 µg/L) et 61% (1 µg/L) de la concentration théoriquement ajoutée. Cette différence peut résulter de phénomènes d'adsorption de la substance aux parois des microcosmes ou à la matière organique présente dans le milieu.

Le Frontier testé à 0.1 et 1 µg/L en 2004 et 2005 sur les communautés naturelles du site de Glénan (expériences B à H, Tableau 8) n'a pas provoqué d'effets significatifs détectables avec les méthodes d'analyse utilisées (HPLC expériences B à H, cytométrie en flux expériences D

et G). La TTGE appliquée aux communautés de l'expérience H, exposées à 0.1 µg/L n'a pas permis de montrer des différences dans les empreintes génétiques des communautés procaryotes (16S) et eucaryotes (18S).

Par contre, des effets significatifs ont été détectés, par HPLC seulement, sur les communautés de la baie de Port-la-Forêt en 2006 (expérience I), à 1, 10 et 100 µg/L. La concentration en chl *a* a augmenté dans les trois cas : cette augmentation peut correspondre soit à une augmentation de biomasse des organismes qui ne sont pas détectés en cytométrie (cellules >10 µm et/ou d'abondance relativement basse par rapport au picoplancton), soit à une augmentation du contenu intracellulaire en chl *a*.

Les autres pigments affectés à 1 µg/L sont la butfuco et la viola. La butfuco est retrouvée chez certains prymnésiophycées et dinoflagellés ; la viola est retrouvée chez les chlorophycées, prasinophycées et eustigmatophycées (Jeffrey *et al*., 1997). On peut donc supposer un impact éventuel du Frontier sur certaines de ces classes algales.

Lorsque les communautés sont exposées à 10 et 100 µg/L de Frontier, les pigments impactés sont au nombre de 6 et 8, respectivement : les chlorophylles c_1, c_2, c_3, et la fuco, qui sont communes à plusieurs classes algales, la butfuco et l'hexfuco qui sont présentes chez certaines prymnésiophycées et dinoflagellés (Jeffrey *et al*., 1997). A 100 µg/L, les deux pigments supplémentaires sont la viola, présente chez les chlorophycées, prasinophycées et eustigmatophycées, ainsi que la diadino, commune à plusieurs classes algales (Jeffrey *et al*., 1997).

En conclusion, le Frontier a été testé à 0.1 µg/L lors de six expériences, sans effets détectés, il ne semble donc pas présenter de risque pour les communautés phytoplanctoniques côtières. Les microcosmes exposés à cet herbicide n'ayant pu être analysés par TTGE, sauf dans un cas, la question des effets sur la structure génétique des communautés reste en suspens.

Cet herbicide a un impact sur la composition pigmentaire des communautés phytoplanctoniques, à partir de 1 µg/L. Les données ne permettent pas de savoir si cet effet concerne des classes particulières ou s'il est plus global, car beaucoup de pigments sont présents dans plusieurs classes. Il peut s'agir d'effets directs sur certains taxons, ou d'effets indirects liés éventuellement à une modification de la pression de prédation, des relations de compétition ou des sources de nutriments. Sur les quatre expériences d'exposition à 1 µg/L, une seule a montré des effets significatifs de l'herbicide. Cette piste mérite donc aussi d'être approfondie, comme dans le cas du Basamaïs et pour les mêmes raisons, même si les effets semblent moins importants.

Tableau 8 - Synthèse des résultats obtenus pour le Frontier (PED = Pas d'Effet Détecté). Les cases grisées correspondent aux analyses n'ayant pas été réalisées

Concentration µg/L	Expérience	Méthode	Variable	Effet
0,1	B	HPLC		PED
		cytométrie		
		TTGE		
	C	HPLC		PED
		cytométrie		
		TTGE		
	D	HPLC		PED
		cytométrie		PED
		TTGE		
	F	HPLC		PED
		cytométrie		
		TTGE		
	G	HPLC		PED
		cytométrie		PED
		TTGE		
	H	HPLC		PED
		cytométrie		
		TTGE	16S	PED
			18S	PED
1	F	HPLC		PED
		cytométrie		
		TTGE		
	G	HPLC		PED
		cytométrie		PED
		TTGE		
	H	HPLC		PED
		cytométrie		
		TTGE		
	I	HPLC	Butfuco, viola	diminution des ratios
			Chl *a*	augmentation de la concentration
		cytométrie		PED
		TTGE		
10	I	HPLC	Chl $c_{3,}$ c_2, c_1, butfuco, fuco, hexfuco	diminution des ratios
			Chl *a*	augmentation de la concentration
		cytométrie		PED
		TTGE		
100	I	HPLC	Chl $c_{3,}$ c_2, c_1, butfuco, fuco, viola, hexfuco, diadino	diminution des ratios
			Chl *a*	augmentation de la concentration
		cytométrie		PED
		TTGE		

4.2.3. Roundup® (glyphosate)

Le Roundup testé à 0.1 et 1 µg/L en 2004 et 2005 sur les communautés naturelles du site de Glénan (expériences B à H, Tableau 9) n'a pas provoqué d'effets significatifs détectables avec les méthodes d'analyse utilisées (HPLC expériences B à H, cytométrie en flux expériences D et G).

Un effet significatif du Roundup a été démontré par TTGE sur les empreintes génétiques des communautés exposées à 1 et 10 µg/L lors de l'expérience J, avec à 10 µg/L une augmentation significative de l'abondance des prasinophycées détectée par cytométrie en flux. Cette augmentation était suspectée dès 1 µg/L ($p = 0.06$). Ces résultats sont discutés en détail dans l'article 2 – Impact of Roundup on the marine microbial community, as shown by an in situ experiment.

Lorsque les communautés ont été exposées à 100 µg/L de Roundup, des différences significatives ont été détectées par HPLC et cytométrie en flux. La concentration en chl *a* a augmenté, ainsi que le ratio de la chl c_1, alors que les ratios de chl *b* et hexfuco ont diminué. Cela peut traduire un effet sur les chlorophycées, prasinophycées et euglénophycées, dont la chl *b* est un marqueur ; mais aussi sur les prymnésiophycées et certains dinoflagellés dont l'hexfuco est un marqueur (Jeffrey *et al.*, 1997). La cytométrie en flux révèle des effets sur l'abondance des prasinophycées, qui diminuent par opposition à leur augmentation observée à 10 µg/L. Le contenu relatif en phycoérythrine des populations de prasinophycées, grands eucaryotes et *Synechococcus* est augmenté, alors que le contenu relatif de *Synechococcus* en chlorophylle est diminué. L'analyse de ces échantillons par TTGE n'a pas pu être réalisée.

Le Roundup à 100 µg/L semble perturber les communautés phytoplanctoniques, au niveau du contenu pigmentaire et de l'abondance de certains taxons. Mais les effets provoqués par cet herbicide apparaissent dès 1 µg/L sur la composition génétique des communautés procaryotes, effets qui peuvent résulter d'une restructuration de ces communautés, par la modification des relations de compétition. Il peut aussi s'agir d'effets indirects sur les prédateurs eucaryotes hétérotrophes. Cet herbicide représente donc un risque pour les communautés microbiennes au niveau côtier, puisque la concentration ajoutée d'1 µg/L correspond à une concentration mesurée en fin d'expérience de 0.13 µg/L. Or, que ce soit en Rade de Brest ou dans la baie de Marennes-Oléron, des concentrations supérieures y ont déjà été mesurées. Il est donc essentiel de poursuivre les investigations sur cet herbicide, qui est parmi les plus utilisés.

Tableau 9 - Synthèse des résultats obtenus pour le Roundup (PED = Pas d'Effet Détecté). Les cases grisées correspondent aux analyses n'ayant pas été réalisées

Concentration µg/L	Expérience	Méthode	Variable	Effet
0,1	B	HPLC		PED
		cytométrie		
		TTGE		
	C	HPLC		PED
		cytométrie		
		TTGE		
	D	HPLC		PED
		cytométrie		PED
		TTGE		
	E	HPLC		PED
		cytométrie		
		TTGE		
	F	HPLC		PED
		cytométrie		
		TTGE		
	G	HPLC		PED
		cytométrie		PED
		TTGE		
1	F	HPLC		PED
		cytométrie		
		TTGE		
	G	HPLC		PED
		cytométrie		PED
		TTGE		
	H	HPLC		PED
		cytométrie		
		TTGE		
	J	HPLC		PED
		cytométrie		PED
		TTGE	16S	empreintes génétiques différentes
			18S	PED
10	J	HPLC		PED
		cytométrie	Prasinophycées	augmentation de la concentration
		TTGE	16S	empreintes génétiques différentes
			18S	PED
100	J	HPLC	Chl *a*	augmentation de la concentration
			Chl c_1	augmentation du ratio
			Hexfuco, chl *b*	diminution du ratio
		cytométrie	Grands eucaryotes	augmentation de la phycoérythrine
			Prasinophycées	diminution de la concentration
				augmentation de la phycoérythrine
			Synechococcus	augmentation de la chlorophylle
				augmentation de la phycoérythrine
		TTGE		

4.2.4. Milagro® (nicosulfuron)

Les dosages de nicosulfuron au premier jour dans les microcosmes contaminés ont révélé des concentrations comprises entre 98% (1 µg/L) et 140% (100 µg/L) de la concentration théoriquement ajoutée. Il y a probablement eu un problème lors de la préparation des aliquots distribués aux microcosmes contaminés.

Le Milagro a été testé à 0.1 µg/L lors de sept expériences en 2004 et 2005 (Tableau 10) et à 1 µg/L lors de quatre expériences en 2005 et 2006. Aucune de ces expériences n'a conduit à mettre en évidence des effets de l'herbicide sur les communautés phytoplanctoniques analysées par HPLC (expériences B à J) et cytométrie en flux (expériences D, G et J). De même, aucun effet n'a été détecté à 10 µg/L.

Les seuls effets détectés à 100 µg/L correspondent à l'augmentation du ratio pigmentaire de la péridinine (marqueur de dinoflagellés, Jeffrey *et al*., 1997) et la diminution de celui de la zéa (marqueur de cyanophycées, Jeffrey *et al*., 1997). On peut donc penser à un éventuel impact de l'herbicide sur ces deux groupes.

Étant donné que les microcosmes exposés au Milagro n'ont pas pu être analysés par TTGE, on ne sait pas si l'herbicide a un effet sur les empreintes génétiques des communautés eucaryotes et procayotes. Toutefois, le Milagro semble relativement peu toxique pour les communautés phytoplanctoniques dans les conditions des expériences, comparé aux trois autres herbicides testés.

Tableau 10 - Synthèse des résultats obtenus pour le Milagro (PED = Pas d'Effet Détecté). Les cases grisées correspondent aux analyses n'ayant pas été réalisées

Concentration µg/L	Expérience	Méthode	Variable	Effet
0,1	B	HPLC		PED
		cytométrie		
	C	HPLC		PED
		cytométrie		
	D	HPLC		PED
		cytométrie		PED
	E	HPLC		PED
		cytométrie		
	F	HPLC		PED
		cytométrie		
	G	HPLC		PED
		cytométrie		PED
	H	HPLC		PED
		cytométrie		
1	F	HPLC		PED
		cytométrie		
	G	HPLC		PED
		cytométrie		PED
	H	HPLC		PED
		cytométrie		
	J	HPLC		PED
		cytométrie		PED
10	J	HPLC		PED
		cytométrie		PED
100	J	HPLC	Périd	augmentation du ratio
			Zéa	diminution du ratio
		cytométrie		PED

4.3. Fongicide : Opus® (époxiconazole)

L'Opus a été testé à quatre reprises à 0.1 µg/L en 2004-2005 (C, D, F, G) et à quatre reprises à 1 µg/L en 2005-2006 (F, G, H, I), sans provoquer d'effets détectables avec les analyses réalisées (Tableau 11).

Les seuls effets détectés à 10 µg/L correspondent à des différences dans les empreintes génétiques des communautés eucaryotes et procaryotes. À 100 µg/L, les trois types d'analyse ont permis de détecter des effets de l'Opus sur les communautés microbiennes. Ces résultats sont discutés en détail dans l'Article 1 – Comparative study of three analysis methods (TTGE, flow cytometry and HPLC) for xenobiotic impact assessment on phytoplankton communities

Cependant, les résultats concernant les différences d'empreintes des communautés procaryotes à 10 et 100 µg/L ne sont pas inclus dans l'article. Ils confirment un effet de l'Opus à 10 µg/L sur plusieurs compartiments de la communauté microbienne, dont les organismes bactériens. Les communautés procaryotes et eucaryotes étant liées par des relations de compétition pour les nutriments, mais aussi de prédation, il est possible que l'Opus perturbe l'un ou l'autre ce ces aspects, voire les deux. Il en va de même à 100 µg/L, avec en plus des effets sur la communauté phytoplanctonique, qui se traduisent par la modification de certains ratio pigmentaires, une chute importante de l'abondance des prasinophycées et l'augmentation de l'abondance de *Synechococcus*.

L'Opus perturbe donc les composants procaryotes et eucaryotes des communautés microbiennes, dès 10 µg/L, avec un effet massif à 100 µg/L. Toutefois, ce fongicide ne semble pas représenter un risque pour les communautés microbiennes au niveau côtier à des concentrations réalistes du point de vue environnemental. Néanmoins, sa capacité à agir en synergie à 10 µg/L avec le Basamaïs sur le naissain d'huîtres mérite d'être étudiée plus en détails. Des expériences pourraient être réalisées en milieu estuarien, à des concentrations inférieures et en analysant aussi les structures des communautés microbiennes.

Tableau 11 - Synthèse des résultats obtenus pour l'Opus (PED = Pas d'Effet Détecté). Les cases grisées correspondent aux analyses n'ayant pas été réalisées

Concentration µg/L	Expérience	Méthode	Variable	Effet
0,1	C	HPLC		PED
		cytométrie		
		TTGE		
	D	HPLC		PED
		cytométrie		PED
		TTGE		
	F	HPLC		PED
		cytométrie		
		TTGE		
	G	HPLC		PED
		cytométrie		PED
		TTGE		
1	F	HPLC		PED
		cytométrie		
		TTGE		
	G	HPLC		PED
		cytométrie		PED
		TTGE		
	H	HPLC		PED
		cytométrie		
		TTGE	16S	PED
			18S	PED
	I	HPLC		PED
		cytométrie		PED
		TTGE	16S	PED
			18S	PED
10	I	HPLC		PED
		cytométrie		PED
		TTGE	16S	empreintes génétiques différentes
			18S	empreintes génétiques différentes
100	I	HPLC	Chl c_3, MV Chl c_3, hexfuco	augmentation des ratios
			chl *a*	augmentation de la concentration
			Chl c_1	diminution du ratio
		cytométrie	Prasinophycées	diminution de la concentration
			Synechococcus	augmentation de la concentration
		TTGE	16S	empreintes génétiques différentes
			18S	empreintes génétiques différentes

4.4. Insecticide : Dursban 4® (chlorpyrifos)

Les dosages de chlorpyrifos au premier jour dans les microcosmes contaminés ont révélé des concentrations comprises entre 22% (100 µg/L) et 54% (10 µg/L) de la concentration théoriquement ajoutée. Cette différence peut résulter de phénomènes d'adsorption de la substance aux parois des microcosmes ou à la matière organique présente dans le milieu.

Le Dursban 4 a été testé à six reprises à 0.1 µg/L en 2004-2005 et à quatre reprises à 1 µg/L en 2005-2006 (Tableau 12). Aucun effet n'a été détecté sur les communautés phytoplanctoniques à 0.1, 1 et 10 µg/L, excepté la diminution de trois ratios pigmentaires sur les communautés exposées à 1 µg/L lors de l'expérience F sur le site de Glénan. Ces trois pigments sont retrouvés chez les prymnésiophycées et dinoflagellés, on peut donc supposer un impact sur ces deux groupes. Cette expérience a été analysée uniquement par HPLC.

Chez les communautés exposées à 100 µg/L, une augmentation du contenu relatif en phycoérythrine des grands eucaryotes a été mise en évidence, ainsi qu'une différence dans les empreintes génétiques des communautés eucaryotes. L'insecticide pourrait agir directement sur les eucaryotes hétérotrophes brouteurs, ce qui pourrait modifier la pression de prédation sur les eucaryotes autotrophes et entraîner un changement de composition de la communauté autotrophe, éventuellement au profit d'espèces au contenu cellulaire en phycoérythrine plus important. Il se peut aussi que l'insecticide agisse directement sur la physiologie de certaines algues.

Même si aucun effet du Dursban n'a été montré à 10µg/L, des effets ont été détectés sur les communautés phytoplanctoniques exposées à 1 µg/L lors d'une expérience sur 4. La question du risque envrionnemental pour les communautés reste donc posée et mériterait d'être approfondie afin de lever toute suspicion sur la toxicité de cette formulation.

Tableau 12 - Synthèse des résultats obtenus pour le Dursban (PED = Pas d'Effet Détecté). Les cases grisées correspondent aux analyses n'ayant pas été réalisées.

Concentration µg/L	Expérience	Méthode	Variable	Effet
0,1	B	HPLC		PED
		cytométrie		
		TTGE		
	C	HPLC		PED
		cytométrie		
		TTGE		
	D	HPLC		PED
		cytométrie		PED
		TTGE		
	F	HPLC		PED
		cytométrie		
		TTGE		
	G	HPLC		PED
		cytométrie		PED
		TTGE		
	H	HPLC		PED
		cytométrie		
		TTGE		
1	F	HPLC	Chl c_3, butfuco, hexfuco	diminution des ratios
		cytométrie		
		TTGE		
	G	HPLC		PED
		cytométrie		PED
		TTGE		
	H	HPLC		PED
		cytométrie		
		TTGE		
	J	HPLC		PED
		cytométrie		PED
		TTGE		
10	J	HPLC		PED
		cytométrie		PED
		TTGE		
100	J	HPLC		PED
		cytométrie	Grands eucaryotes	augmentation de la phycoérythrine
		TTGE	16S	PED
			18S	empreintes génétiques différentes

4.5. Discussion générale

Sur les six pesticides testés sur les communautés microbiennes, quatre d'entre eux ont révélé des effets à 1 µg/L de substance active : les trois herbicides Basamaïs, Frontier et Roundup, ainsi que l'insecticide Dursban 4. Ces quatre formulations sont donc susceptibles de modifier les communautés microbiennes en cas d'épisodes de lessivages importants.

Pour les trois herbicides, seule une expérience sur les quatre réalisées à 1 µg/L a permis de détecter un effet, sur les communautés du site de la baie de Port-la-Forêt uniquement. Cela soulève la question de l'origine des communautés : est-ce que cette différence de comportement des communautés de la baie vis-à-vis des trois herbicides est imputable à l'origine géographique ainsi qu'aux facteurs environnants ? Est-ce que le même résultat aurait été obtenu si les expériences avaient été réalisées sur le site de Glénan en 2006 ? La seule manière d'évaluer l'influence du site sur les résultats, aurait été de réaliser la même expérience en parallèle sur les deux sites. Ce phénomène illustre la variabilité de réponse des communautés exposées à un contaminant, comme cela avait été relevé par Bérard *et al.* (1999b).

Les mélanges de formulations (chacune à 0.1 µg/L, ou chacune à 1 µg/L) ont été testés sept fois à 0.1 µg/L en 2004-2005, et trois fois à 1 µg/L en 2005, sans que les méthodes d'analyses appliquées ne permettent de détecter des effets sur les communautés. Cela n'est pas surprenant, étant donné que les formulations testées individuellement au même moment n'ont pas permis la mise en évidence d'effets, excepté pour le Dursban (expérience F, 1 µg/L). Il ne semble donc pas y avoir d'effets de synergie des pesticides à 0.1 ou 1 µg/L dans les conditions des expériences. Cependant, les mélanges n'ont pas été testés en 2006 dans la baie de Port-la-Forêt, on peut donc se demander si, comme pour les trois herbicides cités plus haut, des effets provoqués par les mélanges auraient pu être visibles à ce moment-là. La problématique des mélanges est certes extrêmement complexe à expérimenter, doser et interpréter, mais il faut garder à l'esprit que les communautés sont exposées à des mélanges de substances dans l'environnement. Cet aspect mérite donc d'être poursuivi.

Il était initialement prévu d'appliquer aux échantillons les trois méthodes d'analyse des communautés : HPLC, cytométrie en flux et TTGE. Ces trois analyses ne ciblent pas exactement les mêmes organismes des communautés :

- la TTGE permet de visualiser les communautés eucaryotes et procaryotes dans leur ensemble, incluant aussi bien les organismes autotrophes qu'hétérotrophes, c'est-à-dire les bactéries, le phytoplancton et les brouteurs ;
- l'HPLC permet d'obtenir des empreintes pigmentaires, issues des organismes photosynthétiques eucaryotes et procaryotes ;
- la cytométrie en flux permet de visualiser les populations photosynthétiques d'organismes (eucaryotes et procaryotes) relativement abondants et de taille inférieure à 10 µm.

Seule l'HPLC a pu être appliquée à tous les échantillons. Toutes les expériences n'ont pas pu être analysées par cytométrie en flux par manque de temps. Pour la TTGE, si la majorité des

échantillons n'a pas été analysée par cette méthode, c'est principalement dû aux problèmes de fiabilité du matériel et à la lourdeur de cette analyse.

Lorsque la TTGE a pu être appliquée à des communautés exposées à plusieurs concentrations d'une substance (Roudup, Opus), elle a permis de mettre en évidence des effets sur les empreintes génétiques obtenues à des concentrations pour lesquelles les analyses par HPLC et cytométrie en flux ne révélaient pas d'effets significatifs. C'est donc la TTGE qui donne la vision la plus large des communautés microbiennes. Puisque cette analyse est basée sur la diversité des séquences d'ADN codant pour l'ARNr 16S ou 18S, c'est aussi elle qui donne la vision la plus fine et la plus pécise de ces communautés. C'est probablement pour ces deux raisons que cette analyse permet de détecter des effets avant les deux autres méthodes. Cette méthode offre aussi l'avantage de pouvoir identifier les organismes présents dans les communautés, par le séquençage des bandes d'intérêts. Malheureusement, le manque de temps ne nous a pas permis d'aboutir à cette étape. Nous n'avons donc pas pu identifier les organismes présents dans les communautés eucaryotes et procaryotes et évaluer quels taxons étaient concernés par les modifications induites par les pesticides.

L'HPLC a été appliquée, et les résultats analysés, de façon à pouvoir montrer des différences dans les empreintes pigmentaires des communautés exposées aux pesticides. C'est pourquoi nous avons appliqué un calcul de ratio pigmentaire. Mais il aurait été intéressant de travailler en quantitatif sur les pigments pour lesquels des standards existent. Cela nous aurait permis d'avoir la distribution des concentrations des pigments dans la communauté. Couplée à des analyses microscopiques, cette distribution des pigments aurait pu permettre de corréler les proportions pigmentaires par rapport à la chl *a*, à la présence de certains taxons (Jeffrey *et al.*, 1997). Mais cette approche nécessite une validation par analyse microscopique sur de nombreux échantillons, ce qui n'était pas possible dans notre cas, par manque de taxonomiste et par manque de temps.

La cytométrie en flux a été appliquée uniquement aux populations auto-fluorescentes. Aucun marquage n'a été effectué. Il aurait été intéressant de faire des marquages de l'ADN pour pouvoir analyser aussi les populations bactériennes hétérotrophes, et comparer ainsi les résultats obtenus avec les empreintes génétiques du 16S.

Dans l'absolu, l'idéal serait de reproduire certaines de ces expériences, en incluant les propositions mentionnées ci-dessus, afin de mieux caractériser les impacts des pesticides sur les communautés microbiennes. Il serait aussi intéressant de mieux décrire l'environnement physico-chimique des microcosmes (nutriments, pH, oxygène dissous).

Conclusion générale et perspectives

Des communautés microbiennes naturelles ont été exposées *in situ* à six pesticides en formulations commerciales, à des concentrations de 0.1, 1, 10 et 100 µg/L en équivalents substance active, sur des durées d'une à deux semaines, pendant trois années de début juin à septembre. Les analyses portant sur la structure des communautés nous ont permis de déterminer que :

- aucun effet significatif n'a été détecté sur les communautés microbiennes pour les six pesticides testés à 0.1 µg/L ;
- parmi les quatre herbicides testés, trois d'entre eux (Basamaïs, Frontier et Roundup) ont entraîné des effets sur certaines des communautés microbiennes exposées à 1, 10 et 100 µg/L ;
- l'insecticide Dursban 4 a provoqué un effet sur certaines des communautés phytoplanctoniques exposées à 1 µg/L et 100 µg/L ;
- le fongicide Opus n'a entraîné des effets sur la composition génétique des communautés qu'à partir de 10 µg/L.

En s'appuyant sur ces résultats, nous pouvons conclure que quatre formulations (Basamaïs, Frontier, Roundup et Dursban 4) présentent un risque environnemental lors des pics de pollution dus au lessivage des sols (1 µg/L). Sur la base des communautés microbiennes testées et des analyses réalisées, les formulations peuvent être classées, de la plus toxique à la moins toxique, en fonction du nombre de méthodes ayant montré des effets à 1 puis à 10 µg/L, de la manière suivante :

Basamaïs > Roundup > Frontier > Dursban 4 > Opus > Milagro

C'est donc le Basamaïs qui semble provoquer les effets les plus importants sur les commuanutés exposées à 1 et 10 µg/L. Cependant, au vu des concentrations mesurées en Rade de Brest, la substance qui représente le plus grand risque est probablement le Roundup. Il paraît important de poursuivre les investigations sur les formulations qui entraînent des effets sur les communautés à 1 µg/L.

Même si les effets observés n'ont pas pu être caractérisés précisément, plusieurs hypothèses, éventuellement différentes selon les pesticides, pourraient expliquer les impacts sur les communautés microbiennes :

- un effet sur les brouteurs pourrait conduire à une modification de la compétition trophique dans ce groupe et une modification de la pression de prédation sur les communautés phytoplanctoniques et bactériennes ;
- un effet sur la communauté phytoplanctonique pourrait aussi modifier les relations de compétition pour les nutriments, se répercuter sur les brouteurs et/ou sur le compartiment bactérien ;

– les effets provoqués sur ces organismes impactés, qu'ils soient autotrophes ou hétérotrophes, eucaryotes ou procaryotes, entraîneraient ainsi une modification de la quantité et de la qualité de la matière organique qui transite par les différents éléments de cette boucle microbienne
– un effet direct ou indirect sur cette boucle microbienne pourrait aussi avoir des conséquences sur le développement et l'équilibre des niveaux trophiques supérieurs.

L'outil de microcosmes *in situ* qui a été développé, a aussi été testé sur le naissain d'huître creuse. L'expérience réalisée nous a permis de mettre en évidence un effet de synergie lorsque le naissain était exposé à un mélange de Basamaïs et d'Opus, à 10 µg/L chacun. Même si cette concentration n'est pas réaliste en environnement côtier, la réduction de croissance d'environ 50% sur les coquillages exposés, laisse penser que la synergie pourrait affecter le naissain à une concentration inférieure. Ici encore, l'effet détecté n'est pas forcément direct, mais pose la question des seuils de toxicité considérés, selon que les substances testées sont seules ou en mélange.

Plus généralement, les recherches bibliographiques et expérimentales menées pendant cette thèse montrent qu'en écotoxicologie, les résultats obtenus en termes de concentrations provoquant un effet dépendent de nombreux facteurs, parmi lesquels :

– le système biologique : culture monospécifique, ou bien communautés phytoplanctoniques accompagnées ou non des communautés bactériennes et eucaryotes hétérotrophes ;
– le système expérimental : microcosmes indoor ou outdoor, ouverts ou fermés, avec ou sans renouvellement du milieu, mésocosmes ;
– les outils analytiques : selon qu'ils portent sur les fonctions ou bien sur les structures des communautés, mais également selon leur sensibilité.

Puisque les seuils de toxicité des xénobiotiques testés dépendent notamment des facteurs mentionnés ci-dessus, il convient de se poser les questions suivantes : quelle est la signification d'un seuil de toxicité sorti du contexte dans lequel il a été déterminé ? Dans quelle mesure ces seuils de toxicité sont-ils extrapolables à l'environnement naturel ? Est-ce que toute toxicité ou non-toxicité démontrée a effectivement une signification pour l'écosystème ?

Par précaution, il vaut mieux tenir compte de la plus faible concentration pour laquelle un effet a été démontré. Mais il faut aussi garder à l'esprit que :

– un effet détecté n'est pas obligatoirement durable, et ne perturbera pas forcément l'écosystème ;
– le fait de ne pas détecter d'effet ne signifie pas qu'il n'y a pas d'effet.

De plus, une absence d'effet détecté n'empêche pas une tolérance induite, détectable par la méthode PICT. Les mécanismes à l'origine d'une telle tolérance peuvent correspondre à une souplesse physiologique de certains organismes, mais aussi à des modifications génétiques durables et transmissibles au fil des générations. Dans ce dernier cas, la pression de sélection

appliquée par le contaminant et favorisant certains génômes, ne risque-t-elle pas de réduire le polymorphisme génétique des populations ? Si oui, les populations résultantes conserveront-elles l'adaptabilité environnementale nécessaire à leur survie dans des conditions changeantes ? Et leur maintien parmi des populations à plus fort polymorphisme sera-t-il compromis, au risque de modifier l'équilibre et les successions des assemblages ? Il serait intéressant de développer ces aspects dans une étude plus mécanistique sur la toxicité des pesticides à faible concentration.

Au niveau réglementaire, la méthodologie d'évaluation du risque chimique (E.C., 2003) consiste à déterminer une Concentration Prédite Sans Effet ou PNEC (Predictive No Effect Concentration), en dessous de laquelle la substance considérée n'est pas censée provoquer de dommages à l'environnement. Cette PNEC est calculée à partir d'études d'écotoxicité portant sur plusieurs niveaux trophiques pour lesquels les CE_{50} et/ou NOEC ont été déterminées. Il s'agit en général d'études mettant en œuvre des tests monospécifiques.

En se basant sur les paradigmes de l'évaluation des risques, selon lesquels on considère que protéger les organismes les plus sensibles revient à protéger l'écosystème dans sa structure et ses fonctions, un facteur d'extrapolation (FE) est appliqué à la plus faible des CE_{50} ou NOEC du jeu de données disponibles. Ce facteur d'extrapolation est un coefficient diviseur de la plus faible donnée et varie en fonction de la quantité (nombre de taxons représentés) et de la qualité (toxicité aiguë/chronique, validité des méthodes employées par rapport à des lignes directrices européennes ou internationales) des données. Le principe de son application repose sur la prise en compte d'une certaine imprécision dans les données disponibles, du fait par exemple des variations inter- et intraspécifiques, des variations entre les données de laboratoire et les données de terrain ou encore des variations entre les données d'eau douce et les données d'eau de mer. Ce facteur d'extrapolation est compris entre 10 et 10 000 pour les écosystèmes estuariens, côtiers ou marins. La PNEC est le résultat de la division de la plus faible CE_{50} ou NOEC par le FE. En appliquant ce principe de calcul des PNEC, l'expert tente donc de s'affranchir des sources de variation de la toxicité détectée liées aux systèmes biologiques, expérimentaux et aux techniques analytiques mises en œuvre, de sorte que la PNEC dérivée aille dans le sens du principe de précaution. Malgré cela, en fonction des organismes testés il se pourrait que le facteur maximal (10 000) ne soit pas suffisant, puisque la sensibilité pour une substance peut différer de six ordres de grandeur entre certaines espèces de phytoplancton marin (Nyström *et al.*, 1999). En fait, pour calculer la PNEC, les études les plus utilisées sont celles portant sur des tests monospécifiques standardisés, c'est-à-dire conformes à des lignes directrices ayant fait l'objet d'un consensus international ou européen. Or ces tests ne reposent que sur les critères d'effets les plus classiquement observés, à savoir l'inhibition de la mobilité, l'inhibition de la croissance, les effets sur la reproduction et enfin la mortalité.

Les études en micro- ou mésocosmes réalisées sur des communautés naturelles, permettent de « balayer » un plus large spectre d'espèces, donc de sensibilités. De plus, ces études permettent de se rapprocher de cas réels observés dans l'environnement, en intègrant des variations naturelles telles que certains paramètres physiques, chimiques et/ou biologiques. Malgré tout, les résultats des études sur mésocosmes ne peuvent être utilisés qu'au cas par cas,

et leur interprétation repose sur ce que l'on appelle le « jugement d'expert », aucune ligne directrice n'existant pour ce type de tests.

En déterminant des conditions à respecter lors de ces expérimentations, telles que le nombre de réplicats, le type de communautés incluses dans l'étude, ou encore les variables et méthodes exploitées, il devrait être possible d'aboutir à une PNEC en s'affranchissant de FE trop importants. Cependant, de nombreuses années seront encore nécessaires à l'ébauche d'une standardisation des études en microcosmes.

En attendant, si la réglementation actuelle fournit une base pour l'évaluation du risque que peuvent représenter pour l'environnement les substances chimiques retrouvées dans le milieu, l'amélioration de la réglementation passe notamment par une meilleure connaissance des effets des xénobiotiques sur les systèmes biologiques naturels, à tous les niveaux trophiques. Son évolution doit donc se faire au regard de l'évolution des connaissances et des techniques d'évaluation des effets, parfois susceptibles de remettre en question certaines décisions.

Bibliographie

– A –

Abdel-Hamid, M.I., Källqvist, T., Hessen, D.O., Berge, D., 1996. The use of enclosure experiments to study the effects of pesticides on lake plankton. Lakes Reserv. Res. Manage. 2, 199-209.

Akcha, F., Arzul, G., Rousseau, S., Bardouil, M., 2008. Comet assay in phytoplankton as biomarker of genotoxic effects of environmental pollution. Mar. Environ. Res. 66, 59-61.

Amiard-Triquet, C., Altmann, S., Amiard, J.C., Ballan-Dufrançais, C., Baumard, P., Budzinski, H., Crouzet, C., Garrigues, P., His, E., Jeantet, A.Y., Menasria, R., Mora, P., Mouneyrac, C., Narbonne, J.F., Pavillon, J.F., 1998. Fate and effects of micropollutants in the Gironde estuary, France: a multidisciplinary approach. Hydrobiologia 373-374, 259-279.

Aminot, A., Kérouel, R., 2004. Hydrologie des écosystèmes marins. Paramètres et analyses. Editions Ifremer, Plouzané, France pp 172-194.

Ansotegui, A., Trigueros, J.M., Orive, E., 2001. The Use of Pigment Signatures to Assess Phytoplankton Assemblage Structure in Estuarine Waters. Estuar. Coast. Shelf Sci. 52, 689-703.

Arnold, G.L., Luckenbach, M.W., Unger, M.A., 2004. Runoff from tomato cultivation in the estuarine environment: biological effects of farm management practices. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 298, 323-346.

Arzul, G., Durand, G., 1999. Pollutions diffuses: du bassin versant au littoral. Actes de colloques (Saint-Brieuc, Ploufragan - septembre 1999). Ifremer Brest. pp. 86-94.

Aubertot, J.N., Barbier, J.M., Carpentier, A., Gril, J.J., Guichard, L., Lucas, P., Savary, S., Savini, I., Voltz, M., (éditeurs), 2005. Pesticides, agriculture et environnement. Réduire l'utilisation des pesticides et limiter leurs impacts environnementaux. Expertise scientifique collective, synthèse du rapport, INRA et Cemagref (France), 64 p.

Auffret, M., Oubella, R., 1997. Hemocyte aggregation in the oyster *Crassostrea gigas*: In vitro measurement and experimental modulation by xenobiotics. Comp. Biochem. Physiol. 118A, 705-712.

Avery, E.L., Dunstan, R.H., 1996. The Detection of Pollutant Impact in Marine Environments: Condition Index, Oxidative DNA Damage, and Their Associations with Metal Bioaccumulation in the Sydney Rock Oyster *Saccostrea commercialis*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31, 192-198.

– B –

Banks, K.E., Turner, P.K., Wood, S.H., Matthews C., 2005. Increased toxicity to *Ceriodaphnia dubia* in mixtures of atrazine and diazinon at environmentally realistic concentrations. Ecotox. Environ. Safe. 60, 28-36.

Barry, M.J., Logan, D.C., 1998. The use of temporary pond microcosms for aquatic toxicity testing: direct and indirect effects of endosulfan on community structure. Aquat. Toxicol. 41, 101-124.

Bendtsen, J., Gustafsson, K.E., Petersen, J.K., 2006. Modelling vertical mixing in the surface boundary layer using artificial age tracers. J. Mar. Syst. 60, 115-128.

Bengtson Nash, S.M., Quayle, P.A., Schreiber, U., Muller, J.F., 2005. The selection of a model microalgal species as biomaterial for a novel aquatic phytotoxicity assay. Aquat. Toxicol. 72, 315-326.

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

Bérard, A., Leboulanger, C., Pelte, T., 1999a. Tolerance of *Oscillatoria limnetica* Lemmermann to Atrazine in Natural Phytoplankton Populations and in Pure Culture: Influence of Season and Temperature. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 37, 472-479.

Bérard, A., Pelte, T., Druart, J.C., 1999b. Seasonal variations in the sensitivity of Lake Geneva phytoplankton community structure to atrazine. Arch. Hydrobiol. 145, 277-295.

Bérard, A., Benninghoff, C., 2001. Pollution-induced community tolerance (PICT) and seasonal variations in the sensitivity of phytoplancton to atrazine in nanocosms. Chemosphere 45, 427-437.

Bérard, A., Dorigo, U., Mercier, I., Becker-van Slooten, K., Grandjean, D., Leboulanger, C., 2003. Comparison of the ecotoxicological impact of the triazines Irgarol 1051 and atrazine on microalgal cultures and natural microalgal communities in Lake Geneva. Chemosphere 53, 935-944.

Bernard, L., Schäfer, H., Joux, F., Courties, C., Muyzer, G., Lebaron, P., 2000. Genetic diversity of total, active and culturable marine bacteria in coastal seawater. Aquat. Microb. Ecol. 23, 1-11.

Bolton-Warberg, M., Coen, L.D., Weinstein, J.E., 2007. Acute Toxicity and Acetylcholinesterase Inhibition in Grass Shrimp (*Palaemonetes pugio*) and Oysters (*Crassostrea virginica*) Exposed to the Organophosphate Dichlorvos: Laboratory and Field Studies. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 52, 207-216.

Boudou, A., Ribeyre, F., 1997. Aquatic ecotoxicology: from the ecosystem to the cellular and molecular levels. Environ. Health Perspect. 105, 21-35.

Bouilly, K., Bonnard, M., Gagnaire, B., Renault, T., Lapègue, S., 2007. Impact of Diuron on Aneuploidy and Hemocyte Parameters in Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 52, 58-63.

Bouilly, K., McCombie, H., Leitão, A., Lapègue, S., 2004. Persistence of atrazine impact on aneuploidy in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. Mar. Biol. 145, 699-705.

Brandt, K.K., Jorgensen, N.O.G., Nielsen, T.H., Winding, A., 2004. Microbial community-level toxicity testing of linear alkylbenzene sulfonates in aquatic microcosms. FEMS Microbiol. Ecol. 49, 229-241.

Brown, M.R., McCausland, M.A., 2000. Increasing the growth of juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* by supplementary feeding with microalgal and dried diets. Aquac. Res. 31, 671-682.

Brown, M., Robert, R., 2002. Preparation and assessment of microalgal concentrates as feeds for larval and juvenile Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). Aquaculture 207, 289-309.

Burgeot, T., Gagnaire, B., Renault, T., Haure, J., Moraga, D., David, E., Boutet, I., Sauriau, P.G., Malet, N., Bouchet, V., Le Roux, A., Lapègue, S., Bouilly, K., Le Moullac, G., Arzul, G., Knoery, J., Quiniou, F., Bacher, C., Soletchnik, P., 2007. Summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. The Morest Project. Samain J.F. and McCombie H. (eds). Ed. Ifremer/Quæ, Versailles, France, pp. 107-151.

– C –

Cairns, J. J., 1986. The myth of the most sensitive species. Bioscience 36, 670-672.

Caquet, T., Lagadic, L., Jonot, O., Baturo, W., Kilanda, M., Simon, P., Le Bras, S., Echaubard, M., Ramade, F., 1996. Outdoor Experimental Ponds (Mesocosms) Designed for Long-Term Ecotoxicological Studies in Aquatic Environment. Ecotox. Environ. Safe. 34, 125-133.

Caquet, T., Lagadic, L., Sheffield, S.R., 2000. Mesocosms in ecotoxicology(1): outdoor aquatic systems. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 165, 1-38.

Caquet, T., Lagadic, L., Monod, G., Lacaze, J.-C., Couté, A., 2001. Variability of Physicochemical and Biological Parameters between Replicated Outdoor Freshwater Lentic Mesocosms. Ecotoxicology 10, 51-66.

Cedergreen, N., Kamper, A., Streibig, J.C., 2006. Is prochloraz a potent synergist across aquatic species? A study on bacteria, daphnia, algae and higher plants. Aquat. Toxicol. 78, 243-252.

Chesworth, J. C., Donkin, M. E., Brown, M.T., 2004. The interactive effects of the antifouling herbicides Irgarol 1051 and Diuron on the seagrass Zostera marina (L.). Aquat. Toxicol. 66, 293-305.

Child, A.R., Laing, I., 1998. Comparative low temperature tolerance of small juvenile European, *Ostrea edulis L*., and Pacific oysters, *Crassostrea gigas Thunberg*. Aquac. Res. 29, 103-113.

Chisholm, S.W., Frankel, S.L., Goericke, R., Olson, R.J., Palenik, B., Waterbury, J.B., West-Johnsrud, L., Zettler, E.R., 1992. *Prochlorococcus marinus* nov. gen. nov. sp.: an oxyphototrophic marine prokaryote containing divinyl chlorophyll a and b. Arch. Microbiol. 157, 297-300.

Chrétiennot-Dinet, M.-J., 1990. Atlas du phytoplancton marin, vol. 3, Chlorarachniophycées, Chlorophycées, Chrysophycées, Cryptophycées Euglénophycées, Eustigmatophycées, Prasinophycées, Prymnésiophycées, Rhodophycées et Tribophycées. Éditions du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, 261 pp.

Christl, T.J., Pennington, P., DeLorenzo, M., Karnaky, K.J., Scott, G.I., 2004. Effect of Multiple Atrazine Exposure Profiles on Hemocyte DNA Integrity in the Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 73, 404-410.

Cid, A., Fidalgo, P., Herrero, C., Abalde, J., 1996. Toxic action of copper on the membrane system of a marine diatom measured by flow cytometry. Cytometry 25, 32-36.

Cid, A., Herrero, C., Torres, E., Abalde, J., 1995. Copper toxicity on the marine microalgae *Phaeodactylum tricornutum*: effects on photosynthesis and related parameters. Aquat. Toxicol. 31, 165-174.

Clara Reboucas do Amaral, M., de Freitas Rebelo, M., Paulo Machado Torres, J., Pfeiffer, W., 2005. Bioaccumulation and depuration of Zn and Cd in mangrove oysters (*Crassostrea rhizophorae*, Guilding, 1828) transplanted to and from a contaminated tropical coastal lagoon. Mar. Environ. Res. 59, 277-285.

Clarke, K. R., 1993. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. Austral Ecol. 18, 117-143.

Collet, B., Boudry, P., Thebault, A., Heurtebise, S., Morand, B., Gerard, A., 1999. Relationship between pre- and post-metamorphic growth in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). Aquaculture 175, 215-226.

Collier, J.L., Campbell, L., 1999. Flow cytometry in molecular aquatic ecology. Hydrobiologia 401, 34-54.

Cornejo, P., Azcón-Aguilar, C., Miguel Barea, J., Ferrol, N., 2004. Temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) as a tool for the characterization of arbuscular mycorrhizal fungi. FEMS Microbiol. Lett. 241, 265-270.

Couderchet, M., Schmalfuss, J., Böger, P., 1998. A specific and sensitive assay to quantify the herbicidal activity of chloroacetamides. Pestic. Sci. 52, 381-387.

Cunningham, A., McKee, D., Craig, S., Tarran, G., Widdicombe, C., 2003. Fine-scale variability in phytoplankton community structure and inherent optical properties measured from an autonomous underwater vehicle. J. Mar. Syst. 43, 51-59.

– D –

da Cruz, A.C.S., Couto, B.C., Nascimento, I.A., Pereira, S.A., Leite, M.B.N.L., Bertoletti, E., Zagatto, P., 2007. Estimation of the critical effect level for pollution prevention based on oyster embryonic development toxicity test: The search for reliability. Environ. Int. 33, 589-595.

Dahl, B., Blanck, H., 1996. Pollution-induced community tolerance (PICT) in periphyton communities established under tri-n-butyltin (TBT) stress in marine microcosms. Aquat. Toxicol. 34, 305-325.

Damiens, G., His, E., Gnassia-Barelli, M., Quiniou, F., Romeo, M., 2004. Evaluation of biomarkers in oyster larvae in natural and polluted conditions. Comp. Biochem. Physiol. 138C, 121-128.

de la Broise, D., Palenik, B., 2007. Immersed *in situ* microcosms: A tool for the assessment of pollution impact on phytoplankton. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 341, 274-281.

DeLorenzo, M.E., Scott, G.I., Ross, P.E., 1999a. Effects of the agricultural pesticides atrazine, deethylatrazine, endosulfan, and chlorpyrifos on an estuarine microbial food web. Environ. Toxicol. Chem. 18, 2824-2835.

DeLorenzo, M.E., Lauth, J., Pennington, P.L., Scott, G.I., Ross, P.E., 1999b. Atrazine effects on the microbial food web in tidal creek mesocosms. Aquat. Toxicol. 46, 241-251.

DeLorenzo, M.E., Scott, G.I., Ross, P.E., 2001. Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: a review. Environ. Toxicol. Chem. 20, 84-98.

DeLorenzo, M.E., Leatherbury, M., Weiner, J.A., Lewitus, A.J., Fulton, M.H., 2004. Physiological factors contributing to the species-specific sensitivity of four estuarine microalgal species exposed to the herbicide atrazine. Aquatic Ecosystem Health and Management 7, 137-146.

Devilla, R.A., Brown, M.T., Donkin, M., Readman, J.W., 2005. The effects of a PSII inhibitor on phytoplankton community structure as assessed by HPLC pigment analyses, microscopy and flow cytometry. Aquat. Toxicol. 71, 25-38.

Diez, B., Pedros-Alio, C., Marsh, T.L., Massana, R., 2001. Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) To Study the Diversity of Marine Picoeukaryotic Assemblages and Comparison of DGGE with Other Molecular Techniques. Appl. Environ. Microbiol. 67, 2942-2951.

Doare-Lebrun, E., El Arbi, A., Charlet, M., Guerin, L., Pernelle, J. J., Ogier, J. C., Bouix, M., 2006. Analysis of fungal diversity of grapes by application of temporal temperature gradient gel electrophoresis - potentialities and limits of the method. J. Appl. Microbiol. 101, 1340-1350.

Dorigo, U., Leboulanger, C., 2001. A pulse-amplitude modulated fluorescence-based method for assessing the effects of photosystem II herbicides on freshwater periphyton. J. Appl. Phycol. 13, 509-515.

Dorigo, U., Bourrain, X., Berard, A., Leboulanger, C., 2004. Seasonal changes in the sensitivity of river microalgae to atrazine and isoproturon along a contamination gradient. Sci. Total Environ. 318, 101-114.

Downing, H.F., DeLorenzo, M.E., Fulton, M.H., Scott, G., Madden, C.J., Kucklick, J.R., 2004. Effects of the agricultural pesticides Atrazine, Chlorothalonil, and Endosulfan on south Florida microbial assemblages. Ecotoxicology 13, 245-260.

Drake, J.A., Huxel, G.R., Hewitt, C.L., 1996. Microcosms as models for generating and testing community theory. Ecology 77, 670-677.

– E –

E.C., 2003. Technical Guidance Document on Risk Assessment in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) N° 1488/94 on Risk Assessment for existing substances, Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market. Part II. Chapter 3. Environmental Risk Assessment. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg. 328 p.

Eichner, C.A., Erb, R.W., Timmis, K.N., Wagner-Döbler, I., 1999. Thermal Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Bioprotection from Pollutant Shocks in the Activated Sludge Microbial Community. Appl. Environ. Microbiol. 65, 102-109.

el Fantroussi, S., Verschuere, L., Verstraete, W., Top, E.M., 1999. Effect of Phenylurea Herbicides on Soil Microbial Communities Estimated by Analysis of 16S rRNA Gene Fingerprints and Community-Level Physiological Profiles. Appl. Environ. Microbiol. 65, 982-988.

Estrada, M., Henriksen, P., Gasol, J.M., Casamayor, E.O., Pedros-Alio, C., 2004. Diversity of planktonic photoautotrophic microorganisms along a salinity gradient as depicted by microscopy, flow cytometry, pigment analysis and DNA-based methods. FEMS Microbiol. Ecol. 49, 281-293.

– F –

Fabioux, C., 2004. Origine et développement des cellules germinales chez l'huître creuse Crassostrea gigas : intérêt pour le contrôle de la reproduction en écloserie. Université de Bretagne Occidentale. 219 pp.

FAO Fisheries Department, Fishery Information, Data and Statistics Unit. FISHSTAT Plus: Universal software for fishery statistical time series. Version 2.3. 2000. Aquaculture production 1950-2006.

Farrelly, V., Rainey, F.A., Stackebrandt, E., 1995. Effect of genome size and rrn gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. Appl. Environ. Microbiol. 61, 2798-2801.

Fernandez-Alba, A.R., Guil, L.H., Lopez, G.D., Chisti, Y., 2001. Toxicity of pesticides in wastewater: a comparative assessment of rapid bioassays. Anal. Chim. Acta 426, 289-301.

Forbes, V. E., Forbes, T. L., 1997. Écotoxicologie: Théorie et applications. Paris, INRA Editions, 256 pp.

Freuze, I., Jadas-Hecart, A., Royer, A., Communal, P.Y., 2007. Influence of complexation phenomena with multivalent cations on the analysis of glyphosate and aminomethyl phosphonic acid in water. J. Chromatogr. A 1175, 197-206.

Furuya, K., Hayashi, M., Yabushita, Y., Ishikawa, A., 2003. Phytoplankton dynamics in the East China Sea in spring and summer as revealed by HPLC-derived pigment signatures. Deep Sea Research Part II 50, 367-387.

– G –

Gagnaire, B., Thomas-Guyon, H., Renault, T., 2004. In vitro effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes. Fish Shellfish Immunol. 16, 501-512.

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

Geffard, O., His, E., Budzinski, H., Seaman, M., Garrigues, P., 2001. Qualité biologique de l'eau de mer évaluée *in situ* par le test embryo-larvaire de *Crassostrea gigas* et *Mytilus galloprovincialis*. *In situ* monitoring of sea water quality with the embryo-larval bioassay of *Crassostrea gigas* and *Mytilus galloprovincialis*. Comptes Rendus de l'Academie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie. 324(12): 1149-1155.

Geffard, O., Geffard, A., His E., Budzinski, H., 2003. Assessment of the bioavailability and toxicity of sediment-associated polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals applied to *Crassostrea gigas* embryos and larvae. Mar. Pollut. Bull. 46, 481-490.

Geffard, O., His, E., Budzinski, H., Chiffoleau, J.F., Coynel, A., Etcheber, H., 2004. Effects of storage method and duration on the toxicity of marine sediments to embryos of *Crassostrea gigas* oysters. Environ. Pollut. 129, 457-465.

Giddings, J.M., Eddlemon, G.K., 1979. Some ecological and experimental properties of complex aquatic microcosms. International Journal of Environmental Studies 13, 119-123.

Giesy, J.P., Dobson, S., Solomon, K.R., 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 167, 35-120.

Gillan, D.C., 2004. The effect of an acute copper exposure on the diversity of a microbial community in North Sea sediments as revealed by DGGE analysis-the importance of the protocol. Mar. Pollut. Bull. 49, 504-513.

Girard, S., Perez-Agundez, J.A., Miossec, L., Czerwinski, N., 2005. Recensement de la conchyliculture 2001. Cahiers (conchyliculture) n°1. Les productions Agreste, Paris.

Goericke, R., Repeta, D.J., 1993. Chlorophylls a and b and divinyl chlorophylls a and b in the open subtropical North Atlantic Ocean. Mar. Ecol. Prog. Ser. 101, 307-313.

González-Barreiro, O., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, A., 2006. Removal of triazine herbicides from freshwater systems using photosynthetic microorganisms. Environ. Pollut. 144, 266-271.

Gustavson, K., Wängberg, S.L., 1995. Tolerance induction and succession in microalgae communities exposed to copper and atrazine. Aquat. Toxicol. 32, 283-302.

Gustavson, K., Mohlenberg, F., Schlüter, L., 2003. Effects of exposure duration of herbicides on natural stream periphyton communities and recovery. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 45, 48-58.

– H –

Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. Palaeontologia Electronica 4(1): 9pp. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm

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

Hasle, G.R., 1978. The inverted microscope method. In: Sournia, A. (Ed.), Phytoplankton manual. UNESCO, Paris, pp 88-96.

Hibberd, D.J., 1981. Notes on the taxonomy and nomenclature of the algal classes Eustigmatophyceae and Tribophyceae (synonym Xanthophyceae). Bot. J. Linnean Soc. 82, 93-119.

His, E., Beiras, R., Quiniou, F., Parr, A.C.S., Smith, M.J., Cowling, M.J., Hodgkiess, T. 1996. The non-toxic effects of a novel antifouling material on oyster culture. Water Res. 30, 2822-2825.

His, E., Budzinski, H., Geffard, O., Beiras, R., 1997. Action d'un sédiment pollué par les hydrocarbures sur la métamorphose de l'huître japonaise, *Crassostrea gigas* (Thunberg). Effects of a hydrocarbon-polluted sediment on *Crassostrea gigas* (Thunberg) metamorphosis. Comptes Rendus de l'Academie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie. 320, 797-803.

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

Hoch, T., 1998. Modelling pelagic food web and primary production in the English Channel. Oceanologica acta 21, 871-885.

Hofstraat, J.W., van Zeijl, W.J.M., de Vreeze, M.E.J., Peeters, J.C.H., Peperzak, L., Colijn, F., Rademaker, T.W.M., 1994. Phytoplankton monitoring by flow cytometry. J. Plankton Res. 16, 1197-1224.

Hourmant, A., Amara, A., Pouline, P., Durand, G., Arzul, G., Quiniou, F., 2008. Effect of bentazon ongrowth and physiological responses of marine diatom : Chaetoceros gracilis. Toxicol. Mech. Methods, in press.

– J –

Jeffrey, S.W., Wright, S.W., 1994. Photosynthetic pigments in the Prymnesiophyceae. In: Green, J.C., Leadbeater, B.S.C. (eds), The Haptophyte Algae. Clarendon Press, Oxford, pp. 111-132.

Jeffrey, S.W., Mantoura, R.F.C., Bjørnland, T., 1997. Data for the identification of 47 key phytoplankton pigments. In: Jeffrey, S.W., Mantoura, R.F.C., Wright, S.W., (Eds), Phytoplankton pigments in oceanography, UNESCO, Paris, pp. 447-559.

Jeffrey, S.W., Wright, S.W., Zapata, M., 1999. Recent advances in HPLC pigment analysis of phytoplankton. Mar. Freshwater Res. 50, 879-896.

Jonker, R.R., Meulemans, J.T., Dubelaar, G.B.J., Wilkins, M.F., Ringelberg, J., 1995. Flow cytometry: a powerful tool in analysis of biomass distributions in phytoplankton. Water Sci. Technol. 32, 177-182.

– K –

Kedwards, T.J., Maund, S.J., Chapman, P.F., 1999. Community level analysis of ecotoxicological field studies. II. Replicated-design studies. Environ. Toxicol. Chem. 18, 158-166.

Kostanjšek, R., Lapanje, A., Drobne, D., Nikcevic, S., Perovic, A., Zidar, P., Štrus, J., Hollert, H., Karaman, G., 2005. Bacterial Community Structure Analyses to Assess Pollution of Water and Sediments in the Lake Shkodra/Skadar, Balkan Peninsula. Environ. Sci. & Pollut. Res. 12, 361-368.

Kruskopf, M., Flynn, K.J., 2006. Chlorophyll content and fluorescence responses cannot be used to gauge reliably phytoplankton biomass, nutrient status or growth rate. New Phytol. 169, 525-536.

Kwan Wong, C., Kim Wong, C., 2003. HPLC pigment analysis of marine phytoplankton during a red tide occurrence in Tolo Harbour, Hong Kong. Chemosphere 52, 1633-1640.

– L –

Lage, O.M., Sansonetty, F., O'Connor, J.E., Parente, A.M., 2001. Flow cytometric analysis of chronic and acute toxicity of copper(II) on the marine dinoflagellate *Amphidinium carterae*. Cytometry 44, 226-235.

Laing, I., Chang, R.M., 1998. Hatchery cultivation of Pacific oyster juveniles using algae produced in outdoor bloom-tanks. Aquac. Int. 6, 303-315.

Lampert, L., 2001. Dynamique saisonnière et variabilité pigmentaire des populations phytoplanctoniques dans l'atlantique nord (Golfe de Gascogne), Université de Bretagne occidentale.

Larsen, D.K., Wagner, I., Gustavson, K., Forbes, V.E., Lund, T., 2003. Long-term effect of Sea-Nine on natural coastal phytoplankton communities assessed by pollution induced community tolerance. Aquat. Toxicol. 62, 35-44.

Leboulanger, C., Rimet, F., Hème de Lacotte, M., Bérard, A., 2001. Effects of atrazine and nicosulfuron on freshwater microalgae. Environ. Int. 26, 131-135.

Lehotay, S.J., Harman-Fetcho, J.A., McConnell, L.L., 1998. Agricultural pesticide residues in oysters and water from two Chesapeake bay tributaries. Mar. Pollut. Bull. 37, 32-44.

Li, Q., Osada, M., Takahashi, K., Matsutani, T., Mori, K., 1997. Accumulation and Depuration of Tributyltin Oxide and Its Effect on the Fertilization and Embryonic Development in the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 58, 489-496.

Li, H., Xiao, T., Ding, T., Lu, R., 2006. Effect of the Yellow Sea Cold Water Mass (YSCWM) on distribution of bacterioplankton. Acta Ecologica Sinica 26, 1012-1019.

Losso, C., Novelli, A.A., Picone, M., Marchetto, D., Pantani, C., Ghetti, P.F., Ghirardini, A.V., 2007. Potential role of sulfide and ammonia as confounding factors in elutriate toxicity bioassays with early life stages of sea urchins and bivalves. Ecotox. Environ. Safe. 66, 252-257.

Lozano, S.J., O'Haixoran, S.L., Sargent, K.W., Brazner, J.C., 1992. Effects of esfenvalerate on aquatic organisms in littoral enclosures. Environ. Toxicol. Chem. 11, 35-47.

Lund, J.W.G., Kipling, C., Le Cren, E.D., 1958. The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. Hydrobiologia 11, 143-170.

Lyons, B.P., Pascoe, C.K., McFadzen, I.R.B., 2002. Phototoxicity of pyrene and benzo[a]pyrene to embryo-larval stages of the pacific oyster *Crassostrea gigas*. Mar. Environ. Res. 54, 627-631.

– M –

Ma, J., Liang, W., Xu, L., Wang, S., Wei, Y., Lu, J., 2001. Acute Toxicity of 33 Herbicides to the Green Alga Chlorella pyrenoidosa. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 66, 536-541.

Macedo, R.S., Lombardi, A.T., Omachi, C.Y., Rörig, L.R., 2008. Effects of the herbicide bentazon on growth and photosystem II maximum quantum yield of the marine diatom Skeletonema costatum. Toxicol. Vitro 22, 716-722.

Mackey, D.J., Blanchot, J., Higgins, H.W., Neveux, J., 2002. Phytoplankton abundances and community structure in the equatorial Pacific. Deep-Sea Research Part II 49, 2561-2582.

Marie, D., Brussaard, C., Partensky, F., Vaulot, D., 1999. Flow cytometric analysis of phytoplankton, bacteria and viruses. In: Current Protocols in Cytometry. John Wiley & Sons, Inc. 11.11.1-11.11.15.

Marie, D., Zhu, F., Balagué, V., Ras, J., Vaulot, D., 2006. Eukaryotic picoplankton communities of the Mediterranean Sea in summer assessed by molecular approaches (DGGE, TGGE, QPCR). FEMS Microbiol. Ecol. 55, 403-415.

Massana, R., Jürgens, K., 2003. Composition and population dynamics of planktonic bacteria and bacterivorous flagellates in seawater chemostat cultures. Aquat. Microb. Ecol. 32, 11-22.

Murray, A.E., Hollibaugh, J.T., Orrego, C., 1996. Phylogenetic compositions of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. Appl. Environ. Microbiol. 62, 2676-2680.

Muylaert, K., Gonzales, R., Franck, M., Lionard, M., Van der Zee, C., Cattrijsse, A., Sabbe, K., Chou, L., Vyverman, W., 2006. Spatial variation in phytoplankton dynamics in the Belgian coastal zone of the North Sea studied by microscopy, HPLC-CHEMTAX and underway fluorescence recordings. J. Sea Res. 55, 253-265.

Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 59, 695-700.

Muyzer, G., Smalla, K., 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Antonie van Leeuwenhoek 73, 127-141.

Muyzer, G., 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. Curr. Opin. Microbiol. 2, 317-322.

– N –

Nice, H.E., Thorndyke, M.C., Morritt, D., Steele, S., Crane, M., 2000. Development of *Crassostrea gigas* Larvae is Affected by 4-nonylphenol. Mar. Pollut. Bull. 40, 491-496.

Nieguitsila, A., Deville, M., Jamal, T., Halos, L., Berthelemy, M., Chermette, R., Latouche, S., Arné, P., Guillot, J., 2007. Evaluation of fungal aerosols using Temporal Temperature Gradient Electrophoresis (TTGE) and comparison with culture. J. Microbiol. Methods 70, 86-95.

Nielsen, L.W., Dahllöf, I., 2007. Direct and indirect effects of the herbicides Glyphosate, Bentazone and MCPA on eelgrass (*Zostera marina*). Aquat. Toxicol. 82, 47-54.

Nilsen, J.E.O., Falck, E., 2006. Variations of mixed layer properties in the Norwegian sea for the period 1948-1999. Prog. Oceanogr. 70, 58-90.

Nyström, B., Björnsäter, B., Blanck, H., 1999. Effects of sulfonylurea herbicides on non-target aquatic micro-organisms Growth inhibition of micro-algae and short-term inhibition of adenine and thymidine incorporation in periphyton communities. Aquat. Toxicol. 47, 9-22.

– O –

Obayashi, Y., Tanoue, E., Suzuki, K., Handa, N., Nojiri, Y., Wong, C.S., 2001. Spatial and temporal variabilities of phytoplankton community structure in the northern North Pacific as determined by phytoplankton pigments. Deep Sea Research Part I 48, 439-469.

Ogier, J.-C., Son, O., Gruss, A., Tailliez, P., Delacroix-Buchet, A., 2002. Identification of the Bacterial Microflora in Dairy Products by Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis. Appl. Environ. Microbiol. 68, 3691-3701.

Oliver, L.M., Fisher, W.S., Winstead, J.T., Hemmer, B.L., Long, E.R., 2001. Relationships between tissue contaminants and defense-related characteristics of oysters (*Crassostrea virginica*) from five Florida bays. Aquat. Toxicol. 55, 203-222.

Olson, R.J., Chisholm, S.W., Zettler, E.R., Armbrust, E.V., 1988. Analysis of *Synechococcus* pigment types in the sea using single and dual beam flow cytometry. Deep Sea Research 35, 425-440.

Oros, D.R., Jarman, W.M., Lowe, T., David, N., Lowe, S., Davis, J.A., 2003. Surveillance for previously unmonitored organic contaminants in the San Francisco estuary. Mar. Pollut. Bull. 46, 1102-1110.

– P –

Paixão, J.F., Nascimento, I.A., Pereira, S.A., Leite, M.B.L., Carvalho, G.C., Silveira, J.S.C. Jr, Reboucas, M., Matias, G.R.A., Rodrigues, I.L.P., 2007. Estimating the gasoline components and formulations toxicity to microalgae (*Tetraselmis chuii*) and oyster (*Crassostrea rhizophorae*) embryos: An approach to minimize environmental pollution risk. Environ. Res. 103, 365-374.

Partensky, F., Blanchot, J., Lantoine, F., Neveux, J., Marie, D., 1996. Vertical structure of picophytoplankton at different trophic sites of the tropical northeastern Atlantic Ocean. Deep Sea Research 43, 1191-1213.

Partensky, F., Hess, W.R., Vaulot, D., 1999. *Prochlorococcus*, a marine photosynthetic prokaryote of global significance. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63, 106-127.

Pennington, P.L., Scott, G.I., 2001. Toxicity of atrazine to the estuarine phytoplankter *Pavlova sp.* (prymnesiophyceae): increased sensitivity after long-term, low-level population exposure. Environ. Toxicol. Chem. 20, 2237-2242.

Pesce, S., Fajon, C., Bardot, C., Bonnemoy, F., Portelli, C., Bohatier, J., 2006. Effects of the phenylurea herbicide diuron on natural riverine microbial communities in an experimental study. Aquat. Toxicol. 78, 303-314.

Pesce, S., Fajon, C., Bardot, C., Bonnemoy, F., Portelli, C., Bohatier, J., 2008. Longitudinal changes in microbial planktonic communities of a French river in relation to pesticide and nutrient inputs. Aquat. Toxicol. 86, 352-360.

Petersen, S., Gustavson, K., 1998. Toxic effects of tri-butyl-tin (TBT) on autotrophic pico-, nano-, and microplankton assessed by a size fractionated pollution-induced community tolerance (SF-PICT) concept. Aquat. Toxicol. 40, 253-264.

Petersen, S., Gustavson, K., 2000. Direct Toxic Effects of TBT on Natural Enclosed Phytoplankton at Ambient TBT Concentrations of Coastal Waters. Ecotoxicology 9, 273-285.

Petersen, D.G., Dahllof, I., Nielsen, L.P., 2004. Effects of zinc pyrithione and copper pyrithione on microbial community function and structure in sediments. Environ. Toxicol. Chem. 23, 921-928.

Ponis, E., Robert, R., Parisi, G., 2003a. Nutritional value of fresh and concentrated algal diets for larval and juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). Aquaculture 221, 491-505.

Ponis, E., Robert, R., Parisi, G., Tredici, M., 2003b. Assessment of the performance of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) larvae fed with fresh and preserved *Pavlova lutheri* concentrates. Aquac. Int. 11, 69-79.

– Q –

Quiniou, F., Damiens, G., Gnassia-Barelli, M., Geffard, A., Mouneyrac, C., Budzinski, H., Romeo, M., 2007. Marine water quality assessment using transplanted oyster larvae. Environ. Int. 33, 27-33.

– R –

Readman, J.W., Devilla, R.A., Tarran, G., Llewellyn, C.A., Fileman, T.W., Easton, A., Burkill, P.H., Mantoura, R.F.C., 2004. Flow cytometry and pigment analyses as tools to investigate the toxicity of herbicides to natural phytoplankton communities. Mar. Environ. Res. 58, 353-358.

Reysenbach, A.L., Giver, L.J., Wickham, G.S., Pace, N.R., 1992. Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. 58, 3417-3418.

Ricard, M., 1987. Atlas du phytoplancton marin, vol. 2, Diatomophycées. Éditions du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, 297 pp.

Riedel, G.F., Valette-Silver, N., 2002. Differences in the bioaccumulation of arsenic by oysters from Southeast coastal US and Chesapeake Bay: environmental versus genetic control. Chemosphere 49, 27-37.

Rioboo, C., Gonzalez, O., Herrero, C., Cid, A., 2002. Physiological response of freshwater microalga (*Chlorella vulgaris*) to triazine and phenylurea herbicides. Aquat. Toxicol. 59, 225-235.

Rodríguez, F., Chauton, M., Johnsen, G., Andresen, K., Olsen, L.M., Zapata, M., 2006. Photoacclimation in phytoplankton: implications for biomass estimates, pigment functionality and chemotaxonomy. Mar. Biol. 148, 963-971.

Rosenzweig, M.S., Buikema, A.L.Jr, 1994. Phytoplankton colonization and seasonal succession in new experimental ponds. Environ. Toxicol. Chem. 13, 599-605.

Rubio, F., Veldhuis, L.J., Clegg, B.S., Fleeker, J.R., Hall, J.C., 2003. Comparison of a Direct ELISA and an HPLC Method for Glyphosate Determinations in Water. J. Agric. Food Chem. 51, 691-696.

Rutten, T.P.A., Sandee, B., Hofman, A.R.T., 2005. Phytoplankton monitoring by high performance flow cytometry: A successful approach? Cytom. Part A 64A, 16-26.

– S –

Sabater, C., Carrasco, J.M., 2001. Effects of pyridaphenthion on growth of five freshwater species of phytoplankton. A laboratory study. Chemosphere 44, 1775-1781.

Sabater, C., Cuesta, A., Carrasco, R., 2002. Effects of bensulfuron-methyl and cinosulfuron on growth of four freshwater species of phytoplankton. Chemosphere 46, 953-960.

Santin-Montanya, I., Sandin-Espana, P., Garcia Baudin, J.M., Coll-Morales, J., 2007. Optimal growth of *Dunaliella primolecta* in axenic conditions to assay herbicides. Chemosphere 66, 1315-1322.

Schäfer, H., Bernard, L., Courties, C., Lebaron, P., Servais, P., Pukall, R., Stackebrandt, E., Trousselier, M., Guindulain, T., Vives-Rego, J., Muyzer, G., 2001. Microbial community dynamics in Mediterranean nutrient-enriched seawater mesocosms: changes in the genetic diversity of bacterial populations. FEMS Microbiol. Ecol. 34, 243-253.

Seguin, F., Leboulanger, C., Rimet, F., Druart, J.C., Bérard, A., 2001. Effects of atrazine and nicosulfuron on phytoplankton in systems of increasing complexity. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 40, 198-208.

Seoane, S., Laza, A., Orive, E., 2006. Monitoring phytoplankton assemblages in estuarine waters: The application of pigment analysis and microscopy to size-fractionated samples. Estuar. Coast. Shelf Sci. 67, 343-354.

Sherrard, N.J., Nimmo, M., Llewellyn, C.A., 2006. Combining HPLC pigment markers and ecological similarity indices to assess phytoplankton community structure: An environmental tool for eutrophication? Sci. Total Environ. 361, 97-110.

Sieburth, J.M., Smetacek, V., Lenz, J., 1978. Pelagic ecosystem structure: heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions. Limnol. Oceanogr. 23, 63.

Simon, N., Barlow, R.G., Marie, D., Partensky, F., Vaulot, D., 1994. Flow cytometry analysis of oceanic photosynthetic picoeucaryotes. J. Phycol. 30, 922-935.

Skark, C., Zullei-Seibert, N., Schottler, U., Schlett, C., 1998. The Occurrence of Glyphosate in Surface Water. Int. J. Environ. Anal. Chem. 70, 93-104.

Smayda, T.J., 1997a. Harmful algal blooms: Their ecophysiology and general relevance to phytoplankton blooms in the sea. Limnol. Oceanogr. 42, 1137-1153.

Smayda, T.J., 1997b. What is bloom ? A commentary. Limnol. Oceanogr. 42, 1132-1136.

Sokal R.R., Rohlf, F.J., 1995. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. 3rd edition. W. H. Freeman and Co., New York.

Sosik, H.M., Olson, R.J., 2002. Phytoplankton and iron limitation of photosynthetic efficiency in the Southern Ocean during late summer. Deep Sea Research Part I 49, 1195-1216.

Soukupová, J., Lukavská, A., Lukavský, J., Nedbal, L., 1999. Sensitivity of the Algal Biotest ISO 10253 to the Photosystem 2 Herbicides in Seawater. Photosynthetica 37, 209-216.

Sournia, A., 1986. Atlas du phytoplancton marin, vol. 1, Cyanophycées, Dictyophycées, Dinophycées, Raphidophycées. Éditions du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, 219 pp.

Sournia, A., Chrétiennot-Dinet, M.J., Ricard, M., 1991. Marine phytoplankton: how many species in the world ocean? J. Plankton Res. 13, 1093-1099.

Stachowski-Haberkorn, S., Becker, B., Marie, D., Haberkorn, H., Coroller, L., de la Broise, D., Impact Of Roundup On The Marine Microbial Community, As Shown By An In Situ Microcosm Experiment, *Aquatic Toxicology* (2008), doi:10.1016/j.aquatox.2008.07.004

Stauber, J.L., Jeffrey, S.W., 1988. Photosynthetic pigments in fifty-one species of marine diatoms 1. J. Phycol. 24, 158-172.

Stauber, J., Adams, M., 2005. Microalgal toxicity tests using flow cytometry. Small-Scale Freshwater Toxicity Investigations 1, 203-241.

Stay, F.S., Katko, A., Rohm, C.M., Fix, M.A., Larsen, D.P., 1989. The effects of atrazine on microcosms developed from four natural plankton communities. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 18, 866-875.

Steen, R.J.C.A., van der Vart, J., Hiep, M., Van Hattum, B., Cofino, W.P., Brinkman, U.A.T., 2001. Gross fluxes and estuarine behaviour of pesticides in the Scheldt Estuary (1995-1997) Environ. Pollut.115, 65-79.

Ston, J., Kosakowska, A., Lotocka, M., 2002. Pigment composition in relation to phytoplankton community structure and nutrient content in the Baltic Sea. Oceanologia 44, 419-437.

Suzuki, M.T., Giovannoni, S.J., 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16 S rRNA genes by PCR. Appl. Environ. Microbiol. 62, 625-630.

Suzuki, K., Handa, N., Nishida, T., Wong, C.S., 1997. Estimation of phytoplankton succession in a fertilized mesocosm during summer using high-performance liquid chromatographic analysis of pigments. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 214, 1-17.

Suzuki, K., Hinuma, A., Saito, H., Kiyosawa, H., Liu, H., Saino, T., Tsuda, A., 2005. Responses of phytoplankton and heterotrophic bacteria in the northwest subarctic Pacific to *in situ* iron fertilization as estimated by HPLC pigment analysis and flow cytometry. Prog. Oceanogr. 64, 167-187.

– T –

Tanguy, A., Boutet, I., Laroche, J., Moraga, D., 2005. Molecular identification and expression study of differentially regulated genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in response to pesticide exposure. FEBS J. 272, 390-403.

Tarran, G.A., Heywood, J.L., Zubkov, M.V., 2006. Latitudinal changes in the standing stocks of nano-and picoeukaryotic phytoplankton in the Atlantic Ocean. Deep-Sea Research Part II 53, 1516-1529.

Tomlin, C.D.S., (Ed.) 2003. The Pesticide Manual: A World Compendium. Alton, Hampshire, British Crop Protection Council, 1344 pp.

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

– U –

Uehlinger, V., 1964. Etude statistique des méthodes de dénombrement planctonique. Arch. Sci. 17, 11-223.

Uysal, Z., Koksalan, I., 2006. The annual cycle of Synechococcus (cyanobacteria) in the northern Levantine Basin shelf waters (Eastern Mediterranean). Marine Ecology 27**,** 187-197.

– V –

Van den Brink, P.J., Hartgers, E.M., Gylstra, R., Bransen, F., Brock, T.C.M., 2002. Effects of a Mixture of Two Insecticides in Freshwater Microcosms: II. Responses of Plankton and Ecological Risk Assessment. Ecotoxicology 11, 181-197.

Van Hannen, E.J., Van Agterveld, M.P., Gons, H.J., Laanbroek, H.J., 1998. Revealing genetic diversity of eukaryotic microorganisms in aquatic environments by denaturing gradient gel electrophoresis. J. Phycol. 34, 206-213.

Van Wijngaarden, R.P.A., van den Brink, P.J., Oude Voshaar, J.H., Leeuwangh, P., 1995. Ordination techniques for analysing response of biological communities to toxic stress in experimental ecosystems. Ecotoxicology 4, 61-77.

Van Wijngaarden, R.P.A., Brock, T.C.M., Douglas, M.T., 2005. Effects of chlorpyrifos in freshwater model ecosystems: the influence of experimental conditions on ecotoxicological thresholds. Pest. Manag. Sci. 64, 923-935.

Vaulot, D., Courties, C., Partensky, F., 1989. A simple method to preserve oceanic phytoplankton for flow cytometric analyses. Cytometry 10**,** 629-635.

Vaulot, D., Le Gall, F., Marie, D., Guillou, L., Partensky, F., 2004. The Roscoff Culture Collection (RCC): a collection dedicated to marine picoplankton. Nova Hedwigia 79, 49-70.

Veldhuis, M.J.W., Kraay, G.W., 2004. Phytoplankton in the subtropical Atlantic Ocean: towards a better assessment of biomass and composition. Deep-Sea Research Part I 51, 507-530.

– W –

Wänstrand, I., Snoeijs, P., 2006. Phytoplankton community dynamics assessed by ships-of-opportunity sampling in the northern Baltic Sea: A comparison of HPLC pigment analysis and cell counts. Estuar. Coast. Shelf Sci. 66, 135-146.

Ward, D.M., Weller, R., Bateson, M.M., 1990. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. Nature 345, 63-65.

Waterbury, J.B., Watson, S.W., Guillard, R.R.L., Brand, L.E., 1979. Widespread occurrence of a unicellular, marine, planktonic cyanobacterium. Nature 277, 293-294.

Weiner, J.A., DeLorenzo, M.E., Fulton, M.H., 2004. Relationship between uptake capacity and differential toxicity of the herbicide atrazine in selected microalgal species. Aquat. Toxicol. 68, 121-128.

Wessel, N., Rousseau, S., Caisey, X., Quiniou, F., Akcha, F., 2007. Investigating the relationship between embryotoxic and genotoxic effects of benzo[a]pyrene, 17[alpha]-ethinylestradiol and endosulfan on *Crassostrea gigas* embryos. Aquat. Toxicol. 85, 133-142.

Widenfalk, A., Bertilsson, S., Sundh, I., Goedkoop, W., 2008. Effects of pesticides on community composition and activity of sediment microbes - responses at various levels of microbial community organization. Environ. Pollut. 152, 576-584.

Wintermyer, M.L., Cooper, K.R., 2007. The development of an aquatic bivalve model: Evaluating the toxic effects on gametogenesis following 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (2,3,7,8-TCDD) exposure in the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). Aquat. Toxicol. 81, 10-26.

Wong, P.K., 2000. Effects of 2,4-D, glyphosate and paraquat on growth, photosynthesis and chlorophyll–a synthesis of Scenedesmus quadricauda Berb 614. Chemosphere 41, 177-182.

Wong, C.S., Crawford, D.W., 2006. Evolution of phytoplankton pigments in an in-situ iron enrichment experiment in the subarctic NE Pacific. Deep Sea Research Part II 53, 2152-2167.

Woodburn, A., 2000. Glyphosate: production, pricing and use worldwide. Pest Manag. Sci. 56, 309-312.

Wright, S.W., Jeffrey, S.W., Mantoura, R.F.C., Llewellyn, C.A., Bjornland, T., Repeta, D.J., Welschmeyer, N., 1991. Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. Mar. Ecol. Prog. Ser. 77, 183-196.

– Y –

Yang, S., Wu, R.S.S., Kong, R.Y.C., 2002. Biodegradation and enzymatic responses in the marine diatom Skeletonema costatum upon exposure to 2, 4-dichlorophenol. Aquat. Toxicol. 59, 191-200.

Yasuno, M., Asaka, A., Kono, Y., 1993. Effects of pyraclofos (an organophosphorus insecticide) on nutrient enriched ecosystems. Chemosphere 27, 1813-1824.

Yoshino, K., Nishigaki, K., Husimi, Y., 1991. Temperature sweep gel electrophoresis: a simple method to detect point mutations. Nucl. Acids Res. 19, 3153.

Yu, Y., Kong, F., Wang, M., Qian, L., Shi, X., 2007. Determination of short-term copper toxicity in a multispecies microalgal population using flow cytometry. Ecotox. Environ. Safe. 66, 49-56.

– Z –

Zamora-Ley, I.M., Gardinali, P.R., Jochem, F.J., 2006. Assessing the effects of Irgarol 1051 on marine phytoplankton populations in Key Largo Harbor, Florida. Mar. Pollut. Bull. 52, 935-941.

Zapata, M., Rodríguez, F., Garrido, J.L., 2000. Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: a new HPLC method using a reversed phase C8 column and pyridine-containing mobile phases. Mar. Ecol. Prog. Ser. 195, 29-45.

Zeidner, G., Beja, O., 2004. The use of DGGE analyses to explore eastern Mediterranean and Red Sea marine picophytoplankton assemblages. Environ. Microbiol. 6, 528-534.

Glossaire

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

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

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

CE_X : concentration efficace qui entraîne une réduction du paramètre mesuré de X% par rapport à un témoin.

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

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

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

NOEC : voir CSEO

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

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

Liste des abbréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AMPA : Acide aminométhylphosphonique

ARN : Acide RiboNucléique

CE_x : Concentration Efficace

CSEO : Concentration Sans Effet Observé

DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

FAO : Food and Agriculture Organisation

HPLC : High Pressure Liquid Chromatography

IFEN : Institut Français de l'Environnement

IMPESPHY : IMpact des PESticides sur le PHYtoplancton marin côtier et les jeunes stades de développement de bivalves

IPEM : Impact des Pesticides sur l'Environnement Marin

LOEC : Lowest Observed Effect Concentration

LUBEM : Laboratoire Universitaire de Biologie et Diversité Microbienne

LUMAQ : Laboratoire Universitaire de Microbiologie Appliquée de Quimper

NOEC : No Observed Effect Concentration

PAM : Pulse Amplitude Modulated

PAR : radiations photosynthétiquement actives, Photosynthetically Active Radiation

PCR : Polymerase Chain Reaction

PICT : Pollution-Induced Community Tolerance

PS II : Photosystème II

TBT : Tributylétain

TTGE : Temporal Temperature Gradient gel Electrophoresis

UBO : Université de Bretagne Occidentale

UIPP : Union des Industries de la Protection des Plantes

Liste des pigments

Chl : chlorophylles

Chlide *a* : chlorophyllide *a*

MgDVP : Mg-3,8-divinyl phytoporphyrine-13^2-méthyl carboxylate

MV chl c_3 : monovinyl chlorophylle c_3

Butfuco : 19'-butanoyloxyfucoxanthine

Diadino : diadinoxanthine

Fuco : fucoxanthine

Hexfuco: 19'-hexanoyloxyfucoxanthine

Néo : néoxanthine

Périd : péridinine

Pras : prasinoxanthine

Viola : violaxanthine

Zéa : zéaxanthine

Table des illustrations

Figures

Figure 1 - Cycle des pesticides 21

Figure 2 - Cycle de développement de l'huître *Crassostrea gigas* (Fabioux, 2004) 53

Figure 3 - Localisation des sites expérimentaux 63

Figure 4 - Emplacement du site expérimental dans l'archipel de Glénan 64

Figure 5 - Emplacement du site expérimental dans la baie de Port-la-Forêt 64

Figure 6 - Photo d'un microcosme contenant le phytoplancton naturel et le naissain d'huîtres 66

Figure 7 - Schéma d'un microcosme contenant le phytoplancton naturel et le naissain d'huîtres 66

Figure 8 - Photo de la structure en inox servant de support aux microcosmes 66

Figure 9 - Schéma représentant la structure en inox *in situ* 66

Figure 10 - Manipulation de la structure 67

Figure 11 - Traitement des microcosmes contenant les communautés phytoplanctoniques 69

Figure 12 - Traitement des microcosmes contenant les communautés phytoplanctoniques et le naissain d'huîtres 71

Figure 13 - Cytograms of side scatter and fluorescence of a seawater sample, showing the populations of *Synechococcus*, prasinophyte-like, and nano-eukaryotes. 81

Figure 14 - TTGE gel profiles from 18S rDNA PCR products and UGPMA cluster analysis of Dice similarity matrix calculated from the banding patterns. C = Control; 1 = Opus 1 µg L^{-1}; a,b,c,d = replicates (on the left of each lane, dashes indicate the bands detected) 84

Figure 15 - TTGE gel profiles from 18S rDNA PCR products and UGPMA cluster analysis of Dice similarity matrix calculated from the banding patterns. C = Control; 10 = Opus 10 µg L^{-1}; 100 = Opus 100 µg L-1; a,b,c,d = replicates (on the left of each lane, dashes indicate the bands detected) 85

Figure 16 - Cellular concentrations (cell mL^{-1}) of the photosynthetic populations in microcosms on the last day of experiment, discriminated using flow cytometry (mean ± standard error, SE) 86

Figure 17 - PCA analysis of pigment ratios in microcosms: projection of the observations (microcosms). 87

Figure 18 - Pigment ratios in controls and in 100 µg L^{-1} Opus treatments (mean ± standard error, SE). 88

Figure 19 - Chl *a* concentrations (µg L^{-1}) in microcosms on the last day of experiment (mean ± standard error). 88

Tableaux

Tableau 1 - Effets de la bentazone sur le phytoplancton 56

Tableau 2 - Effets du glyphosate sur le phytoplancton (PEO : Pas d'Effet Observé) 57

Tableau 3 - Effets du nicosulfuron sur le phytoplancton (PEO : Pas d'Effet Observé) 58

Tableau 4 - Effets du chlorpyrifos sur le phytoplancton 59

Table 5 - List of pigments detected – abbreviated names 82

Tableau 6 - Synthèse des expériences réalisées pendant la thèse : site, période et durée. Les chiffres correspondent au nombre de microcosmes testés par pesticide et par concentration. Les couleurs correspondent aux microcosmes exploités dans les articles 1 (vert), 2 (bleu) et 3 (rouge). Les cases grisées correspondent aux conditions n'ayant pas été testées. 130

Tableau 7 - Synthèse des résultats obtenus pour le Basamaïs (PED = Pas d'Effet Détecté). Les cases grisées correspondent aux analyses n'ayant pas été réalisées 133

Tableau 8 - Synthèse des résultats obtenus pour le Frontier (PED = Pas d'Effet Détecté). Les cases grisées correspondent aux analyses n'ayant pas été réalisées 135

Tableau 9 - Synthèse des résultats obtenus pour le Roundup (PED = Pas d'Effet Détecté). Les cases grisées correspondent aux analyses n'ayant pas été réalisées 137

Tableau 10 - Synthèse des résultats obtenus pour le Milagro (PED = Pas d'Effet Détecté). Les cases grisées correspondent aux analyses n'ayant pas été réalisées 139

Tableau 11 - Synthèse des résultats obtenus pour l'Opus (PED = Pas d'Effet Détecté). Les cases grisées correspondent aux analyses n'ayant pas été réalisées 141

Tableau 12 - Synthèse des résultats obtenus pour le Dursban (PED = Pas d'Effet Détecté). Les cases grisées correspondent aux analyses n'ayant pas été réalisées. 143

Nouveau chapitre de la thèse – 2007

Association Bernard Gregory
www.abg.asso.fr

Valorisation des compétences
«un nouveau chapitre de la thèse ®»

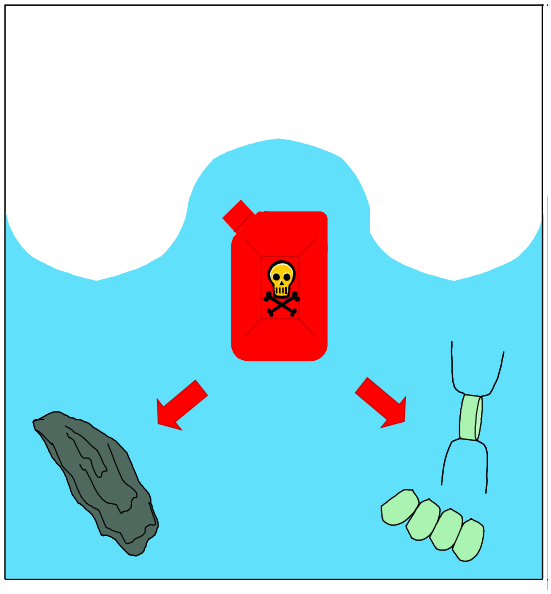
Sabine Stachowski-Haberkorn

Ecole Doctorale des Sciences de la Mer

Université ou organisme de rattachement : Université de Bretagne Occidentale

Nom du "mentor" : Yanys Wessels

Impact des pesticides sur le phytoplancton marin et les bivalves



Sujet académique de la thèse
Impact des pesticides sur le phytoplancton marin et le naissain d'huîtres

Nom du directeur de thèse : Denis de la Broise
Date probable de soutenance : septembre 2008

1. Cadre général de la thèse et enjeux

1.1. Présentation de la thèse

Résumé

Mon travail de thèse consistait à étudier **l'impact de pesticides** sur l'environnement marin, au niveau du **phytoplancton** et du **naissain d'huîtres** (*Crassostrea gigas*). Cette thèse peut se résumer ainsi :

Les **pesticides** sont des produits utilisés pour **protéger les cultures** contre certaines maladies, certains insectes, ou d'autres plantes. Mais les pesticides sont aussi utilisés dans les jardins, pour éviter d'avoir trop de « mauvaises herbes », sur les routes et les espaces verts, les chemins de fer… Ces produits vont rester au niveau des plantes ou du sol, et une partie peut être **emportée par la pluie**, jusque dans les rivières, et ils vont être **retrouvés dans les mers et océans**, au niveau des côtes. La France est le 1er consommateur de pesticides en Europe, et le 3ème au monde. De nombreuses études rapportent que ce commerce n'est pas sans danger, que ce soit pour la nature ou pour l'homme.

Les **pesticides** ne tuent pas seulement leurs cibles, ils peuvent aussi **affecter d'autres êtres vivants**, comme les oiseaux, les abeilles, les poissons, les coquillages… Certains pesticides sont retrouvés dans la **mer**, et peuvent être dangereux pour la **faune et la flore marines** ; c'est pourquoi mon travail de thèse consistait à tester les effets de certains pesticides sur le **phytoplancton marin** et les **jeunes huîtres**.

Le phytoplancton désigne des **algues microscopiques** qui peuplent tous les milieux aquatiques. Ces algues se nourrissent à partir du **dioxyde de carbone atmosphérique** et de la **lumière du soleil**. Elles sont ensuite **consommées** par certains animaux, comme les **coquillages** (huîtres, moules, palourdes…), certains poissons, qui seront ensuite mangés par l'homme. Le phytoplancton permet donc de nourrir la plupart des organismes aquatiques, certains oiseaux, et les humains, directement ou indirectement.

Il est donc très important de savoir si les **pesticides** qui se retrouvent dans le milieu marin peuvent **influencer le phytoplancton**, en **modifiant sa composition** par exemple, ce qui pourrait **perturber l'alimentation** de certains organismes. Dans l'environnement naturel, tous les organismes sont liés, notamment au niveau alimentaire, mais pas seulement. Si une partie des organismes d'un milieu est affectée par un ou plusieurs pesticides, d'autres types d'organismes peuvent en subir les conséquences.

Les coquillages comme les **huîtres** peuvent aussi être directement mis en danger par la présence de pesticides dans le milieu marin. La France est le premier producteur d'huîtres en Europe, et le 4ème au monde. Il faut savoir que **80%** des **huîtres** qui sont **produites** et se retrouvent dans nos assiettes, même si elles sont élevées en écloseries[1], proviennent de **captage naturel** [2]. Lorsque les huîtres se reproduisent dans le milieu naturel, les **larves** qui

1 Ecloserie : installation qui permet la production et l'élevage d'œufs, larves, de coquillages et poissons

2 Le **captage** naturel correspond à la fixation de la larve d'huître sur un support (rochers, tuiles posées par les éleveurs) dans le milieu naturel

nagent vont subir une métamorphose, ce qui leur permet de se fixer afin de poursuivre leur croissance. Une fois **fixées**, ces jeunes huîtres, appelées alors « **naissain** », sont récupérées par les humains pour être nourries en écloseries, jusqu'à leur commercialisation. La majorité des huîtres que nous mangeons sont donc en contact avec les polluants des zones côtières, et ce dès leur plus jeune âge. De ce fait, il était intéressant d'étudier les effets de certains pesticides sur de jeunes huîtres fixées.

Afin d'être le plus **fidèle** possible aux **conditions naturelles** du **phytoplancton** et des **huîtres**, nous avons fait des **expériences en mer** : nous avons mis de **l'eau de mer** contenant du phytoplancton en bouteilles, des **pesticides** ont été ajoutés dans certaines bouteilles, et les **bouteilles** étaient plongées dans la mer à **4 m de profondeur**. Ensuite nous avons filtré les bouteilles pour récupérer tout le phytoplancton, et nous avons comparé les résultats obtenus sur les bouteilles avec et sans pesticides. Nous avons procédé de la même manière pour les **jeunes huîtres**, et nous les avons mesurées afin de voir si les pesticides avaient un effet sur leur croissance.

Le but principal était de déterminer si des **pesticides** retrouvés dans la mer à de faibles quantités pouvaient avoir un **effet** sur la composition du **phytoplancton naturel** et sur les **jeunes huîtres**.

L'adoption de la nouvelle réglementation européenne **REACH** (en**R**egistrement, **E**valuation et **A**utorisation des substances **CH**imiques) entrée en vigueur le 1er juin 2007 (Règlement CE 1907/2006 et directive 2006/121/CE publiés au Journal Officiel du 30/12/2006), **impose** désormais aux **industriels** de fournir des données de **sûreté sanitaire et environnementale** sur toutes les substances qu'elles produisent. Jusqu'alors, l'Etat et les victimes de problèmes sanitaires ou écologiques avaient « charge de preuve », c'est dans ce contexte que s'inscrit notre étude.

Une telle étude n'est pas dissociable de certains enjeux, que ce soit au niveau scientifique, économique et social, ou technique ; ces enjeux sont présentés ci-après.

1.2. Enjeux

1.2.1. Au niveau fondamental

Cette thèse avait pour premier objectif d'explorer une partie méconnue du milieu marin, les **communautés phytoplanctoniques** et leur dynamique, ainsi que leur sensibilité vis-à-vis de **pesticides utilisés dans les bassins versants du Finistère**, que ce soit par des professionnels ou des particuliers.

Très peu d'études nous renseignent sur la diversité et la réactivité de ces communautés soumises à divers types de contraintes, et qui soutiennent le développement de tous les maillons de la « chaîne alimentaire » au niveau aquatique. Et notamment, il était supposé que **l'action de certains pesticides pourrait influencer la composition des communautés phytoplanctoniques** et entraîner des phénomènes de résistance ou de sensibilité sur certaines espèces.

Le second aspect de la thèse était basé sur l'évaluation de la **toxicité de pesticides** sur du **naissain d'huître** : ce stade de développement est très peu utilisé dans les tests de toxicité, en comparaison avec les stades adulte et embryo-larvaire.

L'enjeu scientifique de cette partie concernait la sensibilité de ce stade de développement aux pesticides, sa « maniabilité » pour faire des expériences en milieu naturel et les critères à prendre en compte pour évaluer les effets des pesticides.

1.2.2. Au niveau économique et social

Le sujet fait partie d'un programme national initié par l'ancien Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable (MEDD), visant à évaluer et réduire les risques liés à l'utilisation de pesticides, et complété par un projet régional financé par la Région Bretagne. Le constat était le suivant : la France est le 3ème consommateur mondial de pesticides et le 1er européen, cela représente un coût non négligeable pour les exploitations agricoles, pour des conséquences en santé humaine, animale et environnementale qui peuvent s'avérer désastreuses. Il fallait donc créer des programmes de recherche dont les résultats pourraient servir d'aide à la décision concernant par exemple, les substances autorisées, les périodes d'application, les doses préconisées… Et pour cela faire des études sur tous les compartiments environnementaux susceptibles d'être impactés par les pesticides, dont le phytoplancton et les bivalves. L'aspect économique est important concernant l'étude des huîtres et du naissain car la France est le 1er producteur Européen d'huîtres et le 4ème mondial avec une production annuelle moyenne d'environ 130 000 tonnes. Or 80% de la production d'huîtres provient de captage naturel (larves qui se sont fixées sur des supports dans le milieu naturel et qui sont ensuite « récoltées » pour poursuivre leur élevage en écloseries).

L'enjeu social principal de ces études est de sensibiliser l'ensemble des usagers et pollueurs potentiels des dommages qui peuvent être créés au niveau marin côtier par l'utilisation abusive ou non raisonnée de pesticides.

1.2.3. Les principaux enjeux techniques

- tester un outil permettant d'exposer les organismes à des conditions très proches des conditions de l'environnement ;
- évaluer la faisabilité de tests de toxicité sur du naissain d'huîtres en conditions naturelles ;
- mettre en place au laboratoire une technique d'analyse d'empreintes génétiques des communautés phytoplanctoniques.

1.3. Contexte de la thèse

J'ai réalisé ma thèse dans le **Laboratoire Universitaire de Microbiologie Appliquée de Quimper** (LUMAQ), rattaché à l'Université de Bretagne Occidentale (UBO). Ce laboratoire a des thématiques de recherche variées, avec une composante de Microbiologie Prévisionnelle tournée vers l'alimentaire, une composante d'étude des peptides anti-microbiens, une composante sur les spores fongiques et une composante qui concerne l'étude du milieu marin, dont ma thèse fait partie. Mon sujet de thèse fait partie intégrante du programme initié par le MEDD : évaluation et réduction des risques liés à l'utilisation des pesticides, volet « Impact des Pesticides sur l'Environnement Marin (IPEM)», et qui **a commencé** dans mon laboratoire d'accueil **en 2003 avec mon DEA**. Cette thématique était donc quasiment inexistante avant mon arrivée. Ce projet a été monté en collaboration avec d'autres laboratoires, dont Ifremer Centre de Brest (**Laboratoire d'écotoxicologie**), le **Laboratoire Idhesa** (Institut Départemental d'analyses, de conseil et d'expertise en Hygiène alimentaire, Eau et environnement, et Santé Animale) à Plouzané (Technopôle Brest-Iroise), et le **Laboratoire de Biotechnologie et physiologie Végétales** (UBO) à Brest. Cela nous a permis l'obtention d'un financement complémentaire par la Région Bretagne, incluant mon salaire de thèse.

1.4. Ma place dans le contexte de la thèse

Les études que j'ai faites ont façonné et recadré mes objectifs « d'avenir » ; c'est au cours de ces études que j'ai décidé de travailler si possible sur le milieu naturel aquatique en relation avec une problématique environnementale et comprenant des expériences de terrain. Ma personnalité ainsi que mes résultats m'ont conduit à choisir la voie de la thèse, pour avoir la chance de faire un travail que j'aime, et qui est sans cesse en mouvement, avec d'innombrables questions auxquelles on peut essayer de répondre. Cela correspond à une ouverture d'esprit, liée au travail quotidien mais aussi à l'échange, par le biais des collaborations, rencontres…Il me fallait donc une fonction qui me laisse une certaine **indépendance** et **autonomie d'action**, ainsi qu'une **stimulation intellectuelle**.

J'ai donc choisi ce sujet de DEA qui m'était proposé, « impact des pesticides sur l'environnement marin » sachant que cela pouvait aboutir à une thèse si le financement était accordé.

Le projet était déjà partiellement financé (MEDD) à mon arrivée, et les objectifs définis. Cependant j'ai pu suggérer l'orientation du travail sur les naissains d'huîtres, ce qui permettait de donner une dimension écologique supplémentaire à ce travail.

2. Déroulement, gestion et coût de mon projet de thèse

2.1. Préparation et cadrage du projet

Ce projet est né d'une **collaboration entre quatre laboratoires**, dont deux rattachés à l'UBO (voir 1.2. Contexte de la thèse), qui se sont répartis les financements accordés par les deux **financeurs principaux : le MEDD et la Région Bretagne**. Les partenaires ont été choisis de par les compétences qu'ils pouvaient apporter au niveau scientifique et technique, mais aussi pour leur motivation et implication dans le montage du projet et sa conduite. Le travail de thèse a été réalisé presque en totalité au laboratoire LUMAQ et sur le terrain. J'ai aussi passé quelques semaines à Ifremer-Brest dans le cadre de la collaboration sur les projets IPEM et IMPESPHY. L'UBO a contribué financièrement à la réalisation de ce projet puisque j'ai utilisé les ressources du LUMAQ.

Les compétences humaines et scientifiques *à ma disposition* pour la réalisation de ce projet comprenaient :

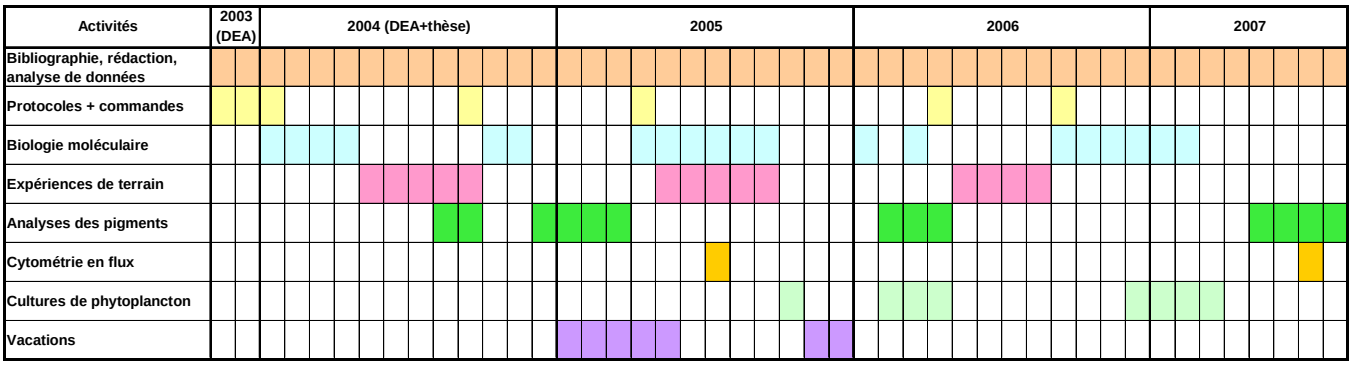
– une personne spécialiste du phytoplancton ;
– une personne spécialiste des tests de toxicité sur le développement embryo-larvaire de bivalves ;
– des compétences de chimie analytique pour le dosage des pesticides ;
– un chercheur ayant déjà expérimenté les expériences de terrain et ayant conçu l'outil que nous avons utilisé pour nos expériences en milieu naturel.

Au niveau du laboratoire, j'ai pu bénéficier de compétences en biologie moléculaire, navigation, plongée, et d'appareils tels que :

– centrifugeuses réfrigérées ;
– dispositif de migration pour gels d'agarose ;
– thermocycleur ;
– consommables communs ;
– autoclave ;
– nombreuses étuves ;
– tables d'agitation thermostatées...

Le matériel spécifique nécessaire pour le travail de thèse a été acquis grâce au financement du MEDD.

2.2. Conduite du projet



Le temps du projet (DEA+thèse) a été réparti entre plusieurs types d'activités, dont quatre principales : la biologie moléculaire s'est étalée sur 20 mois, les expériences de terrain (préparation, installation et démontage compris) se sont étalées sur 14 mois, les analyses pigmentaires se sont déroulées sur 13 mois, et les cultures de phytoplancton sur huit mois. Il y a des recouvrements entre certaines activités qui n'étaient pas forcément pratiquées à temps plein ; de plus l'accueil de stagiaires a permis, lors de certaines périodes, de mener deux activités importantes de front.

2.3. Evaluation et prise en charge du coût du projet

Le **coût total** de ma thèse s'élève à **187 000 €**, répartis à 61% en ressources humaines, 25% en fonctionnement et 14% en investissements. Ce budget a été financé à 52% par la Région Bretagne, 27% par le MEDD, 19% par l'UBO et 2% par Ifremer. Le solde de ma thèse est nul.

2.3.1. Répartition des finances : synthèse

		Origine				
		Ifremer	MEDD	Région Bretagne	UBO	Total
Nature	Fonctionnement	0 €	22 018 €	16 001 €	9 000 €	47 019 €
	Investissement	0 €	26 431 €	0 €	0 €	26 431 €
	RH	2 755 €	2 400 €	81 806 €	26 585 €	113 546 €
	Total	2 755 €	50 849 €	97 807 €	35 585 €	186 996 €

La contribution des différents financeurs au projet de thèse est répartie de la façon suivante :

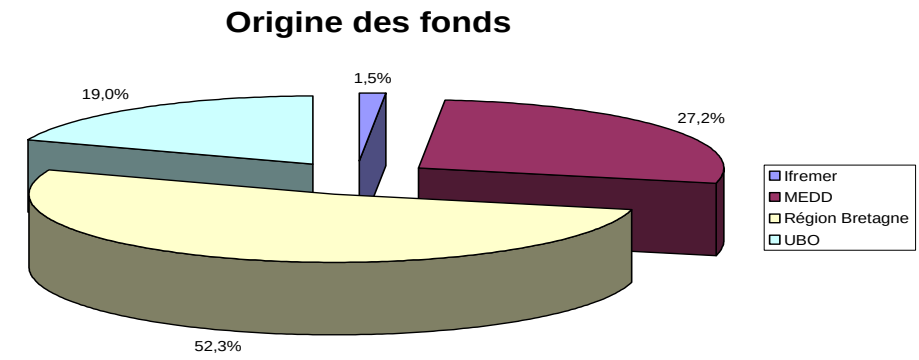
– Ifremer a financé des ressources humaines correspondant à l'encadrement dont j'ai pu bénéficier lors de mes expériences de culture à Ifremer Brest ;

– le MEDD a surtout financé du fonctionnement (presque ½) et de l'investissement (100%), en proportions quasi-équivalentes ;

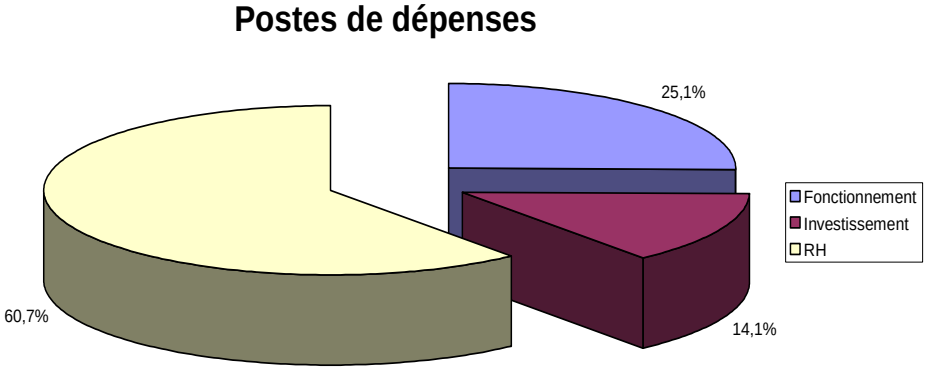
– la Région Bretagne, même si elle a contribué pour une part importante au fonctionnement (1/3), a surtout permis le déroulement du projet grâce à mon salaire de doctorante (environ 2/3 du poste RH) ;

– l'UBO a aussi fourni du fonctionnement correspondant à mon occupation et utilisation des locaux, et des ressources humaines (environ ¼) qui correspondent principalement au salaire de mon directeur de thèse.

2.3.2. Répartition des finances : sources



2.3.3. Répartition des finances : dépenses



3. Compétences

3.1. Compétences scientifiques et techniques, savoir-faire & qualités

Mon travail de thèse m'a amenée à développer des **compétences scientifiques et techniques** dans quatre domaines :

- Terrain : mise en place de microcosmes *in situ*, échantillonnage, gestion logistique et matérielle des expériences, permis mer côtier, permis fluvial, plongée niveau 2 ;
- Laboratoire : cultures monospécifiques de phytoplancton eucaryote et procaryote, analyse d'images, dosages biochimiques (production primaire, ATP cellulaire, chlorophylles et caroténoïdes, suivi de croissance), analyses pigmentaires par HPLC (High Pressure Liquid Chromatography), biologie moléculaire (extraction d'ADN, PCR : Polymerase Chain Reaction, TTGE : Temporal Temperature Gradient gel Electrophoresis, électrophorèses en gel d'agarose), cytométrie en flux ;
- Traitement de données : collecte, traitement et analyses statistiques de données ;
- Informatique : logiciels de bureautique (traitement de texte, tableur, diaporama, graphiques), statistique (Minitab, Statgraphics), analyse d'image (photos et gels d'électrophorèse), bibliographique (Endnote).

Cela m'a permis d'élargir mes connaissances dans les domaines de l'écotoxicologie, l'écologie du **phytoplancton**, du **cycle de l'huître et de son élevage**, de **la navigation et de la plongée** qui étaient des disciplines totalement inconnues pour moi avant ce projet, et du domaine du milieu marin en général.

3.2. Compétences projet & management

3.2.1. Communication & Gestion

Tout au long de ma thèse, j'ai été amenée à **communiquer** avec les collaborateurs des projets Ipem et Impesphy, lors de réunions au cours desquelles j'ai présenté l'évolution du travail accompli ainsi que l'adéquation avec les objectifs de départ, et ceci afin d'organiser les étapes suivantes du travail, en accord avec les membres des deux projets. Ces réunions de travail m'ont permis d'établir un **échéancier des tâches** à réaliser pendant la thèse. J'ai pu **être à l'écoute** des opinions de chacun et essayer d'apporter mes arguments afin de **participer** encore **plus activement à la gestion de mon projet de thèse**. Les partenaires des projets étaient aussi membres de mon comité de thèse, ce qui a facilité la communication et la compréhension de chacun par rapport à mon travail.

Le fait que le projet de thèse soit financé par deux programmes distincts mais complémentaires nécessitait la rédaction de **rapports annuels d'avancement** pour chacun des deux financeurs (Région Bretagne et MEDD), j'ai donc pris en charge la rédaction de nos parties avec l'assistance de mon directeur de thèse. J'ai aussi eu à rédiger les rapports

intermédiaires d'avancement de ma thèse. Je suis donc capable de **rassembler, analyser et synthétiser des données** en vue de leur interprétation, ceci dans un délai imposé pour la rédaction de rapports.

J'ai aussi été amenée à **contacter des personnes extérieures** à ces projets, pour des aspects plus spécifiques de la thèse, afin de bénéficier de compétences techniques qui faisaient défaut dans mon laboratoire. De plus, cela m'a permis de savoir comment présenter mon travail à des inconnus et comment aborder d'autres scientifiques en dehors d'un contexte « cadré ».

J'ai développé une **aisance dans les présentations orales** et une grande **pédagogie**, liées à ma capacité à me projeter à la place des spectateurs, avec pour principe de répondre au maximum à leurs attentes.

3.2.2. Management & Encadrement

J'ai aussi **encadré quatre stagiaires** au niveau **pratique, rédactionnel** et pour les préparer à leur **soutenance**, pour des périodes d'environ trois mois chacun. Cela m'a conduit à savoir leur apprendre les gestes techniques, ainsi que les aspects théoriques liés aux sujets de stage et aux expériences réalisées, en essayant de **m'adapter à leurs capacités et à leur niveau d'études.**

Au niveau scientifique administratif, j'ai eu à me familiariser dès mon arrivée en DEA avec les différents **aspects matériels et financiers de la recherche** : pour la partie biologie moléculaire de ma thèse, ma tâche a consisté à faire des recherches bibliographiques afin de déterminer les protocoles que j'allais utiliser, évaluer le matériel nécessaire pour les trois ans de la thèse, prospecter chez les différents fournisseurs, et passer les commandes. Cela m'a permis de connaître le coût du matériel de laboratoire, de négocier des prix, et de **gérer le budget au mieux**. J'ai aussi géré les commandes de matériel pour les autres aspects de la thèse, au fur et à mesure des besoins.

3.3. Qualités personnelles

Ces quatre années de recherche m'ont permis de développer des compétences personnelles, en particulier une **autonomie d'action et de réflexion**, ainsi qu'une **adaptabilité aux personnes** et aux différents **contextes** rencontrés. Certains aspects de ma thèse qui ont posé des difficultés ont sollicité de l'acharnement et **beaucoup de motivation** pour atteindre les buts fixés, ainsi qu'une grande **rigueur scientifique** et une bonne **organisation** des tâches à accomplir. Je peux dire aujourd'hui que je suis capable de mener mes projets à leur terme, même quand cela entraîne une surcharge de travail ; je n'hésite pas à m'engager dans des projets ambitieux lorsque je pense qu'ils sont réalisables, même s'ils nécessitent un investissement très important.

Les échanges très fréquents avec mon Directeur de thèse et mes stagiaires m'ont aussi fait prendre conscience de mon **ouverture d'esprit** face aux opinions des autres, de mes aptitudes à considérer les intérêts, conseils, ou difficultés des autres personnes impliquées dans le travail de thèse, afin de **ne pas imposer mes vues** et de gérer le travail au mieux du point de vue humain.

Ma rigueur, ma motivation, mon sens de l'organisation, mon exigence envers mon travail et mon ouverture aux autres sont certainement mes plus grands atouts pour mener à bien des projets de recherche.

Les vacations que j'ai réalisées m'ont permis de mettre en œuvre ma pédagogie qui s'est avérée très appréciée : en effet j'ai fait de la formation individuelle et personnalisée, et collective, d'enseignants et d'étudiants à la recherche documentaire sur internet pendant 200h au cours de ma thèse. J'ai eu des retours très positifs sur cette expérience. De même, les présentations orales que j'ai pu faire ont aussi suscité des commentaires très enthousiastes sur ma pédagogie et la clarté de mes explications.

L'ensemble de mes expériences de recherche et d'enseignement m'a aussi permis de rencontrer des personnes d'horizons très variés : avec des enseignants de l'IUT de Quimper en Gestion, Commerce, Transports, Tourisme, Biologie. J'ai pu collaborer brièvement avec des personnes de l'ADRIA et du laboratoire Antiox à Quimper, de la station biologique de Roscoff, du LEMAR à Brest, du Laboratoire de Biotechnologie et physiologie Végétales (UBO), des centres Ifremer de Brest et Nantes, en plus des chercheurs de mon laboratoire d'accueil LUMAQ à Quimper. Cela a renforcé ma sociabilité, ainsi que mon sens du relationnel et de la communication.

4. Résultats, impacts de la thèse.

4.1. En général

Au niveau du laboratoire, notre projet a permis de **renforcer et développer la thématique « milieu marin »** déjà présente, et d'acquérir de nouveaux outils (microcosmes *in situ*, TTGE). De plus, le projet a permis, de par les collaborations, de faire connaître le LUMAQ à d'autres laboratoires et de donner naissance à de **nouveaux projets** en relation avec le phytoplancton, incluant de nouvelles collaborations dont certaines tournées vers **l'international** (Lemar, Roscoff, Ifremer, Industriels, Chili, Algérie).

Ce travail qui était permis grâce à deux financements a fait l'objet de rapports finaux qui seront remis respectivement à la Région Bretagne et au MEDD, et qui, nous l'espérons, permettront d'adapter l'utilisation de pesticides de façon à limiter au maximum les dommages potentiels à l'environnement.

Ce sujet a aussi permis de **sensibiliser la communauté scientifique** à **l'importance cruciale du phytoplancton** de par son rôle de premier maillon trophique des écosystèmes aquatiques, et son implication dans certains problèmes liés à la **consommation de coquillages**, ou encore les problèmes provoqués par le développement massif de certaines espèces non toxiques, et qui peuvent gêner les activités de certains usagers. Quant au naissain d'huîtres, nous avons démontré l'existence de **synergie entre certains pesticides** apparemment « inoffensifs » lorsqu'ils sont testés seuls, on peut donc imaginer les conséquences de ce type d'exposition sur des jeunes huîtres en écloserie ou dans le milieu naturel. Nous espérons que les projets futurs prendront en compte les expositions multiples auxquelles sont soumis ces organismes.

4.2. Pour moi

4.2.1. Pratiques professionnelles

Cette thèse m'a énormément apporté au niveau personnel, car lors de mon arrivée à Quimper je ne savais pas nager ! **En quatre ans**, j'ai donc :

– appris à nager, passé les niveaux 1 et 2 de plongée ;

– passé les permis mer côtier et permis fluvial.

Certaines de ces compétences m'ont permis de **mieux gérer les expériences de terrain** et la découverte du monde sous-marin a été pour moi une révélation tant au niveau personnel que professionnel puisque je compte poursuivre dans la plongée afin d'obtenir dans le futur, le **diplôme de plongeur scientifique**.

Les **expériences de terrain** m'ont aussi fait prendre conscience des **difficultés** liées à ce type d'approche, tant au niveau **pratique** (fatigue, condition physique, dangers, technique) que **théorique** (complexité des systèmes, conception des outils, interprétation des résultats). *De plus j'ai pu comprendre pourquoi peu de personnes pratiquent les expériences de terrain,* puisque cela prend beaucoup de temps, avec un coût élevé, pour des résultats qui ne sont pas toujours à la hauteur de l'investissement en plus des difficultés d'interprétation. En outre, les

temps d'analyses relativement longs, dus aux méthodes choisies et au nombre d'échantillons, n'ont pas permis d'ajuster les expériences au fur et à mesure, mais seulement d'une année sur l'autre.

J'ai maintenant conscience de tous les **aspects importants** à prendre en compte aux niveaux **organisationnel, temporel, matériel, financier et humain**, dans un projet incluant des approches de terrain.

4.2.2. Chemin professionnel

D'une manière plus générale, au commencement j'étais dépendante de mon Directeur de thèse pour la plupart des aspects pratiques et théoriques du sujet, alors que maintenant **je suis totalement autonome** sur ces points. J'ai progressivement pris les choses en main, proposé des idées et pris des initiatives, géré les priorités, pris des contacts…

J'ai pu très récemment mettre en valeur mon profil de recherche, mes compétences et mes qualités, lors d'un entretien d'embauche à l'issue duquel **j'ai été recrutée pour un CDD d'un an à Ifremer Nantes dans le laboratoire d'écotoxicologie**. Ma mission va consister à monter un **projet de recherche sur le phytoplancton et la génotoxicité** de certains contaminants, je vais donc pouvoir appliquer tout ce que j'ai appris pendant mon projet de thèse.