



Laboratoire Sécurisation des Productions en Conchyliculture ; Laboratoire d'Ecotoxicologie
Buchet Vincent ; Akcha Farida et Stachowski-Haberkorn Sabine

Date : décembre 2018

Projet Squale

Rapport final



Fiche documentaire

Titre du rapport : Projet Squalé – rapport final	
Référence interne : R.INT.RBE/SG2M/PMMB 18-01 Diffusion : <input checked="" type="checkbox"/> libre (internet) <input type="checkbox"/> restreinte (intranet) – date de levée d’embargo : AAA/MM/JJ <input type="checkbox"/> interdite (confidentielle) – date de levée de confidentialité : AAA/MM/JJ	Date de publication : 2018/12 Version : 1.0.0 Référence de l’illustration de couverture LSPC/Canal d’alimentation principale du polder/2016 Langue(s) : Français
Résumé : Il s’agissait i) de mettre en place un réseau de suivi de la qualité de l’eau, ii) de déterminer la qualité de chaque élevage larvaire dans le but de mettre en évidence un lien éventuel entre la qualité physico-chimique de l’eau de mer et la production conchylicole en écloserie, iii) mettre en évidence, l’influence de l’eau utilisée pour l’élevage, à court-terme, sur la « qualité » physiologique de l’algue fourrage T-iso utilisée pour nourrir les larves et à plus long-terme vérifier si ses capacités de croissance ainsi que sa « qualité » physiologique sont susceptibles d’être modifiées en fonction de la qualité de l’eau issue du polder. Les résultats obtenus ont mis en évidence la présence permanente de contaminants chimiques dans les eaux du polder. Les variations de concentrations observées étant essentiellement liées aux phénomènes météorologiques (pluie). L’influence du Diuron (molécule de référence, présente dans les eaux du polder) a pu être mise en évidence sur la vitesse de croissance de Tiso et sur sa composition lipidique. La pérennisation du suivi (plus léger) de la qualité des eaux semble être justifiée.	
Mots-clés : Contaminants chimiques ; huîtres ; écloserie ; Polder ostréicole ; T iso	

Commanditaire du rapport : Syndicat Mixte pour Développement de l’Aquaculture en Pays de la Loire	
Nom / référence du contrat : Projet Squalé - Convention N° 2016_03952 <input type="checkbox"/> Rapport intermédiaire <input checked="" type="checkbox"/> Rapport définitif (réf. bibliographique Archimer: 58885)	
Projets dans lesquels ce rapport s’inscrit (programme européen, campagne, etc.) : Squalé (Appel à projets SMIDAP 2016)	
Auteur(s) / adresse mail	Affiliation/Direction/Service, laboratoire
V. Buchet / Vincent.Buchet@ifremer.fr	RBE/SGMM/LSPC
F. Akcha / Farida.Akcha@ifremer.fr S. Stachowski-Haberkorn / Sabine.Stachowski.Haberkorn@ifremer.fr	RBE/BE/EX
Destinataire : Syndicat mixte pour le développement de l’aquaculture en Pays de la Loire (Smidap)	

1. Contexte

En 2016, le polder de Bouin regroupe à lui seul près d'un tiers des ostréiculteurs régionaux, le Comité Régional de Conchyliculture Pays de la Loire regroupe près de 350 entreprises ostréicoles pour une production voisine de 7 000 à 8 000 tonnes, soit 8 à 9 % de la production française. Par ailleurs, le secteur de la baie de Bourgneuf (incluant les zones de production de Bouin et Noirmoutier) est le premier centre français de production de naissain d'écloserie pré-grossi. Il assure près de 70 à 75 % de l'approvisionnement français en naissain d'écloserie, soit une production dépassant le milliard de naissains. La production totale de la Région Pays de la Loire, est de 16 000 t de coquillages, ce qui la place au 4ème rang des régions de production conchylicole françaises ; elle est au premier rang des régions en ce qui concerne la production de naissain d'écloserie d'huitre creuse et en élevage de coques.

En écloserie, comme en milieu ouvert, une qualité d'eau adéquate est indispensable aux différentes étapes, de la fécondation jusqu'à la fixation du naissain. Or, malgré les traitements mis en place en amont des différents établissements du Polder de Bouin (filtration fine jusqu'à 1 µm et désinfection par rayonnements Ultra-Violets), la non atteinte du stade de larves D dans les éclosiers d'huîtres et le mauvais développement de la micro-algue fourrage T-Iso (*Isochrysis galbana*) sont constatés de manière ponctuelle depuis 2008, parfois de façon simultanée dans plusieurs établissements du polder. Ces phénomènes sont à la fois observés dans les éclosiers et dans les établissements d'algoculture. Ces incidents d'élevage qui se caractérisent par des ralentissements de croissance, des malformations larvaires, voire des mortalités massives restent inexpliqués. Il semble donc que la cause de ces phénomènes soit extérieure mais commune aux établissements ostréicoles, dans ce cas, l'eau d'alimentation, peut être considérée comme la source des incidents. Les caractéristiques de l'eau du polder sont très variables et susceptibles d'évolution notamment en fonction des conditions météorologiques de l'eau. Par ailleurs, la présence au sein de l'écosystème du polder de Bouin de produits phytosanitaires est certifiée. Les observations des professionnels orientent également la recherche de la cause de ces mortalités sur les contaminants chimiques, notamment les pesticides utilisés par l'agriculture, dont les exploitations du polder agricole, qui jouxtent le polder conchylicole. Ces contaminants sont aussi utilisés par les particuliers. Il est donc apparu indispensable d'apporter des éléments de compréhension de ces phénomènes afin de rendre durable cette activité économique.

La construction de ce projet s'est appuyée sur les résultats, les analyses et les conclusions de deux projets :

Tout d'abord un premier projet, mené au sein du laboratoire d'Écotoxicologie de l'Ifremer à Nantes, qui avait pour objet l'Utilisation d'Incubateurs in Situ pour l'Évaluation de la qualité chimique des eaux côtières et de son Impact sur le développement et la survie des huîtres (INSEV3I). Ce travail a permis de démontrer la présence de résidus de pesticides dans l'eau qui alimente la station Ifremer de Bouin. Ces résultats ont été présentés lors du séminaire de restitution des projets du SMIDAP. Or des effets toxiques des pesticides sur les stades précoces d'huîtres ont été démontrés en laboratoire ces dernières années à des concentrations qui étaient réalistes en regard de celles de l'environnement (Akcha F. *et al.* 2012).

Ensuite le projet LEAUPOLD dont l'objectif était d'obtenir des données qui devaient permettre la mise en relation entre des incidents d'élevages observés dans les établissements du polder et des dégradations brusques de la qualité des eaux d'alimentation.

Afin d'apprécier l'évolution de la qualité de l'eau du polder, ce rapport centralise les publications et analyses d'eau (marine, douce, saumâtre, salée souterraine) ainsi que des observations faites depuis plusieurs années dans les élevages. En plus de l'activité agricole voisine au polder conchylicole, l'analyse des documents existants et des pratiques actuelles de gestion de l'eau alimentant le polder ont permis d'identifier deux autres causes possibles d'une dégradation de la qualité de l'eau. En effet, le polder est un exutoire pour certains étiers traversant des zones de maraîchage et des zones péri-urbaines présentes sur le bassin versant de la Baie de Bourgneuf. Par ailleurs, cette dernière est également soumise à l'influence du panache de la Loire (dans certaines conditions) qui peut être une source de contaminants chimiques. Ce projet a permis la mise en évidence du manque de données fiables disponibles permettant d'envisager des solutions de gestion de l'eau par les structures ostréicoles.

Cependant, les informations recueillies devraient permettre de déterminer le bien-fondé et les composantes d'un suivi de la qualité de l'eau. Dans cette optique, les élevages conchylicoles et la production de micro-algues seraient un indicateur de l'état écologique du polder (Hatt P.J. *et al.* 2015).

Par ailleurs ce projet vient s'appuyer sur le projet ADAQUA (financement SMIDAP 2015) qui avait pour objectif d'évaluer la faisabilité technico-économique d'un traitement par adsorption sur charbon actif en grains pour alimenter des élevages larvaires d'huîtres. Dans ce projet, sept élevages larvaires étaient programmés de mars 2016 à octobre 2016, ce qui permettra au laboratoire d'Écotoxicologie de Nantes (Laboratoire EX) de poursuivre et de compléter le travail initié au niveau du Polder de Bouin en profitant ainsi de la production de larves sur une saison complète et en considérant également la micro-algue fourrage T-iso comme espèce cible. Ainsi les résultats obtenus pourront être confrontés aux retours des professionnels et aux résultats des analyses chimiques réalisées sur la même période et à des points stratégiques du Polder de Bouin.

Les résultats de ce projet devraient permettre aux établissements de mettre en œuvre des stratégies de gestion de l'eau alimentant leurs établissements, soit en mettant en œuvre des plans de gestion de l'eau adaptés aux variations éventuelles des caractéristiques de l'eau soit en mettant en œuvre des systèmes de traitement adaptés à chaque situation (type de pollution, espèce et stade d'élevage).

2. Objectifs et organisation du projet

Le projet Squale avait pour objectif principal de mettre en évidence les relations entre la dégradation de la qualité des eaux et les éventuels incidents d'élevages. L'installation d'un "réseau" d'échantillonneurs passifs (POCIS) aux différentes entrées d'eau et dans le polder permettra de suivre l'évolution des concentrations en pesticides.

Simultanément, une démarche devait être initiée en concertation avec les professionnels afin d'élaborer une méthode de recueil fiable et anonyme des incidents observés dans les différents établissements.

En parallèle, le laboratoire EX devait réaliser des mesures de toxicité sur les larves d'huîtres issus des élevages, en abordant la génotoxicité de l'eau d'alimentation sur les stades précoces de l'huître creuse ; des tests des comètes étant réalisés sur larves trocophores. En fonction des résultats (test des comètes et anomalies larvaires), des analyses supplémentaires pouvaient être réalisées a posteriori pour la mesure de l'expression de gènes marqueurs d'embryotoxicité (RT-QPCR).

La mesure de paramètres de viabilité et de fonctionnalité cellulaire sur i) de la micro algue T. iso cultivée à Bouin ii) la culture de référence du laboratoire EX sera effectuée par analyses en cytométrie en flux.

L'ensemble des résultats obtenus devrait permettre de mieux comprendre comment les épisodes de pollution agissent sur les performances d'élevage (dégradation de la qualité des micro-algues fourrage, toxicité sur les larves).

Pour cela, le projet SQUALE se décline en 3 tâches.

2.1 Tâche 1

Il s'agit de mettre en place un réseau de points de suivi de la qualité de l'eau. Deux points seront situés aux deux entrées d'eau du polder (sud et nord). Deux points seront déterminés en concertation avec les professionnels en fonction des établissements les plus représentatifs en termes de gestion de l'eau. Ces points seront situés dans le canal d'aménée au droit des canaux secondaires alimentant les établissements identifiés. Ce suivi sera réalisé par la mise à l'eau d'échantillonneurs passifs sur des durées de 3 semaines couvrant au final une période d'un an.

Un suivi de la qualité physico-chimique de l'eau sera assuré en partie par les professionnels dont les établissements auront été retenus. Ce dispositif permettra de suivre en continu l'évolution annuelle de la qualité chimique de l'eau circulant dans le polder de Bouin ; suivi physico-chimique et suivi de la concentration en pesticides.

Parallèlement, une démarche de signalisation d'incidents d'élevage sera établie et les modalités de renseignement seront également définies. Cette phase sera menée en concertation avec les professionnels présents sur le polder de Bouin.

- Recensement des incidents d'élevage intervenus et mise en parallèle avec les profils de la qualité de l'eau observés sur la même période.
- Identification de stratégies de gestion de l'eau.

2.2 Tâche 2

L'objectif de cette tâche est de déterminer la qualité de chaque élevage larvaire dans le but de mettre en évidence un lien éventuel entre la qualité physico-chimique de l'eau de mer (pH, salinité, température, concentrations en pesticides) et la production conchylicole en éclosérie. La qualité des larves sera mesurée par la croissance, l'intégrité de l'ADN (test des comètes au stade trocophore) et les anomalies de développement au stade de larves D (observation microscopique, mesure de gènes marqueurs d'embryotoxicité par QPCR).

2.3 Tâche 3

Cette tâche a deux objectifs. Le premier est la mise en évidence, d'une influence de l'eau utilisée pour l'élevage, à court-terme, sur la « qualité » physiologique de l'algue fourrage T-iso utilisée pour nourrir les larves. Dans ce but, les cultures utilisées pour le nourrissage seront échantillonnées et la qualité des micro-algues évaluée par différentes mesures et marquages au moyen de la cytométrie en flux (morphologie, fluorescence, contenu lipidique, présence d'espèces réactives de l'oxygène). Des mesures de mobilité seront également réalisées par microscopie.

Le second objectif est de déterminer si l'eau d'élevage exerce une influence à plus long-terme sur l'algue fourrage, c'est-à-dire vérifier si ses capacités de croissance ainsi que sa « qualité » physiologique sont susceptibles d'être modifiées en fonction de la qualité de l'eau issue du polder. Pour cela, au cours de chaque élevage, la souche de T-iso maintenue en laboratoire sera cultivée en batch durant un cycle de croissance (environ 5 jours) à la fois en milieu de culture standard et également dans l'eau d'élevage comme pratiqué en éclosérie. La comparaison de ces deux conditions permettra de mettre en évidence une éventuelle influence des différentes qualités de l'eau utilisées au cours des différents élevages réalisés. En parallèle, à chaque élevage, des cultures de ces deux conditions seront également exposées à un témoin positif de toxicité (herbicide diuron) aux effets connus. Cette exposition permettra d'appréhender l'influence de la qualité de l'eau d'élevage sur la capacité des algues à supporter une exposition toxique ; celles-ci pouvant être plus sensibles ou moins sensibles au toxique en fonction du stress engendré par la qualité de l'eau.

3. Réalisation de l'étude

3.1 Mise en relation entre qualité de l'eau et incidents d'élevage

3.1.1 Mise en place du suivi des contaminants dans l'eau



Figure 2: Membranes positionnées dans leur cage de protection avant immersion.

Les membranes utilisées permettent uniquement un suivi des molécules hydrophobes. Le glyphosate n'a donc pas été suivi bien qu'il fasse l'objet d'une actualité importante.

Les valeurs présentées ci-dessous représentent donc des concentrations moyennes observées sur la durée d'immersion des POCIS, de trois à quatre semaines.

Le suivi a débuté au mois de mai 2016 et s'est achevé le 6 juin 2017, suivant le calendrier ci-dessous.

Tableau 1: Calendrier de mise à l'eau et de sortie des POCIS

Entrée Nord (ECN)			Fond canal Nord (FCN)		Entrée Sud (ECS)		Fond canal Sud (FCS)	
Série	Mise à l'eau	Sortie	Mise à l'eau	Sortie	Mise à l'eau	Sortie	Mise à l'eau	Sortie
1	31/05/2016	24/06/2016	31/05/2016	24/06/2016	06/06/2016	17/06/2016	06/06/2016	24/06/2016
2	24/06/2016	18/07/2016	24/06/2016	18/07/2016	24/06/2016	18/07/2016	24/06/2016	18/07/2016
3	18/07/2016	09/08/2016	18/07/2016	09/08/2016	18/07/2016	09/08/2016	18/07/2016	09/08/2016
4	09/08/2016	01/09/2016	09/08/2016	01/09/2016	09/08/2016	01/09/2016	09/08/2016	01/09/2016
5	01/09/2016	26/09/2016	01/09/2016	26/09/2016	01/09/2016	26/09/2016	01/09/2016	26/09/2016
6	26/09/2016	21/10/2016	26/09/2016	21/10/2016	26/09/2016	21/10/2016	26/09/2016	21/10/2016
7	21/10/2016	14/11/2016	21/10/2016	14/11/2016	21/10/2016	14/11/2016	21/10/2016	14/11/2016
8	14/11/2016	12/12/2016	15/11/2016	12/12/2016	15/11/2016	12/12/2016	15/11/2016	12/12/2016
9	03/01/2017	27/01/2017	03/01/2017	27/01/2017	03/01/2017	27/01/2017	03/01/2017	27/01/2017
10	27/01/2017	23/02/2017	27/01/2017	23/02/2017	27/01/2017	23/02/2017	27/01/2017	23/02/2017
11	23/02/2017	20/03/2017	23/02/2017	20/03/2017	23/02/2017	20/03/2017	23/02/2017	20/03/2017
12	20/03/2017	19/04/2017	20/03/2017	19/04/2017	20/03/2017	19/04/2017	20/03/2017	19/04/2017
13	19/04/2017	12/05/2017	19/04/2017	12/05/2017	19/04/2017	12/05/2017	19/04/2017	12/05/2017
14	12/05/2017	08/06/2017	12/05/2017	08/06/2017	12/05/2017	08/06/2017	12/05/2017	08/06/2017

3.1.2 Résultats



Figure 3 : Evolution des concentrations moyennes (ng.l⁻¹) des contaminants chimiques dans les eaux d'alimentation

Sur soixante-huit molécules analysées pendant toute la période de suivi, seulement trente sont détectées. La présence de quatre molécules n'est mise en évidence qu'une seule fois durant tout le suivi, il s'agit de deux fongicides, l'azoxystrobine et le carbendazime (interdite par l'Union Européenne depuis 2009), le prometryne qui est un herbicide et le DIA.

Cependant, la plupart des molécules identifiées présentent des concentrations moyennes relativement faibles, au maximum de l'ordre de quelques centaines de ng/l en concentration cumulée lors des points présentant des valeurs importantes (juin 2016, février et mai 2017).

La majorité des molécules détectées sont des herbicides spécifiques ESA pour le maïs (cf. Annexe I)

Quatre molécules présentent des concentrations significatives tout au long du suivi : le metolachlore, deux de ses dérivés, les metolachlore ESA et OXA et, à un moindre niveau, un dérivé de l'acétolachlore, l'acétolachlore ESA. A noter que ces deux composés, metolachlore et acetolachlore sont interdits en France depuis 2003.

Le metolachlore et ses deux dérivés, s'ils sont présents tout au long de la période étudiée, montrent des concentrations plus importantes du début du suivi jusqu'au 18 juillet. Deux hypothèses peuvent être émises :

- Soit il s'agit de la résultante de son utilisation au cours de cette période, hypothèse qui semble peu probable, puisque cette molécule est interdite en France depuis 2003 ;
- Soit il s'agit d'un relargage de ces molécules emprisonnées dans les sédiments des différents cours d'eau du bassin versant. Cette seconde hypothèse ne sera validée qu'avec la mise en corrélation avec les conditions météorologiques observées pendant tout le suivi. Effectivement, le printemps 2016, a été l'objet de fortes précipitations qui ont pu engendrer ces phénomènes.

Il faut noter également, les inondations majeures survenues à cette période, notamment dans le centre de la France ce qui a impacté le régime hydraulique de la Loire. Ces eaux ont pu être acheminées vers le bassin versant de la baie de Bourgneuf via le canal de Haute perche (Hatt P.J. *et al.* 2015).

Par ailleurs, les Pocis utilisés ne permettent d'analyser que des molécules hydrophobes. Ainsi, il a été mis en parallèle une série de dosage du glyphosate, réalisé dans le cadre du projet ADAQUA à la même période sur les eaux correspondant au point de suivi « Entrée Nord » du canal d'alimentation du polder. Sur l'ensemble des mesures réalisées, seules deux analyses avec présence de glyphosate (légèrement supérieur au seuil de détection), ont été dénombrées.

3.1.3 Corrélation avec les éventuels incidents d'élevage

Dans le cadre du projet LEAUPOLD, il avait été suggéré d'utiliser une fiche navette afin que les professionnels fassent remonter les incidents observés dans leurs installations pour lesquels aucune explication interne à l'entreprise ne pouvait être mise en évidence.

Ce protocole a montré rapidement ses limites dans la mesure où les professionnels ont souvent oublié de remplir et transmettre cette fiche.

Des entretiens en direct, afin de recueillir les informations utiles, ont donc été menés. Au total, quatre entretiens ont pu être réalisés.

De ceux-ci ; il est ressorti qu'au printemps 2016, à partir du mois de juin, les élevages larvaires ont globalement été difficiles à réaliser voire impossible à la fin du printemps. Ceci peut être mis en relation avec les concentrations relativement élevées observées à cette période.

3.2 Influence de la qualité chimique de l'eau d'élevage sur la qualité des larves issues des élevages larvaires

Rappel des objectifs de la tâche 2 « Influence de la qualité chimique de l'eau d'élevage sur la qualité des larves issues des élevages larvaires »

Cette tâche avait pour objectif d'étudier le lien qui pourrait exister entre la qualité physico-chimique de l'eau de mer telle qu'elle peut être évaluée par sa valeur de pH, sa salinité, sa température, et sa concentration en pesticides, et la production conchylicole en éclosion (qualité des larves). Concernant ce dernier point, il s'agissait de suivre la croissance de chaque élevage larvaire, mesurer l'intégrité de l'ADN des larves au stade trocophore par le test des comètes, ainsi que les anomalies de développement au stade de larves D.

Le test des comètes a été appliqué comme préalablement décrit (Behrens *et al.* 2016). Au cours de l'année 2016, les fécondations réalisées ont conduit à des élevages larvaires de très mauvaises qualités qui ne nous ont pas

permis d'obtenir de résultats par le test des comètes (les noyaux analysés présentaient tellement de dommage que les lames étaient inexploitable par le logiciel Komet). En 2017, sur les trois élevages larvaires réalisés deux ont pu être exploités, ceux issus de la fécondation du 1er mars et du 28 juin 2017. L'application du test des comètes a montré une différence significative dans le niveau de dommage à l'ADN des cellules larvaires d'huître, les larves obtenues au mois de mars présentent un niveau de dommage plus élevé que les larves obtenues au mois de juin. Pour autant, le pourcentage de dommage à l'ADN reste faible, inférieure à 15%.

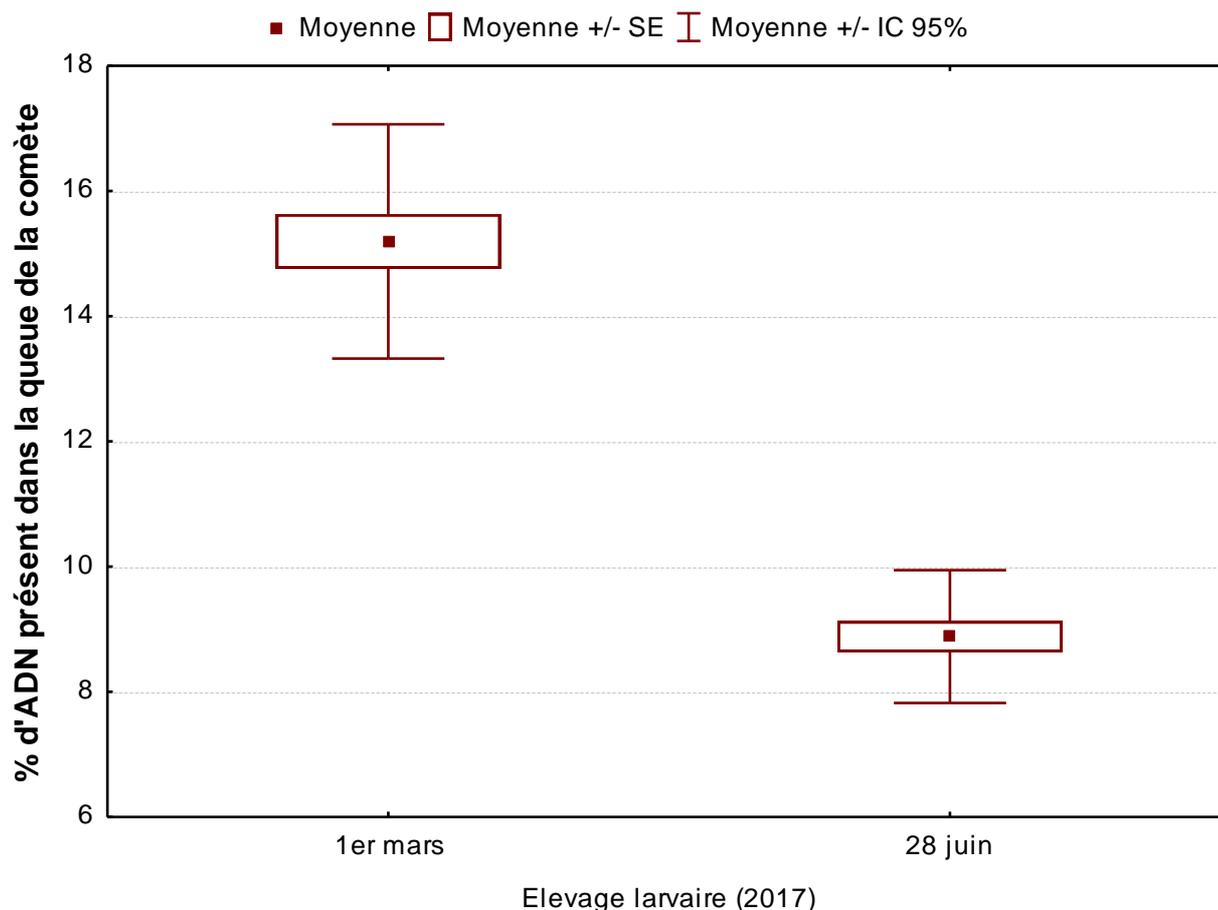


Figure 4 : Niveau de fragmentation de l'ADN des cellules de larves trocophores collectées dans le cadre des élevages larvaires pour l'année 2017.

3.3 Influence de la qualité chimique de l'eau d'élevage sur l'algue fourrage T-iso

Rappel des objectifs de la tâche 3 « Influence de la qualité chimique de l'eau d'élevage sur l'algue fourrage T-iso ».

Le premier objectif est de déterminer, en début d'élevage, si l'eau utilisée pour l'élevage (qui sera par la suite nommée « effluent ») exerce une influence à court-terme sur la « qualité » physiologique de l'algue fourrage T-iso utilisée pour nourrir les larves. Dans ce but, les cultures utilisées pour le nourrissage sont échantillonnées et la qualité des micro algues évaluée par différentes mesures et marquages au moyen de la cytométrie en flux. Le second objectif est de déterminer si l'eau d'élevage exerce une influence à plus long-terme sur l'algue fourrage, sur sa croissance ainsi que sa « qualité » physiologique, en condition témoin mais également en présence d'un stress toxique.

Pour la tâche 3, six expérimentations ont été réalisées, adossées aux élevages larvaires : trois en 2016 et trois en 2017. Chaque expérimentation s'est déroulée en deux étapes : une intervention au sein de la Plateforme Expérimentale Mollusques Marins de Bouin suivie par la mise en place d'une expérimentation au Laboratoire EX à Ifremer Nantes.

Intervention à Bouin (24h après la fécondation) : état physiologique de la culture utilisée pour le nourrissage.

Lors de chaque fécondation, un échantillon de culture a été prélevé 24h après avoir été dilué dans l'effluent. Au moyen de la cytométrie en flux, son état physiologique a été comparé avec celui de la culture initiale (culture-mère), non diluée, conservée dans du milieu de culture optimal. L'analyse des échantillons par cytométrie en flux a permis de comparer, sur ces deux conditions, la fluorescence naturelle des cellules liée aux pigments chlorophylliens (FL3-Chlorophylle), et certains paramètres physiologiques au moyen de marquages par des fluorochromes. Ainsi, la présence d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) au sein des cellules a été évaluée grâce à l'utilisation du DCFH-DA et renseigne sur la présence potentielle d'un stress oxydant plus ou moins élevé (FL1-ERO) ; le contenu lipidique relatif des cellules a quant à lui été évalué à l'aide du BODIPY505/515 (FL1-Lipides). La significativité des résultats présentés dans cette partie a été analysée au moyen d'une analyse de variance avec un seuil d'erreur α de 5%.

L'effluent exerce-t-il une influence sur la qualité physiologique de la culture utilisée pour le nourrissage des larves ?

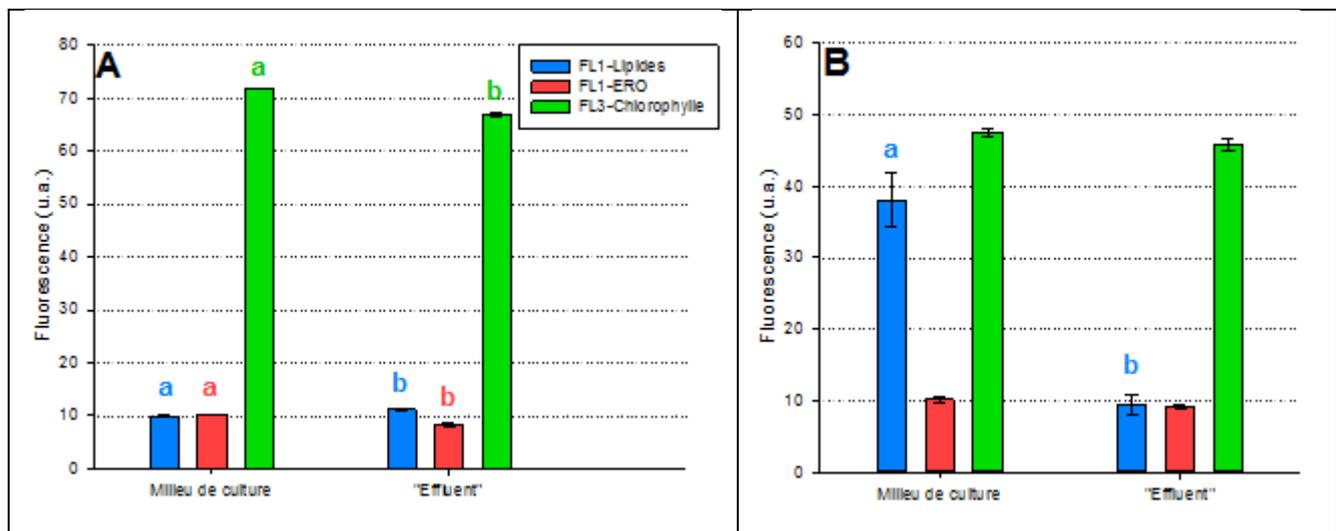


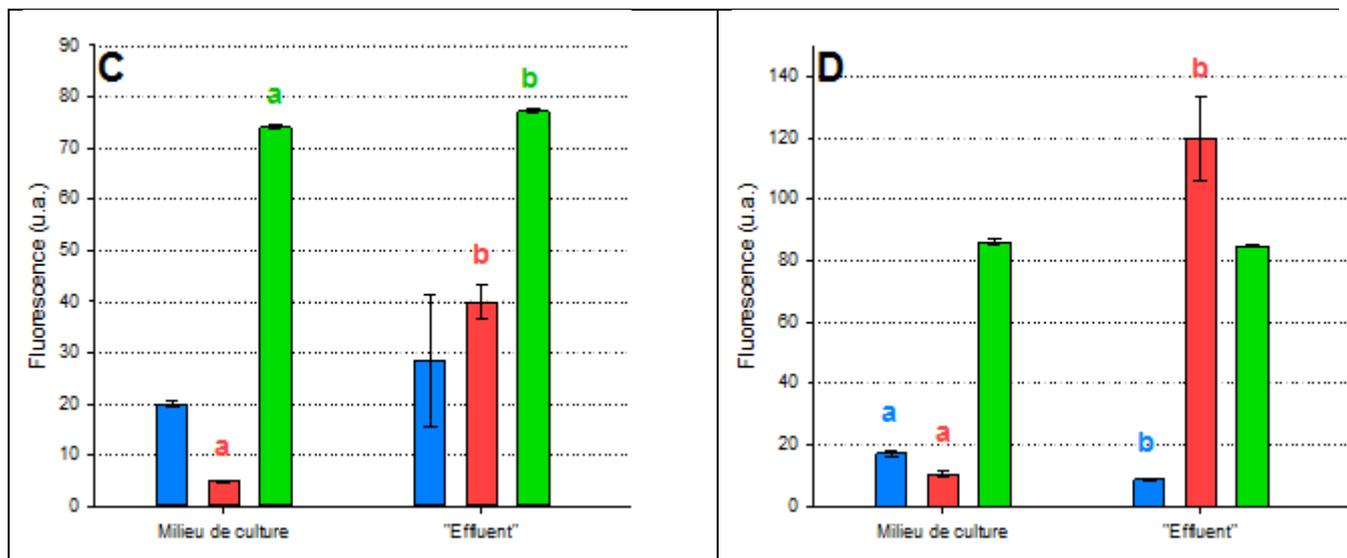
Figure 5 : Mesures de fluorescence effectuées par cytométrie en flux sur Tiso : culture-mère cultivée dans son milieu de culture optimal, et culture utilisée pour le nourrissage, diluée dans l'effluent. FL1-Lipides : fluorescence verte liée à la quantité relative de lipides intracellulaires ; FL1-ERO : fluorescence verte liée à la quantité relative d'espèces réactives de l'oxygène intracellulaires ; FL3-Chlorophylle : fluorescence rouge liée à la quantité relative de pigments chlorophylliens intracellulaires. Élevages larvaires réalisés en A : juillet 2016 ; B : août 2016. Les lettres différentes (par paramètre) indiquent une différence significative entre la culture-mère et la culture ayant passé 24h dans l'effluent ($p < 0.05$).

L'élevage réalisé en juin 2016 n'a pas permis d'obtenir des données exploitables du fait d'un problème sur les marquages effectués. Il est à noter que les valeurs de fluorescence ne sont ici qu'indicatives, et varient d'une expérimentation à l'autre, dépendant à la fois de la machine (calibration et usure du laser) et des fluorochromes (état de conservation, fraîcheur des solutions). Il convient donc de ne pas tenir compte des valeurs absolues de fluorescence. Même si des différences statistiquement significatives sont mises en évidence, aucune tendance nette n'apparaît ici : lors de l'élevage réalisé en juillet (Figure 5A), la culture diluée dans l'effluent semble avoir légèrement plus de contenu lipidique que la culture-mère, moins d'ERO et moins de pigments chlorophylliens.

En août au contraire (Figure 5B), la seule différence notable intervient sur le contenu lipidique avec une culture mère bien plus riche en lipides que la culture diluée, ce qui est peu surprenant : en effet le contenu lipidique dépend fortement de l'état physiologique des cultures. Il est probable que la culture-mère utilisée ait été dans une phase de ralentissement de croissance propice à l'accumulation de réserves, ce qui n'était pas le cas en juillet. La dilution dans un nouveau substrat entraîne de profondes modifications physiologiques avec une consommation des réserves et un passage en phase de division cellulaire.

Concernant les élevages larvaires réalisés en 2017 (Figure 6), il est également observé un contenu relatif en lipides significativement moindre dans les cultures de nourrissage en avril (Figure 6D) et juin (Figure 6E), comme en août 2016. En mars (Figure 6C) et avril 2017 (Figure 6D), une augmentation significative du contenu relatif en ERO est observée dans les cultures servant au nourrissage par rapport à la culture-mère, ce qui peut témoigner d'un stress potentiel des conditions de culture des cellules dans l'effluent à ces deux périodes. Cette tendance n'est pas observée en juin 2017. Enfin, le contenu relatif en pigments chlorophylliens varie tantôt dans le sens d'une augmentation (mars 2017, Figure 6C), tantôt dans le sens d'une diminution chez la culture de nourrissage par rapport à la culture-mère (juin 2017 Figure 6E). Ce dernier paramètre est susceptible de varier selon les conditions d'exposition des cellules à la lumière ambiante : cette dernière diffère fortement entre la salle de culture où est disposée la culture-mère, et la salle où est disposé l'élevage larvaire.

Conclusion : l'état physiologique des cultures utilisées pour le nourrissage semble témoigner d'une potentielle source de stress dans l'effluent, ayant conduit à une augmentation des ERO intracellulaires chez la culture de Tiso lors des élevages larvaires réalisés en mars et avril 2017.



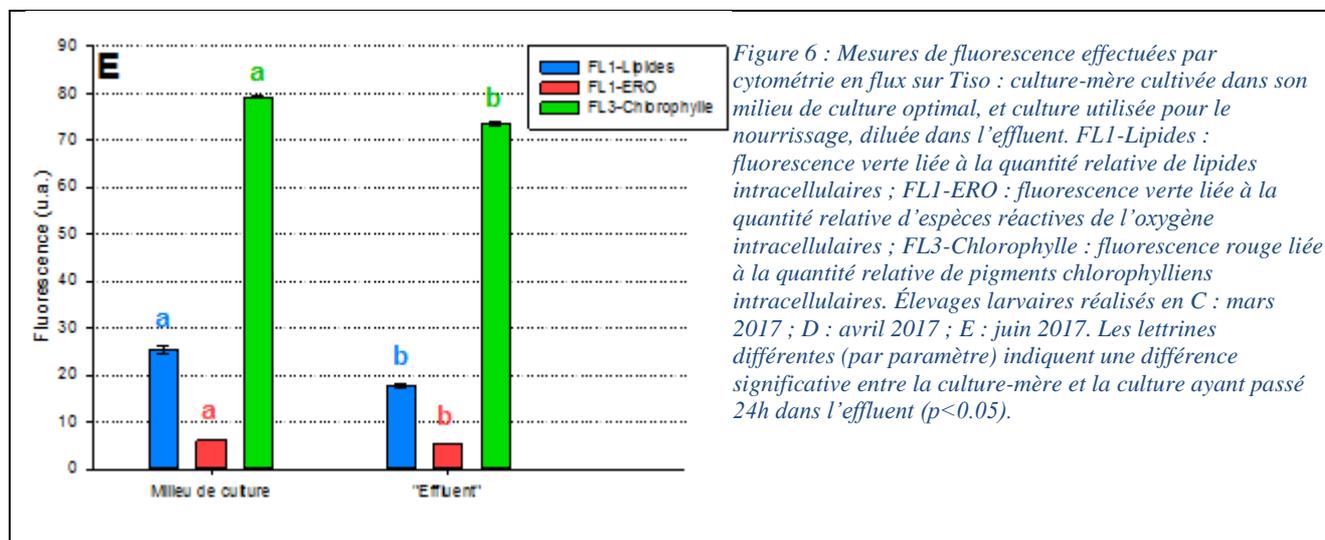


Figure 6 : Mesures de fluorescence effectuées par cytométrie en flux sur Tiso : culture-mère cultivée dans son milieu de culture optimal, et culture utilisée pour le nourrissage, diluée dans l'effluent. FL1-Lipides : fluorescence verte liée à la quantité relative de lipides intracellulaires ; FL1-ERO : fluorescence verte liée à la quantité relative d'espèces réactives de l'oxygène intracellulaires ; FL3-Chlorophylle : fluorescence rouge liée à la quantité relative de pigments chlorophylliens intracellulaires. Élevages larvaires réalisés en C : mars 2017 ; D : avril 2017 ; E : juin 2017. Les lettres différentes (par paramètre) indiquent une différence significative entre la culture-mère et la culture ayant passé 24h dans l'effluent ($p < 0.05$).

Après les mesures effectuées à la station de Bouin, un échantillon de 2 L d'effluent a été prélevé pour l'étape suivante qui a été réalisée au Laboratoire EX à Nantes.

Influence de l'effluent sur la capacité de croissance de la micro algue en présence de stress.

Une culture de Tiso a été utilisée pour évaluer l'effet du contact prolongé avec l'effluent, au cours d'expérimentations qui se sont déroulées sur plusieurs jours dans quatre conditions (Tableau 2). Une condition de stress a été testée, correspondant à l'exposition de la micro algue à l'herbicide diuron à 1.9 µg/L. Cette concentration a induit une inhibition de croissance de 25% de la souche au cours d'expériences préalables après 96h d'exposition : il s'agit d'une référence de toxicité. Ainsi il a été possible de comparer la réponse de la souche face à ce stress chimique selon qu'elle était cultivée dans son milieu de culture habituel ou dans l'effluent. Au cours de ces expérimentations, un suivi quotidien de la croissance a été effectué de manière à déterminer le taux de croissance des cultures en fin d'expérience. En complément, d'autres paramètres ont été mesurés sur les cultures en fin d'expérience : la présence d'ERO ainsi que le contenu lipidique par cytométrie en flux, et l'efficacité photosynthétique. Il a ainsi été possible de comparer la capacité de croissance de la souche dans l'effluent et dans son milieu de culture, en condition optimale (témoin) ou en condition de stress (diuron), ainsi que son état physiologique. De cette manière, une influence éventuelle de l'effluent sur la sensibilité de la souche face à un stress chimique a été recherchée.

Tableau 2 : Conditions d'exposition de la souche Tiso lors des expérimentations réalisées au laboratoire EX. Les expositions ont été réalisées en triplicats, pendant 4 à 7 jours.

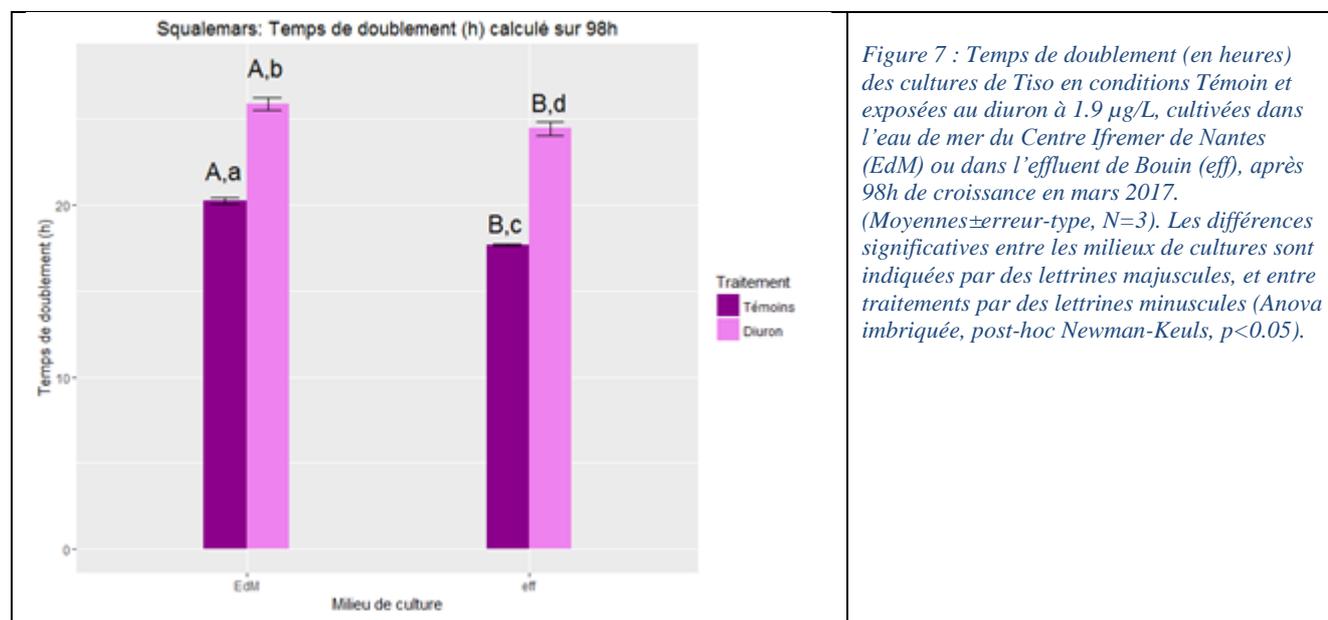
Milieu f/2 (2016) ou eau de mer Ifremer « corrigée » (2017)	« Effluent » : eau du polder non enrichie (2016) ou « corrigée » (2017)
Témoins : souche + milieu de culture	Témoins : souche + effluent
Diuron : souche + milieu de culture + diuron 1.9 µg/L (CE ₂₅)	Diuron : souche + effluent + diuron 1.9 µg/L (CE ₂₅)

L'effluent influence-t-il la réponse de la souche face à un stress chimique ?

Expérimentations réalisées en 2016 (croissance)

En résumé, au cours des expérimentations réalisées en 2016 au laboratoire EX, une différence notable de croissance a été observée entre le milieu de culture et l'effluent : ce dernier semblait très limitant en nutriments. Les résultats obtenus, bien qu'interprétables, présentaient donc des biais non négligeables liés à une phase de croissance exponentielle relativement courte chez la souche cultivée dans l'effluent. Ces résultats ne sont donc pas présentés. Le protocole expérimental a ainsi été modifié en 2017 de manière à tenter d'ajuster les concentrations des principaux nutriments présents dans l'effluent de Bouin et dans l'eau de mer utilisée à Ifremer Nantes. La significativité des résultats présentés dans cette partie a été analysée au moyen d'une analyse de variance imbriquée, suivie d'un test post-hoc de Newman-Keuls avec un seuil d'erreur α de 5%.

Expérimentations réalisées en 2017



L'expérimentation réalisée met en évidence un effet significatif du milieu puisque le temps de doublement des cultures est plus court dans l'effluent (Figure 7), semblant indiquer une croissance plus rapide dans ce dernier ; pour autant, l'effet du diuron sur l'inhibition de croissance s'en trouve exacerbé, avec une inhibition de 38% dans l'effluent contre 28% dans l'eau de mer d'Ifremer Nantes. Ici la souche de Tiso apparaît donc comme plus sensible au stress chimique dans l'effluent du mois de mars 2017, tel que mesuré sur l'inhibition de son temps de doublement après 98 heures d'exposition à 1.9 µg/L de diuron. Les mesures d'efficacité photosynthétique n'ont pas pu être réalisées à 98h d'exposition.

Les paramètres physiologiques mesurés par cytométrie en flux à l'aide de fluorochromes indiquent également un effet du milieu de culture avec notamment un contenu lipidique global plus élevé dans les cultures cultivées en eau de mer d'Ifremer Nantes (Figure 8, Gauche). Le diuron provoque une chute drastique du contenu relatif en lipides dans les deux types de milieux, cet effet étant plus marqué dans l'effluent avec une diminution de 68% contre 54% dans l'eau de mer de Nantes. Les mesures de contenu relatif en ERO ont indiqué des résultats significatifs uniquement dans le cas de l'effluent avec une tendance contraire à celle attendue (Figure 8, Droite) : ici c'est la condition témoin qui montre un contenu relatif plus élevé en ERO. Ce résultat reste inexplicé.

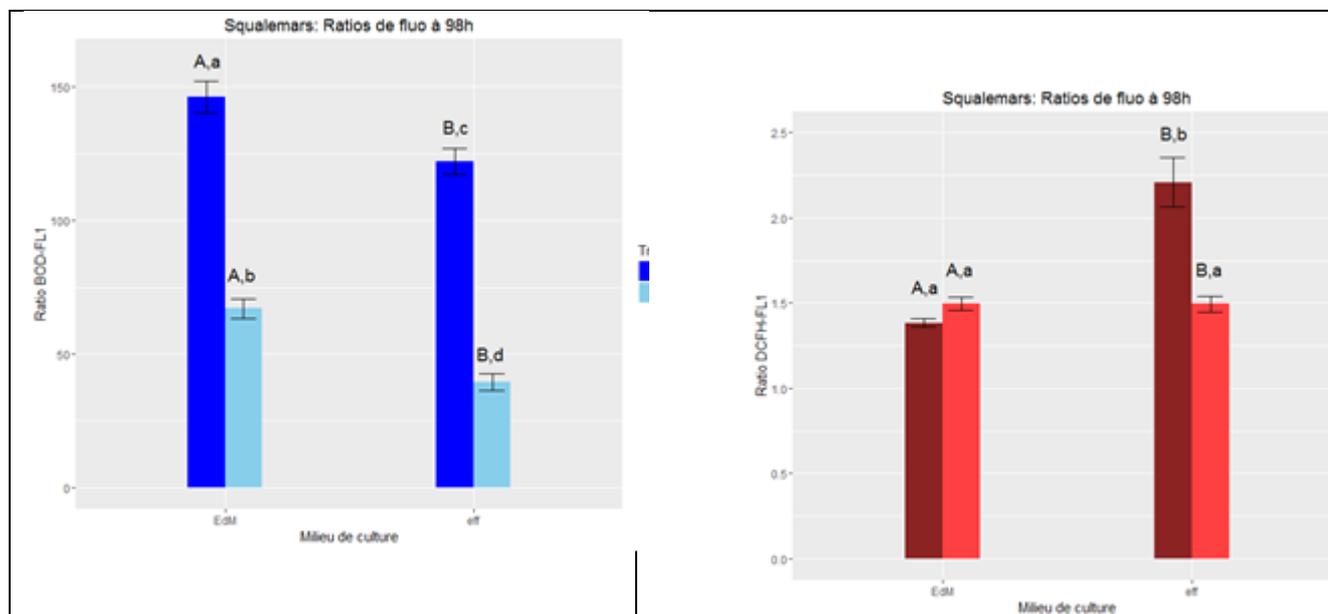


Figure 8 : Réponses des cultures de Tiso en conditions Témoin et exposées au diuron à 1.9 µg/L, cultivées dans l'eau de mer du Centre Ifremer de Nantes (EdM) ou dans l'effluent de Bouin (eff), après 98h de croissance en mars 2017. (Moyennes±erreur-type, N=3). Les différences significatives entre les milieux de cultures sont indiquées par des lettres majuscules, et entre traitements par des lettres minuscules (Anova imbriquée, post-hoc Newman-Keuls, $p < 0.05$). Gauche : Ratio BOD-FLI : ratio de fluorescence verte lié à la quantité relative de lipides intracellulaires. Droite : Ratio DCFH-FLI : ratio de fluorescence verte liée à la quantité relative d'espèces réactives de l'oxygène intracellulaires.

Au mois d'avril, l'exposition a duré 91h. Les temps de doublement ont été similaires dans les deux milieux de culture (Figure 9, Gauche), tandis que l'inhibition de ces derniers par l'exposition à 1.9 µg/L de diuron a donné des résultats relativement proches, avec des pourcentages de 51% dans l'eau de Nantes et de 55% dans l'effluent. Cette tendance n'est pas retrouvée au niveau de l'efficacité de photosynthèse (Figure 9, Droite) où il est constaté des valeurs globales moindres dans l'effluent qui pourraient témoigner de cultures moins performantes du point de vue photosynthétique ; en revanche, l'inhibition induite par le diuron y est également moins marquée.

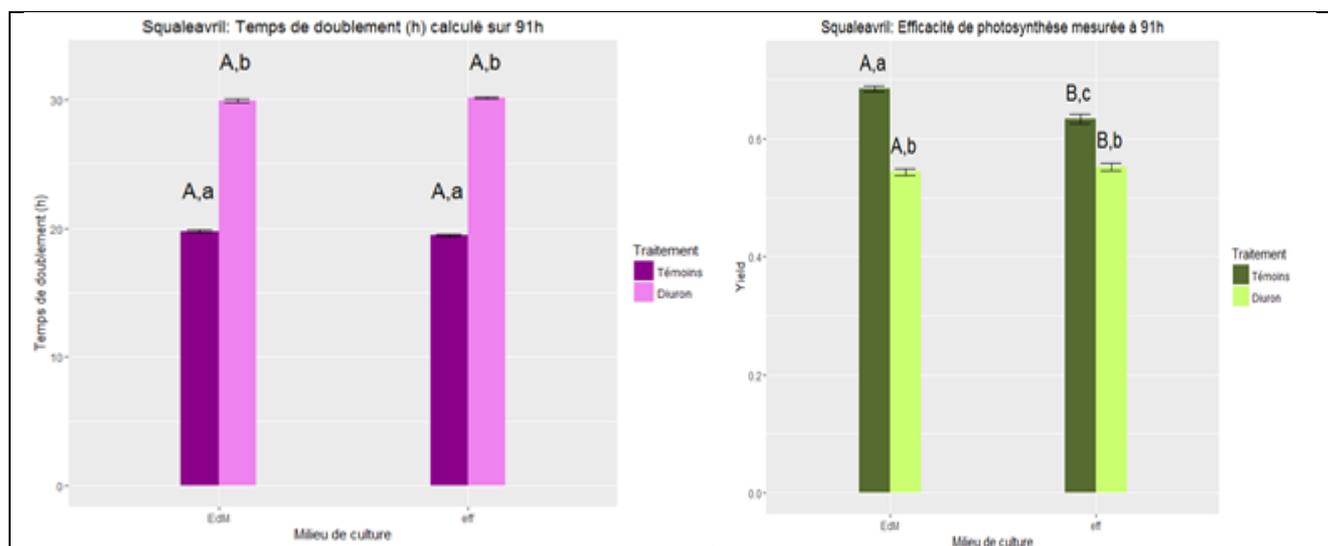


Figure 9 : Réponses des cultures de Tiso en conditions Témoin et exposées au diuron à 1.9 µg/L, cultivées dans l'eau de mer du Centre Ifremer de Nantes (EdM) ou dans l'effluent de Bouin (eff), après 91h de croissance en avril 2017. (Moyennes±erreur-type, N=3). Les différences significatives entre les milieux de cultures sont indiquées par des lettres majuscules, et entre traitements par des lettres minuscules (Anova imbriquée, post-hoc Newman-Keuls, $p < 0.05$). Gauche : temps de doublement (en heures). Droite : efficacité de photosynthèse (sans unité).

Les marquages effectués par cytométrie en flux indiquent, pour les lipides, un contenu global moindre dans le milieu constitué par l'eau de Nantes (Figure 10, Gauche). Il est noté également un effet d'inhibition relatif plus marqué dans les cultures exposées au diuron dans l'effluent de Bouin, comme c'était déjà le cas sur l'expérimentation du mois de mars 2017. Quant aux ERO (Figure 10, Droite), bien que la p-value de l'ANOVA globale ne soit pas significative au seuil de 5% ($p = 0.0631$), il est observé une tendance très similaire à celle déjà observée en mars, avec un résultat contraire à celui attendu dans l'effluent : toutefois celle-ci pourrait s'expliquer par un Témoin de piètre qualité dû à un réplicat présentant une valeur de fluorescence très élevée, dont la mesure n'a pas pu être reproduite.

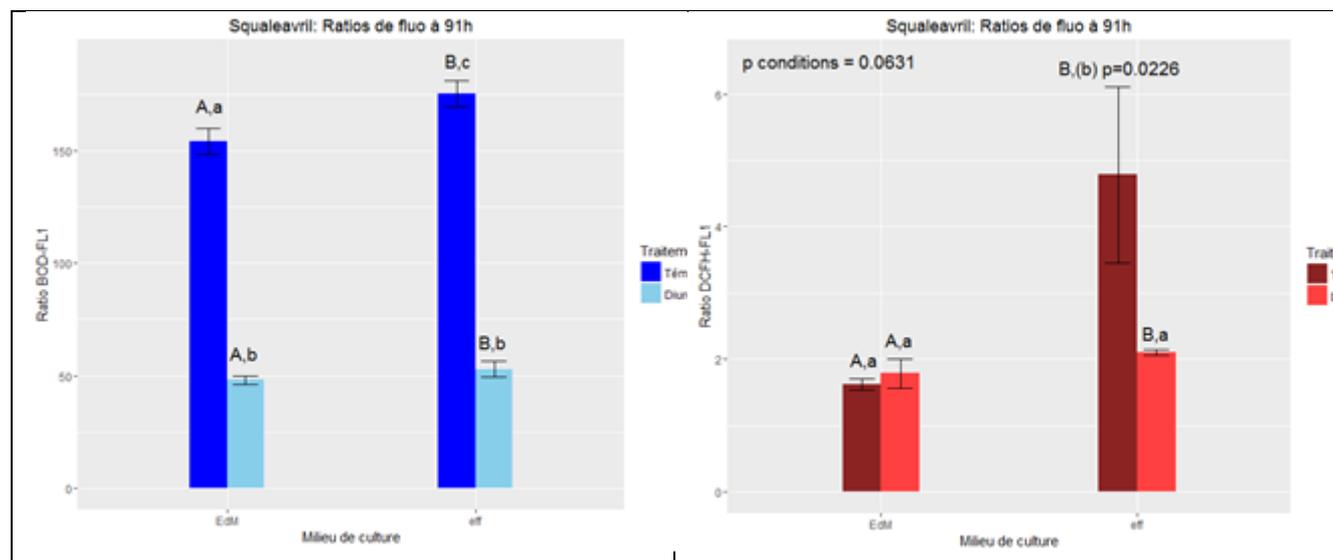


Figure 10 : Réponses des cultures de *Tiso* en conditions Témoin et exposées au diuron à 1.9 µg/L, cultivées dans l'eau de mer du Centre Ifremer de Nantes (EdM) ou dans l'effluent de Bouin (eff), après 91h de croissance en avril 2017. (Moyennes±erreur-type, N=3). Les différences significatives entre les milieux de cultures sont indiquées par des lettres majuscules, et entre traitements par des lettres minuscules (Anova imbriquée, post-hoc Newman-Keuls, $p < 0.05$). Gauche : Ratio BOD-FLI : ratio de fluorescence verte lié à la quantité relative de lipides intracellulaires. Droite : Ratio DCFH-FLI : ratio de fluorescence verte liée à la quantité relative d'espèces réactives de l'oxygène intracellulaires.

Enfin, la dernière expérimentation d'exposition a eu lieu en juin 2017 et a duré 90h. Bien que la croissance de la souche n'ait pas significativement différencié entre les deux milieux de culture, une inhibition légèrement plus marquée a été mesurée dans l'effluent, de 23% contre 20% dans l'eau de mer de Nantes (Figure 11, Gauche). Cette inhibition est également un peu plus élevée dans l'effluent au niveau de l'efficacité photosynthétique, mais reste dans le même ordre de grandeur même si significativement différente entre les deux milieux : autour de 17% (Figure 11, Droite).

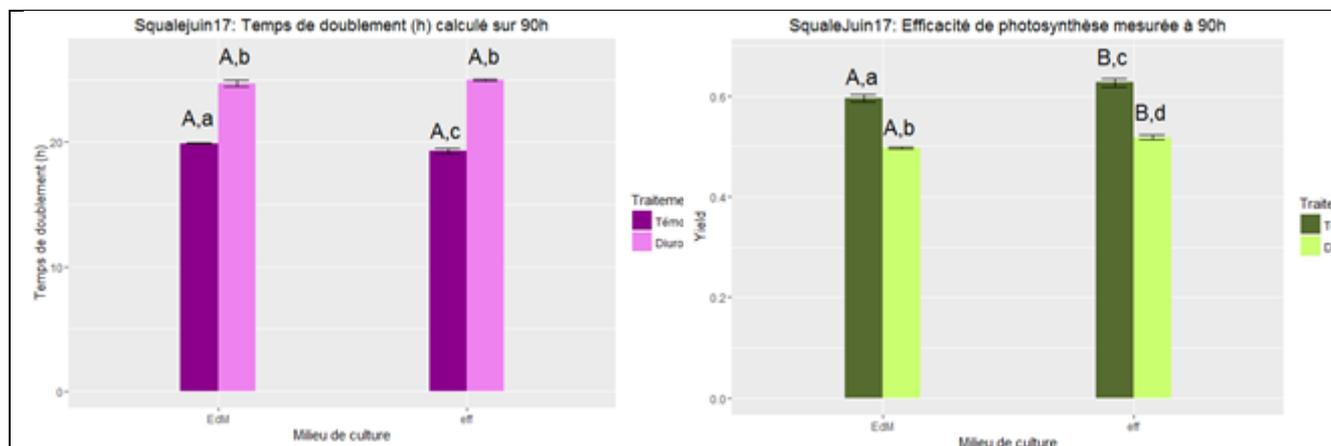


Figure 11 : Réponses des cultures de Tiso en conditions Témoin et exposées au diuron à 1.9 µg/L, cultivées dans l'eau de mer du Centre Ifremer de Nantes (EdM) ou dans l'effluent de Bouin (eff), après 90h de croissance en juin 2017. (Moyennes±erreur-type, N=3). Les différences significatives entre les milieux de cultures sont indiquées par des lettres majuscules, et entre traitements par des lettres minuscules (Anova imbriquée, post-hoc Newman-Keuls, $p < 0.05$). Gauche : temps de doublement (en heures). Droite : efficacité de photosynthèse (sans unité).

Les mesures physiologiques réalisées par cytométrie en flux sur le contenu lipidique indiquent un niveau relatif de lipides inférieur dans les cultures cultivées dans l'effluent comparé à celles réalisées en eau de mer de Nantes (Figure 12, Gauche) tout comme en mars ; l'inhibition provoquée par l'exposition au diuron est en revanche amoindrie dans l'effluent en juin. Aucune augmentation du contenu relatif en ERO n'est détectée en juin (Figure 12, Droite) : le niveau global est plus élevé dans les cultures réalisées en eau de mer de Nantes, avec une diminution significative des ERO intracellulaires en présence de diuron, résultat inattendu.

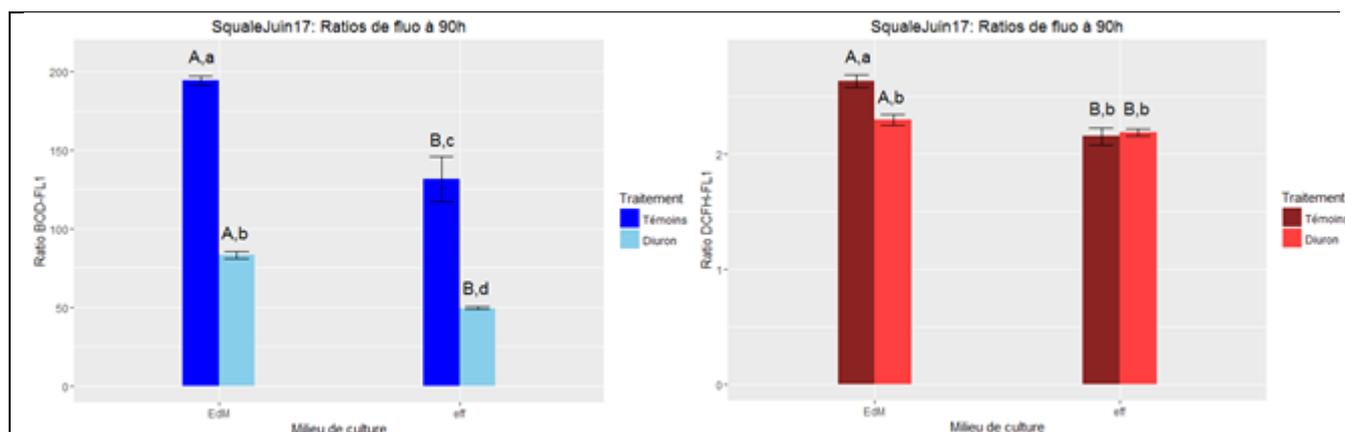


Figure 12 : Réponses des cultures de Tiso en conditions Témoin et exposées au diuron à 1.9 µg/L, cultivées dans l'eau de mer du Centre Ifremer de Nantes (EdM) ou dans l'effluent de Bouin (eff), après 90h de croissance en juin 2017. (Moyennes±erreur-type, N=3). Les différences significatives entre les milieux de cultures sont indiquées par des lettres majuscules, et entre traitements par des lettres minuscules (Anova imbriquée, post-hoc Newman-Keuls, $p < 0.05$). Gauche : Ratio BOD-FLI : ratio de fluorescence verte lié à la quantité relative de lipides intracellulaires. Droite : Ratio DCFH-FLI : ratio de fluorescence verte liée à la quantité relative d'espèces réactives de l'oxygène intracellulaires.

Conclusion : les expérimentations réalisées ont permis de montrer, à chaque fois, une inhibition de croissance supérieure lorsque les cultures exposées au diuron étaient cultivées dans l'effluent de Bouin, comparé au milieu constitué d'eau de mer de Nantes, même pour une croissance globale équivalente. Ces effets ont été accompagnés, à deux reprises (en mars et avril), par une inhibition supérieure du

contenu relatif intracellulaire en lipides chez les cultures exposées dans l'effluent de Bouin. Cela semble confirmer l'effet de stress induit à certaines périodes par cet effluent comme supposé à l'issue de la première partie. Enfin, il semblerait que pour une raison indéterminée, la souche de *Tiso* n'ait pas réagi de la manière attendue à l'exposition au diuron au regard des résultats obtenus sur les ERO : en effet l'inhibition de la photosynthèse engendrée par l'exposition au diuron génère un stress oxydant et induit de ce fait une augmentation du contenu cellulaire des ERO, comme cela a déjà été démontré notamment chez *Tisochrysis lutea* et chez *Tetraselmis suecica*. Les résultats obtenus ici, opposés à ceux attendus, restent inexplicables, d'autant plus que ce même effluent a induit une augmentation des ERO chez les cellules de *Tiso* après 24h dans l'écloserie de Bouin. Un suivi du contenu intracellulaire relatif en ERO au cours des trois expérimentations de quatre jours réalisées au LEX à Nantes aurait peut-être permis de mieux comprendre l'évolution de ce paramètre et de pouvoir en interpréter le résultat final.

4. Conclusions et Perspectives

Les observations réalisées dans le cadre du suivi de la qualité des eaux a montré, une grande variation des concentrations moyennes observées dans les eaux, ceci quel que soit le point de suivi.

Il est difficile de mettre en corrélation les concentrations observées entre les entrées du canal (nord ou sud) et les fond de canal (respectivement nord ou sud). Ce dernier point peut être à mettre en relation avec la typologie des points de suivi (régime hydraulique différents, envasement plus ou moins important,...). A ce niveau et si un suivi pérenne doit être mis en place, les points situés en entrée de canal doivent être suffisants pour un suivi de qualité.

Les différences observées entre l'entrée nord et sud peuvent s'expliquer par le fait qu'elles sont alimentées par deux étiers différents (étier des Champs et étier du Dain) et que la gestion des écluses est différente pour chacun d'eux.

L'impossibilité de maîtriser la gestion des écluses oblige les exploitants à mettre en place des stratégies d'approvisionnement en eaux de leur installations (circuit fermé, grandes réserves d'eau) adaptées à leur contraintes d'exploitation.

Les élevages larvaires expérimentaux réalisés en 2016 n'ont donné aucun résultat. Sur les trois élevages réalisés en 2017, deux (1^{er} mars et 28 juin) ont permis d'obtenir des résultats significatifs par rapports à ceux de l'année précédente. L'eau d'alimentation du polder ayant été utilisé, il est possible de faire un rapprochement avec les différences de concentrations observées entre ces deux périodes, sans qu'il soit possible d'identifier une molécule à la toxicité plus élevée que les autres molécules présentes. Les concentrations observées dans la partie nord du canal sont plus faibles au mois de mars qu'au mois de juin et bien que l'élevage larvaire se soit déroulé juste après la dernière période de suivi de la qualité des eaux d'alimentation, on peut raisonnablement rapprocher les résultats obtenus sur les larves et les différences de qualité d'eau.

L'état physiologique des cultures utilisées pour le nourrissage semble témoigner d'une potentielle source de stress dans l'effluent, ayant conduit à une augmentation des ERO intracellulaires chez la culture de *Tiso*. Par contre, les tests réalisés avec le Diuron sur la micro algue *Tiso* ont mis en évidence une inhibition de croissance supérieure pour les cultures de *Tiso* exposées. De plus, ces effets ont été accompagnés, à deux reprises, par une inhibition supérieure du contenu relatif intracellulaire en lipides chez les cultures exposées dans l'effluent de Bouin.

Les perspectives envisageable sont d'une part la pérennisation d'un suivi allégé (deux points) de la qualité des eaux d'alimentation du polder de Bouin afin de pouvoir suivre l'évolution (positive ou négative) de la qualité des eaux et ainsi anticipé des actions de préventions si nécessaires.

Les professionnels devront développer des systèmes de protection de leurs installations par des stratégies de gestion de l'eau adaptées, comme certains le font déjà ou par la mise en place de système de traitement des eaux adaptés aux molécules présentes.

Enfin, il faut noter que le suivi réalisé ne concerné que des molécules hydrophobes, essentiellement des produits phytopharmaceutiques, une analyses de la présence d'autres types de contaminants (Hydrocarbures, métaux, polluants émergents, ...) serait d'un intérêt certain.

5. Références bibliographiques

Akcha Farida, Spagnol Charlene, Rouxel Julien (2012). **Genotoxicity of diuron and glyphosate in oyster spermatozoa and embryos**. *Aquatic Toxicology*, 106, 104-113. Publisher's official version : <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.10.018> , Open Access version : <https://archimer.ifremer.fr/doc/00070/18128/>

Hatt Philippe-Jacques, Stavrakakis Christophe, Buchet Vincent, Dupuy Beatrice (2015). **Bilan des connaissances sur la qualité de l'eau dans la zone du polder conchylicole de Bouin - Projet LEAUPOLD**. R. INT.RBE/SG2M/LSPC - Décision AELB n° 2014D030 du 30 juillet 2014. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00280/39165/>

Annexe I : Description des molécules identifiées pendant le suivi réalisé sur les eaux d'alimentation du Polder ostréicole

Molécule	Utilisation	Toxicité	Réglementation française	Commentaires
acetochlore ESA	Herbicide	CL50 (algues) : 0,0013 mg/l		
amethryne	Substance active d'un produit phytopharmaceutique		cette substance active n'est pas autorisée dans la composition de préparations bénéficiant d'une autorisation de mise sur le marché.	
atrazine	Herbicide	CL50 (algues) : 0,043 mg/l	interdit depuis 2003	
atrazine 2 hydroxy				
azoxystrobine	Substance active d'un produit phytopharmaceutique	CL50 sur algues : 0,36 mg/l	substance active est autorisée dans la composition de préparations bénéficiant d'une autorisation de mise sur le marché.	
carbendazime	Substance active d'un produit phytopharmaceutique	CL50 sur algues : 0,34 mg/l		
chlorotoluron	Herbicide	CL50 (algues) : 0,024 mg/l	autorisé	
DEA				
DIA				
diuron	Herbicide, Anti-algue		interdit en 2002 pour les usages non-agricole entre le 1er novembre et le 1er mars. Le 30 juin 2003, il a été interdit pour les usages agricoles	
DMSA	Médicament			L'acide dimercaptosuccinique fait partie de la liste des médicaments essentiels de l'Organisation mondiale de la santé (liste mise à jour en avril 2013)
DMST				
hexazinone	Herbicide			
hydroxy simazine	produit de dégradation de la simazine			

imidaclopride	Insecticide	CL50 (algues) > 9 mg/l	autorisée dans la composition de préparations bénéficiant d'une autorisation de mise sur le marché. Toutefois, elle a fait l'objet de mesures : de suspension d'emploi pour le traitement des semences de tournesol et d'interdiction d'utilisation pour le traitement des semences de maïs	
irgarol	Algicide			
isoproturon	Herbicide		autorisée dans la composition de préparations bénéficiant d'une autorisation de mise sur le marché	
métalaxyl m	Fongicide			
métazachlore	Herbicide			
métolachlore	Herbicide (maïs)		interdit depuis 2003	considéré par l'USGS comme un perturbateur endocrinien potentiel
métolachlore ESA	produit de dégradation du métolachlore			
métolachlore OA	produit de dégradation du métolachlore			
nicosulfuron	Herbicide			
promethryne				
propachlore	Herbicide			
propiconazole	Fongicide		toxique et soumis à diverses réglementations dont européennes et françaises	
prosulfuron				
simazine	Herbicide		pas autorisée dans la composition de préparations bénéficiant d'une autorisation de mise sur le marché. La date limite d'écoulement des stocks a été fixée à la distribution au 30 09 2002, et à l'utilisation au 30 09 2003. Précédemment, par l'arrêté du 15 février 1997, l'utilisation de la simazine avait été interdite dans les zones non agricoles, et sa dose d'emploi avait été réduite à 1000 g/ha/an en zone agricole	

terbutryne	Herbicide		utilisation interdite depuis le 31 décembre 2003	
terbutylazine desethyl	produit de dégradation du Terbutylazine, substance active d'un produit phytopharmaceutique	CL50 sur algues : 0,015 mg/l	les herbicides contenant de la terbuthylazine ont été interdits à la commercialisation à partir du 30 septembre 2002, et interdits à l'utilisation à partir du 30 juin 2003. Depuis 2017, la terbuthylazine est à nouveau autorisé pour un usage sur maïs.	