

N° d'ordre : 3538

THESE

Présentée à

L'UNIVERSITE BORDEAUX 1

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES ET ENVIRONNEMENTS

par Timothée DEBENEST

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPECIALITE : ECOTOXICOLOGIE

« Caractérisation de l'impact des pollutions agricoles sur les
diatomées benthiques »

Soutenue le 14 décembre 2007

Après avis de :

Mme COTELLE Sylvie, Maître de Conférence, Université de Metz

Rapporteur

Mme GUASCH Helena, Professeur, Université de Girona

Rapporteur

Devant la commission d'examen formée de :

Mr. ALARD Didier, Professeur, Université de Bordeaux 1

Président

Mme COTELLE Sylvie, Maître de Conférence, Université de Metz

Rapporteur

Mme GUASCH Helena, Professeur, Université de Girona

Rapporteur

Mr. COSTE Michel, Directeur de Recherche, Cemagref,

Directeur de thèse

Mr. PINELLI Eric, Professeur, I.N.P.-E.N.S.A.T.

Directeur de thèse

Mr. SILVESTRE Jérôme, Ingénieur d'Etude, I.N.P.-E.N.S.A.T.

Examineur

Membre invité :

Mr. DELMAS François, I.C.G.R.E.F, Cemagref

*A mes Parents,
Pour leur écoute et leur patience.*

Remerciements

Cette thèse a été réalisée dans l'unité « Réseau, Epuration et Qualité des Eaux » du Cemagref de Bordeaux, au sein de l'équipe d'accueil « Agronomie, Environnement et Ecotoxicologie » de l'I.N.P. – E.N.S.A.T. puis, à partir de janvier 2006, dans l'UMR 5245 « Ecolab ». Je tiens à remercier la Région Aquitaine qui a contribué au financement de cette thèse.

Ce travail de thèse n'aurait pas été possible sans le soutien et l'aide que m'ont apportés messieurs Michel COSTE, Eric PINELLI et Jérôme SILVESTRE. Je leur adresse ici ma très sincère et profonde reconnaissance pour les encouragements qu'ils m'ont prodigués. Leur collaboration dans ce travail et leur enthousiasme ont été et resteront une expérience très enrichissante. Je tiens aussi à remercier monsieur François DELMAS, qui malgré un emploi du temps très chargé, a toujours été disponible pour nous faire profiter de ces connaissances. Je lui exprime toute ma gratitude pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser cette thèse, après mon stage d'ingénieur.

Je suis aussi reconnaissant à monsieur Didier ALARD, Professeur à l'université BORDEAUX 1, à mesdames Sylvie COTELLE, Maître de Conférence à l'université de METZ, et Helena GUASCH, Professeur à l'université de GIRONA, d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Je tiens aussi à remercier Georges MERLINA pour ses conseils qui m'ont permis de découvrir des aspects inconnus de la chimie, et plus particulièrement de la classification de MENDELEIEV.

Un très grand merci à Alain ALRIC, Brigitte MECHIN, Brigitte DELEST, Maryse BOUDIGUES, Muriel BONNET pour avoir eu la patience de réaliser les analyses nécessaires à ce travail de thèse, ainsi qu'à Céline MADIGOU, Jérôme GRANGE, Noémie GARDES et Adeline CHARRIER pour leur aide et leur disponibilité lors de mes diverses expérimentations.

L'étude intracellulaire des diatomées n'aurait pas été possible sans la dextérité de monsieur Jean-Claude LEPERT de l'I.N.S.E.R.M. et les conseils de messieurs Alain JAUNEAU et Yves MARTINEZ de l'I.F.R. 40 à TOULOUSE. L'interprétation des données de concentration en herbicides a été réalisée par messieurs Jean-François DUBERNET et Nicolas MAZZELLA. Je les remercie tous vivement pour leur aide.

Je remercie monsieur Daniel POULAIN de m'avoir laissé l'opportunité de réaliser une partie de mes travaux à Toulouse.

Comme m'a dit un jour un des responsables du laboratoire à Toulouse : « *une thèse, c'est comme une équipe de rugby!* ». Par conséquent un très grand merci à mes coéquipiers qui m'ont permis de passer de très bons moments au cours de ce travail de thèse : Geoffrey pour certaines randonnées en vélo même s'il n'a pas souscrit à toutes mes initiatives, Bertrand pour ses conseils avisés de rugbymen béarnais, Eric pour ces soirées passées à l'ENFA, Claire-Emmanuelle, Alain, Nicolas, Marie, Maria, Aurore, Florian, Thomas, Sébastien, Vaitea, Gaëlle, Clara, Laure, Aude, Damien pour leur bonne humeur et leur gentillesse.

Une pensée particulière pour une demi de mêlée d'exception en la personne d'Annick CORREGÉ.

Je tiens aussi à exprimer toute ma sympathie et ma reconnaissance à Florence MOUCHET et Séverinne JEAN-DUPUY pour leur accueil, leur soutien et leur gentillesse.

Que tous ceux, qui de près ou de loin, ont participé à la réalisation de ce travail trouvent ici l'expression de ma sincère reconnaissance et notamment ma sœur et mon frère.

Ces remerciements ne seraient pas complets sans ceux que j'adresse aux personnels du Cemagref et de l'UMR Ecolab pour l'aide qu'ils m'ont apportée au cours de cette thèse.

Enfin, une pensée affectueuse pour ma filleule Amélie.

Résumé :

Les indices biologiques « diatomées » utilisés pour évaluer la qualité des cours d'eau ont montré leurs limites pour déceler les effets des pollutions toxiques agricoles. Les diatomées, à la base de la chaîne trophique, sont connues comme de bons bio-indicateurs des pollutions par les éléments trophiques (ex : fertilisants agricoles).

Une thèse a donc été initiée dans le but d'identifier et de sélectionner, chez les diatomées, des paramètres sensibles aux pesticides afin de proposer des perspectives d'amélioration des indices « diatomées ».

Le travail de recherche a donc été mené à deux niveaux (communauté et cellule) et dans trois conditions (naturelle, semi-contrôlée et contrôlée).

Les résultats obtenus dans le cadre de l'étude *in situ* ont montré une inhibition de la production de biomasse algale en parallèle de traitements herbicides intensifs des cultures. Des abondances élevées de diatomées anormales ont aussi été relevées dans certains cours d'eau.

Une étude en microcosmes, dans des conditions semi-contrôlées, a confirmé la sensibilité de la biomasse algale à une exposition à des herbicides. Les indices biologiques n'ont, par contre, pas réagi à cette exposition alors même que les communautés, exposées à un des herbicides, ont été modifiées.

Pour établir un lien entre l'apparition d'anormalités sur le frustule des diatomées et une exposition à un pesticide, une technique de culture d'une communauté de ces micro-algues a été mise au point. Une exposition de cette communauté à un herbicide génotoxique connu, l'hydrazide maléique, a mis en évidence des altérations nucléaires. En parallèle, des frustules anormaux ont aussi été dénombrés. Les abondances de ces deux types d'altération se sont avérées significativement plus élevées pour les plus fortes concentrations. Deux hypothèses sont suggérées : soit un effet génotoxique direct qui perturbe la synthèse de protéines, soit un effet génotoxique indirecte sur le réseau de microfilaments.

Mots clés: *Pollution des eaux, Pesticides, Diatomées, Indices biologiques, Altérations cellulaires*

Abstract :

The diatom biological indexes, used to assess the water quality, have shown their limits to detect the toxic pollution effects. The diatoms are well known bioindicators of trophic pollutions.

A study has been initiated to identify and to select parameters sensitive to pesticide exposition.

The work was carried out at two levels (community and cell) and under three conditions (natural, semi-controlled and controlled).

The field study results showed an inhibition of the algal biomass growth during a period of intensive herbicide treatments on crops. High abundances of abnormal diatoms were also found in some rivers.

A study in microcosms under semi-controlled conditions, confirmed the sensitivity of the algal biomass to herbicides. The biological indexes did not react whereas the succession of a community exposed to a herbicide, was marked.

To establish a link between abnormal frustule occurrence and pesticide exposition, a diatom community culture has been developed. From this culture, benthic diatoms were exposed to a well known genotoxic herbicide, the Maleic Hydrazide (MH). The results revealed nuclear alterations. At the same time, abnormal frustules were also counted. The abundances of these two kinds of alterations were significantly higher at the highest MH concentrations. Two hypotheses are proposed: either a direct genotoxic effect which would disrupt the synthesis of proteins, or indirect genotoxic effect on the cytoskeleton. The disturbance of the cytoskeleton would affect independently the chromosom migration during the mitosis and the silica supply for the frustule formation.

Key words: Water pollution, Pesticides, Freshwater diatoms, Biological indexes, Cellular alterations

Sommaire

Introduction Générale	7
Partie I.: Le cadre général de l'étude	9
Chapitre I.: Le contexte global.....	10
A./ L'usage des pesticides en agriculture.....	10
1 Une utilisation ancienne mais des découvertes récentes	10
2 Les principaux pesticides agricoles	11
a) Les insecticides, acaricides et nématocides	11
b) Les fongicides.....	12
c) Les herbicides	13
3 Les pesticides : un marché important.....	15
a) Le marché des pesticides en chiffre d'affaire.....	15
b) Le marché des pesticides en volume	16
c) Les évolutions du marché	16
4 Un outil indispensable en agriculture	20
a) Des modes de traitement et des usages variés	20
b) Un modèle agricole dépendant des pesticides	20
5 Une forte contrainte réglementaire	21
a) L'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM)	21
b) Un contexte de révision des AMM.....	23
B./ Une contamination importante des eaux par les activités agricoles.....	24
1 Les fertilisants.....	24
2 Les pesticides	25
a) Les normes	25
b) L'état des lieux de la qualité des eaux	28
c) Les conséquences de cette pollution	32
d) L'évolution de cette pollution	33
e) Les limites des programmes de surveillance analytique.....	33
C./ Un contexte législatif et réglementaire en pleine évolution.....	36
1 Une forte pression sociale	36
2 Une évolution de la législation en amont au niveau agricole	36
3 Une évolution de la législation en aval au niveau de la gestion des ressources hydriques	37

Chapitre II.: Le contexte scientifique	39
A./ L'écotoxicologie : Définition et enjeux.....	39
1 Définition.....	39
2 Les limites et les perspectives d'une science transversale.....	40
B./ Différents outils pour détecter les pollutions par les pesticides et leurs effets dans les eaux	41
1 Les dispositifs pour l'analyse physico-chimique.....	41
a) Les outils classiques de chromatographie.....	41
b) Les différentes stratégies de prélèvement.....	41
c) Les limites de la seule approche physico-chimique.....	42
2 Les outils biologiques.....	42
a) Les biomarqueurs.....	43
b) Le cas des biotests.....	44
c) Les bioindicateurs.....	45
d) L'Indice Biologique Diatomées (IBD).....	46
e) Le concept PICT : un outil écotoxicologique hybride.....	48
f) Les limites actuelles de ces outils pour révéler les pollutions par les pesticides.....	49
C./ Les diatomées : un bioindicateur reconnu.....	52
1 Systématique.....	52
2 Ecologie.....	53
a) Milieu.....	53
b) Mode de vie.....	54
c) Place dans l'écosystème.....	55
d) Utilisation.....	55
3 L'ultra-structure cellulaire.....	56
a) Les principaux organites.....	56
b) La paroi cellulaire.....	58
4 Multiplication et reproduction.....	60
a) Multiplication végétative.....	60
b) Reproduction sexuée.....	61
D./ Les effets connus des pesticides sur les diatomées.....	62
1 Les effets sur la cytologie et l'ultra-structure.....	62
a) Le squelette interne ou cytosquelette.....	62
b) Le noyau.....	63
c) Les membranes.....	64
d) La paroi cellulaire siliceuse : le frustule.....	64

2 Les effets sur le métabolisme des cellules et des communautés	67
a) Les processus bioénergétiques.....	67
b) Les synthèses de protéines, lipides et glucides	68
c) L'absorption des nutriments	69
3 Les effets sur la multiplication et la reproduction	69
4 Les effets sur la croissance de la biomasse.....	70
a) La Biomasse totale	70
b) La Biomasse algale	70
c) La densité cellulaire.....	71
5 La composition spécifique des communautés.....	72
a) Au sein des communautés de diatomées	72
b) Au sein des communautés algales.....	74
E./ Les facteurs interférant dans la réponse des diatomées aux pesticides et la détection des effets.....	76
1 Les paramètres écologiques	76
a) La compétition spécifique.....	76
b) Le biofilm	76
c) Le broutage	77
d) Les mécanismes de survie.....	77
2 Les paramètres environnementaux.....	77
a) La luminosité	77
b) Les nutriments	77
c) Les conditions hydrauliques	78
d) Les interactions entre molécules toxiques	78

Partie II.: Caractérisation de l'impact des pesticides chez les diatomées benthiques de l'échelle des communautés à celle de la cellule..... 80

Chapitre I.: Identification à l'échelle de la communauté, de paramètres sensibles chez les diatomées benthiques aux pesticides agricoles en conditions naturelles 83

A./ Description du site d'étude.....	83
1 Géologie et hydromorphologie	83
2 Climatologie	84
3 Unités pédo-paysagères.....	85
4 Occupation des sols	86
a) Place de l'agriculture en Midi Pyrénées	86
b) Les différentes cultures	87
c) Le poids de l'irrigation.....	88
5 Ressources en eau.....	89

B./ Matériels et Méthodologie de terrain.....	90
1 Les stations et les bassins versants étudiés	90
a) Le bassin versant du Sousson	91
b) Le bassin versant de la Save	91
c) Le bassin versant du Touch	91
d) Les autres bassins versants étudiés	92
2 Le dispositif de prélèvement.....	92
a) Les prélèvements biologiques.....	92
b) Les prélèvements d'eau et le suivi des paramètres physico-chimiques	93
c) La périodicité des prélèvements.....	94
3 Protocoles de prélèvements et de mesure	95
a) Sur le terrain	95
b) Au laboratoire	97
4 Le traitement des données	98
C./ Résultats	99
1 Caractérisation des stations étudiées en 2005 et 2006 à partir de paramètres classiques de suivi de la qualité des eaux.....	99
a) L'évolution du régime hydraulique.....	99
b) L'évolution de la qualité physico-chimique des eaux	99
c) La contamination des eaux par les herbicides	99
d) L'évolution de la qualité biologique des eaux.....	99
2 L'évolution des paramètres biologiques	99
a) Quantitatifs	99
b) Qualitatifs.....	99
c) La répartition spatiale des communautés de diatomées benthiques en fonction des paramètres environnementaux	99
D./ Discussion.....	99
1 La qualité des eaux dans les cours d'eau étudiés.....	99
a) La qualité trophique des eaux	99
b) La qualité toxique des eaux.....	99
c) La qualité biologique des eaux.....	99
2 L'évolution des paramètres biologiques quantitatifs.....	99
a) Les variations des concentrations de biomasse totale.....	99
b) Les variations des concentrations de biomasse algale.....	99
3 L'évolution des paramètres biologiques qualitatifs.....	99
a) Les variations spatio-temporelles de l'abondance des formes anormales	99
b) Les variations spatio-temporelles de la diversité	99
c) L'évolution de la composition en espèces des communautés entre les stations étudiées.....	99

Chapitre II.: Identification, à l'échelle de la communauté, de paramètres sensibles chez les diatomées benthiques aux pesticides agricoles en conditions semi-contrôlées..... 99

A./ Matériels et Méthodologie	99
1 Dispositif expérimental	99
a) Colonisation in situ de substrats artificiels par les diatomées.....	99
b) Transfert en microcosmes.....	99
2 Protocole d'exposition	99
3 Protocoles de prélèvement.....	99
a) Prélèvements lors du transfert	99
b) Prélèvements lors de l'expérimentation	99
c) Méthodologie de prélèvement et de mesure.....	99
4 Traitement des données.....	99
B./ Résultats	99
1 Les paramètres physico-chimiques.....	99
2 Les concentrations en nutriments et en substances actives.....	99
a) Les nutriments	99
b) Les pesticides.....	99
3 Les paramètres biologiques quantitatifs.....	99
a) Les effets de l'isoproturon	99
b) Les effets du s-métolachlore	99
c) Les effets de l'oxadiazon.....	99
4 Les paramètres biologiques qualitatifs	99
a) L'évolution des indices biologiques.....	99
b) L'évolution de la diversité	99
5 La structure des communautés	99
a) La composition spécifique	99
b) Les données écologiques.....	99
C./ Discussion	99
1 Le dispositif expérimental	99
2 L'ambiance trophique	99
3 L'ambiance toxique.....	99
4 L'efficacité des indices biologiques pour détecter les effets des herbicides	99
5 La sensibilité des paramètres biologiques quantitatifs.....	99
6 La sensibilité des paramètres biologiques qualitatifs	99
a) Le développement de formes anormales de diatomées	99
b) La sensibilité de la diversité vis à vis des herbicides	99
c) L'évolution de la composition en espèces des communautés	99

Chapitre III.: Caractérisation, à l'échelle de la cellule, de l'impact d'un pesticide sur une culture cellulaire d'une communauté de diatomées benthiques..... 99

Conclusion Générale et Perspectives.....	99
Chapitre I.: Conclusion Générale	99
A./ La réponse des communautés de diatomées benthiques à une pollution agricole importante dans les cours d'eau	99
1 Les limites de l'IBD et IPS comme outils de bioindication des pollutions agricoles.....	99
2 Un paramètre quantitatif du biofilm intéressant: la biomasse algale.....	99
3 Des abondances élevées de diatomées anormales.....	99
4 Une discrimination des stations selon les préférences trophiques des espèces	99
B./ Effets des herbicides agricoles sur les communautés de diatomées benthiques dans des conditions semi-contrôlées.....	99
1 Les indices biologiques « diatomées » : des outils actuellement peu adaptés pour le diagnostic des pollutions par les pesticides.....	99
2 La biomasse algale : un paramètre sensible aux herbicides agricoles.....	99
3 La structure des communautés de diatomées benthiques : une évolution marquée de la composition en espèces	99
4 L'induction de formes anormales.....	99
C./ La formation d'altérations nucléaires et l'induction de déformations du frustule chez une communauté de diatomées exposée à un herbicide	99
Chapitre IV.: Perspectives.....	99
A./ Les perspectives à court terme	99
1 L'évolution des outils biologiques « diatomées »	99
a) Le dispositif de prélèvement.....	99
b) Modélisation de la pollution agricole	99
c) Prise en compte de la biomasse algale.....	99
d) Amélioration de leur prise en compte dans le calcul des indices.....	99
e) Les formes anormales et les altérations nucléaires comme biomarqueurs	99
2 La validation de la méthode de culture pour évaluer la toxicité	99
3 L'étude de l'hypothèse de décrochage.....	99
B./ Les perspectives à moyen/long terme dans la détection et le suivi des pollutions par les pesticides	99
Bibliographie.....	99
Liste des figures	99
Liste des tableaux	99
Annexes.....	99

Introduction Générale

Les pollutions agricoles (fertilisants et pesticides) sont une importante cause de dégradation de la qualité des ressources en eaux. Les éléments fertilisants ont été clairement identifiés comme des polluants majeurs des cours d'eau. Depuis quelques années, le suivi des concentrations en pesticides a aussi mis en évidence une forte contamination des eaux de surface et des eaux souterraines par ces molécules toxiques. Dans son dossier sur les pesticides dans les eaux (données 2003-2004), l'Institut Français de l'Environnement (IFEN) rappelle ainsi qu'en 2004, pour les eaux de surface, des pesticides ont été quantifiés sur 96% des points de suivi (IFEN 2006).

Dans ce contexte, les organismes en charge de la gestion des ressources hydriques sont confrontés à l'évolution de la législation et de la réglementation (DCE 2000, Loi sur l'eau 2006) et aux limites des outils existants de suivi de la qualité des eaux. Ils sont donc à la recherche de dispositifs permettant de détecter *in situ* les effets des pollutions par les pesticides sur les biocénoses aquatiques.

Les méthodes actuelles de suivi de la qualité des eaux, du point de vue des pesticides, ne sont en effet pas adaptées à la nature même de cette pollution.

Le suivi physico-chimique classique se réfère à des listes fixant, par molécule, des seuils de qualité à partir de données de toxicité obtenues en laboratoire. Or, par essence, la toxicité de ces molécules est très différente dans le milieu naturel où elles peuvent interagir, modulant ainsi leur toxicité. En outre, le dosage de l'ensemble des molécules (molécules mères et métabolites) pouvant affecter les écosystèmes est techniquement et financièrement inenvisageable dans le cadre d'un suivi régulier.

Les indices biologiques ont été conçus pour détecter les dysfonctionnements pouvant affecter des communautés d'espèces à l'échelle d'un écosystème. S'ils s'avèrent efficaces pour détecter les pollutions trophiques (fertilisants), ils semblent inadaptés pour déceler les effets des pollutions toxiques (pesticides) sur les biocénoses aquatiques. Plusieurs indices biologiques ont été mis au point, notamment à partir de micro-algues benthiques les diatomées (indices « diatomées »). Mais dans les cours d'eau drainant des régions agricoles, ces indices répondent préférentiellement à la pollution trophique au détriment de la détection de la pollution toxique (pesticides) (Nystrom *et al.* 1999). A l'heure actuelle, le suivi des pollutions par les pesticides dans les cours d'eau présente donc quelques lacunes (Aubertot *et al.* 2005).

Depuis les années 70, les altérations dues aux pesticides ont été largement étudiées sur divers organismes, dont les diatomées ; la très grande majorité des travaux a été conduite à l'échelle des individus, voire de la cellule, dans des conditions très contrôlées et sur un nombre très limité de molécules (Forbes *et al.* 1997; Peterson *et al.* 1997; Tang *et al.* 1997; Kasai 1999; Nelson *et al.* 1999). Or l'extrapolation de ces résultats aux communautés présentes dans les cours d'eau s'avère particulièrement compliquée. Les phénomènes environnementaux sont, en effet, par essence complexes ; les interactions entre les espèces dans les communautés ou des espèces avec certains paramètres abiotiques (luminosité, courant, concentration en nutriments) peuvent influencer sur la réponse des organismes lors d'une exposition à un ou des toxiques. En outre, les organismes vivants

sont exposés à un ensemble de substances actives qui affectent différemment les individus en communauté, des cellules prises isolément.

Un travail de thèse en co-tutelle entre le Cemagref et l'Unité Mixte de Recherche Ecolab (INP-ENSAT¹, UPS², CNRS) a donc été mené pour répondre aux nombreuses interrogations concernant la sensibilité des diatomées benthiques à cette pollution dans le milieu naturel. Au cours de cette thèse, les effets des pesticides sur les diatomées ont donc été étudiés à différentes échelles, (communauté d'espèces et cellule), et dans différentes conditions (naturelles et contrôlées). Les diatomées benthiques ont été retenues comme modèle de recherche du fait de leur utilisation ancienne comme bio-indicateur des pollutions trophiques et organiques (Round *et al.* 1990; Stevenson *et al.* 1999). La place des diatomées à la base des écosystèmes aquatiques, leur grande ubiquité et leur sensibilité, démontrée en laboratoire vis à vis des pesticides et des herbicides en particulier, en font des organismes particulièrement intéressants pour étudier les effets des pesticides au sein des écosystèmes aquatiques.

Les objectifs de cette thèse sont d'identifier et de sélectionner des paramètres sensibles aux pollutions par les pesticides et de comprendre les mécanismes impliqués dans la réponse des diatomées, à partir d'études en conditions naturelles et en conditions contrôlées. L'enjeu de ce travail est de proposer des pistes pour la mise au point d'outils de bio-indication « diatomée » adaptés à la révélation des pollutions toxiques globales dans un contexte de forte pollution trophique.

Dans ce mémoire, nous nous attacherons à décrire, dans une première partie, le cadre général de l'étude. Un premier chapitre présentera le contexte global du travail de thèse en détaillant l'usage et l'intérêt des pesticides en agriculture et les problèmes de contamination des ressources en eaux par ces molécules toxiques. Un deuxième chapitre exposera le contexte scientifique au travers d'une description des différents outils disponibles pour détecter les pollutions par les pesticides pour ensuite se focaliser sur un bio-indicateur connu : les diatomées benthiques. Après une présentation générale de ces organismes, une revue de l'état de l'art concernant l'impact des pesticides sur ces micro-algues sera réalisée.

Dans une deuxième partie, la méthodologie expérimentale et les résultats obtenus seront exposés et discutés. Le premier chapitre décrira l'étude *in situ* visant à identifier des paramètres sensibles chez des communautés naturelles de diatomées benthiques. Le deuxième chapitre présentera les travaux de recherche réalisés en conditions semi-contrôlées sur des communautés de ces micro-algues exposées à des herbicides agricoles. Enfin un dernier chapitre s'attardera sur l'étude en conditions contrôlées des effets cellulaires dus à un pesticide chez différentes espèces de diatomées maintenues en culture au sein d'une communauté.

Au final, à partir de la conclusion générale des travaux réalisés, des perspectives d'amélioration de la détection des pollutions par les pesticides, notamment à l'aide des diatomées benthiques, seront proposées.

¹ Institut National Polytechnique-Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse.

² Université Paul SABATIER (Toulouse III).

Partie I.: Le cadre général de l'étude

Chapitre I.: Le contexte global

La modernisation de l'agriculture dans la deuxième moitié du XX^{ième} siècle a été marquée par l'introduction et l'utilisation massive des pesticides dans les pratiques culturales. Les conséquences visibles de cette évolution (accroissement de la productivité agricole) se sont aussi accompagnées d'une contamination et d'une pollution croissante des cours d'eau par ces molécules toxiques. Dans ce premier chapitre, nous aborderons la question de l'usage des pesticides en agriculture afin de détailler les différents types de produits disponibles, leur intérêt dans les pratiques agricoles et la réglementation à laquelle ils sont soumis. Cela nous amènera, par la suite, à nous intéresser à la question de la pollution des eaux par les activités agricoles au travers d'un état des lieux de la qualité des eaux en France. A partir de ce constat, nous détaillerons les conséquences législatives et réglementaires d'une telle situation sur le plan agricole et sur le plan de la gestion de l'eau.

A./ L'usage des pesticides en agriculture

Par le terme de pesticides, on assimile « *toutes les substances (molécules) ou produits (formulations) qui éliminent les organismes nuisibles, qu'ils soient utilisés dans le secteur agricole ou dans d'autres applications* » (Aubertot *et al.* 2005). Mais cette notion demeure très générique ; la réglementation s'est donc chargée de distinguer, les produits phytopharmaceutiques (Directive 91/414/CE), appelés aussi produits phytosanitaires, utilisés dans la protection des végétaux, des biocides (Directive 98/8/CE) utilisés dans la lutte contre les nuisibles. Le terme pesticide, dont nous ferons usage, se réfèrera, donc, aux seules substances actives¹ destinées à la protection des cultures et des productions agricoles.

1 Une utilisation ancienne mais des découvertes récentes

De tout temps les êtres humains ont cherché à protéger leurs cultures des ravages de la nature. Ainsi, dès l'antiquité, Homère mentionnait l'usage du soufre comme fumigant et Pline l'Ancien de l'arsenic comme insecticide (Lhoste *et al.* 1989; Colin 2000). La toxicité connue de ce dernier composé en faisait un pesticide tout indiqué pour lutter contre les insectes ravageurs. En 1681, l'utilisation des dérivés de l'arsenic fut conseillée pour protéger les végétaux (Lhoste *et al.* 1989). Mais les premières tentatives de traitement chimique des cultures ne furent conduites qu'au XVIII^{ième} siècle, lors de la première révolution agricole. L'emploi des pesticides en agriculture ne prit véritablement son essor que vers la fin du XIX^{ième} siècle et la première moitié du XX^{ième} siècle. Les produits disponibles étaient alors peu diversifiés (dérivés arsenic, nicotine, bouillies sulfocalciques pour les insecticides ; acide azotique, chlorhydrique, sulfurique, potasse, soude caustique pour les herbicides et la bouillie bordelaise pour les fongicides) et très toxiques pour les cultures comme pour les agriculteurs. Ce ne fut véritablement qu'avec le développement de la chimie de synthèse dans les années 30-40, que se

¹ En effet pour une même substance active, différentes formulation commerciales peuvent être homologuées, la différence étant liée aux substances connexes (mouillant, solvants, ...) ajoutées dans la préparation.

développèrent des outils efficaces de lutte contre les ravageurs, les adventices et les maladies des cultures. Ainsi, dès 1940, des désherbants sélectifs pour les céréales, comme le pentachlorophénol et les xanthates, furent synthétisés. Mais, à la même époque, l'avancée la plus marquante fut la description de la synthèse de l'auxine, hormone agissant dans la croissance des plantes, qui conduisit à la mise au point des premiers herbicides systémiques et sélectifs (2-4 D, le 2,4,5-T et le MCPA) pour les dicotylédones (Lhoste *et al.* 1989). Les années 50 virent aussi l'identification d'une famille de substances actives aux propriétés herbicides, les s-triazines, qui connurent un succès important auprès des agriculteurs¹. La gamme des pesticides disponibles pour les agriculteurs s'est donc très rapidement diversifiée.

2 Les principaux pesticides agricoles

Parmi les pesticides, on distingue : les insecticides et acaricides, les herbicides, les fongicides et tout un ensemble de molécules destinées à des usages particuliers (rodenticides, corvicides et corvifuge, molluscicides). Nous nous limiterons ici à l'étude des trois premiers genres, et plus particulièrement des herbicides, en détaillant les mécanismes d'action des différentes familles de molécules.

a) Les insecticides, acaricides et nématocides

Qui n'a pas eu à faire face à des invasions de chenilles sur ses pommiers, de pucerons dans ses cerisiers ou ses salades, de doryphores [*Leptinotarsa decemlineata* (Say)] sur ses pommes de terre ou de nématodes sur ses carottes. Pour contrôler le développement de ces ravageurs, différentes classes de molécules existent et, notamment, celle des produits affectant le fonctionnement du système nerveux.

- Les molécules neurotoxiques

Certaines plantes synthétisent naturellement des composés neurotoxiques (nicotines, pyréthrinés, roténone) pour limiter le développement de leurs prédateurs. Ces propriétés sont connues depuis longtemps par les hommes afin de contrôler les ravageurs des cultures: les premiers insecticides utilisés au XVIII^{ème} siècle ciblaient déjà le système nerveux. Un des insecticides neurotoxiques le plus connu est le DDT (1944) de la famille des diphényléthanes, interdit depuis les années 70, qui perturbe la transmission de l'information au niveau de l'axone (Delorme *et al.* 2002). Le fonctionnement des synapses cholinestériques est aussi une cible pour de nombreux insecticides. Les plus connus appartiennent à la famille des organophosphorés [parathion (1944)], des carbamates, qui présentent aussi des propriétés herbicides, et des nicotinoïdes (nicotine). D'autres composés existent comme ceux de la famille des polychlorocycloalkanes [lindane (1945)], de la famille des cyclodiènes [endosulfan (1948)] et de la famille des phénylpyrazoles comme le fipronil (1993) qui fut très utilisé en traitement de semences. Ils agissent au niveau des synapses inhibitrices (synapses GABA ou acide gamma aminobutyrique).

¹ Les principales molécules utilisées en agriculture, l'atrazine et la simazine ont été interdites d'utilisation en 2003.

- Les régulateurs de croissance

Pour pallier les problèmes de la toxicité des neurotoxiques vis-à-vis des vertébrés, des molécules proche des hormones de croissance des arthropodes ont été développées pour perturber leur cycle de développement. Certaines sont des « mimétiques » de l'hormone juvénile bloquant la mue des stades larvaires ou ayant un effet ovicide comme le fénoxycarbe (1985) appartenant à la famille des carbamates. D'autres, de la famille des benzhydrazides (1993 ; 2001), remplacent l'hormone de mue des insectes l'ecdysone, déclenchant prématurément la mue. Enfin certaines molécules perturbent la synthèse de la chitine, polysaccharide essentiel au développement de la cuticule des arthropodes.

- Les inhibiteurs de la chaîne respiratoire

La plupart des molécules inhibant le processus respiratoire sont des acaricides. La famille des arsénicaux a été la première à exploiter cette cible. Il convient de citer aussi les roténoïdes de synthèse, substances actives analogues d'une molécule naturellement synthétisée par certaines plantes, et les sulfones. Mais ces familles sont, à l'heure actuelle, peu utilisées de par leur nocivité pour l'environnement et l'apparition de résistances chez les insectes ravageurs.

- Autres modes d'action

De nombreuses molécules (bromure de méthyle, phosphure d'hydrogène) ont été utilisées dans le traitement des ravageurs¹ d'origine tellurique. Mais leur mode d'action peu spécifique et leur forte toxicité ont conduit à leur retrait du marché. L'utilisation des delta-endotoxines s'est fortement développée ces dernières années en alternative aux molécules de synthèse soit à partir d'une bactérie (*Bacillus thuringiensis*) soit à l'aide du génie génétique en intégrant les gènes codant pour la synthèse des ces molécules dans le génome des plantes cultivées.

b) Les fongicides

Le mildiou, l'oïdium sont des pathogènes bien connus des jardiniers amateurs comme des agriculteurs. De nombreux produits, aux modes d'action très diversifiés, ont été développés pour lutter contre ces champignons qui peuvent affecter le volume et la qualité des récoltes. Nous nous sommes restreints, ici, aux principales cibles connues de ces molécules.

- Inhibition de la germination des spores

Beaucoup de pesticides ont été développés autour du cuivre et du soufre, deux produits minéraux très connus pour lutter contre la multiplication des champignons pathogènes. Parmi les molécules de synthèse, il convient de citer la famille des carbamates avec des pesticides comme le thirame (1942), et le mancozèbe (1961).

¹ Nématodes (*Nematoda*, Rudolphi), Taupins (*Agriotes lineatus* L.)

- Inhibition de la chaîne respiratoire

Cette cible des fongicides est commune avec certains insecticides. Une famille de molécules a été développée autour de ce site d'action : les hétérocycles azotés. Une sous-famille assez récente (années 90-2000) se distingue : les stroburilines [azoxystrobine (1992), pyraclostrobine (2003)]. Ces molécules présentent un spectre d'action assez large pour des doses d'utilisation faibles.

- Perturbation de la biosynthèse des lipides

Un grand nombre de produits, affectant notamment la biosynthèse des lipides et des stérols et, par la même, la mise en place des membranes cellulaires, existe sur le marché. Pour la plupart, ils appartiennent à la même famille (les hétérocycles azotés) que les inhibiteurs de la chaîne respiratoire cités précédemment. Plusieurs sous familles se détachent, notamment : les pyrimidines et surtout les triazoles avec 21 molécules [époconazole (1993), tébuconazole (1986)...].

c) Les herbicides

Que ce soit au bord des routes, sur les voies de chemin de fer, dans les jardins privés ou dans les champs, la lutte contre les mauvaises herbes occupe une place importante dans les traitements phytosanitaires.

Nous nous arrêterons tout particulièrement sur cette catégorie de pesticides car les végétaux aquatiques présents dans les cours d'eau, dont les algues, sont une cible indirecte pour ces molécules et leurs métabolites.

- Inhibition de la synthèse des acides aminés

De toutes les molécules agissant sur la synthèse des acides aminés, les sulfonurées (nicosulfuron, chlorsulfuron,...), apparues vers la fin des années 70, constituent la famille la plus diversifiée au sein des herbicides. Ces molécules systémiques migrent dans la plante pour inhiber une enzyme, l'acétolactate synthase, impliquée dans la synthèse des acides aminés ramifiés. D'autres molécules systémiques présentent le même site d'action comme le glyphosate (1971), herbicide très utilisé en agriculture du fait de sa biodégradation importante dans les sols.

- Inhibition de la synthèse des lipides

La classification distingue les familles des Fops [diclofop-méthyl (1975)] et des Dimes - des anti-graminées foliaires inhibant une enzyme, l'acétyl-coenzyme A carboxylase - de celles des chloroacétamides [ou chloroacétanilides (1967)] et des thiocarbamates (1954) qui bloquent le développement des élongases. Les principaux sites d'action de ces dernières familles se situent dans les plastes et le réticulum endoplasmique. Les chloroacétamides regroupent des molécules systémiques préconisées pour le traitement des adventices déjà présentes lors du traitement alors que les thiocarbamates agissent par contact lors de la germination des adventices.

- Perturbation de la photosynthèse

Parmi le très grand nombre de molécules développées autour de cette cible, les molécules perturbant le fonctionnement du photosystème II constituent le groupe le plus important. Deux familles se détachent les s-triazines [simazine (1956), atrazine,...] et les urées substituées [diuron (1960), isoproturon, linuron,...], toutes deux synthétisées dans les années 50-60. Les molécules de ces deux familles se lient avec la protéine D1 du photosystème II perturbant ainsi le transfert des électrons lors de la photosynthèse. L'application de ces composés systémiques se fait principalement en pré-levé, leur absorption s'effectuant par la voie racinaire. Leur grande stabilité chimique et leur persistance dans les sols sont à l'origine d'une contamination importante des eaux par ces produits qui a conduit à l'interdiction en France de la plupart des s-triazines en 2001 et 2003.

Dans ce groupe des inhibiteurs de la photosynthèse, on trouve aussi la famille des bipyridiles (1958) avec le diquat et le paraquat, molécules très toxiques, non sélectives, qui perturbent le flux d'électrons à la sortie du photosystème I.

- Perturbation de la régulation de l'auxine

Les herbicides « auxiniques » mêlent des substances anciennes [2,4-D, 2,4-MCPA (1942)], parmi les premiers herbicides synthétisés, avec des molécules plus récentes de la famille des acides picoliniques (1963) et des acides quinoléines carboxyliques (1990). Ils perturbent la régulation hormonale de la division et de l'élongation des cellules végétales.

- Inhibition de la synthèse des caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments anti-oxydants efficaces pour neutraliser les radicaux libres responsables du stress oxydatif. Des familles récentes de molécules sont apparues pour neutraliser l'effet protecteur de ces pigments comme les tricétones [sulcotrione (1993)] et la callistémone [mésotrione (2000)].

- Perturbation de l'architecture intracellulaire

Certaines molécules affectent la formation des microtubules et des centrosomes impliqués dans la division et la structuration de la cellule. Parmi ces molécules, on trouve des substances actives de la famille des carbamates [carbétamides et chlorprophame (1945)] à laquelle appartiennent aussi des fongicides et insecticides. Une autre famille, les toluidines [pendiméthalines (1965)] est apparue dans les années 60.

Les agriculteurs ont à leur disposition un large éventail de molécules. Certaines présentent des propriétés insecticides, fongicides et herbicides comme la famille des carbamates, ou ciblent des sites d'action proches comme le processus respiratoire pour certains fongicides et acaricides. Certains insecticides ou fongicides, au même titre que les herbicides, peuvent donc avoir des effets sur les algues aquatiques (Hoagland *et al.* 1993).

En terme d'innovation, la tendance actuelle est à la mise sur le marché de molécules présentant des doses d'application relativement faibles afin de limiter leur concentration dans l'environnement et de réduire les problèmes de stockage liés à l'évolution de la réglementation dans ce domaine. Le développement de nouvelles molécules s'est considérablement ralenti ces dernières années, les nouveautés proposées s'appuyant sur des reformulations ou des isomères de molécules anciennes (Aubertot *et al.* 2005).

3 Les pesticides : un marché important

Vu les perspectives offertes en terme de gain de productivité, la consommation agricole des pesticides a véritablement explosé dans les années 60. Mais les données anciennes sont extrêmement limitées, et les deux sources fiables sont actuellement l'Union des Industries de Produits Phytosanitaires (UIPP) et le service des statistiques de l'Union Européenne (Eurostat).

a) Le marché des pesticides en chiffre d'affaire

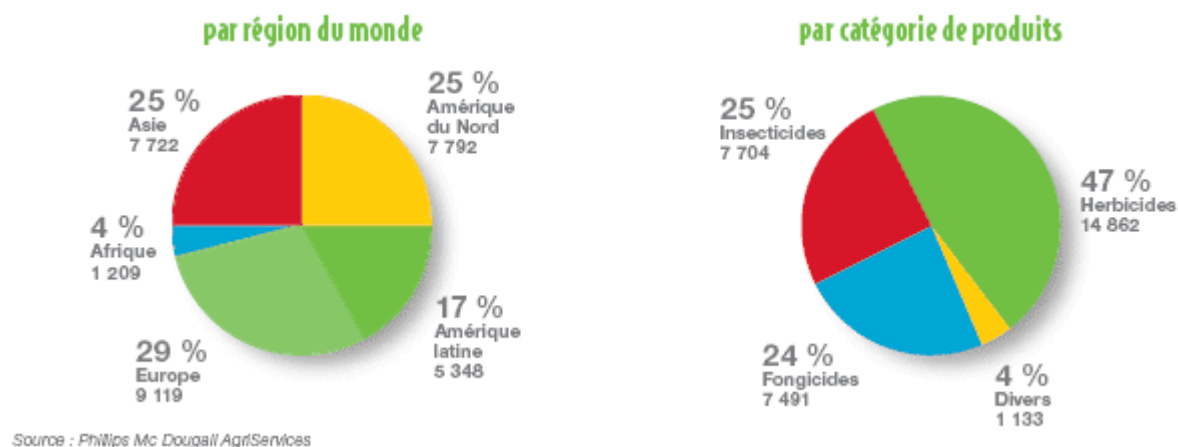


Figure 1 : Le marché mondial 2005, en chiffres d'affaire, des pesticides par région et par catégorie de produits (Source : UIPP <http://www.uipp.org/>)

A elles seules, l'Europe et l'Amérique du nord représentent, en 2005, plus de 50% du marché des pesticides dans le monde. Les herbicides concentrent près de la moitié du chiffre d'affaire mondial du marché des pesticides, les insecticides et les fongicides n'en représentant chacun qu'un quart (Figure 1). Dans les deux cas, cette répartition a peu bougé depuis 2002.

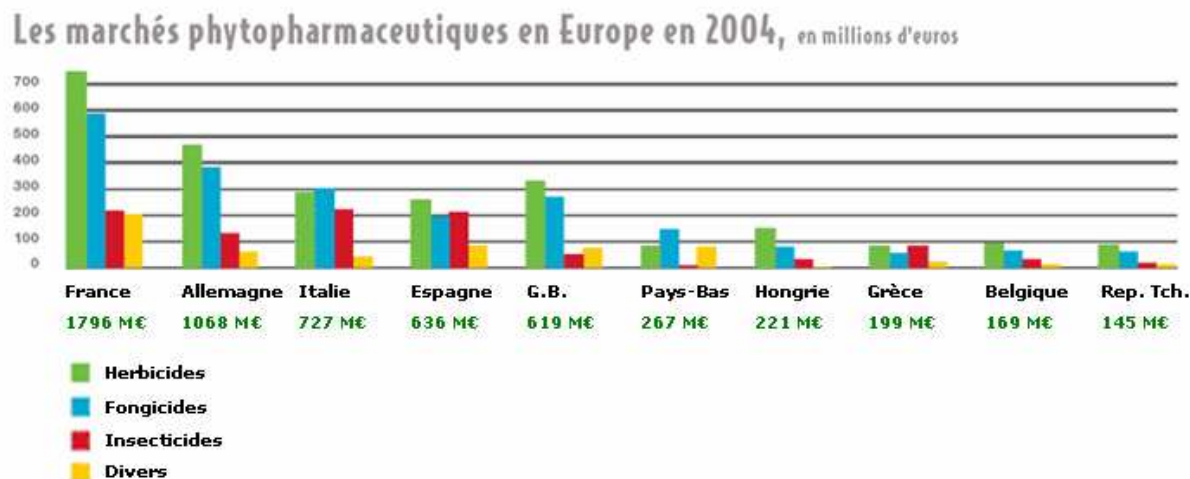


Figure 2 : Les marchés des produits phytosanitaires en Europe en 2004 en millions d'euros (Source : UIPP <http://www.uipp.org/>)

La France est de loin le premier marché européen en chiffre d'affaire en 2004 avec 1796 millions d'euros contre 1068 millions pour l'Allemagne et autour de 650 pour l'Italie, l'Espagne et le Royaume-Uni (Figure 2). Cette configuration a peu évolué depuis 1996 (source Eurostat et UIPP). Si en France, en Allemagne et au Royaume-Uni, les herbicides et les fongicides représentent, en 2004, plus de la moitié du marché, en Italie et en Espagne les chiffres d'affaires des trois principales catégories de pesticides sont proches. Mais ces données très ponctuelles ne permettent pas d'appréhender dans le temps la consommation réelle en pesticides et son évolution.

b) Le marché des pesticides en volume

Les données concernant les volumes totaux ou les volumes par catégorie (en tonnes), achetés en Europe et en France depuis les années 80-90, sont en partie disponibles. Au niveau mondial, la France consomme 76100 tonnes dont 90% pour l'agriculture soit 34% de la consommation totale européenne (Europe des 15) ce qui la place au 3^{ème} rang mondial (données 2001) (Aubertot *et al.* 2005). En terme de consommation rapportée à la surface agricole utile moins les surfaces de prairies permanentes (SAU en hectares), la France se place au 4^{ème} rang européen avec 5,4 kg/ha (Aubertot *et al.* 2005).

c) Les évolutions du marché

La consommation en pesticides a connu, malgré des fluctuations conjoncturelles, une croissance continue depuis les années 60 en Europe. Au niveau européen, l'étude menée par Eurostat (EUROSTAT 2000) sur une période réduite (1992-1996) montre que les volumes écoulés ont peu évolué, les volumes de fongicides étant supérieurs à ceux des herbicides et des insecticides. Concernant la France, les données sont plus complètes.

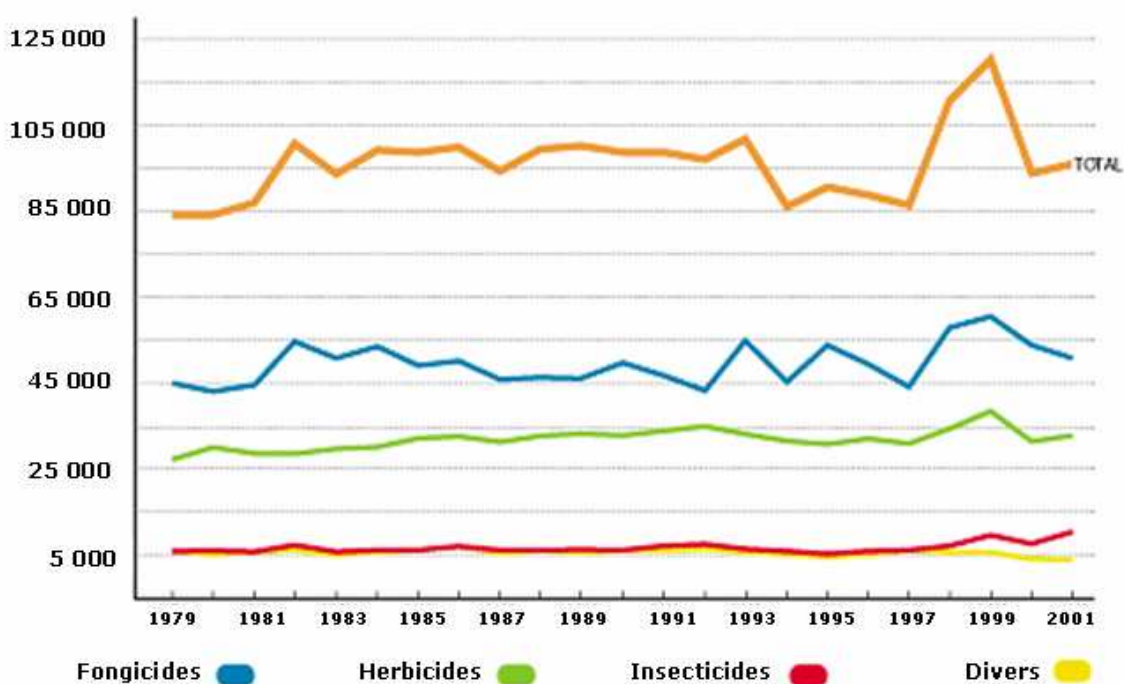
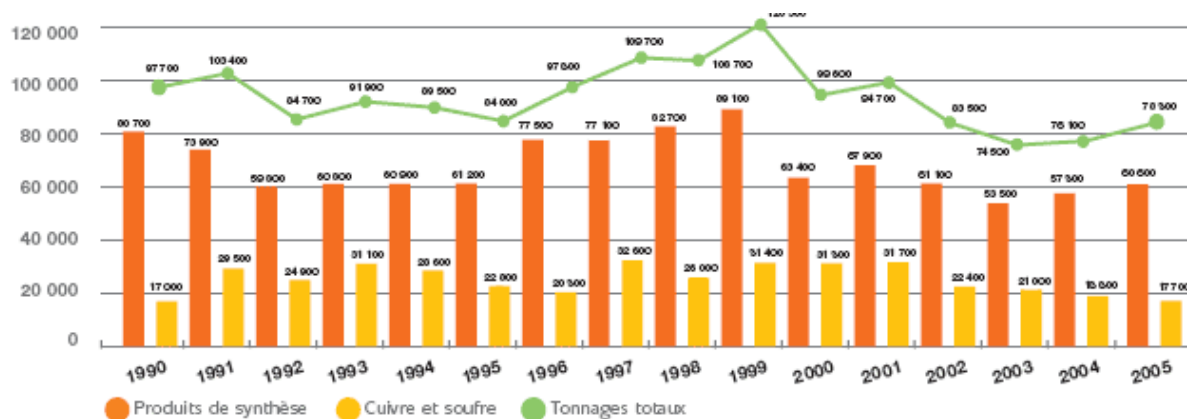


Figure 3 : Historique des tonnages de substances actives de 1979 à 2001
(Source : UIPP <http://www.uipp.org/>)



Source : Philips Mc Dougal AgrifServices

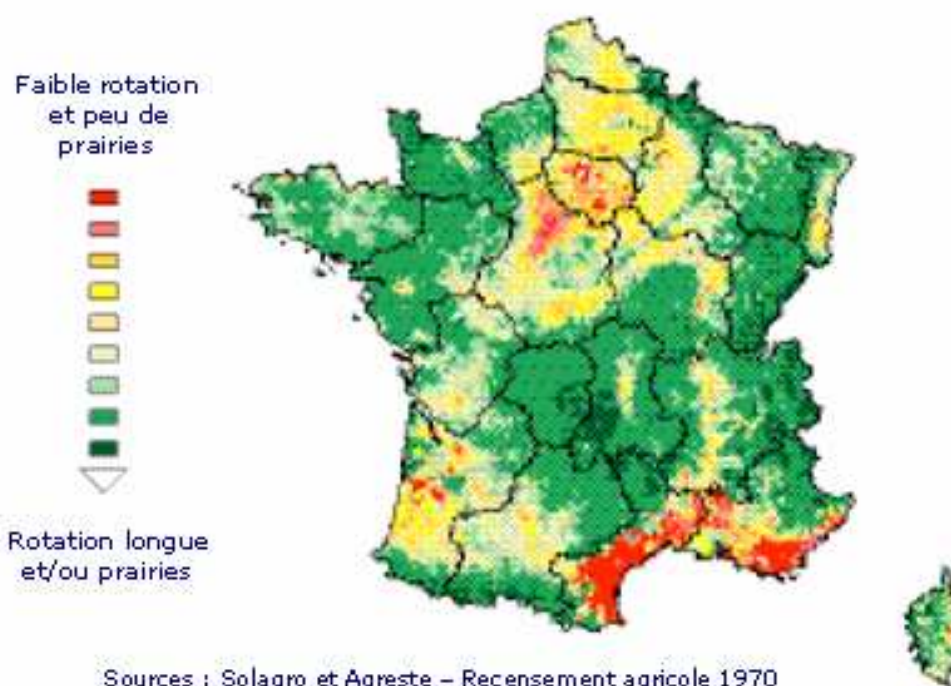
Figure 4 : Historique des tonnages de substances actives vendues en France entre 1990 et 2005
(Source : UIPP <http://www.uipp.org/>)

Dans les années 80 les achats de substances actives achetées se sont stabilisés autour de 95000 tonnes (ACTA 2002). Le début des années 90 (Figure 3 et Figure 4) voit une baisse significative des volumes écoulés. La tendance s'inverse à partir de 1997, les quantités vendues augmentant pour atteindre des valeurs inédites de l'ordre de 120000 tonnes en 1999. Entre 2001 et 2004, la consommation a chuté quelque que soit la famille de produit, la baisse globale sur l'ensemble des produits phytosanitaires étant de l'ordre de 24%. Cela est probablement à relier aux retraits de la vente de molécules très utilisées, notamment de la famille des s-Triazines (2001) (Aubertot *et al.* 2005).

En presque vingt ans, les volumes d'herbicides ont augmenté de 30% sans atteindre ceux des fongicides qui connaissent de fortes fluctuations vers le milieu des années 80 (Aubertot *et al.* 2005). Ces deux catégories dominent, en tonnage, le marché des pesticides. La possibilité de traiter préventivement avec ces deux types de pesticides explique, en partie, les forts volumes consommés par les agriculteurs comparés aux insecticides.

Néanmoins l'évolution réelle de la consommation se révèle difficile à estimer. Comme l'ont bien fait remarquer les différents auteurs de « *l'expertise collective : Pesticides agriculture et environnement* » (Aubertot *et al.* 2005), les données globales de tonnage ne sont guère pertinentes pour analyser finement l'évolution de la consommation en pesticides vu les changements fréquents de matières actives avec des doses différentes de traitement (Rabaud 2003).

Indicateur de diversité des cultures par commune en 1970



Indicateur de diversité des cultures par commune en 2000

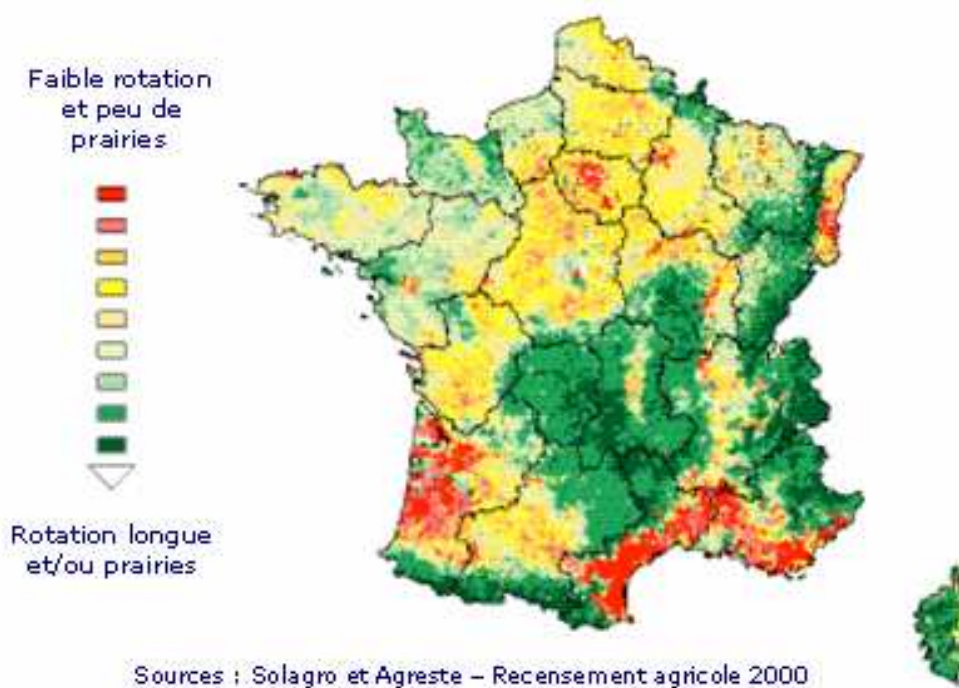


Figure 5 : Evolution de la diversité des cultures en France entre 1970 et 2000
(Source : Pointereau et Bisault 2006)

4 Un outil indispensable en agriculture

a) Des modes de traitement et des usages variés

Les insecticides sont couramment appliqués en traitement curatif lorsque les seuils maximaux d'abondance des ravageurs sont atteints. Les herbicides et les fongicide offrent la possibilité de traiter de manière préventive afin d'éviter tout développement des pathogènes ou des adventices des cultures avant ou après le semis (pré et post semis) et avant ou après la levée des premières plantules (pré et post levée). Si les volumes consommés sont très différents entre ces trois catégories de produits, la répartition est aussi inégale entre les cultures ; quatre cultures (céréales à paille, vigne, maïs et colza) concentrent à elles seules 80% des tonnages de pesticides achetés chaque année alors qu'elles ne représentent que 40% de la surface agricole utile (SAU) (Aubertot *et al.* 2005).

b) Un modèle agricole dépendant des pesticides

Le modèle « productiviste », qui s'est imposé avec la mise en place de la politique agricole commune (PAC) en 1962, a durablement marqué les pratiques agricoles. Pendant de nombreuses années la logique de rentabilité des exploitations agricoles s'est focalisée sur les gains de production, les pesticides étant, alors, indispensables pour assurer de bons rendements (Rabaud 2004). Les pratiques culturales ont, donc, été mises au service de l'accroissement des rendements et, par la même, du risque phytosanitaire. La disparition, dans certaines régions, des prairies, zone de refuge pour les auxiliaires des cultures, et la réduction des rotations ont eu pour conséquence de concentrer les ravageurs et les maladies spécifiques de ces cultures. Pointereau et Bisault (2006) ont ainsi montré qu'en trente ans la diversité des cultures dans les assolements s'était sensiblement (Figure 5) réduite avec la diminution des surfaces de prairies au profit de monocultures spécialisées, plus productives (Pointereau *et al.* 2006). L'intensification des traitements phytosanitaires a aussi conduit à une sélection des ravageurs, de pathogènes et d'adventices résistants aux pesticides. Des résistances sont apparues chez la plupart des familles de pesticides conduisant à l'abandon de certaines substances pourtant prometteuses. Les agriculteurs ont été dans l'obligation d'augmenter le nombre de traitements et, en définitive, de faire appel à de nouvelles molécules pour maintenir la pression sanitaire sous un seuil acceptable. Les insecticides et les fongicides ont développé plus de résistances que les herbicides (Gaillardon *et al.* 2001).

Dans ce contexte les pesticides sont, pour les exploitants, un outil indispensable pour faire face à l'augmentation du risque phytosanitaire et, ainsi, maintenir la production à un niveau acceptable permettant de faire face aux investissements lourds imposés par la spécialisation des exploitations.

D'autres pratiques, comme la Protection Biologique Intégrée (PBI) existent pour juguler le développement des ravageurs et des pathogènes en limitant la sélection d'individus résistants. La PBI s'appuie sur l'introduction de prédateurs naturels des ravageurs (insectes, nématodes) dans les cultures comme moyen de lutte. Mais ce genre d'alternative est restreint à des cultures très particulières (maraîchage sous serre, arboriculture,...)

5 Une forte contrainte réglementaire

De par leur toxicité, les pesticides sont soumis à une législation stricte concernant leur mise sur le marché et leurs conditions d'emploi. Pour rédiger cette synthèse réglementaire, nous nous sommes appuyés sur des données fournies par l'Observatoire des pesticides (<http://www.observatoire-pesticides.gouv.fr/>), l'index phytosanitaire 2007 (Couteux *et al.* 2007) et le ministère de l'agriculture et de la pêche (Ministère de l'agriculture et de la pêche 2003).

a) L'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM)

La plupart des dispositions législatives et réglementaires dans ce domaine sont codifiées dans la rubrique L 253 du code rural. Les premières dispositions législatives sur le contrôle des pesticides datent de 1943 (loi n°525 du 2 novembre 1943). Le décret d'application (décret 74/682 du 1 août 1974) a créé « la commission d'étude de la toxicité des produits antiparasitaires à usage agricole et assimilés » avec pour mission de donner un avis sur le risque que représente chaque produit phytosanitaire pour l'utilisateur, le consommateur et l'environnement. La transcription en droit français (décret 94-359 du 5 mai 1994) de la directive 91/414/CE, visant à harmoniser les conditions d'obtention d'une autorisation de mise sur le marché (AMM), a fait évoluer les principes et les modalités de contrôle des pesticides commerciaux ou produits phytosanitaires. L'article 7 stipule, ainsi, que l'AMM d'un produit phytosanitaire est délivrée si ses substances actives sont inscrites sur une liste communautaire spécifique et si l'innocuité du produit pour la santé publique, l'environnement ainsi que son efficacité et sa sélectivité, indiquées par le fabricant, sont vérifiées par des études agronomiques et toxicologiques.

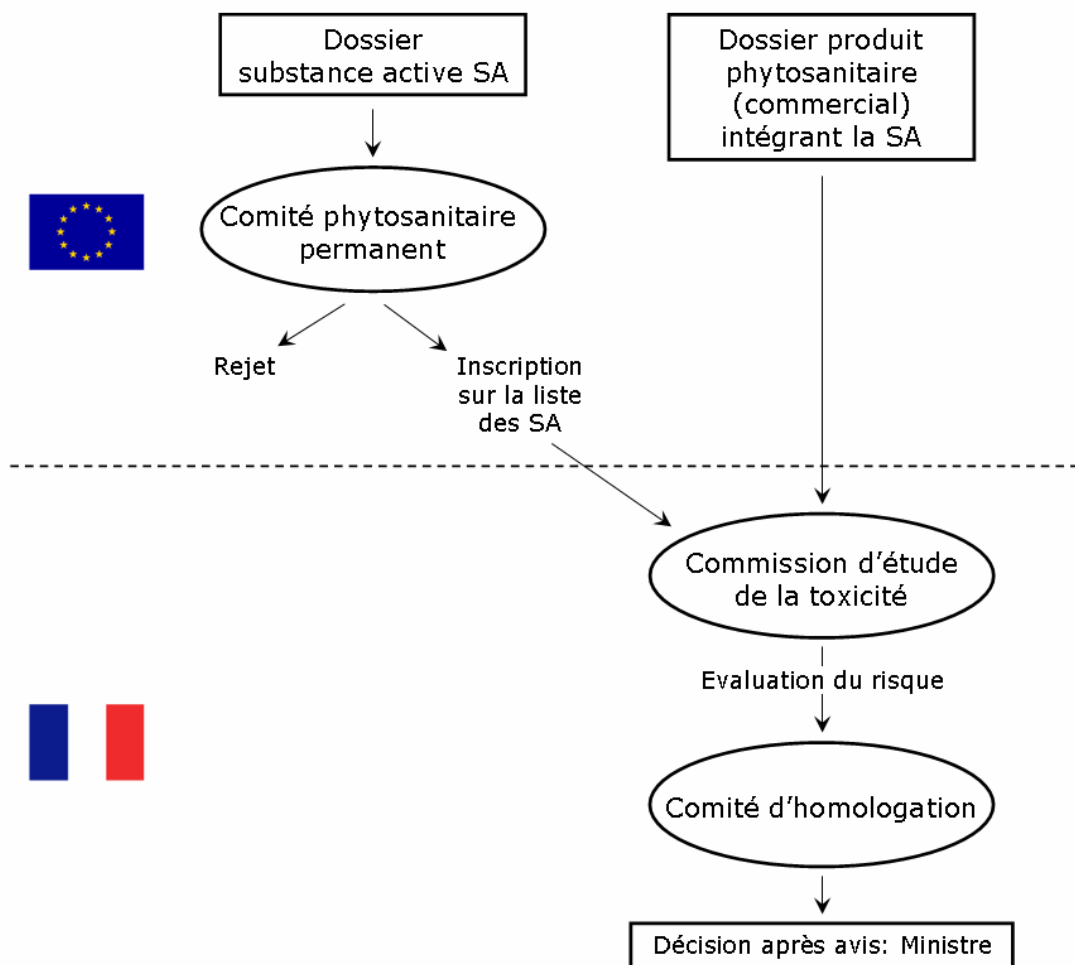


Figure 6 : Schéma synthétique de la directive 91/414/CE concernant l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) d'un produit phytosanitaire

En pratique (Figure 6), les substances actives absentes du marché avant 1993, sont soumises à une inscription¹ sur la liste communautaire (Annexe 1 de la directive 91/414/ CE) après examen d'un dossier relatif à la substance elle-même au niveau européen par la comité phytosanitaire permanent. Un deuxième dossier, concernant le produit phytosanitaire commercial intégrant cette substance, est examiné au niveau de chaque état membre par l'autorité compétente. Pour la France, il s'agit du ministère de l'agriculture et plus précisément de la commission d'étude de la toxicité des produits antiparasitaires à usage agricole et des produits assimilés. Celle-ci examine les études agronomiques et toxicologiques incluses dans les dossiers et transmet ses conclusions au « comité d'homologation des produits antiparasitaires à usage agricole et des produits assimilés ». L'AMM est accordée ou refusée par le ministre de l'agriculture après avis de ce comité. Des dérogations existent sous la forme d'AMM provisoire de trois ans prolongeable, pour des substances actives non inscrites sur la liste communautaire mais qui sont conformes aux conditions énoncées ci-dessus (article 7). Le décret n°2006-1177 (loi n°2006-11 du 5 janvier 2006) a transféré les compétences d'évaluation des

¹ La durée d'inscription ne peut excéder dix ans.

bénéfices et risques des produits phytosanitaires à l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) (Couteux *et al.* 2007).

L'utilisation de ces produits selon des principes de lutte intégrée est aussi mentionnée dans le décret 94-359. Le texte rappelle que l'utilisation de ces produits doit se faire de manière rationnelle en se limitant au strict nécessaire pour éviter toutes pertes économiques inacceptables pour l'agriculteur.

b) Un contexte de révision des AMM

Depuis quelques années, l'Europe et les états membres ont lancé une procédure de révision de la liste des substances actives¹ en fonction des informations nouvelles qui ont pu apparaître concernant le risque que représentent certaines molécules. Quatre phases ont été définies : les deux premières correspondent aux listes de substances actives devant être réévaluées en priorité. Cela a conduit à la radiation de la plupart des herbicides de la famille des s-triazines (Atrazine, Simazine 2004) du fait des concentrations élevées de ces substances relevées dans les eaux. La troisième phase de révision comprend les substances qui étaient sur le marché avant l'application de la directive 91/414/CE en juillet 1993. Elle répertorie 440 substances dont 190 seront soutenues par les industriels. En effet, au vu des coûts engendrés par les études nécessaires pour défendre une substance, les industriels préfèrent soutenir les substances actives les plus rentables. Enfin une quatrième phase est prévue pour étudier certaines substances particulières (endotoxines, rodenticides,...)

Cette démarche de révision s'inscrit dans un contexte plus général d'évaluation et de réglementation du risque que représentent les produits chimiques avec l'entrée en vigueur (1 juin 2007) de la directive REACH. Celle-ci vise à imposer aux industriels d'enregistrer leurs substances actives selon des principes et des règles proches de ceux appliqués aux substances actives destinées aux produits phytosanitaires. La réglementation concernant les AMM des produits phytosanitaires n'est donc pas affectée par cette directive.

¹ Ce qui équivaut à une révision des AMM.

B./ Une contamination importante des eaux par les activités agricoles

Le sursaut écologique des années 70 a contribué à faire prendre conscience du coût environnemental que représentait pour la société l'utilisation abusive d'intrants (fertilisants, pesticides) par les agriculteurs. Dès 1964 avec la loi Pisani, diverses mesures avaient déjà été prises en France (création des Agences de l'eau) pour améliorer la gestion quantitative et, dans une moindre mesure, qualitative des ressources en eau. Aux Etats-Unis, cette prise de conscience s'est traduite par le vote par le congrès du « Clean Water Act » en 1977 et la création d'une agence fédérale pour la protection de l'environnement (« Environmental Protection Agency » EPA). Dans ce contexte, on parle souvent indifféremment de contamination ou de pollution des eaux alors que ces deux termes abordent des notions distinctes ; la contamination des milieux est une notion qualitative (Présence/Absence de polluant(s)), alors que la pollution rend compte de « *l'introduction directe ou indirecte, par suite de l'activité humaine, de substances ou de chaleur dans l'air, l'eau ou le sol, susceptibles de porter atteinte à la santé humaine ou à la qualité des écosystèmes aquatiques ou des écosystèmes terrestres [...]* » (Aubertot et al. 2005). Nous nous attacherons dans cette partie à faire un historique et un état des lieux de la pollution agricole dans son ensemble (fertilisants et pesticides) pour identifier les limites des programmes de suivi de la qualité des eaux.

1 Les fertilisants

La pollution des eaux par les fertilisants agricoles (nitrate et phosphate) a été l'objet des premiers travaux de recherche sur la dégradation de la qualité des eaux de surface et souterraines dans les années 70.

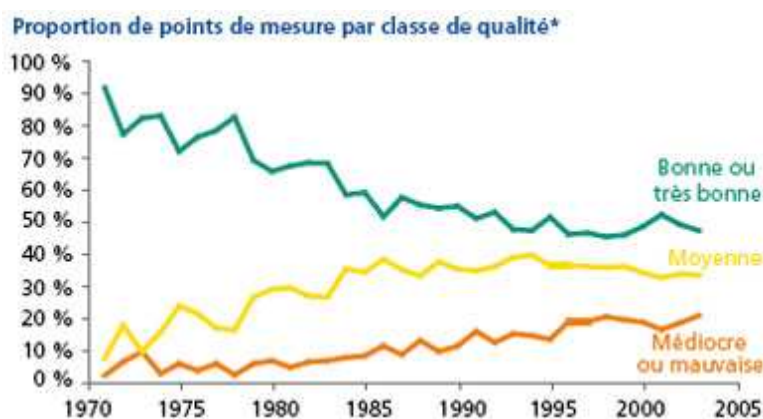


Figure 7 : Evolution de la qualité des eaux, du point de vue des concentrations en nitrates, sur les différents points de mesure entre 1970 et 2005 (Source : IFEN 2002)

Depuis, la qualité des cours d'eau n'a cessé de se dégrader (Figure 7) (IFEN 2006). L'exemple le plus connu est la prolifération d'algues (Ulves principalement) dans les baies de Bretagne.

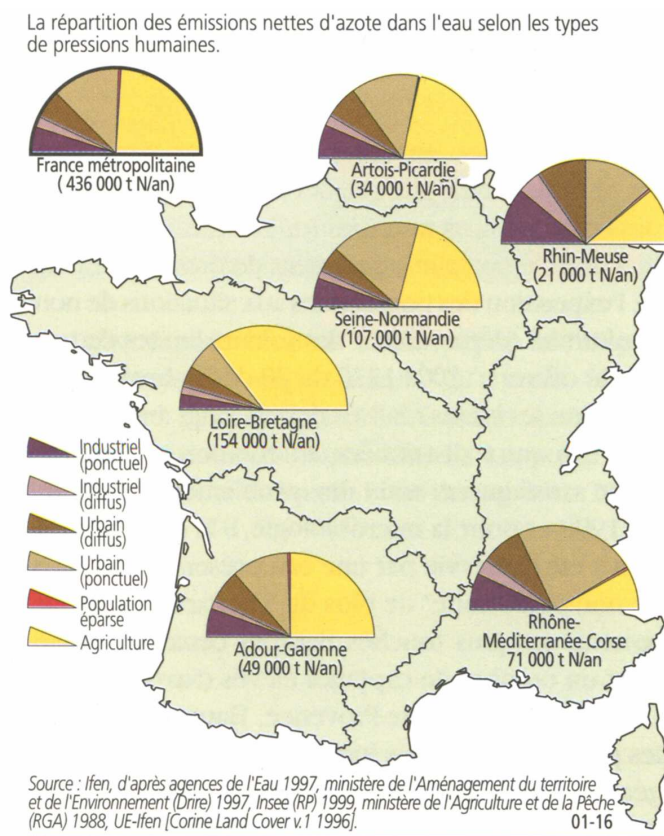


Figure 8 : Répartition des émissions nettes d'azote dans l'eau selon les types de pression humaine (Source : IFEN 2002)

Les apports trop importants d'éléments nutritifs aux cultures, sous la forme d'effluents d'élevage, ont conduit au rejet indirect du surplus dans les cours d'eau.

Dans son rapport sur l'état de l'environnement en France, l'Institut Français de l'Environnement (IFEN) confirme la part importante de l'agriculture dans les émissions d'azote (Figure 8), principalement là où l'agriculture est artificialisée (hors sol dans le grand Ouest) (IFEN 2002). La prise de conscience de la pollution des cours d'eau par des fertilisants agricoles a amené de nombreux chercheurs à se pencher sur la question des rejets diffus de pesticides agricoles dans les eaux de surface et dans les eaux souterraines.

2 Les pesticides

a) Les normes

A l'inverse des substances azotées et phosphorées (nitrate, nitrites, phosphates), le très grand nombre de molécules pesticides utilisées et leur très grande diversité, en terme de mode d'action et de toxicité, compliquent singulièrement l'établissement d'une norme universelle de qualité des eaux. Différents seuils de qualité des eaux ont, ainsi, été définis pour l'eau potable (potabilité et potabilisation) et pour les eaux brutes (Tableau 1).

Tableau 1 : Les différentes classes de qualité du SEQ-eau utilisées pour les pesticides
(Source : IFEN 2006)

		0,01 µg/l	0,05 µg/l	0,1 µg/l	0,7 µg/l	1,4 µg/l	2 µg/l
Eaux superficielles	Qualité globale	Excepté pour 39 substances qui ont une limite plus basse, la limite de la classe bleu-vert est de 0,1 µg/l (0,5 µg/l pour la somme des substances) <i>Permet la vie des organismes aquatiques et la production d'eau potable sans traitement spécifique pour les pesticides</i>		Excepté pour 33 substances qui ont une limite plus basse, la limite est de 0,7 µg/l (2 µg/l pour la somme des substances)	Excepté pour 33 substances qui ont une limite plus basse, la limite est de 1,4 µg/l (3,5 µg/l pour la somme des substances)	Excepté pour 6 substances qui ont une limite plus basse, la limite est de 2 µg/l (5 µg/l pour la somme des substances)	Ne peut plus satisfaire les équilibres écologiques ou la production d'eau potable sauf dérogation
	Usage eau potable	Excepté pour 4 substances qui ont une limite plus basse, la limite est de 0,1 µg/l (0,5 µg/l pour la somme des substances) <i>Permet la production d'eau potable sans traitement spécifique pour les pesticides</i>		2 µg/l (5 µg/l pour la somme des substances) <i>Permet la production d'eau potable mais nécessite un traitement spécifique pour éliminer les pesticides</i>		Ne permet plus la production d'eau potable sauf dérogation	
Eaux souterraines	Usage eau potable	Excepté pour 4 substances qui ont une limite plus basse, la limite est de 0,1 µg/l (0,5 µg/l pour la somme des substances) <i>Permet la production d'eau potable sans traitement spécifique pour les pesticides</i>		2 µg/l (5 µg/l pour la somme des substances) <i>Permet la production d'eau potable mais nécessite un traitement spécifique pour éliminer les pesticides</i>		Ne permet plus la production d'eau potable sauf dérogation	

codes couleurs des classes SEQ-eau

Qualité globale :	Très bonne	Qualité usage eau potable :	Bonne
	Bonne		Médiocre
	Moyenne		Mauvaise
	Médiocre		
	Mauvaise		

Dans le cas des eaux destinées à la consommation humaine, le décret n°2001-1220 du 20 décembre 2001 définit deux niveaux :

- × En amont de la potabilisation, la réglementation définit des concentrations seuils de pesticides dans les eaux brutes pour les trois types de traitements (A1, A2, A3)¹ de potabilisation de l'eau :
 - ➔ pour A1 et A2 : 0,1µg/l par substance individualisée – sauf l'aldrine, la dieldrine, l'heptachlore et l'heptachlore époxyde pour lesquels la valeur seuil est de 0,03µg/l – et 0,5µg/l pour la somme des pesticides

¹ groupe A1 : traitement physique simple et désinfection ;
groupe A2 : traitement normal physique, chimique et désinfection ;
groupe A3 : traitement physique et chimique poussé, opérations d'affinage et de désinfection.

- pour A3 : 2µg/l par substance individualisée et 5µg/l pour la somme des pesticides
- × En aval, pour la distribution d'eau destinée à la consommation humaine, la réglementation ne retient que les concentrations seuils citées précédemment pour les traitements A1 et A2. Il est à noter que ces valeurs seuils incluent également certains produits de dégradation des substances actives.

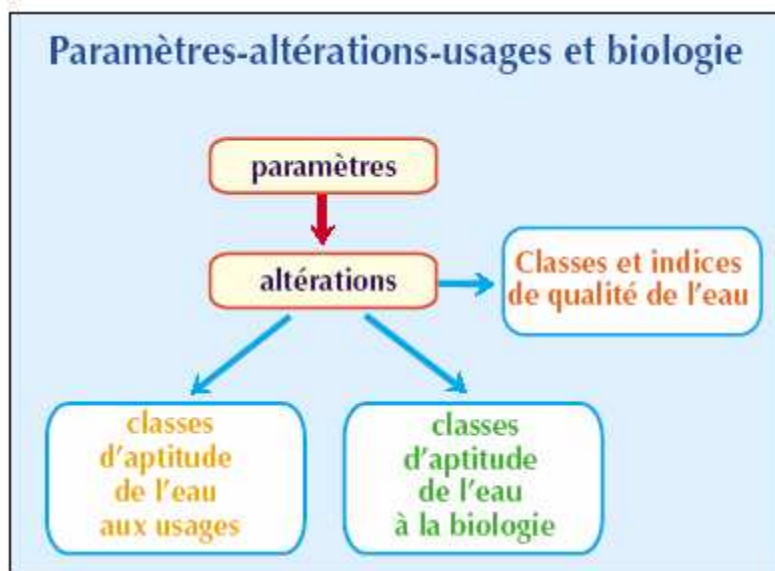


Figure 9 : Schéma du SEQ-eau (Source : Simonet 2001)

Dans le cas des eaux brutes de surface, l'évaluation de la qualité des eaux pour les concentrations en pesticides se réfère au « Système d'évaluation de la Qualité des eaux pour les cours d'eau » (SEQ– Cours d'eau), et plus particulièrement à son volet pour l'évaluation de la qualité physico-chimique des eaux, le SEQ-Eau. Il repose sur deux notions fondamentales que sont les notions d'altération et d'aptitude de l'eau (Figure 9) (Simonet 2001). Une altération regroupe des paramètres de même nature ou ayant les mêmes effets sur le milieu aquatique. La notion d'aptitude de l'eau renvoie, elle, à la capacité des écosystèmes à satisfaire un certain nombre d'usages. *In fine*, le SEQ-eau fournit par altération, et notamment l'altération « pesticides », une liste de substances actives (pesticides et certains de leur métabolites) avec pour chacune des seuils de qualité correspondants aux cinq classes de qualité (Agence de l'eau 2003; IFEN 2006). Pour les pesticides non répertoriés dans cette liste, des seuils globaux ont aussi été définis. La somme totale des concentrations en pesticides est aussi prise en compte pour estimer la qualité des eaux.

La mise en place de la directive cadre sur l'eau DCE (2000/60) doit conduire à la définition de valeurs seuils pour certaines substances définies comme prioritaires parmi lesquelles dix pesticides¹. Le groupe d'experts du Cemagref et de l'INRA préconise dans son rapport « Pesticides, Agriculture, Environnement » d'utiliser les concentrations prédites sans effets (*Predicted No Effect Concentrations*

¹alachlore, atrazine, chlorfenvinphos, chlopyrifos-éthyl, diuron, alpha-endosulfan, lindane, isoproturon, simazine, trifluraline

ou PNEC), déterminées lors de l'évaluation du risque écotoxicologique de ces pesticides, comme valeurs seuils (Aubertot *et al.* 2005).

b) L'état des lieux de la qualité des eaux

La recherche des pesticides dans les eaux a réellement débuté avec le développement de moyens analytiques performants. Les deux principales techniques utilisées de nos jours pour doser ces molécules et leurs métabolites s'appuient sur le principe de la chromatographie (TSWETT 1906), les molécules étant séparées, soit en phase gazeuse (GC) soit en phase liquide (LC), sur une colonne en fonction de leur affinité pour la résine contenue dans cette colonne (Audigie 1997). La littérature scientifique fait état de la mise au point d'un très grand nombre de méthodes analytiques dans les années 70. Les premières études de suivi des concentrations en pesticides dans les eaux ont été lancées en Europe et en Amérique du nord vers le milieu des années 70 (Commission des Communautés Européennes 1978; Wauchope 1978). En France la grande sécheresse de 1976 a fait prendre conscience aux autorités compétentes de la nécessité de préserver la ressource hydrique. Des campagnes de prélèvements ont été alors menées sur la Loire et sur des étangs du Roussillon (Mestres *et al.* 1979). Mais la mise en place d'études de suivi de la contamination des eaux de surface par les pesticides à grande échelle en Europe et en Amérique du nord n'a été effective que dans les années 90 (Pereira *et al.* 1990; Albanis 1992). En France, deux réseaux de suivi systématique, l'un pour la qualité des eaux de surface (Réseau National de Bassin (RNB) 1995) et l'autre pour la qualité des eaux souterraines (Réseau National des Eaux Souterraines (RNES) 1996), ont ainsi été créés. Depuis cette date, les prélèvements effectués ont permis d'évaluer la qualité des ressources en eau et de suivre son évolution.

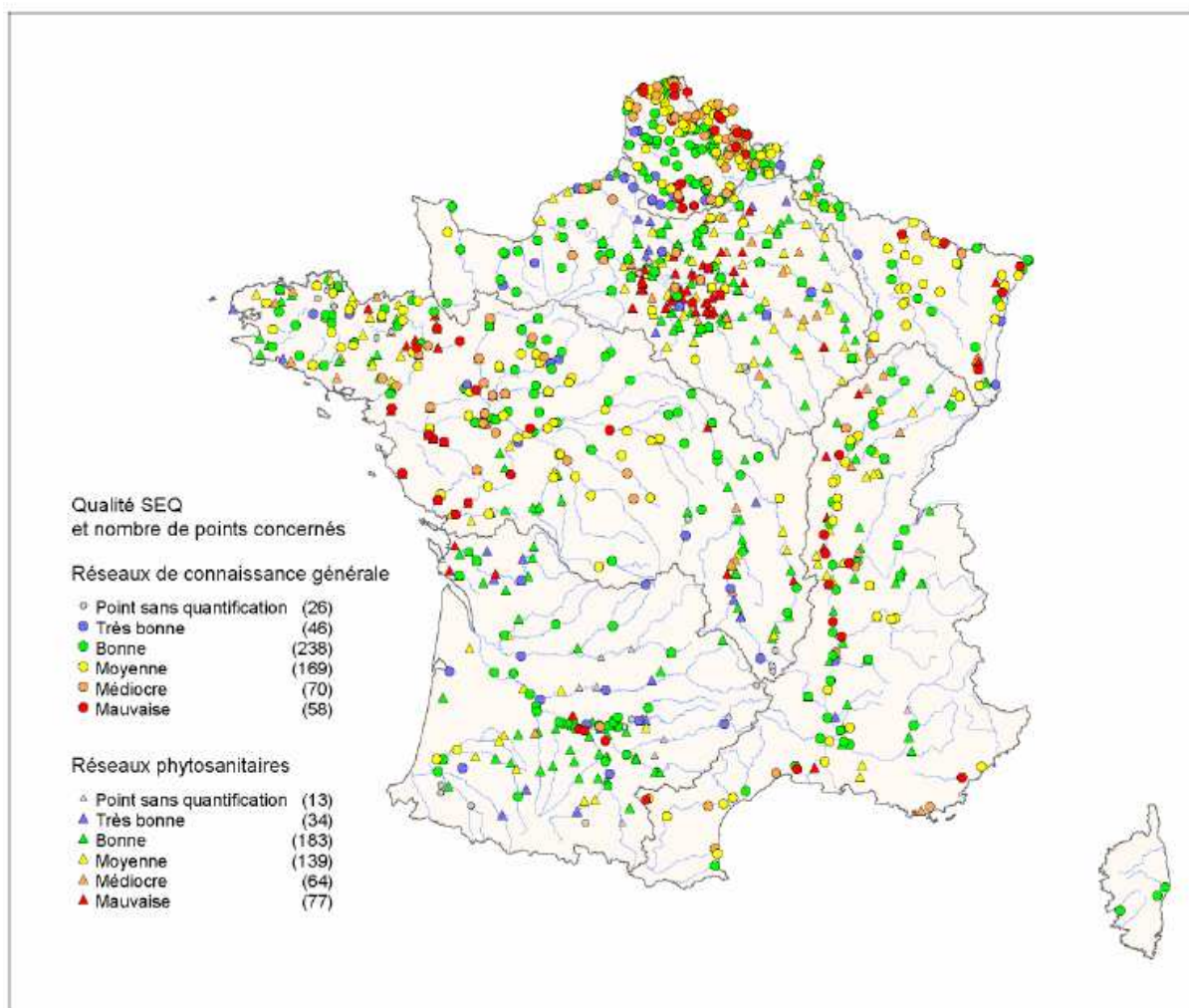


Figure 10 : La qualité des eaux sur les stations du RNB en fonction des concentrations, en pesticides en 2004 (Source : IFEN 2006)

- Au plan national

La synthèse des derniers résultats présentée par l'IFEN en 2002 et 2006 souligne la présence de pesticides dans tous des points de mesure surveillés¹ depuis 1997 (IFEN 2002).

En 1999 et en 2000, pour 95% des 400 points surveillés dans le cadre du RNB, la dégradation de la qualité des eaux représentait un risque pour la vie aquatique. En cas de prélèvement pour la production d'eau potable, un traitement spécifique était en outre nécessaire (IFEN 2002; IFEN 2002). En ce qui concerne les eaux souterraines, les résultats sont relativement semblables. En 1999, 2000 et 2001, des pesticides ont été détectés sur 75% des points surveillés. Dans 41% des cas, l'eau n'était pas utilisable pour produire de l'eau potable sans un traitement spécifique. Que ce soit pour les eaux de surface ou les eaux souterraines, les analyses ont principalement détecté des herbicides comme l'atrazine et des molécules de la famille des urées substituées (diuron et isoproturon) (IFEN 2002).

Pour la période 2003-2004, le rapport spécifique de l'IFEN sur les pesticides dans les eaux confirme l'état des lieux dressé précédemment (Figure 10) (IFEN 2002; IFEN 2002; IFEN 2006). Dans 96% des

¹ Le RNB n'intègre que quelques stations de référence (massifs montagneux,...)

points de mesures pour les eaux de surface et 61% pour ceux des eaux souterraines, la présence de pesticides a été relevée. Au cours de cette période, certains seuils de qualité des eaux brutes (0,7µg/l pour au moins une substance et/ou de 2µg/l pour la somme des concentrations des différentes substances présentes simultanément) ont été dépassées au moins une fois dans 50% des stations du RNB. Dans le cas des eaux souterraines, 30% des stations de suivi ont été confrontées à la même situation (0,1µg/l pour au moins une substance et/ou de 0,5µg/l pour la somme des concentrations des différentes substances présentes simultanément).

Comme précédemment, ce sont des molécules herbicides qui sont à l'origine du déclassement en qualité des points de prélèvement :

- ➔ le glyphosate, le diuron, l'isoproturon, l'aminotriazole et un métabolite du glyphosate, l'acide aminométhylphosphonique AMPA pour les eaux de surface,
- ➔ et le glyphosate, l'atrazine, le chlortoluron pour les eaux souterraines.

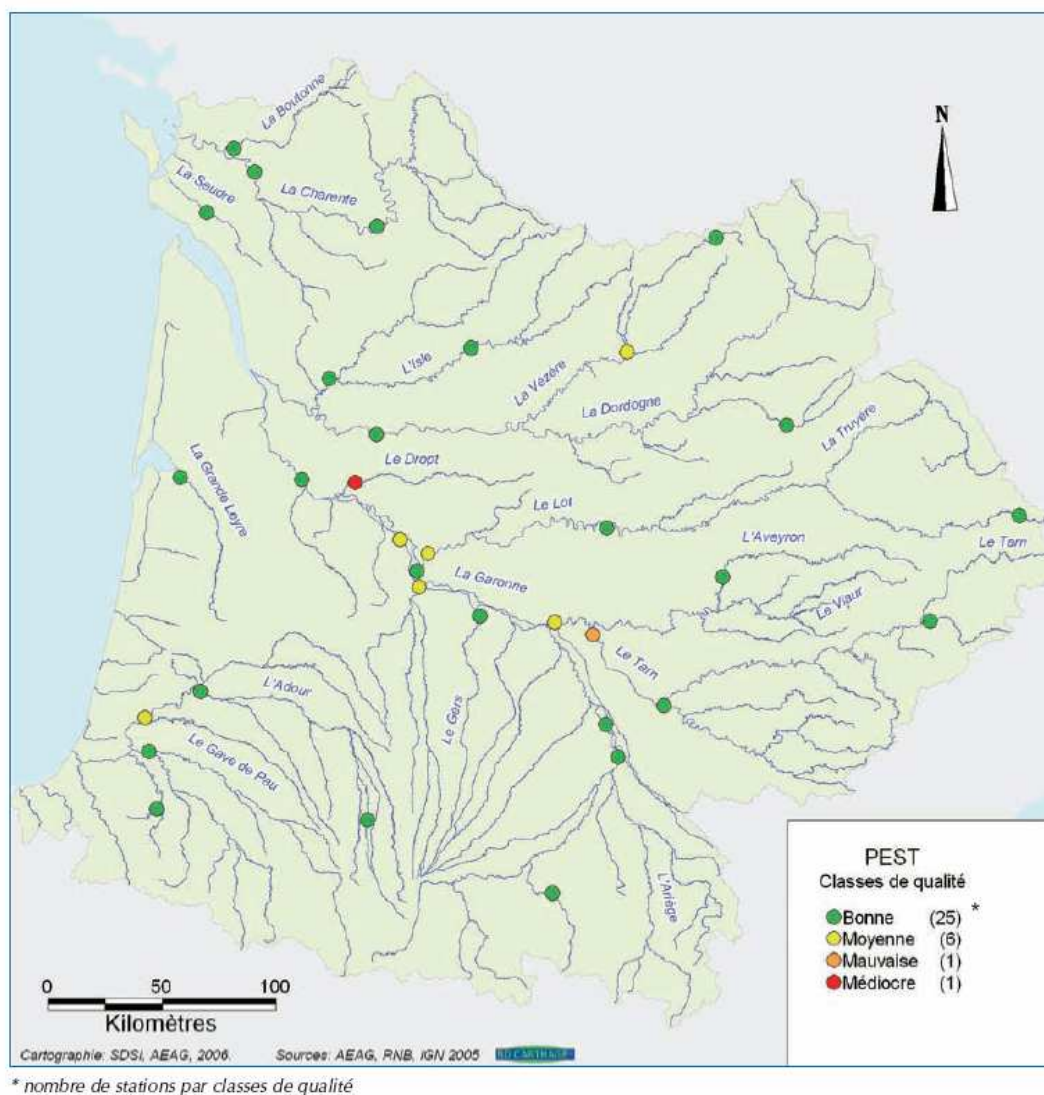


Figure 11 : La qualité des eaux sur les stations du bassin Adour-Garonne (A.G.), en fonction des concentrations en pesticides, en 2005 (Source : Agence de l'eau A.G. 2006)

- Au plan local

Cette pollution affecte la plupart des régions agricoles avec une intensité différente en fonction des caractéristiques hydrologiques et morpho-pédologiques locales (Villey-Desmeserets *et al.* 2001).

Dans le cas du bassin Adour-Garonne, ce sont principalement les départements agricoles de plaine qui sont les plus touchés. En 2002, l'agence de l'eau Adour-Garonne pointait l'état préoccupant de la pollution par les pesticides, 55% des points de mesure pour les eaux de surface présentant une eau de qualité moyenne à très mauvaise pour cette altération (Agence de l'eau Adour-Garonne *et al.* 2003). Les résultats de 2004 et 2005 confirment cette situation, notamment sur les bassins de la Garonne et du Tarn (Figure 11) (Agence de l'eau Adour-Garonne 2006). La contamination des cours d'eau intervient principalement au printemps¹, après des épisodes pluvieux intenses, les molécules étant entraînées par ruissellement (Agence de l'eau Adour-Garonne 2005; Agence de l'eau Adour-

¹ A cette période, de nombreux traitements sont appliqués sur les cultures d'hiver en pleine reprise de croissance et lors des semis.

Garonne 2006). Des observations similaires ont été faites par Albanis en Grèce (Albanis 1992). Les concentrations peuvent, alors, atteindre des valeurs élevées, supérieures à 10µg/L (voir pages 103-104). Des niveaux de pollution semblables voire supérieurs sont rapportés dans d'autres régions françaises et en Europe (Brockway *et al.* 1984; Hamala *et al.* 1985; Williams *et al.* 1995; Seguin *et al.* 2001; Cour des Comptes 2002; Lockert *et al.* 2006; Weiner *et al.* 2007). En 2005, les herbicides utilisés en « maïsiculture » et en cultures permanentes (vergers, vigne) constituaient la majorité des molécules détectées (Agence de l'eau Adour-Garonne *et al.* 2003; Agence de l'eau Adour-Garonne 2005; Agence de l'eau Adour-Garonne 2006).



*Pourcentage de population permanente
ayant été desservie par une eau non conforme
(année 2002 - valeurs maximales observées)*

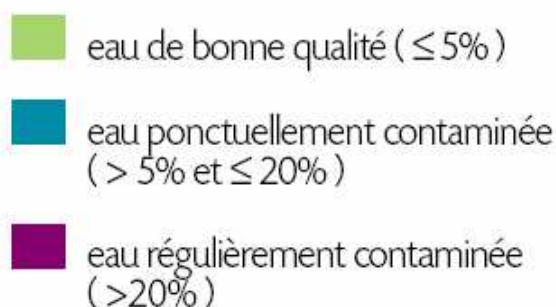


Figure 12 : Carte de la qualité des eaux potables distribuées sur le bassin Adour-Garonne du point de vue des concentrations en pesticides
(Source : Agence de l'Eau A.G. et DDASS/DRASS 2003)

c) Les conséquences de cette pollution

Avant même les conséquences environnementales de ce genre de pollution, la présence des pesticides dans les eaux a été la première cause de restriction en eau potable sur le bassin Adour-Garonne, notamment dans les plaines des départements où une agriculture intensive de grandes cultures s'est développée (Dordogne, Lot et Garonne, Gers, Ariège,...) (Figure 12). En 2002, 5,5% de

la population permanente du bassin a été alimentée par de l'eau non-conforme du point de vue des concentrations en pesticides (Agence de l'eau Adour-Garonne *et al.* 2003).

La mise en place de traitements spécifiques (notamment par charbon actif) a permis de réduire les cas de contamination excessive des eaux distribuées. Néanmoins ce type de traitement est relativement onéreux. On estime, ainsi, à 300 millions d'euros le coût de mise en conformité de l'eau, le poste des traitements spécifiques aux pesticides représentant 28% de cette somme, après les traitements bactériologiques (42%) (Agence de l'eau Adour-Garonne *et al.* 2003).

d) L'évolution de cette pollution

Le retrait de certaines molécules a nettement contribué à modifier le panel de molécules retrouvées. Ainsi, l'interdiction des molécules de la famille des s-triazines¹ (pour la vente 2001 et pour l'utilisation 2003) est visible dans les résultats des eaux de surface pour les données de l'IFEN entre 2002 et 2006 et les données de l'Agence de l'eau entre 2003 et 2004 (IFEN 2002; Agence de l'eau Adour-Garonne 2005; Agence de l'eau Adour-Garonne 2006; IFEN 2006). La vitesse de renouvellement plus lente des eaux souterraines peut expliquer la détection de l'atrazine en 2003 et 2004 sur les stations du RNES. Certaines molécules semblent avoir remplacé l'atrazine. Ainsi, à l'inverse des données de 2000 et 2001, le glyphosate est signalé, en 2003 et 2004, dans des proportions suffisantes pour conduire au déclassement de nombreux points de mesure (IFEN 2006). Cet herbicide non sélectif, très efficace contre les plantes pérennes, est devenu un herbicide très apprécié des agriculteurs en substitution des molécules interdites. Les problèmes émergents liés à sa présence de plus en plus importante dans les eaux (molécule très mobile, peu adsorbée dans les sols) ont conduit à une révision (toujours en cours) des classements toxicologiques (Couteux *et al.* 2007).

Cependant il s'avère difficile de distinguer des tendances à court terme, au plan national, de l'état de cette pollution. En effet, l'hétérogénéité des données disponibles, notamment entre les grands bassins (date de prélèvements, type et nombre de molécules recherchées) et la variabilité interannuelle des régimes pluvieux, au cours desquels les pesticides sont lessivés et rejetés dans les cours d'eau, rendent difficile toute comparaison dans le temps et dans l'espace (Aubertot *et al.* 2005).

Les conséquences de l'application à grande échelle de mesures agri-environnementales (ex : bandes enherbées, contrôle des pulvérisateurs) sur les niveaux de pollutions dans les cours d'eau ne sont pas encore visibles. Mais les conclusions quant à leurs effets doivent être nuancées, leur application sur le terrain étant relativement récente.

e) Les limites des programmes de surveillance analytique

Les programmes de surveillance de la qualité des eaux se heurtent à de nombreuses limites techniques, financières (coût des analyses) et méthodologiques (prélèvements), et à la nécessité d'évaluer, en plus des flux, les effets biologiques de ce type de pollution.

¹ Un isomère du métolachlore, le s-métolachlore, a été substitué à l'atrazine (Agence de l'eau 2005 et 2006).

D'un point de vue analytique, les techniques actuelles de dosage des pesticides dans les eaux ne permettent de détecter que les seules molécules recherchées. Vu leur très grand nombre et le coût élevé de chaque analyse, il est impossible de rechercher, dans un échantillon, toutes les substances actives disponibles sur le marché des pesticides ainsi que leurs métabolites. (Forbes *et al.* 1997; Aubertot *et al.* 2005). Une voie médiane a été trouvée ces dernières années avec le développement d'une nouvelle méthode d'analyse dite « multi-résidus » qui permet de détecter, et si possible de quantifier, non plus une molécule mais un groupe de molécules sélectionnées.

D'un point de vue méthodologique, la couverture spatiale des réseaux de suivi et la fréquence d'échantillonnage sont très hétérogènes d'une agence de l'eau à une autre et au sein même des agences en fonction du polluant recherché. Par exemple, dans le cas du bassin Adour-Garonne, 33 stations assurent le suivi de la pollution par les pesticides contre 281 pour la pollution par les nitrates (281) (Agence de l'eau Adour-Garonne 2006). A l'échelle nationale, l'interprétation de ces données disparates est donc relativement délicate et ne permet d'avoir une idée d'ensemble des flux de contaminants. En outre, le suivi de la qualité des eaux s'appuie sur des prélèvements ponctuels qui ne fournissent pas une vision intégrée dans le temps des niveaux de pollution. Un échantillon d'eau peut ainsi se révéler indemne de pesticides quand bien même une pollution de nature passagère intervient sur la station. Or de nombreuses études ont montré que les rejets de pesticides dans les cours d'eau étaient tributaires des épisodes pluvieux importants. Dans ce cas précis, la pollution des eaux par ces molécules se concentre sur des périodes très brèves, principalement durant les crues, avec des concentrations élevées pouvant avoir un effet biologique (Spalding *et al.* 1989; Forbes *et al.* 1997; Carder *et al.* 1998; Schulz 2001; Ferenczi *et al.* 2002; Neumann *et al.* 2003; Aubertot *et al.* 2005).

Enfin, la majorité des programmes de suivi de qualité des eaux s'est focalisée sur la contamination de la ressource hydrique par les pesticides sans étudier les effets de cette pollution sur les écosystèmes aquatiques (Aubertot *et al.* 2005). Or il apparaît important de disposer de ce type d'information pour pouvoir fixer, si nécessaire, des mesures de réduction d'usage et des normes de rejets aux agriculteurs. La simple interprétation des niveaux de pollution, en se fondant sur les données de toxicologie propres à chacune des molécules présentes, n'a aucune signification d'un point de vue biologique. En effet, pour ce genre de pollution, il est impératif de prendre, aussi, en compte l'effet des molécules en interaction (synergie ou antagonisme) (Krieger *et al.* 1988). En outre, les effets signalés, à partir de tests standardisés¹ sur un nombre restreint d'espèces, ne correspondent, le plus souvent pas, aux effets potentiels d'une pollution globale par les pesticides sur les biocénoses aquatiques, (Crow *et al.* 1979; Ramade 1992; Forbes *et al.* 1997; Lagadic *et al.* 1997).

Toute la difficulté du suivi des pollutions par les pesticides est de réussir à estimer les flux de pesticides et à établir une relation de causalité entre ces flux et les effets sur les biocénoses aquatiques.

¹ Tests d'écotoxicité mono-spécifiques standardisés : Test Daphnies 24h EN 1506341, Test Algues 72h NF T90-360

Bilan sur le suivi de la qualité des eaux

Les réseaux de suivi de la qualité des eaux ont mis en évidence une contamination importante, principalement d'origine agricole, des cours d'eau et des eaux souterraines par les fertilisants et les pesticides. Dans le cas des pesticides, leur présence a été détectée sur tous les points de mesure de ces réseaux depuis leur mise en place dans les années 90. Les principales molécules détectées appartiennent au groupe des herbicides (glyphosate, atrazine, urées substituées) (Aubertot *et al.* 2005). Cependant l'interprétation de ces résultats se heurte à de nombreuses limites d'ordre analytique (nombre réduit de molécules décelables), méthodologique (hétérogénéité des stations, des fréquences d'échantillonnage entre les Agences de l'eau), mais aussi à la nature même de la pollution des cours d'eau par les pesticides qui se concentre sur des épisodes très brefs (crues après épisodes pluvieux). Par ailleurs, les données fournies par ces réseaux se limitent aux concentrations de pesticides sans estimation réelle de leurs effets sur les organismes aquatiques. Les lacunes soulevées ne doivent pas occulter l'intérêt de tels réseaux pour suivre au mieux l'évolution de la qualité des milieux aquatiques et, ainsi, fournir au législateur des éléments nécessaires à la mise en oeuvre de mesures de contrôle et de réduction des rejets.

C./ Un contexte législatif et réglementaire en pleine évolution

L'accroissement des pollutions agricoles et leur responsabilité¹ dans la dégradation continue de la qualité des eaux ont contribué à une prise de conscience, par la société, des risques concernant la santé publique et l'environnement, d'une présence importante de pesticides dans les eaux. Le contexte législatif et réglementaire a donc fortement évolué ces dernières années, que ce soit en amont, pour réduire les rejets, ou en aval, pour restaurer les écosystèmes déjà dégradés.

1 Une forte pression sociale

Ces dernières années ont vu le développement d'une très nette défiance du grand public vis-à-vis du monde agricole, de ses pratiques et de leurs conséquences pour la santé et l'environnement (pollutions agricoles, OGM, « vache folle »). A cela s'est conjuguée une crainte grandissante de la société pour les substances chimiques, potentiellement toxiques, présentes dans notre environnement. Plusieurs décisions judiciaires et études scientifiques récentes, concernant l'impact des pesticides agricoles sur la santé des agriculteurs, ont reconnu l'existence d'un lien possible entre des pathologies observées chez cette population et leur exposition à ces produits toxiques (Baldi *et al.* 2003; Lebailly *et al.* 2003; Prieur 2006; Provost *et al.* 2007). Des études épidémiologiques sont actuellement en cours pour établir la responsabilité de l'exposition à des pesticides dans le développement de pathologies professionnelles dans le monde agricole (Benkimoun 2006). Les effets et perturbations (endocriniennes notamment) induits par des pesticides chez certaines organismes « visibles » (poissons, oiseaux), ont souligné les risques que constitue la pollution par les pesticides pour la santé publique (Aubertot *et al.* 2005). L'attente de la société concernant la réduction de la pollution par les pesticides est donc forte. L'évolution de la législation, tant au plan européen que français, s'inscrit dans ce contexte.

2 Une évolution de la législation en amont au niveau agricole

Dès les années 70, René DUMONT critiquait les dérives d'un modèle agricole productiviste « *gaspilleur d'énergie et polluant* », qu'il avait contribué à créer (Dumont *et al.* 1977). Mais fondamentalement, sa critique ne visait pas l'utilisation des pesticides mais leur application abusive (Dufumier 2002). La politique agricole commune ne prendra en compte cet aspect qu'en 1992 avec sa première réforme importante qui a introduit des aides en faveur de mesures agro-environnementales (MAE) afin de favoriser les pratiques respectueuses de l'environnement. En France, cela s'est traduit par la mise en oeuvre de différentes mesures de soutien contractualisées dans le cadre d'engagements volontaires des exploitants agricoles (Contrats Territoriaux d'Exploitation puis Contrats d'Agriculture Durable). Mais l'aspect non contraignant de ces mesures n'a pas eu les effets escomptés sur la contamination des cours d'eau par les pollutions agricoles (IFEN 2002). Face à ce constat, les

¹ Les efforts consentis par les autres sources de rejets (industrie, collectivités urbaines) font de l'agriculture la source principale de polluants pour les ressources en eau (surface et souterraine).

pays membres ont engagé en 2003 une réforme plus profonde avec le découplage¹ progressif des aides de la production et l'introduction du principe d'écoconditionnalité de ces aides. Ce système vise à favoriser la mise en place de mesures agro-environnementales par les agriculteurs au détriment de l'accroissement de leur production. Vu la polémique entourant la répartition des aides entre états membres, la question du poids de la PAC dans le budget de l'Union Européenne (45% en 2003) pourrait resurgir avant la date fixée (2013) par le conseil de Luxembourg en 2003 et, ainsi, modifier à nouveau le régime des aides agricoles (Aubertot *et al.* 2005).

Au plan européen, dans le cadre du 6^{ème} Plan d'Action Européen (PAE), la commission européenne a adopté en juillet 2006 une stratégie « *pour l'utilisation durable des pesticides* ». Un des principaux objectifs de ce plan est de réduire les risques, pour la santé humaine et l'environnement, liés à l'utilisation des pesticides (définition de normes pour le matériel de pulvérisation) (Ministère de l'écologie et du développement durable 2005).

Au plan national, le gouvernement a mis en place, en 2006, pour trois ans, un « plan interministériel de réduction des risques liés aux pesticides » qui s'inscrit dans la démarche européenne citée précédemment. Il vise à réduire le risque que représentent ces molécules pour la santé des utilisateurs et des consommateurs, et pour l'état de santé des écosystèmes (Ministère de l'écologie et du développement durable 2006).

3 Une évolution de la législation en aval au niveau de la gestion des ressources hydriques

Au niveau européen, la dégradation généralisée de la qualité des eaux sur toute l'Europe a conduit les responsables politiques européens à modifier la législation dans ce domaine avec la mise en œuvre d'une Directive Cadre sur l'Eau (DCE) n°2000/60². Les différentes dispositions législatives et réglementaires³ antérieures n'intégraient pas la dimension globale de la gestion des ressources hydriques. Avec cette directive cadre, l'approche sectorielle des différentes directives précédentes a laissé place à une approche intégrée de la gestion de la qualité de l'eau. Elle introduit la notion de bon potentiel écologique pour un milieu apte à fournir une eau de bonne qualité. Les points clés de cette directive et les différentes étapes sont :

- × la réalisation d'un état des lieux des masses d'eau en terme de qualité, de quantité de la ressource hydrique ainsi que de son utilisation (limite 2004),
- × la reconquête et le maintien d'un bon état écologique en 2015,
- × la mise en place d'un système complet de suivi et d'enregistrement de la qualité des eaux (limite 2006).

¹ L'accord de Luxembourg en 2003 a instauré **le découplage** des aides agricoles de la production et **le principe d'écoconditionnalité** des aides, les agriculteurs s'engageant à réaliser des mesures de protection de l'environnement en contrepartie de ces aides.

² http://ec.europa.eu/environment/water/water-framework/info/intro_en.htm

³ Directive Eaux Résiduaires Urbaines, Directive Nitrates, Directive eau potable,...

Néanmoins, il semble que, dans certains pays européens, les impératifs fixés par cette directive se seront pas atteints dans les temps impartis, notamment en ce qui concerne la restauration du bon état écologique en 2015 (Aubertot *et al.* 2005).

Au niveau national, la politique de l'eau en France, lancée dans les années 60, a largement inspiré la politique européenne pour la DCE. En effet, dès 1964 avec la loi Pisani (n°64-1245), la France a inauguré un mode de gestion décentralisé, par grands bassins versants, des ressources hydriques avec la création d'Agences de l'eau. Ce texte, très en avance pour l'époque, a aussi institué une police de l'eau pour veiller au respect de son intégrité, des normes de qualité étant fixées par cours d'eau et par département. Dans la continuité de ce texte, a été votée en 1992 la première loi dite « loi sur l'eau » (n°92-3) qui relance la politique de l'eau. Elle renforce la gestion globale avec la création d'outils de gestion et de planification comme le « Schéma Directeur d'Aménagement et de Gestion des Eaux » (SDAGE), la gestion locale de la ressource par les collectivités territoriales, et enfin la lutte contre les pollutions. Une des principales innovations est la reconnaissance du principe « pollueur-payeur » dont une des premières applications concrètes a été l'instauration progressive d'une redevance nitrate à partir de 1993 (Office International de l'Eau 2000; Documentation Française 2004). Dans le cas des pesticides agricoles, l'application de ce principe a été plus tardive ; la Taxe Générale sur les Activités Polluantes (TGAP 1999) n'a été étendue aux pesticides qu'en 2000. Le principal enjeu de cette fiscalité environnementale est de réussir à faire évoluer les comportements vers des pratiques plus respectueuses de l'environnement (Direction générale des Douanes et Droits indirects 2005). Enfin, la toute récente loi sur l'eau de 2006 (n°2006/1772) est venue compléter le corpus législatif dans ce domaine. Elle transcrit en droit français les principaux points de la DCE. Cette nouvelle loi a été critiquée pour son manque d'ambition dans l'application plus sévère du principe pollueur-payeur aux agriculteurs. Elle fixe, néanmoins, une nouvelle assiette de la redevance pour les pollutions diffuses (pesticides, nitrates) qui se fonde sur le degré de nocivité des produits (AFP-Reuters-Le monde 2006).

Pendant de très nombreuses années, les politiques agricoles et environnementales ont été en contradiction. En effet jusqu'en 2003, les primes compensatoires aux terres arables (appelées aussi « primes maïs ») ont été supérieures aux aides disponibles pour les mesures agri-environnementales (Cour des Comptes 2002). Mais le coût budgétaire de la PAC et son coût environnemental conjugués à une forte pression sociale pour réduire les risques liés aux produits chimiques ont fait converger ces deux politiques vers une meilleure prise en compte de la préservation de l'environnement dans les pratiques agricoles.

Il existe donc une très forte attente des organismes en charge de la gestion des eaux pour disposer d'outils de détection des pollutions par les pesticides leur permettant de faire un état des lieux complet de la ressource en eau pour proposer des mesures de réduction des rejets.

Chapitre II.: Le contexte scientifique

A./ L'écotoxicologie : Définition et enjeux

1 Définition

Pendant de très nombreuses années, nos sociétés humaines ont rejeté dans l'environnement des déchets divers et variés, fruits de leurs activités domestiques ou professionnelles. Conséquence du développement de l'industrie chimique après la seconde guerre mondiale, les rejets de produits chimiques se sont accrus au cours de cette période sans que cela soulève véritablement d'objections. L'intoxication aux métaux lourds des populations bordant la baie de Minamata au Japon, dans les années 50, a contribué à faire prendre conscience du risque que représentait, pour la santé et l'écosystème dans son ensemble, la pollution de l'environnement par des substances toxiques.

La toxicologie classique, qui se fondait sur l'étude de la toxicité de substances chimiques à l'échelle de l'organisme voire de la cellule, est alors apparue par trop restrictive, les agents polluants n'agissant pas dans le milieu naturel sur des individus isolés mais sur des populations et des communautés (Ramade 1977). L'exposition d'une communauté à un ou des toxiques peut ainsi conduire à un déséquilibre en favorisant une ou plusieurs espèces ou organismes alors même que les autres ne sont pas sensibles à cette substance. En outre de multiples interactions (entre les cellules, entre les espèces, entre les molécules,...) peuvent *in situ* exacerber ou réduire la toxicité d'une substance.

De ce constat est née l'écotoxicologie. Le premier à avoir proposé une définition est Truhaut en 1977 pour qui l'écotoxicologie consiste « *en l'étude de leurs impacts (les substances toxiques) sur les populations d'organismes vivants, de l'homme aux microorganismes constituant les écosystèmes* » (Truhaut 1977).

Cette science comprend :

- × l'étude des flux de polluants dans l'environnement abiotique,
- × l'étude de leur pénétration dans la biosphère et notamment la contamination de la chaîne trophique
- × l'étude des effets toxiques des polluants chimiques, en terme qualitatif et quantitatif, à tous les niveaux des écosystèmes jusqu'à l'homme.

Truhaut (1977) note aussi que ces trois niveaux d'étude s'entrecroisent souvent, particulièrement les deux premiers (Truhaut 1977). Forbes et Forbes (1997) tiennent compte de cette remarque pour définir l'écotoxicologie comme un « *champ d'étude qui intègre les effets écologiques et toxiques des polluants chimiques sur les populations, les communautés et les écosystèmes avec le devenir (transport, transformation et dégradation) de tels polluants dans l'environnement* » (Forbes et al. 1997). L'écotoxicologie est donc, par essence, une science transversale.

2 Les limites et les perspectives d'une science transversale

En fonction des personnes et de leur spécialité la notion d'écotoxicologie évolue. Pour les toxicologues, l'écotoxicologie se résume à des expériences en laboratoire sur des organismes cibles et pour les écologues, à l'étude, *in situ*, de l'impact de substances nocives sur des communautés. Si cette vision est quelque peu caricaturale, elle reflète néanmoins un certain état d'esprit, chaque discipline s'appropriant cette science. Or l'écotoxicologie ne résulte pas de l'addition de deux disciplines, c'est une science transversale qui va des études de terrain jusqu'aux études en laboratoire, de l'échelle de la cellule à celles des communautés. Dans sa définition Truhaut mentionnait l'échelle humaine comme champ d'investigation pour l'écotoxicologie. Mais à l'heure actuelle, peu d'études scientifiques ont confronté les résultats obtenus aux différentes échelles de l'écosystème avec les observations réalisées au niveau des êtres humains. En outre, les recherches en écotoxicologie développées jusqu'à présent ne relient que rarement les flux observés et le devenir des polluants dans l'écosystème avec les effets observés sur les organismes (Forbes *et al.* 1997; Schulz 2001; Aubertot *et al.* 2005; Liess 2005). La tendance actuelle est, donc, de développer des approches plus intégrées à différentes échelles (spatiales, écologiques, chimiques,...) pour étudier les impacts des produits chimiques au sein des écosystèmes pris dans leur globalité (Forbes *et al.* 1997; Camatini *et al.* 1998).

Face à l'accroissement de la pollution des eaux par les pesticides, les enjeux pour l'écotoxicologie sont d'identifier les effets de ces substances toxiques sur les organismes aquatiques, de la cellule jusqu'à la communauté, afin de les comparer aux flux de pesticides observés, et ainsi de proposer des outils physico-chimiques et biologiques de détection de ce type de pollution.

B./ Différents outils pour détecter les pollutions par les pesticides et leurs effets dans les eaux

A l'heure actuelle, de nombreux outils existent pour estimer la qualité des eaux de surface. Dans cette partie, nous détaillerons les dispositifs classiques d'analyse physico-chimique des pesticides dans les eaux, pour étudier, par la suite, les différents outils biologiques existants de suivi de la qualité des hydrosystèmes (biomarqueurs et indices biologiques,...) et détailler leurs limites dans la détection des pollutions par les pesticides dans les cours d'eau.

1 Les dispositifs pour l'analyse physico-chimique

a) Les outils classiques de chromatographie

La détection chimique des pesticides dans les eaux est réalisée de nos jours par chromatographie (TSWETT 1906). Les molécules sont séparées, soit en phase gazeuse (GC) ou en phase liquide (LC), sur une colonne en fonction de leur affinité pour la résine contenue dans cette colonne (Audigie 1997). Au sortir de cette colonne, les molécules sont détectées soit par un détecteur UV soit par un spectromètre de masse. Le premier identifie les molécules en mesurant leur absorption lumineuse à différentes longueurs d'ondes. Le second sépare les molécules en fonction du rapport masse molaire/charge mesuré après ionisation des molécules en phase gazeuse. En cas d'incertitude quant à la molécule associée à un pic du chromatogramme, ce type de détecteur permet d'affiner la détection de cette molécule. Depuis de nombreuses années, un type d'analyse s'est imposé : il s'agit de l'analyse multi résidus. Elle permet de rechercher, à partir d'un échantillon, un ensemble de molécules pouvant regrouper plusieurs familles chimiques.

b) Les différentes stratégies de prélèvement

- Les prélèvements ponctuels

C'est une des stratégies la plus couramment mise en œuvre dans les réseaux de surveillance de par son faible coût et la possibilité de couvrir un grand nombre de stations. Mais comme nous l'avons mentionné précédemment, cette technique de prélèvement est particulièrement mal adaptée au suivi de la pollution par les pesticides, ce type de pollution étant de nature saisonnière sur des laps de temps restreints, principalement durant les forts épisodes pluvieux.

- Les prélèvements automatisés

La mise en place de dispositifs automatisés, réalisant des prélèvements avec une fréquence donnée ou en fonction de l'évolution du débit, permet de pallier les limites des prélèvements ponctuels. Les dispositifs asservis au débit sont plus appropriés car ils permettent de multiplier les prélèvements durant les épisodes hydrauliques (crues) où se concentre la pollution par les pesticides (Ferenczi *et al.* 2002). Mais le coût et la taille du matériel nécessaire rendent illusoire son utilisation à grande échelle.

- Les prélèvements intégrés

L'attention de la communauté scientifique se focalise actuellement sur un nouveau type de dispositif : les capteurs passifs (Passive samplers) (CEMAGREF 2005; Mazzella *et al.* 2007). Il s'agit de dispositifs immergés, composés d'une matrice (résine adsorbante) retenant les molécules chimiques. Il existe différents types de capteurs en fonction des caractéristiques chimiques des molécules :

- × Les « Diffusive Gradients in Thin-Film » ou DGT ont été développés pour rechercher les métaux lourds.
- × Les « semipermeable membrane device » ou SPMD retiennent préférentiellement les substances hydrophobes ayant un $\log K_{ow} > 3$ comme les Hydrocarbures Aromatiques Polycyclique (HAP) ou les pesticides organochlorés.
- × Les « Polar Organic Compounds Integrative Sampler », ou POCIS, sont eux adaptés aux substances hydrophiles, parmi lesquels de nombreux pesticides.

Ces deux derniers dispositifs offrent l'intérêt de fournir une information intégrée quant aux niveaux de pollutions par les pesticides dans les cours d'eau. De nombreuses études sont actuellement en cours afin d'optimiser leur utilisation *in situ* et, plus particulièrement, leur durée d'immersion. En effet, il apparaît indispensable de maîtriser la vitesse de désorption des molécules de la matrice, incluse dans ces capteurs, pour estimer au mieux les flux de pesticides.

Ces nouveaux outils suscitent un fort engouement dans la communauté scientifique. L'avenir est peut être au couplage de ces outils pour le suivi physico-chimique de la pollution par les pesticides avec des outils permettant d'évaluer son impact biologique.

c) Les limites de la seule approche physico-chimique

Le nombre de molécules et de formulations commerciales disponibles sur le marché des pesticides agricoles est actuellement très élevé. La recherche dans les eaux, avec les seuls outils physico-chimiques, de toutes ces molécules et de leurs métabolites est à l'heure actuelle impossible, tant en terme financier que technique. En outre, dans le milieu naturel, de nombreuses interactions positives (synergie) comme négatives (antagonisme) peuvent intervenir entre les molécules et, ainsi, affecter l'état de santé des écosystèmes sans que les analyses physico-chimiques ne le laissent transparaître. Par conséquent, la seule utilisation des outils physico-chimiques n'est pas suffisante pour estimer l'effet d'une contamination par les pesticides sur les organismes.

2 Les outils biologiques

Si la performance des méthodes analytiques actuelles s'est sensiblement accrue ces dernières années, la détection simultanée dans des échantillons de tous les contaminants présents s'avère irréalisable (Lagadic *et al.* 1997). En outre, ces méthodes d'analyse se limitent à la détection des seuls flux de polluants sans évaluer l'effet de ces pollutions sur les organismes. De ce constat sont nés différents outils biologiques pour surveiller la qualité des eaux et détecter d'éventuelles pollutions.

a) Les biomarqueurs

Face aux effets constatés sur l'environnement de certains polluants (Minamata années 50, Seveso 1976, Bhopal 1984)¹, les chercheurs ont cherché à comprendre, au niveau de cellules ou d'individus, les mécanismes induits par ces pollutions (Coppage *et al.* 1975; Narbonne 1979; Narbonne *et al.* 1979; Lagadic *et al.* 1997). A partir de ces différents travaux a été développée la notion de biomarqueur qui « est un changement observable et/ou mesurable, au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant » (Lagadic *et al.* 1997). Au sein des biomarqueurs, on distingue les biomarqueurs d'exposition (pénétration dans l'organisme sans effets nocifs), les biomarqueurs d'effets (pénétration et effet sur une ou plusieurs cibles) et enfin les biomarqueurs de susceptibilité (mise en évidence d'une variabilité dans la réponse à un polluant, ex : développement d'organismes résistants aux pesticides). Néanmoins cette classification est discutée au sein de la communauté scientifique. Un biomarqueur (ex : l'acétylcholinestérase) peut à la fois indiquer une exposition et aussi un effet d'un polluant sur un organisme. Parmi les différents biomarqueurs connus, on peut citer:

- Les enzymes du stress oxydatif

Certains toxiques ou des radiations (UV) peuvent induire la production de molécules réactives oxygénées (ROS)² ou des molécules réactives oxygénées et azotées (RONS)³ à fort pouvoir oxydant. Le stress oxydatif peut être utilisé comme biomarqueur au travers du suivi des enzymes anti-oxydantes (la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion-S-transférase (GST),...). L'utilisation de ce biomarqueur demeure néanmoins problématique, notamment *in situ*, d'autres facteurs (physiologiques ou environnementaux) que les polluants pouvant être à l'origine d'un stress oxydatif (Rijstenbil 2003).

- Les enzymes du métabolisme des xénobiotiques

Le Reticulum Endoplasmique Granuleux dispose sur sa surface interne d'une enzyme, le cytochrome P450, impliqué dans la dégradation des molécules exogènes comme les polluants. Ce biomarqueur est reconnu pour son efficacité dans la détection précoce d'une exposition à des produits toxiques chez les poissons. Une enzyme inductrice de ce cytochrome, l'Éthoxyrésorufine O-Déethylase (EROD) est ainsi utilisée comme biomarqueur de pollution en milieu marin (Lagadic *et al.* 1997; Burgeot *et al.* 2000) et en eau douce (Lagadic *et al.* 1997; Flammarion *et al.* 2000). Ce biomarqueur est normalisé (T90-385) depuis 2001.

- L'inhibition de l'acétylcholinestérase

Cette enzyme est impliquée dans la transmission de l'influx nerveux au niveau des synapses cholinestériques. L'inhibition de cet enzyme bloque son transfert ; cette propriété a été exploitée par

¹ Deux accidents graves dans des usines de fabrication de pesticides ont eu des conséquences dramatiques pour l'environnement proche.

² On peut citer le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), le radical superoxyde (O₂⁻).

³ On peut aussi citer le monoxyde d'azote (NO).

de nombreux insecticides, le plus connu étant le DDT. L'acétylcholinestérase peut donc être utilisée comme biomarqueur, chez des animaux, d'une exposition à un insecticide ou une autre molécule insecticide.

- Les mutations chromosomiques

Certaines molécules toxiques sont connues pour altérer l'intégrité du génome. Elles peuvent induire des effets clastogènes, l'ADN ou les chromosomes étant fragmentés, et conduire ainsi à la formation d'entités indépendantes (micronoyaux) du noyau lors de la division cellulaire. Ces micronoyaux peuvent aussi résulter d'une désorientation des fuseaux mitotiques lors de la mitose, une partie des chromosomes se séparant du reste du matériel génomique. Ce phénomène est appelé aneugénèse.

Les effets clastogènes et aneugènes constituent des mutations chromosomiques à différencier des mutations géniques (modification d'une ou plusieurs séquences de nucléotides) et des mutations génomiques (modification du nombre de chromosomes). Les molécules qui conduisent à la formation de ces mutations génétiques (chromosomiques, géniques et génomiques) sont dites génotoxiques.

Les micronoyaux sont reconnus comme des biomarqueurs du stress génotoxique, notamment chez les plantes (Ma *et al.* 1995). Des tests de micronoyaux ont été développés sur des plantes entières (*Vicia faba*, *Allium Cepa*,...) pour évaluer la génotoxicité de sols, de sédiments ou d'effluents liquides (Cotelle *et al.* 1999; Ohe *et al.* 2004; White *et al.* 2004). En France, le test de micronoyaux sur *Vicia faba* a été normalisé par l'AFNOR en 2004.

- L'inhibition de la photosynthèse

La photosynthèse permet à tous les végétaux de synthétiser de la matière organique à partir de l'énergie lumineuse. Plusieurs molécules herbicides ont été développées pour inhiber les réactions photosynthétiques, bloquant ainsi le métabolisme de la plante. Or l'inhibition de la photosynthèse, au travers de son photosystème II (PS II), induit un accroissement de la fluorescence spécifique d'un pigment chlorophyllien, la chlorophylle a (Nystrom *et al.* 1999). Cette particularité est exploitée pour détecter à l'aide d'un fluoromètre de type PAM (Pulse Amplitude Modulated) une exposition brève à un herbicide inhibiteur du PS II (Dorigo *et al.* 2001).

b) Le cas des biotests

Les biotests ne sont pas à proprement parler des outils de détection des pollutions comme les biomarqueurs et les bioindicateurs. Ils sont principalement utilisés pour évaluer et prédire le potentiel écotoxique, et notamment génotoxique, de molécules. Ces outils sont, de ce fait, très utilisés dans les études réalisées dans le cadre des autorisations de mise sur le marché des produits phytosanitaires. Différents tests standardisés existent comme le test Daphnies 24h (EN 1506341), le test Algues 72h (NF T90-360) ou le test d'Ames pour évaluer la mutagénicité de molécules sur des cellules procaryotes (*Salmonella typhimurium*) (Ames *et al.* 1973). De nombreux auteurs ont pointé les limites de ce genre d'outils pour évaluer les effets des pollutions « globales » par les pesticides (Crow *et al.* 1979; Ramade 1992; Forbes *et al.* 1997; Lagadic *et al.* 1997). En effet, les données fournies par ces tests ne sont disponibles que pour un nombre très restreint d'espèces ayant été exposées à une seule

molécule, avec des concentrations données et dans des conditions très contrôlées. Or dans les communautés naturelles, les espèces interagissent entre elles, la réponse d'une pouvant être influencée par la réponse d'une autre (De Noyelles *et al.* 1982). En outre, les conditions naturelles sont extrêmement variables que ce soit au sein même d'une station ou entre différents points de mesure.

Les résultats ainsi obtenus avec les biotests sont donc difficilement extrapolables aux biocénoses aquatiques.

c) Les bioindicateurs

Guelorget et Perthuisot (1984) définissent les bioindicateurs comme « *des espèces ou groupes d'espèces, qui par leur présence et/ou leur abondance, sont significatifs d'une ou plusieurs propriétés de l'écosystème dont ils font partie* » (Lagadic *et al.* 1997). Dès le début du XX^{ème} siècle, Kolkwitz et Marson ont proposé d'utiliser des organismes aquatiques comme bioindicateur pour estimer la qualité des cours d'eau grâce à la méthode dite des « saprobies » (Kolkwitz *et al.* 1908; Kolkwitz *et al.* 1909; Lagadic *et al.* 1998). Cette méthode se fonde sur l'étude de la répartition des espèces, ou de groupes d'espèces, au sein d'une communauté à partir de critères de présence/absence et d'abondance. Le conjugaison de ces différentes informations avec les préférences écologiques (nutriments, acidité, salinité, oxygénation) des espèces présentes permet d'estimer l'état d'un cours d'eau (Blandin 1986; Rosenberg *et al.* 1993; Stevenson *et al.* 1999). La nécessité de croiser plusieurs paramètres pour un nombre important d'espèces a conduit au développement de modèles mathématiques calculant une note de qualité des eaux. A partir des années 70, de très nombreux indices biologiques, associant un modèle mathématique et une base de données répertoriant les préférences écologiques des espèces, ont été mis au point pour chacun des grands compartiments biologiques aquatiques (Coste *et al.* 1974; Coste 1982; Ter Braak *et al.* 1989; Kelly *et al.* 1995; Lenoir *et al.* 1995; Coring 1996; Aubertot *et al.* 2005; Potapova *et al.* 2005).

Au niveau français les principaux indices biologiques sont :

- × L'Indice Biotique et l'Indice Biologique Global Normalisé (IBGN) pour le compartiment des macro-invertébrés benthiques. Ces indices sont parmi les premiers indices biologiques créés en France (Verneaux *et al.* 1967). L'IBGN, normalisé en 1992 (NF T90-350), est très largement utilisé dans les réseaux de suivi de la qualité des eaux des cours d'eau. Il intègre des données classiques de répartition d'espèces avec des données liées au substrat (type, granulométrie), la présence de macro-invertébrés étant très dépendante de ce facteur. Dans certains milieux (milieux profonds, grands cours d'eau,...) où la collecte de ce genre d'informations se révèle impossible, cet indice ne peut être appliqué.

- × L'Indice de Polluo-Sensibilité (IPS) et l'Indice Biologique Diatomées (IBD) pour le compartiment des diatomées benthiques. De ces deux indices mis au point au Cemagref de Bordeaux, seul l'IBD est normalisé (NF T90-354, 2000) (Coste 1982; Lenoir *et al.* 1995). Ils s'appuient sur l'étude de micro-algues benthiques, les diatomées, évoluant dans une matrice biologique, le

biofilm. Ces organismes végétaux ont la particularité de disposer d'une paroi siliceuse, tel un squelette, le frustule, qui permet leur identification jusqu'à l'espèce. Ces deux indices sont utilisés en France et en Europe (Prygiel *et al.* 1996; Sabater 2000) pour estimer la qualité globale des cours d'eau. D'autres indices « diatomiques » plus spécifiques existent : le « Trophic index » pour les pollutions organiques, l'indice de Ter Braak pour évaluer l'acidité d'une rivière (Ter Braak *et al.* 1989; Kelly *et al.* 1995).

× L'Indice Biologique Macrophyte Rivière (IBMR) pour les algues supérieures, normalisé en 2003 (T 90-395), l'indice poisson rivière (IPR) normalisé en 2004 (NF T90-344) et l'Indice Oligochètes de bio-indication des sédiments (IOBS) normalisé (NT T90-390) en 2002.

Pour répondre aux impératifs de la DCE concernant l'estimation de la qualité des eaux par comparaison à un état de référence, de nouvelles approches ont été mises en œuvre. Elles se fondent sur la conception de communautés théoriques de référence à partir du traitement de données géomorphologiques et écologiques par des méthodes statistiques multivariées et grâce à la modélisation par réseaux de neurones (Tison *et al.* 2004; Lek *et al.* 2005).

Les différents indices biologiques et les méthodes indicielles développées ces derniers temps se sont avérés efficaces pour détecter les pollutions de nature organique, saline et acide. Ils sont utilisés en routine dans le cadre des réseaux de surveillance de la qualité des eaux.

d) L'Indice Biologique Diatomées (IBD)

L'IBD est un des principaux indices « généralistes » utilisés pour estimer la qualité globale des eaux. Il a fait l'objet d'une normalisation en 2000 (NF T90-354). Une nouvelle version a été proposée en 2006. La structure et le calcul de cet indice sont assez particuliers.

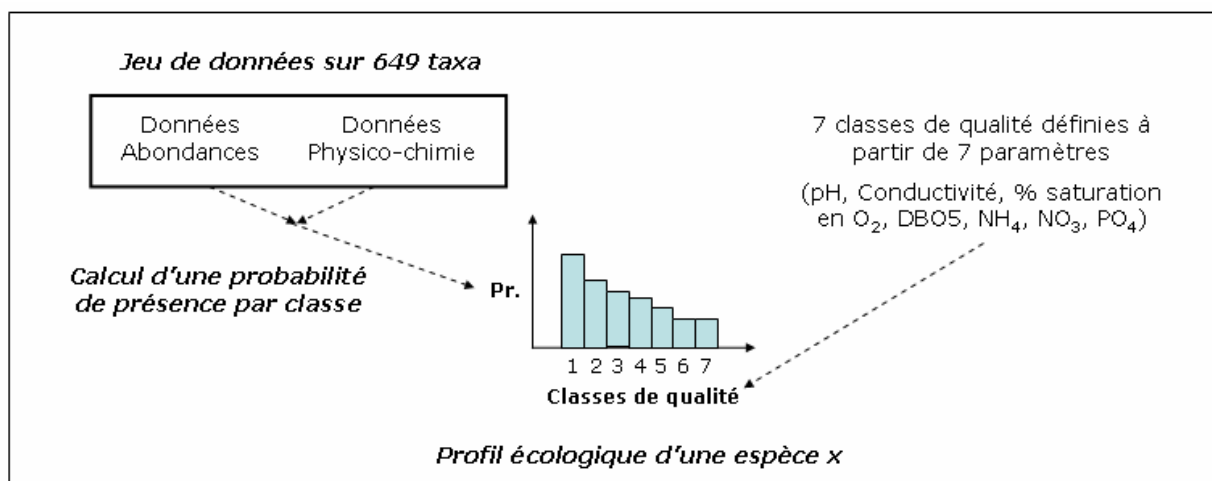


Figure 13 : Représentation schématique de la structure de l'IBD

En ce qui concerne la structure, cet indice s'appuie sur 7 classes de qualité des eaux définies par rapport à 7 paramètres physico-chimiques (pH, Conductivité, % de saturation en O₂, DBO₅, NH₄, NO₃

et PO₄) (Figure 13). Pour chaque espèce, un profil écologique a ensuite été calculé à partir d'un jeu de données intégrant les abondances de 658 taxa¹ et des données de physico-chimie. Chaque histogramme de la représentation graphique de ce profil représente la probabilité de présence calculée de l'espèce pour la classe de qualité déterminée.

Dans le cas du calcul proprement dit de l'IBD, on peut distinguer deux étapes.

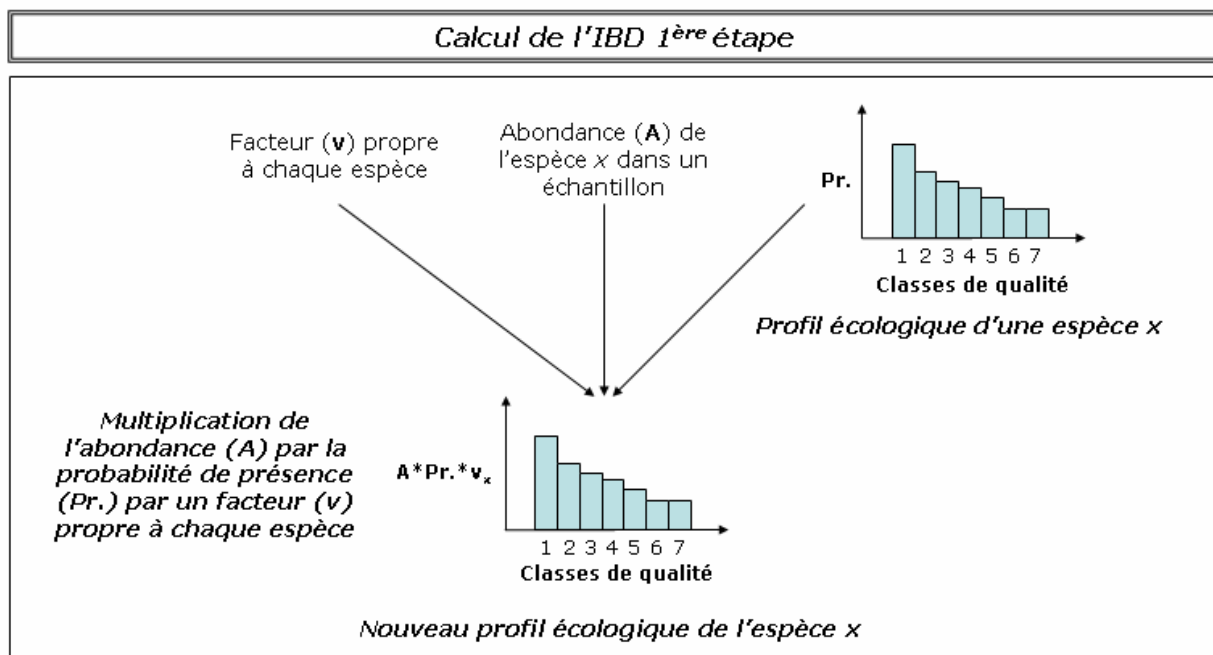


Figure 14 : Représentation schématique de la première étape du calcul de l'IBD

Dans un premier temps, à partir de cette structure de l'indice, la probabilité de présence (Pr) est multipliée par l'abondance (A) de l'espèce considérée dans un échantillon prélevé sur le terrain (Figure 14). Un facteur (v), propre à l'espèce, est ajouté à ce produit. En effet, chacune des espèces présentes dans un échantillon n'apporte pas la même information concernant l'état du milieu aquatique. Un nouveau profil est alors calculé par espèce en prenant en compte le produit $A*Pr*v$ pour chacune des classes de qualité.

¹ Un taxon comprend une espèce et les espèces appariées.

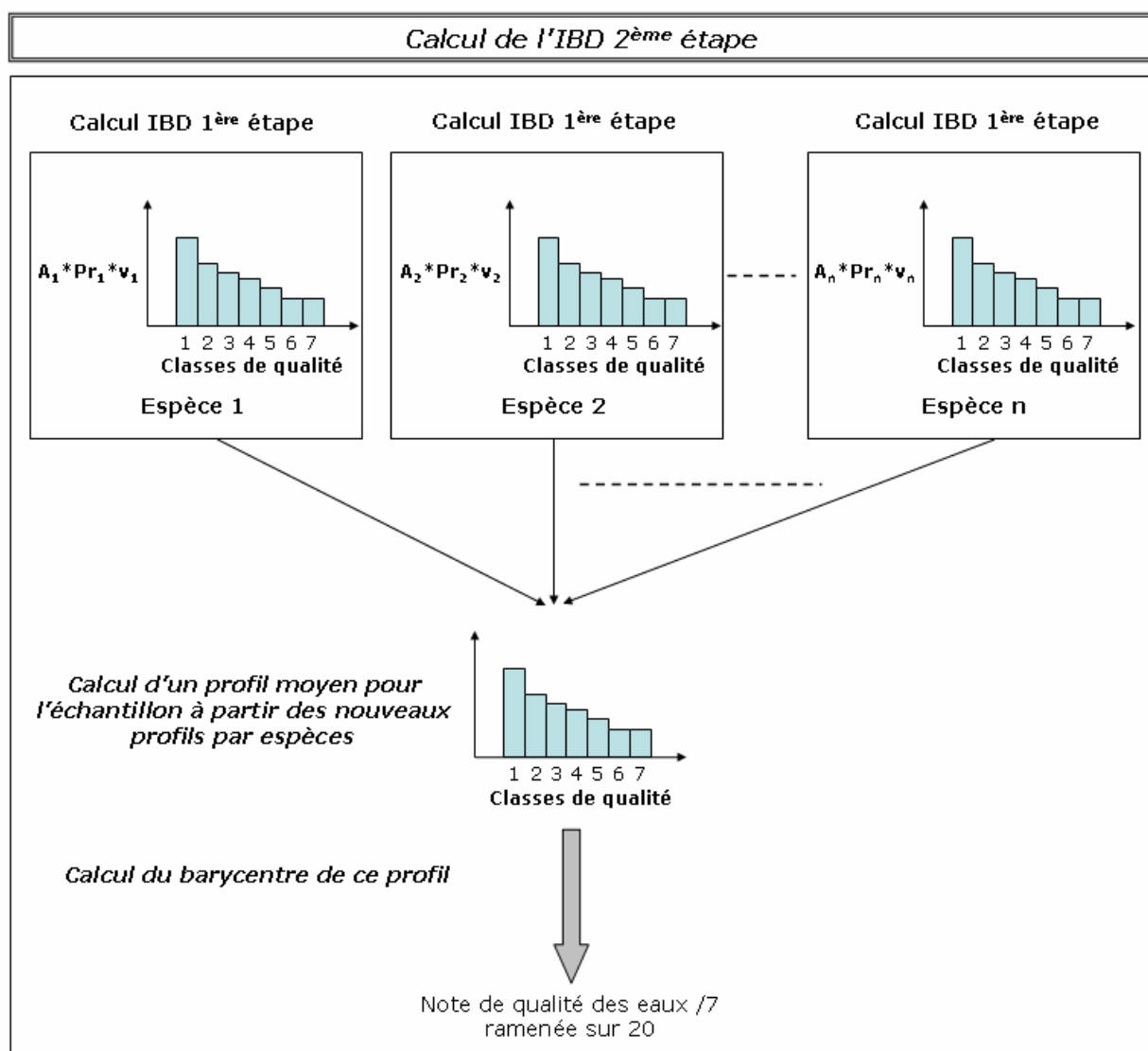


Figure 15 : Représentation schématique de la deuxième étape du calcul de l'IBD

Dans un deuxième temps, à partir des nouveaux profils calculés pour l'ensemble des espèces présentes, un profil écologique moyen est obtenu pour l'échantillon (Figure 15). Le calcul du barycentre de ce profil fournit une note de qualité des eaux sur 7 qui est ensuite ramenée sur 20.

e) Le concept PICT : un outil écotoxicologique hybride

Le PICT (Pollution-Induced Community Tolerance) est un concept hybride qui conjugue des paramètres structuraux, comme la densité cellulaire par espèce ou par genre, pour estimer leur degré d'inhibition, et des paramètres physiologiques afin d'évaluer la tolérance des communautés à des polluants comme les herbicides. Ce type d'outil est fondé sur une détection à posteriori, au sein d'une communauté d'espèces, d'une exposition à un toxique (Molander *et al.* 1992; Berard *et al.* 2001). En plus du suivi de paramètres structuraux (composition en espèces, densité cellulaire par espèce), le PICT fait appel à des tests de toxicité à court terme en laboratoire sur des communautés prélevées

sur le terrain. L'efficacité de cet outil a principalement été étudiée dans le cas des herbicides inhibiteurs du PS II (Berard *et al.* 2001; Dorigo *et al.* 2004). Le principal avantage de cette technique réside dans la rapidité d'obtention des résultats comparée aux études taxonomiques détaillées utilisées dans les indices biologiques (Aubertot *et al.* 2005).

f) Les limites actuelles de ces outils pour révéler les pollutions par les pesticides

▪ Le cas des biomarqueurs

L'utilisation des biomarqueurs sur des organismes évoluant dans des conditions naturelles demeure encore problématique (Lagadic *et al.* 1998; Aubertot *et al.* 2005). En effet, l'adaptation aux conditions naturelles de techniques développées en laboratoire dans des conditions contrôlées se heurte à la forte variabilité abiotique (lumière, nutriments, pH,...) ou biotique (âge, sexe, état physiologique, état sexuel,...) existant dans les écosystèmes naturels. En outre, la spécificité de certains de ces outils vis à vis de certaines molécules ne permet pas de détecter l'effet d'une pollution globale (différentes molécules interagissant entre elles) caractéristique des milieux naturels (Lagadic *et al.* 1998). Un bon exemple est la technique du PAM (voir page 44) pour les organismes chlorophylliens. En effet, cette technique se fonde sur le suivi de la fluorescence de la « chlorophylle a » pour détecter l'exposition à des herbicides inhibiteurs du photosystème II. Les nombreux herbicides, qui ne ciblent pas la photosynthèse, mais peuvent néanmoins avoir des effets sur les algues, ne sont donc pas détectés par cet outil. Enfin, l'extrapolation des résultats, fournis par les biomarqueurs au niveau cellulaire, pour estimer l'effet d'un polluant au niveau des populations et des communautés, se révèle difficile (Lagadic *et al.* 1998; Aubertot *et al.* 2005). En effet, de par les interactions pouvant exister entre les espèces, la réponse d'une communauté ne correspond pas à la somme des réponses de chaque espèce.

Pour être en mesure d'utiliser les biomarqueurs sur des organismes *in situ*, particulièrement en milieu continental, il apparaît nécessaire d'être en mesure de relier les flux de polluants avec les réponses des biomarqueurs et de développer des approches couplant plusieurs biomarqueurs (Lagadic *et al.* 1997; Aubertot *et al.* 2005).

▪ Le cas des indices biologiques

Les indices biologiques, notamment les indices s'appuyant sur les diatomées benthiques, utilisés en routine pour le suivi de la qualité des eaux de surface, dans le cadre des réseaux de surveillance, ne permettent pas à l'heure actuelle de discriminer les pollutions dues aux composés toxiques (pesticides et métaux lourds) des autres pollutions (Sabater 2000; Gold *et al.* 2002; Dorigo *et al.* 2004; Aubertot *et al.* 2005). Cela est dû à la structure même de ces indices qui ont été développés à partir de données physico-chimiques classiques (pH, conductivité, concentration en nutriments). La nature même de la pollution par les pesticides, où un très grand nombre de molécules peut intervenir, et les limites analytiques de sa détection (détection des seules substances actives recherchées) ne facilitent pas l'adaptation des indices existants. En outre, de nombreux facteurs environnementaux, comme la

lumière ou les nutriments, interfèrent dans la réponse des diatomées aux pesticides (Guasch *et al.* 1998). Les conditions du milieu influent, donc, sur la physiologie des cellules et, par voie de conséquence, sur leur capacité à résister à une exposition à ces molécules (Guasch *et al.* 1997). En milieu agricole, la forte pollution des cours d'eau par les fertilisants contribue, ainsi, à masquer les effets des pesticides (Nystrom *et al.* 1999).

- Le cas du PICT

Le PICT s'appuie sur la tolérance ou la sensibilité des communautés algales vis à vis de certains toxiques pour identifier une pollution par ces composés. Or la sensibilité des algues, dépend de nombreux paramètres du milieu (niveau de trophie, lumière, etc...) qui influent sur l'état physiologique des individus et des communautés et, donc, sur leur réponse à une exposition par des pesticides (Guasch *et al.* 1997; Guasch *et al.* 1998; Nystrom *et al.* 1999). Cela est particulièrement vrai dans le cas de cours d'eau drainant des bassins versants agricoles où la pollution par les pesticides est associée à une pollution très importante par les fertilisants. La réponse du PICT varie donc en fonction des paramètres environnementaux et, par conséquent, de la saison de prélèvement (Berard *et al.* 2001).

En outre, comme nous l'avons rappelé précédemment, les algues et les diatomées peuvent être exposées à un très grand nombre de pesticides. L'application du PICT, pour chacune des substances actives toxiques potentiellement présentes dans les eaux, est de ce fait techniquement impossible. De plus, cet outil n'est pas en mesure d'identifier les effets des interactions possibles entre les pesticides et leurs métabolites qui modifient la toxicité globale de ces composés. Par conséquent, le faible nombre de substances actives (Inhibiteurs du photosystème II) jusqu'à présent testées et validées *in situ* ne permet pas d'envisager l'usage courant du PICT pour évaluer la qualité biologique des écosystèmes aquatiques (Berard *et al.* 2002; Aubertot *et al.* 2005).

Bilan sur les outils d'évaluation des pollutions par les pesticides

La détection des pesticides dans les eaux dans le cadre des réseaux de suivi est encore de nos jours le fait d'analyses physico-chimiques faisant appel à la chromatographie. Mais les stratégies de prélèvement actuelles (ponctuelles) ne fournissent pas une information représentative des niveaux de pollution. L'utilisation de dispositifs plus complets (préleveurs automatiques) est limitée par le coût financier et la taille de tels équipements. Pour répondre à la nécessité d'obtenir une information intégrée dans le temps concernant les concentrations en pesticides, de limiter les coûts et de favoriser une utilisation aisée des dispositifs, des systèmes de capteurs passifs ont été conçus. Leur utilisation dans les cours d'eau est en cours de validation. Mais ce type de capteur est limité au suivi des flux de pesticides et ne permet pas d'estimer leur impact biologique sur les biocénoses aquatiques.

Des outils biologiques ont été développés pour étudier et détecter les effets des pesticides sur les organismes vivants.

A l'échelle de la cellule et des individus, des biomarqueurs, qui s'apparentent à des changements observables sous l'effet d'une perturbation toxique, ont été identifiés (Enzymes du stress oxydatif, Inhibition de la photosynthèse,...). Mais leur application dans des conditions naturelles, à des niveaux d'organisation (communautés) supérieurs à ceux auxquels ils ont été étudiés en laboratoire, est limitée par l'influence des paramètres environnementaux (lumière, nutriments,...) sur la réponse des organismes aux toxiques.

A l'échelle des communautés, des indices biologiques s'appuyant sur des espèces bio-indicatrices (macro-invertébrés, diatomées, poisson, ...) des pollutions sont utilisés en routine pour évaluer la qualité des eaux de surface. Mais ces outils ont été conçus pour détecter les pollutions organiques et trophiques. Dans des bassins versants agricoles, les indices, notamment les indices « diatomiques », sont plus sensibles à la forte pollution trophique due aux fertilisants qu'à la pollution par les pesticides. Des outils hybrides comme le PICT ont aussi été mis au point pour révéler à posteriori l'exposition d'une communauté à un pesticide. Mais ce type de concept, qui conjugue pour une même communauté une approche de type biomarqueur avec une approche plus écologique d'étude de paramètres structuraux, est limité, comme pour les analyses physico-chimiques, par le grand nombre de substances actives pesticides à tester.

L'attente est donc forte de la part des organismes en charge du suivi de la qualité qui souhaitent disposer d'outils biologiques sensibles aux pollutions par les pesticides, semblables à ceux développés autour des diatomées benthiques, micro-algues bio-indicatrices reconnues pour détecter les pollutions organiques et trophiques.

C./ Les diatomées : un bioindicateur reconnu

1 Systématique

Les diatomées ou **bacillariophycées** appartiennent à la division des Heterokontophyta dans le règne des Protistes (Van Den Hoek *et al.* 1995; Quéguiner 2007). Elles se distinguent des autres algues par certains de leurs pigments de la famille des xanthophylles (fucoxanthine, diatoxanthine, diadinoxanthine). Elles contiennent aussi de la chlorophylle a et c ainsi que du β -carotène. La systématique se fonde sur l'ornementation et la forme des valves pour identifier entre elles les 100 000 espèces répertoriées (Van Den Hoek *et al.* 1995).

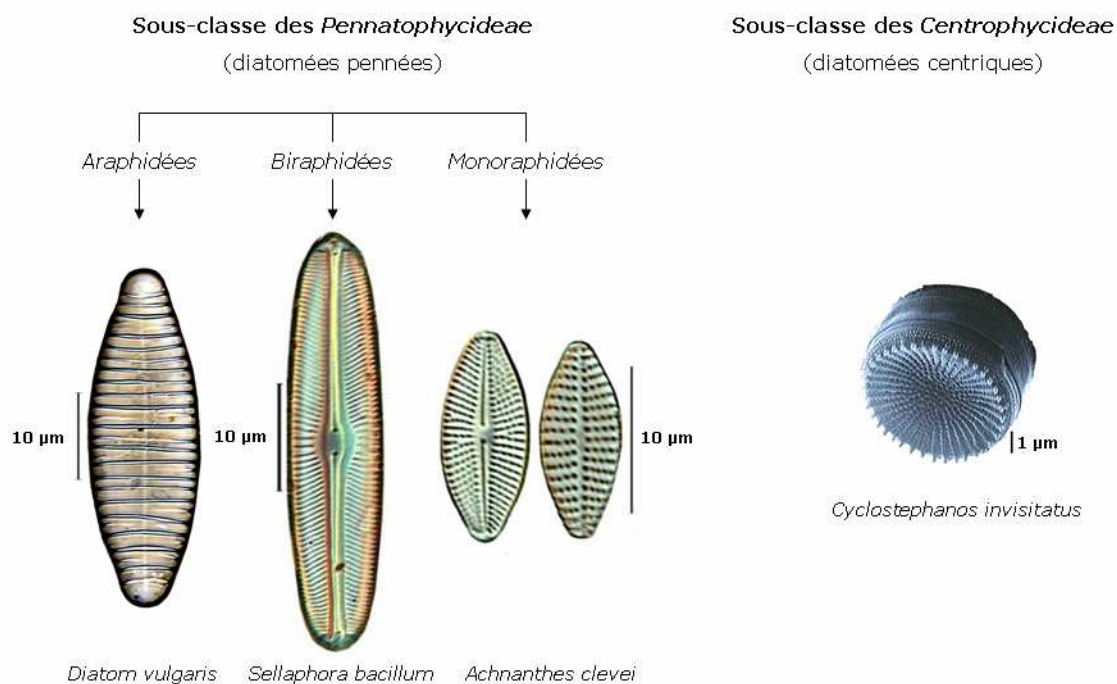


Figure 16 : Représentation schématique de la systématique chez les diatomées

Parmi les diatomées, on distingue ainsi deux sous-classes : les *Pennatophycideae* (Pennées) et les *Centrophycideae* (Centriques). Au sein de la sous-classe des pennées, on différencie les espèces en fonction de la présence et du nombre de raphés :

- les araphidées, sans raphé
- les biraphidées, avec un raphé sur chaque valve
- les monoraphidées, où seule une valve possède un raphé, l'autre valve ne présentant au plus qu'une ligne médiane appelée **pseudo raphé**.

Les diatomées centriques et pennées diffèrent aussi par leur écologie et leur cycle de développement.

2 Ecologie

a) Milieu

Les facultés d'adaptation et de survie de ces micro-algues leur confèrent une très grande ubiquité. Les diatomées sont présentes non seulement dans les milieux aquatiques (marins et continentaux) mais aussi dans les milieux aériens (espèces aérophiles) et terrestres (sols, paroi de cavernes) (Prygiel *et al.* 2000; Berard *et al.* 2004). Lorsque les conditions deviennent trop défavorables (sécheresse, lumière, nutriment), des spores de repos sont produits par la cellule. Dès que les conditions optimales sont rétablies, ces spores germent pour donner une cellule identique (Quéguiner 2007).

Dans les écosystèmes aquatiques, on distingue :

- **Les diatomées planctoniques** qui vivent libres en suspension dans la colonne d'eau. Elles constituent l'essentiel du phytoplancton dans les parties inférieures des cours d'eau (milieux lenticques, canalisés), et les milieux lacustres et marins. Mises à part quelques formes pennées, les diatomées planctoniques sont surtout représentées par les diatomées centriques isolées ou associées en chaînes.
- **les diatomées benthiques** qui vivent fixées à la surface des objets immergés à une profondeur correspondant à la zone photique des cours d'eau, où la lumière est suffisante pour assurer la photosynthèse. La nature du substrat détermine en général le type de communauté de diatomées qui s'y installent.

Dans ce dernier cas, ces micro-algues se développent au sein d'une matrice biologique complexe, le biofilm, qui comprend aussi des bactéries, des algues et des champignons, l'ensemble étant lié par des substances extracellulaires polymériques (notamment des polysaccharides) secrétées par ces microorganismes.

b) Mode de vie

Dans un même milieu, sur un même substrat, les communautés de diatomées évoluent au cours des saisons.

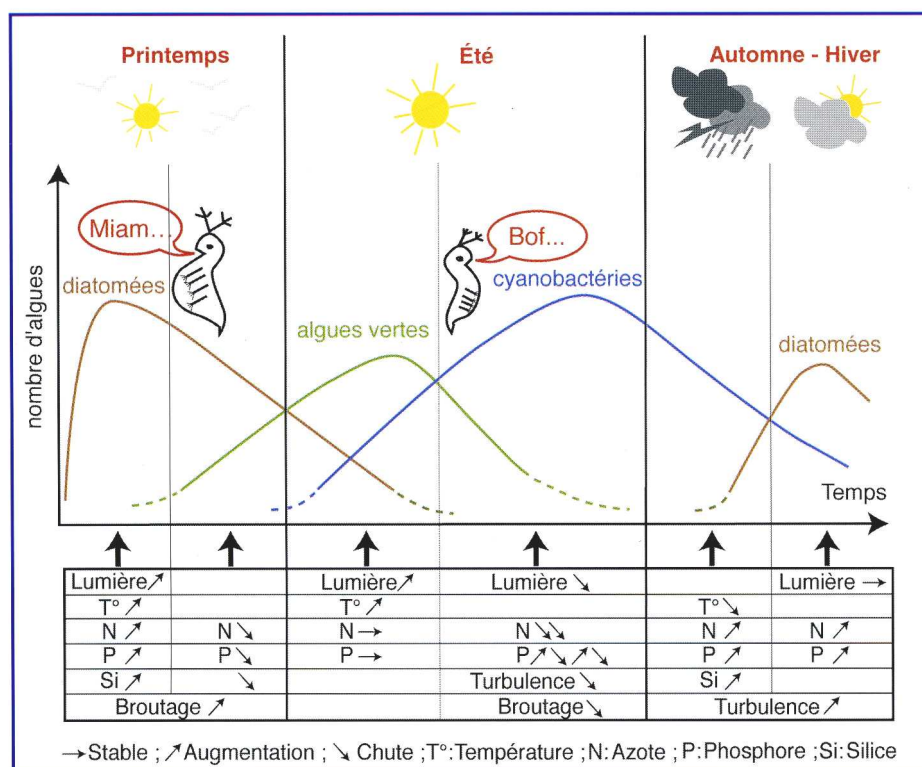


Figure 17 : Représentation schématique de l'évolution saisonnière des peuplements algaux (Source : Leitão et Couté 2005)

Au début du printemps, se développent des espèces pionnières (*Achnanthes sp.*, *Cocconeis sp.*), principalement des pennées de petite taille, capables d'adhérer très étroitement, sur toute la surface de leur valve, au substrat (Korte *et al.* 1983; Ghosh *et al.* 1998; Sekar *et al.* 2004). Les diatomées dominent alors les peuplements algaux, les conditions trophiques et les débits encore importants au début du printemps leur étant favorables (Figure 17) (Leitão *et al.* 2005). Dès que ces conditions disparaissent, les diatomées sont supplantées par les algues vertes et les cyanobactéries. L'accroissement du broutage du zooplancton et des macro-invertébrés benthiques contribue aussi à ce déclin (Leitão *et al.* 2005). Vers le milieu de l'hiver, les conditions étant trop défavorables au développement des autres groupes algaux, les diatomées reprennent l'avantage, les forts courant favorisant la croissance de certaines espèces de diatomées (*Gomphonema parvulum* (Kützing), *Achnanthes sp.*) (Ghosh *et al.* 1998).

Les communautés de diatomées sont donc soumises à de perpétuelles réorganisations saisonnières en fonction des conditions du milieu. Leur capacité à se développer très rapidement, durant des périodes où la compétition est faible avec les autres algues, procure un avantage significatif à ces micro-algues et peut expliquer l'importance qu'elles occupent dans les écosystèmes aquatiques.

c) Place dans l'écosystème

Dans tous les milieux, marins comme continentaux, les diatomées sont des producteurs importants de matière organique. La part des diatomées marines dans la production primaire à l'échelle de la planète sur un an oscille ainsi entre 25 et 45% selon les estimations (Nelson *et al.* 1995; Van Den Hoek *et al.* 1995; Quéguiner 2007). Dans certains cas, lorsque la puissance du courant limite le développement des autres algues, la production primaire est essentiellement le fait des diatomées, la biomasse algale étant dominée par ces micro-algues (Ghosh *et al.* 1998).

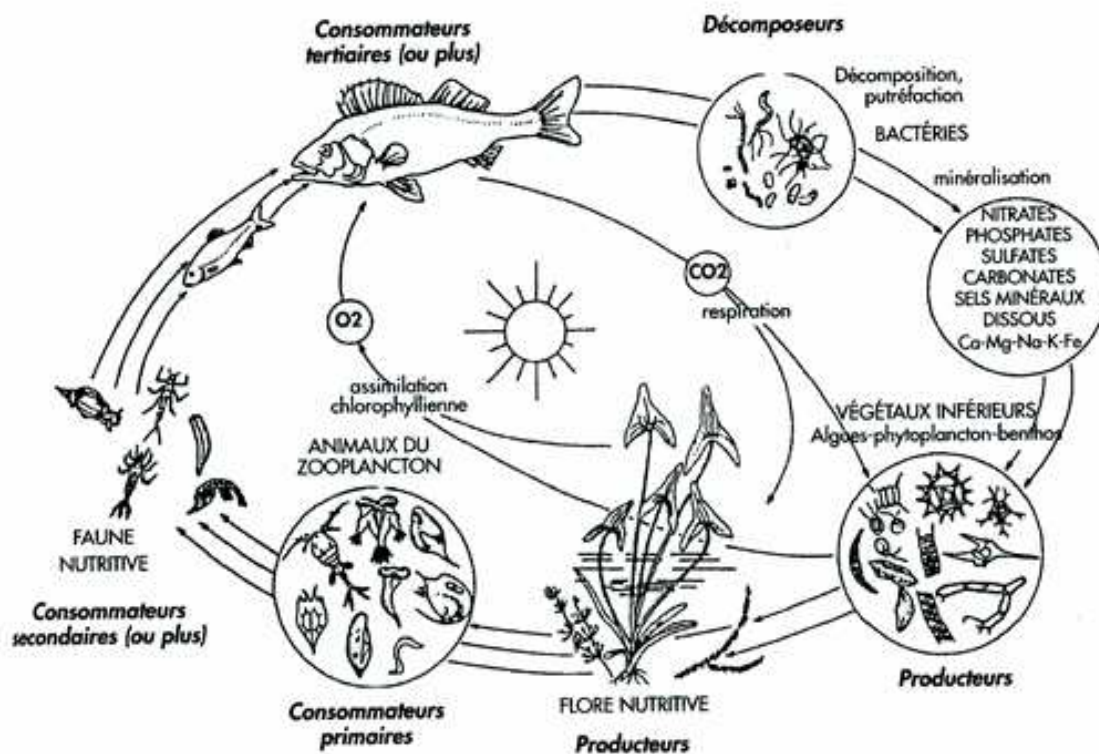


Figure 18 : Schéma des relations trophiques dans un écosystème aquatique (Source : (Genin *et al.* 1997)

Par conséquent, les diatomées jouent un rôle fondamental à la base des chaînes trophiques comme source de nourriture pour de nombreux organismes brouteurs (protozoaires, macroinvertébrés, poissons benthophages) et les organismes filtreurs (Figure 18) (Round *et al.* 1990; Stevenson *et al.* 1999).

d) Utilisation

De par leur importance écologique, les diatomées sont très utilisées en aquaculture pour nourrir les larves, les alevins et les adultes de poissons, de crustacés et de mollusques (Avendano-Herrera *et al.* 2007; Chen 2007). De nombreux travaux ont été, par exemple, initiés pour produire à l'aide d'une espèce, *Haslea ostrearia* Simonsen, un pigment, la marennine, impliqué dans le verdissement des huîtres du bassin Marennes-Oléron (Lebeau *et al.* 1999; Turpin *et al.* 2001; Mouget *et al.* 2005).

Des travaux scientifiques ont aussi été lancés depuis quelques années pour tenter d'identifier des diatomées et d'autres microorganismes, capables de synthétiser des lipides utilisables comme substitut aux énergies fossiles (Sudo *et al.* 1991).

Comme nous l'avons vu précédemment, la bio-indication aquatique mais aussi terrestre fait appel aux diatomées comme organisme indicateur de l'état du milieu (Berard *et al.* 2004). Ces micro-algues sont aussi utilisées par la police scientifique¹ dans des cas de noyade pour déterminer, notamment, l'origine de la mort (Ludes *et al.* 1996).

3 L'ultra-structure cellulaire

a) Les principaux organites

Les diatomées sont des organismes végétaux aquatiques unicellulaires eucaryotes dont la taille peut varier de quelques dizaines à plusieurs centaines de micromètres.

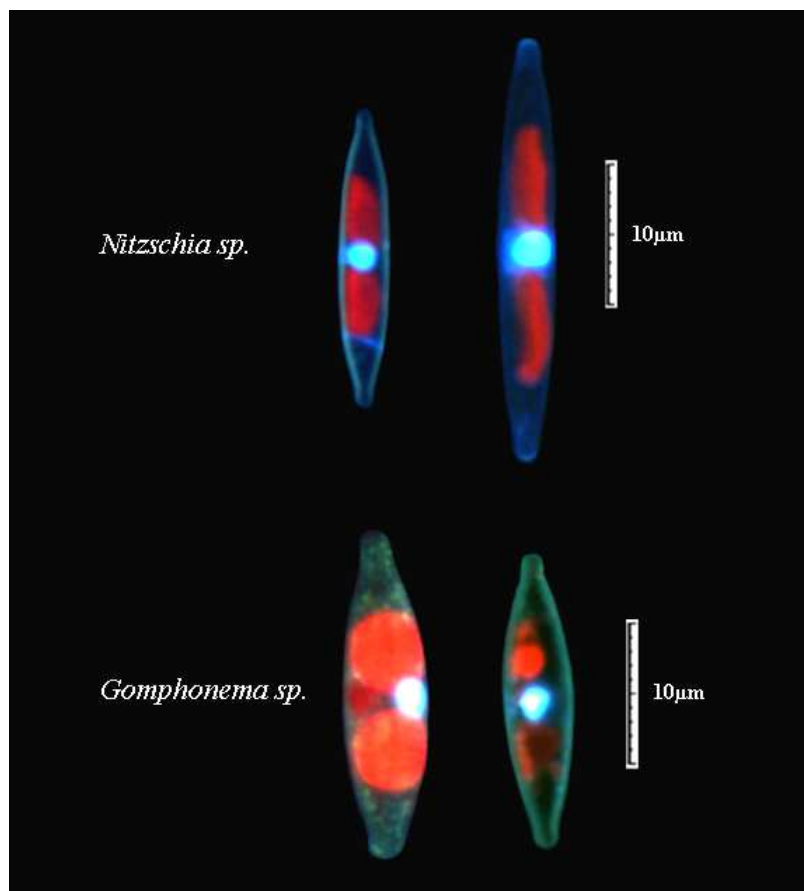


Figure 19 : Vue en microscopie à épifluorescence de diatomées pennées des genres *Nitzschia* et *Gomphonema* dont le noyau (bleu), marqué par du Hoescht 33342, est entouré de deux chloroplastes (rouges)

Comme toutes les cellules eucaryotes, elles disposent d'un noyau délimité par une membrane et généralement positionné, durant l'interphase, au centre de la cellule entre les vacuoles (Figure 19) (Round *et al.* 1990; Pickett-Heaps 1991; Van Den Hoek *et al.* 1995). Dans certains cas, juste avant la

¹ De la même manière que pour la bio-indication, la très grande distribution géographique conjuguée à la mobilité extrêmement réduite sur un site de ces organismes fixés font des diatomées benthiques des organismes particulièrement intéressants, dans le cas de la police scientifique, pour évaluer les causes du décès dans le cas de corps immergés.

mitose, le noyau peut être observé contre la paroi, et plus précisément contre les bandes connectives (Figure 19), mais toujours dans le plan central¹ de la cellule (Edgar *et al.* 1984). La forme du noyau varie peu pour une même espèce. Les différences observées entre les espèces sont liées à la taille et la forme de la cellule, facteurs qui influent aussi sur les autres organites (vacuole, cytoplasme, réseau filaments...) (Duke *et al.* 1977). En ce qui concerne les chloroplastes, leur nombre et leur forme varient entre les diatomées centriques et les diatomées pennées (voir ci-dessous) Les premières possèdent généralement un grand nombre de petits chloroplastes discoïdes alors que les secondes se limitent à deux grands plastes (Figure 19 et Figure 20) (Van Den Hoek *et al.* 1995; Raven *et al.* 2000).

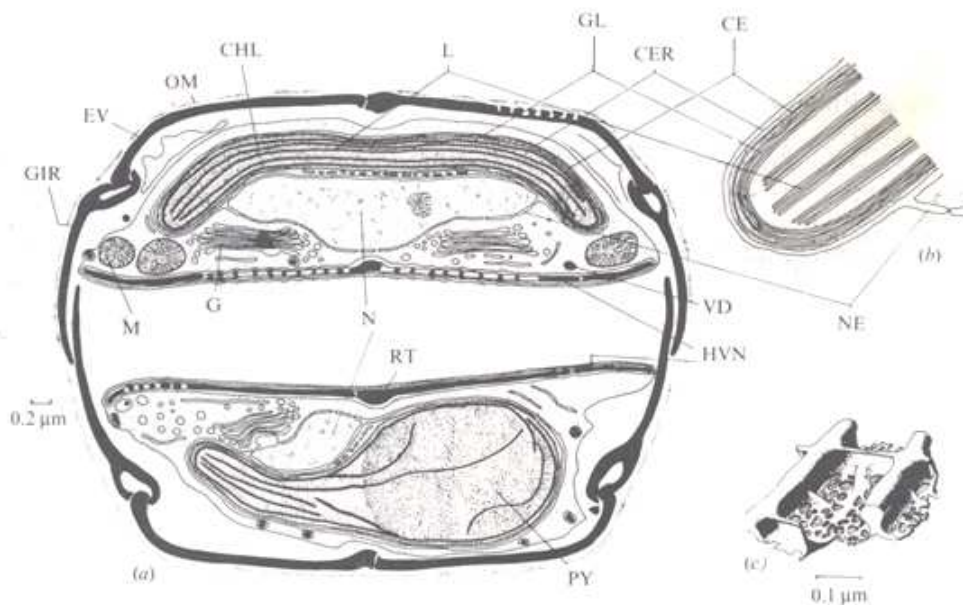


Figure 20 : Coupe transversale vue en MET d'*Amphipleura pellucida* (CHL : Chloroplaste, EV : Epivalve, G : Appareil de Golgi, HVN : Hypovalve de la cellule fille, M : Mitochondries, N : Noyau, OM : Matière organique entourant le frustule, PY : Pyrénoïde, RT : Raphé en continu, VD : Vésicule avec un contenu noir)
(Source : (Van Den Hoek *et al.* 1995)

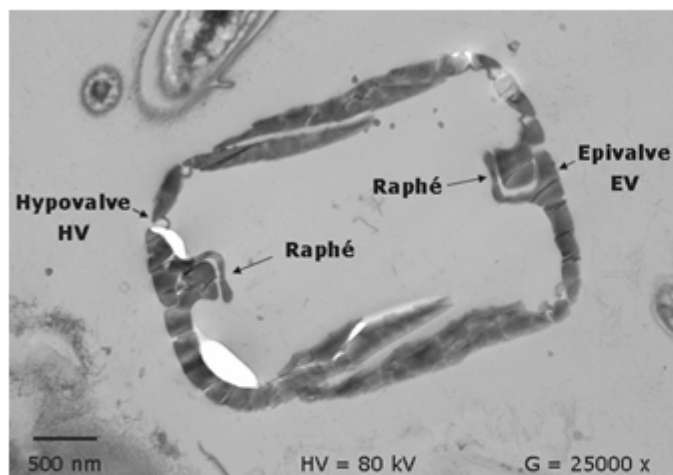
Comme l'ont montré des observations en microscopie électronique de coupes transversales de diatomées, les plastes épousent souvent la forme de la cellule (Figure 20) (Duke *et al.* 1977). Ces micro-algues disposent aussi de mitochondries et d'une ou plusieurs vacuoles qui occupent la majeure partie de l'espace intracellulaire.

¹ Perpendiculaire au plan transapical

b) La paroi cellulaire

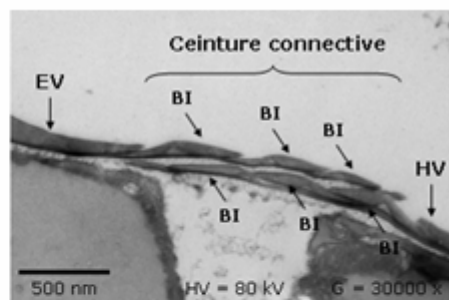
▪ Composition

La principale particularité des diatomées réside dans la composition de leur paroi cellulaire, structure propre à toutes les cellules végétales. A la différence des autres organismes végétaux¹, elle est constituée d'une coque siliceuse (silice opaline polymérisée hydratée $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) enchâssée dans une matrice organique (Campbell 1995; Raven *et al.* 2000).



Debenest T. / Martinez Y. / Le Pert J.C.

Coupe transversale d'une diatomée pennée biraphidée observée au MET



Debenest T. / Martinez Y. / Le Pert J.C.

Coupe transversale, au niveau des bandes intercalaires (BI) composant la ceinture connective, d'une diatomée pennée observée au MET



Frustule d'une espèce biraphidée, *Gomphoneis minuta* (Grun.), observé au MEB (Sellier et Coste)

Figure 21 : Vues aux microscopes électroniques à transmission (MET) et à balayage (MEB) de l'ultra-structure cellulaire de diatomées pennées

¹ Les chrysophycées présentent des écailles siliceuses et non une coque siliceuse. Gayral, P. (1975). *Les Algues : morphologie, cytologie, reproduction, écologie*. Paris, Doin..

Cette coque, ou frustule, est composée de deux valves (l'épivalve et l'hypovalve) qui s'emboîtent l'une dans l'autre, la suture entre ces valves étant assurée par un ensemble de bandes intercalaires siliceuses formant la ceinture connective (Figure 21).

- Forme et ornementation

Les valves sont percées de nombreux pores et parcourues, pour certaines diatomées pennées, par une fente longitudinale : **le raphé**, permettant ainsi les échanges avec le milieu extérieur (Figure 21). Les diatomées sécrètent ainsi du mucilage, au travers de ces ouvertures, sous la forme de polysaccharides impliqués dans l'adhésion aux substrats, dans la mobilité des cellules et dans la formation des colonies (Bourrelly 1981; Van Den Hoek *et al.* 1995; Bertrand 1999).

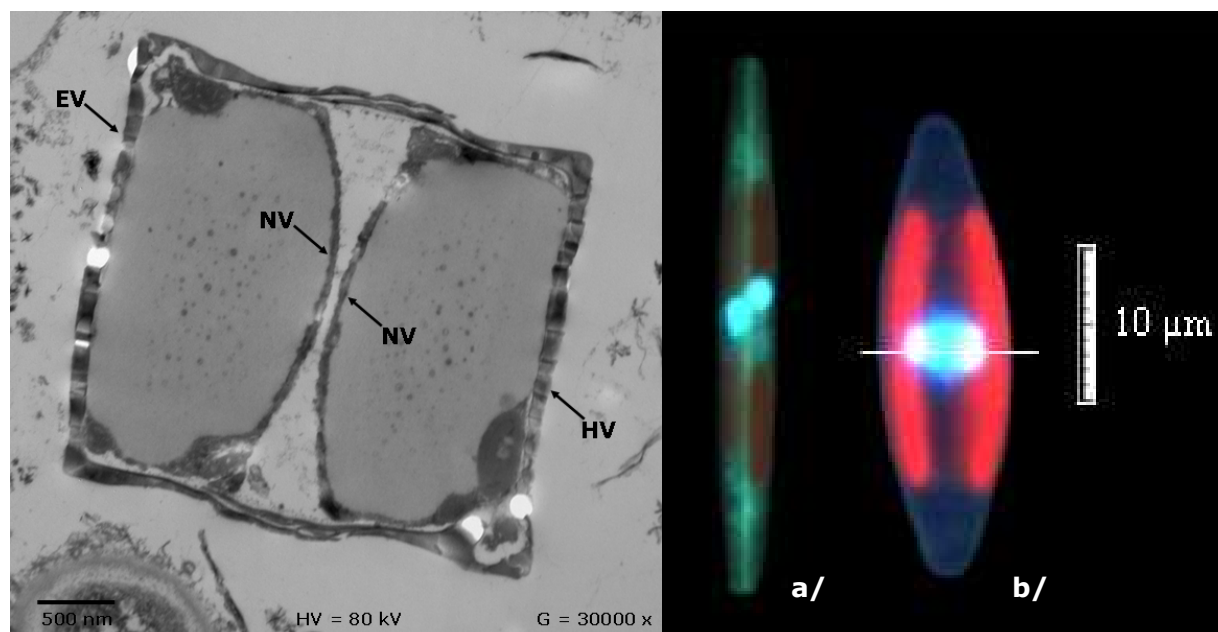
- Formation

Les mécanismes à l'origine de la formation de cette structure minérale originale sont sujets à discussion au sein de la communauté scientifique. Le silicium, absorbé par la cellule, serait accumulé sous forme d'acide silicique dans une vésicule de dépôt issue de la fusion de microvésicules dont l'origine n'est pas établie, certains auteurs citant l'appareil de Golgi alors que d'autres penchent plus pour le réticulum endoplasmique granuleux (Lee *et al.* 1992). Le transport des microvésicules serait contrôlé par les microfilaments alors que le transport de la vésicule de dépôt serait le fait des microtubules même si cette dernière hypothèse est, elle aussi, controversée (Duke *et al.* 1977; Pickett-Heaps *et al.* 1979; Lee *et al.* 1992; Van Den Hoek *et al.* 1995). Une fois arrivé à la surface de la membrane cellulaire, le matériel siliceux se condense et se polymérise sur les groupes hydroxyles de deux acides aminés, la sérine et la thréonine, pour former une nouvelle valve (Round *et al.* 1990). Pour certains auteurs, la polymérisation de la silice aurait lieu directement dans la vésicule de dépôt (Wilt 2005). La membrane et les matériaux organiques présents dans la vésicule constituent une enveloppe éphémère autour de la valve en formation. Cette structure primaire est constituée de polysaccharides sulfatés, contenant notamment du fucose, du manose et du galactose, synthétisés durant les tous premiers stades de développement de la valve. (Round *et al.* 1990; Van Den Hoek *et al.* 1995). Une enveloppe secondaire, appelée couche diatoptétique, est ensuite synthétisée. Elle est composée de polypeptides, de polysaccharides acides et, chez certaines diatomées (notamment *Navicula pelliculosa*), d'un polysaccharide sulfaté le glucoromannan (Round *et al.* 1990; Van Den Hoek *et al.* 1995; Quéguiner 2007). Cette matrice organique protège le frustule contre toute forme de dissolution liée aux conditions physico-chimiques du milieu.

4 Multiplication et reproduction

a) Multiplication végétative

La mitose des diatomées benthiques ne diffère fondamentalement pas des autres organismes végétaux. A partir des deux centromères, les fuseaux mitotiques, le long desquels migrent les chromosomes lors de l'anaphase, se déploient (Pickett-Heaps *et al.* 1979; Round *et al.* 1990; Pickett-Heaps 1991).



Debenest T. / Martinez Y. / Le Pert J.C.

Figure 22 : Coupe transversale, visualisée au MET, d'une diatomée en fin de division, deux nouvelles valves (NV) ayant été sécrétées dans l'épivalve (EV) et l'hypovalve (HV) et Vue au microscope à épifluorescence de diatomées en division (a/ anaphase ou télophase les parois étant synthétisée ; b/ métaphase le noyau étant divisé en deux le long d'un axe transapical en blanc)

La principale particularité de la division cellulaire chez les diatomées réside dans la synthèse, par chacune des cellules filles, d'une nouvelle valve au sein de chaque valve héritée de la cellule mère (Figure 22). De ce fait, la taille d'une des cellules filles est inférieure à celle de la cellule mère. Avec la multiplication végétative des cellules la réduction de taille s'amplifie au cours des générations. Lorsqu'un seuil minimal est atteint la reproduction sexuée se déclenche et rétablit la taille originelle de la cellule. La vitesse de multiplication est extrêmement variable entre les espèces. Certains auteurs estiment que les petites espèces pionnières se multiplient plus rapidement que les grandes mais les données demeurent réduites à quelques espèces (Round *et al.* 1990; Leitão *et al.* 2005). Dans notre cas, nous avons observé qu'une communauté de diatomées benthiques doublait, dans des conditions favorables et en pleine croissance, en 24 voire 36 heures. Plusieurs auteurs ont cherché et réussi à obtenir des divisions synchrones en soumettant les diatomées à un régime de nuit-jour ou à des carences en silice (Lewin *et al.* 1966; Round *et al.* 1990).

b) Reproduction sexuée

Les diatomées présentent un cycle monogénétique diplontique, la méiose intervenant lors de la formation du gamète. Chez les diatomées, la reproduction sexuée se caractérise par la production d'un auxospore qui donne naissance à une nouvelle diatomée (Gayral 1975). Les modalités de la reproduction sexuée diffèrent entre les diatomées centriques et les diatomées pennées. Chez les premières, les cellules végétatives font office de gamétocystes, une partie d'entre elles produisant 1 ou 2 oosphères immobiles et d'autres de petites cellules uniflagellées (Round *et al.* 1990; Quéguiner 2007). Dans ce cas présent, la reproduction sexuée s'apparente à une oogamie, qui induit au final la formation d'une auxospore dont la division produit une diatomée de taille maximale (Reviés 1953; Raven *et al.* 2000). Pour les diatomées pennées, les gamètes se forment suite à une division cellulaire inégale, la plus petite masse haploïde donnant le gamète mâle et l'autre l'oosphère. La fusion des gamètes des deux cellules voisines produit deux auxospores. Une fois synthétisée une nouvelle coque en silice, chaque auxospore donne naissance à une cellule initiale, morphologiquement légèrement différente des clones qu'elle engendre par multiplication végétative (Round *et al.* 1990; Quéguiner 2007).

Bilan concernant les diatomées

L'évolution suivie par une communauté en réponse à une exposition à des toxiques peut influencer sa production de matière organique. L'effet des toxiques sur ces micro-algues se répercute alors à toute la chaîne trophique (Goldsborough *et al.* 1986). Ces micro-algues, et plus particulièrement les formes benthiques, ont donc été utilisées pour développer des outils de bioindication aquatique. Elles sont, de ce point de vue, des bioindicateurs reconnus des pollutions organiques, des lacunes demeurant en ce qui concerne la détection des pollutions par les agents toxiques comme les pesticides. De nombreuses études scientifiques ont donc été menées pour observer et évaluer les effets de ces molécules, le plus souvent d'origine agricole, sur les cellules et les communautés de diatomées.

D./ Les effets connus des pesticides sur les diatomées

Les effets des pesticides, et plus particulièrement des herbicides, sur les algues et les diatomées ont fait l'objet d'un grand nombre de travaux de recherche. Nous avons choisi de présenter l'état de l'art dans ce domaine en partant de l'échelle de la cellule pour finir au niveau des communautés. Nous nous focaliserons, dans un premier temps, sur les effets des pesticides sur la cytologie et l'ultra-structure des cellules pour ensuite étudier les effets sur le métabolisme des cellules et des communautés et enfin aborder l'impact de ces toxiques sur la composition spécifique des communautés.

1 Les effets sur la cytologie et l'ultra-structure

Il est relativement difficile d'appréhender par organite les effets des agents toxiques, et des pesticides en particulier, sur la cytologie et l'ultrastructure des diatomées. En effet, l'altération d'un organite a des conséquences sur le fonctionnement d'un autre composant de la cellule, l'ensemble étant très imbriqué. En outre, les données bibliographiques concernant les effets intracellulaires des toxiques chez les diatomées sont assez limitées. Nous avons donc choisi de nous focaliser sur les effets de ces molécules sur le squelette intracellulaire, le noyau, les membranes jusqu'à la paroi cellulaire et d'étudier, à chaque fois, les mécanismes physiologiques pouvant être mis en jeu.

a) Le squelette interne ou cytosquelette

Comme toutes les cellules, les diatomées sont dotées d'un réseau interne de filaments (microtubules, filament d'actine, microfilaments), qui interviennent dans les phases de multiplication et jouent un rôle important dans le fonctionnement et le maintien de l'agencement interne de la cellule. Ces filaments sont essentiels à la survie et à la reproduction des cellules. Par conséquent, de nombreuses molécules herbicides ont été développées autour de cette cible cellulaire. Or les algues peuvent être exposées à ce type de substances actives dans les eaux. Coss et Pickett-Heaps (1974) ont ainsi montré qu'un herbicide de la famille des carbamates (l'isopropyl *N*-Phenyl carbamate IPC) conduisait à des déformations des fuseaux mitotiques chez une algue verte (*Oedogonium cardiacum*) (Coss *et al.* 1974). Les effets de la colchicine, un inhibiteur de la mitose agissant de la même manière que l'ICP, sur le développement des microtubules ont, aussi, été très étudiés chez des algues vertes et des diatomées (Coombs *et al.* 1968; Edgar *et al.* 1984; Puiseux-Dao 1989). L'exposition à ce composé perturbe la polymérisation de la tubuline et conduit à une désorganisation des fuseaux mitotiques (Coombs *et al.* 1968; Puiseux-Dao 1989). De même, Spurck et Pickett-Heaps (1994) ont montré que l'agencement ordonné des chromosomes en métaphase pouvait être modifié par l'effet de la substance active d'un médicament, le diazepam, sur les fuseaux mitotiques de deux espèces de diatomées (*Surirella robusta et Hantzschia amphioxys*) (Spurck *et al.* 1994). Dans le cas d'expositions modérées, ces mêmes auteurs ont mis en évidence une réversibilité des effets.

En ce qui concerne les mécanismes cellulaires impliqués, ce sont les effets sur les microtubules de certaines molécules qui ont été principalement étudiés. La colchicine inhiberait ainsi l'agrégation des

tubulines α et β en se fixant à ces molécules (Puisseux-Dao 1989). Or selon Coss et Pickett-heaps, les mécanismes d'action de la colchicine et de l'IPC, herbicides appartenant à la famille des carbamates, sont proches (Coss *et al.* 1974). Les herbicides pourraient, donc, aussi perturber la synthèse des microtubules. L'IPC appartient à une famille qui comprend aussi bien des molécules fongicides et herbicides. Ceci peut laisser à penser que le squelette interne des cellules de diatomées peut aussi être affecté par une exposition à des fongicides. Néanmoins, le nombre d'études physiologiques, concernant l'effet des molécules toxiques sur les microfilaments des algues en général, est réduit.

b) Le noyau

Peu d'études ont été réalisées sur l'impact des produits toxiques et des pesticides en particulier sur le noyau. Cassoti *et al.* (2005) ont observé, chez des diatomées marines (*Thalassiosira weissflogii*) exposées à un aldéhyde (2-trans,4-trans-decadienal), une dispersion de l'ADN dans les cellules (Casotti *et al.* 2005). Cette altération semble liée à une forme d'apoptose. Une autre molécule, la colchicine, serait à l'origine d'une fragmentation du noyau chez les diatomées, des cellules multi-nucléaires ayant été observées chez une espèce de diatomée (*Navicula pelliculosa*) exposée à cette molécule (Coombs *et al.* 1968; Duke *et al.* 1977). Pour détecter des fragmentations de l'ADN induites par des agents toxiques, appelés aussi effets clastogènes, plusieurs auteurs ont appliqué la technique du « Comet assay » chez des algues (Euglenia et Diatomées). Desai *et al.* (2006) ont ainsi montré que 65% des cellules d'une diatomée exposées à du cadmium présentaient un ADN fragmenté (Desai *et al.* 2006). Les produits toxiques de synthèse ont le même effet sur des algues vertes (Aoyama *et al.* 2003).

Les mécanismes à l'origine de ces altérations nucléaires peuvent être très divers. Rijstenbil (2001) rapporte, ainsi, que le stress oxydatif induit par des radiations solaires peut altérer les membranes et l'ADN des diatomées (Rijstenbil 2001). Il est vraisemblable d'envisager que les produits toxiques, et notamment des pesticides, soient à l'origine, chez ces micro-organismes, de mécanismes similaires, déjà observés chez des plantes supérieures exposées à ce type de composés.

Les effets des produits toxiques sur le noyau peuvent aussi être liés à des altérations des microtubules. Comme nous l'avons vu précédemment certains composés (herbicide ICP et colchicine) peuvent perturber les microtubules qui jouent un rôle primordial lors de la séparation du matériel génétique au cours de la mitose. On parle alors d'effet aneugène. Or Coombs *et al.* (1968) ont montré à la fois une désorganisation des fuseaux mitotiques (constitués de microtubules) et le développement de cellules multi-nucléaires sous l'effet de la colchicine (Coombs *et al.* 1968; Duke *et al.* 1977). La désorganisation des microtubules sous l'action des toxiques conduirait, donc, à une fragmentation du noyau en plus de deux parties lors de la mitose.

c) Les membranes

Sous l'effet de radiations ou de certains composés, les membranes peuvent être altérées par la production de radicaux oxydants (Rijstenbil *et al.* 1994). En excès, ces composés dérèglent la balance pro/antioxydants, et oxydent certains composants membranaires comme les lipides (peroxydation).

d) La paroi cellulaire siliceuse : le frustule

Les diatomées sont des organismes unicellulaires dotés, comme toutes les cellules végétales, d'une paroi cellulaire. Mais dans le cas des diatomées, la paroi est composée de structures siliceuses qui offrent, à ces algues, une forme « d'exosquelette » : le frustule. Chaque espèce présente une ornementation et une forme générale de frustule qui lui est propre.

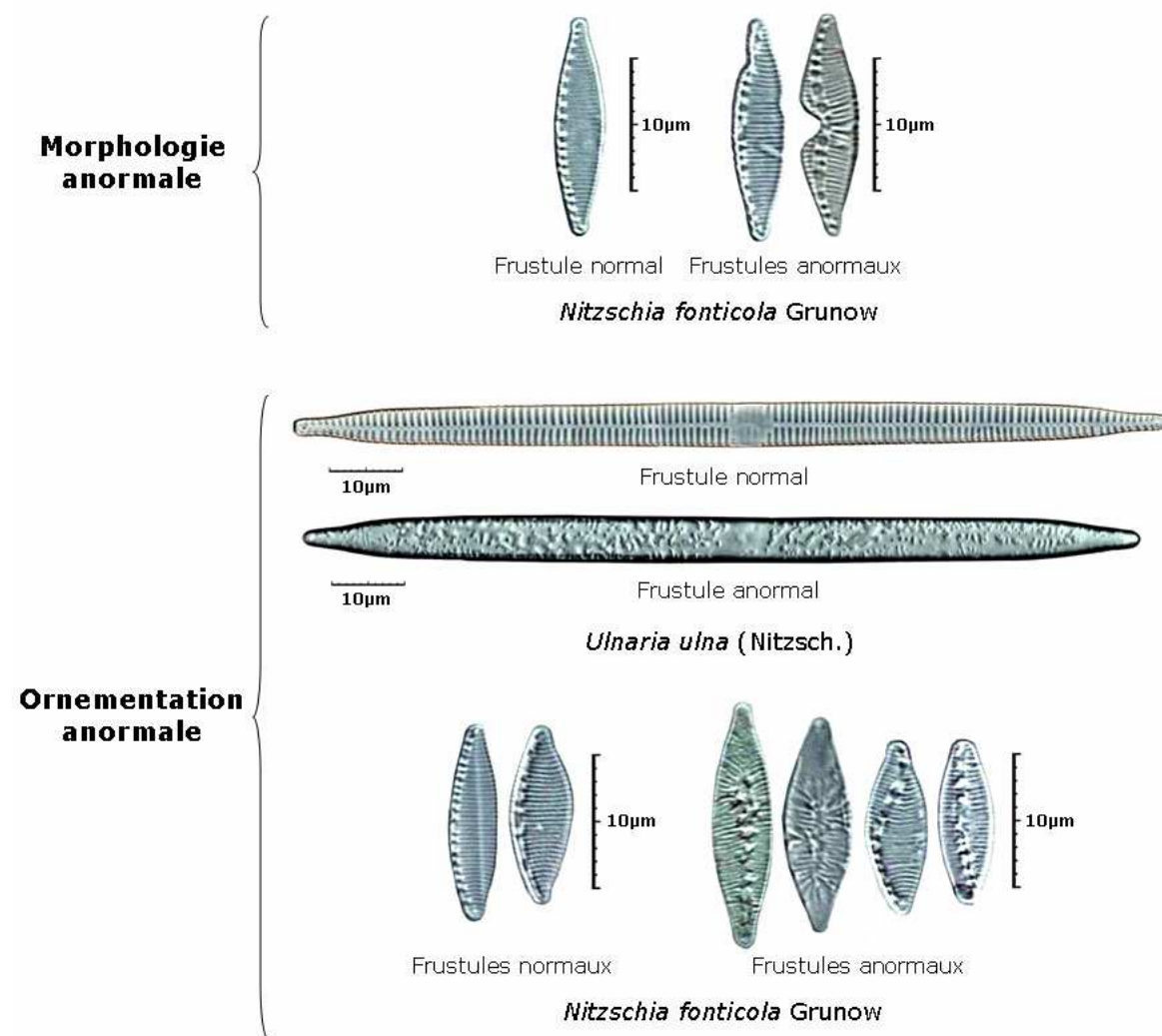


Figure 23 : Photos au microscope optique de frustules normaux et anormaux de différentes espèces de diatomées benthiques

Cette particularité a permis, à de nombreux auteurs, d'identifier des cas d'anormalités de morphologie ou de striation chez certains individus (Figure 23) (Feldt *et al.* 1973; Thomas *et al.* 1980; Adshead-Simonsen *et al.* 1981; Fisher *et al.* 1981; Yang *et al.* 1993; McFarland *et al.* 1997; Dickman 1998; Gomez *et al.* 2003; Cattaneo *et al.* 2004; Stoermer 2004).

Plusieurs hypothèses ont été émises quant à l'**origine de ces déformations**.

× Les métaux lourds

Parmi toutes les causes possibles pouvant conduire à l'induction d'anormalités du frustule, les métaux lourds sont les plus souvent cités dans la littérature scientifique. Des études *in situ* ont, en effet, mis en évidence des formes anormales dans des environnements contaminés par de fortes pollutions métalliques (Feldt *et al.* 1973; McFarland *et al.* 1997; Dickman 1998). Dans le cas d'expérimentations plus spécifiques, des formes anormales ont été observées au sein de communautés exposées à du cadmium, du cuivre, du mercure et du zinc (Thomas *et al.* 1980; Adshead-Simonsen *et al.* 1981; Fisher *et al.* 1981; Rijstenbil *et al.* 1994; Ruggiu *et al.* 1998; Gold *et al.* 2003; Gomez *et al.* 2003; Cattaneo *et al.* 2004).

× Les produits chimiques dont les pesticides

La responsabilité des produits chimiques, et en particulier des pesticides, dans l'apparition d'anormalités dans la paroi siliceuse des diatomées n'a été que très peu étudiée. Schmitt-Jansen et Altenburger (2005) ont, ainsi, observé des formes anormales sur des diatomées exposées à des concentrations élevées (maximum 312µg/L) en isoproturon, un herbicide agricole très utilisé (Schmitt-Jansen *et al.* 2005). Mais chez des communautés exposées à des herbicides différents (atrazine et nicosulfuron), des anomalies de ce type n'ont pas été notées. Néanmoins les résultats obtenus avec des produits chimiques aux modes d'action similaires aux pesticides peuvent laisser supposer que ce type de composés est à l'origine de l'induction de ces anormalités. Plusieurs auteurs rapportent, ainsi, que des molécules, comme la colchicine ou des drogues anti-microtubules, peuvent perturber la forme générale du frustule (Duke *et al.* 1977; Edgar *et al.* 1984; Van Den Hoek *et al.* 1995).

× Les radicaux libres

Ces différents composés¹ sont produits naturellement (radiations lumineuses) ou sous l'effet d'expositions anormales à des produits toxiques ou des radiations. Lorsque les mécanismes de défense ne suffisent plus, le fort pouvoir oxydant de ces composés peut altérer l'intégrité membranaire de la cellule. Pour Rijstenbil *et al.* (1994, 2001), le stress oxydatif, induit par ces composés, peut aussi conduire à la formation de frustules anormaux sans que les mécanismes cellulaires aient été identifiés (Rijstenbil *et al.* 1994; Rijstenbil 2001).

× Les carences en nutriment

D'autres facteurs environnementaux, comme les carences en nutriments et le pH, jouent vraisemblablement un rôle dans le développement de formes anormales de diatomées, (Dickman 1998). Selon Thomas *et al.* (1980) et Mc Farland *et al.* (1997) de fortes carences en silice seraient, ainsi, à l'origine de l'apparition de ce type d'altération (Thomas *et al.* 1980; McFarland *et al.* 1997).

¹ l'anion superoxide (O₂⁻), le peroxide d'hydrogène (H₂O₂), le dioxygène singlet (O₂), et le radical hydroxyle (HO).

En effet, en absence de silice, la silicification de la paroi cellulaire est perturbée, la cellule ne pouvant plus subvenir à ses besoins physiologiques.

× Autres causes possibles

L'apparition de frustules déformés peut aussi être le fait de pressions mécaniques des différents individus entre eux en cas de surpopulation (Andresen *et al.* 1991). Selon Stoermer (1998), la présence de formes anormales dans une communauté peut aussi résulter du développement d'une population clonale à partir d'un individu ayant subi une mutation génétique à l'origine de la déformation de sa paroi cellulaire (Stoermer 1998).

Les mécanismes cellulaires impliqués dans la genèse des formes anormales sont encore mal connus. Pour certains auteurs, l'apparition de formes anormales serait liée à une perturbation dans l'absorption de la silice par la cellule, notamment suite à une exposition à des métaux lourds (Fisher *et al.* 1981; Rijstenbil *et al.* 1994; McFarland *et al.* 1997; Cattaneo *et al.* 2004). Ces agents toxiques, en perturbant le fonctionnement normal des membranes, réduiraient l'entrée de silice dans la cellule. Rijstenbil *et al.* (1994) avance, ainsi, l'hypothèse d'une possible peroxydation des lipides de la membrane par le cuivre (Rijstenbil *et al.* 1994).

Plusieurs auteurs mentionnent aussi l'effet probable des agents toxiques sur la synthèse des acides aminés (Fisher *et al.* 1981; McFarland *et al.* 1997). Or il a été suggéré que la polymérisation des molécules de silice pouvait être contrôlée par une protéine de structure (Round *et al.* 1990). Le développement d'anormalités sur le frustule pourrait donc être lié à un défaut d'approvisionnement en silice polymérisée, conséquence d'une perturbation dans la synthèse de certains acides aminés indispensables à la polymérisation du silicium. Rimet *et al.* (1999) suspectent ainsi des acides aminés entrant dans la composition de la paroi siliceuse d'être inhibé par un herbicide, le nicosulfuron (Rimet *et al.* 1999).

D'autres travaux scientifiques renvoient ce défaut d'approvisionnement à un effet des toxiques sur le réseau de filaments (microtubules, filaments d'actine et microfilaments) véritable squelette interne de la cellule. Edgar et Pickett-Heaps (1984) ont ainsi montré que des drogues anti-microtubules conduisaient à des anormalités primaires du raphé chez certaines diatomées pennées dotées de cette fente sur leur frustule (Edgar *et al.* 1984). Selon d'autres auteurs, les filaments d'actine et les microfilaments interviennent aussi dans le transfert des microvésicules issues du réseau de Golgi et des vésicules, contenant la silice, vers la paroi cellulaire (Lee *et al.* 1992; Raven *et al.* 2000). Mais Spurck et Pickett-Heaps (1994) ont réussi à visualiser des altérations des microtubules, affectant l'ordonnement des chromosomes, chez deux espèces de diatomées exposées à un médicament, le diazepam¹, sans que des anomalies du frustule aient été identifiées (Spurck *et al.* 1994). Malgré cela, il semble que la modification de l'agencement interne de la cellule ait un impact sur la sécrétion du frustule (Edgar *et al.* 1984; Round *et al.* 1990).

¹ Substance active du valium.

2 Les effets sur le métabolisme des cellules et des communautés

Les effets des pesticides au cours du cycle de développement des algues et des diatomées en particulier ont été largement étudiés. Nous nous attacherons, donc dans cette partie, à détailler l'état des connaissances concernant l'impact de ces agents toxiques sur la photosynthèse et la respiration, la synthèse des acides gras et des acides aminés et, enfin, l'absorption des nutriments

a) Les processus bioénergétiques

- L'activité photosynthétique

Les organismes végétaux présentent cette particularité d'utiliser les photons de la lumière comme source d'énergie pour leur métabolisme cellulaire. Cette activité photosynthétique est la cible de toute une gamme de molécules herbicides très utilisées en agriculture comme les s-triazines et les urées substituées (phénylurées et sulphonylurées). Ces molécules inhibent plus précisément le fonctionnement d'une entité du complexe photosynthétique, le photosystème II. Elles se lient avec une protéine, la protéine D1, bloquant ainsi le transfert d'électrons nécessaires à une réaction d'oxydoréduction, la réaction de Hill (Berard *et al.* 1996; Peres *et al.* 1996; Dorigo *et al.* 2001; Leboulanger *et al.* 2001; Berard *et al.* 2003; Dorigo *et al.* 2004).

De très nombreux travaux ont été publiés sur l'impact de ce type de molécules sur l'activité photosynthétique des algues. Il a, ainsi, été observé que des concentrations d'atrazine de l'ordre de 1 à 5µg/L pouvaient affecter la photosynthèse d'algues phytoplanctoniques. Seules les concentrations les plus élevées (20 et 500µg/L) ont fait apparaître une baisse significative de l'absorption en ¹⁴C indiquant une inhibition de la photosynthèse (De Noyelles *et al.* 1982). Des résultats similaires ont été obtenus avec des concentrations de 25µg/L (Weiner *et al.* 2007). D'autres molécules de la famille des s-triazines, notamment l'Irgarol, utilisées pour éliminer les algues, et notamment les diatomées, fixées sur les coques des bateaux, ont aussi été étudiées. Différentes expérimentations, à partir de tests à court terme (quelques jours), ont souligné le fort potentiel inhibiteur de cette molécule sur l'activité photosynthétique des algues (Dahl *et al.* 1996; Nystrom *et al.* 2002; Berard *et al.* 2003). Dans le cas d'études à plus long terme (quelques semaines), les effets sont mêmes apparus à des concentrations relativement faibles (0,063-0,25µg/L) (Dahl *et al.* 1996). L'Irgarol est connu pour sa très forte toxicité vis-à-vis des algues comparé à l'atrazine (70 fois plus toxique) (Dahl *et al.* 1996; Berard *et al.* 2003). Avec ce même type de système expérimental à long terme, Kasai *et al.* (1994) ont, aussi, mis en évidence qu'un herbicide de la même famille, la simetryne, réduisait l'activité photosynthétique du phytoplancton mais à des concentrations élevées (0,1 et 1mg/L) (Kasai *et al.* 1995).

Des observations similaires ont été réalisées sur des diatomées et des algues vertes exposées à des molécules herbicides, le diquat et l'hexazinone, n'appartenant pas à la famille des s-triazines (Peterson *et al.* 1997).

Pour plusieurs substances actives de la famille des sulfonylurées, Nystrom *et al.* (2002) ont, aussi, observé une augmentation de la fluorescence spécifique de la « chlorophylle a », synonyme d'une inhibition de la photosynthèse, chez des organismes phytoplanctoniques (Nystrom *et al.* 2002).

Enfin, une étude concernant la formulation commerciale d'une substance active très utilisée, le glyphosate, a montré une réponse dose-effet, l'activité photosynthétique diminuant avec une augmentation des concentrations en glyphosate. Mais les effets ont été observés à des concentrations relativement fortes (8-1800mg/L) (Goldsborough *et al.* 1988).

- L'activité respiratoire

Peu de données sont disponibles, concernant l'impact des herbicides sur la respiration cellulaire. Hamala et Kollig (1985) ont mis en évidence, sur des communautés periphytiques, qu'une exposition à de l'atrazine augmentait leur activité hétérotrophe, le rapport photosynthèse/respiration étant inférieure à 1 après ajout de l'atrazine, et diminuait leur productivité primaire nette. Ces auteurs ont observé que la demande respiratoire s'amplifiait à mesure que l'activité photosynthétique diminuait. Au bout de 50 jours d'exposition, la demande respiratoire s'est même avérée plus importante que l'activité photosynthétique.

b) Les synthèses de protéines, lipides et glucides

Pour plusieurs espèces de diatomées, il a été montré qu'une exposition à l'atrazine pouvait significativement réduire la production de protéines, notamment les protéines D1 et D2, qui jouent un rôle important dans les mécanismes cellulaires de la photosynthèse (Weiner *et al.* 2007). D'autres substances actives, comme le nicosulfuron qui inhibent la synthèse d'acides aminés (valine et isoleucine), peuvent aussi perturber la production de protéines chez les algues (Rimet *et al.* 1999).

Les protéines ne sont pas les seules affectées. Des accumulations de lipides ont aussi été observées chez des diatomées exposées à de l'atrazine dans des milieux non carencés¹. D'autres molécules de la famille des chloroacétamides, comme l'alachlore, peuvent à l'inverse inhiber la synthèse des acides gras.

Certains composés de la famille des phenylurées, comme le linuron, sont connus pour bloquer la mobilité de diatomées (*Hantzschia sp.*). Or comme nous l'avons rappelé précédemment les polysaccharides sécrétés par ces micro-algues sont impliqués dans le déplacement de certaines espèces de diatomées. La perte de mobilité observée chez certaines espèces, suite à une exposition à ce type d'herbicide, pourrait donc être liée à un défaut de production de ces sucres (Pipe *et al.* 1984). Cohn et McGuire (2000) ont proposé d'utiliser la perte de mobilité comme indicateur d'une exposition des diatomées à un stress environnemental de nature toxique (Cohn *et al.* 2000).

¹ L'augmentation des concentrations en lipides peut aussi être un signe de carences en nutriments Weiner, J. A., M. E. DeLorenzo and M. H. Fulton (2007). "Atrazine induced species-specific alterations in the subcellular content of microalgal cells." *Pesticide Biochemistry and Physiology* **87**(1): 47-53..

c) L'absorption des nutriments

Les molécules herbicides affectent aussi l'absorption des nutriments (NO₃, NO₂, Si) par les algues. Krieger *et al.* (1988) ont ainsi observé, chez des micro-algues exposées de manière continue à une concentration forte (134µg/L) en atrazine, une baisse de l'absorption commune en nitrate, nitrite et silice. D'autres travaux ont aussi mis en évidence, sur des communautés phytoplanctoniques exposées à de la simetryne, une augmentation continue dans le milieu des concentrations en nitrites et nitrates au cours de l'expérimentation (Kasai *et al.* 1995). De nombreux auteurs sont arrivés à des résultats similaires à partir de systèmes expérimentaux traités avec des herbicides inhibiteurs de la photosynthèse (Goldsborough *et al.* 1986; Herman *et al.* 1986; Gurney *et al.* 1989). L'augmentation des concentrations en nutriments dans le milieu serait liée à l'inhibition du périphyton, ce dernier ne retenant plus les minéraux des couches supérieures du sédiment (Peres *et al.* 1996). D'autres auteurs attribuent ce phénomène à la remise en solution des composés nutritifs lors de la décomposition des organismes végétaux (Goldsborough *et al.* 1986). Mais ces observations sont limitées à l'échelle de la communauté et s'avèrent donc difficiles à extrapoler à l'échelle cellulaire. La littérature scientifique rapporte qu'en présence d'atrazine, les algues périphytiques se comportent comme si elles étaient exposées à des carences en nutriments (Carder *et al.* 1998). L'atrazine perturberait alors l'absorption en nutriments des cellules. Mais la température joue aussi un rôle non négligeable dans ce mécanisme cellulaire. Krieger *et al.* (1988) ont noté des effets à 10°C, mais pas à 25°C, sur l'absorption en nutriments de plusieurs périphytons exposés à des pics de quatre herbicides (alachlore, atrazine, metolachlore, metribuzin).

3 Les effets sur la multiplication et la reproduction

Certains herbicides de la famille des carbamates et des toluidines ont été spécialement développés pour inhiber la division cellulaire. Coss *et al.* (1974) ont ainsi montré qu'un herbicide de la famille des carbamates, l'isopropyl *N*-Phenyl carbamate (IPC), était à l'origine d'une perturbation de la division des centrosomes, les fuseaux mitotiques étant anormaux. Les pesticides affecteraient donc les microtubules impliqués dans la séparation des chromosomes lors de la mitose. De tels mécanismes ont été mis en évidence chez des plantes supérieures comme *Vicia faba* L. traitées avec un herbicide génotoxique connu : l'hydrazide maléïque (HM) (Grant *et al.* 1992; Marcano *et al.* 2004). Chez une diatomée pennée, *Navicula pelliculosa*, exposée à un inhibiteur de la mitose, la colchicine, Coombs *et al.* (1968) ont aussi observé des cellules multi-nucléées signe d'une désorganisation des fuseaux mitotiques. Des observations semblables ont été réalisées chez deux diatomées exposées à la substance active d'un médicament, le valium, les fuseaux mitotiques et les chromosomes présentant de nombreuses anomalies de forme (Spurck *et al.* 1994). Les mécanismes cellulaires à l'origine de ces altérations sont encore mal connus. Pour Rijstenbil *et al.* (2001), l'arrêt de la division nucléaire est à mettre en relation avec une désorganisation des membranes liée au stress oxydatif. D'autres auteurs citent la perturbation de la synthèse des acides gras par des molécules de la famille des chloroacétamides pour expliquer l'inhibition de la division cellulaire (Carder *et al.* 1998).

4 Les effets sur la croissance de la biomasse

Les diatomées, et plus particulièrement les diatomées benthiques, vivent au sein de communautés où les espèces interagissent entre elles. L'impact de pesticides sur une ou plusieurs espèces affecte, donc, l'ensemble de la communauté. De nombreux travaux ont été publiés concernant les perturbations induites par ces agents toxiques sur la croissance de la biomasse totale et algale du biofilm au sein duquel évoluent les communautés de ces micro-algues benthiques.

a) La Biomasse totale

La biomasse totale du biofilm comprend la matière organique amorphe (polysaccharides extracellulaires,...) et la matière organique vivante. Très peu de données sont disponibles concernant l'impact d'une pollution par les pesticides sur le développement de la biomasse totale du biofilm. Une exposition chronique à des concentrations moyennes à fortes (2 à 500µg/L) en atrazine a induit, dans plusieurs études, une baisse significative de la biomasse totale (De Noyelles *et al.* 1982; Krieger *et al.* 1988; Jurgensen *et al.* 1990; Carder *et al.* 1998). Chez certaines espèces d'algues, dont des diatomées, exposées à des concentrations proches, la baisse de biomasse a été immédiate et significative après l'ajout d'atrazine (Weiner *et al.* 2007).

b) La Biomasse algale

La biomasse algale est évaluée, soit par dosage classique, en spectrométrie, de certains pigments chlorophylliens, notamment les « chlorophylles a, b, c », soit par chromatographie en phase liquide. La concentration en « chlorophylle a » est un des paramètres les plus utilisés pour évaluer l'effet des pesticides sur la biomasse algale.

Plusieurs auteurs ont ainsi montré que, chez des communautés d'algues dont des diatomées, une exposition à des concentrations de l'ordre de 10 à 1000µg/L d'atrazine conduisait à une réduction plus ou moins importante de la concentration en chlorophylle a (De Noyelles *et al.* 1982; Kosinski *et al.* 1984; Krieger *et al.* 1988; Jurgensen *et al.* 1990; Berard *et al.* 1996; Guasch *et al.* 1997; Tang *et al.* 1997; Carder *et al.* 1998; Guasch *et al.* 1998). Mais les résultats sont relativement contrastés. Certaines études ne mettent pas en évidence d'impacts à une concentration de 25µg/L, d'autres observant même une augmentation de la concentration en chlorophylle a¹ chez des algues exposées entre 10 et 32µg/L d'atrazine ou à un mélange d'atrazine et de nicosulfuron (30µg/L pour chacune des molécules) (Lynch *et al.* 1985; Tang *et al.* 1997; Seguin *et al.* 2001). Ce résultat étonnant serait lié à un mécanisme de tolérance et d'adaptation chez certaines algues. Les concentrations en pigments dans les antennes pigmentaires augmenteraient, dans le cas d'expositions modérées à des pesticides, pour maintenir une activité photosynthétique suffisante au métabolisme de la cellule (Tang *et al.* 1997; Seguin *et al.* 2001).

¹ Cette réaction est communément appelée « Greening effect ».

D'autres herbicides comme la simetryne (famille des s-triazines) ou le 2,4-D (herbicide auxinique) altèrent aussi le contenu en « chlorophylle a » à des concentrations élevées, entre 0,1 à 1mg/L pour la simetryne, et supérieures à 5mg/L pour le 2,4-D (Kasai *et al.* 1995; Okay *et al.* 1996). Mais là aussi les résultats divergent entre les études. Dans le cas d'une diatomée, *Phaeodactylum tricorutum*, exposée à des concentrations de 100 et 300mg/L de 2,4-D, il a ainsi été noté une augmentation de la biomasse algale par rapport au témoin. Ce résultat serait dû à l'utilisation par les cellules de l'ammonium présent dans la molécule comme source d'azote (Okay *et al.* 1996).

Il est aussi apparu qu'une molécule de la famille des urées substituées, l'isoproturon, perturbait le développement de la biomasse algale à des concentrations élevées entre 40 et 312µg/L (Schmitt-Jansen *et al.* 2005). Mais la biomasse algale n'est pas apparue affectée par des concentrations plus réduites (20µg/L), ce qui contredit des résultats obtenus, avec la même molécule, par Pérès *et al.* (1996) à des concentrations plus faibles (5µg/L). Mais dans ce dernier cas, les résultats ne portaient que sur les diatomées, sans tenir compte des autres classes d'algues (cyanophytes et chlorophytes). Or Schmitt-Jansen et Altenburger (2005) ont observé un développement d'algues vertes à des concentrations intermédiaires (20µg/L), qui a pu compenser l'effet de l'isoproturon sur les diatomées.

Le cuivre, fongicide utilisé principalement en viticulture, induit aussi une baisse de la concentration en « chlorophylle a », les pigments étant endommagés par le stress oxydatif causé par ce métal (Rijstenbil *et al.* 1994).

c) La densité cellulaire

Il semble difficile de distinguer chez ce paramètre une réponse générale à une exposition à un ou des pesticides. En effet, de nombreux auteurs ont montré que l'atrazine pouvait induire soit une baisse de la densité cellulaire chez certaines espèces de diatomées, notamment des centrifuges, soit l'inverse chez d'autres espèces, principalement des diatomées pennées (Tang *et al.* 1997; Berard *et al.* 2001; Berard *et al.* 2004).

Pour les autres molécules testées, la réponse des communautés ou des populations fluctuent en fonction des substances actives testées. Dans le cas de la simetryne, si certains auteurs n'ont pas observé d'effets délétères sur des communautés phytoplanctoniques (Kasai *et al.* 1995), d'autres travaux ont fait apparaître, chez des communautés de diatomées, des réactions semblables à celles observées pour l'atrazine. La densité cellulaire d'une espèce pennée comme *Cocconeis placentula* (Ehrenberg) a augmenté en présence de simetryne alors que la densité totale du périphyton diminuait (Goldsborough *et al.* 1986). En ce qui concerne, l'isoproturon, même aux concentrations les plus faibles, Peres *et al.* (1996) ont montré que cet herbicide avait un effet marqué sur la densité cellulaire en diatomées benthiques (Peres *et al.* 1996).

5 La composition spécifique des communautés

Les effets des pesticides sur la croissance des algues ne sont pas nécessairement directs. Ils peuvent s'exprimer au travers d'une stimulation de la compétition spécifique au sein d'une communauté, certaines espèces tolérantes prenant l'avantage sur des espèces plus sensibles en se multipliant plus rapidement (Berard *et al.* 2003). Bérard et Pelte (1996) mentionnent que l'atrazine peut perturber physiologiquement certaines espèces, sans que cela soit visible, diminuant par la même leurs capacités de compétition au sein des communautés (Berard *et al.* 1996). Une exposition à un ou plusieurs toxiques peut donc conduire à une sélection des espèces les plus adaptées en rompant l'équilibre existant au sein des communautés.

a) Au sein des communautés de diatomées

Des différentes études conduites, il ressort, dans la majorité des cas, qu'une exposition à des herbicides altère la diversité des communautés de diatomées. Il a ainsi été montré que la diversité des communautés aquatiques, mais aussi terrestres, de diatomées diminuait suite à une exposition à de l'atrazine (10-90µg/L) (Hamala *et al.* 1985; Berard *et al.* 1996; Berard *et al.* 2004). L'isoproturon, un herbicide de la famille des urées substituées, a induit lui aussi une baisse de la diversité de communautés de diatomées exposées à des concentrations élevées de l'ordre de 40 à 160µg/L (Peres *et al.* 1996; Schmitt-Jansen *et al.* 2005). A l'inverse il a été observé, à des concentrations plus faibles (2µg/L), une augmentation de la diversité par rapport aux communautés témoins, certaines espèces minoritaires se développant au détriment d'autres espèces plus sensibles mais toujours présentes du fait des faibles niveaux d'exposition (Schmitt-Jansen *et al.* 2005).

- Les espèces eutrophes

Au sein des communautés de diatomées benthiques, les espèces préférant des milieux riches en nutriments (eutrophes) semblent plus tolérantes à une exposition à des herbicides. Des espèces caractéristiques de milieux pollués par des pollutions trophiques, comme *Gomphonema parvulum* Lange-Bertalot & Reichardt (GPAR), *Nitzschia palea* (Kutzing) W. Smith (NPAL), *Asterionella formosa* Hassall (AFOR), *Navicula lanceolata* (Agardh) Ehrenberg (NLAN), *Fragilaria capucina* Desmazieres var. *vaucheriae* (FCVA), *Synedra acus* Kutzing (SACU), *Achnanthes lanceolata* ssp. *frequentissima* (Breb.) (ALFR), *Achnanthes minutissima* Hustedt (AMIN) et *Cocconeis placentula* (Ehrenberg) (CPLA) ont été favorisées au sein des communautés de diatomées benthiques suite à une exposition à des herbicides de la famille des s-triazines (atrazine et Irgarol) dans des conditions contrôlées (microcosmes, cultures cellulaires) (Hamala *et al.* 1985; Goldsborough *et al.* 1986; Berard *et al.* 1996; Munoz *et al.* 2001; Berard *et al.* 2003) ou dans des conditions naturelles (Guasch *et al.* 1998; Berard *et al.* 2003). Des espèces comme ALFR et NPAL sont connues pour leur résistance à l'atrazine (Kosinski *et al.* 1984; Kasai 1999; Dorigo *et al.* 2004). Des observations semblables ont été réalisées chez des communautés de diatomées traitées avec de l'isoproturon. Certaines espèces tolérantes aux conditions eutrophes, principalement des navicules (*Navicula minima* Grunow (NMIN), *Navicula*

halophila (Grunow) Cleve (NHAL), *Navicula cryptocephala* Kutzing (NCRY)) mais aussi un gomphonema (GPAR), ont vu leur abondance augmenter dans des communautés exposées à cet herbicide (Peres *et al.* 1996; Schmitt-Jansen *et al.* 2005).

Mais les résultats concernant la sensibilité de certaines espèces dépendent largement de la toxicité des molécules impliquées. En effet, des diatomées sensibles à un herbicide de la famille des s-triazines, l'Irgarol, se sont avérées tolérantes à l'atrazine, moins toxique (Berard *et al.* 2003). Des résultats similaires ont été obtenus avec une substance active de la famille des urées substituées, le nicosulfuron, dont le potentiel inhibiteur vis-à-vis des diatomées pennées s'est révélé plus fort que celui de l'atrazine (Rimet *et al.* 1999).

- Les espèces de petite taille

Plusieurs études en conditions semi-contrôlées (microcosmes) ont aussi souligné qu'une exposition à un herbicide, comme l'atrazine ou l'isoproturon, favorisait le développement des petites espèces, notamment NMIN, *Sellaphora seminulum* SSEM et des achnanthes, *Achanthidium minutissimum* (ADMI), ALFR, AMIN, CPLA (Goldsborough *et al.* 1986; Peres *et al.* 1996; Munoz *et al.* 2001; Seguin *et al.* 2001; Schmitt-Jansen *et al.* 2005). La littérature scientifique mentionne que les petites espèces sont des espèces pionnières, les premières à coloniser les substrats (Korte *et al.* 1983; Sekar *et al.* 2004). La stratégie de ces espèces « opportunistes » pour survivre s'appuierait sur taux élevé de multiplication leur permettant de croître plus rapidement et de coloniser précocement les substrats même dans des conditions peu favorables (Goldsborough *et al.* 1986; Peres *et al.* 1996). Dans des conditions de forte pollution toxique, ces espèces seraient alors les seules à maintenir un taux de reproduction suffisant pour continuer à croître. Mais le schéma d'une colonisation primaire des substrats par de petites espèces plutôt que par des grandes espèces, dans des milieux non pollués, est discuté dans la communauté scientifique (Acs *et al.* 1993). Une autre explication avancée par Rijstenbil *et al.* (2001) serait que les petites espèces présentent des concentrations en gammaglutamylcysteinyl-glycine (GSH), une molécule anti-oxydante¹, 5 à 10 fois supérieures comparées aux grandes espèces (Rijstenbil 2001). Mais selon Tang *et al.* (1998) la sensibilité des algues à des herbicides comme l'atrazine est à relier à leur capacité de bioconcentration. Plus leur biovolume est élevé, plus elles seraient susceptibles d'accumuler cet herbicide (Tang *et al.* 1998). Mais pour Lockert *et al.* (2007), la relation entre volume cellulaire et sensibilité à l'atrazine n'est pas significative (Lockert *et al.* 2006). Ces propos semblent confirmés par une remarque de Tang *et al.* (1998) qui ont étudié une espèce de petite taille, *Synedra radians* Kutz. (SRAD), sensible à l'atrazine (Tang *et al.* 1998).

¹ La GSH est principalement impliquée dans les voies de détoxification des cellules. Cette molécule se conjugue avec les composés toxiques afin de les excréter hors de la cellule ou de les stocker dans la vacuole pour les cellules végétales. Elle peut aussi participer aux cycles d'oxydo-réduction de la cellule et ainsi jouer un rôle anti-oxydant.

- Les espèces hétérotrophes et autotrophes

Certains auteurs ont remarqué que des espèces N-hétérotrophes, comme NHAL ou NMIN étaient tolérantes à des expositions à des herbicides inhibiteurs de la photosynthèse (simazine, terbutryne et isoproturon) (Goldsborough *et al.* 1986; Peres *et al.* 1996). Les diatomées seraient donc capables d'entretenir deux voies métaboliques en parallèle et de passer de l'une à l'autre en fonction des conditions du milieu. La littérature scientifique explique la survie de certaines diatomées pennées dans des conditions défavorables à leur développement (obscurité, pollution organique) par ce type de mécanismes (HELLEBUST *et al.* 1977). Par conséquent, en cas d'inhibition de la photosynthèse par un herbicide, certaines espèces de diatomées seraient en mesure de survivre de la même manière que dans les milieux présentant une faible luminosité. Ceci expliquerait leur relative tolérance à des herbicides inhibiteurs du photosystème II (Hamilton *et al.* 1988).

b) Au sein des communautés algales

- La diversité

Les résultats concernant les effets des pesticides sur la diversité des communautés algales sont relativement contrastés. Certains auteurs rapportent une diminution de la diversité au sein des communautés algales exposées à l'atrazine (Berard *et al.* 1996). Mais dans le cas d'expositions brèves, Jurgensen et Hoagland (1990) n'ont pas détecté d'effets sur des communautés d'algues périphytiques (Jurgensen *et al.* 1990). De la même manière, une exposition à un mélange d'atrazine et de nicosulfuron, à des concentrations proches de celle relevées sur le terrain (2 et 30µg/L), n'a pas permis de mettre en évidence un effet sur la composition en espèces du périphyton (Seguin *et al.* 2001). En outre, à de faibles concentrations, la diversité peut même s'accroître, les herbicides réorganisant la structure des communautés en favorisant certaines espèces sans éliminer les espèces initiales (Schmitt-Jansen *et al.* 2005).

- Les différentes espèces algales

De nombreux travaux ont souligné l'effet de molécules, comme l'atrazine, sur la structure et la composition en espèces des communautés algales. Berard et Benninghoff (2001) ont ainsi montré qu'une exposition à une concentration de 10µg/L d'atrazine restructurait les communautés algales (Berard *et al.* 2001). Toutes les algues ne présentent pas la même sensibilité à cet herbicide. Plusieurs études, conduites sur des communautés périphytiques, ont mis en évidence une évolution de la composition des communautés algales en faveur des diatomées (Goldsborough *et al.* 1986; Guasch *et al.* 1997; Guasch *et al.* 1998). Ces micro-algues sont, en effet, plus tolérantes aux inhibiteurs du photosystème II (Kosinski *et al.* 1984; Gurney *et al.* 1989; Molander *et al.* 1992; Hoagland *et al.* 1993; Kasai 1999). De nombreuses publications rapportent que les algues vertes (chlorophyceae et chrysophyceae) et les cyanobactéries seraient entre 4 et 10 fois plus sensibles que les diatomées à ce type de molécule (Hoagland *et al.* 1993; Tang *et al.* 1997; Guasch *et al.* 1998; Guasch *et al.* 1998; Navarro *et al.* 2002; Lockert *et al.* 2006). Des observations similaires ont été faites sur des communautés phytoplanctoniques exposées sur le long terme à du métazachlore (Mohr *et al.*

In press). Des communautés algales naturelles dominées par les diatomées se sont montrées aussi plus tolérantes à une exposition à court terme à de l'atrazine et de l'isoproturon (Dorigo *et al.* 2004). L'effet d'un ou plusieurs herbicides dépend donc de la composition des communautés algales lors de leur exposition (Herman *et al.* 1986). La tolérance des diatomées serait à mettre en relation, soit avec la capacité métabolique de certaines espèces de passer en mode hétérotrophe, soit avec la composition en pigments des diatomées (Plumley *et al.* 1980; Hamilton *et al.* 1988; Peres *et al.* 1996). En effet, les diatomées se distinguent des autres algues par les pigments qu'elles contiennent, notamment les caroténoïdes et les xanthophylles. Or plusieurs auteurs ont signalé que ces pigments présentaient des propriétés anti-oxydantes qui confèrent aux cellules une certaine tolérance à un possible stress oxydatif engendré par les pesticides (Rijstenbil *et al.* 1994; Pinto *et al.* 2003).

E./ Les facteurs interférant dans la réponse des diatomées aux pesticides et la détection des effets

La réponse des algues, et des diatomées en particulier, aux pesticides n'est pas uniforme. En effet, de nombreux paramètres écologiques ou environnementaux peuvent interférer dans le degré de réaction de ces micro-organismes, voire même masquer leurs réponses.

1 Les paramètres écologiques

Les interférences au sein des communautés algales, l'action des autres compartiments aquatiques et le comportement des diatomées peuvent affecter la réponse de ces micro-algues aux pesticides.

a) La compétition spécifique

Dans des milieux non-contaminés, les différentes espèces d'une communauté vivent en équilibre. Dans le cas des diatomées, les cellules sont capables de sécréter des médiateurs chimiques, comme l'aldéhyde 2-Trans, 4-Trans-Decadienal, qui leur permettent de réguler leur croissance entre elles (Casotti *et al.* 2005). Les espèces étudiées isolément ou au sein de communautés ne présentent donc pas les mêmes réactions aux pesticides (De Noyelles *et al.* 1982; Badr *et al.* 1997; Peterson *et al.* 1997). La compétition et les relations d'inter-dépendance entre les différentes espèces influent donc largement sur la réponse des algues. Les compétiteurs les plus opportunistes, comme CPLA, sont largement avantagés dans des conditions défavorables au développement d'espèces plus sensibles (Goldsborough *et al.* 1986).

De ce fait, les paramètres structurels globaux (biomasse, densité globale) sont moins sensibles aux pesticides que les paramètres structuraux plus spécifiques (densité par espèces, composition spécifique). En effet dans certains cas, des espèces tolérantes peuvent remplacer les espèces les plus sensibles sans que les paramètres structuraux globaux ou les paramètres fonctionnels (activité photosynthétique, production primaire) ne le détectent (Dahl *et al.* 1996).

b) Le biofilm

Parmi les diatomées, certaines espèces vivent fixées à différents types de substrats. Ces diatomées benthiques évoluent au sein d'une matrice biologique complexe, le biofilm, composée de bactéries, de champignons et de matières organiques amorphes, dont une partie est sécrétée par ces organismes sous la forme de polysaccharides extracellulaires. Ces substances constituent une matrice de protection qui protège en partie les algues contre les effets des pesticides (Peres *et al.* 1996). La dynamique de colonisation des substrats et le degré de développement du biofilm ont ainsi un impact sur la réponse des communautés de diatomées benthiques à une exposition par des composés toxiques comme l'atrazine (Guasch *et al.* 1997).

c) Le broutage

Le biofilm représente une source de nourriture importante pour un grand nombre d'organismes brouteurs (macro-invertébrés, poissons). L'action de ces organismes benthophages modifie profondément la structure du biofilm, altérant par la même la couche protectrice que représente, pour les cellules, les exopolysaccharides. Le broutage affecte aussi la structure des cellules, favorisant par la même l'effet des toxiques (Munoz *et al.* 2001). Mais le rôle de ces organismes brouteurs dans l'apparition d'altérations chez les algues, suite à une exposition par des pesticides, est difficile à évaluer en conditions naturelles.

d) Les mécanismes de survie

Dans le cas des diatomées planctoniques, Rijstenbil *et al.* (1994) rapportent l'existence de mécanismes de plongée des cellules pour échapper à un environnement toxique chez une espèce de diatomée marine (Rijstenbil *et al.* 1994).

2 Les paramètres environnementaux

Les facteurs environnementaux (luminosité, courant, concentration en nutriments,...) déterminent très largement les effets des pesticides sur les communautés algales (Guasch *et al.* 1997; Guasch *et al.* 1998; Berard *et al.* 2001; Navarro *et al.* 2002).

a) La luminosité

Plusieurs travaux scientifiques ont montré que les diatomées étaient plus sensibles à l'atrazine en cas de forte exposition lumineuse (Guasch *et al.* 1997; Guasch *et al.* 1998). Dans des conditions naturelles, où la luminosité varie fortement d'un point à l'autre, il s'avère donc difficile de comparer les réponses fournies par des communautés de stations différentes exposées à des pesticides. A la fin du printemps et au début de l'été, le développement de la végétation des ripisylves peut potentiellement atténuer les effets des pesticides sur les diatomées. Navarro *et al.* (2002) ont ainsi montré que la tolérance à l'atrazine de communautés périphtiques était plus faible au printemps qu'en été. Des résultats inverses ont été obtenus chez des communautés phytoplanctoniques exposées elles aussi à de l'atrazine (Berard *et al.* 1996). Le facteur saisonnier joue donc un rôle important dans la réponse des algues.

b) Les nutriments

La disponibilité en nutriments a un impact marqué sur le développement des algues. En effet, elle influe sur l'état physiologique des individus, sur le niveau de développement du biofilm dans le cas des espèces périphtiques et sur la composition en espèces des communautés. Par conséquent, les effets des pesticides sur les algues et sur les communautés varient en fonction des niveaux de concentration en nutriments dans le milieu. Il a ainsi été montré que des carences en azote et phosphore pouvaient augmenter la sensibilité des algues (Lin *et al.* 2005). Dans des conditions naturelles, les variations spatiales et temporelles des concentrations en nutriments doivent donc

affecter la sensibilité des algues aux toxiques, particulièrement dans le cas de cours d'eau drainant des bassins versants agricoles. (Berard *et al.* 2001; Navarro *et al.* 2002). Les effets des pesticides sont, par conséquent, plus difficiles à relever dans ce type de milieu, les pollutions par les pesticides étant concomitantes de fortes pollutions par les nitrates et les phosphates.

c) *Les conditions hydrauliques*

Le développement des communautés de diatomées benthiques est largement dépendant des conditions hydrauliques (Ghosh *et al.* 1998). L'effet abrasif de courants élevés contribue à limiter le développement des communautés et du biofilm, et à sélectionner les espèces les plus rhéophiles. Les conditions hydrauliques influencent donc indirectement les réponses des diatomées aux pesticides en modelant la structure des communautés et en limitant le développement de la matrice protectrice que représente le biofilm. Les crues sont à ce titre des épisodes hydrauliques très intéressants. Elles abrasent une partie des communautés de diatomées, sélectionnant par la même les espèces, et concentrent les pics de concentration en pesticides dans les milieux naturels. Or la réponse des communautés algales ne dépend pas uniquement des concentrations mais aussi de la durée d'exposition et des espèces présentes (Jurgensen *et al.* 1990; Tang *et al.* 1998).

d) *Les interactions entre molécules toxiques*

La pollution par les pesticides des milieux aquatiques naturels est caractérisée par le grand nombre de molécules (substances actives mères, métabolites, substances connexes comme les adjuvants présents dans les formulations commerciales) présentes dans les eaux. Dans les cours d'eau, les molécules peuvent interagir entre elles et induire des effets (synergie, antagonisme, effets combinés) différents de la simple somme des effets qu'elles induisent séparément (Hoagland *et al.* 1993; Carder *et al.* 1998; Lagadic *et al.* 1998). Hoagland *et al.* (1993) rapportent ainsi que les effets combinés de deux molécules chimiques toxiques, le Poly-Chloro-Biphényl (PCB) et le p,p-dichloro-diphényl-dichloroéthylène (DDE) produit de dégradation du DDT, sur une diatomées marine, sont plus qu'additifs. A l'inverse, dans le cas du bifenthrin, un insecticide de la famille des pyréthriinoïdes, et de l'atrazine, les effets d'un des deux pesticides ne sont significatifs qu'en l'absence de l'autre molécule (Hoagland *et al.* 1993). Les effets d'une pollution globale par des pesticides sont donc difficiles à évaluer.

Bilan

La réponse des algues, et des diatomées en particulier, est largement fonction de l'état physiologique des individus et des communautés, de la nature des interactions écologiques qui peuvent intervenir avec les autres composantes de l'écosystème et des conditions environnementales. La nature des pigments qu'elles contiennent et le niveau de développement de la matrice biologique dans laquelle se développent les communautés expliquent, aussi, les différences de sensibilité observées que ce soit entre les espèces de diatomées ou entre les algues. La composition en espèces influence donc la réponse des communautés à une exposition par des toxiques. Par ailleurs, les interactions entre certains organismes benthophages et les communautés de diatomées benthiques peuvent avoir un impact sur la nocivité des pesticides vis à vis de ces micro-algues. L'exposition lumineuse, les niveaux de trophie interfèrent, aussi, dans la réponse des algues aux pesticides. De même, les conditions hydrauliques jouent un rôle important dans la nature et l'intensité de l'exposition des communautés aux pesticides. Par conséquent la complexité des écosystèmes aquatiques et la nature même de la pollution par les pesticides (un grand nombre de molécules interagissant entre elles) ne permettent pas une détection aisée des effets de ce type de polluants chez les diatomées benthiques.

Partie II.: Caractérisation de l'impact des pesticides chez les diatomées benthiques de l'échelle des communautés à celle de la cellule

Introduction

Dans ce contexte global de dégradation de la qualité des eaux et d'inadaptation des indices biologiques « diatomées » à la détection des pollutions par les pesticides, ce travail de thèse a donc pour objectif d'identifier, en conditions naturelles et en conditions contrôlées, des paramètres sensibles à ces composés toxiques et de comprendre les mécanismes impliqués dans la réponse des organismes.

La démarche scientifique de ce travail de thèse a suivi une approche décrite dans le schéma suivant (Figure 24).

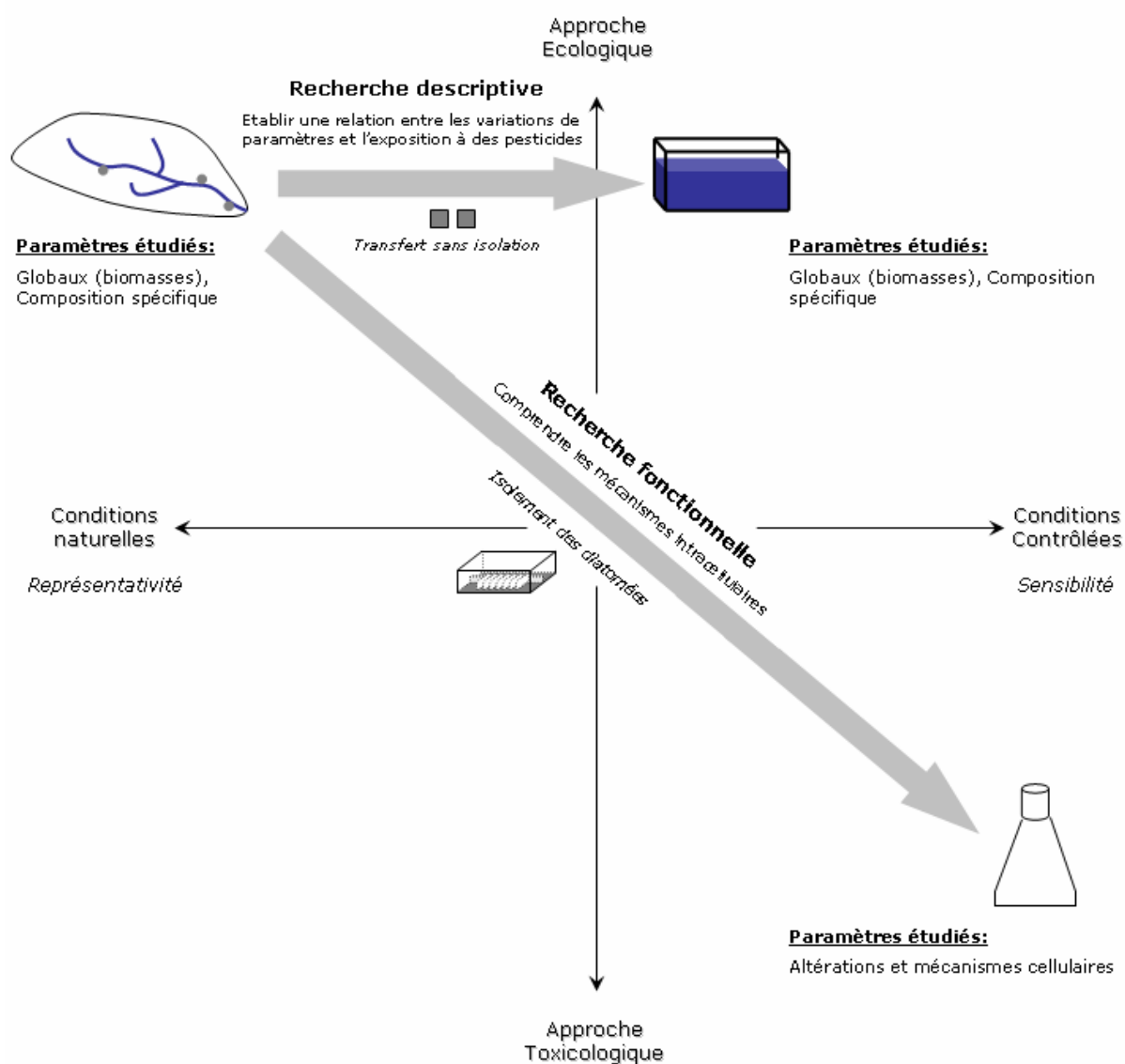


Figure 24 : Représentation schématique de la démarche scientifique suivie au cours du travail de thèse

Cela nous a conduits, dans un premier temps, à étudier les variations au sein de communautés de diatomées benthiques exposées, dans des conditions naturelles, à des pollutions agricoles trophiques

(fertilisants) et toxiques (pesticides). L'objectif de cette première étape était de sélectionner des paramètres potentiellement sensibles aux pesticides et représentatifs des réactions des communautés algales dans le milieu naturel.

A partir des observations réalisées sur le terrain, nous avons cherché, dans un deuxième temps, à confirmer la sensibilité de certains paramètres à l'aide de communautés naturelles transférées dans des microcosmes en conditions semi-contrôlées. L'intérêt de ce genre de dispositif est de limiter la variabilité des paramètres abiotiques pouvant interférer dans la réponse des algues et, ainsi, de mieux évaluer la sensibilité des paramètres étudiés.

Cette recherche descriptive des effets des pollutions par les pesticides sur les communautés de diatomées benthiques s'est accompagnée d'une recherche fonctionnelle dans le but de comprendre les mécanismes cellulaires impliqués dans la réponse de ces micro-algues. Les altérations induites par un herbicide ont été étudiées sur des cellules de diatomées issues de communautés prélevées dans le milieu naturel, isolées du biofilm et maintenues en culture. Ce type de culture permet d'étudier les effets cellulaires de ce toxique sur différentes espèces évoluant dans le même milieu. Les conditions très contrôlées de la culture cellulaire nous ont permis de nous affranchir des effets des paramètres abiotiques et, ainsi, de sélectionner des paramètres sensibles à ce type d'agent toxique.

Cette partie du mémoire détaillera les protocoles mis en œuvre, présentera et discutera les résultats obtenus en suivant la démarche scientifique de ce travail. Les résultats obtenus en conditions non contrôlées seront exposés dans un premier temps, puis confrontés aux résultats obtenus à partir des microcosmes en conditions semi-contrôlées et des cultures cellulaires en conditions contrôlées.

Chapitre I.: Identification à l'échelle de la communauté, de paramètres sensibles chez les diatomées benthiques aux pesticides agricoles en conditions naturelles

Les indices biologiques « diatomées » classiques sont couramment utilisés pour estimer la qualité des eaux dans les milieux naturels. Mais ces outils ne se sont pas adaptés à la détection des pollutions dues aux pesticides et peu d'études ont été réalisées quant à leur sensibilité vis-à-vis de ces pollutions (Aubertot *et al.* 2005). La première étape du travail de thèse nous a conduits à rechercher au sein de communautés de diatomées benthiques, évoluant dans des cours d'eau pollués par des pesticides, des paramètres sensibles à ce type de pollution. Cette expérimentation a été conduite *in situ* afin d'obtenir des résultats représentatifs des conditions naturelles qui puissent être utilisés *in fine* pour proposer des perspectives d'adaptation ou d'amélioration des indices biologiques « diatomées », dans le but de détecter les pollutions dues aux pesticides dans les milieux aquatiques naturels. Deux campagnes printanières de prélèvements ont été menées en 2005 et 2006 sur un ensemble de stations localisées sur des cours d'eau drainant une région très agricole, les coteaux de Gascogne. Des prélèvements de biofilms ont été réalisés à chaque station sur des substrats artificiels immergés ainsi que sur des substrats naturels. En parallèle, l'état du milieu d'un point de vue trophique et toxique a été caractérisé.

Cette première phase du travail de recherche avait pour objectif d'étudier la nature et l'évolution des pollutions d'origine agricole dans les cours d'eau afin d'identifier, au sein du biofilms et du périphyton, des paramètres potentiellement sensibles à une exposition aux pesticides dans des conditions naturelles.

Nous avons, donc, choisi dans un premier temps de caractériser la zone d'étude pour décrire, par la suite, la méthodologie mise en œuvre et présenter, dans une troisième partie, les différents résultats obtenus. Nous nous attacherons donc dans une dernière partie à discuter ces résultats par rapport aux données bibliographiques disponibles et à étudier leur pertinence au regard des objectifs initiaux de l'étude.

A./ Description du site d'étude

1 Géologie et hydromorphologie

La zone d'étude des coteaux de Gascogne se situe à cheval sur trois départements, la Haute-Garonne (31), le Gers (32) et les Hautes-Pyrénées (65), entre Toulouse, Auch et Lannemezan. Elle est adossée, au sud, au plateau de Lannemezan (alt. 600m) constitué, au tertiaire, par des dépôts successifs de formations mollassiques arrachées au Pyrénées (Enjalbert 1960; Colin 2000). Le cône de déjection de ce plateau est entaillé de rivières (Baïse, Gers, Save) qui irradiant sur toute la zone des coteaux de Gascogne, formant des vallées étroites orientées nord-sud. Sur la partie amont des cours d'eau, le profil des vallées est nettement dissymétrique avec, sur la rive gauche, des terrasses cultivées à faibles pentes et, sur la rive droite, des coteaux à fortes pentes (3 à 15%), couverts de

forêts et de landes (Enjalbert 1960). En certains endroits les pentes peuvent dépasser les 30% (Morschel *et al.* 2004). Plus en aval, une fois dépassé les dernières digitations du plateau de Lannemezan, ces vallées s'élargissent recouvrant des formations de molasses remaniées.

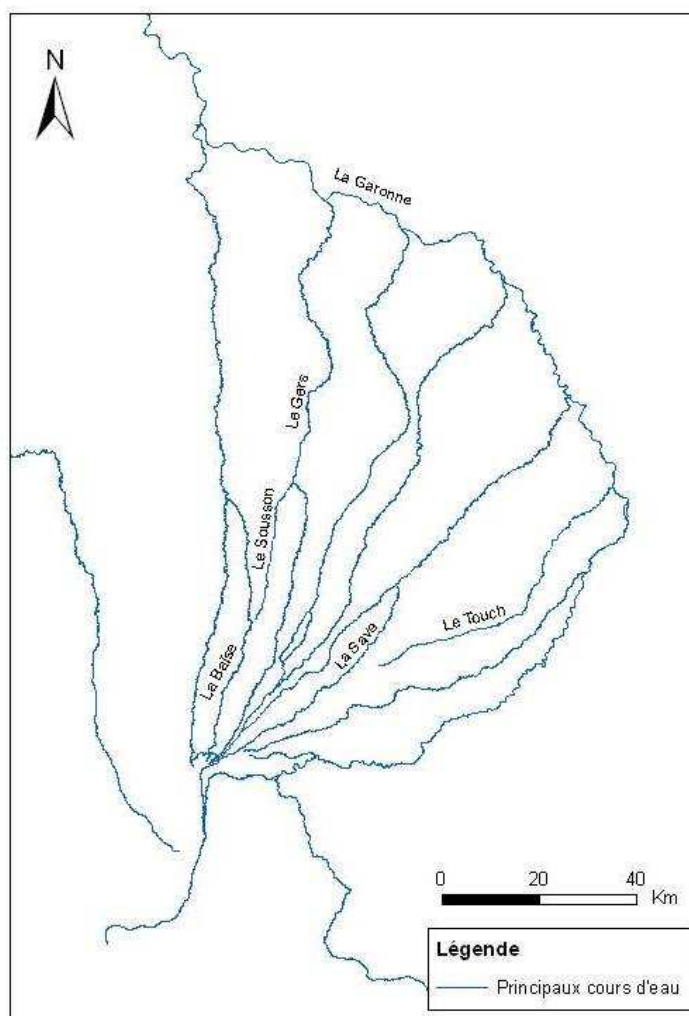


Figure 25 : Réseau hydrographique des coteaux de Gascogne
(Source : K. PETIT, ADBX-Cemagref Bordeaux 2007)

Quelques cours d'eau prennent leur source sur les coteaux, alimentant les principales rivières de la zone (Figure 25). A l'est, la zone d'étude englobe une partie de la plaine alluviale de la Garonne et les cours d'eau qui la drainent, notamment le Touch, qui prend sa source au nord du plateau de Lannemezan.

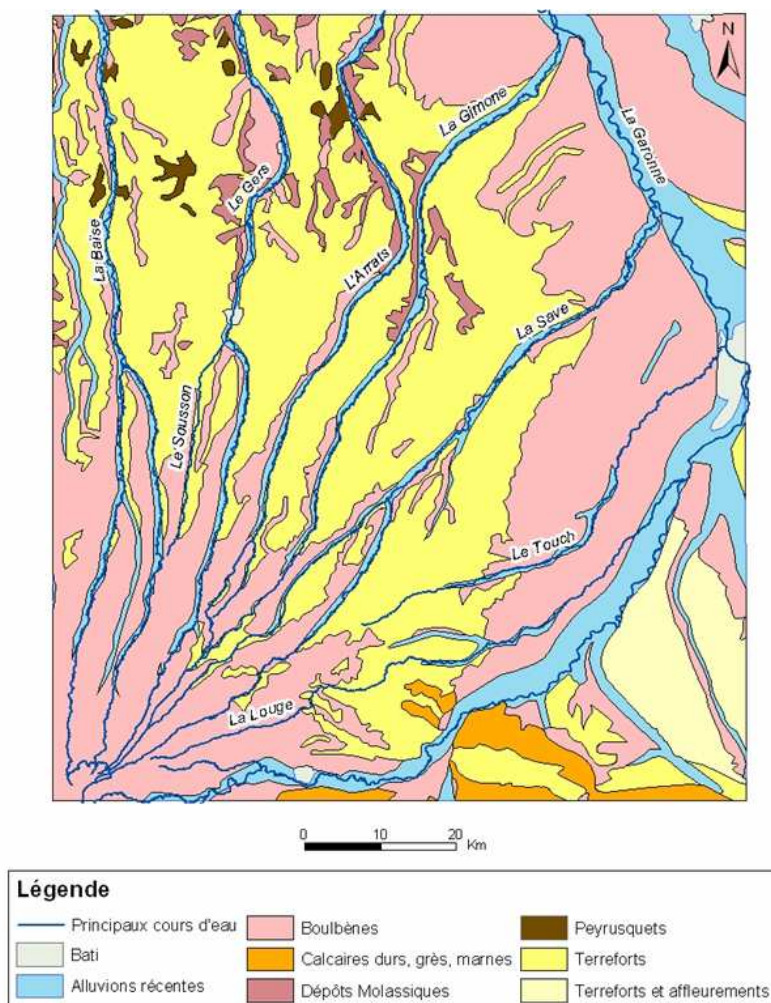
2 Climatologie

D'un point de vue climatique, cette région subit des influences méditerranéennes, océaniques et, dans une moindre mesure, montagnardes pour sa partie méridionale. La pluviométrie oscille entre 600 et 750 mm avec des épisodes orageux violents, principalement aux printemps (Colin 2000; Morschel *et al.* 2004). Conjugués à la faible perméabilité de certains sols (notamment les boubènes) et aux fortes

pentés, ces orages peuvent être à l'origine de réactions rapides et importantes des cours d'eau (ARROUAYS *et al.* 1990).

3 Unités pédo-paysagères

A l'ouest, dans la partie Gersoise de la zone d'étude, on peut distinguer deux grands ensembles pédo-paysagers (Figure 26).



Légende simplifiée à partir de la carte pédologique au 1/80000 de la CACG et des données pédologique de la CRAMP

Figure 26: Carte pédologique simplifiée de la zone des coteaux de Gascogne (Source : M. BALESTRAT, N. de la Ville d'AVRAY, K. PETIT, ADBX-Cemagref Bordeaux 2007)

Les coteaux molassiques sur la rive droite des cours d'eau sont constitués pour l'essentiel de sols argilo calcaires, appelés « terreforts ». Ces sols sont issus de l'altération de la molasse, leur couleur ocre étant issue de l'oxydation du fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}). Les terreforts sont, comme leur nom l'indique, des sols lourds, particulièrement en saison humide, caractérisés par l'abondance (40 à 45%) des éléments fins (limons) et la forte proportion d'argile et de calcaire (Enjalbert 1960).

Les terrasses et les glacis, sur les longues pentes douces de la rive gauche, comprennent de sols communément appelés « boubènes ». Ces sols bruns, limoneux voire argilo-limoneux et battant, sont issus du lessivage des terreforts, le calcaire ayant totalement disparu. Sur le haut de ces pentes douces, on trouve des boubènes superficielles composées d'une fine couche de limon recouvrant des couches argileuses et des cailloux. Sur la partie inférieure, l'érosion a conduit à l'accumulation de limons et, par conséquent, à la formation de boubènes plus profonds (Enjalbert 1960; Penalver *et al.*).

A l'est, la zone d'étude est caractérisée par un enchaînement de **terrasses** (haute, moyenne et basse) jusque dans la plaine alluviale de la Garonne. Dans les trois cas, les boubènes, qui se caractérisent par de fortes variations de leur teneur en eau (sols hydromorphes), dominent. De la même manière que dans la partie Gersoise de la zone d'étude, l'épaisseur de la couche de limon augmente des hautes (boubènes superficiels) vers les basses terrasses (boubènes profonds) où les sols s'imperméabilisent. Au niveau des moyennes terrasses, l'écoulement des eaux est principalement superficiel, l'infiltration verticale étant limitée (Enjalbert 1960; ARROUAYS *et al.* 1990; BEGON 1990).

4 Occupation des sols

a) Place de l'agriculture en Midi Pyrénées

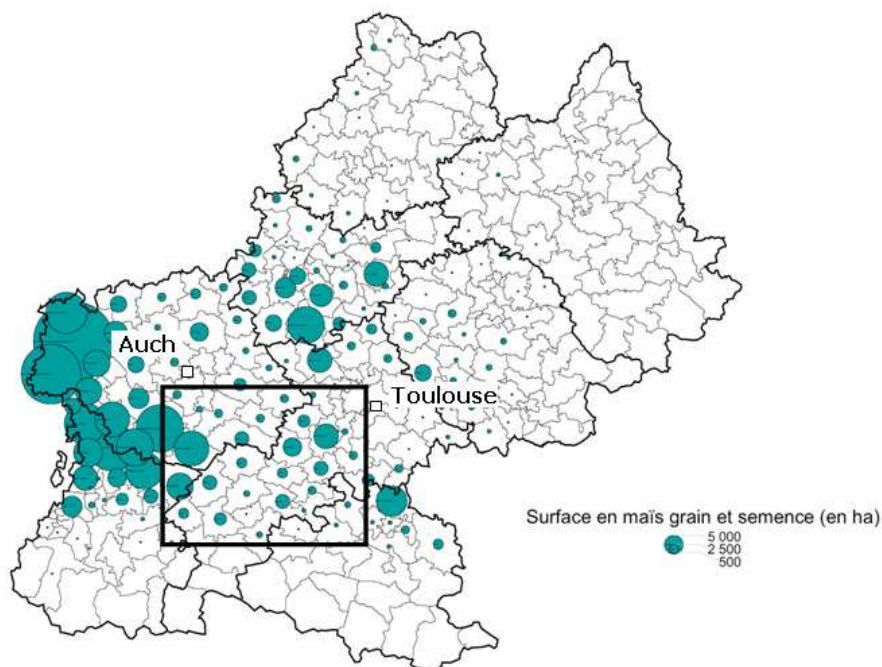
La région Midi-Pyrénées demeure une des principales régions agricoles françaises (7^{ème} rang), la surface agricole utile (SAU) recouvrant environ 51% de sa surface totale (DRAF Midi-Pyrénées 2007). La population active agricole représente encore 5,9% de la population active totale contre 3% au plan national (Recensement Agricole 2000). Mais de fortes disparités existent entre les différents départements. Nous nous intéresserons ici aux deux principaux départements de notre zone d'étude, le Gers et la Haute Garonne.

Situé à l'ouest de Toulouse, le Gers est le premier département agricole de Midi-Pyrénées et un des plus ruraux de France avec une SAU occupant plus de 73% de la surface totale. La population active agricole représente encore 18% de la population active totale (AGRESTE 2003; DRAF Midi-Pyrénées 2007). L'agriculture y est très diversifiée avec une dominante de productions végétales. Le Gers concentre, à lui seul, les plus grandes surfaces de maïs, de blé, de tournesol et de colza de toute la région. Les cultures de blé et de tournesol occupent la partie nord-est alors que la culture du maïs, en très grande majorité irriguée, se concentre à l'ouest et au sud ouest (AGRESTE 2003).

Le département de la Haute-Garonne peut être, de manière très simplifiée, divisé en trois zones : les massifs montagneux et les piémonts au sud, les plaines agricoles de la Garonne et de l'Ariège, et l'agglomération Toulousaine. L'activité agricole est, dans ce département, plus réduite (2% de la population active), principalement concentrée au sud de Toulouse dans les vallées de la Garonne et de l'Ariège, la SAU du département occupant environ 58% de la surface totale (AGRESTE 2000; INSEE Midi-Pyrénées 2002). Elle est le fait de grandes cultures de tournesol, de céréales, et de maïs irrigué.

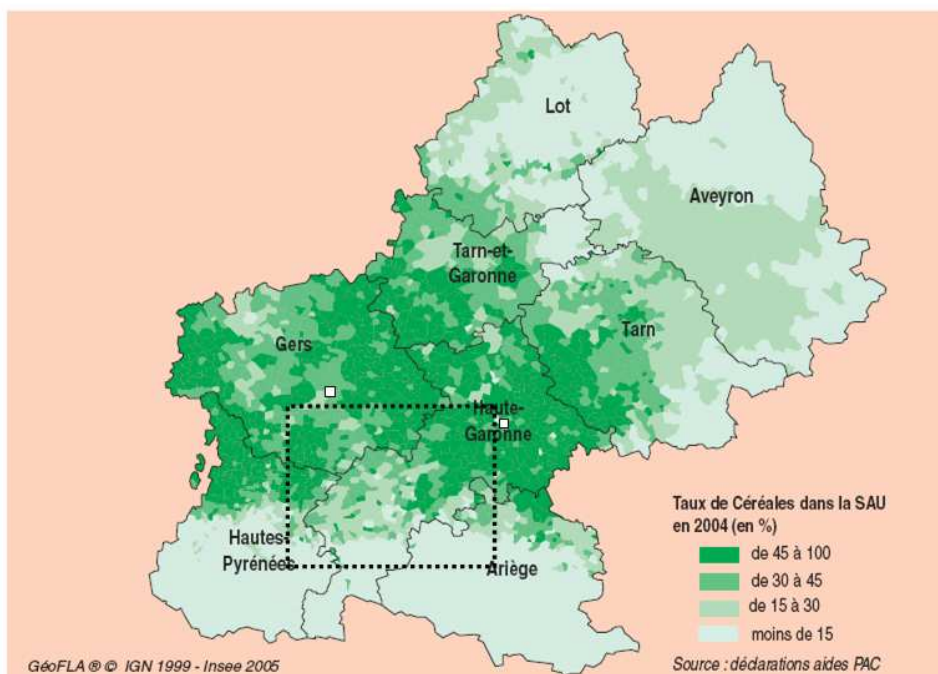
b) Les différentes cultures

Comme nous l'avons vu précédemment les cultures végétales couvrent majoritairement les zones de plaine de la Garonne et les reliefs plus vallonnés du département du Gers.



Source: AGRESTE Midi-Pyrénées Recensement agricole 2000

Figure 27 : Les surfaces cultivées de maïs par canton sur la zone d'étude (rectangle) et pour la région Midi-Pyrénées



Source: INSEE Tableaux économiques de Midi-Pyrénées 2006

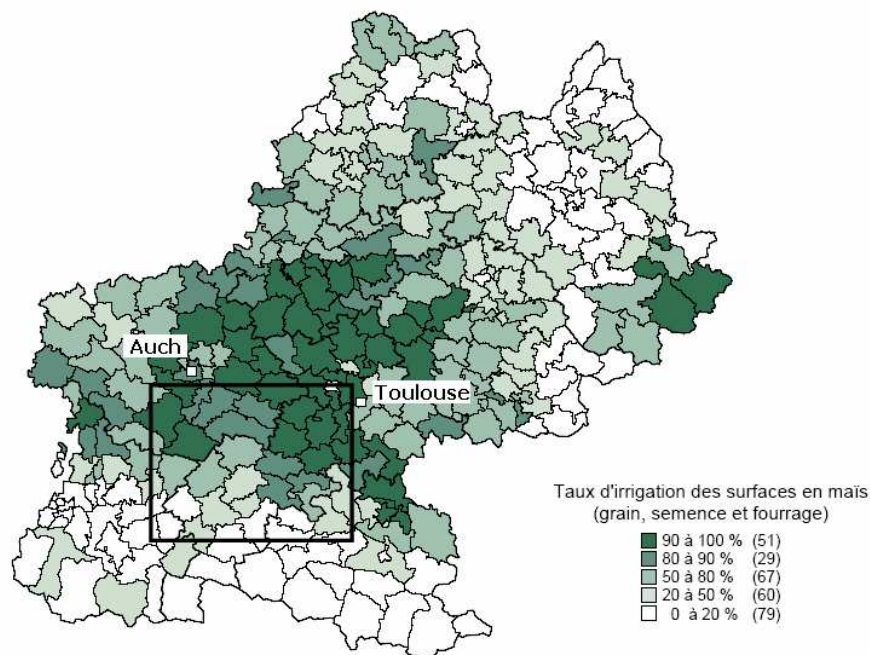
Figure 28 : Carte de la culture des céréales (céréales à paille et maïs) pour la région Midi-Pyrénées en 2004

Dans le cas de notre zone d'étude (Auch-Toulouse-Lannemezan), il apparaît que dans sa partie ouest (sud d'Auch) le maïs irrigué prédomine sur les pentes douces des vallées (Figure 27). Dès que les vallées s'élargissent au nord, et se rapprochent de Toulouse, les cultures se diversifient avec l'implantation de céréales et d'oléagineux (Isle Jourdain, Rieumes) (AGRESTE 2000; AGRESTE 2000). Mais la culture du maïs demeure, sur ces zones, encore très importante.

Au sud, à la limite avec le plateau de Lannemezan, la surface agricole utile occupée par les grandes cultures diminue, les prairies et l'élevage occupant encore une place non négligeable (Boulogne sur Gesse, Aurillac) (AGRESTE 2000) (Figure 28). Le taux de boisement de la zone étudiée est très faible (20%) au regard du taux moyen pour tout le bassin de la Garonne (30%) (Dermont 2002).

c) Le poids de l'irrigation

La culture du maïs a connu, dans le grand sud ouest, un développement considérable au cours des dernières décennies. Or l'implantation de ce type de culture nécessite des apports en eau importants. Entre 1988 et 2000, les surfaces irriguées ont ainsi cru de 20 à 30% dans le département de la Haute-Garonne (Dermont 2002).



Source: AGRESTE Midi-Pyrénées Recensement agricole 2000

Figure 29 : L'irrigation du maïs en Midi-Pyrénées

Dans notre zone d'étude, excepté au sud, où la polyculture se maintient, la culture du maïs est presque exclusivement irriguée (Figure 29). En Midi-Pyrénées, le maïs concentre les deux tiers des surfaces irriguées. A eux deux, le colza et les protéagineux ne représentent que 18% (TEYSSIER 2006). Les campagnes d'Aquitaine et de Midi-Pyrénées ont donc vu se développer des infrastructures, relativement lourdes (réseaux, pivots d'irrigation fixes) pour assurer l'approvisionnement en eau. Dans le cas des coteaux de Gascogne, l'irrigation des cultures a nécessité la mise en place de tout un réseau de canaux et de canalisations, pour contourner l'obstacle que représente le plateau de Lannemezan, et acheminer de l'eau provenant des Pyrénées dans cette région dépourvue de nappes aquifères importantes.

5 Ressources en eau

Le réseau hydrographique des coteaux de Gascogne est constitué de rivières « en arrête de poisson » prenant leur source sur le plateau de Lannemezan (Figure 25) (Colin 2000). Le cône de déjection de ce plateau prive les rivières des coteaux de Gascogne des ressources en eau des Pyrénées. Or les ressources souterraines sont limitées dans cette région. En l'absence de couches géologiques imperméables de taille suffisante, aucune nappe phréatique de grande taille n'est répertoriée. La ressource en eau dans cette région est, par conséquent, essentiellement superficielle, tant pour l'irrigation que pour l'approvisionnement en eau potable (Agence de l'eau Adour-Garonne *et al.* 2003). Par conséquent la pression sur la ressource, en terme de qualité comme de quantité, est relativement importante. Dès la fin du XIX^{ème} siècle, un canal a été construit pour acheminer de l'eau prélevée dans un affluent de la Garonne, la Neste, afin d'alimenter en période d'étiage les cours d'eau Gascons (Baïse, Gers, Save, Lounge, Gimone, Arrats, Osse et Boues) prenant leur source sur le plateau de Lannemezan. Pour répondre aux besoins d'une agriculture en plein développement, des lacs de montagne ont été adjoints au réseau dans les années 50. L'eau est ainsi acheminée par des canaux et par des canalisations jusqu'à des stations d'exhaure qui réalimentent les petits cours d'eau de la zone. Un ensemble de pompes et de retenues sur tout le réseau hydrographique gascon permet d'optimiser au mieux la gestion de l'eau en récupérant une partie de la ressource non utilisée pour la remonter en tête de bassin. Des retenues collinaires parsèment aussi la région et fournissent une part non négligeable de l'eau consommée sur la zone (Colin 2000; Mission Interservice de l'Eau MISE 2004). Ce soutien d'étiage peut donc contribuer éventuellement à diluer les pollutions. Dans le cas des pesticides, comme nous l'avons vu précédemment, les pics de pollutions ont lieu durant les crues, périodes durant lesquelles les retenues reconstituent leurs stocks. Par conséquent, la dilution, liée aux apports en eau des retenues, des pollutions dues à ces composés toxiques doit être relativement limitée.

B./ Matériels et Méthodologie de terrain

La première étape du travail de thèse a consisté à suivre, au printemps durant les principales périodes d'épandage des pesticides, les évolutions des populations de diatomées benthiques prélevées sur des cours d'eau des coteaux de Gascogne. Nous décrivons donc dans cette partie, les caractéristiques de chacune des 18 stations sélectionnées pour détailler ensuite le dispositif de prélèvement mis en place et, enfin, expliquer les protocoles mis en œuvre et les paramètres mesurés.

1 Les stations et les bassins versants étudiés

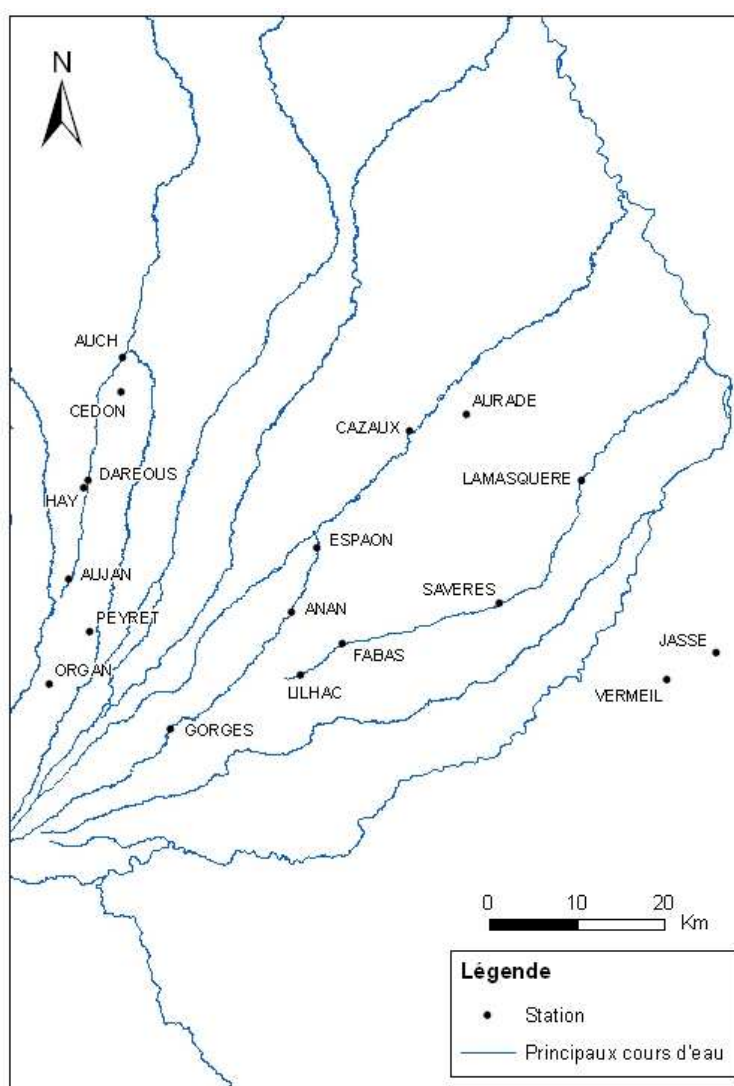


Figure 30 : Carte du réseau de stations suivies en 2005 et 2006 sur les cours d'eau des coteaux de Gascogne (Source : K. PETIT, ADBX-Cemagref Bordeaux 2007)

Le réseau de stations étudiées en 2005 et 2006 comprend 18 stations (Figure 30).

- × 11 stations réparties entre trois continuums (3 stations sur le Sousson, 4 stations pour chacun des deux autres continuums : la Save et le Touch), afin d'étudier l'impact d'un accroissement de la pression de pollution sur les diatomées d'un même cours d'eau.
- × 2 stations positionnées chacune à l'exutoire de petits bassins versants agricoles (le Hay à Clermont-Pouyguilles et le Montoussé à Auradé).
- × 2 couples de stations proches (Organ/Peyret et Jasse/Vermeil) constitués chacun d'une station dite « de référence » (Organ et Jasse) en zone boisée.
- × 1 station isolée sur un affluent du Sousson, le Cedon, conservée du fait de l'abondance relative élevée, observée en 2004, de formes anormales de diatomées benthiques.

Ces différentes stations ont été retenues en fonction de leur position dans leurs bassins versants respectifs et de leur environnement agricole.

a) Le bassin versant du Sousson

A l'ouest de zone d'étude et au sud de Auch un petit bassin versant, le bassin du Sousson a été suivi de l'amont, à proximité de la source (station « Aujan »), jusqu'à son exutoire (station « Auch »). En plus des trois stations sur ce cours d'eau (Aujan, Dareous, Auch), deux autres stations ont été suivies sur des affluents: la station du bassin versant du Hay et celle sur le Cedon. Le Sousson, cours d'eau caractéristique des rivières des coteaux de Gascogne, avec à l'est des coteaux abrupts et, à l'ouest, des terrasses à pente réduite, est en grande majorité couvert de cultures irriguées de maïs (AGRESTE 2000; Colin 2000).

b) Le bassin versant de la Save

Située à l'est du Sousson, la Save, qui prend sa source à proximité de Lannemezan, n'a été étudiée que sur la partie de son bassin versant en aval du plateau de Lannemezan, entre Montmaurin (31) et l'Isle Jourdain (32). La station la plus en amont (Gorges) est à la limite de la zone de polyculture-élevage. La rivière est classée à cet endroit en « zone à truite », signe d'une relative bonne qualité de l'eau. En aval, les grandes cultures se développent, surtout après la station Anan, la plaine s'élargissant. La culture du maïs irrigué et celle du tournesol dominent vers la station Espaon alors qu'au niveau de la station suivante (Cazaux-Savès), il s'agit plutôt de céréales à paille. A proximité de cette dernière, une autre station (Auradé) est positionnée sur le bassin versant instrumenté du Montoussé, un affluent de la Save.

c) Le bassin versant du Touch

Comme pour le Sousson, le bassin versant du Touch a été étudié de la source, en zone forestière (station Lilhac), jusque sur les dernières terrasses de la plaine de la Garonne, en amont de Toulouse (station Lamasquère). Le Touch prend sa source dans une zone encore dominée par la polyculture et l'élevage. La station Lilhac n'est pas, à proprement parler, une station de référence, le Touch prenant

sa source dans des champs cultivés avant de rentrer en milieu forestier. Dès la station Fabas, les grandes cultures de printemps (maïs, tournesol, soja) occupent la plupart du territoire. A partir de la station Savères, le Touch passe des hautes aux basses terrasses de la plaine de la Garonne. La plaine agricole s'élargit alors très sensiblement. Au niveau de la station la plus en aval (Lamasquère), les cultures se diversifient avec une part non négligeable de cultures de céréales à paille.

d) Les autres bassins versants étudiés

A la différence des trois précédents, le bassin versant de la Gèze est de taille beaucoup plus réduite. Il se situe au sud du bassin versant du Sousson à la limite du département des Hautes-Pyrénées. Il comprend une station de référence (Organ) et une station en aval (Peyret), avant la confluence avec le Gers. Ce cours d'eau draine un petit bassin versant dans une zone de polyculture-élevage.

Sur la rive droite de la Garonne, deux stations ont été suivies : la station Vermeil à l'exutoire d'un bassin versant en grande majorité couvert de grandes cultures irriguées, à proximité de Lézat sur Lèze et, à proximité, la station Jasse située sur un cours d'eau (ruisseau de la Jasse) en zone forestière. Le bassin versant en amont est à dominante forestière avec quelques parcelles de grandes cultures.

Le réseau de stations a été choisi afin de suivre des communautés de diatomées benthiques dans différents contextes de grandes cultures (maïs irrigué, colza-tournesol, céréales à paille). La principale limite de ce genre d'étude, dans des régions de plaines dominées par les grandes cultures, est l'absence de véritables stations de référence sur les cours d'eau, les zones boisées étant extrêmement réduites (Dermont 2002).

2 Le dispositif de prélèvement

a) Les prélèvements biologiques

Des prélèvements biologiques de biofilm ont été réalisés sur des galets pour chaque station afin de réaliser ultérieurement un suivi qualitatif de la composition en espèces des communautés de diatomées benthiques. Si, dans le cas des pollutions trophiques, les échantillons de biofilm naturels suffisent pour estimer la qualité des eaux, plusieurs auteurs ont souligné les limites d'une approche uniquement qualitative et structurelle pour étudier les effets des pesticides sur les communautés de diatomées benthiques (Prygiel *et al.* 1993; Dorigo *et al.* 2004). En effet le biofilm, prélevé sur substrats naturels, résulte de l'accumulation de communautés d'âges différents n'ayant pas la même sensibilité aux toxiques. Ce type d'échantillon est trop hétérogène pour étudier les effets des pesticides.

L'utilisation de lames de verres est donc préférable pour collecter et d'étudier les communautés de diatomées exposées aux pesticides (Dorigo *et al.* 2001; Navarro *et al.* 2002; Berard *et al.* 2003; Guasch *et al.* 2003). Le verre est, en effet, inerte d'un point de vue toxicologique et résiste relativement bien aux chocs. La cage ajourée permet de limiter, l'effet abrasif du courant, notamment lors des crues, et l'accumulation de déchets organiques sur les lames.



Figure 31 : Le dispositif expérimental

Un dispositif expérimental (Figure 31), constitué de caisses ajourées¹ (40 x 30 x 13,1 cm) attachées à des supports et contenant trois lames de verres disposées verticalement, a donc été mis en place sur chaque station étudiée afin d'obtenir, en plus des données qualitatives, des mesures quantitatives de biomasse (biomasse totale et biomasse algale).

b) Les prélèvements d'eau et le suivi des paramètres physico-chimiques

Lors de chaque prélèvement de matériel biologique, des prélèvements d'eau ont été réalisés afin de suivre l'évolution spatiale et temporelle des concentrations en nutriments et en pesticides dans les eaux, et d'identifier le type de molécules herbicides présentes. Les paramètres classiques de la physico-chimie des eaux ont aussi été mesurés à l'aide d'appareils portatifs.

¹ Dimensions : 400*300*131 mm

c) La périodicité des prélèvements

Cinq tournées de terrain ont été conduites de mars à juin en 2005 et 2006 sur l'ensemble des stations (Figure 32). Les caisses contenant les lames de verre ont été immergées entre 3 et 4 semaines. Quatre périodes de colonisation ont, donc, été étudiées.

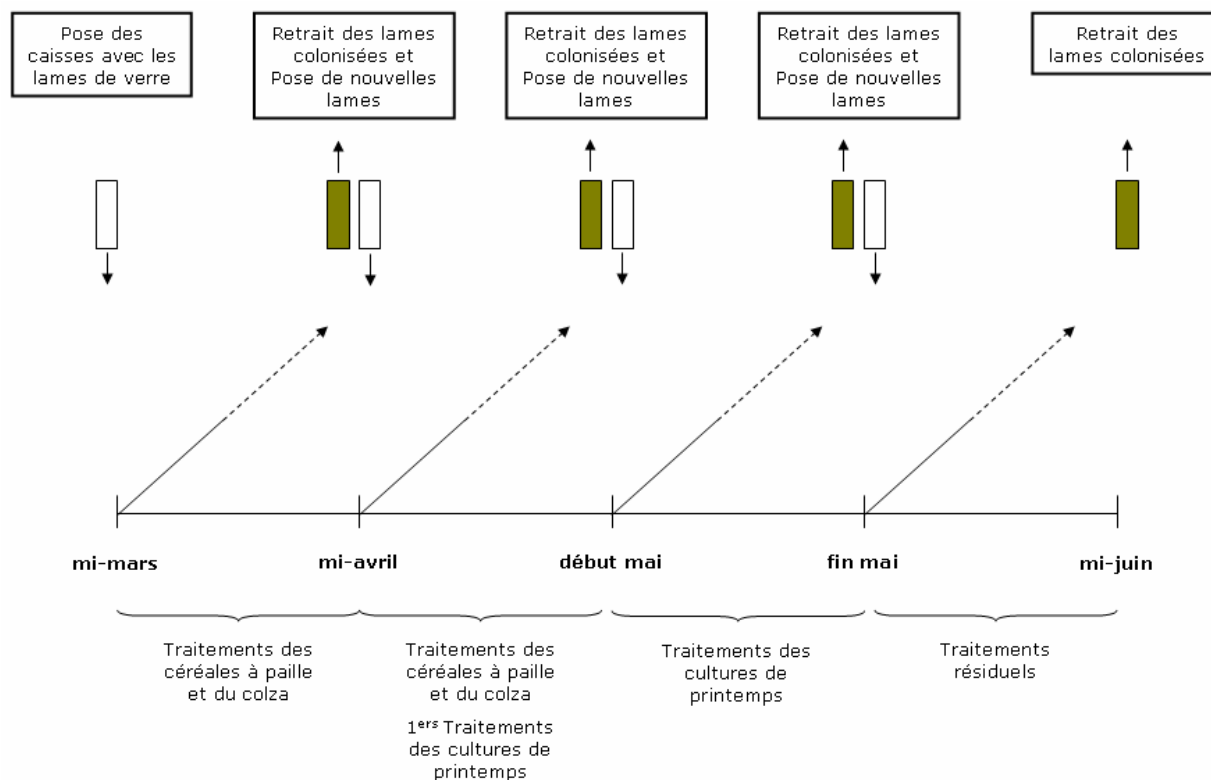


Figure 32 : Protocole de colonisation des lames de verre au cours d'une campagne de prélèvements

Les dates des tournées ont été choisies de manière à encadrer les périodes connues de traitement des cultures par les herbicides (Figure 32) :

- Période de mi-mars à début avril : 1^{ers} traitements de sortie d'hiver sur céréales à paille et colza.
- Période de début avril à début mai : Fin des traitements sur céréales à paille et colza, 1^{ers} traitements de pré-semis sur les cultures de printemps (maïs, tournesol, soja).
- Période de début mai à fin mai : traitements sur les cultures de printemps (pré et post semis, pré et post levée).
- Période de fin mai à la fin juin: traitements résiduels, lessivage des traitements précédents.

Le suivi en continu, de mars à juin, d'un même biofilm n'a pas été retenu. En effet, la sensibilité aux pesticides d'une communauté, présente dans le biofilm, dépend de l'âge et de la maturité de celui-ci

(Lagadic *et al.* 1997). Or sur une période aussi longue (mars à juin) le biofilm évolue très nettement et acquiert une certaine maturité qui lui permet de s'affranchir des conditions du milieu extérieur (Ivorra *et al.* 2000). Les comparaisons entre les différentes dates de prélèvements seraient donc relativement compliquées du fait des différences d'âge du biofilm. L'intérêt de suivre de manière fragmentée l'évolution des communautés de diatomées est, par conséquent, de travailler sur des échantillons présentant le même stade de développement entre les différentes séries de prélèvements.

3 Protocoles de prélèvements et de mesure

a) Sur le terrain

- Mesures des paramètres physico-chimiques

La conductivité, le pH, la teneur en oxygène dissous et le pourcentage de saturation en oxygène des eaux ont été mesurés pour chaque station.

- Prélèvements d'eau

Des prélèvements d'eau (1L), à l'aide de bouteilles en plastique (dosage des nutriments) et de bouteilles en verre (dosage des herbicides), ont été réalisés sur chaque station. Les échantillons ont été maintenus au froid et à l'obscurité.

- Prélèvement sur substrat naturel

Les prélèvements biologiques de biofilm ont été réalisés sur plusieurs galets, le long d'un transect, pour chaque station. Les échantillons ont été immédiatement fixés avec du formaldéhyde (formol 35% p/p) afin d'étudier au laboratoire la composition en espèce des communautés.

▪ Prélèvements sur substrat artificiel

En ce qui concerne le prélèvement du biofilm sur les substrats artificiels, un protocole particulier d'échantillonnage a été suivi (Figure 33).

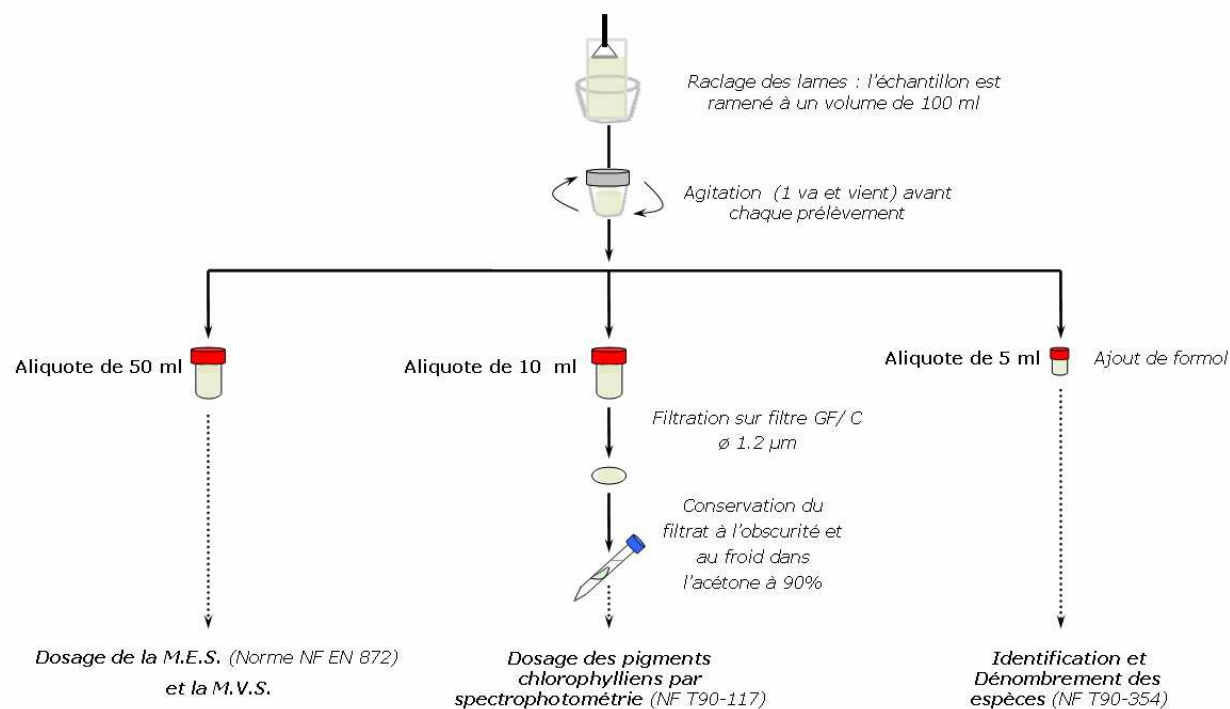


Figure 33 : Protocole de prélèvement du matériel biologique fixé sur les lames de verre pour le dosage de la Matière En Suspension (MES), de la Matière Volatile en Suspension (MVS), des pigments chlorophylliens par spectrophotométrie et pour l'identification et le dénombrement des espèces.

Chaque lame extraite de la caisse a été raclée. L'échantillon obtenu a été ramené à un volume total de 100 ml. Après agitation, différents aliquotes ont été réalisés :

- × un aliquote de 50 ml pour les mesures de concentration en M.E.S. (Matière En Suspension) et M.V.S. (Matière Volatile en Suspension) afin de mesurer la biomasse totale
- × un aliquote de 10 ml filtré sur place pour les mesures de concentration en pigments chlorophylliens afin d'estimer la biomasse algale. Le filtrat a, ensuite, été immergé dans de l'acétone à 90% pour éviter toute dégradation des pigments chlorophylliens au contact de l'air.
- × Enfin, un aliquote de 5 ml, fixé avec du formaldéhyde à 35%, pour l'identification et le dénombrement des espèces.

Les aliquotes non fixés ont été conservés au froid et à l'obscurité jusqu'à leur transfert au laboratoire.

b) Au laboratoire

- Les nutriments

Le dosage des nutriments a été effectué au laboratoire de chimie des eaux du Cemagref de Bordeaux. Les concentrations en azote total (N Kjeldahl), en ammonium (NH_4^+), en nitrites (NO_2^-) en nitrates (NO_3^-), en en phosphore total (P) et en orthophosphates (PO_4^{3-}), ont été déterminées selon des méthodes normalisées (voir Annexe A). Pour certaines campagnes, la silice a été dosée en colorimétrie par flux continu (Technicon) à 660nm au Laboratoire des Mécanismes et Transferts en Géologie (LMTG, G. DURBE).

- Les herbicides

Les échantillons d'eau ont été filtrés (Whatman GF/F, 0,7 μm). L'extraction des herbicides a été réalisée sur des cartouches contenant une résine adsorbante, l'Oasis HLB, selon un protocole détaillé par Mazzella *et al.* (2007) (Mazzella *et al.* 2007). La détection et la quantification des concentrations de 28 molécules herbicides (voir Annexe B) ont été conduites à l'aide d'un détecteur UV (Thermo, Spectra System UV6000LP) couplé à une chromatographie en phase liquide (Thermo, Spectra System AS3000) (Munaron 2004).

- Paramètres biologiques qualitatifs

Les paramètres biologiques qualitatifs ont été étudiés pour 12 des 18 stations de la zone d'étude. Les stations des trois principaux cours d'eau (Sousson, Save et Touch) ont été sélectionnées afin d'évaluer, sur différents continuums, l'évolution de ces paramètres. La station Cedon a été retenue de par les fortes valeurs d'abondance relative en formes anormales relevées en 2004. Les échantillons de biofilms, fixés avec du formol, ont été préparés selon la méthodologie définie par la norme NF T90-354. Pour chaque échantillon, la matière organique a été éliminée, par une attaque chimique à l'aide de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 33% env.) porté à ébullition, afin de ne conserver que les frustules des diatomées. Après plusieurs centrifugations destinées à éliminer le H_2O_2 , un aliquote a été déposé sur une lamelle circulaire. Une fois l'eau évaporée, la lamelle a été fixée sur une lame de microscope avec une résine (Naphrax) présentant un fort pouvoir réfringent (1,73). Les valves de diatomées fixées sur cette lame ont été identifiées sous microscopie photonique à un grossissement x1000 (microscope Leica DMRB, Wetzlar, Allemagne). Environ 250 valves ont été déterminées par lame afin d'atteindre une moyenne de 750 valves par station. Les recherches taxonomiques se sont appuyées sur différents ouvrages taxonomiques (Krammer *et al.* 1986-1991; Prygiel *et al.* 2000). A partir des données de composition spécifique des communautés obtenues, différents indices biologiques (IBD, IPS) ont été calculés ainsi que l'indice de diversité de Shannon. Cet indice est le plus utilisé pour évaluer la diversité au sein d'une communauté. Il prend en compte la présence mais aussi l'abondance des espèces pour calculer une note de diversité.

- Paramètres quantitatifs

Différents paramètres de biomasse ont été mesurés sur le matériel biologique non fixé.

A partir de l'aliquote de 50 ml, la concentration en matières en suspension (MES) a été évaluée selon la norme NF EN 872. Les Matières Volatiles en Suspensions (MVS) ont été dosées par calcination à 550°C dans une coupelle en verre. Les MES équivalent à la matière sèche du biofilm. La concentration en MVS correspond à la concentration en matière organique du biofilm.

Les différents pigments chlorophylliens (« chlorophylle a et c ») ont pu être quantifiés par spectrophotométrie selon la norme NF T90-117, à partir de la solution obtenue après filtration de la solution d'acétone contenant le filtrat réalisé *in situ*. L'absorbance a été mesurée à quatre longueurs d'onde (630, 645, 665 et 750 nm). Les concentrations en « chlorophylle a et c » ont été calculées à partir des formules établies par Strickland et Parsons (1968) et Lorenzen (1967) pour évaluer la biomasse algale totale (« chlorophylle a ») et estimer la biomasse des diatomées (« chlorophylle c ») (Lorenzen 1967; Strickland *et al.* 1968). Il est à noter que ce dernier pigment n'est pas propre aux diatomées. D'autres algues (Chrysophycées, Raphidophycées, Phaeophycées), de la même division des Heterokontophyta, en contiennent aussi (Van Den Hoek *et al.* 1995). Mais l'observation microscopique des échantillons n'a pas mis en évidence de développements importants de ces algues. De plus, leurs préférences écologiques¹ ne correspondent pas aux conditions du milieu auxquelles ont été exposés les échantillons (Van Den Hoek *et al.* 1995). Enfin, les diatomées sont connues comme étant des algues pionnières dans la colonisation des substrats. Par conséquent, nous avons considéré que la concentration en « chlorophylle c » permettait d'estimer la biomasse des diatomées benthiques sur les substrats artificiels.

4 Le traitement des données

Les données quantitatives, qualitatives et physico-chimiques ont fait l'objet, dans un premier temps, d'une analyse descriptive classique. Les corrélations (corrélation de Person) ont ensuite été calculées entre les différentes variables biologiques et les variables physico-chimiques disponibles. Afin d'étudier la variabilité entre les lames et entre les stations, des analyses de variance ont aussi été réalisées (Sigmastat, SPSS Inc.). Enfin, les données concernant la composition spécifique des communautés ont été analysées à partir d'une analyse multivariée (Analyse des Correspondances Canoniques) (McCune, B. and M. J. Mefford. 1999. *Multivariate Analysis of Ecological Data*, Version 4.25, MjM Software, Gleneden Beach, Oregon, U.S.A.). Ce type d'analyse présente l'intérêt de croiser des paramètres de composition en espèces avec des paramètres environnementaux, pour comparer des stations entre elles. Dans le cas présent, les concentrations totales par station en nitrates et en herbicides ont été retenues comme paramètres environnementaux.

¹ Les chrysophycées se développent préférentiellement dans les lacs oligotrophes à mésotrophes. Les raphidophycées sont plus adaptées aux milieux acides lenticques. Enfin les phaeophycées sont en grande majorité des algues marines. Quelques algues, comme les euglénophytes, vivent dans les eaux douces lenticques.

C./ Résultats

1 Caractérisation des stations étudiées en 2005 et 2006 à partir de paramètres classiques de suivi de la qualité des eaux

a) L'évolution du régime hydraulique

Comme nous l'avons vu précédemment (voir pages 84-85), les variations de régime hydraulique sont, sur certains cours d'eau des coteaux de Gascogne, particulièrement marquées.

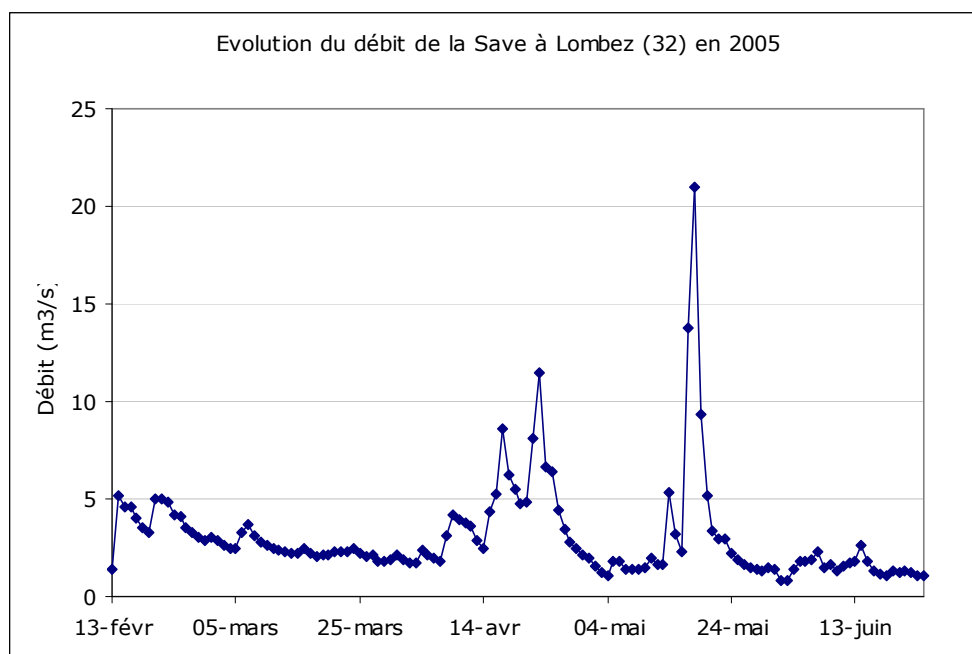


Figure 34: Evolution du régime hydraulique sur la Save au printemps 2005
(Source : CACG, Banque de données Hydro <http://www.hydro.eaufrance.fr/>)

En 2005, à Lombez, entre les stations Espaon et Cazaux, les données de débit journalier pour la Save (Figure 34) ont montré, qu'au cours de la période d'étude, les caisses immergées ont eu à faire face à deux crues importantes. Entre le 12 avril (date de l'immersion) et le 9 mai (date du retrait), le débit a connu deux pics de taille moyenne, le 17 avril (8,63 m³/s) et le 23 avril (11,5 m³/s). Par la suite, pour la période d'immersion du 9 mai au 30 mai, une crue plus importante et plus brève (4-5 jours) est intervenue le 18 mai dépassant les 20 m³/s. Les variations observées sur le Touch à Bérat, entre les stations Savères et Lamasquère, sont beaucoup plus modérées (4,72 m³/s le 25 avril et 5,69 m³/s le 18 mai).

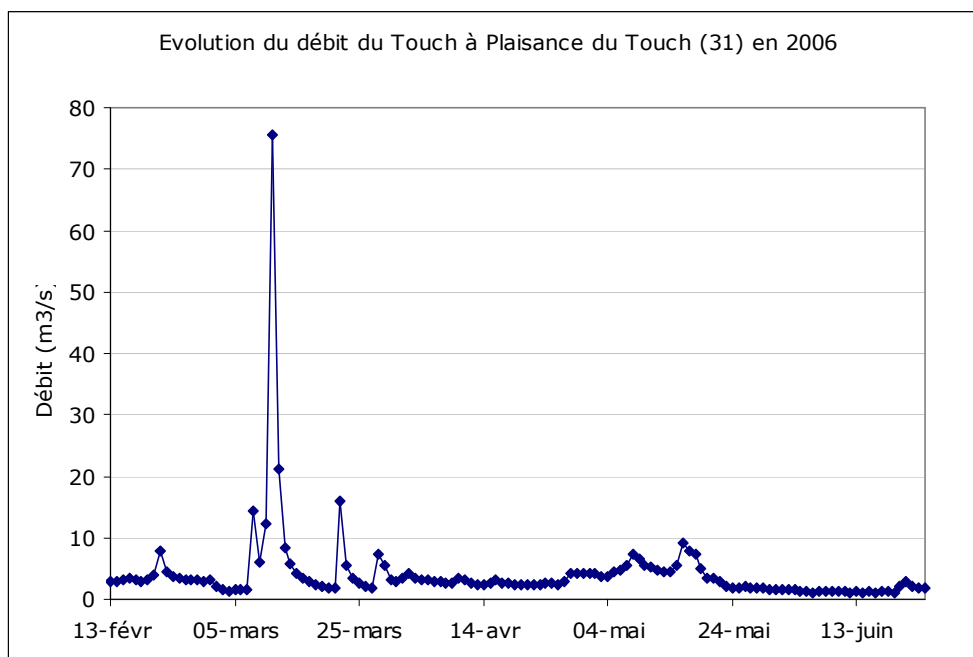


Figure 35: Evolution du régime hydraulique sur le Touch au printemps 2006
(Source : DIREN, Banque de données Hydro <http://www.hydro.eaufrance.fr/>)

En 2006¹, en l'absence de données pour la station Bérat, nous nous sommes reportés à une station plus en aval, Plaisance du Touch, pour étudier les variations de débit du Touch (Figure 35). En février, une crue d'une rare violence ($75 \text{ m}^3/\text{s}$ le 11 mars à Plaisance du Touch) a frappé les cours d'eau de la zone d'étude. La première tournée de prélèvements (17 et 18 mars, pose des caisses) a été marquée par une crue nettement plus limitée, autour de $15 \text{ m}^3/\text{s}$. Les caisses immergées ont été soumises à des pics beaucoup plus réduits fin mars et mi-mai. Au final, les augmentations du niveau des eaux ont été beaucoup plus limitées en 2006 qu'en 2005 au cours de l'expérimentation de terrain.

¹ Les données hydrographiques pour la station de Lombez ne sont pas disponibles.

b) L'évolution de la qualité physico-chimique des eaux

▪ Nutriments

La qualité des eaux, d'un point de vue trophique, a été estimée par station à partir de la grille d'évaluation de la qualité des eaux du SEQ¹ eau « cours d'eau ». En 2005 et en 2006, il est apparu que, de tous les nutriments étudiés (N Kjeldahl, NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- , phosphore total (P) et PO_4^{3-}), la concentration en nitrates (NO_3^-) était le paramètre trophique le plus dégradant, en terme de qualité de l'eau, sur la très grande majorité des stations de la zone d'étude.

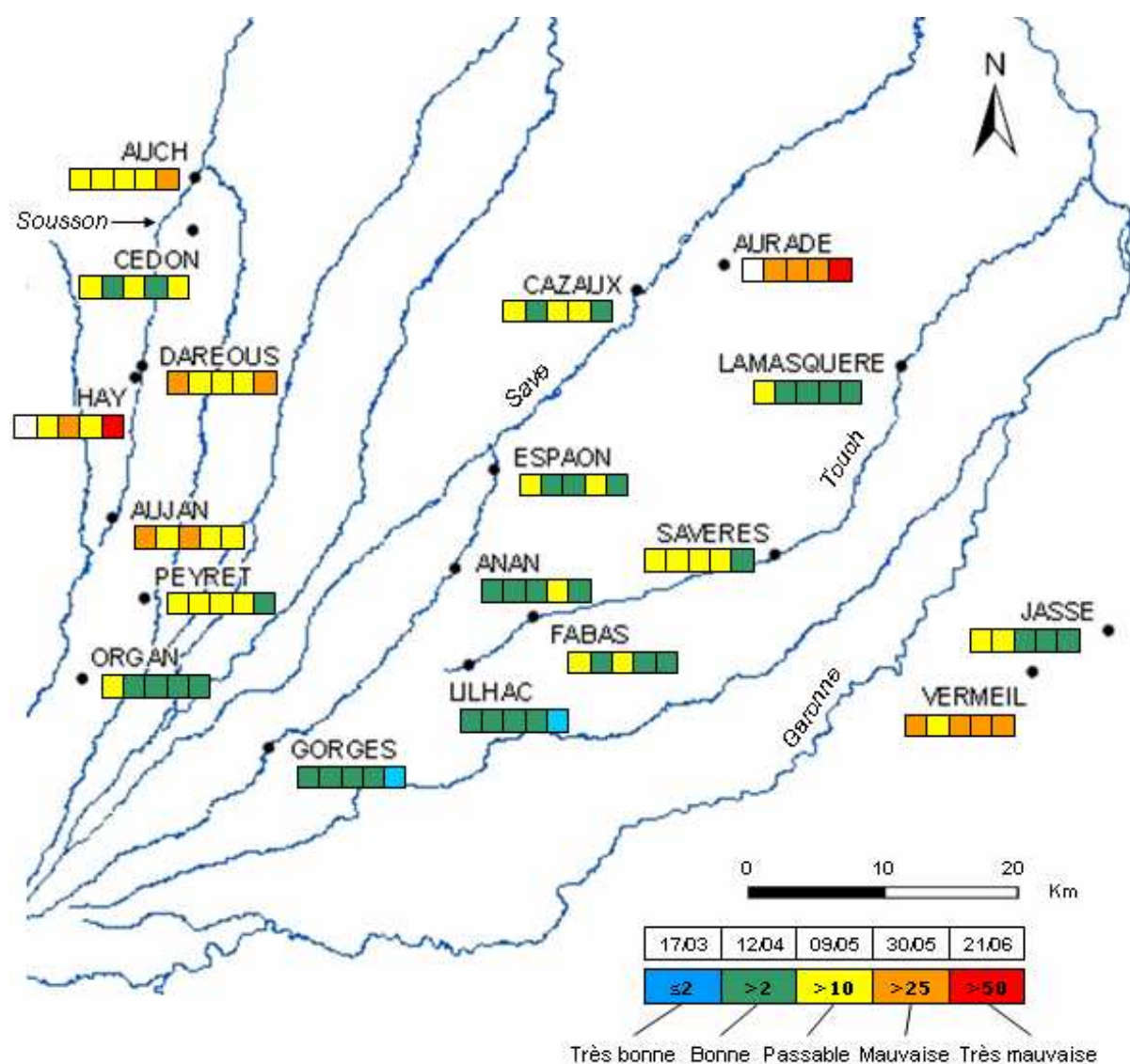


Figure 36 : Evolution de la qualité des eaux en fonction des concentrations en nitrates (N-NO_3 en mg/L) sur les stations des coteaux de Gascogne aux différentes dates de prélèvement en 2005

¹ SEQ : Système d'Evaluation de la Qualité

² Pour l'estimation générale de la qualité des eaux d'une station, le SEQ cours d'eau prend en compte le paramètre le plus déclassant.

Comme le souligne la représentation graphique de l'évolution de qualité des eaux du point de vue des concentrations en nitrates en 2005 (Figure 36), la situation est contrastée entre les différents bassins versants étudiés.

Dans le cas du bassin versant du **Sousson**, la qualité trophique des eaux est apparue, durant les deux campagnes de prélèvements (2005 et 2006), nettement plus faible que celle relevée sur les autres grands bassins versants étudiés (Save et Touch). Un grand nombre de stations a présenté des teneurs en nitrates supérieures à 10mg/L (N-NO₃) voire dépassant les seuils de mauvaise (25mg/L) et de très mauvaise qualité (50mg/L) en certaines occasions.

Sur les stations du bassin versant de la **Save**, les concentrations en nitrates ont suivi un gradient positif, de l'amont vers l'aval, pour les stations situées sur le cours de la Save en 2005 et 2006. Ce gradient a été plus marqué en début de campagne (mars, avril) puis s'est estompé au fur et à mesure que les concentrations en nitrates diminuaient. Les prélèvements effectués à la station positionnée à l'exutoire du bassin versant du Montoussé [Auradé (32)], un affluent de la Save à proximité de la station Cazaux-Savès, ont confirmé la dégradation de la qualité des eaux sur la partie aval du bassin versant de la Save, le seuil de très mauvaise qualité (50mg/L) ayant été dépassé une fois en 2005 et en 2006.

Dans le cas du bassin versant du **Touch**, la situation a été sensiblement différente. La qualité de l'eau s'est avérée moyenne à mauvaise, vers la mi-mars au cours des deux campagnes de prélèvement. Sur la station la plus en aval (Lamasquère), mis à part les prélèvements de la mi-mars, l'eau analysée s'y est révélée de bonne qualité (<10mg/L N-NO₃) en 2005 comme en 2006. Sur les cours d'eau de la Save et du Touch, la situation s'est améliorée à partir de la fin mai.

Enfin en ce qui concerne les deux couples de stations (**Organ/Peyret sur la Gèze et Jasse/Vermeil**), la qualité des eaux s'est avérée généralement bonne pour la station de référence sur la Gèze (Organ) à la différence de l'autre station de référence « Jasse » où les deux premiers prélèvements (mi-mars et mi-avril) ont mis en évidence une qualité plus médiocre. La situation s'est dégradée pour la station Peyret en aval de la station Organ et, surtout, sur la station Vermeil à l'exutoire d'un bassin versant agricole, le seuil de mauvaise qualité (25mg/L) étant, pour cette station, dépassé pour quatre des cinq campagnes de prélèvements en 2005. Le seuil de très mauvaise qualité (50mg/L) a même été atteint à trois reprises entre mars et mai 2006.

En terme d'état de la pollution par des éléments trophiques sur notre zone d'étude des grandes tendances se dégagent :

- × Les nitrates ont été majoritairement à l'origine de la dégradation de la qualité trophique des eaux.
- × Les eaux ont été de mauvaise, voire très mauvaise qualité, sur les stations du Sousson, sur celles à l'exutoire des deux petits bassins versants du Hay et d'Auradé, et à la station Vermeil.
- × La pollution par les nitrates a suivi un gradient positif amont-aval sur les stations de la Save alors que sur le Touch, la station, la plus en aval, a été moins affectée que les stations en amont.

- × Pour ces deux cours d'eau (Save et Touch), la situation s'est améliorée à partir de la fin mai, les concentrations en nitrates mesurées diminuant.
- × Seule la station Gorges sur la Save peut faire office de véritable station de référence, toutes les autres stations étant affectées par une pollution trophique conséquente.
 - Le pH et la conductivité

Les mesures de pH réalisées pour chaque station ont mis en évidence la nature alcaline des milieux étudiés, les valeurs de pH oscillant entre 7,6 et 8,5. Les valeurs de conductivité se sont avérées significativement et positivement corrélées aux concentrations en nitrates (NO_3) mesurées dans les eaux ($C_{\text{Pearson}}=0,539$ en 2005 et $C_{\text{Pearson}}=0,570$ en 2006 avec $P<0,05$).

c) La contamination des eaux par les herbicides¹

Le bassin versant du **Sousson** s'est clairement distingué des autres bassins versants étudiés par les valeurs de concentration totale maximale en herbicides atteintes sur certaines stations (Figure 37).

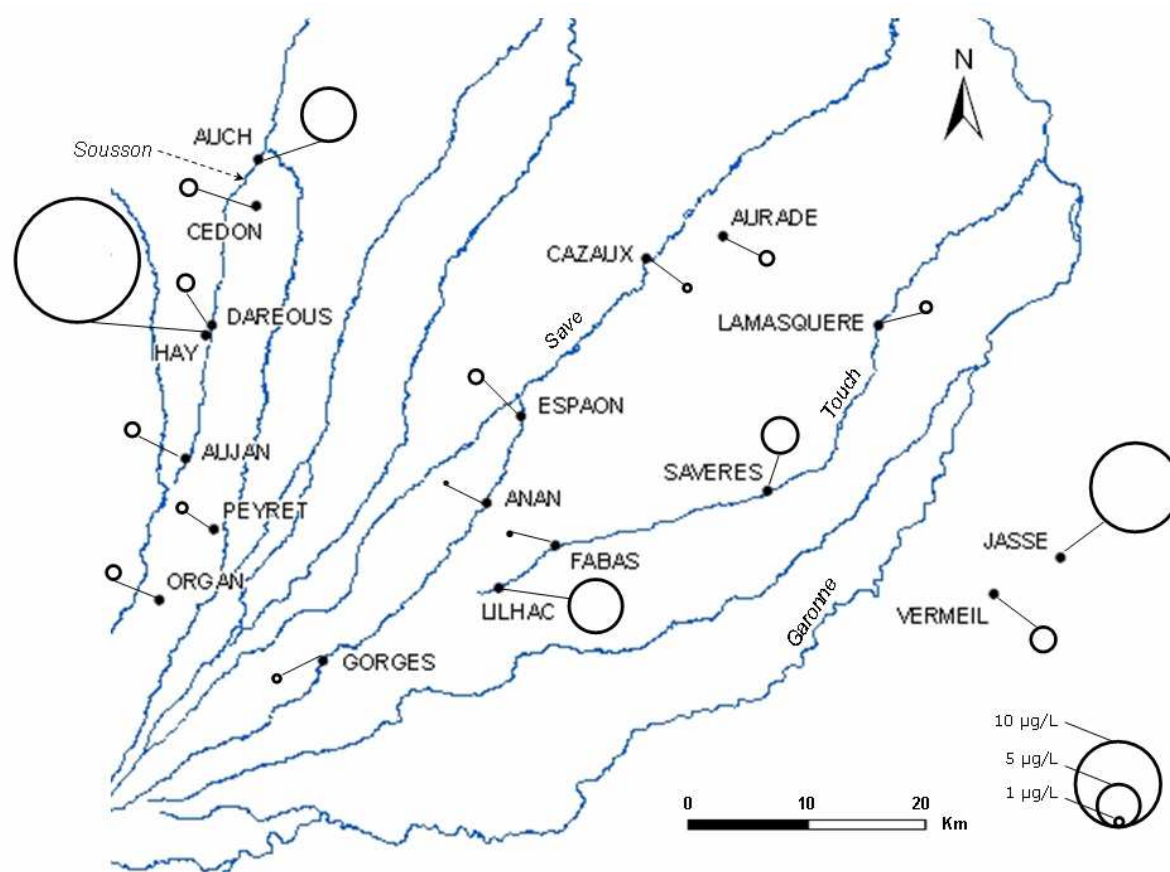


Figure 37 : Carte récapitulative des plus fortes concentrations totales en herbicides mesurées en 2005 et en 2006 sur les stations des coteaux de Gascogne

¹ En 2005, l'analyse des échantillons d'eau de la campagne du 17 mars n'a pas permis de révéler des contaminations significatives par les pesticides des cours d'eau de la zone d'étude.

Ainsi, en mars 2006, en pleine période de crue, une concentration extrêmement élevée (14,4µg/L) a été détectée à la station Hay. Les deux campagnes de prélèvements ont mis en évidence, à chaque fois, des valeurs de concentration relativement fortes sur ce bassin versant (6,3µg/L en avril 2005, 5,1µg/L en juin 2005, quatre stations sur cinq avec des concentrations supérieures à 1,5µg/L en juin 2006).

En ce qui concerne les stations du bassin versant de la **Save**, les concentrations totales en pesticides ont été plus faibles que celles relevées sur le bassin versant du Sousson en 2005 comme en 2006. Lors de la première campagne de prélèvements (2005), un gradient de concentration positif, de l'amont vers l'aval, s'est aussi dégagé, comme pour les nutriments, jusqu'à la fin mai. La station la plus en amont, Gorges, s'est révélée être contaminée même si les concentrations mesurées ont été relativement faibles. Pour les deux campagnes de prélèvements, l'accroissement des concentrations est intervenu principalement en mai sur les stations les plus en aval (Espaon, Cazaux et Auradé). Sur l'ensemble des prélèvements réalisés, la concentration maximale mesurée n'a pas dépassé les 1,8µg/L.

Dans le cas du bassin versant du **Touch**, comme pour la Save, la station la plus en amont s'est avérée contaminée par des concentrations, à certaines occasions, très élevées (1,6µg/L et 6,3µg/L pour les prélèvements du mois de mai 2005). Les valeurs de concentration atteintes ont été plus élevées en 2006. Fin mai 2006, une concentration totale très forte, de l'ordre de 4,3µg/L, a été détectée à la station Savères.

En ce qui concerne les stations localisées sur **la Gèze**, des valeurs plus élevées (1,2µg/L le 9 mai à Peyret et 1,7µg/L le 21 juin à Organ) qu'en 2005 ont été mesurées en 2006 sur les deux stations.

Enfin, dans le cas des stations **Jasse et Vermeil**, les prélèvements réalisés au cours d'une crue en mars 2006 ont aussi mis en évidence la présence de concentrations importantes dans les eaux d'herbicides (3,0µg/L à la station Vermeil). La station Jasse s'est avérée elle aussi contaminée, à des niveaux extrêmement élevés (10,4µg/L) en avril 2005. La contamination importante de ces deux stations a été confirmée, dans une moindre mesure, par d'autres prélèvements (1,1µg/L début mai 2005 pour la station Jasse, 1,6µg/L en juin 2006 pour la station Vermeil).

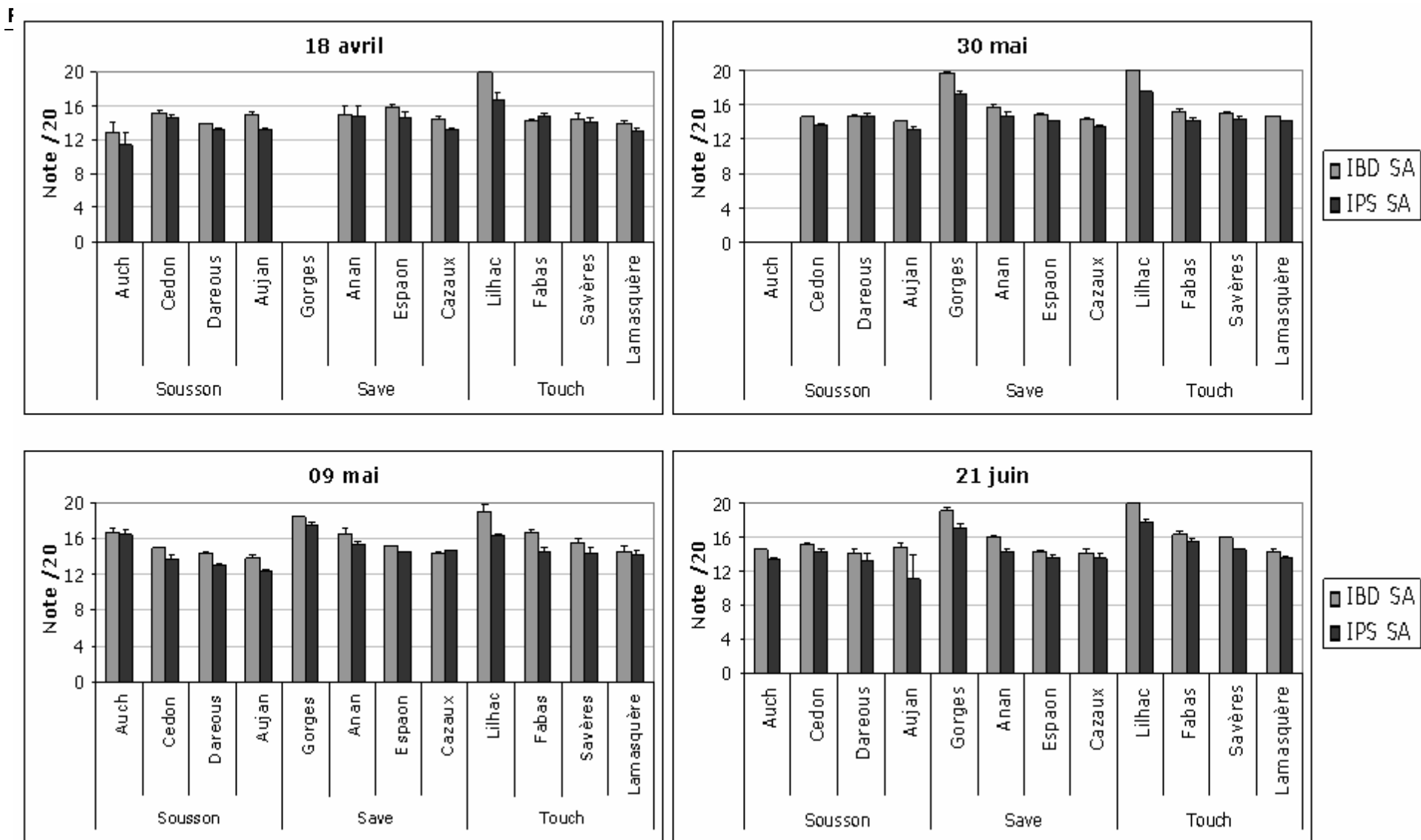


Figure 38: Evolution des indices biologiques « diatomées » (IBD et IPS) calculés à partir des communautés de diatomées benthiques prélevées sur les lames de verre (SA : Substrat Artificiel) en 2006

d) *L'évolution de la qualité biologique des eaux*

Les indices biologiques s'appuyant sur les diatomées benthiques (IBD et IPS) ont été calculés sur les échantillons prélevés sur substrats naturels (SN galets) et sur substrats artificiels (SA lames de verre) afin d'estimer la qualité biologique des eaux. Pour les deux campagnes de prélèvements (2005 et 2006), la nature du substrat n'a pas influé sur les valeurs d'indices, les résultats étant significativement corrélés¹ pour les deux indices. Les notes fournies par ces deux indices ont évolué de manière relativement similaire en 2006, un peu moins en 2005 ($C_{\text{Pearson}}=0,32$ en 2005 et $C_{\text{Pearson}}=0,89$, $P<0,05$ dans les deux cas).

Pour chacune des deux campagnes les notes de qualité biologique des eaux ont aussi été confrontées aux concentrations en nitrates et aux concentrations totales en pesticides. En 2005 et 2006, que ce soit pour l'IBD et l'IPS, les notes de qualité calculées à partir des échantillons prélevés sur substrat artificiel ont relativement bien rendu compte des variations des niveaux de pollution des cours d'eau par les nitrates ($C_{\text{Pearson}}>0,33^2$, $P<0,05$). A l'inverse, la concentration totale en pesticides et les notes d'IBD et IPS ont évolué de manière totalement différente, les corrélations n'étant pas significatives (Corrélation de Pearson, $P>0,05$).

L'évolution spatio-temporelle des notes de ces deux indices, pour les échantillons prélevés sur substrat artificiel, confirme en partie certaines tendances observées précédemment (Figure 38).

Sur le bassin versant du Sousson, la qualité des eaux, d'un point de vue biologique, est apparue relativement médiocre, les notes obtenues étant proches, exception faite de la station Auch en avril 2006, de celles relevées à la station la plus en aval sur la Save, Cazaux.

Dans le cas du bassin versant de la Save, l'IBD et l'IPS ont mis en évidence une excellente qualité des eaux sur la station la plus en amont, Gorges, avec des notes supérieures à 17/20 en 2005 comme en 2006. Cette station apparaît, du point de vue de l'état trophique, comme la station de référence de la zone. Ces indices ont aussi confirmé l'existence sur la Save d'un gradient amont-aval négatif de qualité des eaux pour les deux campagnes de prélèvements. En ce qui concerne les stations du bassin versant du Touch, la qualité biologique des eaux ne s'est pas améliorée pour la station Lamasquère comme cela a pu être observé avec les concentrations en nitrates. Un gradient amont-aval négatif est aussi apparu sur ce cours d'eau mais seulement à certaines dates de prélèvement (12 avril 2005 et 18 avril 2006, 09, 30 mai et 21 juin 2006).

¹ En 2005 $C_{\text{Pearson}}=0,54$ (IBD) et $C_{\text{Pearson}}=0,32$ (IPS), $P<0,05$; en 2006 $C_{\text{Pearson}}>0,71$ pour l'IBD et l'IPS, $P<0,05$)

² Calcul des corrélations entres les notes d'indice et les concentrations en nitrates.

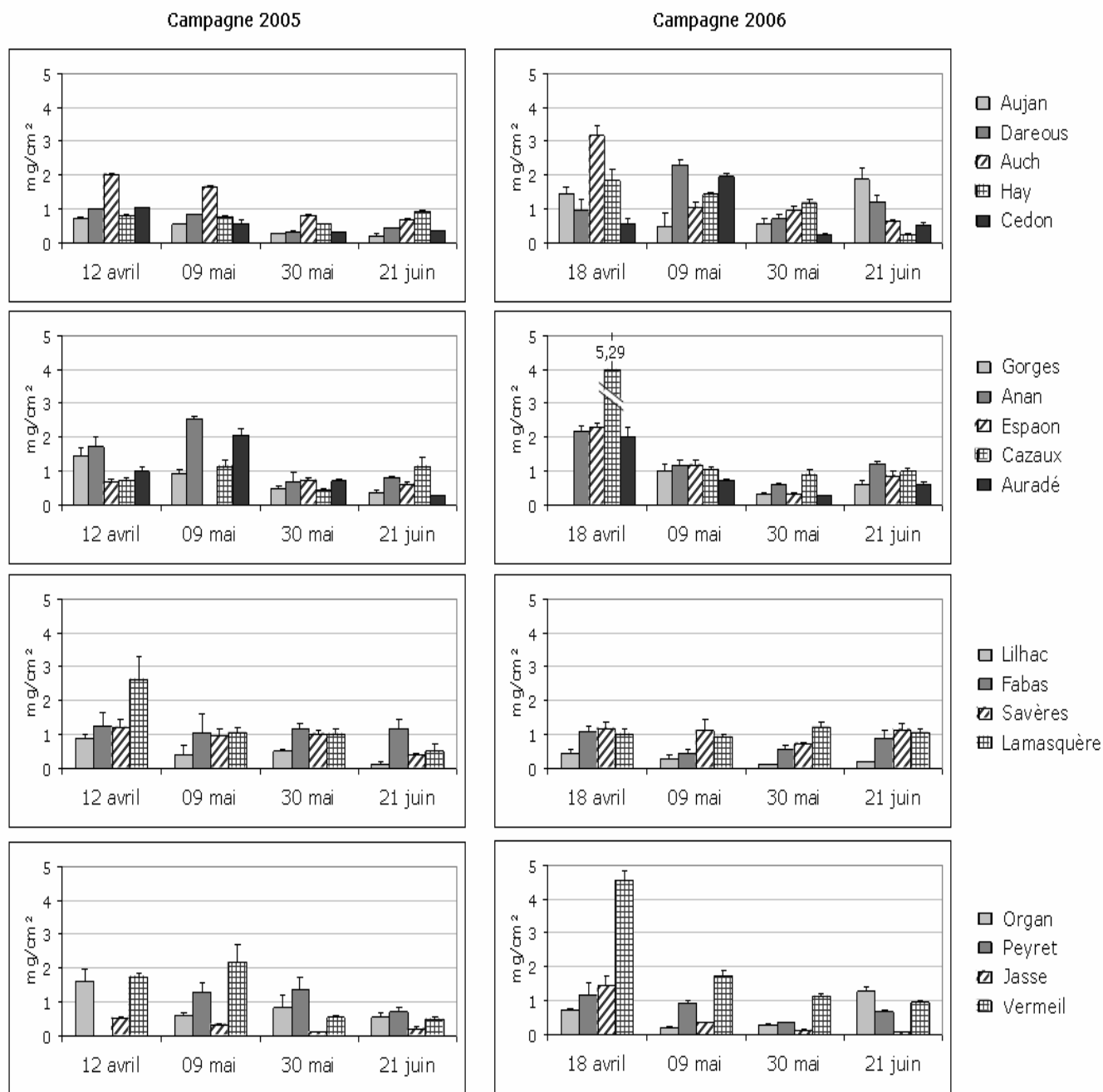


Figure 39: Evolution spatiale et temporelle de la concentration en matière organique dans les biofilms prélevés sur les lames de verre lors des campagnes 2005 et 2006

2 L'évolution des paramètres biologiques

a) Quantitatifs

- La biomasse totale

La production de biomasse totale a été évaluée à partir de la concentration en matière organique mesurée dans les biofilms prélevés par grattage sur les substrats artificiels (Figure 39). Une analyse statistique des résultats (Analyse de Variance à un facteur ANOVA) a permis de s'assurer de l'absence de variations significatives des concentrations en matière organique (MO) entre les trois lames de chaque caisse ($P > 0,05$).

Sur le bassin versant du **Sousson**, la production de MO sur les substrats artificiels s'est révélée plus forte sur les quatre périodes étudiées en 2006 par rapport à 2005. En 2006, les variations spatiales des concentrations en MO ont divergé entre les deux premières séries de prélèvements, les concentrations en MO augmentant dans deux cas (Dareous et Cedon) et diminuant dans les autres.

En ce qui concerne les stations du bassin versant de la **Save** les concentrations en MO sont apparues plus fortes dans les prélèvements du mois d'avril 2005 sur les deux stations en amont et en 2006 sur toutes les stations. Si les résultats de début mai ont été assez différents entre les deux campagnes (2005 et 2006), les données de la fin mai ont mis en évidence une baisse de la production de biomasse totale par les biofilms, pour l'ensemble des stations. En juin, les résultats ont montré une reprise modérée de la production de MO sur la plupart des stations pour les deux campagnes.

Dans le cas du bassin versant du **Touch**, les concentrations en matière organique sur la station la plus en aval (Lamasquère) mesurées en 2005 et 2006 ont été relativement proches (exception faite des données de juin). La production de biomasse par les biofilms a semblé plus importante sur cette station. A l'inverse, les concentrations en matière organique les plus faibles ont été mesurées à la station Lilhac, située en milieu forestier, pour les deux campagnes de prélèvements.

Enfin, pour les deux couples de stations, la production de matière organique dans le biofilm est apparue faible sur la station Jasse en 2005 et en 2006. A l'inverse, la station Vermeil a mis en évidence des concentrations fortes en matière organique tout au long des deux campagnes de terrain. Une baisse de la production de matière organique a aussi été observée dans les biofilms s'étant développés en mai (prélèvement du 30 mai) sur les deux stations aval (Peyret et Vermeil) en 2005 et sur la station Vermeil en 2006.

Pour ce paramètre, il apparaît difficile de dégager des grandes tendances spatiales et temporelles:

- × Dans le cas du Sousson, une production de MO faible a été relevée sur toutes les stations en 2005.
- × Sur certaines stations (Sousson, Save, Vermeil), situées en zone agricole, les concentrations en matière organique se sont avérées plus basses fin mai en 2005 et en 2006.
- × Les stations ombragées, situées en milieu forestier (Lilhac et Jasse), se sont avérées moins productives.

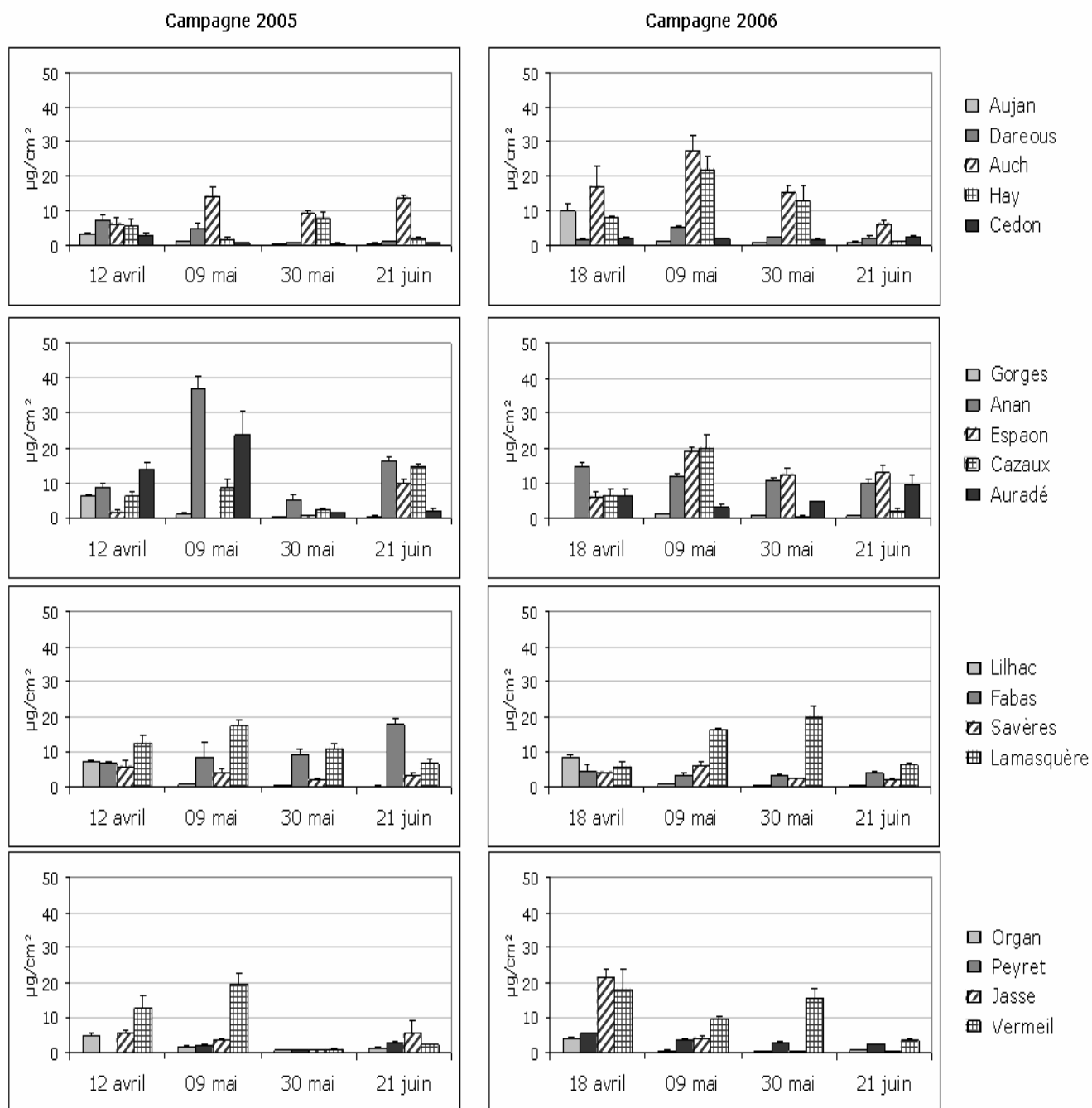


Figure 40 : Evolution spatiale et temporelle de la concentration en « chlorophylle a » dans les biofilms prélevés sur les lames de verre lors des campagnes 2005 et 2006

▪ La Biomasse algale

A partir des données d'absorbance obtenues par spectrophotométrie, la biomasse algale a été calculée à l'aide des formules de Lorenzen (1967) et de Strickland et Parsons (1968). Les résultats de concentration en « chlorophylle a » obtenus avec ces deux méthodes sont fortement et significativement ($P < 0,05$) corrélés ($C_{\text{Pearson}}=0,997$ en 2005; $C_{\text{Pearson}}=0,996$ en 2006). Les données présentées ci-dessous s'appuient sur les calculs de la formule de Strickland et Parsons. La comparaison statistique¹ des concentrations de « chlorophylle a » avec les concentrations de « chlorophylle c »², en 2005 et 2006, a montré que la biomasse algale, qui s'était développée dans les biofilms prélevés sur les lames de verre, était principalement constituée de diatomées. L'étude de la biomasse algale s'est donc focalisée sur le suivi des concentrations en « chlorophylle a » du biofilm (Figure 40).

En 2005, sur le bassin versant du **Sousson**, comme pour les concentrations en MO, les concentrations en « chlorophylle a » ont été, en général, plus faibles que celles relevées sur les deux autres gros bassins versants de la zone (Save et Touch). Les données de 2006 ont fait apparaître des développements plus importants de la biomasse algale sur les stations à l'exutoire des bassins versants (Auch pour le Sousson et Hay pour le Hay). Les prélèvements du 30 mai ont mis en évidence une baisse de la production de biomasse algale sur la plupart des stations en 2005 et 2006.

Dans le cas du bassin versant de la **Save**, un développement important de la biomasse algale a été noté en avril sur les stations amont (Gorges et Anan) en 2005 et en 2006³. Début mai, lors des deux campagnes, les concentrations en « chlorophylle a », mesurées sur la station la plus en amont (Gorges), sont apparues relativement faibles. La croissance de la biomasse algale à la station Gorges est ensuite restée réduite tout au long des deux campagnes de terrain. A l'inverse, sur les autres stations⁴ situées sur la Save, la production de biomasse algale s'est révélée plus importante que ce qui avait été relevé en avril. Au cours de la période suivante (09-30 mai), la croissance de la biomasse algale a été plus limitée, les concentrations en « chlorophylle a » étant faibles comparées à celles relevées début mai pour les deux campagnes. Cette baisse de croissance a principalement été observée sur les stations les plus en aval comme Cazaux. Cette différence entre les prélèvements du 09 mai et ceux du 30 mai a été plus marquée pour les données acquises en 2005.

De toutes les stations du bassin versant du **Touch**, les concentrations en « chlorophylle a » les plus élevées ont été mesurées à la station la plus en aval, Lamasquère, en 2005 comme en 2006. A l'inverse, le développement de la biomasse algale a été très faible dans les biofilms prélevés à la station Lilhac, et dans une moindre mesure à la station Savère à partir du mois d'avril.

Sur les stations de la **Gèze** (Organ et Peyret), les niveaux de concentration en « chlorophylle a » ont été relativement faibles en 2005 comme en 2006. Par contre, à la station Vermeil, la production de

¹ En 2005, $C_{\text{Pearson}}=0,961$ et en 2006 $C_{\text{Pearson}}=0,929$ avec $P < 0,05$.

² La concentration en « chlorophylle c » a été calculée selon la formule de Strickland et Parsons (1968).

³ La caisse immergée sur la station Gorges n'a pas été retrouvée en avril.

⁴ Excepté à Espaon en 2005, le dispositif expérimental ayant disparu.

biomasse algale s'est avérée importante à de nombreuses reprises sauf fin mai 2005 (30 mai), où la concentration en « chlorophylle a » s'est révélée plus faible que début mai.

Au final, des données issues des deux campagnes 2005 et 2006 il se dégage plusieurs éléments:

- × Les stations en tête de bassin (Organ, Jasse, Lilhac) et les stations encombrées par la végétation (Jasse, Gorges, Lilhac) ne sont pas apparues favorables au développement de la biomasse algale après la mi-avril.
- × Sur un certain nombre de stations situées à l'aval ou à l'exutoire de bassins versants agricoles (Cazaux, Lamasquère, Auradé, Vermeil), des niveaux de concentration en « chlorophylle a » plus faibles ont été observés dans les biofilms qui se sont développés en mai (prélèvements de fin mai), en 2005, comparés aux périodes précédentes de développement. L'analyse des variances, calculées sur l'ensemble des données entre les différentes dates de prélèvement, a mis en évidence que cette baisse était significative par rapport aux prélèvements précédents (Test de Kruskal-Wallis, méthode de Dunn, $P < 0,05$). Si, à cette même date, une baisse a aussi été observée en 2006 sur certaines stations (bassin versant du Sousson et stations aval de Save (Espaon, Cazaux)), elle ne s'est pas avérée significative sur l'ensemble des stations (Test de Kruskal-Wallis, méthode de Dunn, $P > 0,05$).
 - Corrélations entre certains paramètres environnementaux et les paramètres biologiques quantitatifs

Le calcul des corrélations de Pearson entre certains paramètres environnementaux (concentration totale en herbicides, concentration en nitrates, en nitrites, en orthophosphates et en phosphore total) et les concentrations en MO et en « chlorophylle a » n'a pas permis de mettre en évidence des liens statistiquement significatifs entre les variations de ces différents paramètres, pour chacune des deux campagnes de mesures 2005 et 2006.

b) Qualitatifs

- L'abondance relative des formes anormales

La comparaison des résultats d'abondance relative des frustules déformés, ou formes anormales, a mis en évidence de fortes divergences entre les échantillons prélevés sur des substrats naturels et ceux prélevés sur des substrats artificiels (Corrélation de Pearson, $P > 0,05$).

Les formes anormales ont été dénombrées en plus grand nombre dans les échantillons prélevés sur des galets en faciès lotique. En mars 2005, sur certaines stations du bassin versant du Sousson (Cedon, Auch et Dareous), des valeurs d'abondance très fortes (respectivement 165‰, 60‰, 40‰) ont ainsi été relevées. Si une abondance élevée (60‰) a aussi été observée dans l'échantillon prélevé fin mai à la station Espaon sur la Save, les valeurs obtenues pour les autres stations étudiées n'ont pas dépassé les 20‰. Malgré des valeurs nettement inférieures, les données issues des substrats artificiels, ont aussi mis en évidence des abondances en formes anormales plus élevées sur les stations du bassin versant du Sousson, que ce soit par échantillon (20-30‰) ou à partir des données cumulées sur toute la campagne (Figure 41).

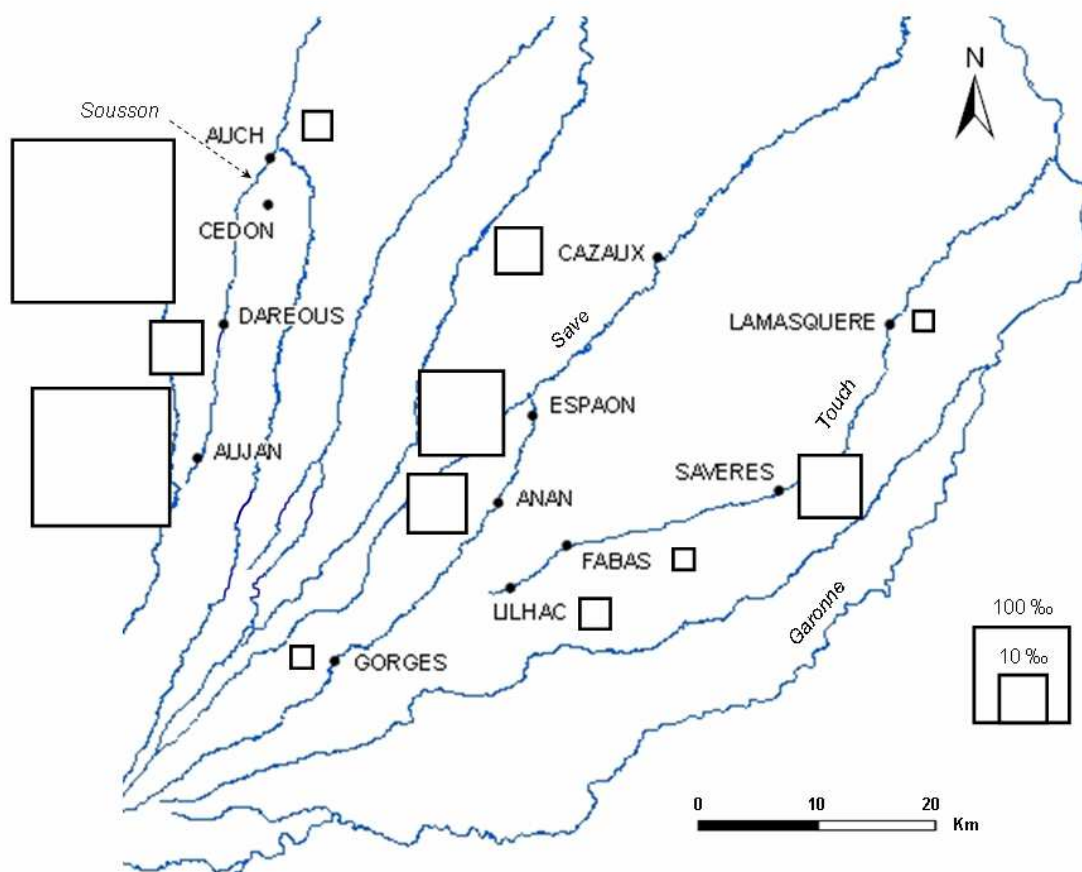


Figure 41 : Carte des abondances relatives cumulées en formes anormales dénombrées sur les substrats artificiels en 2005

Le suivi de l'évolution de ce paramètre à partir des données issues des substrats artificiels a permis d'observer une augmentation significative, fin mai 2005 (Test de Kruskal-Wallis, Méthode de Dunn $P < 0,05$), par rapport aux deux séries de prélèvements précédentes, des valeurs d'abondance en formes anormales.

En 2006, même si les valeurs ont été plus faibles, des abondances élevées ont aussi été observées dans les prélèvements effectués début mai sur substrats naturels dans le bassin versant du Sousson (46‰ à la station Cedon et 23‰ à la station Aujan) et, dans une moindre mesure, dans les bassins de la Save et du Touch (30‰ à la station Espaon, 29‰ à la station Savères et 23‰ à la station Aujan). Dans le cas des échantillons prélevés sur les substrats artificiels, les valeurs sont demeurées très faibles. Elles n'ont dépassé que rarement les 10‰ pour osciller plutôt autour de 5‰.

L'évolution spatio-temporelle des abondances en formes anormales ne suit pas les variations des concentrations totales en pesticides mesurées dans les cours d'eau que ce soit pour les données issues des substrats naturels comme celles issues des substrats artificiels (Corrélation de Pearson, $P > 0,05$).

- La diversité

Le suivi de la diversité calculée à partir l'indice de Shannon¹ sur le bassin versant du Sousson a mis en évidence une baisse de ce paramètre à l'exutoire du bassin (station Auch) à partir des prélèvements de début mai pour les deux campagnes de prélèvements (2005 et 2006). Dans le cas du bassin versant de la Save, une baisse de la diversité dans le périphyton a aussi été observée à cette même date à la station la plus en aval sur la Save (Cazaux) en 2005 et 2006. En ce qui concerne le bassin versant du Touch, des valeurs relativement faibles de diversité ont été relevées, le 09 mai 2005, à la station Fabas. Enfin fin mai 2006, la diversité générale s'est avérée plus faible dans la série de prélèvements réalisée sur ce bassin.

¹ Cet indice prend en compte dans son calcul la présence et aussi l'abondance des espèces pour estimer la diversité d'une communauté.

c) La répartition spatiale des communautés de diatomées benthiques en fonction des paramètres environnementaux

La représentation graphique de l'analyse des correspondances canoniques (ACC) de la composition en espèces des communautés prélevées sur les lames de verre immergées sur les différentes stations à partir des données de concentration en nitrates (N-NO₃) et de concentration totale en herbicides a mis en évidence, pour toutes les dates de prélèvement, que la station Gorges se dégageait des autres stations (Figure 42 et Annexe C). Des résultats similaires ont été obtenus à partir des données issues des prélèvements sur substrat naturel.

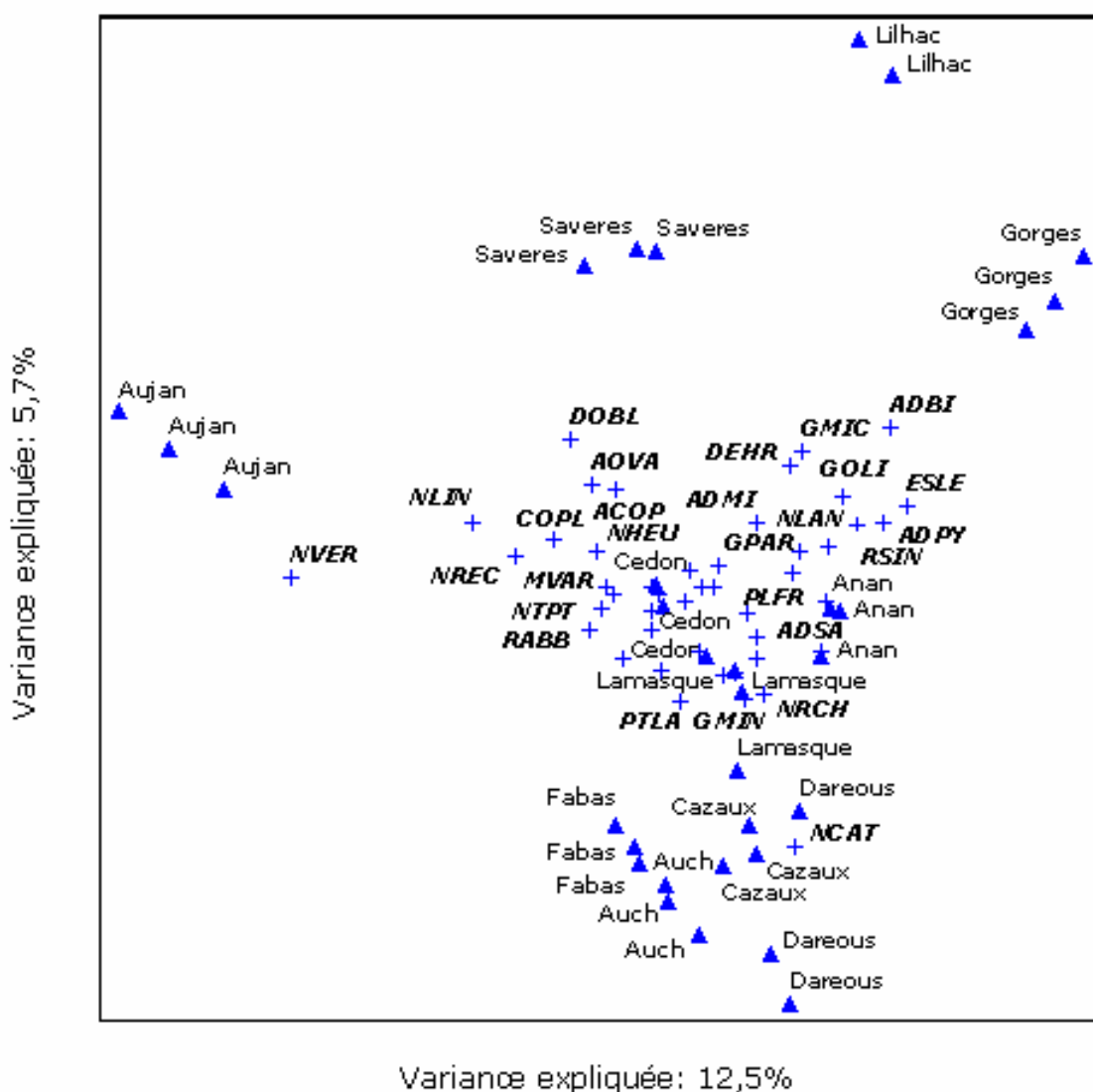


Figure 42: Analyse des Correspondances Canoniques des communautés de diatomées benthiques prélevées sur les substrats artificiels le 09 mai 2005 à partir des concentrations totales en nitrates et en herbicides comme variables environnementales

Une discrimination claire est apparue à de nombreuses reprises entre la station Gorges d'une part et les stations Auch et Cazaux d'autre part. Les communautés de la station Gorges ont semblé être caractérisées par la présence d'espèces comme *Encyonema silesiacum* (Bleisch in Rabh.) (ESLE),

Achnantheidium pyrenaicum (Hustedt) (ADPY) et *Achnantheidium biasolettianum* (Grunow in Cl. & Grun.) (ADBI) et les stations Auch, et dans une moindre mesure Cazaux, par des espèces telles que *Navicula tripunctata* (O.F.Müller) (NTPT), *Mayamaea atomus* (Hustedt) (MAPE) et *Melosira varians* Agardh (MVAR). Cette dernière espèce a principalement été observée dans les communautés prélevées sur les substrats naturels. Les communautés prélevées sur les stations en amont (Aujan, Lilhac) où la taille du cours d'eau est très réduite et où son caractère permanent est incertain se sont aussi distinguées des communautés des autres stations à plusieurs reprises (avril-début mai).

Afin d'affiner l'interprétation, l'ACC a été conduite sur les données écologiques (Préférences trophiques, Caractères halophiles, saprophyles, Voies métaboliques des espèces) des communautés.

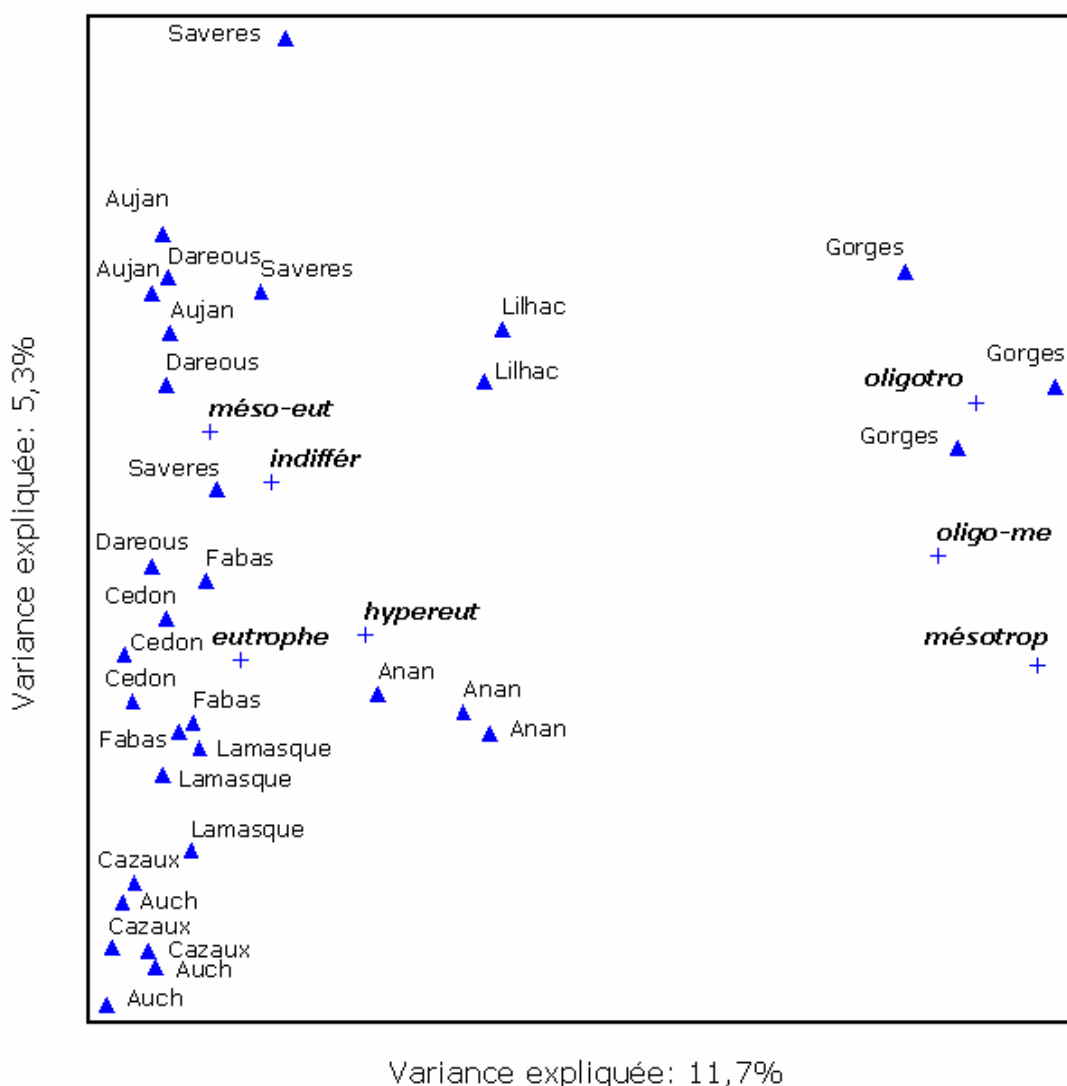


Figure 43 : Analyse des Correspondances Canoniques des communautés de diatomées benthiques prélevées sur les substrats artificiels le 09 mai 2005, en fonction des préférences trophiques des espèces (*hypereutrophe*, *eutrophe*, *méso-eutrophe*, *indifférent*, *mésotrophe*, *oligo-mésotrophe*, *oligotrophe*) (Variables environnementales prises en compte : concentrations totales en nitrates et en herbicides)

La représentation graphique de ce traitement statistique souligne que les communautés des différentes stations se différencient principalement par les préférences trophiques des espèces (Figure 43 et Annexe D). Ainsi il est apparu une discrimination très claire entre la station Gorges, qui a présenté des communautés oligotrophes à oligo-mesotrophes, et la station Auch avec des communautés eutrophes pour les deux campagnes de terrain. En 2005, l'étude des autres stations les plus aval sur la Save (Cazaux) et sur le Touch (Lamasquère) a aussi mis en évidence une prédominance de communautés eutrophes pour les trois dernières tournées (09 mai, 30 mai et 21 juin). En ce qui concerne les autres stations, il semble que leurs communautés soient plus caractéristiques de conditions proches des milieux eutrophes, exception faite de la station Lilhac. Cette discrimination entre les stations selon les préférences trophiques des espèces a semblé nettement moins marquée au sein des communautés prélevées sur substrats naturels.

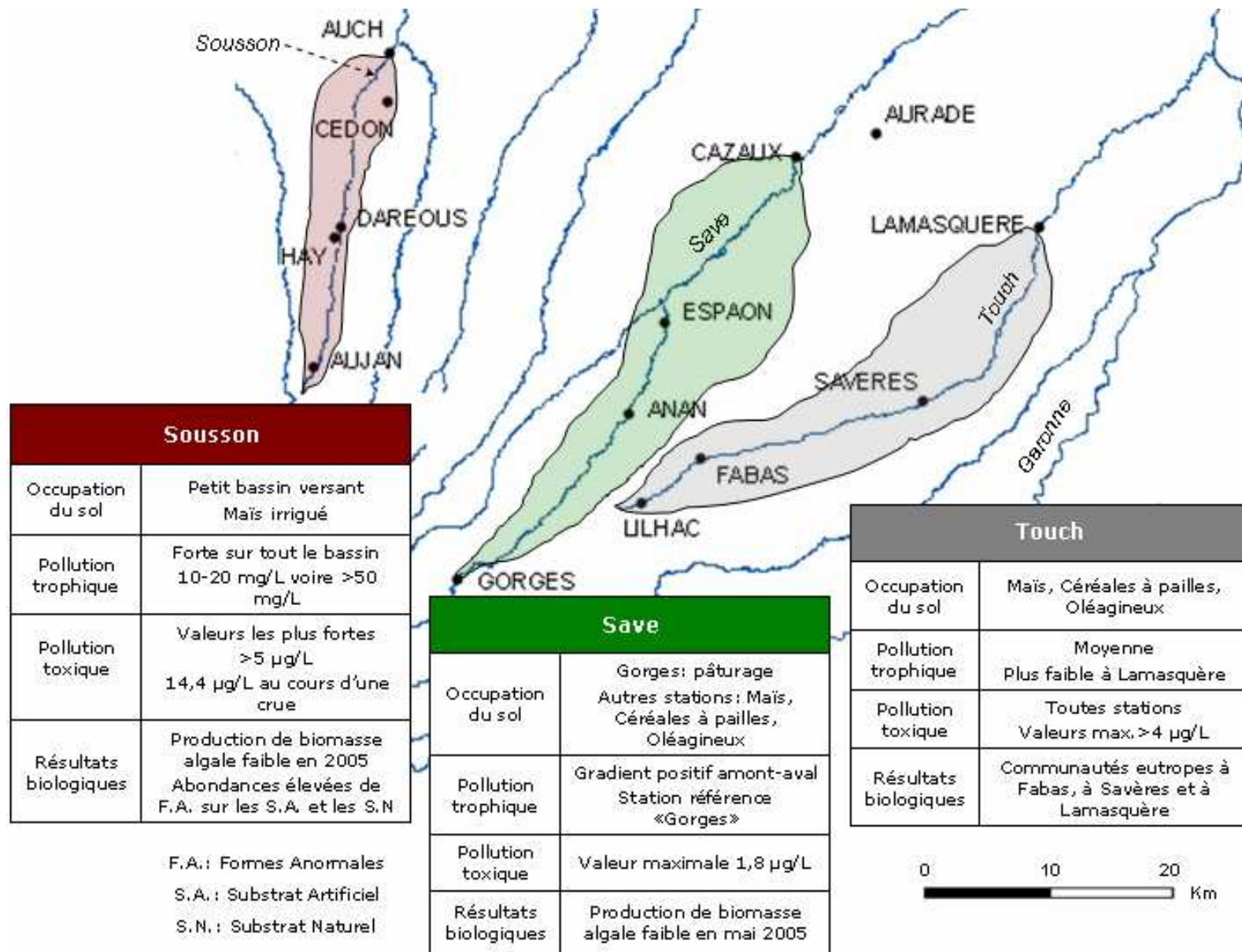


Figure 44 : Carte bilan des données et résultats obtenus sur les trois principaux bassins versants étudiés

D./ Discussion

Ce travail de recherche a été initié pour répondre aux lacunes connues des indices biologiques « diatomées » dans la détection des pollutions dues aux pesticides. En plus des paramètres qualitatifs classiques utilisés jusqu'à présent pour évaluer la qualité des eaux (composition en espèces, abondance relative), il est apparu nécessaire d'étudier des paramètres quantitatifs (concentrations en MO, en pigments chlorophylliens) dont la sensibilité a été démontrée, à de nombreuses reprises, en laboratoire (De Noyelles *et al.* 1982; Kosinski *et al.* 1984; Lynch *et al.* 1985; Krieger *et al.* 1988; Jurgensen *et al.* 1990; Kasai *et al.* 1995; Berard *et al.* 1996; Okay *et al.* 1996; Peres *et al.* 1996; Guasch *et al.* 1997; Tang *et al.* 1997; Carder *et al.* 1998; Guasch *et al.* 1998; Seguin *et al.* 2001; Schmitt-Jansen *et al.* 2005; Weiner *et al.* 2007). La première étape de ce travail a donc consisté en un suivi de l'évolution, dans des conditions naturelles, de ces différents paramètres au sein de biofilms prélevés sur des substrats artificiels.

1 La qualité des eaux dans les cours d'eau étudiés

A partir des données de concentrations en nutriments, en herbicides et des valeurs d'indices biologiques « diatomées », nous avons cherché, dans un premier temps, à caractériser du point de vue des pollutions d'origine agricole l'état des écosystèmes aquatiques dans lesquels se sont développées les communautés de diatomées benthiques.

a) La qualité trophique des eaux

Les concentrations des principaux nutriments (nitrate et phosphate) dans les cours d'eau des coteaux de Gascogne ont été mesurées afin de caractériser l'ambiance trophique à laquelle les diatomées ont été exposées. La pollution due aux fertilisants agricoles est, en effet, connue pour influencer sur la réponse des algues aux pesticides (Guasch *et al.* 1997; Berard *et al.* 2001; Navarro *et al.* 2002).

Le suivi de ces concentrations dans les eaux a montré que les cours d'eau étudiés des coteaux de Gascogne étaient sujets à une forte pollution par les nitrates. En se fondant sur les critères du SEQ¹-eau « cours d'eau », cette contamination est apparue comme la principale cause de déclassement de la qualité trophique des eaux. En l'absence de zones urbaines importantes le long des cours d'eau étudiés, l'agriculture apparaît clairement comme la principale source de pollution trophique des eaux sur la zone d'étude.

Ce suivi a mis en évidence que, de toutes les stations choisies comme stations de référence, seule la station Gorges présentait une qualité trophique des eaux nettement supérieure, les stations Aujan, Lilhac et Jasse étant affectées par une pollution agricole et Organ et Lilhac par des débits trop faibles en période d'étiage.

Cette pollution est apparue aussi particulièrement importante sur les stations à l'exutoire de petits bassins versants agricoles (Sousson, Auradé, Hay, Vermeil) où les activités agricoles sont présentes de la source jusqu'à l'exutoire. L'absence d'affluents importants limite les possibilités de dilution de la

¹ SEQ : Système d'Evaluation de la Qualité

pollution. La taille même de ces bassins et la présence de pentes (comme sur toute la zone des coteaux de Gascogne) sont aussi de facteurs qui accélèrent le rejet dans le cours d'eau des substances appliquées sur les sols ou sur les cultures. Pour certains auteurs, le degré de contamination des cours d'eau par les produits (fertilisants et pesticides) utilisés sur les cultures est inversement proportionnel à la surface du bassin versant (Aubertot *et al.* 2005).

Sur la Save, un gradient amont-aval négatif de qualité trophique est apparu à de nombreuses reprises. Les caractéristiques pédo-géologiques expliquent en partie cette situation. En effet, la station la plus en amont (Gorges) est située sur les dernières digitations du plateau de Lannemezan. Or sur ce type de formation géologique, les sols sont plus acides et plus pauvres en éléments minéraux que les sols septentrionaux de la zone d'étude (Enjalbert 1960). Cette région serait donc moins favorable au développement de grandes cultures intensives d'où le maintien d'une activité agricole de type polyculture-élevage. Une fois dépassées les dernières formations du plateau de Lannemezan, la qualité des eaux tend à se dégrader progressivement vers l'aval. Cette détérioration de la qualité trophique des eaux sur les stations les plus en aval (Espaon et Cazaux) est intervenue principalement durant les périodes connues d'apport de fertilisants aux cultures (mi-mars pour les cultures d'hiver de céréales, et début mai et fin mai pour le semis du maïs et du tournesol).

Un gradient positif amont-aval de concentration en nitrates a aussi été observé sur le Touch jusqu'à la station Savères. La baisse des concentrations en nitrates à la station Lamasquère, à partir de la mi-avril, est probablement liée, en l'absence d'autres affluents, à un effet de dilution suite à des lâchers de la retenue de Poucharramet (31). De nombreuses retenues collinaires sont en effet disséminées sur la zone afin de soutenir le niveau des cours d'eau sujets à de nombreux prélèvements pour l'irrigation des cultures de la zone.

Ces résultats confirment l'état des lieux plus global réalisé par l'Agence de l'eau Adour Garonne (Agence de l'eau Adour-Garonne 2005; Agence de l'eau Adour-Garonne 2006). Exception faite de la station Gorges sur la Save, toutes les stations de la zone d'étude sont affectées par une pollution trophique importante, principalement due aux nitrates. Cette pollution trophique apparaît plus marquée sur les petits bassins versants (Sousson, Auradé, Hay, Vermeil).

b) La qualité toxique des eaux

En parallèle des éléments nutritifs, les concentrations en herbicides dans les eaux ont aussi été suivies afin de caractériser, dans le temps et dans l'espace, l'intensité de la pollution due aux pesticides.

Les concentrations les plus élevées, supérieures à 10µg/L, ont été relevées dans des échantillons prélevés en période de crue. Cette concomitance entre les crues et les valeurs élevées de concentration en pesticides a déjà été mentionnée par de nombreux auteurs (Brockway *et al.* 1984; Hamala *et al.* 1985; WILLIAMS *et al.* 1995; Seguin *et al.* 2001; Cour des Comptes 2002; Lockert *et al.* 2006). La pollution des cours d'eau par les pesticides semble intervenir principalement après des épisodes pluvieux importants au cours des crues. Des observations similaires ont été réalisées sur le Sousson par Colin (2000). Les prélèvements ponctuels ne permettent donc pas d'estimer finement les flux réels de pesticides dans les cours d'eau. En effet la pollution par les pesticides apparaît beaucoup

plus dépendante des variations des régimes hydrauliques. En l'absence de données sur les concentrations en période de crue, la comparaison entre les différentes stations et les différents bassins versants étudiés se révèle donc aléatoire. Or le suivi intégré des concentrations à l'aide de préleveurs automatiques demeure difficile à mettre en place sur un réseau de stations aussi étendu. L'utilisation de capteurs passifs semble plus appropriée dans ce type de contexte.

Malgré ces limites, il est à noter que les concentrations les plus élevées en herbicides ont été relevées sur des cours d'eau de petits bassins versants (Sousson, Hay, Vermeil) pour lesquels une importante contamination d'origine agricole par les nitrates a aussi été observée.

c) La qualité biologique des eaux

Les résultats de qualité biologique globale des eaux fournis par les indices biologiques « diatomées » ont confirmé l'efficacité de ce type d'outils pour déceler les effets des pollutions trophiques sur les communautés biologiques. Néanmoins aucun lien statistique n'a pu être mis en évidence entre les données fournies par les indices et les concentrations totales en herbicides. Cela vient confirmer les limites, déjà citées par d'autres travaux, de ce type d'outils pour révéler les pollutions des cours d'eau par les pesticides (Dorigo *et al.* 2004; Aubertot *et al.* 2005). Ces indices ont été spécialement conçus pour détecter les pollutions trophiques et non toxiques. En outre, la forte pollution trophique masque vraisemblablement les effets des pesticides sur les communautés de diatomées benthiques (Nystrom *et al.* 1999). En effet, les concentrations en nutriments influent sur l'état physiologique des algues, qui s'avère optimal dans des milieux eutrophes. Or la réponse des organismes aux toxiques est largement dépendante de leur état physiologique (Guasch *et al.* 1997; Guasch *et al.* 1998; Nystrom *et al.* 1999). Si l'utilisation des indices biologiques « diatomées » classiques n'apparaît pas suffisante pour estimer la qualité des milieux aquatiques du point de vue des pollutions dues aux pesticides agricoles, le manque de données sur les flux de ces composés dans les cours d'eau ne permet de juger de l'efficacité réelle de ces outils.

2 L'évolution des paramètres biologiques quantitatifs

Suite à cet état des lieux concernant la qualité des eaux dans les cours d'eau étudiés, notre attention s'est portée sur l'évolution de plusieurs paramètres biologiques quantitatifs du biofilm à partir des échantillons prélevés sur les lames de verre exposées à ces conditions trophiques et toxiques.

a) Les variations des concentrations de biomasse totale

La biomasse totale, constituée de la matière organique amorphe (polysaccharides,...) et de la matière organique vivante, a été étudiée afin de voir dans quelle mesure les pesticides pouvaient affecter la production de matière organique par le biofilm. Avant même les pollutions agricoles, la fermeture de certains milieux au printemps (apparition des feuilles) semble avoir eu un impact négatif sur la production de matière organique dans les biofilms, comme l'ont montré les résultats obtenus sur les stations en milieu forestier (Gorges, Lilhac, Jasse). Or les diatomées benthiques sont reconnues comme des colonisateurs primaires des substrats, essentiels au bon développement du biofilm (Korte *et al.* 1983; Ghosh *et al.* 1998; Sekar *et al.* 2004). Par conséquent, le manque de luminosité a dû

limiter l'activité photosynthétique des diatomées, seuls organismes à même de produire des quantités importantes de matière organique du fait de leur prédominance dans le biofilm, et réduire leur développement.

Sur d'autres stations de la zone d'étude (bassins versants du Sousson, de la Save et du Vermeil) une baisse de la concentration en matière organique a été observée dans les prélèvements réalisés fin mai, en 2005 et en 2006. Les biofilms prélevés sur les stations du Touch, situées en zone agricole, n'ont, par contre, pas mis en évidence une baisse similaire à cette même période. Or la qualité des eaux des stations du Touch n'est pas apparue être différente de celle relevée sur les stations des bassins cités ci-dessus, situés eux aussi en zone de grandes cultures. Par conséquent, l'absence de corrélations entre la concentration en MO et les paramètres abiotiques étudiés (nitrates, herbicides) apparaît relativement logique.

Ce résultat peut s'expliquer par la nature très globale de ce paramètre. En effet, la biomasse algale intègre la matière organique amorphe et vivante, cette dernière comprenant tous les organismes vivants présents dans le biofilm. Or l'exposition à un pesticide peut favoriser une ou plusieurs espèces au détriment d'autres sans que cela soit visible, la perte des espèces sensibles étant compensée par le développement des espèces tolérantes (Dahl *et al.* 1996). La bibliographie concernant l'impact des pesticides sur la biomasse totale est très limitée. Il a été montré que l'atrazine pouvait induire des baisses de la concentration en matière organique du biofilm (De Noyelles *et al.* 1982; Krieger *et al.* 1988; Jurgensen *et al.* 1990; Carder *et al.* 1998; Weiner *et al.* 2007). Mais ces résultats ne prennent pas en compte la forte sensibilité de ce paramètre à l'effet abrasif du courant (Ghosh *et al.* 1998). De ce fait, l'influence de certains facteurs environnementaux sur ce paramètre rend toute interprétation, quand aux effets potentiels des pesticides, très aléatoire.

b) Les variations des concentrations de biomasse algale

Le suivi de la biomasse algale a été réalisé à partir de deux paramètres : la « chlorophylle a » pour l'ensemble de la biomasse algale totale et la « chlorophylle c » pour la biomasse des diatomées. Les résultats ont fait apparaître une forte corrélation de ces deux paramètres. Les diatomées ont vraisemblablement constitué l'essentiel de la biomasse algale présente sur les lames de verre. Certaines espèces de ces micro-algues sont, en effet, connues comme des colonisateurs primaires des substrats d'où un développement plus important sur des supports vierges comme les lames de verre (Korte *et al.* 1983; Sekar *et al.* 2004).

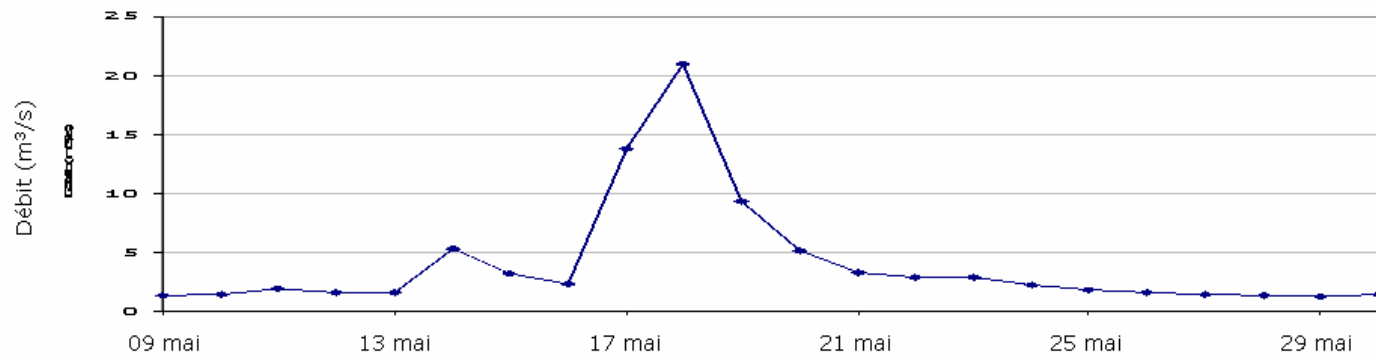
Au sein des stations ombragées (Gorges, Lilhac, Jasse) ou présentant de faibles débits (Organ), l'évolution de la biomasse algale a été relativement semblable à celle observée pour la biomasse totale (matière organique). Par contre sur la grande majorité des autres stations, la croissance de la biomasse algale a été importante principalement lors de la deuxième période de colonisation (avril-mai). Avec l'allongement de la durée des jours et l'augmentation de la température de l'eau, les conditions sont devenues favorables au développement des algues. Or fin mai, les niveaux atteints de concentration en « chlorophylle a » ont été proches, voire inférieurs, à ceux mesurés dans les prélèvements d'avril. Cela a été particulièrement le cas des prélèvements réalisés en 2005 sur les

stations des petits bassins versants (Sousson, Auradé, Vermeil) et sur les stations de la Save et du Touch situées en zone agricole (Anan, Cazaux, Savères, Lamasquère).

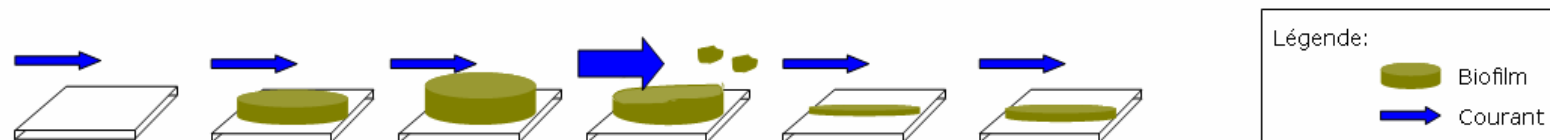
Ces observations peuvent être interprétées de différentes manières.

L'effet abrasif des crues est une hypothèse possible pour expliquer la baisse de biomasse algale enregistrée (Figure 45). En effet, les biofilms sont connus pour leur sensibilité au pouvoir érosif du courant (Ghosh *et al.* 1998). Si on compare les deux campagnes de prélèvements, on constate que le faible développement de la biomasse algale en mai a été moins marqué en 2006 qu'en 2005. Or en 2006, les cours d'eau de la région n'ont pas connu de crues printanières comme en 2005 où le débit a atteint 21 m³/s sur la Save le 18 mai (Lombez 31) (voir page 99). A première vue, l'abrasion des biofilms par les courants violents pourrait donc expliquer les faibles concentrations de « chlorophylle a » relevées fin mai en 2005. Mais l'étude des données de débit sur la Save et le Touch fait apparaître que les caisses ont, aussi, été exposées à deux pics de débit (17 et 25 avril) durant la période précédente de colonisation. Or les prélèvements effectués début mai ont montré des valeurs élevées de biomasse algale, parmi les plus fortes relevées en 2005. L'effet érosif des crues ne semble pas pouvoir expliquer cette variation dans la production de biomasse algale fin mai.

La contamination des cours d'eau par des pollutions d'origine agricole est une autre hypothèse envisageable pour interpréter cette faible production de biomasse algale en mai (Figure 45). La comparaison des données de « chlorophylle a » des stations ombragées et des stations du bassin versant du Sousson, d'une part, avec celles des stations Anan, Cazaux, Savères et Lamasquère, d'autre part, a permis de constater que les valeurs de biomasse algale entre ces stations étaient relativement proches. Les faibles niveaux de concentration en « chlorophylle a » observés sur les stations ombragées peuvent être reliés aux conditions lumineuses limitées de ces stations, l'activité photosynthétique réduite ne favorisant pas le développement des algues. Dans le cas du bassin versant du Sousson, comme nous l'avons montré précédemment, les valeurs les plus élevées en herbicides, pour la zone d'étude, ont été mesurées sur certaines de ses stations (Auch, Hay) (Figure 37). Le suivi des concentrations en nitrates dans les eaux a aussi mis en évidence, sur ce bassin, une forte pollution due aux fertilisants agricoles. Les cours d'eau de ce bassin sont, par conséquent, sujets à une forte pollution agricole, trophique comme toxique. Or de nombreux travaux de recherche ont montré que les herbicides pouvaient avoir un effet sur l'activité photosynthétique des algues, la concentration en « chlorophylle a » du périphyton et sur la biomasse algale en général (De Noyelles *et al.* 1982; Kosinski *et al.* 1984; Lynch *et al.* 1985; Krieger *et al.* 1988; Jurgensen *et al.* 1990; Kasai *et al.* 1995; Berard *et al.* 1996; Okay *et al.* 1996; Peres *et al.* 1996; Guasch *et al.* 1997; Tang *et al.* 1997; Guasch *et al.* 1998; Seguin *et al.* 2001; Schmitt-Jansen *et al.* 2005). Par conséquent, la proximité entre les valeurs faibles de « chlorophylle a » relevées sur les stations ombragées (signe d'une activité photosynthétique réduite) et celles mesurées sur les stations en zone agricole du Sousson, de la Save et du Touch laisse à penser que la faible production de biomasse algale, enregistrée fin mai 2005 sur ces dernières stations, pourrait être due à une exposition du périphyton à des herbicides lors de la crue du 18 mai.



Hypothèse: Abrasion du biofilm par le courant lors de la crue



Hypothèse: Exposition aiguë lors de la crue à des pesticides lessivés par les pluies abondantes sur les sols nus destinés aux cultures de printemps

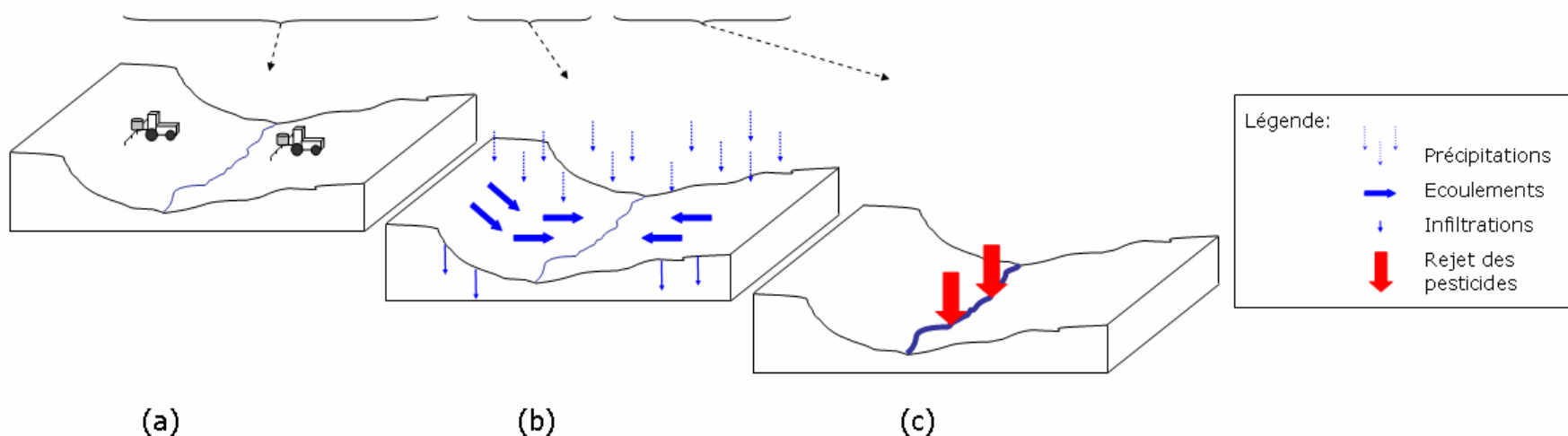


Figure 45: Représentation schématique des deux hypothèses avancées pour expliquer la baisse de production de biomasse algale observée entre le 09 mai et le 30 mai 2005

Comme nous avons pu l'observer dans nos données de mars 2006, la pollution par les pesticides dans les cours d'eau semble se concentrer durant les crues. De nombreux auteurs sont parvenus aux mêmes conclusions quant à l'occurrence de ce genre de pollution (Brockway *et al.* 1984; Hamala *et al.* 1985; WILLIAMS *et al.* 1995; Seguin *et al.* 2001; Cour des Comptes 2002; Lockert *et al.* 2006; Weiner *et al.* 2007). Ceci pourrait donc expliquer l'absence de baisse très marquée fin mai 2006 sur les périphytons prélevés. En effet, pour les périodes de colonisation étudiées, aucune crue majeure n'est intervenue durant cette campagne. Par contre, en 2005, les pluies ((b) Figure 45), qui ont précédées la crue du 18 mai, ont probablement lessivé les herbicides récemment appliqués sur les sols nus pour le semis des cultures de printemps (maïs irrigués, tournesol, soja) qui dominent sur la zone d'étude ((a) Figure 45). Conjuguées au caractère superficiel des écoulements dûs aux fortes pentes et aux propriétés des sols de la région (boulbènes peu drainant, voir pages 85-86), ces pluies ont probablement entraîné un rejet massif de ces molécules dans les cours d'eau et, par conséquent, une exposition brève mais très intense ((c) Figure 45) des diatomées à ces composés toxiques.

L'absence d'effets sur le développement de la biomasse algale sur la période précédente, alors qu'une crue a eu lieu sur cette même période en 2005, peut sembler contredire cette interprétation. Or la période entre mi-avril et début mai constitue une période intermédiaire entre les traitements herbicides de mars et de début avril sur les céréales à pailles et les traitements des sols avant le semis des cultures de printemps¹. Les quantités d'herbicides « lessivables » sont donc potentiellement moindres et, par la même, les concentrations de ces molécules dans les eaux lors des crues. Ces divers éléments peuvent expliquer l'absence d'inhibition dans le développement de la biomasse algale entre la mi-avril et le début du mois de mai 2005 comparée à la période suivante de colonisation.

Mais en l'absence de données intégrées sur les concentrations en pesticides dans les cours d'eau, notamment durant les crues, cette interprétation peut être discutée.

Si la concentration en « chlorophylle a » est mentionnée par de nombreux auteurs comme un paramètre sensible aux pesticides dans des conditions contrôlées, peu de travaux ont été réalisés dans des conditions naturelles (Guasch *et al.* 1998).

En effet, de nombreux paramètres environnementaux, comme la luminosité, peuvent interférer dans la sensibilité des diatomées aux pesticides (Guasch *et al.* 1997; Guasch *et al.* 1998; Guasch *et al.* 1998; Berard *et al.* 2001).

En outre, à de faibles concentrations et dans des milieux riches en nutriments, comme dans les cours d'eau drainant des régions agricoles, les algues ont la capacité de pallier les effets des pesticides sur leur métabolisme (Guasch *et al.* 1997; Nystrom *et al.* 1999; Schmitt-Jansen *et al.* 2005). Il a ainsi été observé une augmentation des concentrations en « chlorophylle a », appelée aussi « Greening effect », au sein de communautés exposées à des concentrations faibles en herbicides (Seguin *et al.* 2001). Ce résultat, à première vue étonnant, pourrait être la conséquence d'une production plus importante de ce pigment chlorophyllien dans les antennes pigmentaires pour compenser les effets des herbicides sur l'activité photosynthétique.

¹ Les premiers semis sur la zone d'étude débutent au début du mois de mai.

Enfin, le temps nécessaire aux algues pour récupérer après une exposition brève de type crue est inconnu. Or dans des milieux favorables à leur développement (milieux riches en nutriments comme les milieux agricoles), on peut envisager que les diatomées soient capables de compenser la perte de biomasse induite par les herbicides. Au final, lorsque les prélèvements sont réalisés, l'effet de ces molécules ne serait alors plus visible dans le biofilm.

L'étude de paramètres structuraux plus spécifiques apparaît donc nécessaire pour confirmer de possibles effets des pesticides sur les diatomées benthiques.

3 L'évolution des paramètres biologiques qualitatifs

a) Les variations spatio-temporelles de l'abondance des formes anormales

Les diatomées présentent la particularité de posséder une paroi cellulaire siliceuse, le frustule, dont la forme et l'ornementation varient entre les espèces. Or les valves, qui composent le frustule, peuvent présenter des anomalies de contour ou d'ornementation. Plusieurs travaux ont mis en évidence des frustules anormaux chez des diatomées exposées à des composés toxiques comme les pesticides ou les métaux lourds (Thomas *et al.* 1980; Fisher *et al.* 1981; McFarland *et al.* 1997; Dickman 1998; Gomez *et al.* 2003; Cattaneo *et al.* 2004; Schmitt-Jansen *et al.* 2005). Dans le cadre de notre travail de recherche, ce type d'anomalie cellulaire a été recherché dans les communautés de diatomées prélevées sur des substrats naturels et dans celles prélevées sur des substrats artificiels. Les résultats ont fait apparaître une très nette différence entre les deux types de substrats. Si dans les prélèvements effectués sur des galets des stations du Sousson, des valeurs d'abondance élevées (40-60‰) voir très élevées (165‰ à la station Cedon en 2005) ont été notées, les valeurs les plus fortes relevées sur les substrats artificiels n'ont pas dépassé, pour ces même stations, les 30‰. Entre les deux types de substrat, l'évolution spatiale de ce paramètre apparaît relativement proche, les stations du bassin versant du Sousson et la station Espaon sur la Save ayant présenté à chaque fois les plus fortes abondances en formes anormales. Par contre, l'évolution temporelle de ce paramètre diffère entre les deux types de substrat. Les données issues des substrats artificiels ont ainsi mis en évidence une augmentation significative, fin mai 2005, de l'abondance en formes anormales, par rapport aux séries précédentes de prélèvements. Or comme nous l'avons mentionné précédemment, les pesticides agricoles sont soupçonnés, sur la même période en 2005, d'être à l'origine d'un développement plus faible de la biomasse algale. En l'absence de carence établie en silice dans les eaux des cours d'eau des coteaux de Gascogne (Perrin *et al.* 2006), cette augmentation de l'abondance des formes anormales de diatomées pourrait donc être associée à une exposition à des pesticides agricoles.

Une hypothèse peut être avancée pour expliquer les différences en terme d'abondance observées entre les prélèvements effectués sur substrats naturels et ceux réalisés sur substrats artificiels. Les anomalies des frustules pourraient être, en fait, le signe d'altérations cellulaires plus profondes comme l'inhibition de la synthèse de protéines et de polysaccharides. Ces molécules sont impliquées, pour les premières, dans la condensation de la silice lors de la formation du frustule et, pour les secondes, dans les mécanismes d'adhésion aux substrats et le déplacement des cellules (Drum *et al.*

1966; Van Den Hoek *et al.* 1995). Or certains herbicides, comme le linuron, sont connus pour affecter la mobilité des diatomées (Pipe *et al.* 1984). La production de polysaccharides pourrait donc être perturbée par une exposition à ce type de composé. Par conséquent, on peut être amené à penser que les herbicides présents dans la colonne d'eau soient à l'origine, chez certaines cellules, de déformations du frustule et, dans le même temps, d'une adhésion moins forte au substrat.

Dans le cas de lames de verre, positionnées verticalement dans la colonne d'eau, les abondances plus faibles en formes anormales pourraient donc être interprétées comme résultant d'un décrochage des individus anormaux sous l'effet du courant. A l'inverse dans les biofilms présents sur les substrats naturels, dont le stade de développement est plus poussé que sur les lames de verre, les formes anormales resteraient imbriquées dans la matrice et résisteraient ainsi mieux à l'effet érosif du courant.

En l'absence de données intégrées concernant les flux de pesticides dans les eaux, aucun lien n'a pu être établi entre l'induction de frustules anormaux et une pollution par ces composés toxiques. En outre, les données issues des substrats naturels sont difficilement exploitables pour relier la présence d'anormalités à un événement précis dans le temps (crue par exemple). En effet, le biofilm, qui se développe sur ce type de substrats, résulte de l'accumulation progressive de strates très différentes entre elles. En outre, à partir de ce genre de données, la comparaison des stations entre elles s'avère compliquée l'âge du biofilm n'étant pas estimable. Or des organismes ou des matrices biologiques d'âges différents ne répondent pas de la même manière à un stress environnemental (Forbes *et al.* 1997; Lagadic *et al.* 1997).

b) Les variations spatio-temporelles de la diversité

L'indice de Shannon a mis en évidence une diversité plus faible comparée aux stations amont, au sein des communautés prélevées à l'exutoire du bassin versant du Sousson (Auch) et à la station la plus en aval sur la Save (Cazaux). Or les prélèvements ponctuels ont montré que ces stations étaient affectées par une pollution par les herbicides plus importante que sur les parties plus amont des deux bassins versants. Si certains auteurs ont observé une diminution de ce paramètre dans des communautés exposées à de l'atrazine (Berard *et al.* 1996), d'autres travaux n'ont pas mis en évidence, à des concentrations (2 et 30µg/L) proches de celles relevées sur le terrain, d'effets de ce même herbicide et d'autres substances actives (Jurgensen *et al.* 1990; Seguin *et al.* 2001). Dans notre étude, mises à part les deux stations citées précédemment, aucune variation spatio-temporelle, pouvant être reliée à une exposition à des pesticides agricoles, n'a été identifiée pour ce paramètre.

c) L'évolution de la composition en espèces des communautés entre les stations étudiées

L'analyse multivariée de la composition en espèces des communautés confirme la place de la station Gorges au sein du réseau de stations étudiées. Des espèces relativement sensibles ou indifférentes aux pollutions trophiques comme ESLE, ADPY ou ADBI ont ainsi été dénombrées préférentiellement au sein des communautés prélevées sur cette station. A l'inverse, sur des stations aval comme Auch ou Cazaux, les communautés ont plutôt été dominées par des espèces tolérantes aux conditions

eutrophes (NTPT, MAPE et MVAR). L'analyse des préférences écologiques a confirmé la discrimination qui s'est opérée entre les stations selon les préférences trophiques des espèces. Les autres préférences écologiques (Caractères halophiles/saprophiles, Voies métaboliques des espèces) n'ont pas permis de faire apparaître une claire discrimination entre les stations.

De nombreux travaux ont montré que les espèces eutrophes étaient plus tolérantes à une exposition à des pesticides (Hamala *et al.* 1985; Goldsborough *et al.* 1986; Berard *et al.* 1996; Peres *et al.* 1996; Guasch *et al.* 1998; Munoz *et al.* 2001; Berard *et al.* 2003; Schmitt-Jansen *et al.* 2005). Or des concentrations élevées en herbicides dans les eaux ont été observées sur des stations comme Cazaux, et encore plus Auch.

Cette discrimination des stations selon les préférences eutrophes des espèces est apparue nettement moins marquée au sein des communautés de diatomées prélevées sur substrats naturels. Cela peut être lié au niveau de maturité du biofilm. En effet plusieurs auteurs ont montré que les biofilms matures étaient capables de s'affranchir des niveaux de nutriments dans les eaux et de pourvoir ainsi à leurs propres besoins trophiques (Ivorra *et al.* 2000). Or sur les substrats naturels, les biofilms se sont développés sur des périodes plus longues que sur les substrats artificiels. En outre, comme l'ont montré Biggs *et al.* (1990), un biofilm ne devient mature qu'après, en moyenne, trois semaines de développement. Les biofilms prélevés sur les lames de verre n'avaient pas atteint ce pallier. Par conséquent, les niveaux de trophie des eaux ont probablement eu moins d'impact sur les communautés de diatomées présentes sur les substrats naturels que sur celles s'étant développées sur les substrats artificiels.

La variabilité naturelle liée aux paramètres environnementaux et l'absence de données concernant les flux de pesticides dans les cours d'eau ne nous permettent pas de conclure quant à la sensibilité d'un descripteur du biofilm et des communautés de diatomées benthiques vis-à-vis des pesticides. Une expérimentation reproduisant en partie les conditions naturelles, dans des conditions semi-contrôlées, nous a donc semblé nécessaire afin de tester la validité des hypothèses avancées concernant la sensibilité supposée de certains paramètres (concentration en « chlorophylle a » et abondance des formes anormales) en s'affranchissant de la variabilité naturelle liée aux paramètres environnementaux (luminosité, courant, concentration en nutriment)

Chapitre II.: Identification, à l'échelle de la communauté, de paramètres sensibles chez les diatomées benthiques aux pesticides agricoles en conditions semi-contrôlées

Les deux campagnes de prélèvements sur les cours d'eau des coteaux de Gascogne ont permis de mettre en évidence une pollution importante des eaux par des pesticides. Des concentrations élevées en substances actives ont été relevées, principalement au cours de crues. Le suivi de certains paramètres biologiques globaux a mis en évidence des variations spatiales et temporelles pouvant être reliées à une exposition à des pesticides.

Mais en l'absence de données intégrées sur les flux de ces substances toxiques, il s'est avéré difficile d'établir un lien de causalité entre l'exposition à des pesticides et les variations observées de certains paramètres biologiques. En outre, la forte variabilité de paramètres environnementaux (luminosité, courant, concentrations en nutriments), connus pour influencer sur la réponse des diatomées benthiques à une pollution par des pesticides, perturbe l'interprétation des résultats.

Par conséquent, une expérimentation en conditions contrôlées a été menée à partir de communautés de diatomées benthiques prélevées sur une station de la zone d'étude et transférées dans des canaux artificiels afin de s'affranchir des variations liées aux milieux naturels qui peuvent interférer dans la réponse des communautés suite à une exposition par des pesticides agricoles.

L'objectif de ce travail de recherche descriptif a donc été d'étudier, en conditions contrôlées, les effets de produits phytosanitaires agricoles, utilisés sur la zone d'étude et représentatifs des grands familles chimiques de molécules, sur des communautés de diatomées benthiques issues d'un cours d'eau des coteaux de Gascogne.

Tout l'enjeu de cette expérimentation a été d'étudier dans quelle mesure les variations observées *in situ* de certains paramètres biologiques du biofilm pouvaient être associées à une exposition à des herbicides agricoles, avec des concentrations proches de celles relevées dans les cours d'eau de la zone d'étude.



Figure 46: Dispositif de collecte des diatomées benthiques dans le milieu naturel pour l'expérimentation en microcosmes

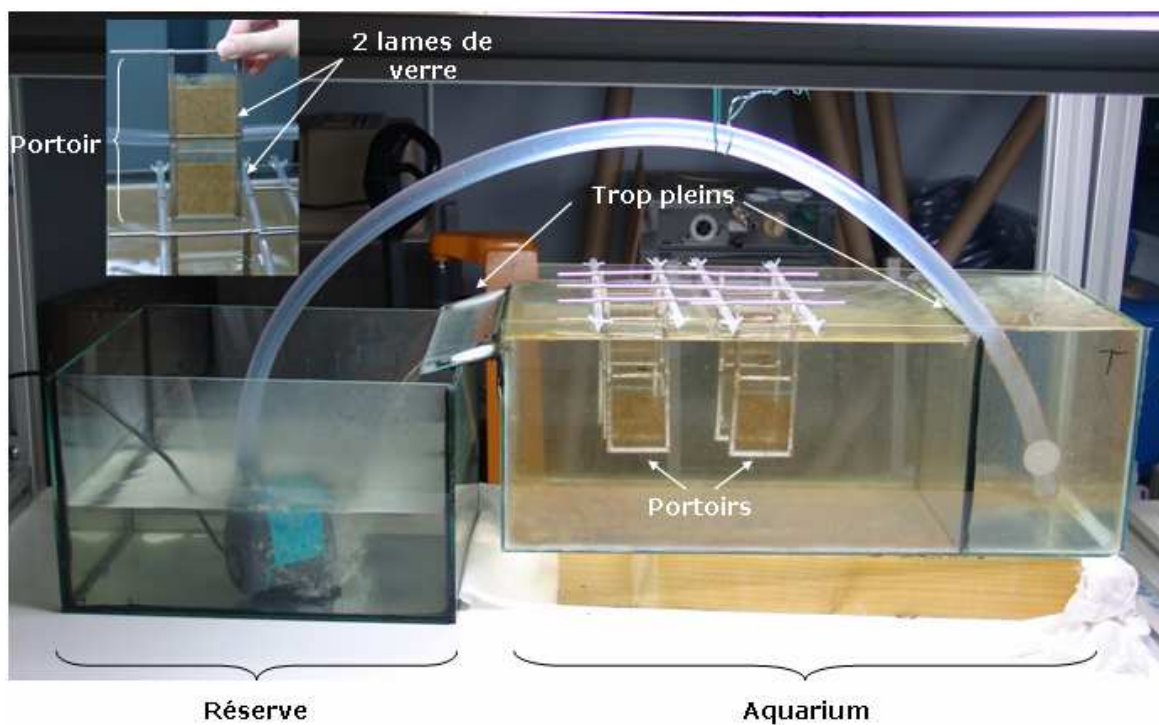


Figure 47: Microcosme utilisé lors de l'étude

A./ Matériels et Méthodologie

1 Dispositif expérimental

a) Colonisation *in situ* de substrats artificiels par les diatomées

Des lames de verre (60 x 70 mm), placées dans cinq caisses plastiques ajourées (Figure 46), ont été immergées sur une station déjà suivie antérieurement sur la Save (Anan 31). Le choix du site de colonisation s'est porté sur cette station car le débit de la Save était suffisant pour obtenir un développement satisfaisant du biofilm sur les lames. L'intensité de la pollution par les pesticides sur ce cours d'eau est apparue, en outre, suffisamment réduite pour disposer d'une communauté algale diversifiée. Au bout de 17 jours d'immersion, les caisses ont été retirées du milieu naturel et transférées au laboratoire. L'eau utilisée dans l'expérimentation a été prélevée sur la station afin de limiter, pour les algues, toutes formes de stress lié au changement de milieu.

b) Transfert en microcosmes

Dès leur arrivée, les lames de verre ont été introduites, deux par deux, dans des portoirs en inox disposés en trois rangées de deux portoirs dans chaque microcosme. Un microcosme était constitué d'un canal en verre [650 x 270 x 210 mm (l x L x h)], doté d'un trop plein, et d'une réserve dans laquelle était immergée une pompe (NJ 2300 Aquarium Systems NEWA) (Figure 47). L'ensemble a fonctionné en circuit fermé afin de limiter la consommation en eau. Les volumes d'eau transportés depuis la station Anan n'étaient pas suffisants pour un circuit ouvert. Afin de limiter les turbulences liées à l'arrivée de l'eau dans le canal, une lame de verre a été adjointe en tête, l'eau passant dans la partie de l'aquarium contenant les lames par surverse. Cette compartimentation du canal a été réalisée afin d'homogénéiser le flux d'eau au niveau des lames de verre. Le dispositif a été placé dans une enceinte climatisée, à une température de 18,8°C ($\pm 0,7$) et à l'obscurité afin d'éviter toute source parasite de lumière. Les microcosmes ont été soumis à un cycle d'éclairage de 14h de jour, l'éclairage étant fourni par huit rampes de deux néons (OSRAM Biolux 18W). L'homogénéité de l'éclairage a été contrôlée à l'aide d'un lux-mètre (LI-250 Li-Cor). Une fois chaque microcosme rempli, le milieu expérimental a été complété en nutriments afin d'atteindre des conditions trophiques minimales propres aux milieux agricoles (11mg/L de N-NO₃, 1,53mg/L de P-PO₄ et 4mg/L de Si). Le débit des pompes a été réglé afin d'obtenir une vitesse du courant (2,1cm/s $\pm 0,1$) favorable au développement des diatomées tout en limitant l'abrasion du biofilm.

2 Protocole d'exposition

Au bout d'une période de six jours d'adaptation ($t=6$ jours), les herbicides ont été ajoutés dans les microcosmes (Figure 48). Les algues ont été exposées, pour chaque herbicide, en continu durant 6 jours à deux concentrations: $5\mu\text{g/L}$ et $25\mu\text{g/L}$. Pour la concentration la plus forte, une exposition brève (3 jours) a aussi été réalisée. Au terme de ces trois jours, l'eau des aquariums concernés a été renouvelée et les niveaux en nitrates, en orthophosphates et en silice ont été complétés en fonction de l'évolution des concentrations en nutriments évaluée lors de précédentes expérimentations.

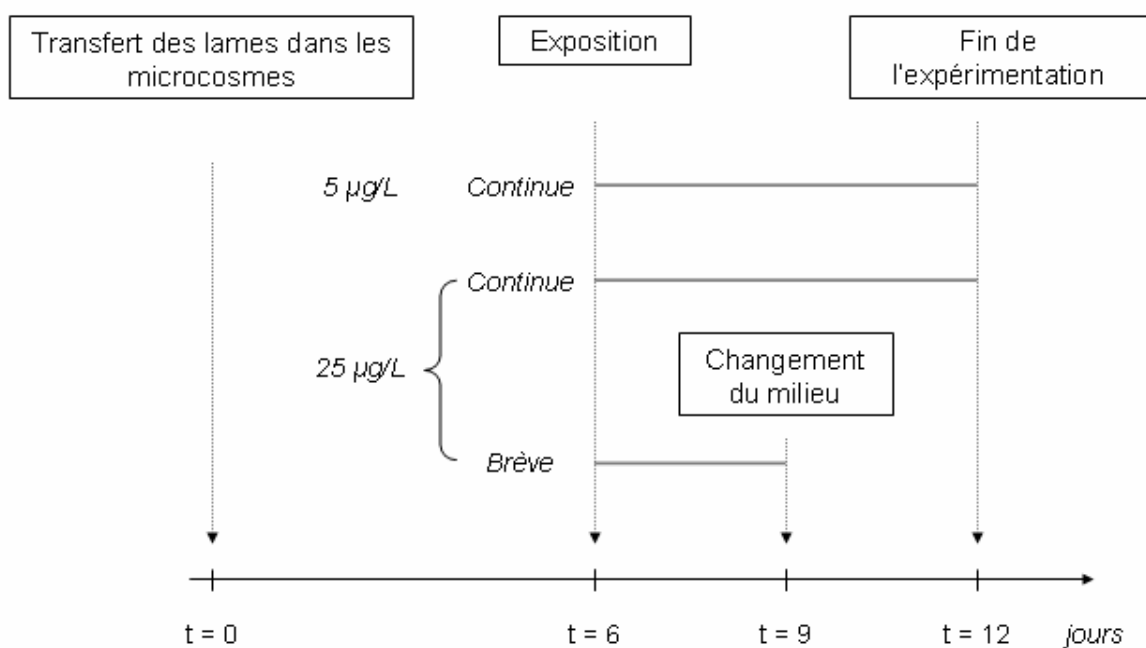


Figure 48 : Protocole d'exposition

Deux expérimentations ont été conduites pour tester en tout trois produits phytosanitaires. Afin d'étudier des populations relativement proches, les expérimentations se sont enchaînées consécutivement. Pour les mêmes raisons, les diatomées ont été prélevées en janvier-février, période au cours de laquelle les variations des paramètres environnementaux pouvant influencer sur les communautés, sont limitées. Trois produits phytosanitaires, utilisés sur la zone d'étude et appartenant à des familles importantes de substances actives herbicides homologuées sur différents types de grandes cultures, ont été choisis. Les substances actives de ces produits phytosanitaires sont :

- × l'isoproturon, de la famille des phénylurées, dont la formulation commerciale utilisée est homologuée sur blé et orge d'hiver,
- × le s-métolachlore, de la famille des chloroacétamides, dont la formulation commerciale utilisée est homologuée sur sorgho, maïs, soja et tournesol en remplacement de l'atrazine,

- × l'oxadiazon, de la famille des oxadiazoles, dont la formulation commerciale utilisée est homologuée sur tournesol et soja.

Les échantillons ont été fournis par l'exploitation de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Toulouse (INP-ENSAT) située à Poucharramet (31) sur le bassin versant du Touch, entre les stations Savères et Lamasquère.

3 Protocoles de prélèvement

a) Prélèvements lors du transfert

Lors du retrait des caisses du cours d'eau, des échantillons de matériel biologique (3 lames par caisses) et d'eau (dosages des herbicides et des nutriments) ont été prélevés afin de connaître l'état initial de notre expérimentation (t=0 jours).

b) Prélèvements lors de l'expérimentation

Par la suite, des échantillons d'eau, pour le suivi des concentrations en nutriments et en herbicides, ont été effectués à t=6 jours¹ et t=12 jours. Les dosages des nitrates et des orthophosphates dans les eaux ont été réalisés selon les mêmes méthodes analytiques citées ci-dessus (voir page 97). Les concentrations en silice ont été mesurées à l'aide d'une méthode colorimétrique (NF T 90-007). Le dosage des substances actives dans les eaux s'est appuyé sur le même protocole d'extraction que celui cité précédemment (voir page 97) mais l'analyse proprement dite a été réalisée à partir d'un spectromètre de masse (Finnigan Polaris) couplé à une chromatographie en phase gazeuse (Thermo, Trace GC 2000 Series).

Après le transfert des lames au laboratoire, le matériel biologique (3 lames par aquarium) a été prélevé à t=6 jours, t=9 jours et t=12 jours.

Les paramètres physico-chimiques classiques (conductivité, pH) ont été suivis quotidiennement afin de s'assurer de l'absence de variations des conditions physico-chimiques entre les différents aquariums.

c) Méthodologie de prélèvement et de mesure

Le biofilm présent sur chacune des lames prélevées a été raclé. L'échantillon obtenu a été ramené à un volume total de 40 mL. A partir de cet échantillon, 20 mL ont été prélevés pour doser la concentration en matière organique et 8 ml pour doser les concentrations en « chlorophylle a et c ». La méthodologie analytique de ces paramètres biologiques quantitatifs est identique à celle utilisée précédemment (voir page 98). A partir de l'échantillon restant, fixé avec du formol (35% p/p), la densité cellulaire en diatomées benthiques a été évaluée par numération des cellules viables (contenant des chloroplastes visibles) à l'aide d'une cellule hématimètre de type Nageotte. Pour chaque échantillon, trois sous-cellules de 1,25 mm³ de la cellule de Nageotte ont été comptées. Des

¹ Les prélèvements d'eau, pour le suivi des concentrations des substances actives étudiées, ont été réalisés 30 minutes après l'ajout des produits phytosanitaires.

lames pour l'identification et le dénombrement des espèces de diatomées ont aussi été réalisées sur les échantillons prélevés à t=0, t=6 et t=12 jours, selon le protocole mentionné ci-dessus (voir page 97). A partir de ces données sur la composition en espèces des communautés, les indices biologiques « diatomées » (IBD et IPS) et l'indice de Shannon pour la diversité ont été calculés. Les formes anormales de diatomées ont aussi été dénombrées.

4 Traitement des données

Les données physicochimiques et biologiques (quantitatives) ont fait l'objet d'une analyse descriptive classique. Les données concernant la composition en espèces des communautés ont été analysées, dans un premier temps, à partir d'une représentation graphique descriptive de type « camembert ». Dans un deuxième temps, afin d'identifier les espèces les plus sensibles ou les plus tolérantes aux herbicides utilisés, la pente de la régression linéaire entre les concentrations appliquées et l'abondance a été calculée pour chaque espèce. A partir de ces résultats, l'évolution des abondances de ces espèces, entre les différents canaux, a été étudiée. Pour les paramètres biologiques quantitatifs, la variabilité entre les lames exposées à un herbicide et les lames témoins a été évaluée statistiquement à partir d'une analyse de variance (Sigmastat, SPSS Inc.).

Tableau 2 : Evolution des concentrations en nutriments dans les différents canaux au cours des deux expérimentations

N-N03 (mg/L)	Témoin 1	Isoproturon		Témoin 2	s-Métolachlore		Oxadiazon	
		<i>5 µg/L</i>	<i>25 µg/L</i>		<i>5 µg/L</i>	<i>25 µg/L</i>	<i>5 µg/L</i>	<i>25 µg/L</i>
t=6 jours	20,2	16,5	16,5	30,8	30,4	29,8	30,2	29,9
t=12 jours	16,9	17,3	17,4	31,1	32,3	27,2	30,4	30,3

P-PO4 (mg/L)	Témoin 1	Isoproturon		Témoin 2	s-Métolachlore		Oxadiazon	
		<i>5 µg/L</i>	<i>25 µg/L</i>		<i>5 µg/L</i>	<i>25 µg/L</i>	<i>5 µg/L</i>	<i>25 µg/L</i>
t=6 jours	1,2	1,2	1,3	1,4	1,4	1,3	1,4	1,4
t=12 jours	0,9	1,0	1,1	1,0	1,2	0,7	1,0	1,1

Si (mg/L)	Témoin 1	Isoproturon		Témoin 2	s-Métolachlore		Oxadiazon	
		<i>5 µg/L</i>	<i>25 µg/L</i>		<i>5 µg/L</i>	<i>25 µg/L</i>	<i>5 µg/L</i>	<i>25 µg/L</i>
t=6 jours	10,0	8,0	8,5	8	9	8	7	10
t=12 jours	7,0	8,5	9,5	5	7,5	4	3,5	3,5

B./ Résultats

1 Les paramètres physico-chimiques

Le suivi des paramètres physico-chimiques (pH et conductivité) n'a pas mis en évidence de différences significatives (Test de Kruskal-Wallis $P > 0.05$) entre les canaux. Le milieu étudié s'est avéré être alcalin ($\text{pH}_{\text{moyen}} = 8,5 \pm 0,1$) avec une conductivité moyenne de $367 \mu\text{S}/\text{cm}$ (± 48). La température relevée dans les canaux est restée relativement stable autour d'une valeur moyenne de $20,1^\circ\text{C}$ ($\pm 0,4$).

2 Les concentrations en nutriments et en substances actives

a) Les nutriments

- Les nitrates

Pour le premier herbicide testé, l'isoproturon, les concentrations en nitrates sont restées stables au cours de l'expérimentation (Tableau 2). Les valeurs initiales de concentration en nitrates dans le milieu étaient plus faibles pour cette première expérimentation.

Pour les deux autres herbicides, les concentrations en nitrates sont restées relativement stables.

- Les orthophosphates

La concentration en orthophosphates a baissé sur tous les aquariums. La baisse a été plus marquée pour l'aquarium traité en continu avec du s-métolachlore à la concentration de $25 \mu\text{g}/\text{L}$.

- La silice

Les résultats mettent en évidence l'absence de carence en silice dans les aquariums. La consommation de silice semble avoir été plus importante dans les canaux traités avec du s-métolachlore et de l'oxadiazon.

Tableau 3 : Evolution des concentrations en substances actives dans les différents canaux

	Isoproturon			s-Métolachlore			Oxadiazon		
	5µg/L	25µg/L	25µg/L brève	5µg/L	25µg/L	25µg/L brève	5µg/L	25µg/L	25µg/L brève
t=6 jours	6,3	38,0	30,1	5,1	26,5	24,2	2,8	13,5	14,5
t=12 jours	5,0	20,7	< L.D.	1,6	6,2	1,8	0,4	0,6	0,5

L.D. : Limite de détection (0,1µg/L)

b) Les pesticides

▪ L'isoproturon

A t=6 jours les concentrations dosées dans les eaux se sont révélées supérieures aux concentrations attendues (Tableau 3). Trois jours après, pour la modalité la plus élevée (25µg/L), la concentration a diminué pour se stabiliser autour de 20µg/L. En ce qui concerne la modalité la plus faible, la concentration en isoproturon a peu évolué (5-7µg/L). A t=12 jours, 3 jours après le changement complet du milieu, les niveaux d'isoproturon présents dans la modalité 25µg/L « brève » ont été inférieurs aux seuils de détection.

▪ Le s-métolachlore

Les analyses ont mis en évidence une baisse continue des concentrations en s-métolachlore pour les modalités 5 et 25µg/L. Après le prélèvement à t=9 jours, le milieu de la modalité 25µg/L « brève » a été complètement renouvelé.

▪ L'oxadiazon

Les concentrations mesurées (13-15µg/L), une demi-heure après l'ajout d'oxadiazon, sont inférieures à celles attendues (25µg/L). Dès le troisième jour après l'ajout du produit phytosanitaire, une baisse très marquée des concentrations pour toutes les modalités a été observée. Les valeurs mesurées se sont avérées alors faibles de l'ordre de 0,5 à 1µg/L.

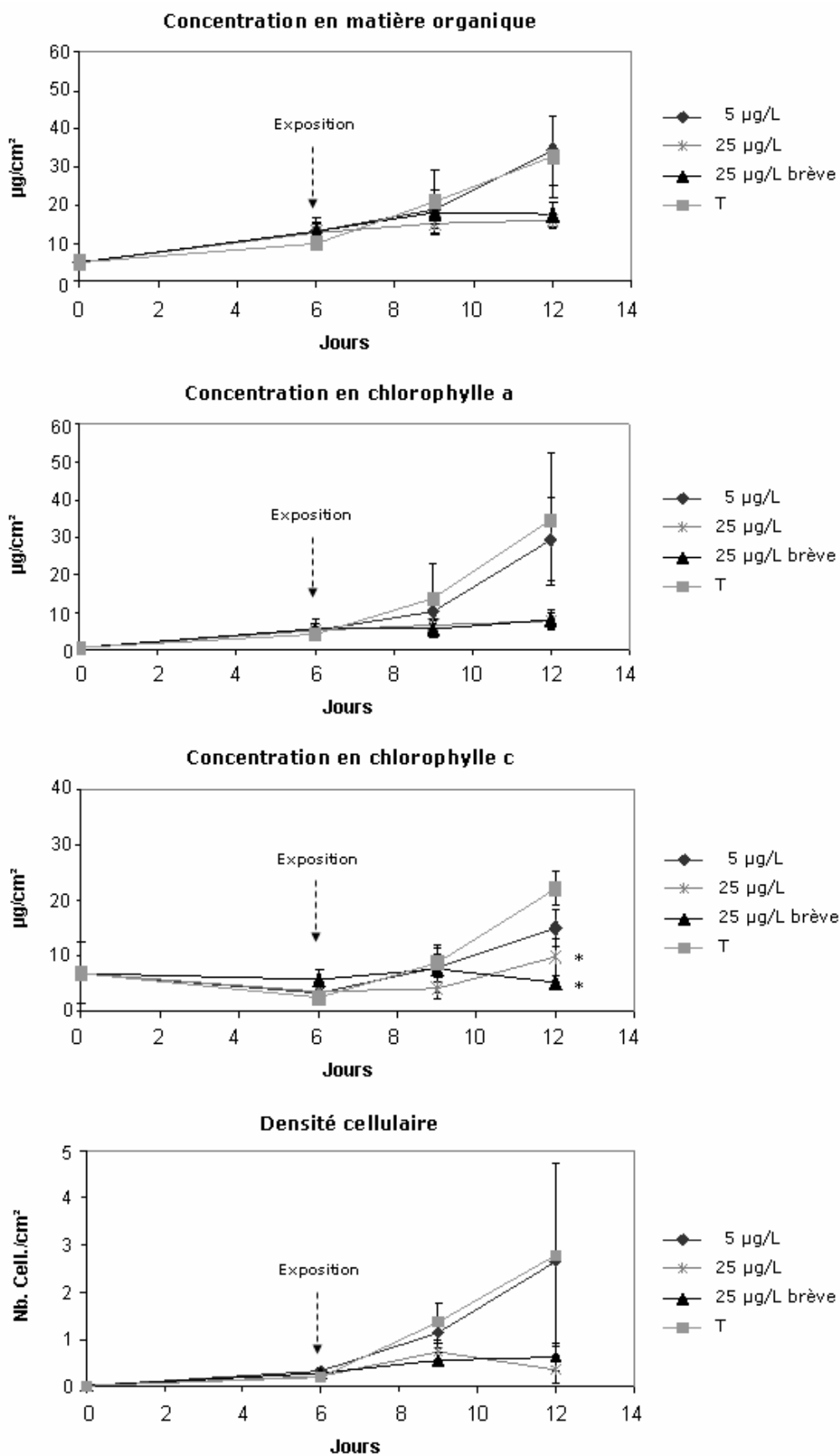


Figure 49 : Evolution des quatre paramètres biologiques quantitatifs étudiés dans le canal témoin et les canaux exposés à de l'isoproturon (* différence significative avec le témoin ; ANOVA $P < 0,05$; test de Tukey)

3 Les paramètres biologiques quantitatifs

Le calcul des corrélations entre les différents paramètres étudiés (matière organique, chlorophylle a, chlorophylle c et densité cellulaire) a été réalisé pour chacune des trois substances actives étudiées. Dans le cas des communautés traitées avec de l'isoproturon, et dans une moindre mesure du s-métolachlore, les trois paramètres quantitatifs étudiés ont suivi globalement la même tendance ($C_{\text{Pearson}} > 0,54$, $P < 0,05$). En ce qui concerne l'oxadiazon, les corrélations entre les concentrations en MO et les autres paramètres étudiés se sont révélées plus faibles ($C_{\text{Pearson}} < 0,26$, $P > 0,05$). A l'inverse les concentrations en « chlorophylle a », en « chlorophylle c », et la densité cellulaire se sont avérées fortement corrélées entre elles ($C_{\text{Pearson}} > 0,9$, $P < 0,05$). Pour les trois herbicides testés, les résultats seront présentés, pour les paramètres biologiques quantitatifs, sous forme de courbes.

a) Les effets de l'isoproturon

Dans le cas du suivi de l'évolution de la biomasse totale sur les lames, exposées à de l'isoproturon, on observe, qu'entre $t=6$ jours et $t=12$ jours, la concentration en matière organique des biofilms, appartenant aux modalités témoin et $5\mu\text{g/L}$, a continué à croître (Figure 49). Par contre, pour les deux autres modalités, la croissance de la matière organique a été inhibée suite à l'exposition au produit phytosanitaire ($25\mu\text{g/L}$: inhibition=51% ; $25\mu\text{g/L}$ brève : inhibition=46% à $t=12$ jours).

En ce qui concerne la concentration en « chlorophylle a », l'inhibition du développement de la biomasse algale est apparue plus importante que pour la matière organique ($25\mu\text{g/L}$: inhibition=78% ; $25\mu\text{g/L}$ brève : inhibition=76% à $t=12$ jours).

Pour ces deux paramètres, les résultats obtenus dans le canal témoin ne sont pas avérés significativement plus élevés que ceux relevés dans les canaux traités (ANOVA $P > 0,05$).

Si la « chlorophylle c » a suivi la même tendance que les deux paramètres précédents, les valeurs de concentration de la modalité témoin sont apparues significativement plus élevées que celles des modalités $25\mu\text{g/L}$ et $25\mu\text{g/L}$ « brève » à $t=12$ jours (ANOVA $P < 0,05$; test de Tukey).

Enfin, l'évolution de la densité cellulaire est apparue semblable à celle de la « chlorophylle a ». L'inhibition de la multiplication cellulaire s'est révélée élevée pour les deux modalités présentant les concentrations les plus fortes ($25\mu\text{g/L}$: inhibition=75% ; $25\mu\text{g/L}$ brève : inhibition=81% à $t=12$ jours).

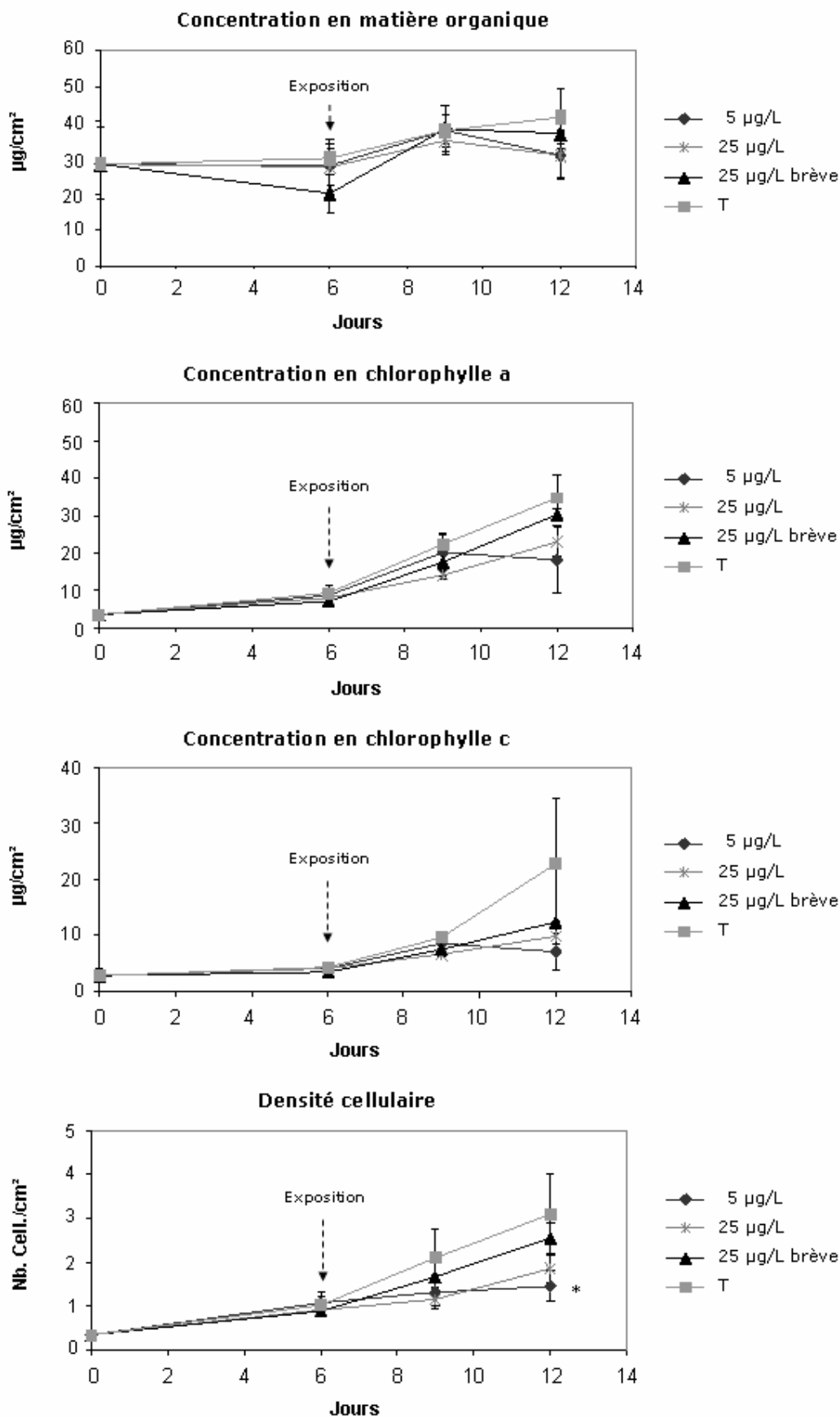


Figure 50 : Evolution des quatre paramètres biologiques quantitatifs étudiés dans le canal témoin et les canaux exposés à du s-métolachlore (* différence significative avec le témoin ; ANOVA $P < 0,05$; test de Tukey)

b) Les effets du s-métolachlore

Si les concentrations en MO ont continué à croître au cours des 3 jours qui ont suivi l'ajout du produit phytosanitaire dans les canaux, elles ont chuté par la suite (de t=9 jours à t=12 jours) dans les échantillons prélevés dans les modalités 5 et 25µg/L (Figure 50). Aucune différence significative n'a été observée entre les différentes modalités « traitées » et la modalité témoin à t=12 jours (ANOVA $P>0,05$).

En ce qui concerne la « chlorophylle a », la croissance de la biomasse algale semble avoir été, à t=12 jours, plus importante dans le canal témoin et dans le canal pour lequel l'exposition a été plus brève (25µg/L pendant 3 jours).

La différence entre la concentration moyenne en « chlorophylle c » relevée dans le canal témoin à t=12 jours et les autres canaux est apparue nettement plus marquée que pour la « chlorophylle a ». La croissance de ce paramètre dans le biofilm a été ainsi inhibée dans tous les microcosmes traités (5µg/L : inhibition=69% ; 25µg/L : inhibition=57% ; 25µg/L brève : inhibition=46% à t=12 jours). Les fortes variations, enregistrées entre les échantillons de la modalité témoin, n'ont pas permis de conclure positivement quant à la significativité des différences observées (ANOVA $P>0,05$).

Les effets du s-métolachlore sur la densité cellulaire en diatomées viables se sont avérés similaires à ceux observés pour la « chlorophylle a ». La différence entre le canal témoin et le canal exposé à la modalité 5µg/L a été, par contre, significative (ANOVA $P<0,05$; test de Tukey).

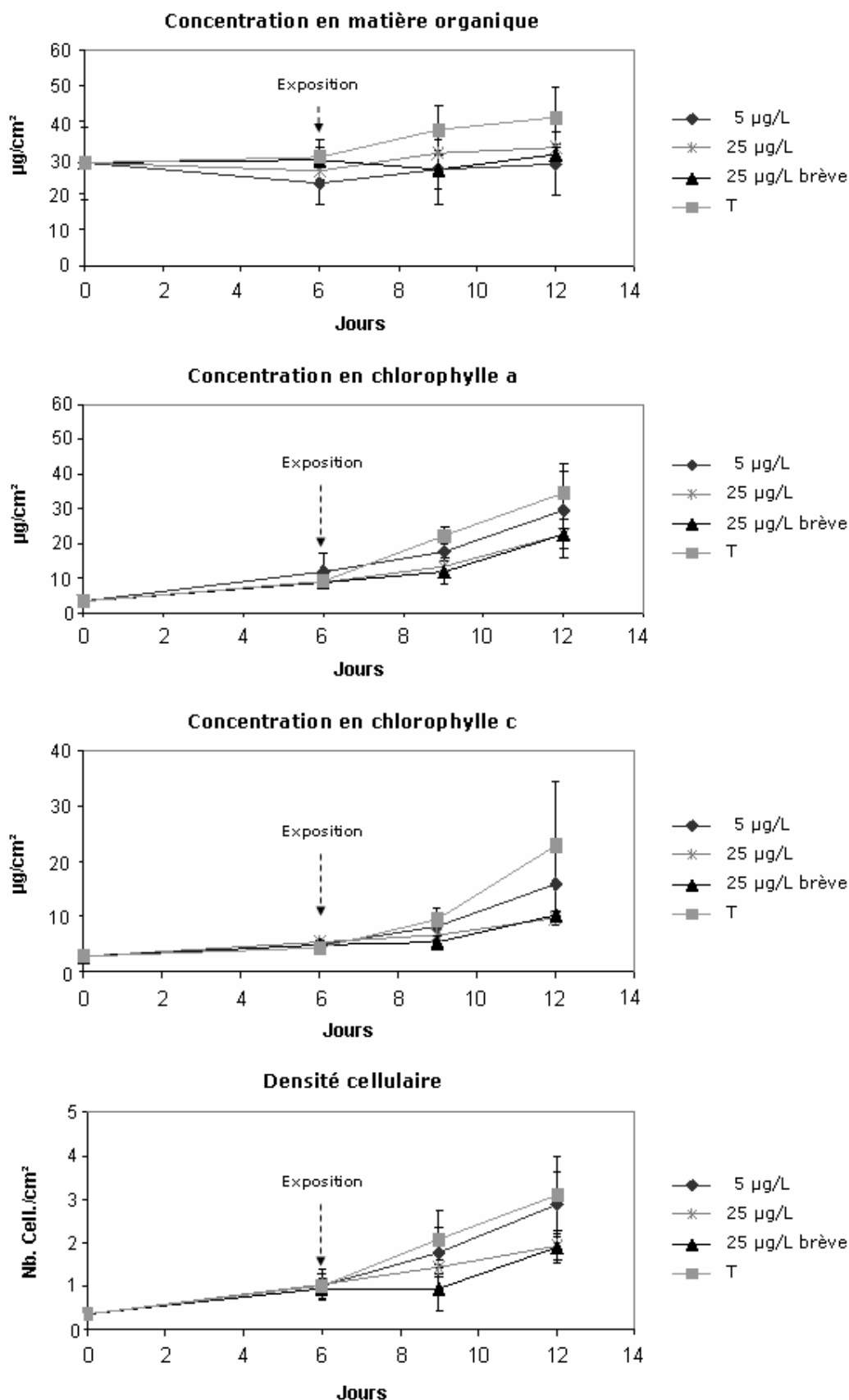


Figure 51 : Evolution des quatre paramètres biologiques quantitatifs étudiés dans le canal témoin et les canaux exposés à de l'oxadiazon (* différence significative avec le témoin ; ANOVA $P < 0,05$; test de Tukey)

c) Les effets de l'oxadiazon

Après t=9 jours, l'accroissement de la MO dans le biofilm s'est poursuivi dans le canal témoin. Pour les canaux traités en continu, la concentration en MO s'est stabilisée (Figure 51). A t=12 jours, la différence a été plus marquée entre le canal témoin et les autres canaux comparés aux résultats obtenus avec le s-métolachlore. Mais les valeurs de concentration en MO mesurées dans les échantillons, issus du canal témoin, n'ont pas été significativement plus élevées (ANOVA $P > 0,05$).

En ce qui concerne la biomasse algale, la croissance a été plus faible pour les concentrations les plus fortes sans que des différences significatives soient apparues (ANOVA $P > 0,05$) avec le canal témoin.

La tendance, concernant la concentration en « chlorophylle c », a été similaire à celle observée dans les canaux traités avec du s-métolachlore. Après t=9 jours, la croissance de ce paramètre est apparue inhibée, principalement pour les modalités avec les concentrations les plus fortes (25µg/L : inhibition=57% ; 25µg/L brève : inhibition=55% à t=12 jours). A la modalité 5µg/L, l'inhibition a été nettement plus faible (30% à t=12 jours).

La densité cellulaire a réagi de la même manière que la « chlorophylle a » suite à l'exposition à l'oxadiazon.

4 Les paramètres biologiques qualitatifs

a) L'évolution des indices biologiques

Les résultats concernant les notes de qualité des eaux, calculées à partir de l'IBD et de l'IPS pour les différents canaux, sont présentés dans la figure ci-dessous.

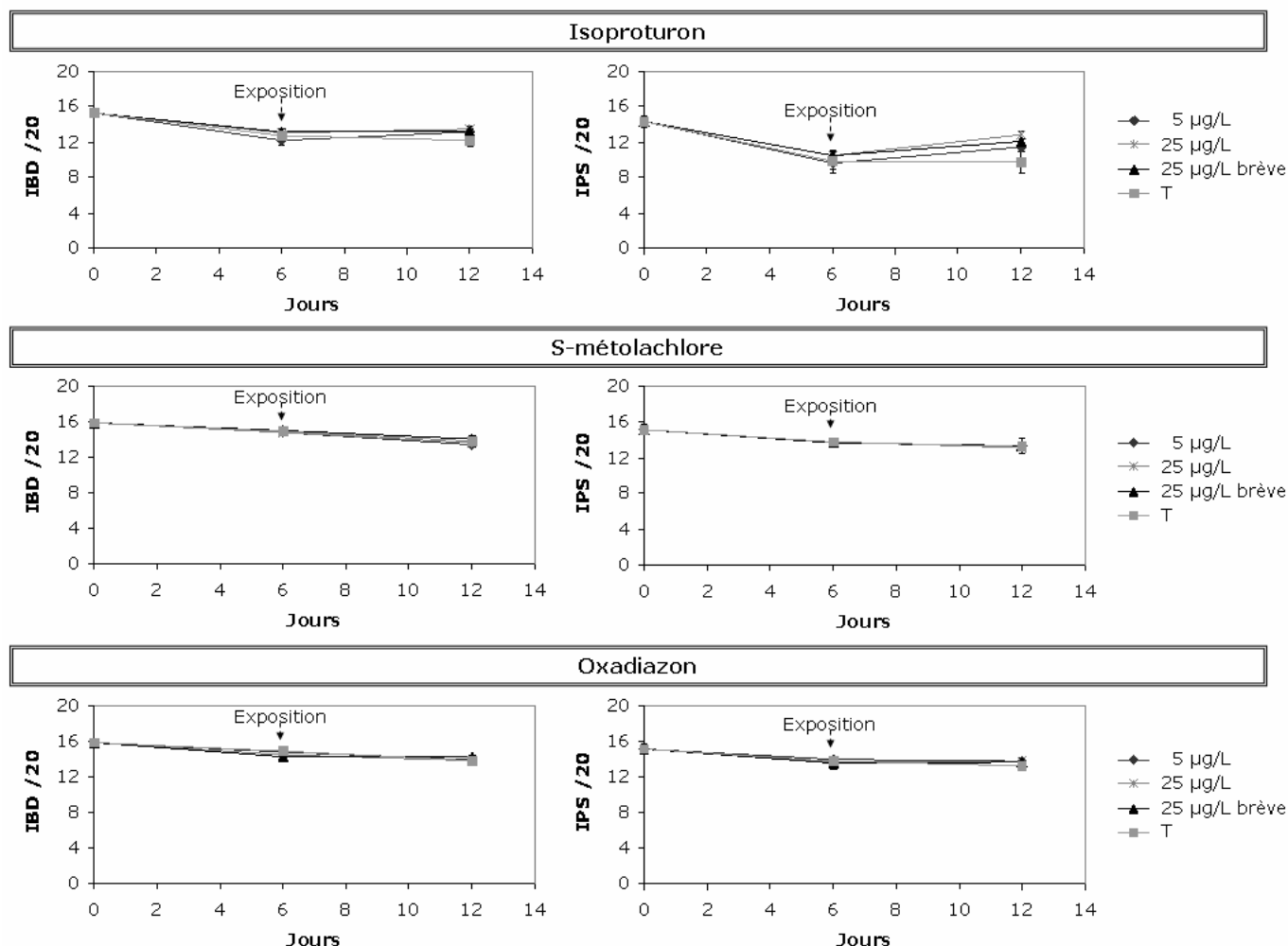


Figure 52 : Evolution des notes d'IBD et d'IPS pour les microcosmes exposés à de l'isoproturon, du s-métolachlore et de l'oxadiazon

A t=0 jours, les notes fournies par l'IBD et par l'IPS se sont avérées relativement proches entre, d'une part, les canaux traités avec l'isoproturon (1^{ère} expérimentation) et, d'autre part, les canaux traités avec du s-métolachlore ou de l'oxadiazon (2^{ème} expérimentation) (Figure 52). Après l'ajout de l'isoproturon, si les notes de l'IBD sont restées relativement stables, celles de l'IPS ont légèrement augmenté dans les canaux traités. Les notes des deux indices pour les communautés témoins et pour celles exposées à du s-métolachlore et de l'oxadiazon ont légèrement baissé au cours de la deuxième expérimentation.

b) L'évolution de la diversité

Pour tous les microcosmes traités avec de l'isoproturon, la diversité a légèrement baissé au cours de l'expérimentation. Dans le cas du s-métolachlore et de l'oxadiazon, après l'ajout du produit phytosanitaire, la diversité a chuté dans les microcosmes traités. Les variations demeurent très faibles et les différences observées ne sont pas significatives.

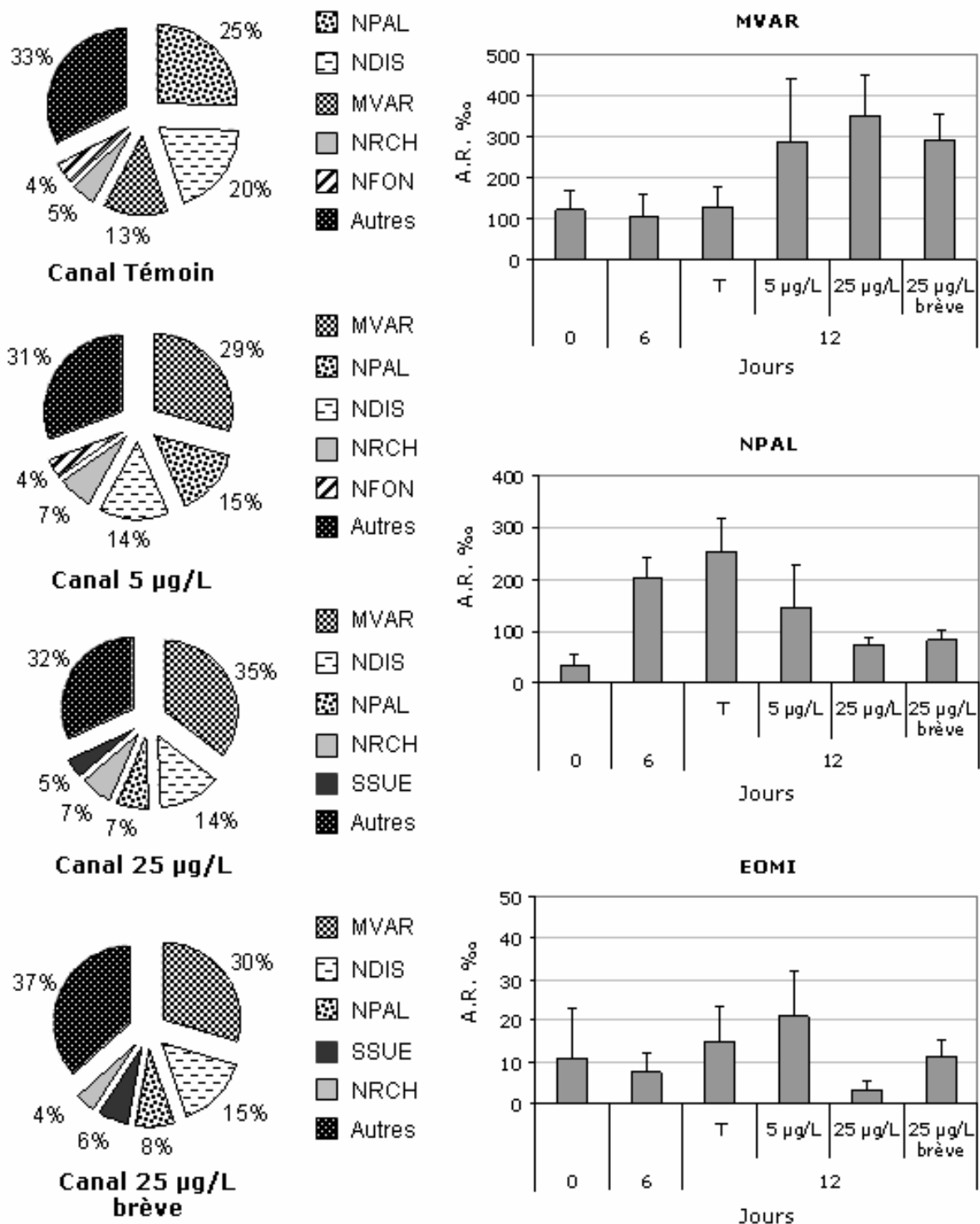


Figure 53 : Evolution de la composition en espèces à t=12 jours entre les différents canaux et de l'abondance relative (A.R.) des espèces MVAR, NPAL et EOMI au cours de l'expérimentation dans les communautés de diatomées benthiques exposées à de l'isoproturon

5 La structure des communautés

Le calcul des corrélations entre les différentes lames à t=0 et t=6 jours a montré que les communautés développées sur les lames ne différaient pas entre les canaux et, donc, entre les deux expérimentations ($C_{\text{Pearson}}=0,85$, $P<0,05$). L'évolution de la structure des communautés a été étudiée à partir de l'analyse de leur composition spécifique (camemberts¹ et histogrammes) et des données écologiques relatives aux espèces.

a) La composition spécifique

- Les communautés exposées à un produit phytosanitaire contenant de l'isoproturon

Dans le canal témoin, la communauté de diatomées benthiques est apparue relativement semblable entre t=6 jours et t=12 jours (Figure 53). Trois espèces prédominaient : *Nitzschia palea* (Kutzing) W.Smith (NPAL) (25%), *Nitzschia dissipata* (Kutzing) Grunow (NDIS) (20%) et *Melosira varians* Agardh (MVAR) (13%).

Dans le canal contenant 5µg/L d'isoproturon, MVAR a semblé s'être développée au détriment de NPAL et de NDIS (Figure 53). Les espèces *Navicula reichardtiana* Lange-Bertalot (NRCH) et *Nitzschia fonticola* Grunow in Cleve et Möller (NFON) ont conservé des proportions relativement semblables entre les communautés du canal traité et celles du canal témoin. Pour les modalités 25µg/L et 25µg/L « brève », un accroissement de la proportion de l'espèce MVAR dans les communautés a aussi été observé au détriment de l'espèce NPAL. L'espèce NDIS est demeurée relativement stable. La proportion de NFON a diminué pour passer en dessous du seuil des 4%. A l'inverse, une espèce, *Surirella suecica* Grunow (SSUE), s'est développée dans ces canaux.

L'étude plus approfondie des données d'abondance relative souligne que l'exposition à de l'isoproturon a induit un fort accroissement de l'abondance relative de MVAR dans les canaux. L'espèce MVAR s'est clairement distinguée des autres espèces. A l'inverse, l'abondance des espèces NPAL et *Eolimna minima* (Grunow) (EOMI) a sensiblement diminué avec l'augmentation des concentrations utilisées. La différence est même significative, dans le cas de l'espèce NPAL, entre le canal témoin et le canal de la modalité 25µg/L (ANOVA $P<0,05$, test de Tukey). L'abondance relative de NDIS, et dans une moindre de NFON, est restée relativement stable entre les différents canaux (ANOVA $P>0,05$).

¹ Les espèces, dont l'abondance était inférieure à 4%, ont été regroupées dans la catégorie « Autres ».

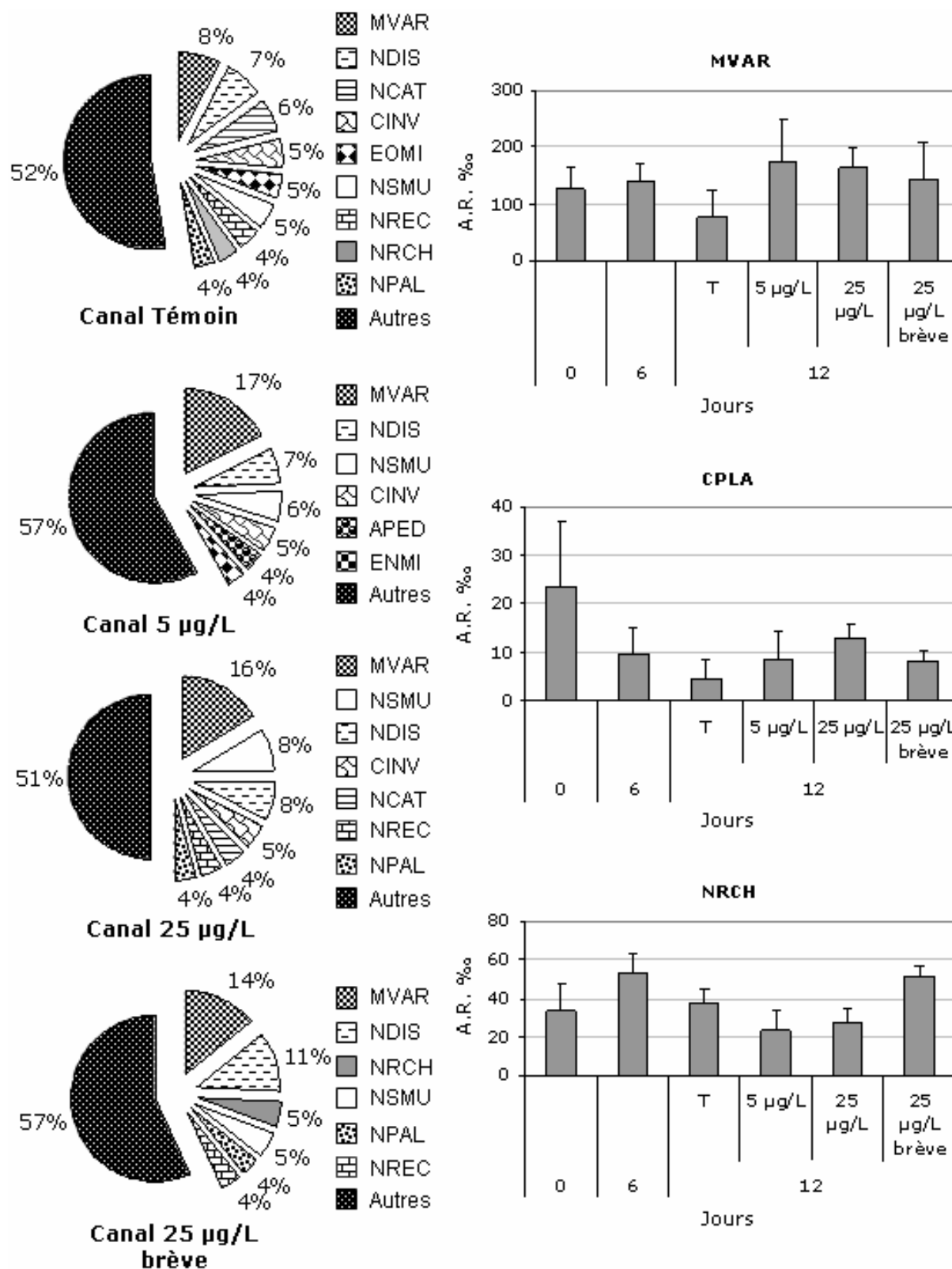


Figure 54 : Evolution de la composition en espèces à t=12 jours entre les différents canaux et de l'abondance relative (A.R.) des espèces MVAR, CPLA et NRCH au cours de l'expérimentation dans les communautés de diatomées benthiques exposées à du s-métolachlore

- Les communautés exposées à un produit phytosanitaire contenant du s-métolachlore

Dans le cas du canal témoin, après 6 jours de développement, la communauté prélevée à t=12 jours n'a que très peu différencié de la communauté à t=6 jours ($C_{\text{Pearson}}=0,835^1$ $P<0,05$). La proportion de l'espèce MVAR dans la communauté de diatomées s'est légèrement réduite.

L'évolution des communautés exposées à du s-métolachlore est apparue relativement semblable à celle observée pour les communautés exposées à de l'isoproturon (Figure 54). La proportion de MVAR, à t=12 jours, a augmenté dans les canaux traités. Dans le cas du canal de la modalité 25µg/L « brève », la part de l'espèce NDIS au sein de la communauté de diatomées s'est aussi accrue. D'autres espèces comme *Navicula submuralis* Hustedt (NSMU) et *Cyclostephanos invisitatus* (Hohn & Hellerman) (CINV) n'ont pas semblé affectées par l'exposition à du s-métolachlore, leurs proportions dans les communautés témoin et traitées n'évoluant guère.

Les données d'abondance relative par espèce ont fait apparaître un développement similaire de l'espèce MVAR entre les canaux traités à l'isoproturon et ceux traités avec du s-métolachlore. L'abondance relative de NDIS a augmenté dans les communautés de la modalité 25µg/L « brève » par rapport au témoin. Le s-métolachlore n'a pas semblé affecter l'abondance de NPAL même si les valeurs relevées se sont avérées nettement inférieures à celles obtenues dans le cas des communautés exposées à de l'isoproturon. L'abondance relative de NSMU s'est accrue, entre le début et la fin de l'exposition, dans la communauté issue du canal traité en continu à une concentration de 25µg/L. Des abondances plus élevées de *Cocconeis placentula* Ehrenberg (CPLA) ont aussi été observées dans les canaux traités en continu. Mais les faibles valeurs et la variabilité entre les lames ne rendent pas cette évolution significative entre ces canaux et le canal témoin. Des espèces, comme NRCH ou EOMI, sont apparues aussi relativement sensibles au s-métolachlore, leurs abondances diminuant dans les deux modalités où l'exposition a été continue. Par contre, dans la modalité 25µg/L « brève », les valeurs d'abondance de ces espèces se sont révélées plus élevées que celles obtenues dans les autres canaux traités en continu.

¹ Calcul de la corrélation de Pearson entre la communauté à 6 jours et la communauté à 12 jours

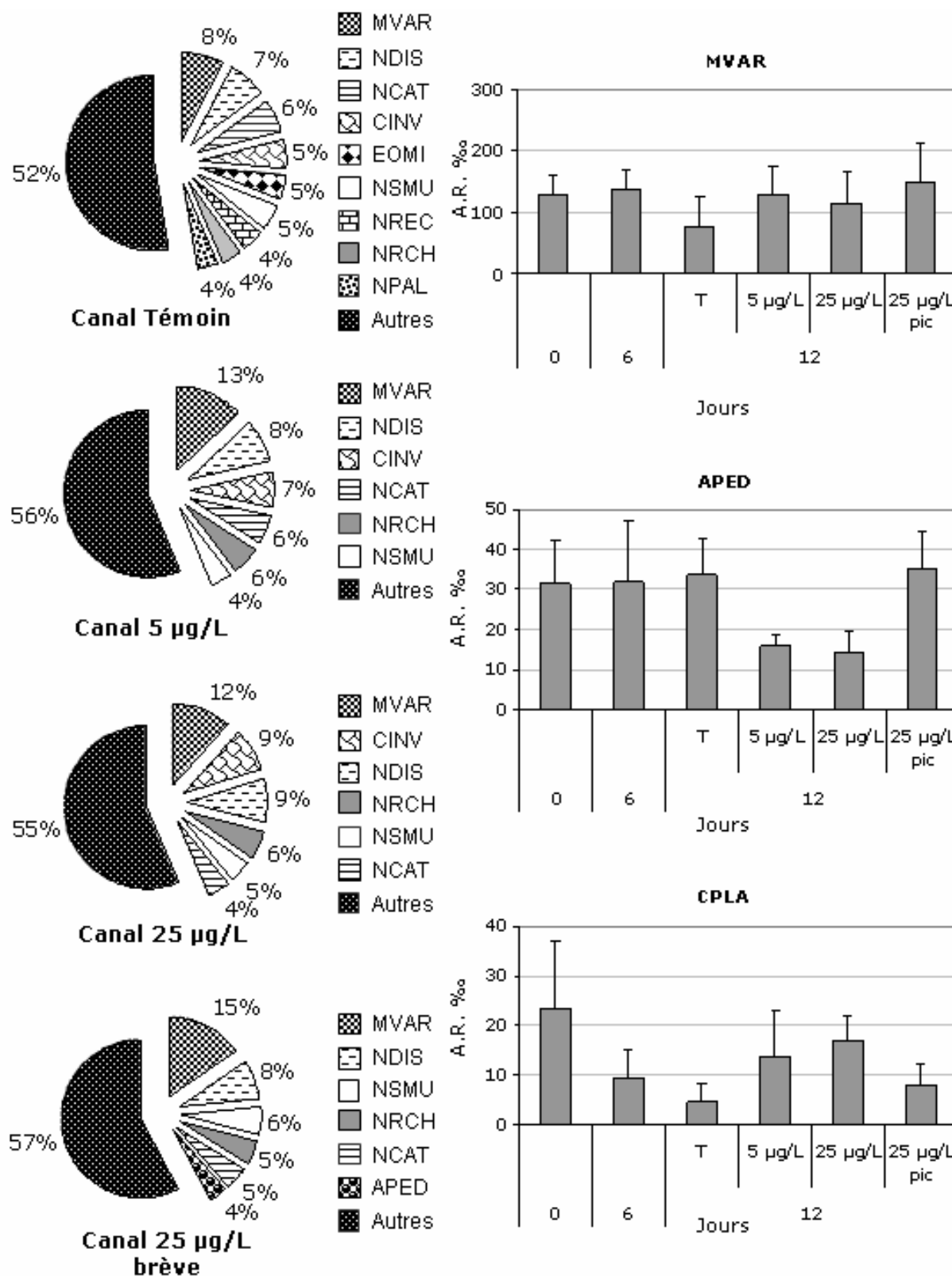


Figure 55 : Evolution de la composition en espèces à t=12 jours entre les différents canaux et de l'abondance relative (A.R.) des espèces MVAR, APED et CPLA au cours de l'expérimentation dans les communautés de diatomées benthiques exposées à de l'oxadiazon

- Les communautés exposées à un produit phytosanitaire contenant de l'oxadiazon

L'évolution de la composition en espèces des communautés exposées à de l'oxadiazon par rapport aux communautés témoins a été relativement similaire à ce qui a été observé dans le cas du s-métolachlore (Figure 55). Une espèce, *Amphora pediculus* (Kutzing) Grunow (APED), est apparue dans des proportions importantes dans le canal de la modalité 25µg/L « brève » à t=12 jours. L'étude des données d'abondance relative montre que cette espèce a connu une baisse importante de son abondance dans les deux canaux traités en continu (modalités 5 et 25µg). Par contre, une autre espèce, CPLA, comme pour les canaux traités avec du s-métolachlore, a vu son abondance augmenter en présence d'oxadiazon. De la même manière que pour les canaux exposés à de l'isoproturon ou du s-métolachlore, l'espèce EOMI est apparue relativement sensible à une exposition à de l'oxadiazon.

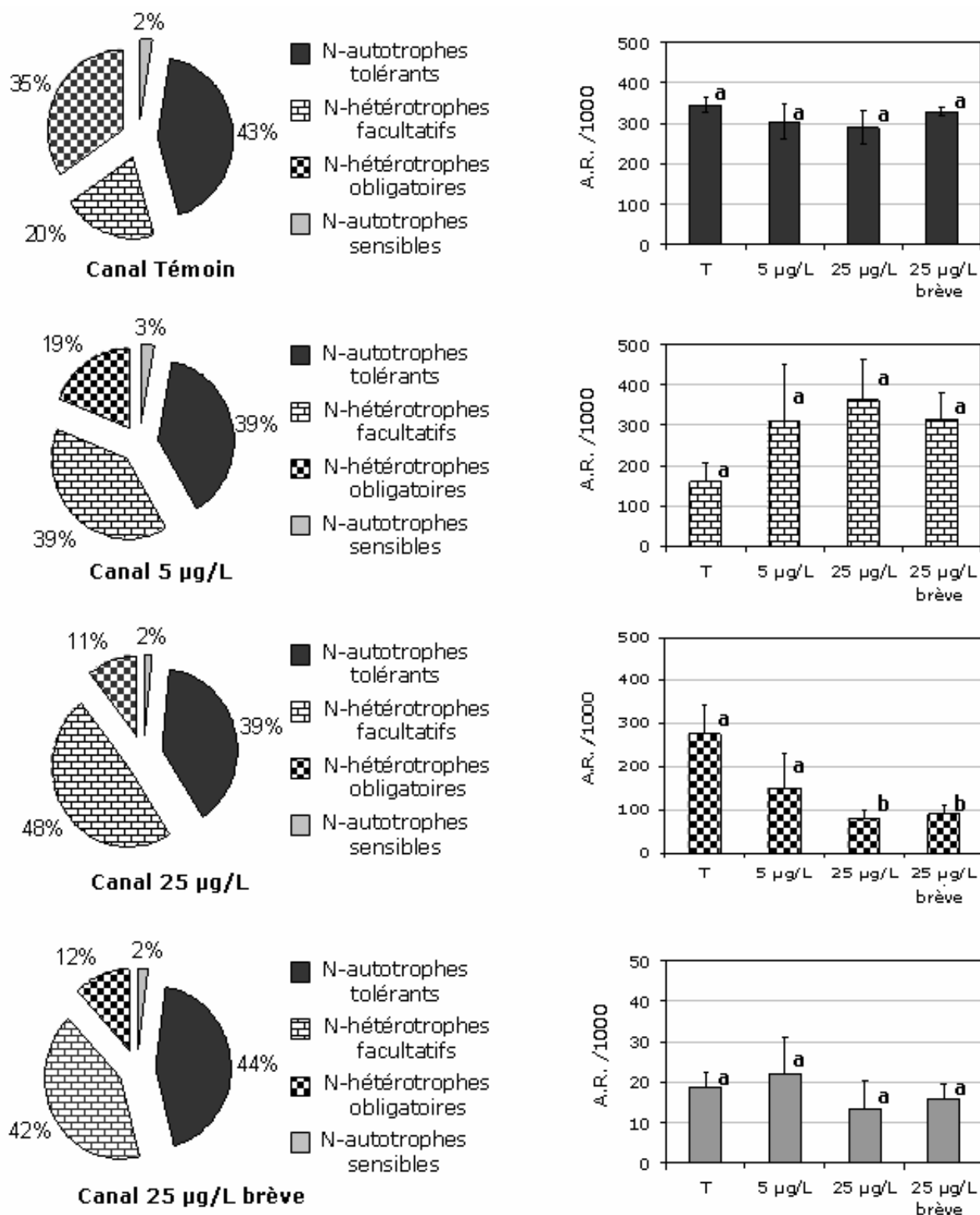


Figure 56 : Evolution de la composition en espèces de communautés selon leur voie métabolique entre le canal témoin et les canaux traités avec de l'isoproturon (si lettres différentes entre deux traitements, différence significative ANOVA test de Tukey $P < 0,05$) (A.R. : Abondance Relative)

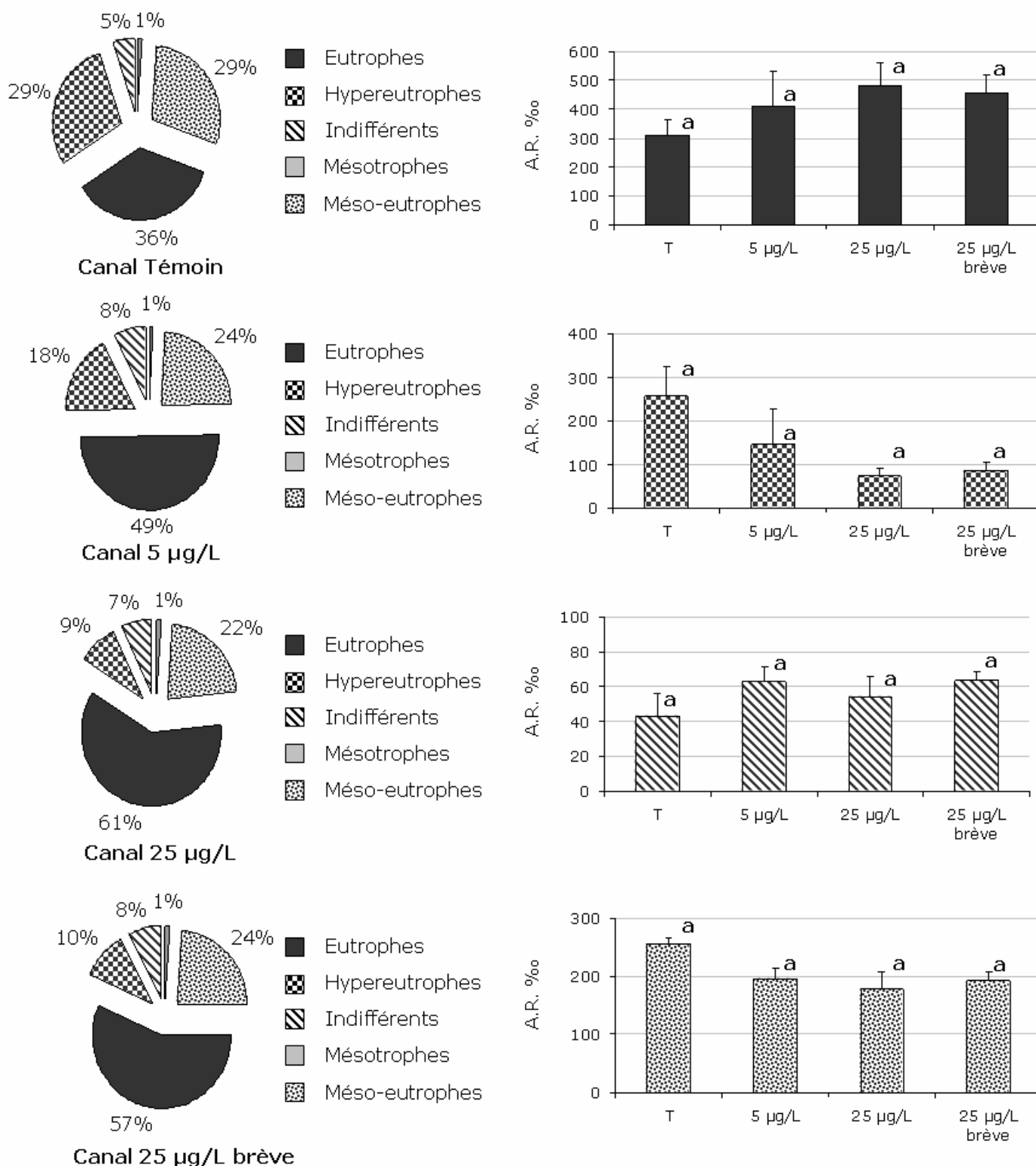


Figure 57 : Evolution de la composition en espèces de communautés selon leur préférences trophiques entre le canal témoin et les canaux traités avec de l'isoproturon (si lettres différentes entre deux traitements, différence significative ANOVA) (A.R. : Abondance Relative)

b) Les données écologiques

L'analyse des données écologiques a montré qu'un traitement des communautés de diatomées benthiques par de l'isoproturon conduisait à favoriser les espèces N-hétérotrophes facultatives à mesure que les concentrations appliquées augmentaient (Figure 56). Cela s'est réalisé au détriment des espèces N-autotrophes tolérantes et des espèces N-hétérotrophes obligatoires, pour lesquelles la différence est significative entre la modalité témoin et les modalités 25µg/L et 25µg/L brève (ANOVA test de Tukey $P < 0,05$). Les espèces tolérantes aux pollutions trophiques (eutrophes) sont aussi apparues favorisées suite à l'exposition à cet herbicide (Figure 57).

A la différence de l'isoproturon, le s-métolachlore et l'oxadiazon n'ont pas fait évoluer les caractéristiques écologiques des communautés exposées par rapport aux communautés témoins.

C./ Discussion

1 *Le dispositif expérimental*

Ce travail expérimental s'est appuyé sur des lames de verre colonisées sur le terrain pour étudier les effets d'herbicides agricoles sur les diatomées benthiques. Ce type de dispositif permet de travailler sur des échantillons biologiques homogènes, plus représentatifs des conditions naturelles (Dorigo *et al.* 2001) que ceux obtenus à partir d'une colonisation des substrats en laboratoire. En outre, avant même la colonisation en laboratoire, le prélèvement du biofilm sur des galets dans les cours d'eau déstructure l'organisation et la structure de cette matrice, occasionnant un stress pour les communautés de diatomées benthiques. La colonisation *in situ* de substrats artificiels a été très largement utilisée pour étudier en laboratoire les effets de pesticides sur des communautés de diatomées benthiques (Dorigo *et al.* 2001; Navarro *et al.* 2002; Guasch *et al.* 2003).

Deux expérimentations successives ont été réalisées pour tester au moins trois herbicides agricoles. Les lames ont été immergées pour chaque expérimentation durant deux semaines en période hivernale. Hoagland *et al.* (1982) ont en effet montré que cette durée était suffisante pour que la biomasse algale se développe sur des substrats artificiels (Hoagland *et al.* 1982). La colonisation des lames pour les deux expérimentations s'est faite dans la continuité, les premières lames prélevées ayant été directement remplacées par des lames vierges. Ce protocole de colonisation et la date d'immersion ont été choisis pour limiter les différences en terme de communautés entre les deux expérimentations. En effet, en hiver, les conditions environnementales, comme les concentrations en nutriments ou la luminosité, varient moins. En outre, à cette période (janvier-février), la colonisation des substrats est principalement le fait des diatomées (Leitão *et al.* 2005). Par ailleurs certaines études ont montré que la sensibilité du périphyton à un herbicide était plus élevée sur des lames colonisées en hiver par rapport à des lames colonisées en période estivale (Guasch *et al.* 1997).

Au sein de chaque microcosme, la vitesse du courant a été ajustée afin de favoriser le développement des communautés tout en évitant les risques d'abrasion. Il a été montré que la vitesse du courant pouvait avoir un impact sur la disponibilité en éléments nutritifs et, ainsi, favoriser le développement de la biomasse algale (Biggs 1990; Watanabe *et al.* 1998; Othoniel 2006).

2 *L'ambiance trophique*

Les résultats concernant les concentrations en nitrates montrent que les microcosmes n'ont pas été carencés. Les concentrations finales en nitrates (N-NO₃) (autour de 17mg/L pour la première expérimentation et autour de 30mg/L pour les deux autres) sont proches de celles relevées, dans l'expérimentation de terrain, sur les stations de cours d'eau (Sousson, Montoussé à Auradé, Vermeil) drainant des bassins versants très agricoles. Les phosphates semblent être l'élément nutritif limitant, leurs concentrations pour tous les canaux baissant au cours de l'expérimentation. Les concentrations de silice dans les canaux ont été supérieures ou proches des concentrations mesurées dans les cours d'eau des coteaux de Gascogne par Perrin *et al.* (2006). Les variations observées entre les canaux sont probablement liées à la méthode analytique par colorimétrie utilisée pour le dosage.

Les concentrations en nitrates ont été plus faibles dans les canaux de la première expérimentation du fait d'une concentration initiale plus réduite dans l'eau utilisée. Mais les nitrates n'étant pas l'élément nutritif limitant dans les microcosmes, cet écart n'a vraisemblablement pas dû influencer sur la croissance des communautés de diatomées benthiques.

3 L'ambiance toxique

Les concentrations initiales en isoproturon, analysées une demi-heure après l'ajout de l'herbicide, sont supérieures aux concentrations attendues. Cette différence est probablement due à la forte viscosité de la formulation commerciale utilisée, la substance active n'ayant pas eu le temps, entre l'ajout et le prélèvement, de se dissoudre complètement dans le milieu. Dans le cas du s-métolachlore et de l'oxadiazon, la baisse enregistrée de leurs concentrations peut s'expliquer par les propriétés physico-chimiques de ces composés. L'oxadiazon ($\log K_{ow}=4,8$) et dans une moindre mesure le s-métolachlore ($\log K_{ow}=3,05$) sont des substances actives relativement hydrophobes ($\log K_{ow}>3$) qui s'adsorbent sur les parois, les tuyaux, les matières en suspension et par la même probablement le biofilm. Or des analyses de concentration dans le biofilm de certains herbicides ont souligné le potentiel d'accumulation de cette matrice biologique (Margoum *et al.* 2006). Par conséquent, même si les concentrations dans les eaux du s-métolachlore et de l'oxadiazon se sont vite avérées faibles dans les canaux, les diatomées ont pu être exposées à ces molécules dans le biofilm. Dans le cas de l'oxadiazon, d'autres caractéristiques chimiques comme son temps d'hydrolyse à 20°C (14 jours) peuvent aussi expliquer cette baisse des concentrations. Les molécules ont aussi pu être dégradées par la lumière apportée par les néons même si en ce qui concerne le s-métolachlore la photodégradation est relativement longue (75 jours).

Enfin ces trois herbicides ont aussi pu être métabolisés par le biofilm et constituer ainsi une source d'azote pour les micro-organismes comme le suggèrent certains auteurs pour l'isoproturon (Peres *et al.* 1996) et le 2-4D (Okay *et al.* 1996).

4 L'efficacité des indices biologiques pour détecter les effets des herbicides

Que ce soit pour l'isoproturon, le s-métolachlore ou l'oxadiazon, les indices biologiques « diatomées » (IBD et IPS) n'ont pas indiqué une dégradation de la qualité des eaux, 6 jours après l'ajout des herbicides. Or le suivi des autres paramètres a mis en évidence une baisse de la biomasse algale et une modification de la structure des communautés à cette même date dans les canaux traités par ces herbicides et notamment par de l'isoproturon. Les indices biologiques « diatomées » sous leur forme actuelle ne semblent donc pas adaptés¹ à la détection des pollutions par les herbicides. Ceci peut être lié à l'élimination du contenu organique cellulaire des cellules pour l'identification et le dénombrement des espèces afin de calculer ces indices. La distinction entre les cellules mortes et vivantes étant impossible. Néanmoins dans cette expérimentation, on peut penser que les cellules mortes ne restent pas attachées sur les lames où le biofilm est peu développé.

¹ Ces indices ont été conçus pour une application en milieu naturel. Les résultats issus d'études en microcosmes sont donc à analyser avec précautions.

Ces résultats sont relativement cohérents, ces indices ayant été développés pour détecter les pollutions trophiques. Les limites de ces outils pour détecter les pollutions dues aux pesticides sont en effet connues (Dorigo *et al.* 2004; Aubertot *et al.* 2005).

5 La sensibilité des paramètres biologiques quantitatifs

Les quatre paramètres biologiques quantitatifs (concentrations en matière organique, en chlorophylle a et en chlorophylle c, densité cellulaire) étudiés ont évolué de manière relativement semblable dans toutes les expérimentations. Ceci tend à indiquer que les périphytons utilisés étaient dominés par les diatomées benthiques. Des trois substances actives, l'isoproturon est celle qui a induit les effets les plus marqués sur les diatomées benthiques. La croissance des communautés de diatomées a été sévèrement inhibée aux concentrations les plus fortes (25µg/L). Dans le cas de modalité « brève », même après trois jours de récupération consécutifs à une exposition de la même durée, la croissance n'a pas repris.

L'étude des données d'écotoxicité disponibles¹ montre que cette molécule est plus toxique, sa CE₅₀ pour la croissance d'une espèce de diatomée (*Navicula pelliculosa* (Breb) Hilse) étant plus faible (0,013mg/L à 72h) que celles du métolachlore (1,1mg/L à 120h) et de l'oxadiazon (0,128mg/L à 120h) pour cette même espèce. Les observations concernant l'exposition à l'isoproturon sont en accord avec les résultats obtenus par Pérès *et al.* (1996) qui ont mis en évidence des effets de cette substance active sur la biomasse des diatomées à une concentration de 5µg/L. Par contre, Schmitt-Jansen *et al.* (2005) n'ont pas observé d'effets sur la biomasse algale à une concentration supérieure. Cet écart pourrait être lié à la composition algale des périphytons étudiés, Schmitt-Jansen *et al.* (2005) ayant étudié la biomasse algale dans sa globalité à la différence de Pérès *et al.* (1996) qui se sont focalisés sur les diatomées.

Dans le cas du s-métolachlore et de l'oxadiazon, les communautés ont continué à croître.

De tous les paramètres étudiés seule la densité cellulaire a fait apparaître une inhibition significative de son développement dans les canaux traités en continu avec du s-métolachlore. Or certains auteurs mentionnent que les molécules de la famille des chloroacétamides (dont le s-métolachlore) peuvent inhiber la division cellulaire en perturbant la synthèse des acides gras (Carder *et al.* 1998).

Dans l'ensemble, si les écarts entre les valeurs moyennes sont visibles, peu de différences significatives ont été observées entre les données des canaux témoins et les données issues des canaux traités. Dans le cas du s-métolachlore et de l'oxadiazon cela peut s'expliquer par la chute rapide de leur concentration dans le milieu. Les résultats ont aussi fait apparaître une variabilité importante au sein même des canaux. Ce constat est probablement lié à l'utilisation de lames ayant été colonisées dans le milieu naturel par des communautés naturelles. La variabilité naturelle entre les lames à t=0 jours a donc vraisemblablement persisté au cours de l'expérimentation.

¹ (<http://www.dive.afssa.fr/agritox/index.php>)

6 La sensibilité des paramètres biologiques qualitatifs

a) Le développement de formes anormales de diatomées

Les valeurs d'abondance des formes anormales relevées dans les différents canaux se sont avérées très faibles, les maxima ne dépassant pas les 8‰. Comme dans le cas des lames de verres immergées dans les cours d'eau, l'hypothèse concernant le décrochage des formes anormales des lames de verre peut aussi être avancée pour expliquer ces valeurs relativement basses pour des communautés exposées à des concentrations relativement élevées (25µg/L) (voir pages 125-126). L'accroissement des abondances observées dans certains canaux peut être relié à un développement clonal de formes anormales déjà présentes avant l'introduction des herbicides. Pour certains auteurs comme Stoermer (1998), le développement de diatomées anormales serait la conséquence de la formation d'une population clonale à partir d'un individu ayant subi une déformation (Stoermer 1998). Cette hypothèse est discutable, l'état physiologique des cellules anormales n'étant pas connu suite à une exposition à une pollution par des pesticides.

b) La sensibilité de la diversité vis à vis des herbicides

La diversité des communautés de diatomées benthiques exposées à ces trois herbicides n'a pas semblé affectée, les différences observées n'étant pas significatives. Si certains travaux de recherche ont souligné les effets négatifs de l'isoproturon sur la diversité de communautés de diatomées à des concentrations élevées (40 à 160µg/L), des résultats inverses ont été obtenus à des concentrations plus faibles (2µg/L) (Peres *et al.* 1996; Schmitt-Jansen *et al.* 2005). En effet, le développement d'espèces tolérantes au détriment d'espèces sensibles (redondance fonctionnelle) peut conduire à une stabilité voire une augmentation de la diversité (Aubertot *et al.* 2005).

c) L'évolution de la composition en espèces des communautés

Dès avant l'exposition, pour les trois produits phytosanitaires traités, les communautés de diatomées benthiques sont apparues dominées par des espèces connues pour leurs préférences pour les milieux eutrophes (MVAR, NPAL NDIS et NFON).

Dans le cas de l'isoproturon, la stabilisation, voire l'augmentation de l'abondance de ces espèces suite à l'ajout du produit phytosanitaire est en accord avec d'autres travaux scientifiques pour lesquels les espèces eutrophes ont été favorisées dans les communautés de diatomées exposées à des herbicides de la famille des s-triazines (Hamala *et al.* 1985; Goldsborough *et al.* 1986; Berard *et al.* 1996; Guasch *et al.* 1998; Munoz *et al.* 2001; Berard *et al.* 2003). La baisse observée dans les abondances de l'espèce NPAL est, par contre, en contradiction avec des observations publiées par un certain nombre d'auteurs pour lesquels cette espèce est tolérante à certains herbicides au mode d'action similaire à l'isoproturon (Kosinski *et al.* 1984; Kasai 1999; Dorigo *et al.* 2004). Cette baisse n'a été statistiquement significative qu'au sein du canal exposé en continu à la concentration la plus forte (25µg/L). On peut penser que le niveau d'exposition était peut être trop élevé pour que cette espèce soit en mesure de se développer.

L'analyse de la répartition des espèces en fonction de certaines de leurs préférences écologiques a permis de montrer que les espèces « N-hétérotrophes facultatives », capables de passer d'une voie métabolique à l'autre (hétérotrophie/autotrophie), avaient été favorisées par l'exposition à de l'isoproturon au détriment des espèces « N-hétérotrophes obligatoires » ou « autotrophes tolérantes ». Plusieurs auteurs ont montré que certaines espèces hétérotrophes étaient tolérantes à des exposition par des herbicides inhibiteurs de la photosynthèse dont l'isoproturon (Goldsborough *et al.* 1986; Peres *et al.* 1996). En outre, le passage d'une voie métabolique à l'autre est connu comme mécanisme de survie de certaines diatomées dans des conditions défavorables à leur développement (obscurité, pollution organique) (HELLEBUST *et al.* 1977). Pour Hamilton *et al.* (1988), cette possibilité de passer par une voie métabolique (l'hétérotrophie) lorsque l'autre est inhibée (au travers de la photosynthèse, l'autrophie) expliquerait le fait que ces espèces se développent plus facilement en présence d'herbicides inhibiteurs du photosystème II.

En ce qui concerne le s-métolachlore et l'oxadiazon, les espèces tolérantes ont aussi semblé favorisées dans les communautés exposées à l'herbicide. Une espèce, CPLA, connue pour sa tolérance aux herbicides, a ainsi vu son abondance augmenter dans les canaux traités en continu (Goldsborough *et al.* 1986). Certaines espèces comme NRCH et APED, si elles sont apparues sensibles à une exposition à un de ces herbicides, se sont avérées capables, après une exposition brève, de reprendre assez rapidement leur développement. Ces deux espèces sont en effet relativement tolérantes aux conditions particulièrement eutrophes.

Les caractéristiques écologiques des communautés, exposées à du s-métolachlore ou de l'oxadiazon, n'ont pas sensiblement évolué par rapport aux communautés témoins. Ces herbicides n'étant pas des inhibiteurs principaux de la photosynthèse, les diatomées hétérotrophes facultatives n'ont, donc, pas du être favorisées par rapport aux autres espèces.

Si cette étude en conditions semi-contrôlées des effets de trois herbicides agricoles sur les diatomées benthiques a confirmé la sensibilité de la biomasse algale à une exposition à ce type de composés toxiques, elle n'a pas réussi à établir un lien entre cette exposition et l'apparition de frustules déformés de diatomées, les abondances de formes anormales demeurant faibles.

Pour s'affranchir de la variabilité résiduelle liée à l'utilisation de communautés naturelles et tenter d'identifier une relation entre l'induction d'altérations intracellulaires et la formation de frustules déformés suite à une exposition à des pesticides, une étude en conditions contrôlées à partir de cultures cellulaires de communautés de diatomées benthiques a donc été menée.

Chapitre III.: Caractérisation, à l'échelle de la cellule, de l'impact d'un pesticide sur une culture cellulaire d'une communauté de diatomées benthiques

Dans le cadre de l'étude *in situ*, le suivi spatio-temporel de l'abondance en diatomées déformées dans les biofilms a mis en évidence des valeurs plus élevées sur les stations de bassins versants affectés par une forte pollution agricole (trophique et toxique) et au cours de la principale période de traitement herbicide des cultures (mai). L'inhibition en parallèle d'un autre paramètre du biofilm (la biomasse algale) et l'existence, à la même période, d'une crue, potentiellement associée au lessivage des produits phytosanitaires épandus sur les cultures, a permis de suggérer que ces déformations pourraient être induites par une exposition à ces composés. Mais en l'absence de données intégrées sur les flux de pesticides et vu la forte variabilité existant entre les prélèvements effectués sur substrats naturels et ceux réalisés sur substrats artificiels, cette hypothèse n'a pu être validée.

De nombreux facteurs, dont l'exposition à des pesticides, ont été cités comme de potentiels inducteurs de ce type d'anormalités chez les diatomées. Mais les mécanismes cellulaires impliqués dans la formation de frustules anormaux n'ont jamais été élucidés.

Certains travaux ont mis en évidence des cas de frustules anormaux chez des diatomées exposées à de la colchicine et à un herbicide, l'isoproturon (Coombs *et al.* 1968; Schmitt-Jansen *et al.* 2005). Des expositions à de la colchicine et à un aldehyde ont aussi induit chez des diatomées des cas de dispersion de l'ADN ou de polyploïdie (effet aneugène probable) (Coombs *et al.* 1968; Casotti *et al.* 2005). Chez des larves d'huîtres (*Crassostrea gigas*), des travaux récents ont mis en évidence une corrélation positive significative entre des déformations de coquilles et des ruptures de l'ADN suite à une exposition à un pesticide : l'endosulfan (Wessel *et al.* 2007). Dans ce contexte, il nous est apparu nécessaire de compléter l'étude descriptive menée précédemment (expérimentation de terrain et en microcosmes) par une étude fonctionnelle afin d'analyser dans quelle mesure la formation de frustules déformés pouvait être associée à un effet génotoxique des herbicides.

Certains herbicides, comme l'hydrazide maléique, sont des agents génotoxiques connus pour induire des lésions de l'ADN comme la rupture de chromosomes (effet clastogène) ou la perturbation de leur migration lors de la mitose (effet aneugène). Ces effets, appelés aussi mutations chromosomiques, sont à l'origine de la formation d'entités indépendantes du noyau appelées « micronoyaux » (Ma *et al.* 1995). De nombreux tests d'évaluation de la génotoxicité de sols, d'effluents à partir du dénombrement des micronoyaux ont été mis au point (Cotelle *et al.* 1999; Ohe *et al.* 2004; White *et al.* 2004). En France, le test micronoyau sur *Vicia faba* a été normalisé par l'AFNOR en 2004.

Tous ces éléments nous ont donc amenés à orienter nos travaux vers la recherche d'altérations nucléaires et d'anormalités de frustule chez des diatomées benthiques exposées à de l'hydrazide maléique.

Dans un premier temps, il nous est apparu nécessaire de mettre au point une technique de culture d'une communauté de diatomées benthiques afin de s'affranchir des limites liées à l'utilisation de cultures cellulaires d'espèces isolées ou d'échantillons de biofilm issus du milieu naturel.

En effet, de nombreux biotests ont été développés pour étudier les effets de composés toxiques sur des organismes procaryotes (test de Ames) et eucaryotes (test CE50 diatomée *Navicula pelliculosa*). Mais les résultats fournis par ces cultures d'espèces isolées s'avèrent relativement difficiles à extrapoler aux communautés évoluant dans les milieux naturels (Badr *et al.* 1997). Dans des conditions naturelles, les interactions entre les espèces et leur sensibilité variable aux pesticides modulent la réponse globale de la communauté à un stress lié à des substances toxiques (DeNoyelles *et al.* 1982). De plus, la culture à long terme d'une espèce induit une sélection génétique des individus qui peut altérer la sensibilité de cette espèce aux produits chimiques (Peterson *et al.* 1997).

En outre, l'utilisation d'échantillons de biofilms naturels n'est guère plus envisageable. La présence de matières organiques (amorphe et vivante) dans le biofilm perturbe le marquage et l'observation au microscope à épifluorescence des noyaux des cellules de diatomées.

La communauté de diatomées benthiques ainsi cultivée a été exposée à différentes concentrations d'hydrazide maléique pendant six heures suivies de 24 heures de récupération. Au terme de cette phase de récupération, les noyaux des cellules de diatomées ont été visualisés en microscopie à épifluorescence après marquage de l'ADN à l'aide d'un fluorochrome émettant à des longueurs d'onde inférieures (450-500 nm) à celles de la chlorophylle (640-670 nm). L'autofluorescence naturelle des pigments chlorophylliens ne permet pas, avec des fluorochromes émettant dans le même spectre que la chlorophylle, de distinguer le noyau des chloroplastes. Une fois cette étape réalisée, le contenu organique des cellules a été éliminé par attaque à l'eau oxygénée afin de ne conserver que les frustules des diatomées et ainsi d'observer, en microscopie photonique classique, de possibles anomalies de cette paroi cellulaire siliceuse. L'identification des espèces de diatomées se fonde, en effet, sur la morphologie et surtout sur l'ornementation des frustules.

Ce chapitre s'appuie sur deux articles scientifiques soumis dans la revue « *Journal of Applied Phycology* » pour la mise au point de la technique de primo-culture d'une communauté de diatomées benthiques et dans la revue « *Aquatic toxicology* » pour l'expérimentation concernant l'effet de l'hydrazide maléique sur cette communauté en terme d'altérations nucléaires et d'anomalies du frustule.

A new cell primo-culture method for freshwater benthic diatom communities.

Debenest T.^{1,2}, Silvestre J.¹, Coste M.², Delmas F.², Pinelli E^{1*}.

¹ Ecolab UMR 5245 (UPS, CNRS, INP-ENSAT), Equipe ECOGEN, Av. de l'Agrobiopole - BP 32607
Auzeville Tolosane, 31326 CASTANET TOLOSAN CEDEX, France

² Cemagref, 50 av. de VERDUN, 33612 CESTAS CEDEX, France

*Corresponding author: Tel.: +335 62 19 39 45; Fax: +335 62 19 39 01; E-mail: pinelli@ensat.fr

Abstract

A new cell primo-culture method was developed for benthic diatom community isolated from biofilm sampled in rivers. This approach was divided into three steps: (i) scraping biofilm from river pebbles, (ii) diatom isolation from biofilm and (iii) diatom community culture. With a view to designing a method able to stimulate the growth of diatoms, to limit the development of other micro-organisms and to maintain in culture a community similar to the original natural one, different modalities were tested in the third step (iii): cell culture media (Chu No 10 and Freshwater "WC" medium modified), cell culture vessels, and time of culture. Results showed that the Chu No 10 medium with Erlenmeyer flask for cell culture is the best adapted to produce enough biomass for ecotoxicological tests as well as to avoid development of other micro-organisms. After 96 hours of culture, communities were different from the original communities sampled in the two rivers studied. Species tolerant for eutrophic or saprobic conditions were favoured during the culture. This method of diatom community culture offers a wide range of perspectives to assess, *in vitro*, the effects of different chemicals or effluents (water sample and industrial effluents) on diatom communities as well as on diatom cells.

Keywords: diatom community, culture, biofilm

Abbreviations

Names of species	Abbreviations
<i>Achnantheidium biasolettianum</i> (Grunow in Cl. & Grun.) Lange-Bertalot	ADBI
<i>Diatoma vulgare</i> Bory	DVUL
<i>Encyonema minutum</i> (Hilse in Rabh.) D.G. Man	ENMI
<i>Fistulifera saprophila</i> (Lange-Bertalot & Bonik) Lange-Bertalot	FSAP
<i>Gomphonema minutum</i> (Ag.) Agardh	GMIN
<i>Gomphoneis minuta</i> (Stone) Kociolek & Stoermer	GMMI
<i>Gomphonema olivaceum</i> (Hornemann) Brébisson var. <i>olivaceum</i>	GOLI
<i>Gomphonema parvulum</i> (Kützing) Kützing	GPAR
<i>Mayamaea atomus</i> (Hustedt) Lange-Bertalot	MAPE
<i>Nitzschia dissipata</i> (Kützing) Grunow	NDIS
<i>Nitzschia fonticola</i> Grunow in Cleve et Möller	NFON
<i>Nitzschia palea</i> (Kützing) W.Smith	NPAL
<i>Navicula tripunctata</i> (O.F.Müller) Bory	NTPT

Introduction

Diatoms are important primary producers in the aquatic ecosystems and represent an important source of food for aquatic grazing organisms (Round *et al.* 1990). These micro-algae are crucial for the development of fish larvae and other young animals in the upper trophic levels (Stevenson *et al.* 1999). Perturbations in diatom communities lead to indirect disruption of the productivity of the whole aquatic ecosystem (Berard *et al.* 2003). Man-made disturbances, such as fertiliser or pesticide contamination, may alter the balance of benthic diatom communities (Stevenson *et al.* 1999). In this context, the study of freshwater benthic diatom community variations is particularly relevant in the understanding of the whole aquatic ecosystem succession and in the determination of the good ecological status recommended by the European Water framework Directive (2000) (McCormick *et al.* 1994). Up to now most research focused on the behaviour of mono-specific cultures exposed to chemicals (Peterson *et al.* 1997; Tang *et al.* 1997; Kasai 1999; Nelson *et al.* 1999). However, unialgal culture responses are difficult to compare with the reactions of algae communities in rivers. In natural conditions, species interactions and differential sensitivity of taxa modulate the response of a diatom community to a disturbance (DeNoyelles *et al.* 1982). Moreover, transfer in culture of species induces genetic selection of individuals and alters their sensitivity to chemicals (Peterson *et al.* 1997). For these reasons, classic mono-specific tests do not predict the effects of perturbations at the level of the community, especially in natural conditions (Badr *et al.* 1997).

To overcome these limitations, numerous studies have been carried out with benthic diatoms in natural biofilms fixed on artificial substrata submerged in rivers and transferred to the laboratory (Guasch *et al.* 1997; Guasch *et al.* 1998; Guasch *et al.* 1998; Dorigo *et al.* 2001; Navarro *et al.* 2002; Berard *et al.* 2003; Gustavson K. *et al.* 2003). Nevertheless, river biofilm is quite a complex matrix composed of organic matter (OM) and extra-cellular polymeric substances (EPS) and numerous organisms, including bacteria, algae and fungi. Thus, the *in vivo* observation of benthic diatom cells is quite difficult in natural biofilm samples. For these reasons, benthic diatom studies are focused on species composition of the community. The identification of species is based on the shapes and ornamentations of the siliceous diatom valves (Lenoir *et al.* 1995; Whitton *et al.* 1995; Prygiel *et al.* 1996). Nevertheless this descriptive ecological approach has been shown to be limited in its ability to discriminate between nutrient enrichment effects and other environmental stress impacts (Peres *et al.* 1996; Sabater 2000). Thus many functional tests have been developed based on classical pigment analysis or chlorophyll *a* fluorescence assessment to measure, *in vivo*, the sensitivity of natural periphytic algae to a stress (Dorigo *et al.* 2001; Schreiber *et al.* 2002). However, this approach is performed either on mono-specific cultures or on whole algae communities without distinction between diatoms and the other algae fixed in the biofilm.

In this context, development of a culture method for diatom communities represents a significant improvement to allow ecotoxicological experiments on freshwater benthic diatoms at the community level as well as at the cell level. Therefore experiments were carried out to design a new method able to isolate from the biofilm a freshwater benthic diatom community similar to the original community collected in the river and to maintain it in culture. Two culture media were compared on their ability to favour the diatom growth and to limit the development of other micro-organisms (other algae,

bacteria). The influence of the inoculum (the diatoms being either free or fixed on a substrate) and the nature of vessels used for the culture in liquid medium, were also studied. The effect of the culture time was finally tested with two different diatom communities sampled in two rivers located in the southwest (SW) of France.

Materials and methods

In order to develop a new method of culture, biofilms were scraped off numerous pebbles in the flow of the river Garonne. The biofilm solution was transferred as quickly as possible to the laboratory and enriched with nutrient solution for diatoms. The mix was placed into a clear plastic box under controlled conditions (temperature $24 \pm 0.5^\circ\text{C}$ / $18 \pm 0.5^\circ\text{C}$ day/night cycles; photoperiod 16 h under daylight fluorescent lamps providing $400 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ [Philips 600W, Eindhoven, Netherlands]; relative humidity 70%) in a phytotron. Slides for the microscope, previously washed with distilled water, were submerged in this solution and held vertically by pieces of dense polystyrene. The plastic box was closed. After three days, the slides were removed from the plastic box. The time of submersion was chosen to collect a maximum of benthic diatoms as well as to limit the presence of other micro-organisms (especially other algae) on the slides. The original inoculum obtained after scraping the slides was used to test different methods of culture in terms of media and vessels used. In order to select the best duration of culture, this inoculum was also compared with another inoculum from the river Ariege.

Test of media for cell culture

Two nutrient media (Table 1) for the culture of benthic diatoms, Chu No. 10 medium (Nichols 1973) modified by Hughes and Lund and a nutrient solution developed in our laboratory similar to Freshwater "WC" medium (Guillard *et al.* 1972), were studied. These media without the vitamins were previously autoclaved at 120°C for 20 minutes. For the two media, vitamins were added in the same proportions: 0.1 mg.L^{-1} of vitamin B1, $0.5 \mu\text{g.L}^{-1}$ of biotin and $0.5 \mu\text{g.L}^{-1}$ of B12. Both the vitamin solutions and the oligo-element solution were filtered ($0.2\mu\text{m}$) and frozen to be preserved before being used. Major element solutions and oligo-element solutions can be stocked at 4°C . The cell media for diatom culture were prepared just before their uses. Benthic diatoms collected as mentioned previously were transferred into Erlenmeyer flasks for cell culture and slowly shaken (70 rpm).

Selection of vessel for cell culture

Some slides used for the isolation of benthic diatoms were not scraped and transferred into a smaller plastic box (180x135x90mm). Samples of scraped cell inoculum were introduced into an Erlenmeyer flask and a centrifuge tube. At the start, two aliquots (12 mL and 0.8 mL) of cell inoculum were inserted respectively into 150 mL (cell culture Erlenmeyer flask) and 10 mL (centrifuge tube) of new medium in order to obtain the same cell density. The plastic box, the Erlenmeyer flask and the centrifuge tube were slowly shaken. The rest of the inoculum was used for the study of the ecological succession of the community.

Cell density assessment

The growth of diatom community was followed, with a Malassez counting chamber, by viable cell density assessment based on the cell score with chloroplasts. For each sample, the counting was repeated three or four times. In the case of the plastic box, a part of each slide was scraped on both sides. For the Erlenmeyer flask and the centrifuge tube diatoms were scraped off the surface of the vessel with a scraper. For all the vessels, the surface scraped and the volume of the sample were noted to correct variations due to the scraping.

Time culture experiment

Cultures of inocula from two different rivers located in the Southwest of France (Garonne and Ariège) were carried with modified Chu No. 10 medium. The aim was to determine the best culture time to obtain enough diatom biomass and a community relatively close to the original natural community. After 72 h of growth, benthic diatoms were treated for 24 hours with 10mg/L of amoxicillin T trihydrate [CAS No: 61336-70-7]. According to previous results (data not shown) about the kinetic of nutrient uptake by diatom community in Erlenmeyer flask (nitrate, phosphate and silicium), media were renewed every 72 h and at the end of an antibiotic treatment (72, 96, 168, 240 h). Samples were taken at each step of the culture: during the transfer into the Erlenmeyer flask, at the beginning and at the end of antibiotic treatment, and ten days after the transfer. All the samples were fixed with formaldehyde [CAS Number: 50-00-0]. According to the French standard for "the Determination of the Diatom Biological Index (IBD)" (AFNOR NF T90-354) samples were treated with hydrogen peroxide [CAS No: 7722-84-1] to digest cell organic content and subsequently centrifuged (2571g for 10 min) four times and washed in order to eliminate the hydrogen peroxide. For all samples treated, an aliquot of 200µL was dried on a cover glass. The diatom frustules fixed on the cover glass were mounted on a microscope slide with Naphrax. Slides were scanned with a light microscope (Leica DMRD Microsystems GmbH, Wetzlar, D) at a magnification of 1000X and about 400 frustules were identified as recommended by the French standard NF T90-354. From the species composition data obtained

after each slide scan, the Shannon index [$-\sum_{i=1}^S p_i \ln p_i$ with S the number of species and $p_i = n_i/N$ (n_i

the number of individuals in each species and N the total number of individuals)] was calculated to assess the variations of the species diversity. This diversity index accounts for abundance as well as evenness of the species present in the community.

Data analysis

A descriptive analysis of the data was used to calculate the mean and the standard deviation. The results of cell density for the two media tested were statistically analyzed with One-Way ANOVA and Kruskal Wallis test and Dunn's test (Sigmastat, SPSS Inc.). Between each sample the growth rate (μ) was calculated according to:

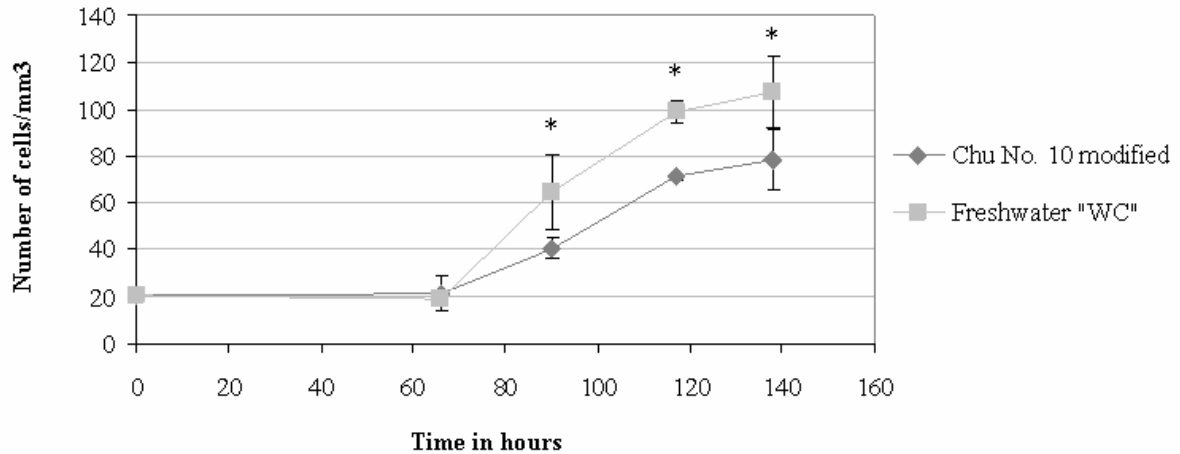
$$\mu = (D_{t_b}/D_{t_a}) * 24/t.$$

" D_{t_a} " and " D_{t_b} " represent cell densities at the start (t_a) and at the end (t_b) of the growth period considered, and " t " the duration of this period ($t = t_b - t_a$) in hours. The growth rate is expressed per day. The maximum growth rate (μ_{max}) observed for each culture was calculated. Pearson correlations (Sigmastat, SPSS Inc.) were also calculated to study the succession of the species composition during the culture in comparison with initial natural community in the river. Histogram charts were used to study the variations of abundance for the main species.

Results

Effects of cell medium on diatom growth

The cell density was assessed during the culture to study the growth of diatom biomass.



* Cell density values are statistically different between the two media ANOVA P<0.05

Figure 1: Growth curves of diatom communities in two different media (Chu No. 10 modified and the Freshwater "WC") from the cell density assessment

The results showed that the length of the lag time after the inoculation was 66 hours (figure 1). The maximum growth rate was achieved immediately after the lag time, between 66 hours and 90 hours of culture. It was higher for the diatom community in the Freshwater "WC" medium ($\mu_{max} = 3.41 \text{ d}^{-1}$) than the one in the Chu No. 10 ($\mu_{max} = 1.88 \text{ d}^{-1}$). Afterwards, the growth rate gradually decreased. For the two media studied, the lowest growth rates ($\mu = 1.24 \text{ d}^{-1}$ for Freshwater "WC" and $\mu = 1.26 \text{ d}^{-1}$ for Chu No 10) were observed between 117 and 138 hours. The maximal diatom biomass was obtained at 138 hours ($107 \text{ cells.mm}^{-3}$ for Freshwater "WC" and 79 cells.mm^{-3} for Chu No. 10). At 90, 117 and 138 hours, the cell density was significantly higher for the community in the Freshwater "WC" medium (ANOVA, P<0.05). Microscope observations showed that this last medium favoured the growth of other algae such as *Scenedesmus sp.* or *Chlamydomonas sp.*

Diatom growth with different vessel types

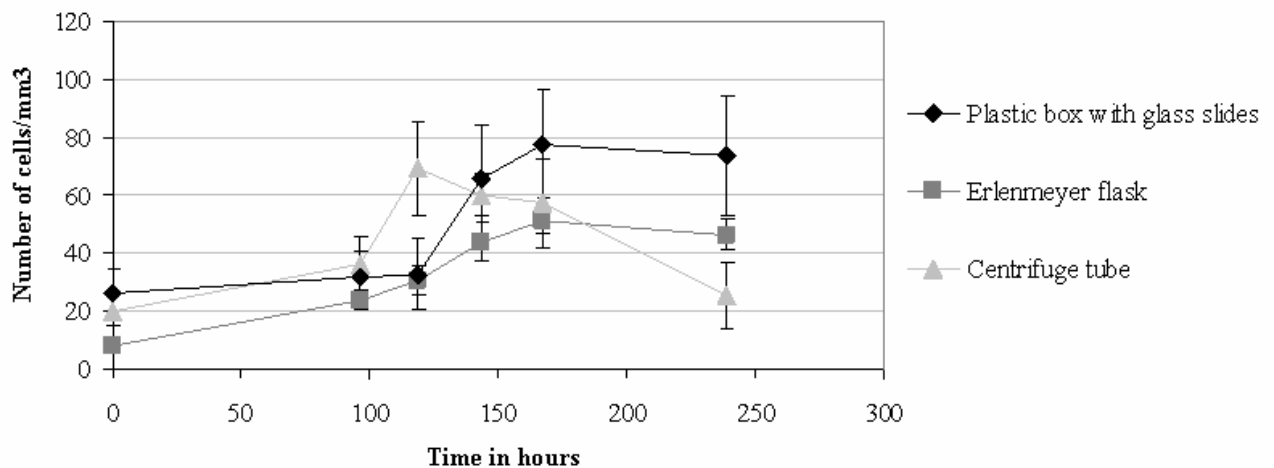


Figure 2: Growth curves of diatom communities for three different culture vessels (Plastic box with glass slides, Erlenmeyer flask, Centrifuge tube) from the cell density assessment

In the case of the centrifuge tube (figure 2), the maximum growth rate ($\mu_{max} = 1.9 \text{ d}^{-1}$) was achieved earlier (between 96 and 119 hours). The highest cell density ($69.9 \text{ cells}\cdot\text{mm}^{-3}$) reached at 119 hours with this vessel is close to those obtained with the glass slides ($77.8 \text{ cells}\cdot\text{mm}^{-3}$) and with the Erlenmeyer flask ($51.1 \text{ cells}\cdot\text{mm}^{-3}$) at 167 hours. After 119 hours the diatom growth stopped in the centrifuge tube and the cell density decreased. For the other vessel types, the highest maximum growth rate was calculated for the glass slides ($\mu_{max} = 2 \text{ d}^{-1}$) in comparison with the Erlenmeyer flask ($\mu_{max} = 1.42 \text{ d}^{-1}$). For the two vessels, the stationary phase was achieved at 167 hours. Statistical analysis showed, for each time, no significant differences between the different vessels (ANOVA or Kruskal Wallis $P > 0.05$).

Succession of benthic diatom communities isolated from the biofilms of two different rivers

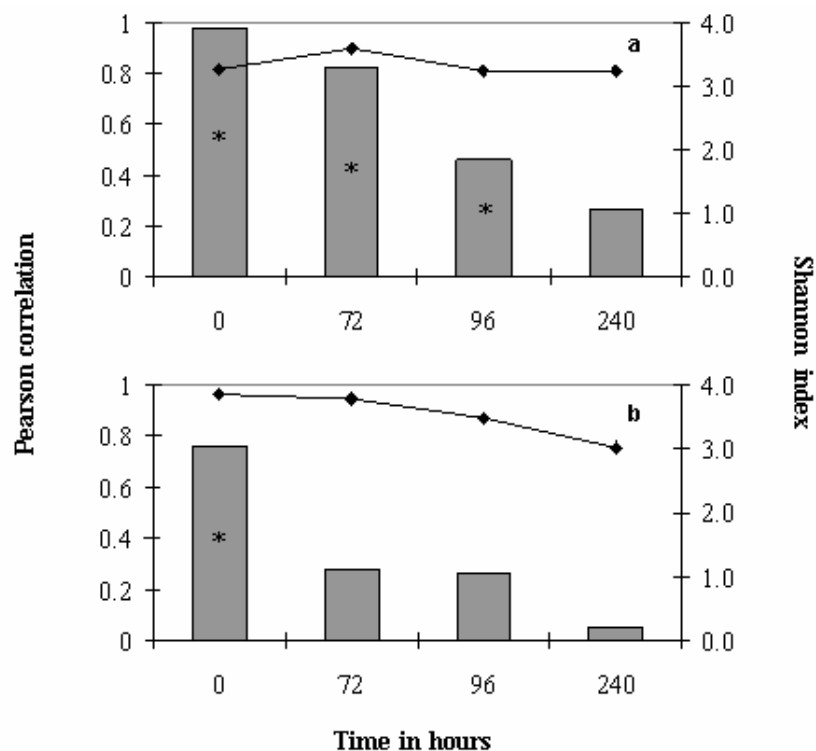


Figure 3: Diversity curves and Histograms of the Pearson correlations between the cultured diatom community at different date and the natural community sampled in (a) the Garonne river and (b) the Ariege river (*Significant correlation $P < 0.05$)

As shown in Figure 3, for the two cultures carried out, the correlation between the natural community and the community isolated ($t = 0$ hours) was positive and significant (0.982* for the River Garonne community and 0.759* for the River Ariege community, * $P < 0.05$). The isolation with glass slides of diatom cells did not affect the species composition of the communities or the diversity assessed by the Shannon index.

For the diatoms isolated from the River Garonne, up to 96 hours, the cultured community stayed relatively similar to the natural one, the correlations being positive and significant. Between 72 hours and 96 hours, the diversity decreased from a value of 3.6 to a value of 3.24. Afterwards the succession of community in culture was more pronounced.

In the case of diatoms isolated from the River Ariege, at 72 hours, the community changed. The correlation (0.279) with the natural community was not significant. During the culture a continuous decrease of the diversity was also observed.

In parallel, the study of the density values showed that the cell density reached values close to 80 cells. mm^{-3} for the Garonne culture and 40 cells. mm^{-3} for the Ariege culture.

In order to study more precisely the ecological succession during the culture, line charts of the relative abundance of main species are presented in figures 4a and 4b.

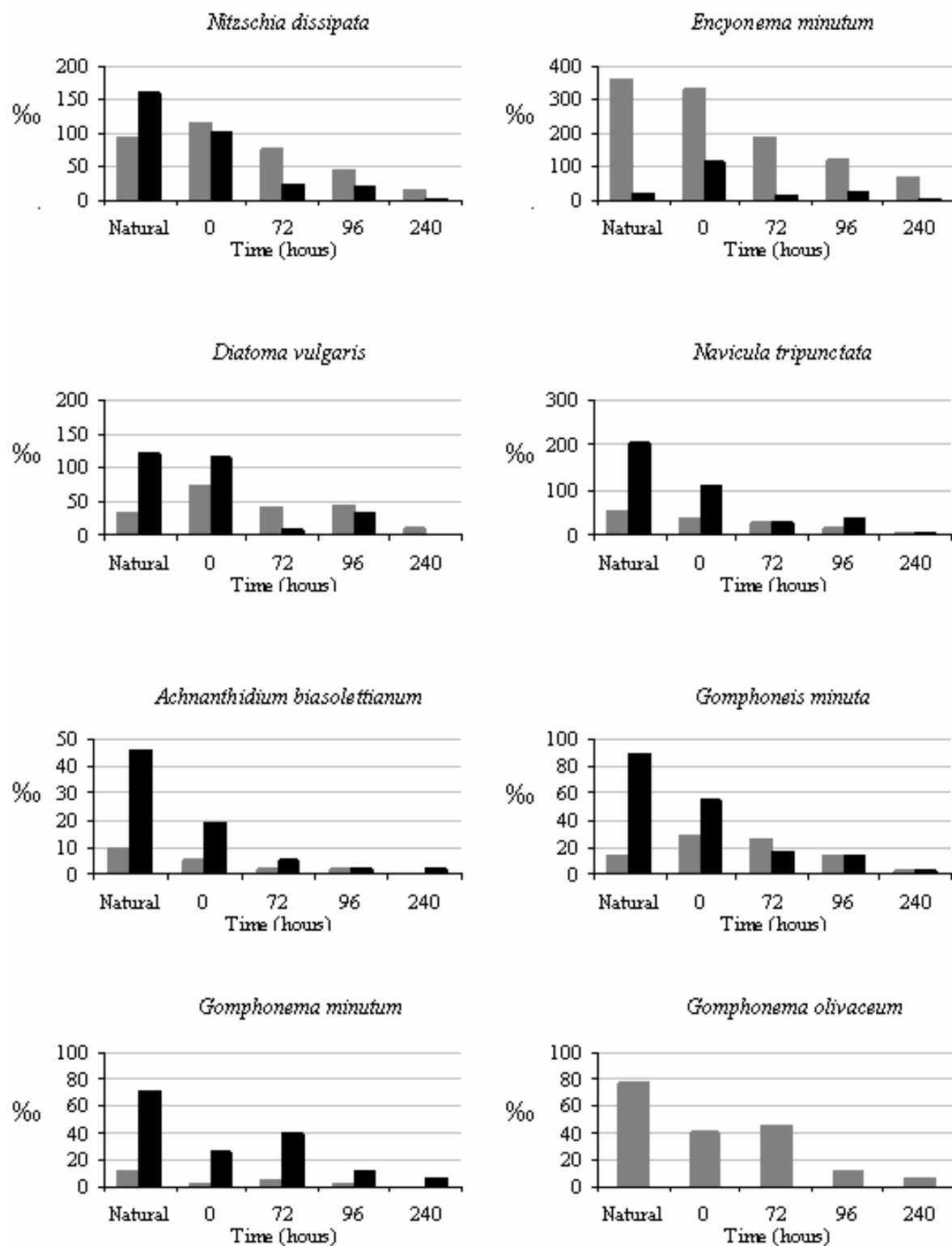


Figure 4a: Histograms of species (NDIS, ENMI, DVUL, NTPT, ADBI, GMMI, GMIN, GOLI) relative abundance (/1000) in the natural communities, in the communities isolated on glass slides (t = 0 h) and in the communities during the culture (t = 72, 96, 240 h) for two inoculums (Garonne and Ariege)

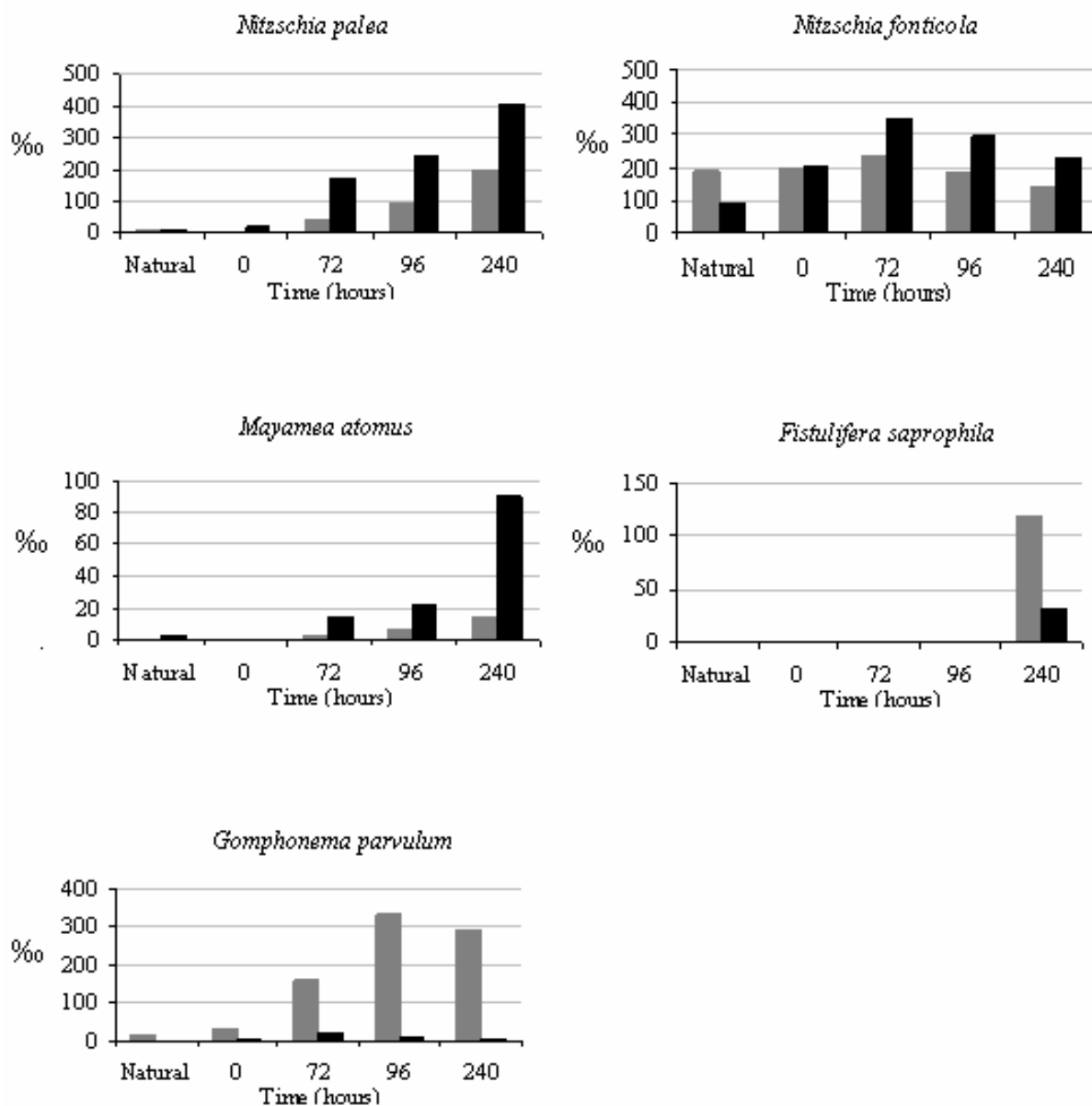


Figure 4b: Histograms of species (NPAL, NFON, MAPE, FSAP, GPAR) relative abundance (/1000) in the natural communities, in the communities isolated on glass slides (t = 0 h) and in the communities during the culture (t= 72, 96, 240 h) for two inoculums (Garonne and Ariege)

The same global succession pattern was observed in the two cultures. Dominant species reported in original natural communities [*Encyonema minutum*, *Nitzschia fonticola*, *Nitzschia dissipata* (Kutzing) Grunow, *Diatoma vulgare* and *Navicula tripunctata*] were replaced during the culture by *Nitzschia palea* or *Gomphonema parvulum*.

Among the dominant species in the natural communities, the decline of *Nitzschia dissipata*, *Encyonema minutum* and *Diatoma vulgare* during the culture was not related to the isolation step.

Their abundance remained almost stable (except *Nitzschia dissipata* in the culture from the River Ariege biofilm) or increased during this step. The culture conditions also affected the development of different Gomphonema species scored in the Ariege culture [*Gomphonema minutum* and *Gomphoneis minuta*] and in the Garonne culture [*Gomphonema olivaceum*]. The abundances of these species decreased. Likewise other species such as *Navicula tripunctata* and *Achnanthydium biasoletianum* highlighted a decrease of their abundances in the both cases.

A few species were more adapted to culture conditions, such as *Nitzschia palea*, which showed the largest development in the two cultures. Its increase was faster in the community isolated from the community sampled in the River Ariege. Likewise another species, *Gomphonema parvulum*, grew very quickly during the last hours of the culture and then stabilized. But it was in abundance only in the culture isolated from the River Garonne. In the case of *Nitzschia fonticola*, its growth was stopped at 72 hours and afterwards decreased. But the decrease was limited and, at the end, for both cultures, relative abundance of *Nitzschia fonticola* was stable around 200 individuals per 1000 cells.

Two species, *Mayamaea atomus* and *Fistulifera saprophila*, developed suddenly in relatively high abundance after 96 hours for each culture. *Mayamaea atomus* was more abundant in the community isolated from the River Ariege and *Fistulifera saprophila* in the community isolated from the River Garonne.

Discussion

The data obtained in these experiments led to a discussion about the influence of the culture method selected on the growth and on the succession of diatom communities.

The first experiment was carried out to select an efficient medium for the growth of benthic diatoms which limits the development of bacteria and other algae. The comparison of the Freshwater "WC" medium modified (Guillard *et al.* 1972) with the Chu No. 10 medium (Nichols 1973), indicated that Freshwater "WC" medium was rapidly colonized by cyanobacteria and other algae species (green algae). This contamination may be related to the absence of inhibitor elements in the micronutrient solution, like vanadium for cyanobacteria (Nalewajko *et al.* 1995). Even if with the Freshwater "WC" medium the diatom biomass growth was higher, the contamination of the culture by other micro-organisms is a negative factor for further ecotoxicological experiment. These micro-organisms produced extra-cellular polymeric substances which agglomerated diatoms and other algae and thus disturbed the diatom cellular observations under microscope. In contrast, the Chu No. 10 allowed a sufficient production of diatom biomass and was very selective for other micro-organisms and algae. For these reasons, the Chu No. 10 was retained for the rest of the experiment.

The growth rates obtained with this medium ($1.2 < \mu < 1.9 \text{ d}^{-1}$) were close to those reported for unialgal cultured in this medium and under the same conditions of temperature (Hayakawa *et al.* 1994; Butterwick *et al.* 2005). The growth rate data for diatom culture are limited to unialgal cultures (Round *et al.* 1990). Cassoti *et al.* (2005) mentioned that culture of *Thalassiosira weissflogii* (Grunow) reached the stationary phase of growth within 72 hours, whereas in this study, this phase was reached at 117 hours. This difference may be related to the use of another medium by Cassoti *et al.*. The presence of diatom species growing at different speeds in the community culture could also explain this difference.

In the second experiment, different vessels for diatom cell culture were tested. The results (figure 2) show that polypropylene centrifuge tubes are not appropriate for the culture of diatom community. Cell density decreased after 119 hours probably due to poor oxygenation. On glass slides, diatom cell culture exhibited a higher maximum growth rate. However, the communities of diatoms differed between the slides after only two days of culture (data not shown). In addition, the variability of cell density was very high during the growth period. For the Erlenmeyer flasks, the maximum growth rate of the community was lower than that of the glass slides. Nevertheless, it is possible to reproduce the diatom development with this vessel. The diatom community growth remained homogenous during the time of the culture (239 hours) in comparison with the communities on the glass slides. The results illustrated that the Erlenmeyer flask is the most useful vessel to allow homogenous development of the cells and to maintain diatom community in primo-culture. Glass slides provide heterogeneous biological material for further applications in ecotoxicological experiments.

In the third experiment, the optimum time culture was studied in Erlenmeyer flasks. The purpose of this experiment was to select the optimum duration to (i) obtain a community close to the original natural community and (ii) to produce enough biomass for experiments on diatoms. Results of figure 3 showed that the isolation step (described in material and methods) just before the primo-culture had no significant effect on the community composition. The communities isolated were composed of

species which are very sensitive to organic pollution (*Nitzschia fonticola*, *Nitzschia dissipata*, *Navicula tripunctata*, *Gomphonema olivaceum*, *Diatoma vulgare*, *Gomphonema minutum*, *Gomphoneis minuta* and *Encyonema minutum*) according to Krammer *et al.* (1986). After 72 hours of cell culture, the abundance of some species was significantly reduced (figure 4b). Some species, like *Gomphonema olivaceum*, are more adapted to oligotrophic than to eutrophic culture conditions (Guasch *et al.* 1998; Rott *et al.* 1998). Other species *Encyonema minutum* and *Nitzschia dissipata* were still observed in moderate proportions due to their high abundance in the isolated community from the river Garonne. At the same time of culture, *Gomphonema parvulum* and *Nitzschia palea* appeared in high abundance in the culture stemming from the communities of the Garonne and Ariège rivers (figure 4a). These two species were largely described for their tolerance to high nutrient concentrations and poor oxygenated conditions (Lange-Bertalot 1979; Van Dam *et al.* 1994; Guasch *et al.* 1998; Rott *et al.* 1998). After 96 hours of culture, the community structure remained unchanged. No significant differences were observed in the community composition after antibiotic treatment for the diatoms isolated from the Garonne River. The antibiotic treatment is not absolutely required. Nevertheless, it makes it possible to control the unsuitable development of other algae and bacteria. In the Ariège culture the low correlation obtained at the same date between community in culture and original natural community could be related to the dominance of oligotrophic species in the natural community. Therefore in eutrophic culture conditions, the succession was more marked.

After 240 hours of culture, diatom communities reflect highly eutrophic to saprobic conditions. At this time, two species *Mayamaea atomus* and *Fistulifera saprophila*, not enumerated previously, appeared in high proportions (respectively 9% and 12%). These two species are particularly tolerant to eutrophic and poor oxygenated conditions (Krammer *et al.* 1986; Rott *et al.* 1998). In contrast, *Nitzschia dissipata*, *Navicula tripunctata*, *Gomphonema olivaceum*, *Diatoma vulgare*, *Gomphonema minutum*, *Gomphoneis minuta* and *Encyonema minutum* were close to disappearance (figure 4b). As mentioned previously, these species are known to be sensitive to organic pollution and to poor oxygenated conditions. *Nitzschia fonticola* is always observed with relatively stable abundance all along the cell culture (figure 4a). This species was described for its ecological tolerance to large trophic conditions (Coste 1982). The occurrence of this species under eutrophic conditions is confirmed by its moderate sensitivity value (3.5) according to Coste in the Polluo-Sensitivity Index (Coste 1982).

In conclusion, the best duration for the primo-culture method would be 72 or 96 hours. After this duration, the communities obtained in culture were too significantly different and did not reflect the natural ones. In this ecological succession, tolerant species for eutrophic to saprobic conditions and poor oxygenated conditions were most favoured in the species competition. Sensitive species may not be able to modulate the development of tolerant species with interspecific signal (Casotti *et al.* 2005). Moreover, oxygenation by flask agitation appeared inadequate and favoured the growth of species tolerant to poor oxygenated conditions. Air bubbles may be a potential improvement to maintain species which favour oxygenated conditions.

To sum up, the culture of a diatom community provides the opportunities to test the effects of a wide range of parameters including contaminants such as pesticides, or the harmfulness of different effluents at the community level as well as at the cell level. With this aim, further investigations will be

necessary to increase the time of culture as well as to obtain a diverse diatom community relatively similar to the original natural community.

Acknowledgements

The authors are grateful to E. Menthon and J.C. Druart of the INRA Lake Hydrobiology Unit in Thonon for their help. This work was supported by the Aquitaine Region.

References

Badr, S. A. and H. F. Abou-waly (1997). "Growth Response of Freshwater Algae to Continuous Flow of Terbutryn." *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 59(2): 298-305.

Berard A, Dorigo U, Mercier I, Becker-van Slooten K, Grandjean D and 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(8):935-944

Butterwick C, Heaney SI and Talling JF (2005) Diversity in the influence of temperature on the growth rates of freshwater algae, and its ecological relevance. *Freshwater Biology* 50(2):291-300

Casotti R, Mazza S, Brunet C, Vantrepotte V, Ianora A and Miralto A (2005) GROWTH INHIBITION AND TOXICITY OF THE DIATOM ALDEHYDE 2-TRANS, 4-TRANS-DECADIENAL ON THALASSIOSIRA WEISSFLOGII (BACILLARIOPHYCEAE). *Journal of Phycology* 41(1):7-20

Coste, M. (1982). Etude des méthodes biologiques d'appréciation quantitative de la qualité des eaux. CEMAGREF, 21

DeNoyelles F-J, Kettle WD and Sinn DE (1982) The responses of plankton communities in experimental ponds to atrazine, the most heavily used pesticide in the United States. *Ecology* 63(12):1285-1293

Dorigo U and Leboulanger C (2001) A pulse-amplitude modulated fluorescence-based method for assessing the effects of photosystem II herbicides on freshwater periphyton. *Journal of Applied Phycology* 13(6):509-515

Guasch H, Ivorra N, Lehmann V, Paulsson M, Real M and Sabater S (1998) Community composition and sensitivity of periphyton to atrazine in flowing waters: the role of environmental factors. *Journal of Applied Phycology* 10(2):203-213

Guasch H, Munoz I, Roses N and Sabater S (1997) Changes in atrazine toxicity throughout succession of stream periphyton communities. *Journal of Applied Phycology* 9(2):137-146

Guasch H and Sabater S (1998) Light history influences the sensitivity to atrazine in periphytic algae. *Journal of Phycology* 34(2):233-241

Guillard RRL and Lorenzen CJ (1972) Yellow-green algae with chlorophyllide c. *Journal of Phycology* 8):10-14

Gustavson K., Mohlenberg F. and L. S (2003) Effects of Exposure Duration of Herbicides on Natural Stream Periphyton Communities and Recovery. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 45(1):0048-0058

Hayakawa T, Kudoh S, Suzuki Y and Takahashi M (1994) Temperature-Dependent Changes in Colony Size of the Fresh-Water Pennate Diatom *Asterionella-Formosa* (Bacillariophyceae) and Their Possible Ecological Implications. *Journal of Phycology* 30(6):955-964

Kasai F (1999) Shifts in herbicide tolerance in paddy field periphyton following herbicide application. *Chemosphere* 38(4):919-931

Krammer, K. and H. Lange-Bertalot, Eds. (1986). *_Bacillariophyceae 1.Teil:Naviculaceae._ Süßwasserflora von Mitteleuropa* . Stuttgart., G.Fischer verlag.

Lange-Bertalot H (1979) Pollution tolerance of diatoms as a criterion for water quality estimation. *Nova Hedwigia* 64(285-304

Lenoir A and Coste M (1996) Development of a practical diatom index of overall water quality applicable to the French national water Board network. In: WHITTON BA and ROTT E (ed) *Proceedings of Use of Algae for monitoring rivers II*, Innsbruck Austria 1995

McCormick P and Cairns J (1994) Algae as indicators of environmental change. *Journal of Applied Phycology* 6(5):509-526

Nalewajko, C., K. Lee and T. R. Jack (1995). "Effects of Vanadium on Fresh-Water Phytoplankton Photosynthesis." *Water Air and Soil Pollution* 81(1-2): 93-105.

Navarro E, Guasch H and Sabater S (2002) Use of microbenthic algal communities in ecotoxicological tests for the assessment of water quality: the Ter river case study. *Journal of Applied Phycology* 14(1):41-48

Nelson KJ, Hoagland KD and Siegfried BD (1999) CHRONIC EFFECTS OF ATRAZINE ON TOLERANCE OF A BENTHIC DIATOM. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18(5):1038-1045

Nichols (1973) Growth media - freshwater. In: JR S (ed) *Handbook of Phycological methods: Culture Methods and Growth Measurements*, Cambridge Univ.Press Ed., New York

Peres F, Florin D, Grollier T, FeurtetMazel A, Coste M, Ribeyre F, Ricard M and Boudou A (1996) Effects of the phenylurea herbicide isoproturon on periphytic diatom communities in freshwater indoor microcosms. *Environmental Pollution* 94(2):141-152

Peterson HG, Boutin C, Freemark KE and Martin PA (1997) Toxicity of hexazinone and diquat to green algae, diatoms, cyanobacteria and duckweed. *Aquatic Toxicology* 39(2):111-134

Prygiel J and Coste M (1996) Diatoms and diatom indices in the networks for quality measurement of French watercourses: Short history and future. *Bulletin Francais de La pêche et de la pisciculture* 341-42):65-79

Rott E, Duthie HC and Pipp E (1998) Monitoring organic pollution and eutrophication in the Grand River, Ontario, by means of diatoms. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 55(6):1443-1453

Round FE, Crawford RM and Mann DG (1990) *The Diatoms. Biology & morphology of the genera*. Cambridge University Press., Cambridge

Sabater S (2000) Diatom communities as indicators of environmental stress in the Guadiamar River, S-W. Spain, following a major mine tailings spill. *Journal of Applied Phycology* 12(2):113-124

Schreiber U, Müller JF, Haugg A and Gademann R (2002) New type of dual-channel PAM chlorophyll fluorometer for highly sensitive water toxicity biotests. *Photosynthesis Research* 74(3):317-330

Stevenson RJ and Pan Y (1999) Assessing environmental conditions in rivers and streams with diatoms. In: Stoermer EF and Smol JP (ed) *The Diatoms - Applications for the Environmental and Earth Sciences.*, Cambridge University Press., Cambridge

Tang JX, Hoagland KD and Siegfried BD (1997) Differential toxicity of atrazine to selected freshwater algae. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 59(4):631-637

Van Dam H, Mertens A and Sinkeldman J (1994) A coded checklist and ecological indicator values of freshwater diatoms from the Netherlands. *Netherlands Journal of Aquatic Ecology* 28(1):117-133

Whitton BA and Kelly MG (1995) Use of Algae and Other Plants for Monitoring Rivers. *Australian Journal of Ecology* 20(1):45-56

Table 1

Lists of major nutrients and micronutrients for the Chu No.10 modified medium and for the Freshwater "WC" medium

Major Nutrients	CAS Number	Freshwater "WC" medium	Chu No. 10 modified medium
Ca(NO ₃) ₂	13477-34-4		0.042 mM
K ₂ HPO ₄	7758-11-4		0.228 mM
Na ₂ CO ₃	497-19-8		0.188 mM
MgSO ₄	10034-99-8	0.150 mM	0.100 mM
Na ₂ SiO ₃ , 5H ₂ O	10213-79-3	0.100 mM	0.202 mM
NaNO ₃	7631-99-4	1.000 mM	
KH ₂ PO ₄	7778-77-0	0.064 mM	
NaHCO ₃	144-55-8	0.150 mM	
CaCl ₂ , 2H ₂ O	10035-04-8	0.250 mM	

Micro Nutrients	CAS Number	Freshwater "WC" medium	Chu No. 10 modified medium
EDTA-Fe	15708-41-5	268.600 µM	268.6 µM
MnSO ₄ , H ₂ O	10034-96-5	8.900 µM	1.000 µM
H ₃ BO ₃	10043-35-3	24.100 µM	5.000 µM
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	7446-20-0	1.700 µM	0.100 µM
CuSO ₄ , 5H ₂ O	7758-99-8	3.900 µM	0.050 µM
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	12054-85-2		0.007 µM
Na ₂ WO ₄ , 2H ₂ O	10213-10-2		0.010 µM
KBr	7758-02-3		0.100 µM
KI	7681-11-0		0.050 µM
Cd(NO ₃) ₂	10022-68-1		0.050 µM
Co(NO ₃) ₂ , 6H ₂ O	10026-22-9		0.050 µM
(NH ₄) ₂ Ni(SO ₄) ₂ , 6H ₂ O	7785-20-8		0.050 µM
Cr(NO ₃) ₃ , 9H ₂ O	7789-02-8		0.010 µM
NH ₄ VO ₃	7803-55-6		0.010 µM
AlK(SO ₄) ₂ , 12H ₂ O	7784-24-9		0.050 µM
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	10102-40-6	0.100 µM	
CoCl ₂ , 6H ₂ O	7791-13-1	0.042 µM	

Herbicide effects on freshwater benthic diatoms: Induction of nucleus alterations and silica cell wall abnormalities

Debenest T.^{1,2}, Silvestre J.¹, Coste M.², Delmas F.², Pinelli E^{1*}.

¹ Ecolab UMR 5245 (UPS, CNRS, INP-ENSAT), Equipe ECOGEN, Av. de l'Agrobiopole - BP 32607
Auzeville Tolosane, 31326 CASTANET TOLOSAN CEDEX, France

² Cemagref, 50 av. de VERDUN, 33612 CESTAS CEDEX, France

* Corresponding author: Tel.: +335 62 19 39 45; Fax: +335 62 19 39 01; E-mail: pinelli@ensat.fr

Abstract

The benthic diatoms are well known bio-indicators of river pollution by nutrients (nitrate and phosphorus) but are not a reliable means to detect pollution by pesticides. A field experiment in two watersheds (Sousson and Save) in the southwest of France was carried out during the spring of 2005 to study the impacts of agricultural pollution on benthic diatom communities. The monitoring of the water quality from the Diatom Biological Index (IBD) and from the nitrate concentration in water showed a poor trophic quality in the sites located in intensive crop areas. In the highly agricultural watershed studied (Sousson), high total herbicide mean concentration (3.3µg/L) and high mean abundances of diatom cell wall abnormalities (12 and 14.2/1000) were also analysed. Nevertheless no relations have been established between these two parameters.

In this context, an experiment was carried out to investigate if the induction of frustule abnormalities could be associated with herbicide toxicity. A freshwater benthic diatom community, isolated from natural biofilm and cultured under controlled conditions, was treated with a well known genotoxic herbicide, the Maleic Hydrazide (MH) (CAS No. 123-33-1). Cells were exposed to three concentrations of MH ($5 \cdot 10^{-6}$, 10^{-6} , 10^{-7} M) during six hours followed by 24h-recovery time. Different kinds of nucleus alterations were identified such as abnormal nucleus location, micronucleus, multinuclear cell or disruption of nucleus membrane. In addition a dose dependant increase of the nucleus alterations abundance was observed. At the same time, the count of benthic diatom species exhibited a significantly higher abundance of diatoms silica cell wall (frustule) abnormalities at the highest concentrations of MH (10^{-6} and $5 \cdot 10^{-6}$ M). These two parameters tended to increase together (Pearson correlation=0.702, $P_{\text{value}} < 0.05$).

Keywords: Diatoms, Genotoxicity, Cellular alterations, Frustule, Maleic Hydrazide

Introduction

The freshwater diatoms are fundamental primary producers for the aquatic ecosystems (Round *et al.* 1990). They are a source of food for numerous other organisms of the upper trophic levels. Alterations on these micro-organisms may disrupt the balance of the whole ecosystem (Stevenson *et al.* 1999). For these reasons water quality bio-monitoring programs, based on studies of benthic diatoms, have been developed in Europe and North America to monitor river health (Whitton *et al.* 1995; Potapova *et al.* 2005). In this context several monitoring tools like the IPS (Polluo-sensibility Index) and the IBD (Diatom Biological Index) have been developed in Europe and in North America to assess the water quality of rivers from the evolution of the diatom community structure (Coste 1982; Lenoir *et al.* 1995; Prygiel *et al.* 1996; Potapova *et al.* 2005). Nevertheless these tools use the sensitivity of species for classical chemical data (dissolved organic matter, nutrients and pH) to estimate the water quality. Their efficiency to detect water pollutions by pesticides is questioned (Dorigo *et al.* 2004). Indeed a wide panel of parameters like light exposition, nutrient concentrations may interfere in the response of diatoms exposed to pesticides (Guasch *et al.* 1997; Guasch *et al.* 1998). Thus, in agricultural watersheds, where there is a high level of pollution from pesticides in streams, the potential impacts of pesticides on algae communities were not demonstrated (Berard *et al.* 1998).

Among the photosynthetic micro-organisms, diatoms present a cell wall (frustule) composed of siliceous valves which constitute a shell around the cell. The morphology and the ornamentation of the frustule are specific for each species. However the frustule may present abnormal morphology and disturbed ornamentation. Silica deficiency and high cell density were proposed to induce such abnormalities. (Thomas *et al.* 1980; Adshead-Simonsen *et al.* 1981; McFarland *et al.* 1997; Dickman 1998; Rijstenbil 2001). Numerous authors suggested that these abnormalities could be induced by toxic agents, like herbicides or heavy metals (Thomas *et al.* 1980; Fisher *et al.* 1981; McFarland *et al.* 1997; Dickman 1998; Gomez *et al.* 2003; Cattaneo *et al.* 2004; Schmitt-Jansen *et al.* 2005). However the cellular mechanisms involved in the formation of frustule abnormalities remain unknown.

The genotoxicity is one of the potential mechanisms suspected for the frustule abnormality induction. For other organisms (oyster larvae), it has recently been shown that endosulfan genotoxicity was related to the induction of shell abnormalities (Wessel *et al.* 2007). In diatoms, DNA dispersion and multinuclear cells were reported after treatments by different chemicals (colchicine CAS No 64-86-8 and an aldehyd CAS No. 50-00-0) (Coombs *et al.* 1968; Casotti *et al.* 2005). Abnormal frustules were also observed in diatoms exposed to colchicine (microtubule inhibitor) or a herbicide (isoproturon CAS No 34123-59-6) (Coombs *et al.* 1968; Schmitt-Jansen *et al.* 2005). These abnormalities may be induced during the frustule formation. Indeed the secretion of the siliceous valves is mediated by proteins and by the cytoskeleton which are implicated in the polymerisation and the transport of silica (Pickett-Heaps *et al.* 1979; Round *et al.* 1990; Pickett-Heaps 1991; Lee *et al.* 1992; Van Den Hoek *et al.* 1995). An inhibition of the protein synthesis or an alteration of the cytoskeleton may lead to a poor silica supply which is known to disturb the frustule formation (Thomas *et al.* 1980; McFarland *et al.* 1997; Dickman 1998).

The aim of this work was to study (i) *in situ* the relationship between the frustule abnormality abundance and the variations of total herbicide concentration in sites of agricultural watersheds and,

(ii) in laboratory, the potential links between the formation of frustule abnormalities and the genotoxicity. For the field experiment, environmental parameters (nitrate and total herbicide concentrations) were assessed for all the sites parallel to biological samples during the main periods of agricultural herbicide treatments. In the case of the laboratory experiment the diatom cells were isolated from a natural biofilm and maintained in culture. Diatom culture was exposed to a well known genotoxic herbicide, the Maleic Hydrazide (MH CAS No. 123-33-1), which induced micronuclei, chromosomal ruptures and chromosome bridges in higher plants (Cotelle *et al.* 1999; Grant 1999; Kong *et al.* 1999; Marcano *et al.* 2004; Hajjouji *et al.* 2007). DNA specific stain was used to observe diatom nucleus with an epifluorescence microscope. Thus the potential genotoxicity of MH on diatoms was estimated by a count of nucleus alterations. For all the experiments the abnormal frustules were counted to evaluate the role of herbicides in the induction frustule abnormalities.

Materials and methods

× Study area

The study area is located in the basin of the Garonne River to the west of Toulouse (SW France). It is covered by intensive agricultural crops (wheat, irrigated corn and soybean, sunflower). Two watersheds were studied: the watershed of the Sousson River covered by a majority of irrigated corn crops and the largest watershed of the Save River covered by wheat, soybean and sunflower crops. The first was followed from the source of the Sousson River (site "Aujan") to its mouth (site "Auch"). A site ("Cedon"), located on a tributary of the Sousson River, was also studied. The Save River was followed from an upstream site ("Gorges"), classified in the trout zone, and located in an area covered by pastures and breeding. After this site, the intensive crop surfaces gradually increase downstream up to the last site (Cazaux).

× Periphyton sampling

In the different sites, plastic racks (400 x 300 x 131 mm) were immersed in the water from March to June 2005 during the main periods of herbicide agricultural treatments. In each rack, three glass slides (80 x 285 mm) were fixed vertically and positioned parallel to the current. The glass slides were sampled on 12th April, 9th May, 31st May and 20th June. With the exception of the last date, the glass slides colonized by benthic diatoms were replaced, each time, by clean glass slides. For each glass slide colonized, the biofilm was scraped off and the solution obtained was homogenized to a volume of 100 mL.

× Diatom species identification

For the identification of the diatom species and the count of cell wall abnormalities, all the samples, from the field experiment and the laboratory experiment, were fixed with formaldehyde (CAS No. 50-00-0). According to the French standard for "the Determination of the Diatom Biological Index (IBD)" (NF T90-354) samples were treated with hydrogen peroxide (CAS No. 7722-84-1) to digest organic components. They were subsequently centrifuged and the siliceous diatom cell walls (frustules) were re-suspended in water to eliminate the hydrogen peroxide. For all samples treated, an aliquot (about 200 µl) was dried on a glass cover. The frustules fixed on this glass cover were mounted on a microscope slide with Naphrax®, a resin with an high refractive power (1.73). The slides were

scanned with a light microscope (Leica DMRD Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, D) at a magnification of 1000X and an average of 1000 frustules was identified.

For the field experiment, the IBD was calculated from the species composition data of each site with the Omnidia software (Lecointe *et al.* 1993). The abundance of frustule abnormalities was also recorded. For the whole study, mean value of IBD and of frustule abnormality abundance was finally obtained for each site to estimate the water quality.

For the laboratory experiment, the frustule abnormalities were counted.

× Analysis of nitrates in water samples

The water samples collected in the sites were transferred into a cool box and immediately analysed. After filtration through a glass fiber prefilter (Sartorius), nitrate concentration was determined by colorimetric method according to the French standard NF EN ISO 13395.

× Chromatographic analysis of herbicides in water samples

The water samples, collected in rivers with glass bottles, were transferred by cool box to the laboratory. After filtration through a glass microfiber filter (Whatman GF/F, porosity 0.7 µm), the water samples were pre-concentrated on a 6 ml SPE encapped cartridge packed with 1000 mg of octadecyl silica from Supelco (Bellefonte, PA, USA) according to Dupas *et al.* (1996) (Dupas *et al.* 1996). The samples obtained were analysed by HPLC system (Finnigan SpectraSYSTEM SCM1000 Solvent Degasser, Finnigan SpectraSYSTEM P4000 Quaternary Pump, Finnigan SpectraSYSTEM AS3000 Autosampler (column oven set at 30 °C)) and Finnigan UV6000LP photodiode array detector (Thermo Electron Corporation, MA, USA) (Mazzella *et al.* 2007). For each sample 28 herbicides (Acetochlor, Aclonifen, Ametryn, Atrazine and its metabolite (DEA) Bromacil, Chlortoluron, Cyanazine, Diuron and its metabolites (DCPMU and DCPU) Hexazinone, Isoproturon and its metabolites (IPPMU and IPPU), Linuron, Metobromuron, Metolachlor, Metoxuron, Monolinuron, Monuron, Prometryn, Propazine, Simazine and its metabolite (DIA), Terbutylazine and its metabolite (DET), Terbutryn) were monitored (Munaron 2004).

× Diatom culture

The benthic diatoms were cultured as described by Debenest *et al.* (Debenest, T., J. Silvestre, M. Coste, F. Delmas and E. Pinelli, unpublished data). The biofilms were collected on pebbles from rivers located in the basin of the Garonne River in the southwest of France. A specific diatom medium (Chu No. 10 modified by HUGHES, J.C. & LUND, J.W.G.) was added to the biofilm samples and placed in plastic boxes under controlled conditions in phytotron with air temperatures of $24 \pm 0.5^\circ\text{C}/18 \pm 0.5^\circ\text{C}$ and relative humidity of 70/75 %. Diatoms were lit with a 16 h day length under day/light, fluorescent lamps providing $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ [Philips 600W, Eindhoven, Netherlands]. In order to isolate the benthic diatoms, microscopic slides were submerged vertically in the solution. After three days, the benthic diatoms were scraped off the slides and cultivated in an Erlenmeyer flask for cell culture filled with 150 ml of new medium. The flasks were slowly stirred.

× Diatoms toxic agent exposure

After a two-week culture, diatom samples (5ml) from the flask were placed in twelve centrifuge tubes (15 ml) fixed horizontally in a small box and stirred. The volume of nutrient solution was the same between the tubes in order to provide the same amount of nutrients to diatoms during the exposure.

The Maleic Hydrazide (MH) was then added: three replicates have been realized for each concentration ($5 \cdot 10^{-6}$, 10^{-6} , 10^{-7} M) and the control. The cells were exposed to the toxic agent during six hours. At the end of exposure, the cells were centrifuged (693g during ten minutes) and re-suspended in fresh medium to remove MH. Diatom cells were kept for a 24h-recovery time in the same conditions of culture. The duration of the MH exposure was chosen in comparison with bibliographic data (Cotelle *et al.* 1999; Casotti *et al.* 2005) and followed by a recovery time fixed in relation to growth rate assessed previously during other cell cultures (Debenest, T., J. Silvestre, M. Coste, F. Delmas and E. Pinelli, unpublished data).

× Microscopic Nucleus observation

For the laboratory experiment, the diatom nucleus was stained with 2% of Hoescht 33342 (CAS No. 23491-52-3) solution at 2 g/L. The slides were prepared after the recovery time for each replicate. Nucleus alterations were counted under a 600X magnification with an epifluorescence microscope (BX41 Olympus America Inc. Center Valley, PA USA) with specific DAPI filter (U-MWU2, Ex. Filter: 330-385 λ , Em. Filter: 420 λ , Dichromatic filter: 400 λ). A total of at least 1000 cells for each treatment was counted to determine the mitotic index and the frequency of nucleus alterations. To be able to observe these alterations, preliminary studies with a confocal microscope (DRMX A2 Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, D) were performed to identify the specific, correct stain of DNA in diatoms. The Hoescht 33342 was selected comparatively to other fluorochromes (Propidium iodide CAS No. 25535-16-4) tested which did not make it possible to discern nucleus from chloroplasts.

× Statistical analysis

A descriptive analysis of the data was used to calculate the mean value and the standard deviation of the different data from the field and the laboratory experiments. The Pearson correlations were calculated to study the relationship between the different parameters studied (IBD values, nitrate concentration and total herbicide concentration and abnormal frustule abundance). In the case of laboratory experiment, the values of abundance for the nucleus alterations and for the abnormal frustule were statistically analyzed with ANOVA and Tukey test (SigmaStat, Systat Software Inc.) to compare the groups treated with the control group. The Pearson correlation (SigmaStat, Systat Software Inc.) was also calculated to test the relation between these two alterations.

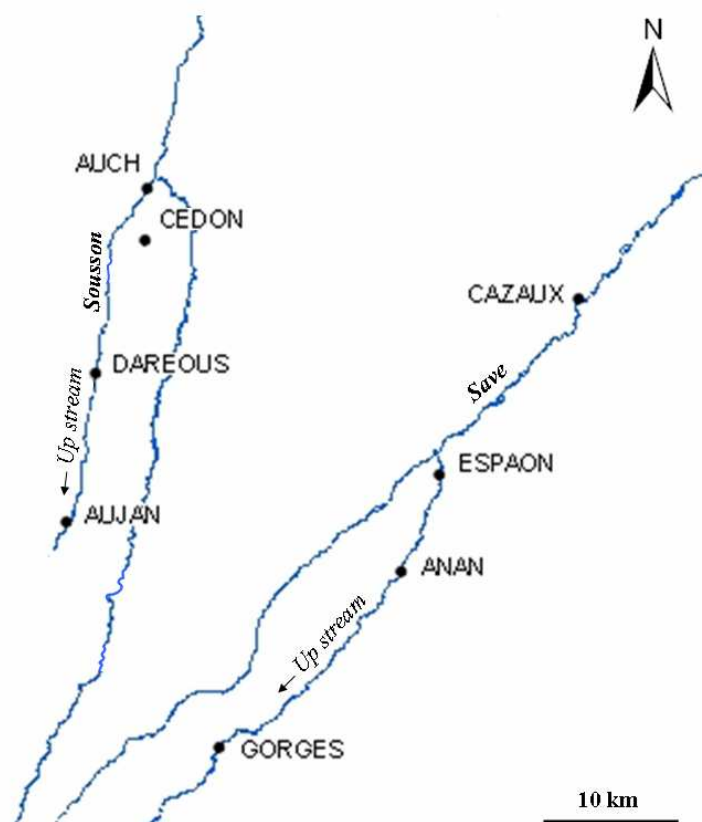


Figure 1: The sites of the Sousson and the Save watersheds in the southwest of France

Table 1

The IBD mean values, the nitrate (N-NO₃) mean concentrations, the total herbicide mean concentrations and the abnormal frustule mean abundances in the sites of the Sousson and the Save watersheds in the spring 2005 (April-June)

Watershed	Site	IBD mean value (/20)		Nitrate concentration (mg.L ⁻¹)		Total herbicide concentration (µg.L ⁻¹)		Abnormal frustule abundance (/1000)	
		Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.
Sousson	AUJAN	14.0	1.1	22.3	3.0	0.4	0.2	12.0	11.3
	DAREOUS	13.9	1.5	18.8	11.5	1.2	0.4	5.1	2.8
	CEDON	14.0	1.3	10.4	4.9	0.4	0.2	14.2	7.5
	AUCH	13.3	1.4	18.9	7.7	3.3	2.5	3.2	3.2
Save	GORGES	17.3	0.6	4.8	1.8	0.1	0.1	1.9	0.6
	ANAN	14.6	0.8	7.2	2.6	0.1	0.2	5.1	2.4
	ESPAON	15.0	1.1	7.6	2.7	0.3	0.2	10.2	4.5
	CAZAUX	13.7	0.9	9.6	3.4	0.5	0.3	3.8	3.2

(S.D. : Standard Deviation)

Results

The Diatom Biological Index (IBD), calculated from the species composition of the diatom communities, revealed a decrease in the water quality, during the spring 2005, between the reference site "Gorges" and the other sites, especially the sites of the Sousson watershed (figure 1 and table 1). In the site "Gorges" the IBD mean value was relatively high (17.3/20) and decreased downstream after this site. For the sites of the Sousson watershed, the IBD calculated did not exceed the mean value of 14/20 and remained close to the water quality reported for the downstream site ("Cazaux") of the Save watershed. The nitrate (N-NO₃) concentrations assessed in the same way confirmed the results of water quality obtained with the IBD. For the Save watershed, the data showed a positive gradient of mean nitrate concentration from the site "Gorges" up to the site "Cazaux". The sites of the Sousson watershed presented nitrate mean concentrations (table 1) higher than the mean values assessed in the Save River except for the site "Cazaux". The total herbicide concentration exhibited higher mean values in the site "Cazaux" than in the other sites of the Save watershed (table 1). In the case of the Sousson watershed the stream water was affected by serious herbicide contaminations. The highest total mean concentration (3.3µg/L) of the study area was reported for the mouth site ("Auch") of this watershed. Likewise the analyses of the biological samples (table 1) showed that the maximum mean values (14.2 and 12/1000) of abnormal frustule abundance were obtained for two sites (respectively Cedon and Aujan) of this watershed. In the case of the Save watershed, the sites (Anan, Espaon and Cazaux) located in agricultural areas highlighted higher mean values of abnormal frustule abundance than the upstream site (Gorges). Therefore the statistical relationships between these different parameters were studied. The IBD mean values were negatively correlated with nitrates (-0.664, $P > 0.05$) and total herbicide mean concentrations (-0.515, $P > 0.05$) even if the correlations were not significant. The total herbicide mean concentrations were also negatively correlated with the abnormal frustule mean abundances (-0.332, $P > 0.05$). Nevertheless this correlation remained not significant.

In this context a laboratory experiment was carried out with a culture of diatom community exposed to a genotoxic herbicide, the Maleic Hydrazide (MH), to investigate under controlled conditions the relationship between frustule abnormalities and potential genotoxic effects. The results showed that nucleus alteration abundance increased with the concentration of MH applied (table 2). These alterations appeared statistically (Tukey test, $P < 0.05$) in higher proportions for the MH highest doses (10^{-6} and $5 \cdot 10^{-6}$ M).

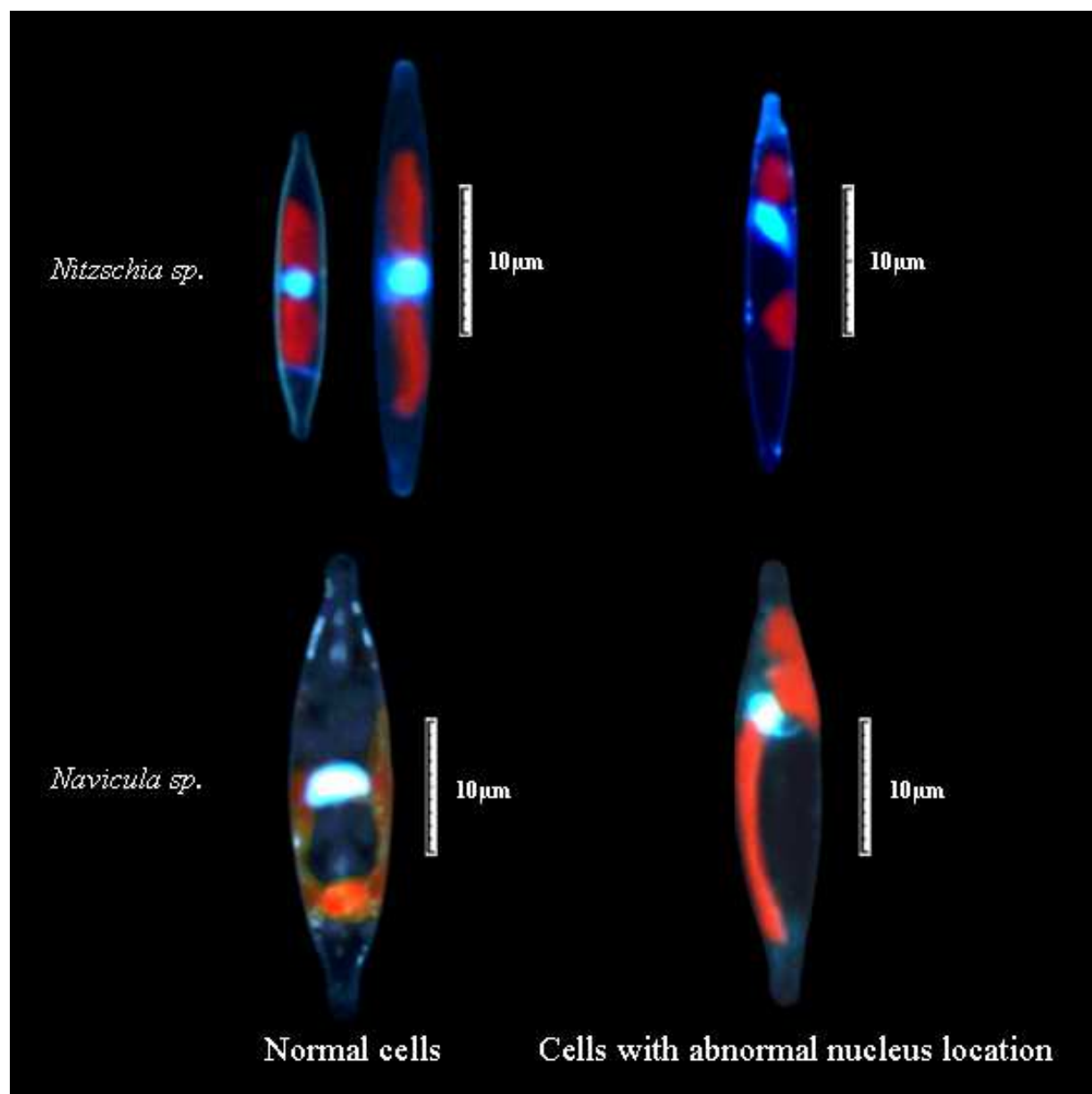


Figure 2a: Cells of different diatom genera (*Nitzschia* and *Navicula*) with normal and abnormal nucleus location (nucleus stained in blue with Hoescht 33342, chloroplasts appeared in red)

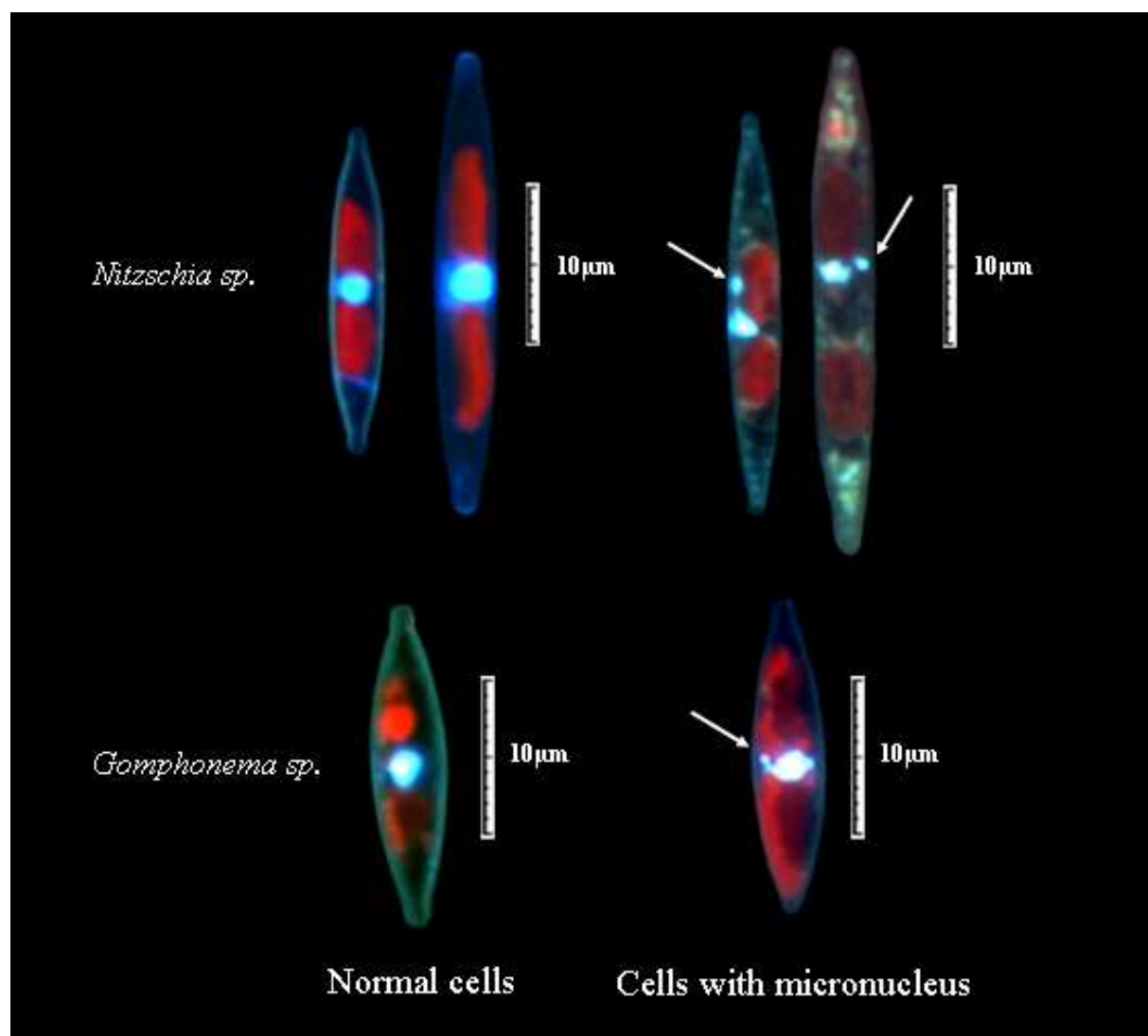


Figure 2b: Cells of different diatom genera (*Nitzschia* and *Gomphonema*) with or without micronuclei (arrows) observed with epifluorescence microscope (nucleus stained in blue with Hoescht 33342, chloroplasts appeared in red)

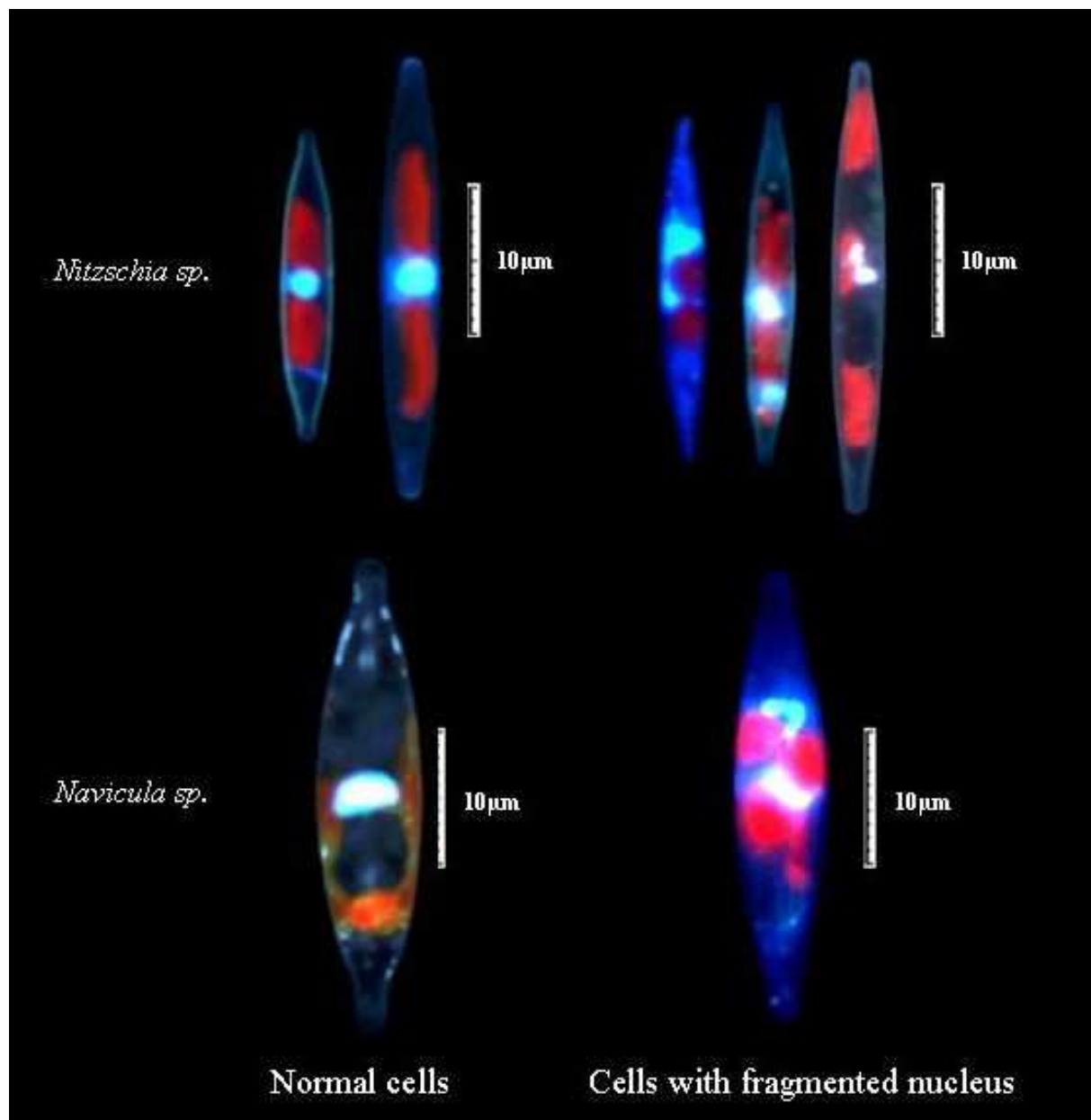


Figure 2c: Cells of different diatom genera (*Nitzschia* and *Navicula*) with normal and fragmented nucleus observed with epifluorescence microscope (nucleus stained in blue with Hoescht 33342, chloroplasts appeared in red)

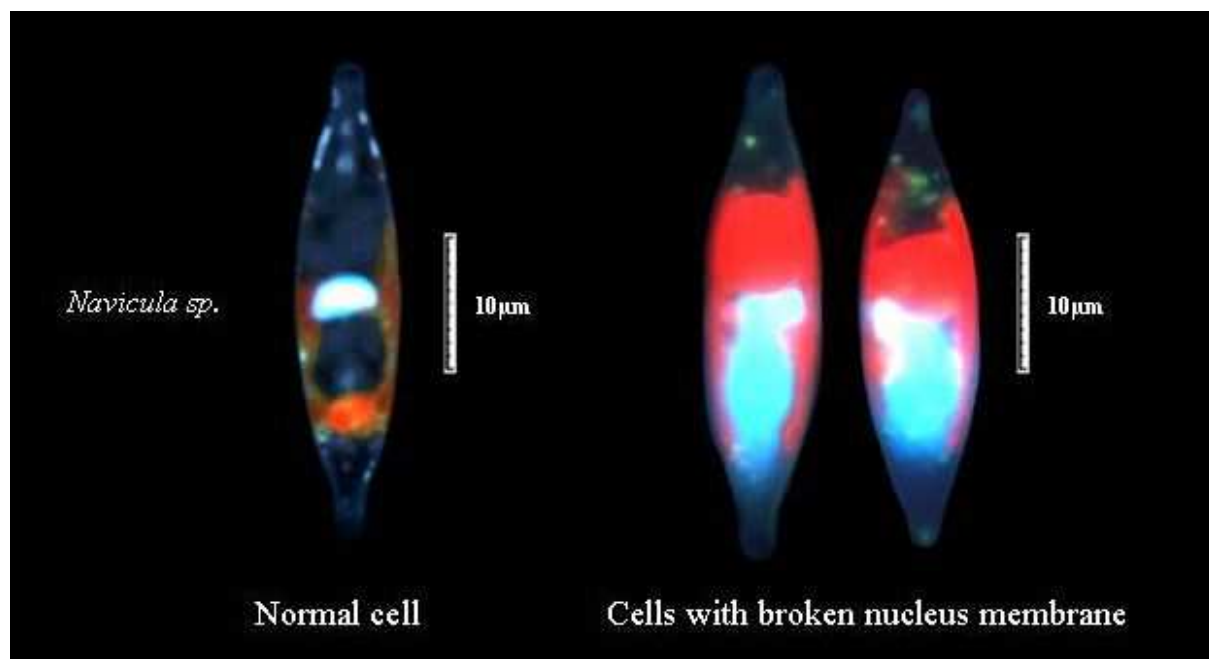
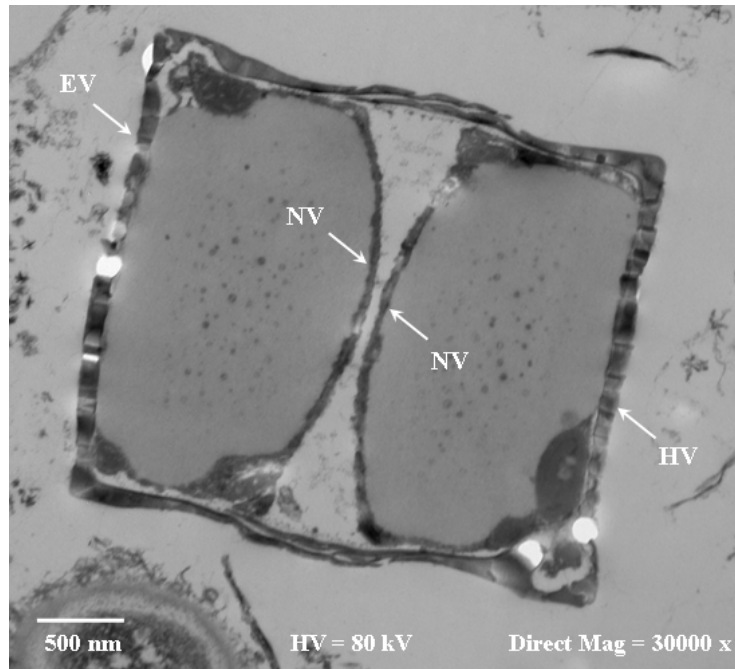


Figure 2d: Diatom cells (*Navicula* genera) with or without broken nucleus membrane observed with epifluorescence microscope (nucleus stained in blue with Hoescht 33342, chloroplasts appeared in red)

Different kinds of nucleus alterations were identified: disruption of nucleus location (figure 2a), micronucleus induction (figure 2b) and fragmentation of nucleus in multiple parts (figure 2c). Moreover nucleus morphological changes (nuclear membrane breakage and DNA spreading out in the cell) were also observed (figure 2d). Nevertheless, this morphological change was not counted as a nucleus alteration.



Debenest T. / Martinez Y. / Le Pert J.C.

Figure 3a: Cross section view by transmission electronic microscope of diatoms during valve formation, new valves (NV) being secreted in the mother valves (Epivalve EV and Hypovalve HV)

Previous observations of diatom cross section with a transmission electronic microscope showed that during the mitosis new valves (NV) were secreted inside each valve (Epivalve EV and Hypovalve HV) of the mother cell (figure 3a).

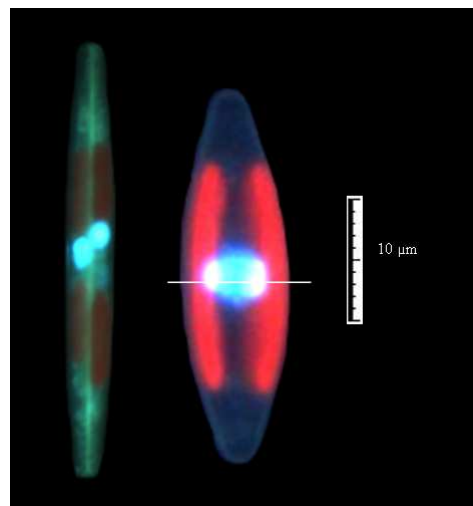


Figure 3b: Benthic diatoms in division with anaphase stage (left) and metaphase stage (right, transapical axis in white) observed with epifluorescence microscope (nucleus stained in blue with Hoescht 33342, chloroplasts appeared in red)

Therefore two cells were regarded as divided cells if they were stuck side by side (figure 3b). Likewise cells are considered in mitosis if two similar nuclei are observed in the transapical plane (white axis figure 3b). These cells were counted in order to calculate the mitotic index. The results showed that no

significant variations (ANOVA, $P > 0.05$) in mitosis frequency occurred between the control and the diatom communities treated (table 2).

The abnormalities of the siliceous diatom frustules were also counted.

Table 2

The effect of Maleic Hydrazide (MH) concentrations on the mean abundance of cells with nucleus alterations, on the mean abundance of cells in division (mitotic index) and on the mean abnormal frustule abnormality abundance

Treatments (M)	Nucleus alteration abundance (/1000)		Mitotic index (/100)		Abnormal frustule abundance (/1000)	
	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.
Control	9.65	4.23	18.34	2.75	4.33	1.25
1.10 ⁻⁷	23.04	5.56	22.14	2.37	12.00	0.82
1.10 ⁻⁶	29.40*	8.49	23.74	6.00	15.00*	3.74
5.10 ⁻⁶	35.96*	3.71	22.51	0.74	14.67*	3.68

(S.D. : Standart Deviation ; significant difference (*) $P < 0.05$ with the control)

The highest abundances of these abnormalities were obtained for diatom communities exposed to MH (table 2). The abnormal frustules were statistically more abundant in the communities treated with the highest doses (10^{-6} and 5.10^{-6} M) than in the control communities.

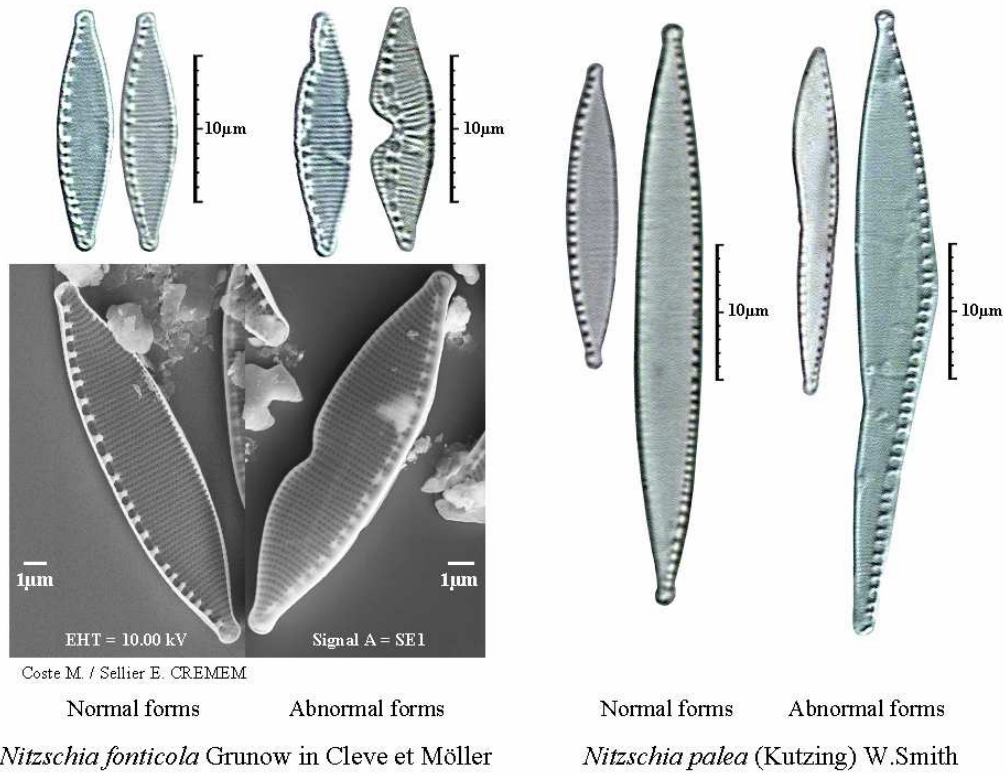


Figure 4a: Pictures, with light and scanning electron microscopes, of abnormal frustule morphologies for two species, *Nitzschia fonticola* Grunow in Cleve et Möller and *Nitzschia palea* (Kutzing) W. Smith, exposed to MH

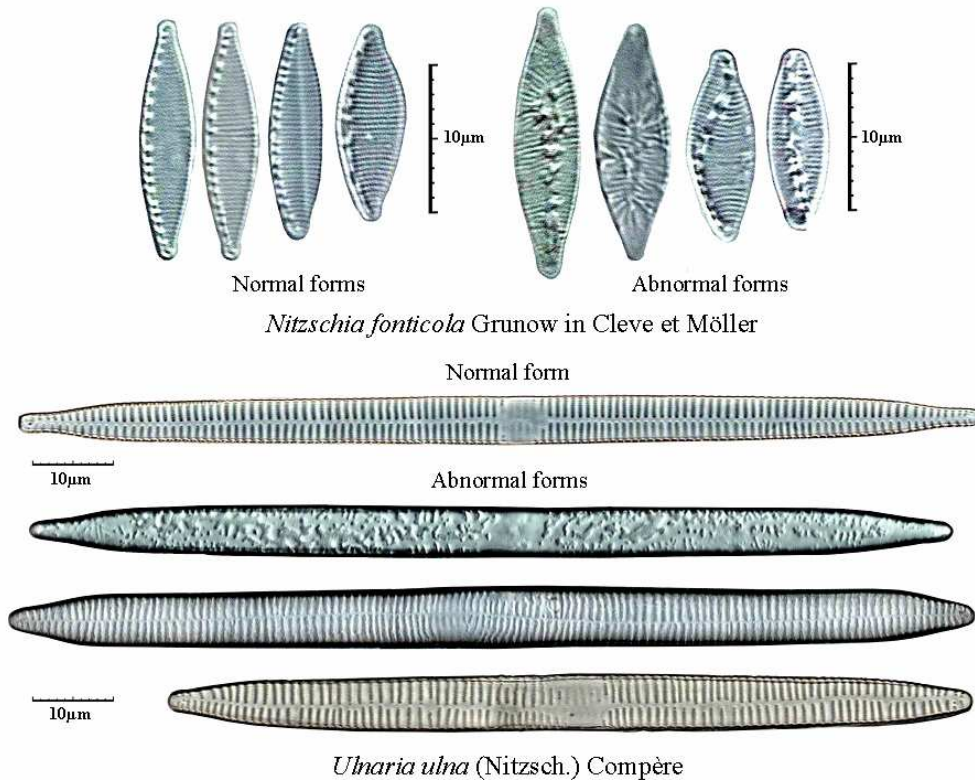


Figure 4b: Pictures, with light microscope, of abnormal frustule ornamentations for two species, *Nitzschia fonticola* Grunow in Cleve et Möller and *Ulnaria ulna* (Nitzsch.) Compère

Two types of frustule alterations were identified: abnormal morphology (figure 4a) or disrupted ornamentation (figure 4b). The Pearson analysis showed a significant positive correlation between the abundance of nucleus alterations and the abundance of abnormal frustules (0.702, $P < 0.05$).

Discussion

According to the high value of IBD (17.3/20) calculated from the diatom species composition and the low nitrate concentration monitored, the site "Gorges" highlighted the best water quality. After this site, the IBD values gradually decreased from the site "Anan" to the downstream site "Cazaux" and the nitrate concentration increased too. These results are consistent with the agricultural activities, pastures and the breeding around the site "Gorges". These activities were replaced by intensive crops at the sites Espaon and Cazaux. The Sousson watershed showed a poor trophic water quality for all the sites from the source ("Aujan") to the mouth of the watershed ("Auch"). The mean values of IBD calculated for spring 2005 data were close to those reported for the downstream site (Cazaux) of the Save watershed. Likewise, the nitrate concentrations were, most of the time, higher in the sites of the Sousson watershed than those monitored in the sites of the Save watershed. This trophic pollution was associated with pesticide pollution, especially for the Sousson watershed. The highest mean values of the total herbicide concentration assessed were detected in two sites of this watershed. In a sample realized during a flood, very high total concentration (14.4 µg/L) was detected for another site of the Sousson watershed (data not shown). Many researchers reported that the water pollution by pesticides is concentrated during flooding and may reach high concentrations (Spalding *et al.* 1989; Forbes *et al.* 1994; Schulz 2001; Ferenczi *et al.* 2002; Neumann *et al.* 2003; Aubertot *et al.* 2005). Therefore the isolated monitoring of the pesticides in water does not make it possible to properly estimate the real exposure of diatoms by pesticides. This may explain the absence of significant correlation between the IBD value and the total herbicide concentration. Moreover, the biological indices based on diatom communities are known to be not efficient to detect water pollution by pesticides (Dorigo *et al.* 2004). In this context, the score of the frustule abnormalities in diatom communities was particularly interesting. The highest abundances of these abnormalities were noted in some sites of the Sousson watershed which appeared highly polluted by agricultural fertilisers and herbicides. But the cause-effect relationships between the induction of frustule abnormalities and the exposure to herbicides remain unclear. Likewise, even if pesticides such as heavy metals were reported as potential inducers (Thomas *et al.* 1980; Fisher *et al.* 1981; McFarland *et al.* 1997; Dickman 1998; Gomez *et al.* 2003; Cattaneo *et al.* 2004; Schmitt-Jansen *et al.* 2005), some other factors, like nutrient deficiency, were also suggested to explain the development of these abnormalities (Dickman 1998). Nevertheless, the monitoring of silica concentrations in the Sousson River and the Save River did not show limited conditions (Perrin *et al.* 2006).

Therefore an experiment was carried out in the laboratory to study if the genotoxicity of a herbicide could be associated with the induction of frustule abnormalities. For the assessment of the mitotic index, the cells in division were counted. Because of the original ultrastructure of the diatom cell wall (two siliceous valves, the epivalve (EV) and the hypovalve (HV), connected with girdle bands), the mitosis of these micro-algae is relatively characteristic (Pickett-Heaps *et al.* 1979; Pickett-Heaps 1991). The prophase and the anaphase stages take place in the transapical plane (Van Den Hoek *et*

al. 1995). After the mitosis a new valve (NV) is secreted inside each valve of the mother cell (figure 3a) (Duke *et al.* 1977; Round *et al.* 1990; Van Den Hoek *et al.* 1995).

Four nucleus alteration types (nucleus location, micronucleus, nucleus fragmentation and nucleus membrane breakage) were identified after the exposure of diatoms to the MH. In the case of the nucleus location, many researchers reported that diatom nucleus position is generally either in the central position, or in the middle or on one side of the cell according to the cell view (valvar or connective) (Edgar *et al.* 1984; Round *et al.* 1990; Pickett-Heaps 1991; Van Den Hoek *et al.* 1995). Therefore it could be assumed that the nucleus was altered when it was located clearly in the apex of benthic diatoms (figure 2a). Indeed no evidence of this location is mentioned in the bibliography. An explanation would be that the toxic agent, altering the cytoskeleton (microtubular system and other microfilaments), modifies the nucleus positioning or disrupts the nucleus division during the mitosis (Edgar *et al.* 1984; Spurck *et al.* 1994; Rank *et al.* 1997). In green algae treated with a pesticide, the isopropyl *N*-Phenyl carbamate (IPC, CAS No. 122-42-9), Coss and Pickett-Heaps (1974) showed that microtubular spindles that re-formed, after the exposure, were abnormal (Coss *et al.* 1974).

The micronucleus induction is a well known biomarker of the impact of genotoxic agents on the cells of higher plants like *Allium Cepa* L., *Tradescantia sp.* and *Vicia faba* L. (Gichner *et al.* 1982; Grant *et al.* 1992; Cabrera *et al.* 1999; Cotelle *et al.* 1999; Kong *et al.* 1999; Marcano *et al.* 2004). The micronuclei were never shown in benthic diatoms.

The diatom nucleus fragmentation observed (figure 2c) in this experiment may be related to the alterations noted in *Allium Cepa* L. exposed to the MH and in a green algae *Oedogonium cardiacum* treated with a herbicide, IPC (Coss *et al.* 1974; Rank *et al.* 1997; Marcano *et al.* 2004).

The micronuclei and the nucleus fragmentations could be induced by DNA breaks or the disturbance of the microtubular system orientation inducing abnormal migration of the chromosomes during the cell division. Grant *et al.* (1992) mentioned that micronucleus would result from the induction of multipolar nuclear divisions (Grant *et al.* 1992).

Nucleus membrane breakage is a less common effect of MH. This impact was not reported in the studies carried out with the MH on the higher plants. Coombs *et al.* (1968) have noted abnormalities of the nuclear envelope for diatoms treated with colchicine (CAS No 64-86-8) but without membrane breakage (Coombs *et al.* 1968). This alteration may be related to a direct genotoxic impact as well as an induction of cellular apoptosis. Cassoti *et al.* (2005) observed that DNA was completely dispersed in marine diatoms exposed to an aldehyd (2-trans,4-trans-decadienal CAS No 25152-84-5) (Casotti *et al.* 2005). For these researchers, DNA spread could be related to a mechanism similar to apoptosis. Therefore nucleus membrane breakage was not counted as nucleus alteration.

The exposure of benthic diatoms to the MH also induced abnormal frustules. Two types of abnormalities may be distinguished: deformed morphology (figure 4a) or irregular ornamentation of the valves (figure 4b). The results demonstrated that the MH treatment induced both nucleus alterations and frustule abnormalities. Schmitt-Jansen *et al.* (2005) have reported abnormal shapes of diatoms exposed to a herbicide (Isoproturon CAS No 34123-59-6) but without observations parallel to intracellular alterations (Schmitt-Jansen *et al.* 2005). Numerous studies noted also the development of abnormal frustules among communities exposed to heavy metals or UVA radiations (Thomas *et al.*

1980; Fisher *et al.* 1981; Yang *et al.* 1993; Rijstenbil *et al.* 1994; McFarland *et al.* 1997; Rijstenbil 2001; Gold *et al.* 2003; Gomez *et al.* 2003; Cattaneo *et al.* 2004). The information about a potential link between the induction of intracellular alterations and the formation of frustule abnormalities remains sketchy. Round *et al.* (1990) reported that there was usually a close relationship between the nucleus and the forming valve (Round *et al.* 1990). In the case of oysters D-larvae exposed to an organochlorine pesticide (endosulfan), larvae exhibited shell abnormalities and DNA strand breaks (Wessel *et al.* 2007). A positive and significant correlation was observed between these two parameters.

Therefore different hypotheses may be suggested to explain the nature of the relationship between the formation of frustule abnormalities and the genotoxicity of the herbicide. A first hypothesis would be that the toxic agent, inducing nucleus alterations, affects the gene expression and, consequently, the synthesis of essential amino-acids for the frustule formation. Indeed the polymerisation of the silicic acid to produce opaline silica for the frustule formation is mediated by a protein template (Fisher *et al.* 1981; Round *et al.* 1990; McFarland *et al.* 1997). Several pesticides have been developed to alter the amino-acid synthesis. A disruption in the amino-acid synthesis could lead to a lack of silica during the diatom cell wall formation. The lack of silica is suggested by many researchers as a potential explanation for the induction of frustule abnormalities (Thomas *et al.* 1980; McFarland *et al.* 1997). In this case, the genotoxicity of the herbicide would be directly implicated in the development of frustule abnormalities.

A second hypothesis deals with the effect of the toxic agent on the integrity of the cytoskeleton (microtubular system and microfilament). The observations of fragmented nucleus as well as fragmented chloroplasts (figure 2c) support the idea that disturbances of the cytoskeleton, rather than direct genotoxic impacts, would induce nucleus alterations and frustule abnormalities. An experiment with a green algae showed that the treatment by a herbicide (IPC) induced at the same time more than two functional polar Microtubule Organisation Centers and more than two daughter nuclei (Coss *et al.* 1974). Likewise, for diatom cells treated with microtubule inhibitors, different researchers reported multinuclear cells and also abnormal frustules (Coombs *et al.* 1968; Duke *et al.* 1977; Lee *et al.* 1992). Therefore a disruption of the microtubules would lead to abnormal fragmentation of the nucleus during the cell division and poor silica supply for the formation of new valves at the end of the mitosis. Edgar *et al.* (1984) reported that the position of the nucleus as well as the integrity of the microtubules (MT) is important for the development of the valves (Edgar *et al.* 1984). Indeed the microtubular system is known to play a central role in the division of the nucleus during the mitosis. It would also manage the migration of certain components for the cell wall formation (Pickett-Heaps *et al.* 1979; Round *et al.* 1990; Pickett-Heaps 1991; Van Den Hoek *et al.* 1995). Microfilaments would also be implicated in the silica supply of the diatom cell wall (Lee *et al.* 1992).

The field and laboratory works illustrate, for the first time, that the exposure of benthic diatoms to herbicides induces frustule abnormalities. These results also highlight that the formation of frustule abnormalities is associated with the genotoxic induction of nucleus alterations. The nature of the relationship between these two alterations must be carefully investigated. These data may lead, in the

future, to the use in rivers of biomarkers, able to discriminate toxic pollution from trophic pollution, in addition to diatom indices.

Acknowledgements

The authors are grateful to J.-C. Lepert (INSERM Toulouse), Y. Martinez and A. Jauneau (IFR 40 Toulouse) for their helpful collaboration in the optical and electronical microscopy techniques. This work was supported by the Aquitaine Region and the GIS-ECOBAG.

References

- Adshead-Simonsen, P. C., G. E. Murray and D. J. Kushner (1981). "Morphological Changes in the Diatom, *Tabellaria flocculosa*, Induced by Very Low Concentrations of Cadmium." Bulletin of Environmental Contamination Toxicology **26**: 745-748.
- Aubertot, J.-N., J.-M. Barbier, A. Carpentier, J.-J. Gril, L. Guichard, P. Lucas, S. Savary, M. é. Voltz and S. r. Savini (2005). Pesticides, agriculture et environnement Réduire l'utilisation des pesticides et en limiter les impacts environnementaux. Paris, INRA-CEMAGREF, : 64.
- Berard, A., T. Pelte, E. Menthon, J. C. Druart and X. Bourrain (1998). "Characterisation of phytoplankton from two limnic systems contaminated by a herbicidal photosynthetic inhibitor. The PICT method (Pollution-Induced Community Tolerance): application and significance." Annales De Limnologie-International Journal of Limnology **34**(3): 269-282.
- Cabrera, G. L. and D. M. G. Rodriguez (1999). "Genotoxicity of leachates from a landfill using three bioassays." Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis **426**(2): 207-210.
- Casotti, R., S. Mazza, C. Brunet, V. Vantrepotte, A. Ianora and A. Miralto (2005). "GROWTH INHIBITION AND TOXICITY OF THE DIATOM ALDEHYDE 2-TRANS, 4-TRANS-DECADIENAL ON THALASSIOSIRA WEISSFLOGII (BACILLARIOPHYCEAE)." Journal of Phycology **41**(1): 7-20.
- Cattaneo, A., Y. Couillard, S. Wunsam and M. Courcelles (2004). "Diatom taxonomic and morphological changes as indicators of metal pollution and recovery in Lac Dufault (Québec, Canada)." Journal of Paleolimnology **32**(2): 163-175.
- Coombs, J., J. A. Lauritis, W. M. Darley and B. E. Volcani (1968). "Studies on the Biochemistry and Fine Structure of Silica Shell Formation in Diatoms." Z. Pflanzenphysiol. Bd. **59**: 274-284.
- Coss, R. A. and J. Pickett-Heaps (1974). "THE EFFECTS OF ISOPROPYL N-PHENYL CARBAMATE ON THE GREEN ALGA *OEDOGONIUM CARDIACUM*, I. Cell division." The Journal of Cell Biology **63**: 84-98.
- Coste, M. (1982). Etude des méthodes biologiques d'appréciation quantitative de la qualité des eaux. CEMAGREF, 218
- Cotelle, S., J. F. Masfarau and J. F. Ferard (1999). "Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the Allium/Vicia-micronucleus and the Tradescantia-micronucleus assays." Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis **426**(2): 167-171.
- Dickman, M. D. (1998). "Benthic marine diatom deformities associated with contaminated sediments in Hong Kong." Environment International **24**(7): 749-759.
- Dorigo, U., X. Bourrain, A. Berard and C. Leboulanger (2004). "Seasonal changes in the sensitivity of river microalgae to atrazine and isoproturon along a contamination gradient." Science of the Total Environment **318**(1-3): 101-114.
- DUKE, E. L. and B. E. F. REIMANN (1977). THE ULTRASTRUCTURE OF THE DIATOM CELL. THE BIOLOGY OF DIATOMS. D. WERNER. OXFORD, Blackwell Scientific Publications. **13**: 45.
- Dupas, S., P. Scribe and J. Francois Dubernet (1996). "On-line and off-line solid-liquid extraction and liquid chromatographic analysis at trace levels, for monitoring of herbicides and their degradation products in river and fluviostuarine freshwater-seawater interfaces." Journal of Chromatography A **737**(1): 117-126.
- Edgar, L. A. and J. Pickett-Heaps (1984). "Valve morphogenesis in the pennate diatom *Navicula cuspidata*." J Phycol **20**: 47-61.

- Ferenczi, J., A. Ambrus, R. D. Wauchope and H. R. Sumner (2002). "Persistence and runoff losses of 3 herbicides and chlorpyrifos from a corn field in the Lake Balaton watershed of Hungary." Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes **37**(3): 211-224.
- Fisher, N. S., G. J. Jones and D. M. Nelson (1981). "Effects of copper and zinc on growth, morphology, and metabolism of *Asterionella japonica* (Cleve) 1." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **51**(1): 37-56.
- Forbes, V. E. and T. L. Forbes (1994). Ecotoxicology in Theory and Practice. London, Chapman & Hall.
- Gichner, T., J. Veleminsky and V. Pokorny (1982). "Somatic mutations by maleic hydrazide and its potassium and diethanolamine salts in the *Tradescantia* mutation assay." Mutation Research **103**: 289-293.
- Gold, C., A. Feurtet-Mazel, M. Coste and A. Boudou (2003). "Impacts of Cd and Zn on the development of periphytic diatom communities in artificial streams located along a river pollution gradient." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **44**(2): 189-197.
- Gomez, N. and M. Licursi (2003). "Abnormal forms in *Pinnularia gibba* (Bacillariophyceae) in a polluted lowland stream from Argentina." Nova Hedwigia **77**(3-4): 389-398.
- Grant, W. F. (1999). "Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations--a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals." Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis **426**(2): 107-112.
- Grant, W. F., H. G. Lee, D. M. Logan and M. F. Salamone (1992). "The Use of *Tradescantia* and *Vicia-Faba* Bioassays for the Insitu Detection of Mutagens in an Aquatic Environment." Mutation Research **270**(1): 53-64.
- Guasch, H., N. Ivorra, V. Lehmann, M. Paulsson, M. Real and S. Sabater (1998). "Community composition and sensitivity of periphyton to atrazine in flowing waters: the role of environmental factors." Journal of Applied Phycology **10**(2): 203-213.
- Guasch, H., I. Munoz, N. Roses and S. Sabater (1997). "Changes in atrazine toxicity throughout succession of stream periphyton communities." Journal of Applied Phycology **9**(2): 137-146.
- Hajjouji, H. E., E. Pinelli, M. Guiresse, G. Merlina, J. C. Revel and M. Hafidi (2007). "Assessment of the genotoxicity of olive mill waste water (OMWW) with the *Vicia faba* micronucleus test." Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.
- Kong, M. S. and T. H. Ma (1999). "Genotoxicity of contaminated soil and shallow well water detected by plant bioassays." Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis **426**(2): 221-228.
- Lecoite, C., M. Coste and J. Prygiel (1993). "Omnidia - Software for Taxonomy, Calculation of Diatom Indexes and Inventories Management." Hydrobiologia **269**: 509-513.
- Lee, M. and C.-W. Li (1992). "The origin of the silica deposition vesicle of diatoms." Bot. Bull. Acad. Sin.(33): 317-325.
- Lenoir, A. and M. Coste (1995). Development of a practical diatom index of overall water quality applicable to the French national water Board network. Use of Algae for monitoring rivers II, Innsbruck Austria Studia Student. G.m.b.H.
- Marcano, L., I. Carruyo, A. Del Campo and X. Montiel (2004). "Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa* L." Environmental Research **94**(2): 221-226.

- Mazzella, N., J.-F. Dubernet and F. Delmas (2007). "Determination of kinetic and equilibrium regimes in the operation of polar organic chemical integrative samplers: Application to the passive sampling of the polar herbicides in aquatic environments." Journal of Chromatography A **1154**(1-2): 42-51.
- McFarland, B. H., B. H. Hill and W. T. Willingham (1997). "Abnormal *Fragilaria* spp. (Bacillariophyceae) in streams impacted by mine drainage." Journal of Freshwater Ecology **12**(1): 141-149.
- Munaron, D. (2004). Etude des apports en herbicides et nutriments par la Charente : modélisation de la dispersion de l'atrazine dans le bassin de Marennes-Oléron: 341.
- Neumann, M., M. Liess and R. Schulz (2003). "A qualitative sampling method for monitoring water quality in temporary channels or point sources and its application to pesticide contamination." Chemosphere **51**(6): 509-513.
- Perrin, A.-S., A. Probst and J.-L. Probst (2006). "Impact of nitrogen fertilizers on natural weathering processes: Evident role on CO₂ consumption." GEOCHIMICA ET COSMOCHIMICA ACTA **70**(18): A483-A483 Suppl. S.
- Pickett-Heaps, J. (1991). "Cell Division in Diatoms." International Review of Cytology **128**: 63-108.
- Pickett-Heaps, J., D. H. Tippit and J. A. Andreozzi (1979). "Cell division in the Pennate Diatom *Pinnularia* V-Observations on Live Cells." Biol. Cellulaire **35**: 295-304.
- Potapova, M. and D. F. Charles (2005). "Diatom metrics for monitoring eutrophication in rivers of the United States." Ecological Indicators **In Press, Corrected Proof**.
- Prygiel, J. and M. Coste (1996). "Diatoms and diatom indices in the networks for quality measurement of French watercourses: Short history and future." Bulletin Francais De La Peche Et De La Pisciculture(341-42): 65-79.
- Rank, J. and M. H. Nielsen (1997). "Allium cepa anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate." Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis **390**(1-2): 121-127.
- Rijstenbil, J. W. (2001). "Effects of periodic, low UVA radiation on cell characteristics and oxidative stress in the marine planktonic diatom *Ditylum brightwellii*." European Journal of Phycology **36**(1): 1-8.
- Rijstenbil, J. W., J. W. M. Derksen, L. J. A. Gerringa, T. C. W. Poortvliet, A. Sandee, M. Vandenberg, J. Vandrie and J. A. Wijnholds (1994). "Oxidative Stress-Induced by Copper - Defense and Damage in the Marine Planktonic Diatom *Ditylum-Brightwellii*, Grown in Continuous Cultures with High and Low Zinc Levels." Marine Biology **119**(4): 583-590.
- Round, F. E., R. M. Crawford and D. G. Mann (1990). The Diatoms. Biology & morphology of the genera. Cambridge, Cambridge University Press.
- Schmitt-Jansen, M. and R. Altenburger (2005). "Toxic effects of isoproturon on periphyton communities - a microcosm study." Estuarine, Coastal and Shelf Science **62**(3): 539-545.
- Schulz, R. (2001). "Rainfall-induced sediment and pesticide input from orchards into the lourens river, western cape, south africa: importance of a single event." Water Research **35**(8): 1869-1876.
- Spalding, R. F. and D. D. Snow (1989). "Streamlevels of agrichemicals during a spring discharge event." Chemosphere **19**(8-9): 1129-1140.

- Spurck, T. P. and J. Pickett-Heaps (1994). "The effect of diazepam on mitosis and the microtubule cytoskeleton, I. Observations on the diatoms *Hantzschia amphioxys* and *Surirella robusta*." Journal of Cell Science **107**: 2643-2651.
- Stevenson, R. J. and Y. Pan (1999). Assessing environmental conditions in rivers and streams with diatoms. The Diatoms - Applications for the Environmental and Earth Sciences. E. F. Stoermer and J. P. Smol. Cambridge, Cambridge University Press.: 469 pp.
- Thomas, W. H., J. T. Hollibaugh and D. L. R. Seibert (1980). "Effects of heavy metals on the morphology of some marine phytoplankton." Phycologia **19**(3): 202-209.
- Van Den Hoek, C., D. G. Mann and H. M. Jahns (1995). Algae - An introduction to phycology, Cambridge University Press.
- Wessel, N., S. Rousseau, X. Caisey, F. Quiniou and F. Akcha (2007). "Investigating the relationship between embryotoxic and genotoxic effects of benzo[a]pyrene, 17[alpha]-ethinylestradiol and endosulfan on *Crassostrea gigas* embryos." Aquatic Toxicology **85**(2): 133-142.
- Whitton, B. A. and M. G. Kelly (1995). "Use of Algae and Other Plants for Monitoring Rivers." Australian Journal of Ecology **20**(1): 45-56.
- Yang, J.-R. and H. C. Duthie (1993). "Morphology and ultrastructure of teratological forms of the diatoms *Stephanodiscus niagarae* and *S. parvus* (Bacillariophyceae) from Hamilton Harbour (Lake Ontario, Canada)." Hydrobiologia **269-270**(1): 57-66.

Bilan

Cette expérimentation a été conduite à partir d'une primo-culture cellulaire d'une communauté de diatomées benthiques issue de la Garonne. Tout l'intérêt de cette technique de culture est à la fois de conserver sur une certaine durée une communauté proche de la communauté naturelle initiale mais aussi de favoriser la multiplication des cellules afin d'obtenir une biomasse suffisante pour la réalisation d'études écotoxicologiques.

Le traitement d'une communauté de diatomées benthiques par un herbicide génotoxique connu (l'hydrazide maléique) a mis en évidence qu'une exposition brève (6h), proche de la durée d'une crue, pouvait induire différentes formes d'altérations nucléaires (position anormale du noyau, micronoyaux, fragmentation du noyau) ainsi que des déformations du frustule. Le suivi des abondances de ces deux types d'altérations a montré que la réponse des communautés était dépendante des concentrations appliquées. Les mécanismes cellulaires à l'origine de ces altérations sont encore relativement méconnus. L'étude de la bibliographie nous a conduit à émettre deux hypothèses :

- × Dans un premier cas, l'induction d'anormalités du frustule pourrait être directement liée à l'apparition d'altérations nucléaires. Une altération de l'ADN perturberait, au travers de la synthèse de protéines impliquées dans la polymérisation de la silice en silice opaline, la formation du frustule. La silice opaline est, en effet, le constituant essentiel de la paroi cellulaire des diatomées et toute carence en ce composé peut conduire au développement d'anormalités de forme ou d'ornementation.
- × Dans un deuxième cas, l'apparition d'altérations nucléaires et le développement de frustules anormaux se résument à deux événements concomitants sans lien de cause à effet directs. Ainsi l'altération du noyau serait la conséquence d'une déformation du réseau de microfilaments (microtubules, filaments d'actines) qui perturberait sa séparation lors de la mitose. Le développement d'anormalités sur les frustules s'expliquerait par un mauvais approvisionnement en silice lors de la formation d'une nouvelle valve, cette même déformation du réseau de microfilaments perturbant l'acheminement des vésicules contenant le matériel siliceux.

L'état physiologique des cellules présentant ces deux types d'altérations demeure inconnu. Des cas de noyaux éclatés avec l'ADN dispersé dans la cellule permettent de suspecter de possibles cas d'apoptose. Des observations similaires ont, en effet, été réalisées sur des diatomées exposées à un composé chimique (Casotti *et al.* 2005). Par conséquent, la question de la viabilité des cellules anormales de diatomées et de leur capacité à se multiplier pour former des populations clonales est encore sujette à de nombreuses interrogations.

Ces résultats offrent des perspectives de recherche particulièrement intéressantes dans le développement d'outils s'appuyant sur ce type d'altérations pour détecter et estimer l'intensité des pollutions par les pesticides dans les cours d'eau.

Conclusion Générale et Perspectives

Chapitre I.: Conclusion Générale

Dans le milieu naturel, les diatomées peuvent être exposées à un très grand nombre de substances actives mais aussi à tout un ensemble de composés présents dans les solutions commerciales pour optimiser les effets de ces substances. Si chacune de ces molécules a fait l'objet d'études en laboratoire concernant leur écotoxicité, l'impact global de la pollution par les produits phytosanitaires sur les écosystèmes aquatiques naturels demeure encore difficile à estimer. En effet, cette pollution se caractérise par un mélange d'un très grand nombre de substances de synthèse accompagnées de composés issus de la dégradation des substances actives qui n'en conservent pas moins une certaine toxicité. Toutes ces molécules peuvent interagir entre elles et modifier ainsi leur effet. L'étude de la bibliographie a mis en évidence que la plupart des travaux de recherche réalisés jusqu'à présent concernant les effets de pesticides sur des organismes aquatiques se sont focalisées sur certaines molécules phares (pour les algues, l'atrazine) alors que ces organismes sont exposés dans les cours d'eau à une pollution globale composée d'un grand nombre de molécules en interaction. Par conséquent, il est très difficile d'identifier les effets de cette pollution dans le milieu naturel sur les communautés à partir des données obtenues en laboratoire avec un nombre restreint d'espèces et de molécules.

A./ La réponse des communautés de diatomées benthiques à une pollution agricole importante dans les cours d'eau

1 Les limites de l'IBD et IPS comme outils de bioindication des pollutions agricoles.

L'étude de terrain a confirmé la forte pollution trophique affectant les cours d'eau qui drainent les régions agricoles. Les nitrates (N-NO₃) se sont révélés être le paramètre le plus dégradant en terme de qualité trophique des eaux. Cette pollution s'est avérée d'autant plus intense que le bassin versant du cours d'eau était de taille réduite. Ce constat a aussi été réalisé par de nombreux auteurs (Aubertot *et al.* 2005). Dans le cas du suivi des concentrations en herbicides dans les eaux, il est apparu que la méthodologie des prélèvements ponctuels n'était pas adaptée à la nature de la pollution agricole toxique qui s'accroît fortement durant les épisodes crues. Des concentrations totales élevées (>10 µg/L) ont ainsi été mesurées au cours de fortes augmentations du niveau des eaux. Il semble donc difficile d'estimer les flux réels de pesticides sans un appareillage relativement lourd (préleveurs automatiques) et une prise d'échantillon asservie au débit afin de concentrer les prélèvements durant les crues. Or ce type de dispositif est difficile à mettre en place pour le suivi de la qualité toxique des eaux sur un très grand nombre de stations.

Dans ce contexte, les indices biologiques diatomées (IBD et IPS), utilisés en routine pour évaluer la qualité des eaux, ont confirmé leur sensibilité aux pollutions trophiques. Les espèces adaptées aux milieux eutrophes (*Melosira varians*, *Mayamea atomus*, *Navicula tripunctata*) ont, en effet, été principalement dénombrées dans les stations les plus affectées par la contamination des eaux par les

nitrate (Auch, Cazaux). Dans le cas des pollutions par les pesticides, aucun lien n'a pu être établi entre les notes de qualité des eaux fournies par ces indices et les concentrations totales en herbicides dosées dans les échantillons ponctuels d'eau. Néanmoins l'absence de données concernant les flux réels de pesticides, auxquels ont été exposées les diatomées, ne permet pas de conclure quant à la sensibilité de ces outils indiciaires vis-à-vis de ces pollutions. En outre, ces outils, qui s'appuient sur des paramètres classiques de physico-chimie des eaux (pH, conductivité, concentration en nutriments,...), n'ont pas été conçus pour détecter ce type de pollution, malgré l'introduction dans l'IBD et l'IPS des formes anormales. Par conséquent, dans des cours d'eau situés en milieu agricole, où les deux types de pollution sont associés, les indices biologiques répondent donc préférentiellement à la pollution trophique. Cette pollution masque ainsi probablement les effets des pesticides sur les communautés de diatomées benthiques, en influant sur l'état physiologique des algues (Nystrom *et al.* 1999).

2 Un paramètre quantitatif du biofilm intéressant: la biomasse algale

Face à ce constat concernant les limites des indices biologiques, l'étude de paramètres quantitatifs, connus pour leur sensibilité en laboratoire aux pesticides, est apparue nécessaire pour identifier, au sein de communautés naturelles de diatomées benthiques, un ou des paramètres sensibles aux pesticides. Parmi les différents paramètres étudiés, la biomasse algale, estimée à partir des concentrations en pigments chlorophylliens (« chlorophylle a » et « chlorophylle c »), est apparue *in situ* comme potentiellement sensible aux pesticides. En effet, sur les stations les plus en aval (Save notamment), sa croissance a été assez nettement inhibée au cours d'une période connue de traitement des cultures (en mai, traitements herbicides sur les sols nus des cultures de printemps dominantes sur la zone d'étude). Les niveaux de concentration en « chlorophylle a » ont alors atteint des valeurs proches de celles relevées sur les stations ombragées (inhibition de la photosynthèse) ou sur les stations du bassin du Sousson (concentrations en herbicides élevées). Or de nombreux herbicides agricoles (s-triazines, urées substituées, bipyridiles) sont connus pour inhiber l'activité photosynthétique des organismes chlorophylliens. De plus, cette inhibition de la croissance de la biomasse algale est apparue plus marquée en mai 2005 par rapport à 2006, année pour laquelle aucune crue importante n'a été observée sur cette période (mois de mai). Or comme nous l'avons rappelé précédemment, la pollution des eaux par les pesticides est particulièrement aiguë durant ces épisodes hydrauliques.

Deux hypothèses ont été avancées pour expliquer cette baisse de la production de biomasse algale.

La première concerne un possible effet abrasif des crues. En effet, la croissance des biofilms est largement dépendante de la force du courant. Les faibles valeurs de concentration en « chlorophylle a » relevées fin mai pourraient donc être interprétées comme la conséquence d'une abrasion des biofilms sur les lames lors de la crue intervenue mi-mai. Mais il s'est avéré que les caisses contenant ces lames avaient été exposées à une crue lors de la période précédente de développement, au cours de laquelle la production de biomasse algale est apparue maximale. Par conséquent, cette hypothèse apparaît relativement peu vraisemblable.

La deuxième hypothèse suggère que les herbicides appliqués sur les cultures et rejetés dans les cours d'eau pourraient être à l'origine de l'inhibition de la croissance de la biomasse algale observée

au cours du mois de mai 2005. Néanmoins en l'absence de données sur les flux réels de pesticides lors de la crue de 2005, la responsabilité de ces composés toxiques ne peut être clairement établie. Plusieurs auteurs ont montré qu'un paramètre environnemental comme l'exposition lumineuse pouvait affecter la sensibilité des algues aux pesticides (Guasch *et al.* 1998). De ce fait, la comparaison des résultats obtenus entre différentes stations est relativement compliquée. Les paramètres environnementaux sont en effet très variables d'une station à une autre.

3 Des abondances élevées de diatomées anormales

Le frustule siliceux des diatomées peut présenter en certaines occasions une morphologie ou une ornementation anormale. Des abondances extrêmement élevées (max. 165‰) de frustules anormaux ont ainsi été observées, dans les échantillons prélevés sur substrats naturels, pour les stations du bassin du Sousson où les concentrations les plus fortes en herbicides ont été mesurées. Néanmoins aucun lien statistique n'a pu être établi.

Les données issues des substrats naturels sont difficilement exploitables. En l'absence d'informations sur le degré de maturité des biofilms, qui influe sur leur sensibilité à un stress, et sur leur âge, qui renseigne sur la période de développement et donc d'exposition à des pesticides, les résultats obtenus entre les différentes stations sont difficilement comparables.

Sur les substrats artificiels (lames de verre), les échantillons de biofilm ont fait apparaître des valeurs d'abondance plus faibles comparées à celles obtenues sur les substrats naturels. Cette différence peut être la conséquence de mécanismes de décrochage. Les cellules déformées, suite à une exposition à un ou des pesticides, n'étant plus en mesure de sécréter des substances « mucilagineuses » pour rester fixées au substrat. Cet effet potentiel des pesticides conjugué à l'effet d'abrasion du courant et au niveau encore faible de développement du biofilm sur les lames de verre pourrait donc conduire au décrochage de ces cellules.

La comparaison des différentes périodes de développement a permis de mettre en évidence une augmentation significative (Test de Kruskal-Wallis, Méthode de Dunn $P < 0,05$), dans les échantillons prélevés en mai sur les lames de verre, du nombre de diatomées anormales par rapport aux périodes antérieures. Or sur cette même période (mois de mai), comme nous l'avons rappelé précédemment, les pesticides sont suspectés être à l'origine d'une inhibition de la croissance de la biomasse algale. Cet accroissement du nombre de diatomées anormales pourrait donc être imputé à une exposition à ces composés toxiques. Aucun lien n'a encore été établi scientifiquement entre une telle exposition et l'induction de ces anomalies. De multiples causes, autres qu'une exposition à des agents toxiques comme les carences en nutriments ou la surpopulation, sont répertoriées dans la bibliographie (Thomas *et al.* 1980; Fisher *et al.* 1981; McFarland *et al.* 1997; Dickman 1998; Gomez *et al.* 2003; Cattaneo *et al.* 2004; Schmitt-Jansen *et al.* 2005). Sous certaines conditions, les formes anormales pourraient être incluses dans des études d'impact et devenir un outil de diagnostic.

4 Une discrimination des stations selon les préférences trophiques des espèces

Une analyse multivariée des données de composition en espèces des communautés de diatomées benthiques prélevées sur les différentes stations a été réalisée. L'étude de la répartition des espèces en fonction de leurs préférences trophiques a permis de mettre en évidence une discrimination des stations entre, d'une part, la station Gorges caractérisée par des communautés dominées par des espèces oligotrophes et, d'autre part, les stations les plus en aval sur le Sousson et la Save (Auch, Cazaux) présentant des communautés plus eutrophes. Ceci vient confirmer les observations faites quant à l'état de la pollution trophique mais aussi potentiellement toxique dans les cours d'eau étudiés. En effet, les espèces eutrophes sont connues pour leur tolérance aux herbicides alors même que des concentrations élevées de ces mêmes composés ont été relevées à la station Auch et, dans une moindre mesure, à la station de Cazaux (Hamala *et al.* 1985; Goldsborough *et al.* 1986; Berard *et al.* 1996; Peres *et al.* 1996; Guasch *et al.* 1998; Munoz *et al.* 2001; Berard *et al.* 2003; Schmitt-Jansen *et al.* 2005).

L'ensemble des résultats obtenus permet de suggérer qu'une exposition à des pesticides agricoles pourrait être à l'origine de certaines variations spatio-temporelles des paramètres biologiques constatées au sein des communautés de diatomées. Mais de nombreux paramètres environnementaux (luminosité, courant, conditions trophiques) influent sur la réponse des algues aux toxiques. De même, le manque de données quant à l'exposition réelle des communautés algales aux pesticides ne permet pas de conclure quant à la responsabilité des pesticides dans les variations observées de certains paramètres.

B./ Effets des herbicides agricoles sur les communautés de diatomées benthiques dans des conditions semi-contrôlées

Afin de s'affranchir des limites soulevées dans le cadre de l'étude de terrain et ainsi, mieux évaluer l'impact d'une pollution par des herbicides agricoles sur des communautés de diatomées benthiques, une étude en conditions semi-contrôlées a été menée. Des produits phytosanitaires, appartenant à des grandes familles d'herbicides et utilisés sur la zone d'étude, ont été testés.

Les concentrations de deux (s-métolachlore et oxadiazon) des trois molécules testées ont rapidement chuté au cours de l'expérimentation. Leurs propriétés chimiques ($\log K_{ow} > 3$) permettent d'envisager soit une possible adsorption de ces molécules sur les matières en suspension, soit dans le cas de l'oxadiazon une hydrolyse neutre. Certains auteurs suggèrent aussi que le biofilm, peut métaboliser certains herbicides et s'en servir comme source d'azote (Okay *et al.* 1996; Peres *et al.* 1996).

1 Les indices biologiques « diatomées » : des outils actuellement peu adaptés pour le diagnostic des pollutions par les pesticides

En l'absence de données de flux de pesticides, nous n'avons pu conclure dans le cadre de l'expérimentation de terrain sur la sensibilité des indices biologiques « diatomées » vis-à-vis des pollutions par les pesticides. Toutefois, les résultats obtenus lors de l'expérimentation en microcosmes ont souligné l'absence de réponse de ces indices suite à une exposition à des herbicides, malgré une inhibition marquée de la production de biomasse algale et une modification de la structure des communautés. Par conséquent, ces outils d'évaluation de la qualité des eaux s'avèrent insuffisants pour rendre compte de la totalité des effets des pollutions. Ces indices ne prennent pas en compte certains facteurs comme la vitalité des cellules sur laquelle les pesticides peuvent avoir un impact important. En effet, de par la méthode de préparation des échantillons pour l'identification et le dénombrement des espèces nécessaires à leur calcul, ces indices ne font pas la différence entre les cellules vivantes et les cellules mortes.

2 La biomasse algale : un paramètre sensible aux herbicides agricoles

L'étude des différents paramètres permettant d'estimer la biomasse globale des organismes chlorophylliens a montré que les communautés algales présentes sur les lames immergées dans les microcosmes étaient dominées par les diatomées. Des trois substances actives (isoproturon, s-métolachlore et oxadiazon), présentes dans les herbicides agricoles testés, l'isoproturon a eu l'effet le plus marqué sur la biomasse algale, la croissance de celle-ci étant sévèrement inhibée à la concentration la plus forte (25µg/L). Même dans le cas de l'exposition de courte durée (25µg/L « brève »), la biomasse algale n'a pas montré, trois jours après la fin de l'exposition, de signe de reprise de son développement. Les communautés ne semblent pas être capables de compenser rapidement les effets d'une exposition brève à des concentrations élevées, conditions proches de celles pouvant intervenir en période de crue. Ces résultats sont en accord avec d'autres travaux menés avec cette substance active sur des diatomées (Peres *et al.* 1996). En ce qui concerne les

deux autres herbicides étudiés, l'inhibition de la croissance de la biomasse algale a été nettement moins marquée.

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que les paramètres permettant de suivre la croissance de la biomasse algale sont sensibles à des herbicides agricoles dans des conditions semi-contrôlées. La faible croissance de la biomasse relevée dans les prélèvements effectués en 2005 sur la zone d'étude pourrait donc être liée à une exposition à des herbicides.

3 La structure des communautés de diatomées benthiques : une évolution marquée de la composition en espèces

Les espèces, connues pour leurs préférences pour les milieux eutrophes (MVAR, NDIS, NFON, CPLA), se sont avérées plus tolérantes aux trois herbicides testés. De nombreux auteurs ont souligné que les espèces eutrophes pouvaient être favorisées suite à une exposition à des herbicides de la famille des s-triazines (Hamala *et al.* 1985; Goldsborough *et al.* 1986; Berard *et al.* 1996; Guasch *et al.* 1998; Munoz *et al.* 2001; Berard *et al.* 2003).

Les espèces « N-hétérotrophes facultatives », capables de passer d'une voie métabolique à l'autre (hétérotrophie/autotrophie), ont aussi été favorisées dans les canaux traités avec de l'isoproturon. Or plusieurs travaux de recherche ont montré que certaines espèces hétérotrophes n'étaient pas sensibles à des herbicides inhibiteurs de la photosynthèse comme l'isoproturon (Goldsborough *et al.* 1986; Peres *et al.* 1996). Cette particularité offerte à ces espèces de passer d'une voie métabolique à une autre, lorsque l'une est inhibée, expliquerait leur développement plus important en présence d'herbicides inhibiteurs du photosystème II par rapport aux autres espèces.

4 L'induction de formes anormales

L'exposition à ces herbicides agricoles n'a pas conduit à un accroissement significatif du nombre de diatomées présentant un frustule déformé. Les valeurs d'abondance relevées se sont avérées très faibles (<8‰). Vu les concentrations fortes appliquées aux diatomées, ces résultats peuvent être interprétés de la même manière que les résultats obtenus en milieu naturel à partir des lames de verre. Les abondances faibles de formes anormales pourraient être la conséquence d'un phénomène de décrochage de ces cellules anormales des lames de verre dans les microcosmes. Par conséquent, la sensibilité de ce paramètre à une exposition à des herbicides ne peut être écartée.

C./ La formation d'altérations nucléaires et l'induction de déformations du frustule chez une communauté de diatomées exposée à un herbicide

En l'absence de lien clairement établi, au cours de l'étude de terrain et de l'étude en microcosmes, entre le développement de diatomées anormales et une exposition à des pesticides, une dernière étude a été conduite en conditions contrôlées. Pour cette étude, une méthode de primo-culture d'une communauté de diatomées benthiques a été mise au point et utilisée de préférence aux cultures d'espèces isolées. Les réponses de ces espèces isolées en culture diffèrent, en effet, des réactions

pouvant être observées pour les mêmes espèces dans le milieu naturel et pour les communautés en général (De Noyelles *et al.* 1982; Peterson *et al.* 1997).

Si de nombreuses explications ont été avancées pour décrire la formation d'anormalités du frustule aucune n'a été démontrée. Dans le cas de diatomées exposées à divers composés chimiques (colchicine et un aldéhyde), il a été mis en évidence des dispersions de l'ADN dans la cellule et des inductions de polyploïdie (cellules multi-nucléaires) (Coombs *et al.* 1968; Casotti *et al.* 2005). Or des frustules anormaux ont aussi été observés chez des diatomées exposées à de la colchicine et à un herbicide : l'isoproturon (Coombs *et al.* 1968; Schmitt-Jansen *et al.* 2005). Ces résultats, conjugués au lien établi par certains auteurs entre des déformations de coquilles et des altérations de l'ADN chez d'autres organismes aquatiques (larves d'huîtres) exposées à un pesticide (endosulfan), nous ont amené à suspecter une possible responsabilité de la génotoxicité dans l'induction de frustules anormaux (Wessel *et al.* 2007).

Une communauté de diatomées benthiques en culture a été exposée à un herbicide génotoxique connu, l'hydrazide maléique (HM). Suite à cette exposition, différentes altérations nucléaires ont été identifiées (position anormale du noyau, micro-noyau, fragmentation du noyau). Des diatomées présentant une morphologie ou une ornementation anormale de leur paroi cellulaire ont aussi été dénombrées. Ces altérations et anormalités sont apparues significativement plus abondantes dans les échantillons exposés aux plus fortes concentrations (10^{-6} et 5.10^{-6} M) par rapport au témoin. Dans les deux cas, la réponse des communautés s'est apparentée à une réponse de type « dose-effet ».

Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer la genèse de ces altérations :

- × L'herbicide a pu perturber l'expression des gènes et ainsi la synthèse de protéines nécessaires à l'approvisionnement du frustule en silice lors de sa formation.
- × Cette même molécule peut affecter l'organisation et l'orientation du cytosquelette conduisant en parallèle, sans liens de cause à effet, à la formation d'altérations nucléaires et d'anormalités du frustule. La division du noyau et l'acheminement des vésicules de silice pour la synthèse du frustule sont, en effet, assurés par des protéines du cytosquelette.

D'importantes modifications de l'organisation intracellulaire des diatomées exposées à l'HM, notamment au niveau de la taille et du positionnement des plastes ont aussi été observées. Sans exclure la responsabilité de possibles mutations, au sein du matériel génétique, dans le développement d'anormalités au niveau du squelette de la diatomée, les anomalies observées sur les plastes tendraient à étayer la deuxième hypothèse.

Cette expérimentation a aussi permis de tester deux méthodes de comptage des formes anormales. Les formes anormales ont été dénombrées soit pour 1000 cellules comptées (**FA 1000**) soit le long de deux transects sur la lame après le comptage de 400 individus (**FA**). Les résultats obtenus n'ont pas mis en évidence de différence significative dans les valeurs d'abondance des frustules anormaux entre les deux méthodes (Kruskal-Wallis, $P > 0,05$) (Figure 58).

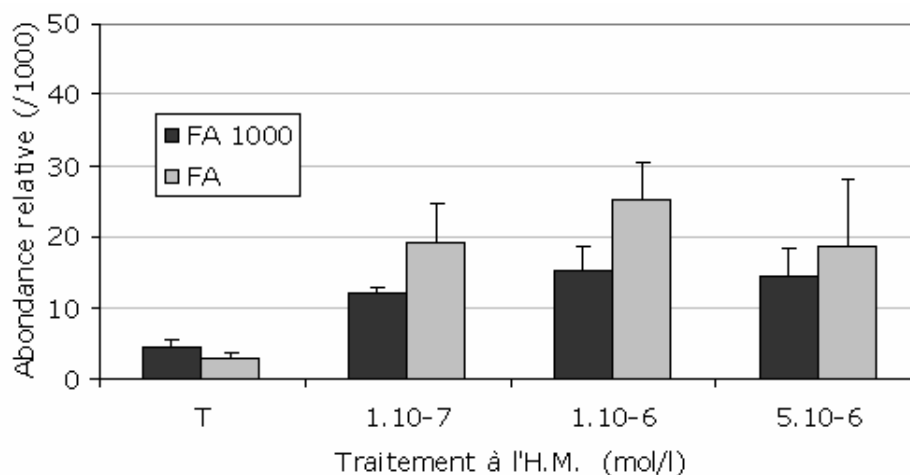


Figure 58 : Comparaison de deux méthodes de comptage (FA 1000 et FA) des diatomées anormales suite à l'exposition d'une communauté de diatomées benthiques à différentes concentrations d'un herbicide, l'Hydrazide Maléique (H.M.)

Par ailleurs, l'analyse de la composition en espèces de la communauté témoin et des communautés exposées à de l'HM durant 6 heures a montré que les espèces connues pour leurs tolérances aux milieux eutrophes avaient vu leurs abondances augmenter à la plus forte dose (5.10^{-6} M) (*Mayamaea atomus*), ou rester relativement stables malgré le traitement herbicide (*Nitzschia palea*, *Gomphonema parvulum*). Ces données confirment la tolérance de certaines espèces de diatomées à une exposition, même brève (6 heures) à un herbicide. Les résultats obtenus lors de cette étude soulignent que les crues, qui véhiculent la majorité de la pollution toxique dans les cours d'eau sur des périodes limitées dans le temps, peuvent avoir un impact important sur les diatomées tant au niveau des communautés qu'au niveau cellulaire.

Chapitre IV.: Perspectives

La première étape de notre travail de recherche nous a permis d'identifier *in situ* certains paramètres (biomasse algale ou anomalies du frustule) potentiellement sensibles à une pollution par les pesticides agricoles sans que la responsabilité de celle-ci soit clairement identifiée. Les flux de pesticides n'ont, en effet, pas pu être quantifiés de par le nombre de stations suivies et les limites techniques et financières liées à la nature de cette pollution (un nombre élevé de molécules à rechercher principalement durant les épisodes de crue). L'étude en microcosmes a permis de confirmer l'impact négatif des herbicides agricoles sur la croissance de la biomasse algale. L'exposition d'une culture cellulaire d'une communauté de diatomées benthiques à un herbicide a aussi permis d'identifier, des altérations nucléaires et d'observer, en parallèle, des frustules anormaux de diatomées.

A./ Les perspectives à court terme

1 L'évolution des outils biologiques « diatomées »

Les indices biologiques diatomées n'ont pas été conçus pour détecter les effets des pollutions par les pesticides. Ils se réfèrent à des paramètres classiques de chimie des eaux (pH, conductivité, concentration en nitrates,...). En outre, les données de composition en espèces, à partir desquelles ces indices sont calculés, ne différencient pas les cellules mortes des cellules vivantes. Or ce facteur est vraisemblablement sensible aux pesticides.

Au vu des résultats que nous avons obtenus, plusieurs pistes d'évolution des outils biologiques peuvent être proposées pour améliorer leur efficacité dans la détection des pollutions dues aux pesticides.

a) Le dispositif de prélèvement

A l'heure actuelle, les indices biologiques « diatomées » s'appuient sur des données biologiques collectées à partir d'échantillons de biofilm prélevés sur des substrats naturels (galets principalement). Sur ce type de substrat, le développement du biofilm peut être très hétérogène d'une station à une autre. Or la comparaison des stations entre elles apparaît importante pour être en mesure d'établir, le long d'un gradient de contamination, un lien entre les variations observées de paramètres biologiques et les pollutions agricoles.

L'immersion de substrats artificiels, comme les lames de verre, sur des périodes inférieures à 3-4 semaines, semble donc plus adaptée pour suivre les effets des pollutions agricoles. Passée cette durée d'immersion, le biofilm acquiert un degré de maturité qui le rend moins sensible aux conditions environnementales (Biggs 1990; Ivorra *et al.* 2000).

b) Modélisation de la pollution agricole

Le suivi intégré dans le temps des concentrations en pesticides sur 18 stations est techniquement et financièrement inenvisageable. Cette information s'avère néanmoins indispensable pour interpréter les variations de certains paramètres biologiques, observées *in situ*, au sein des biofilms et des communautés de diatomées benthiques. Les données fournies par des bassins versants instrumentés (suivi des débits, prélèvements pour le suivi des concentrations en nutriments et en pesticides) peuvent être intéressantes. En effet, à partir de ces données, une modélisation des pollutions trophiques et toxiques par rapport aux débits et à la pluviométrie peut être envisagée. Le modèle ainsi obtenu pourrait permettre de fournir, à partir des données hydrauliques et météorologiques, une information quant à l'exposition potentielle des diatomées à des pesticides sur les autres stations de la zone d'étude des coteaux de Gascogne. Une autre perspective serait d'immerger des capteurs passifs dans ce type de bassins versants instrumentés afin de tester l'efficacité de ces dispositifs pour évaluer les flux de contaminants. Des travaux sont actuellement en cours au Cemagref de Bordeaux sur cette thématique.

c) Prise en compte de la biomasse algale

Les résultats obtenus *in situ* et en laboratoire ont souligné la sensibilité de ce paramètre à une exposition à des herbicides. Le principal avantage de la biomasse algale est de travailler sur les seules cellules vivantes à la différence des indices biologiques classiques ou d'autres paramètres comme la biomasse totale ou la densité cellulaire. En effet, dans le cas de la biomasse totale, la matière organique vivante et la matière organique amorphe sont analysées indistinctement. En ce qui concerne la densité cellulaire, la nécessité de fixer les échantillons avec du formol pour un comptage au laboratoire supprime toute vitalité aux cellules.

Il nous a donc semblé intéressant d'étudier dans quelle mesure les variations de la biomasse algale pouvaient être intégrées au calcul de l'Indice Biologique Diatomées (IBD) afin d'apporter une information supplémentaire concernant la vitalité des cellules et ainsi pallier aux limites de cet indice dans la détection des effets des pesticides sur les diatomées benthiques.

De nombreux obstacles à l'utilisation de ce paramètre sont néanmoins apparus :

- la croissance de la biomasse algale peut être affectée par de nombreux paramètres environnementaux comme la luminosité ou le courant et donc être sujette à une certaine variabilité naturelle.

- l'absence de station de référence présentant les mêmes conditions environnementales (courant, lumière, taille du cours d'eau,...) pour chaque station étudiée, ne permet pas d'estimer l'impact potentiel des pesticides sur le développement des algues.

Confrontés à ces divers éléments, il nous est apparu intéressant de travailler sur le différentiel d'accroissement de la biomasse algale entre deux dates de prélèvement consécutives pour une même station (Figure 59).

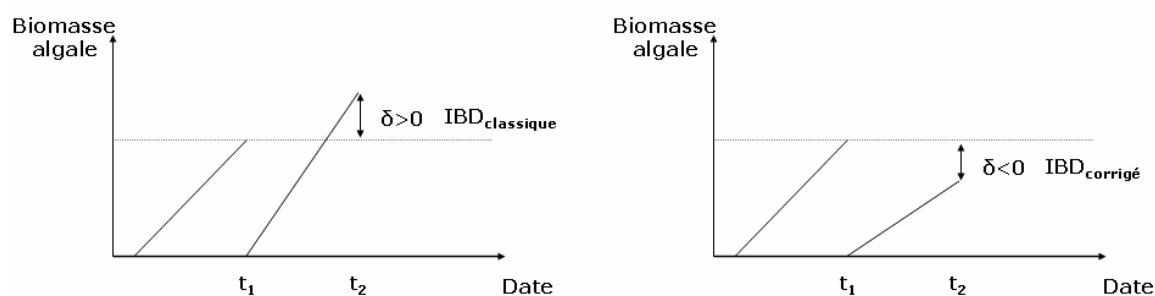


Figure 59 : Représentation schématique du calcul du différentiel d'accroissement de la biomasse algale pour une même station entre deux périodes consécutives de développement

Cette approche permet de nous affranchir de la variabilité naturelle liée aux caractéristiques intrinsèques des stations et des communautés d'algues en travaillant sur les différences de croissance de la biomasse algale entre deux périodes consécutives de développement plutôt que de comparer des données brutes.

A partir des données de différentiel de croissance (δ), nous avons élaboré une nouvelle formule de calcul de l'IBD :

si $\delta > 0$ entre t_1 et t_2 alors $IBD_{corrigé} = IBD_{classique}$ à t_2

si $\delta < 0$ entre t_1 et t_2 alors $IBD_{corrigé} = IBD_{classique} - 2,67 * (\ln(1-\delta))$ à t_2

Le **logarithme népérien** a été appliqué pour atténuer la correction en cas de différentiel trop élevé pouvant conduire à des notes excessivement basses ($< 5/20$). La différence $(1-\delta)$ a été utilisée afin que la valeur fournie par le logarithme de cette différence soit toujours positive. Les effets des pesticides sur la croissance de la biomasse pouvant être masqués *in situ* par les effets de certains paramètres environnementaux, un facteur a été adjoint dans la formule pour mieux prendre en compte l'effet inhibiteur de la pollution agricole toxique sur le développement des algues. Le facteur « **2,67** » a été obtenu en calculant l'inverse de la différence « A »

où $A = 1 - B$

avec $B =$ (moyenne des inhibitions observées pour la biomasse algale).

Si l'inverse de « B » avait été utilisé directement comme facteur, la valeur de celui-ci aurait été plus élevée si les inhibitions observées dans les microcosmes avaient été plus faibles. Par conséquent, nous avons choisi de prendre en compte l'inverse du complémentaire (A) de l'inhibition moyenne (B) pour calculer ce facteur.

L'application de cette nouvelle formule aux données issues des échantillons prélevés sur les substrats artificiels en 2005 met en évidence une baisse des notes de qualité des eaux pour les prélèvements du 30 mai aux stations de Auch, Cedon, Anan, Cazaux et Lamasquère, et pour les prélèvements du

21 juin à la station de Lamasquère (Figure 60). Dans le cas de la station Anan, la qualité chute de « bonne » à « mauvaise » et pour les autres stations (à l'exception de Auch) de « bonne » à « passable ».

Cette forme corrigée de l'IBD semble mieux prendre en compte les variations de la biomasse algale. Elle doit être validée par l'acquisition de données de flux de pesticides. En effet, le facteur utilisé dans la formule doit probablement être ajusté par rapport aux niveaux de contamination relevés dans les cours d'eau. Cette formule n'est applicable qu'entre des périodes consécutives de colonisation. A cela s'ajoute la nécessité que les biofilms se soient développés sur des durées identiques. Le printemps, de par les conditions optimales pour la croissance végétative et l'intensité des traitements pesticides, est probablement la période la plus propice à son application.

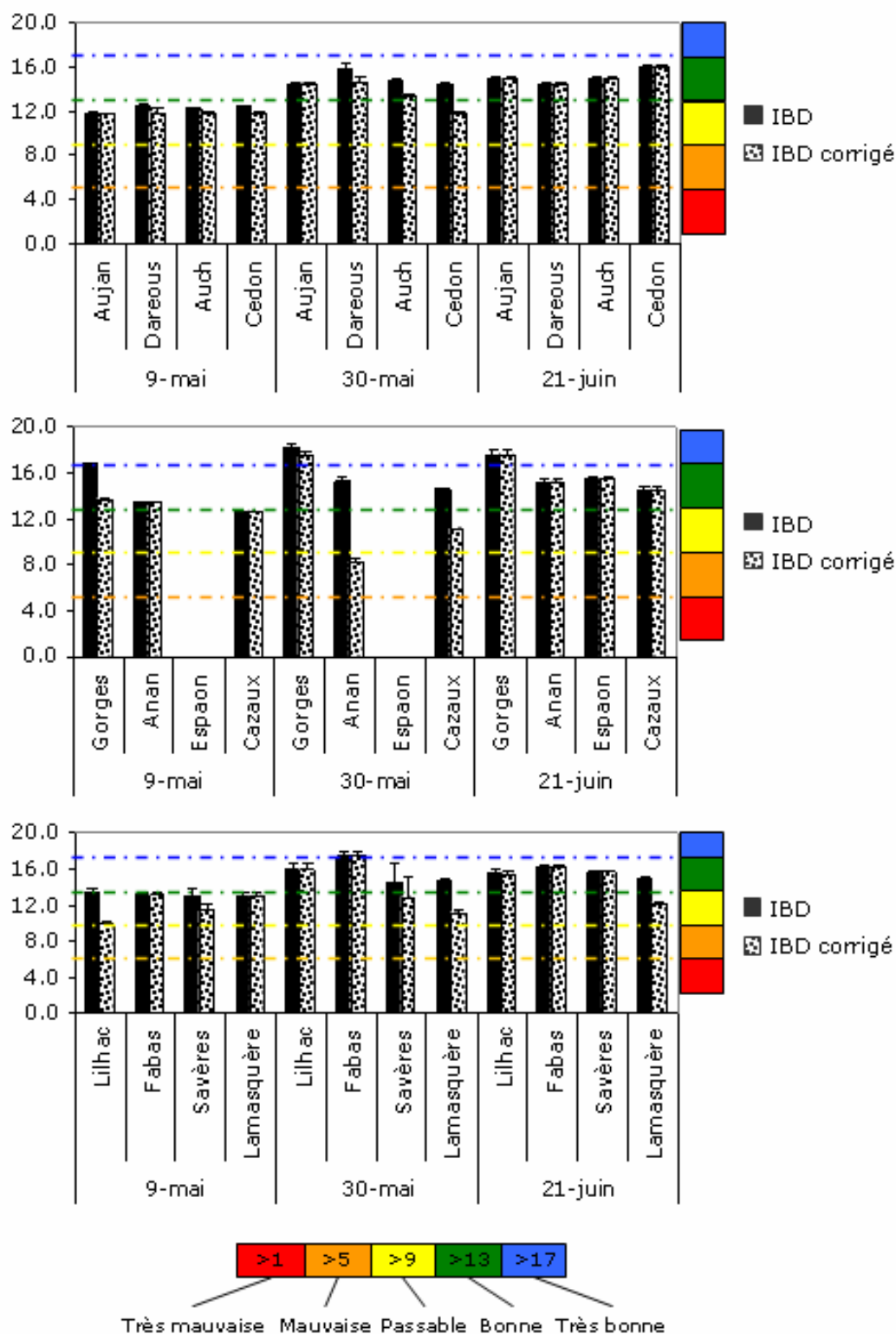


Figure 60 : Comparaison des notes de qualité des eaux obtenues avec l'IBD classique et l'IBD recalculé prenant en compte le différentiel d'accroissement de la biomasse algale pour les échantillons prélevés sur substrat naturel en 2005

d) Amélioration de leur prise en compte dans le calcul des indices

De la même manière que pour la concentration en « chlorophylle a », l'abondance des formes anormales de diatomées semble être un paramètre sensible aux pesticides. Si des valeurs d'abondance plus élevées ont été relevées dans des échantillons prélevés sur des substrats naturels, l'utilisation des résultats issus des substrats artificiels semble, comme nous l'avons indiqué ci-dessus, plus appropriée. Mais dans ce cas précis, les valeurs relativement faibles observées sur ce type de substrat sont une limite à leur utilisation dans le calcul des indices.

Pour pallier ces faibles valeurs d'abondance, une autre solution serait d'accroître le poids des formes anormales dans le calcul des indices diatomées, en augmentant artificiellement les données brutes d'abondance de formes anormales à l'aide d'un facteur donné. Toute la problématique réside dans le choix d'une valeur pour ce facteur. En effet, cette valeur est subordonnée au lien pouvant exister entre les flux de pesticides *in situ* et l'abondance de frustules anormaux.

Or dans le cas où l'hypothèse de décrochage des cellules anormales serait vérifiée, ce lien resterait difficile à établir. En effet, si en microcosmes le décrochage peut être estimé avec des valeurs fixes de courant, l'extrapolation de ces résultats aux données de terrain demeure relativement aléatoire. La puissance du courant est très fluctuante entre les stations dans le milieu naturel. Dans ce cas de figure, la variabilité naturelle liée au courant ne permettrait donc pas de fixer un facteur universel.

Si par contre, l'hypothèse de décrochage n'est pas vérifiée, une étude couplant analyse de flux de pesticides et abondance des formes anormales pourrait permettre de fixer une valeur pour ce facteur.

e) Les formes anormales et les altérations nucléaires comme biomarqueurs

Les formes anormales mais aussi les altérations nucléaires observées en culture cellulaire peuvent constituer des biomarqueurs intéressants d'une exposition à des pesticides. La durée d'exposition choisie (6 heures) lors de l'expérimentation à l'aide des cultures cellulaires est relativement proche de la durée d'une crue. Au sein d'une communauté en culture exposée à des échantillons d'eau prélevés dans les cours d'eau, ces biomarqueurs pourraient alors servir d'outils de détection des pollutions par des pesticides. Leur utilisation directe sur des échantillons de biofilms naturels prélevés apparaît relativement difficile. La présence en quantités importantes de matières en suspension et de déchets organiques dans les échantillons perturbe l'observation microscopique des cellules. L'intérêt de coupler ces deux biomarqueurs est de travailler sur des cellules « vivantes », ou présentant encore un contenu cellulaire, et sur la partie minérale de la cellule (frustule) à la différence des indices qui font pas la différence entre cellules « pleines » et cellules « vides ». Le contenu cellulaire organique des diatomées est, en effet, éliminé afin d'identifier les espèces.

L'ensemble de ces résultats permet d'envisager une évolution des outils biologiques actuels, voire le développement de nouveaux outils (indices biologiques et/ou biomarqueurs), permettant de détecter dans les cours d'eau une pollution due à des toxiques. L'intérêt de ce type d'outils serait de cibler les sites où des investigations plus poussées (capteurs passifs, préleveurs automatiques) devraient être mises en œuvre afin d'évaluer le degré de dégradation du milieu et ainsi proposer des mesures

correctives au niveau des pratiques agricoles. Dans ce contexte, les outils biologiques seraient plus des instruments de gestion des réseaux de suivi de la qualité des eaux (identification des sites les plus dégradés pour cibler les interventions) plutôt que des outils capables d'estimer la qualité des eaux du point de vue des toxiques.

2 La validation de la méthode de culture pour évaluer la toxicité

A partir de ces biomarqueurs, la méthode de culture d'une communauté de diatomées benthiques mise au point pourrait être utilisée pour tester la toxicité d'effluents ou d'échantillons d'eau brute prélevés *in situ* à partir du suivi de l'évolution de cette communauté et des impacts cellulaires sur les diatomées (altérations nucléaires et anomalies du frustule). L'intérêt de cette approche serait de coupler une approche écologique (communautés) avec une approche plus toxicologique (biomarqueur). Des améliorations du dispositif et de la méthodologie peuvent être réalisées afin d'optimiser la mise en œuvre de ce type de culture.

3 L'étude de l'hypothèse de décrochage

Avant de pouvoir utiliser le paramètre d'abondance des formes anormales pour améliorer la détection des pollutions des eaux par des pesticides, il apparaît nécessaire de tester l'hypothèse émise concernant le décrochage de ces cellules déformées des lames de verre.

Deux expérimentations peuvent être proposées :

× Dans un premier cas, on peut envisager d'exposer dans un récipient en verre des lames de verre préalablement colonisées à un herbicide. Différentes doses et différentes substances actives pourraient être étudiées. *In fine*, l'étude de la répartition des formes anormales, des cellules vivantes et mortes¹ et des cellules présentant des altérations nucléaires, entre les échantillons prélevés sur la lame et ceux issus du surnageant, devrait permettre d'estimer le décrochage potentiel des cellules altérées. La principale limite de ce type d'expérimentation est de négliger l'effet du courant. Or l'effet d'abrasion du courant est un paramètre qui doit être pris compte pour étudier un possible décrochage des cellules anormales.

× Dans un deuxième cas, on peut suggérer d'immerger les lames de verre colonisées dans un microcosme présentant une faible hauteur d'eau. L'intérêt de ce type de dispositif est d'éviter toute sédimentation de cellules de diatomées et d'être en mesure de collecter toutes les cellules non fixées sur les lames. Il serait souhaitable que ce microcosme soit doté à une extrémité d'une paroi percée de trous afin d'éviter tout phénomène de contre courant et ainsi assurer un écoulement laminaire dans l'aquarium. La collecte des cellules pourrait être réalisée à l'aide d'un filet planctonique positionné à la sortie de la paroi percée du microcosme. Afin de quantifier le niveau de base et l'effet

¹ Le marquage des cellules vivantes et mortes peut être réalisé à l'aide de marqueurs spécifiques comme la diacétate de fluoresceine (FDA) ou le Sytox green (Casotti, R., S. Mazza, C. Brunet, V. Vantrepotte, A. Ianora and A. Miralto (2005). "Growth inhibition and toxicity of the diatom aldehyde 2-trans, 4-trans-decadienal on the *Thalassiosira weissflogii* (Baccillariophyceae)." *Journal of Phycology* 41(1): 7-20.).

potentiel des pesticides sur le décrochage, il semble préférable que la collecte soit réalisée en deux étapes : avant et pendant l'exposition à des pesticides. Enfin, il apparaît nécessaire que les communautés présentes sur les lames soient aussi étudiées.

B./ Les perspectives à moyen/long terme dans la détection et le suivi des pollutions par les pesticides

Les résultats que nous avons obtenus, nous permettent de penser que la mise en évidence des pollutions dues aux pesticides nécessite la mise en place d'une démarche plus intégrée faisant appel à la fois aux indices biologiques, aux biomarqueurs et à des « outils hybrides » comme le PICT (Berard *et al.* 2002; Aubertot *et al.* 2005). Des observations réalisées à l'aide d'un seul outil biologique ne paraissent pas suffisantes pour conclure quant à une exposition des organismes par des pesticides, de nombreux paramètres environnementaux pouvant interférer dans leurs réponses. Avant toute chose, il semble nécessaire de modéliser les réactions de ces différents outils sur des bassins versants de taille différente à partir de données, les plus précises possibles, de flux de pesticides dans les eaux.

Mais dans le cas d'un suivi régulier de la qualité des eaux, les informations de flux de pesticides, auxquels ont été exposés les organismes nécessaires pour faire fonctionner un modèle mis au point en conditions expérimentales, ne sont pas disponibles. Il est, par essence, impossible de rechercher dans un échantillon toutes les molécules présentes. Une solution envisageable pour pallier ce problème serait de croiser les résultats obtenus à partir des outils biologiques avec les données fournies par des indices de risque de contamination des eaux par les pesticides. En effet si on observe pour deux stations (une référence et une en zone agricole) une baisse identique, par exemple d'un paramètre sensible aux pesticides, la confrontation des résultats obtenus avec le risque¹ pour ces stations d'être contaminées par des produits phytosanitaires pourrait permettre de les discriminer. Le suivi en continu des concentrations en pesticides fournirait une information plus fiable mais son coût et la logistique nécessaire ne permettent pas une application sur un grand nombre de stations.

La détection et la quantification des pollutions liées aux pesticides passeront donc vraisemblablement par la mise au point d'outil composite intégrant les outils biologiques (indices et biomarqueurs) et les indices de risque de contamination des eaux. Mais ce type d'outil ne pourra vraisemblablement pas s'affranchir de résultats obtenus en laboratoire. Les perspectives dans ce domaine sont donc de concevoir un outil hybride qui intègre des données de terrain avec des données obtenues en laboratoire sur des communautés d'organismes cibles comme les diatomées.

¹ Ce risque est lié à l'occupation, à la nature et à la topographie des sols environnants.

Bibliographie

- Acs, E. and K. T. Kiss (1993). "Colonization Processes of Diatoms on Artificial Substrates in the River Danube near Budapest (Hungary)." *Hydrobiologia* 269: 307-315.
- ACTA, Ed. (2002). *Pesticides et protection phytosanitaire dans une agriculture en mouvement*. Paris.
- Adshead-Simonsen, P. C., G. E. Murray and D. J. Kushner (1981). "Morphological Changes in the Diatom, *Tabellaria flocculosa*, Induced by Very Low Concentrations of Cadmium." *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology* 26: 745-748.
- AFP-Reuters-Le monde (2006). *L'Assemblée renforce la protection de l'eau et des milieux aquatiques. Le monde*. Paris.
- Agence de l'eau Adour-Garonne (2005). *Bilan sur la qualité des eaux du Bassin Adour-Garonne en 2004*. Toulouse.
- Agence de l'eau Adour-Garonne (2006). *Bilan sur la qualité des eaux du Bassin Adour-Garonne en 2005*. Toulouse.
- Agence de l'eau Adour-Garonne and S. S.-E. DRASS-DDASS (2003). *L'eau potable en Adour-Garonne Distribution et qualité en 2003*. Toulouse.
- Agence de l'eau, R. M. C. (2003). "SYSTEME D'EVALUATION DE LA QUALITE DE L'EAU DES COURS D'EAU GRILLES D'EVALUATION SEQ-EAU (VERSION 2)." Retrieved 30/09, 2005.
- AGRESTE (2000). *L'Essentiel Gers*. Paris, Ministère Agriculture: 160.
- AGRESTE (2000). *L'Essentiel Haute-Garonne*. Paris, Ministère Agriculture: 208.
- AGRESTE (2003). *Recensement agricole 2000 - Le Gers et ses cantons*. Auch, Ministère Agriculture: 71.
- Albanis, T. A. (1992). "Herbicide losses in runoff from the agricultural area of Thessaloniki in Thermaikos Gulf, N. Greece." *Science of the total environment* 114: 59-71.
- Ames, B., E. Dusrton, E. Yamasaki and F. Lee (1973). Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenate for activation and bacteria for detection.
- Andresen, N. A. and M. L. Tuchman (1991). "Anomalous Diatom Populations in Lakes Michigan and Huron in 1983." *Journal of Great Lakes Research* 17(1): 144-149.
- Aoyama, K., K. Iwahori and N. Miyata (2003). "Application of *Euglena gracilis* cells to comet assay: evaluation of DNA damage and repair." *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 538(1-2): 155-162.
- ARROUAYS, D., J. C. BEGON, J. WILBERT and M. BERLAND (1990). *REPARTITION SCHEMATIQUE DES SOLS LESSIVES HYDROMORPHES ET LESSIVES DEGRADEES (BOULBENES) DU GRAND SUD-OUEST DE LA FRANCE. LES SOLS DE BOULBENES, TOULOUSE, AFES S.O.*
- Aubertot, J.-N., J.-M. Barbier, A. Carpentier, J.-J. Gril, L. Guichard, P. Lucas, S. Savary, M. é. Voltz and S. r. Savini (2005). *Pesticides, agriculture et environnement Réduire l'utilisation des pesticides et en limiter les impacts environnementaux*. Paris, INRA CEMAGREF: 64.
- Audigie, C. (1997). *Principes des méthodes d'analyse biochimique, Tome I*.
- Avendano-Herrera, R. E. and C. E. Riquelme (2007). "Production of a diatom-bacteria biofilm in a photobioreactor for aquaculture applications." *Aquacultural Engineering* 36(2): 97-104.
- Badr, S. A. and H. F. Abou-waly (1997). "Growth Response of Freshwater Algae to Continuous Flow of Terbutryn." *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 59(2): 298-305.
- Baldi, I., P. Lebailly, B. Mohammed-Brahim, L. Letenneur, J.-F. Dartigues and P. Brochard (2003). "Neurodegenerative Diseases and Exposure to Pesticides in the Elderly." *Am. J. Epidemiol.* 157(5): 409-414.
- BEGON, J. C. (1990). *LES SOLS DE BOULBENE DU TOULOUSAIN. LES SOLS DE BOULBENES, Toulouse, AFES S.O.*
- Benkimoun, P. (2006). *Une enquête sur l'exposition professionnelle aux pesticides. Le monde*. Paris.
- Berard, A. and C. Benninghoff (2001). "Pollution-induced community tolerance (PICT) and seasonal variations in the sensitivity of phytoplankton to atrazine in nanocosms." *Chemosphere* 45(4-5): 427-437.
- Berard, A., U. Dorigo, U. Humbert, C. Leboulanger and E. Seguin (2002). "Application of the Pollution-Induced Community Tolerance (PICT) method to algal communities: its values as a diagnostic tool for ecotoxicological risk assessment in the aquatic environment." *Annales De Limnologie-International Journal of Limnology* 38(3): 247-261.
- Berard, A., U. Dorigo, I. Mercier, K. Becker-van Slooten, D. Grandjean and C. Leboulanger (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(8): 935-944.

- Berard, A. and T. Pelte (1996). "EFFETS DE L'ATRAZINE SUR L'EVOLUTION DES PEUPELEMENTS PHYTOPLANCTONNIQUES LACUSTRES - ETUDE EN ENCEINTES EXPERIMENTALES *IN SITU*." *Ecologie* 27(4): 195-201.
- Berard, A., T. Pelte, E. Menthon, J. C. Druart and X. Bourrain (1998). "Characterisation of phytoplankton from two limnic systems contaminated by a herbicidal photosynthetic inhibitor. The PICT method (Pollution-Induced Community Tolerance): application and significance." *Annales De Limnologie-International Journal of Limnology* 34(3): 269-282.
- Berard, A., F. Rimet, Y. Capowiez and C. Leboulanger (2004). "Procedures for determining the pesticide sensitivity of indigenous soil algae: A possible bioindicator of soil contamination?" *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 46(1): 24-31.
- Bertrand, J. (1999). "Mouvements des diatomées VI. Les efforts pendant le déplacement apical. Mesures, analyses, relations : longueur, vitesse, force." *Cryptog Algol* 20(1): 43-57.
- Biggs, B. J. F. (1990). "Use of relative specific growth rates of periphytic diatoms to assess enrichment of a stream." *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 24: 9-18.
- Blandin, P. (1986). "Bioindicateurs et diagnostic des systèmes écologiques." *Bull. Ecol.* 17(4): 215-307.
- Bourelly, P. (1981). *LES ALGUES D'EAU DOUCE* Initiation à la systématique Tome II: Les Algues jaunes. Paris, Société Nouvelle des Editions Boubée.
- Brockway, D. L., P. D. Smith and F. E. Stancil (1984). "Fate and Effects of Atrazine in Small Aquatic Microcosms." *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 32: 345-353.
- Burgeot, T. and F. Galgani (2000). Application of EROD in Marine Fish in a Multidisciplinary Surveillance Programme in North Sea. Use of Biomarkers for Environmental Quality Assessment In: T. C. Laurent Lagadic, Jean-Claude Amiard, and Francois Ramade (eds.) (Eds.), Science Publishers, Enfield, USA, Plymouth, UK.
- Butterwick, C., S. I. Heaney and J. F. Talling (2005). "Diversity in the influence of temperature on the growth rates of freshwater algae, and its ecological relevance." *Freshwater Biology* 50(2): 291-300.
- Cabrera, G. L. and D. M. G. Rodriguez (1999). "Genotoxicity of leachates from a landfill using three bioassays." *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 426(2): 207-210.
- Camatini, M., R. Baudo and A. Burton (1998). Preface. Proceedings of the international symposium on integrated ecotoxicology from molecules/organisms to ecosystems, *Chemosphere*.
- Campbell, N. A. (1995). *BIOLOGIE* 3th ed., De Boeck université.
- Carder, J. P. and K. D. Hoagland (1998). "Combined effects of alachlor and atrazine on benthic algal communities in artificial streams." *Environmental Toxicology and Chemistry* 17(7): 1415-1420.
- Casotti, R., S. Mazza, C. Brunet, V. Vantrepotte, A. Ianora and A. Miralto (2005). "Growth inhibition and toxicity of the diatom aldehyde 2-trans, 4-trans-decadienal on the *Thalassiosira weissflogii* (Baccilariophyceae)." *Journal of Phycology* 41(1): 7-20.
- Cattaneo, A., Y. Couillard, S. Wunsam and M. Courcelles (2004). "Diatom taxonomic and morphological changes as indicators of metal pollution and recovery in Lac Dufault (Québec, Canada)." *Journal of Paleolimnology* 32(2): 163-175.
- CEMAGREF, Q. (2005). Séminaire sur les échantillonneurs intégratifs de terrain appliqués aux contaminants organiques - Acte, Compte rendu et Synthèse des discussions, Lyon.
- Chen, Y. C. (2007). "Immobilization of twelve benthic diatom species for long-term storage and as feed for post-larval abalone *Haliotis diversicolor*." *Aquaculture* 263: 97-106.
- Cohn, S. A. and J. R. McGuire (2000). "Using diatom motility as an indicator of environmental stress: effect of toxic sediment." *Diatom Research* 15(1): 19-29.
- Colin, F. (2000). Approche spatiale de la pollution chronique des eaux de surface par les produits phytosanitaires. Cas du bassin du Sousson (Gers, France): 152 p.
- Commission des Communautés Européennes (1978). Final reports on research sponsored under the First environmental research programme. environment and quality of life. Luxembourg, Office for Official Publications of the European Communities: 460.
- Coombs, J., J. A. Lauritis, W. M. Darley and B. E. Volcani (1968). "Studies on the Biochemistry and Fine Structure of Silica Shell Formation in Diatoms." *Z. Pflanzenphysiol.* Bd. 59: 274-284.
- Coppage, D. L., E. Matthews, G. H. Cook and J. Knight (1975). "Brain acetylcholinesterase inhibition in fish as a diagnosis of environmental poisoning by malathion, O,O-dimethyl S-(1,2-dicarbethoxyethyl) phosphorodithioate." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 5(6): 536-542.
- Coring, E. (1996). Use of diatoms for monitoring acidification in small mountain rivers in Germany with special emphasis on "diatom assemblage type analysis" (DATA). Use of Algae for monitoring rivers II, Innsbruck Austria 17-19 Sept. 95, Studia Student. G.m.b.H.

- Coss, R. A. and J. Pickett-Heaps (1974). "The effects of isopropyl *N*-Phenyl Carbamate on the green alga *Oedogonium cardiacul*, I. Cell division." *The Journal of Cell Biology* 63: 84-98.
- Coste, M. (1982). *Etude des méthodes biologiques d'appréciation quantitative de la qualité des eaux*. CEMAGREF, 218
- Coste, M. and G. Leynaud (1974). *Etudes sur la mise au point d'une méthode biologique de détermination de la qualité des eaux en milieu fluvial.*, Rapport CTGREF - AFBSN, Paris: 80p.
- Cotelle, S., J. F. Masfarau and J. F. Ferard (1999). "Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia*-micronucleus and the *Tradescantia*-micronucleus assays." *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 426(2): 167-171.
- Cour des Comptes. (2002). "LA PRÉSERVATION DE LA RESSOURCE EN EAU FACE AUX POLLUTIONS D'ORIGINE AGRICOLE : LE CAS DE LA BRETAGNE." Retrieved 19 mai, 2005, from <http://www.ccomptes.fr/Cour-des-comptes/publications/rapports/ressources-eau/EauBret1.html>.
- Couteux, A. and V. Lejeune (2007). *Index phytosanitaire ACTA*. Paris, ACTA.
- Crow, M. E. and F. B. Taub (1979). "Designing a microcosm bioassay to detect ecosystem level effects." *International journal of environmental studies* 13(2): 141-147.
- Dahl, B. and H. Blanck (1996). "Toxic effects of the antifouling agent Irgarol 1051 on periphyton communities in coastal water microcosms." *Marine Pollution Bulletin* 32(4): 342-350.
- De Noyelles, F., W. D. Kettle and D. E. Sinn (1982). "THE RESPONSES OF PLANKTON COMMUNITIES IN EXPERIMENTAL PONDS TO ATRAZINE, THE MOST HEAVILY USED PESTICIDE IN THE UNITED STATES." *Ecology* 63(5): 1285-1293.
- Delorme, R., P. Leroux and P. Gaillardon (2002). "Evolution des produits phytosanitaires à usages agricoles, III - Les insecticides-acaricides." *Phytoma* 548: 7-13.
- DeNoyelles, F.-J., W. D. Kettle and D. E. Sinn (1982). "The responses of plankton communities in experimental ponds to atrazine, the most heavily used pesticide in the United States." *Ecology* 63: 1285-1293.
- Dermont, G. (2002). *Impact des activités agricoles sur la qualité des eaux du bassin de la Garonne*. *Science de la Terre et de l'Environnement*. Toulouse, Univ. Paul Sabatier Toulouse III: 28.
- Desai, S., X. Verlecar, Nagarajappa, Nagarajappa and U. Goswami (2006). "Genotoxicity of cadmium in marine diatom *Chaetoceros tenuissimus* using the alkaline Comet assay." *Ecotoxicology* 15(4): 359-363.
- Dickman, M. D. (1998). "Benthic marine diatom deformities associated with contaminated sediments in Hong Kong." *Environment International* 24(7): 749-759.
- Direction générale des Douanes et Droits indirects. (2005). "La taxe générale sur les activités polluantes (TGAP) au service de l'environnement." Retrieved 02/07, 2007.
- Documentation Française. (2004). "La politique de l'eau (1964-2004) - 40 ans de gestion décentralisée." Retrieved 22/06, 2007.
- Dorigo, U., X. Bourrain, A. Berard and C. Leboulanger (2004). "Seasonal changes in the sensitivity of river microalgae to atrazine and isoproturon along a contamination gradient." *Science of the Total Environment* 318(1-3): 101-114.
- Dorigo, U. and C. Leboulanger (2001). "A pulse-amplitude modulated fluorescence-based method for assessing the effects of photosystem II herbicides on freshwater periphyton." *Journal of Applied Phycology* 13(6): 509-515.
- DRAF Midi-Pyrénées (2007). *L'agriculture, l'agro-alimentaire et la forêt Toulouse*: 20.
- Drum, R. and J. Hopkins (1966). "Diatom locomotion: An explanation." *Protoplasma* 62(1): 1-33.
- Dufumier, M., Ed. (2002). *Un agronome dans son siècle Actualité de René Dumont*. Paris, Editions Karthala.
- Duke, E. L. and B. E. F. Reimann (1977). *The Ultrastructure of the diatom cell. The biology of diatoms*. In: D. Werner (Eds.), Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 13-45.
- Dumont, R. and F. Ravignan (1977). *Nouveaux voyages dans les campagnes françaises*. Paris, Le seuil.
- Dupas, S., P. Scribe and J. Francois Dubernet (1996). "On-line and off-line solid-liquid extraction and liquid chromatographic analysis at trace levels, for monitoring of herbicides and their degradation products in river and fluvioestuarine freshwater-seawater interfaces." *Journal of Chromatography A* 737(1): 117-126.
- Edgar, L. A. and J. Pickett-Heaps (1984). "Valve morphogenesis in the pennate diatom *Navicula cuspidata*." *J Phycol* 20: 47-61.
- Enjalbert, H. (1960). *Les pays aquitains, Le modelé et les sols*. Bordeaux, Bière.

- EUROSTAT (2000). Protection des cultures dans l'UE, Consommation de produits phytosanitaires dans l'Union européenne. Luxembourg, Office for Official Publications of the European Communities.
- Feldt, L. E., E. F. Stoermer and C. L. Schelske (1973). Occurrence of morphologically abnormal *Synedra* populations in lake superior phytoplankton. 16th Conference Great Lakes Research, International Association Great Lakes Research.
- Ferenczi, J., A. Ambrus, R. D. Wauchope and H. R. Sumner (2002). "Persistence and runoff losses of 3 herbicides and chlorpyrifos from a corn field in the Lake Balaton watershed of Hungary." *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes* 37(3): 211-224.
- Fisher, N. S., G. J. Jones and D. M. Nelson (1981). "Effects of copper and zinc on growth, morphology, and metabolism of *Asterionella japonica* (Cleve) 1." *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 51(1): 37-56.
- Flammarion, P., J. Garric and G. Monod (2000). Use of EROD Enzymatic Activity in Freshwater Fish. Use of Biomarkers for Environmental Quality Assessment. In: T. C. Laurent Lagadic, Jean-Claude Amiard, and Francois Ramade (eds.) (Eds.), Science Publishers, Enfield, USA, Plymouth, UK.
- Forbes, V. E. and T. L. Forbes (1994). *Ecotoxicology in Theory and Practice*. London, Chapman & Hall.
- Forbes, V. E. and T. L. Forbes (1997). *Ecotoxicologie Théorie et Application*. Paris, INRA EDITIONS.
- Gaillardon, P., P. Leroux and R. Delorme (2001). "Evolution des produits phytosanitaires à usages agricoles, I - Les herbicides." *Phytoma* 544: 10-16.
- Gayral, P. (1975). *Les Algues : morphologie, cytologie, reproduction, écologie*. Paris, Doin.
- Genin, B., C. Chauvin and F. Ménard (1997). COURS D'EAU ET INDICES BIOLOGIQUES, Pollutions-Méthodes-IBGN. Dijon, ENESAD-CNERTA.
- Ghosh, M. and J. P. Gaur (1998). "Current velocity and the establishment of stream algal periphyton communities." *Aquatic Botany* 60(1): 1-10.
- Gichner, T., J. Veleminsky and V. Pokorny (1982). "Somatic mutations by maleic hydrazide and its potassium and diethanolamine salts in the *Tradescantia* mutation assay." *Mutation Research* 103: 289-293.
- Gold, C., A. Feurtet-Mazel, M. Coste and A. Boudou (2002). "Field transfer of periphytic diatom communities to assess short-term structural effects of metals (Cd, Zn) in rivers." *Water Research* 36(14): 3654-3664.
- Gold, C., A. Feurtet-Mazel, M. Coste and A. Boudou (2003). "Impacts of Cd and Zn on the development of periphytic diatom communities in artificial streams located along a river pollution gradient." *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 44(2): 189-197.
- Goldsborough, L. G. and D. J. Brown (1988). "Effect of glyphosate (Roundup® formulation) on periphytic algal photosynthesis." *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 41(2): 253-260.
- Goldsborough, L. G. and G. G. C. Robinson (1986). "Changes in periphytic algal community structure as a consequence of short herbicide exposures." *Hydrobiologia*(139): 177-192.
- Gomez, N. and M. Licursi (2003). "Abnormal forms in *Pinnularia gibba* (Bacillariophyceae) in a polluted lowland stream from Argentina." *Nova Hedwigia* 77(3-4): 389-398.
- Grant, W. F. (1999). "Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations--a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 426(2): 107-112.
- Grant, W. F., H. G. Lee, D. M. Logan and M. F. Salamone (1992). "The Use of *Tradescantia* and *Vicia-Faba* Bioassays for the In situ Detection of Mutagens in an Aquatic Environment." *Mutation Research* 270(1): 53-64.
- Guasch, H., W. Admiraal and S. Sabater (2003). "Contrasting effects of organic and inorganic toxicants on freshwater periphyton." *Aquatic Toxicology* 64(2): 165-175.
- Guasch, H., N. Ivorra, V. Lehmann, M. Paulsson, M. Real and S. Sabater (1998). "Community composition and sensitivity of periphyton to atrazine in flowing waters: the role of environmental factors." *Journal of Applied Phycology* 10(2): 203-213.
- Guasch, H., I. Munoz, N. Roses and S. Sabater (1997). "Changes in atrazine toxicity throughout succession of stream periphyton communities." *Journal of Applied Phycology* 9(2): 137-146.
- Guasch, H. and S. Sabater (1998). "Light history influences the sensitivity to atrazine in periphytic algae." *Journal of Phycology* 34(2): 233-241.

- Guillard, R. R. L. and C. J. Lorenzen (1972). "Yellow-green algae with chlorophyllide c." *Journal of Phycology*(8): 10-14.
- Gurney, S. E. and G. G. C. Robinson (1989). "The influence of two triazine herbicides on the productivity, biomass and community composition of freshwater marsh periphyton." *Aquatic botany* 36: 1-22.
- Gustavson K., Mohlenberg F. and S. L. (2003). "Effects of Exposure Duration of Herbicides on Natural Stream Periphyton Communities and Recovery." *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 45(1): 0048-0058.
- Hajjouji, H. E., E. Pinelli, M. Guiresse, G. Merlina, J. C. Revel and M. Hafidi (2007). "Assessment of the genotoxicity of olive mill waste water (OMWW) with the *Vicia faba* micronucleus test." *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*.
- Hamala, J. A. and H. P. Kollig (1985). "The effects of atrazine on periphyton communities in controlled laboratory ecosystems." *Chemosphere* 14(9): 1391-1408.
- Hamilton, P. B., G. S. Jackson, N. K. Kaushik, K. R. Solomon and G. L. Stephenson (1988). "The impact of two applications of atrazine on the plankton communities of in situ enclosures." *Aquatic Toxicology* 13: 123-140.
- Hayakawa, T., S. Kudoh, Y. Suzuki and M. Takahashi (1994). "Temperature-Dependent Changes in Colony Size of the Fresh-Water Pennate Diatom *Asterionella-Formosa* (Bacillariophyceae) and Their Possible Ecological Implications." *Journal of Phycology* 30(6): 955-964.
- HELLEBUST, J. A. and J. C. LEWIN (1977). HETEROTROPHIC NUTRITION. THE BIOLOGY OF DIATOMS. In: D. WERNER (Eds.), Blackwell Scientific Publications, OXFORD, 13.
- Herman, D., N. K. Kaushik and K. R. Solomon (1986). "Impact of atrazine on periphyton in freshwater enclosures and some ecological consequences." *Canadian journal of fisheries and aquatic sciences* 43(10): 1917-1925.
- Hoagland, K. D., R. W. Drenner, J. D. Smith and D. R. Cross (1993). "Fresh-Water Community Responses to Mixtures of Agricultural Pesticides - Effects of Atrazine and Bifenthrin." *Environmental Toxicology and Chemistry* 12(4): 627-637.
- Hoagland, K. D., S. C. Roemer and J. R. Rosowski (1982). "Colonization and community structure of two periphyton assemblages, with emphasis on the diatoms (Bacillariophyceae)." *American Journal of Botany* 69: 188-213.
- IFEN (2002). Les pesticides dans les eaux-Sixième bilan annuel-Données 2002. Orléans, IFEN: 34.
- IFEN (2002). Rapport sur l'état de l'environnement en France. Orléans, IFEN.
- IFEN (2006). 10 indicateurs clés de l'environnement. Orléans: 2.
- IFEN (2006). Les pesticides dans les eaux Données 2003-2004. Orléans, IFEN: 40.
- INSEE Midi-Pyrénées (2002). Regards sur la Haute-Garonne. Toulouse.
- Ivorra, N., S. Bremer, H. Guasch, M. H. S. Kraak and W. Admiraal (2000). "Differences in the sensitivity of benthic microalgae to Zn and Cd regarding biofilm development and exposure history." *Environmental Toxicology and Chemistry* 19(5): 1332-1339.
- Jurgensen, T. A. and K. D. Hoagland (1990). "Effects of short term pulses of atrazine on attached algal communities in a small stream." *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 19: 617-623.
- Kasai, F. (1999). "Shifts in herbicide tolerance in paddy field periphyton following herbicide application." *Chemosphere* 38(4): 919-931.
- Kasai, F. and T. Hanazato (1995). "Effects of the triazine herbicide, simetryn, on freshwater plankton communities in experimental ponds." *Environmental Pollution* 89(2): 197-202.
- Kelly, M. G. and B. A. Whitton (1995). "The trophic Diatom Index: a new index for monitoring eutrophication in rivers." *Journal of Applied Phycology* 7: 433-444.
- Kolkwitz, R. and M. Marsson (1908). *Ökologie der pflanzlichen Saprobien*. Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft. In: (Eds.), pp. 505-519.
- Kolkwitz, R. and M. Marsson (1909). "Ökologie der tierischen Saprobien. Beiträge zur Lehre von der biologischen Gewässerbeurteilung." *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie*: 126-152.
- Kong, M. S. and T. H. Ma (1999). "Genotoxicity of contaminated soil and shallow well water detected by plant bioassays." *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 426(2): 221-228.
- Korte, V. L. and D. W. Blinn (1983). "Diatom colonization on artificial substrata in pool and riffle zones studied by light and scanning electron microscopy." *Journal of Phycology* 19(3): 332-341.
- Kosinski, R. and M. G. Merkle (1984). "The effect of four terrestrial herbicides on the productivity of artificial stream algal communities." *J. envir. Qual.* 13(75-82).

- Krammer, K. and H. Lange-Bertalot, Eds. (1986). Bacillariophyceae 1.Teil:Naviculaceae. Süßwasserflora von Mitteleuropa . Stuttgart., G.Fischer verlag.
- Krammer, K. and H. Lange-Bertalot, Eds. (1986-1991). Bacillariophyceae 1.Teil:Naviculaceae. 876 p.; 2 Teil :Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae, 596 p.; 3 Teil : Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae, 576 p.; 4 Teil : Achnanthaceae. Kritische Ergänzungen zu Navicula (Lineolatae) und Gomphonema. 437 p. Süßwasserflora von Mitteleuropa . Stuttgart., G. Fischer verlag.
- Krieger, K. A., D. B. Baker and J. W. Kramer (1988). "Effects of herbicides on stream Aufwuchs productivity and nutrient uptake." *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 17: 299-306.
- Lagadic, L., T. Caquet, J.-C. Amiard and F. Ramade, Eds. (1997). Bio-marqueurs en écotoxicologie: Aspects fondamentaux. Paris, Masson.
- Lagadic, L., T. Caquet, J. C. Amiard and F. Ramade (1998). *Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement*. Paris, Tec et Doc.
- Lange-Bertalot, H. (1979). "Pollution tolerance of diatoms as a criterion for water quality estimation." *Nova Hedwigia* 64: 285-304.
- Lebailly, P., A. Devaux, D. Pottier, M. De Meo, V. Andre, I. Baldi, F. Severin, J. Bernaud, B. Durand, M. Henry-Amar and P. Gauduchon (2003). "Urine mutagenicity and lymphocyte DNA damage in fruit growers occupationally exposed to the fungicide captan." *Occup Environ Med* 60(12): 910-917.
- Lebeau, T., G.-A. Junter, T. Jouenne and J.-M. Robert (1999). "Marennine production by agar-entrapped *Haslea ostrearia* Simonsen." *Bioresource Technology* 67: 13-17.
- Leboulanger, C., F. Rimet, M. H. de Lacotte and A. Berard (2001). "Effects of atrazine and nicosulfuron on freshwater microalgae." *Environment International* 26(3): 131-135.
- Lecoite, C., M. Coste and J. Prygiel (1993). "Omnidia - Software for Taxonomy, Calculation of Diatom Indexes and Inventories Management." *Hydrobiologia* 269: 509-513.
- Lee, M. and C.-W. Li (1992). "The origin of the silica deposition vesicle of diatoms." *Bot. Bull. Acad. Sin.*(33): 317-325.
- Leitão, M. and A. Couté (2005). *Guide pratique des Cyanobactéries planctoniques du Grand Ouest de la France*, Agence de l'eau Seine Normandie.
- Lek, S., M. Scardi, P. F. M. Verdonshot, J.-P. Descy and Y. S. Park, Eds. (2005). Modelling Community Structure in Freshwater Ecosystems. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag.
- Lenoir, A. and M. Coste (1995). *Development of a practical diatom index of overall water quality applicable to the French national water Board network. Use of Algae for monitoring rivers II*, Innsbruck Austria Studia Student. G.m.b.H.
- Lewin, J. C., B. E. Reimann, W. F. Busby and B. E. Volcani (1966). *Silica shell formation in synchronously dividing diatoms. Cell Synchrony - Studies in Biosynthetic Regulation*. In: I. L. Cameron and G. M. Padilla (Eds.), Academic Press, New York, pp. 169-188.
- Lhoste, J. and P. Grison (1989). *La Phytopharmacie française chronique historique*. Paris, INRA.
- Liess, M. (2005). *Predicting effects of pesticides in streams. Effects of Pesticides in the Field*. EU & SETAC Europe Workshop, Le Croisic, SETAC press.
- Lin, J.-H., W.-C. Kao, K.-P. Tsai and C.-Y. Chen (2005). "A novel algal toxicity testing technique for assessing the toxicity of both metallic and organic toxicants." *Water Research* 39(9): 1869-1877.
- Lockert, C. K., K. D. Hoagland and B. D. Siegfried (2006). "Comparative sensitivity of freshwater algae to atrazine." *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 76(1): 73-79.
- Lorenzen, C. J. (1967). "Determination of chlorophyll and pheopigments: Spectrophotometric equations." *Limnology and Oceanography* 12: 343-346.
- Ludes, B. and M. Coste (1996). *Diatomées et Médecine Légale*, Lavoisier Technique et Documentation, Paris.
- Lynch, T., H. E. Johnson and W. J. Adams (1985). "Impact of atrazine and hexachlorobiphenyl on the structure and function of model stream ecosystems." *Envir. Toxicol. Chem.* 4: 399-413.
- Ma, T.-H., Z. Xu, C. Xu, H. McConnell, E. Valtierra Rabago, G. Adriana Arreola and H. Zhang (1995). "The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants." *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects* 334(2): 185-195.
- Marcano, L., I. Carruyo, A. Del Campo and X. Montiel (2004). "Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa* L." *Environmental Research* 94(2): 221-226.
- Margoum, C., M. Barasc, N. Faure, M. Coquery and B. Montuelle (2006). *Développement d'une méthode de dosage des pesticides dans les biofilms pour évaluer leur impact environnemental*. Groupe Français des Pesticides, Strasbourg.

- Mazzella, N., J.-F. Dubernet and F. Delmas (2007). "Determination of kinetic and equilibrium regimes in the operation of polar organic chemical integrative samplers: Application to the passive sampling of the polar herbicides in aquatic environments." *Journal of Chromatography A* 1154(1-2): 42-51.
- McCormick, P. and J. Cairns (1994). "Algae as indicators of environmental change." *Journal of Applied Phycology* 6(5): 509-526.
- McFarland, B. H., B. H. Hill and W. T. Willingham (1997). "Abnormal *Fragilaria* spp. (Bacillariophyceae) in streams impacted by mine drainage." *Journal of Freshwater Ecology* 12(1): 141-149.
- Mestres, R., C.-M. Coste and C. J.F. (1979). Etude des résidus de produits phytosanitaires dans la région de l'étang de Canet en Roussillon. C. R. D. R. A. D. G. F. D. PESTICIDES. Bordeaux, Perpignan, SOCIETE DE PHARMACIE DE MONTPELLIER 365.
- Ministère de l'agriculture et de la pêche (2003). NOTICE D'INFORMATION, L'AUTORISATION DE MISE SUR LE MARCHE DE PRODUITS PHYTOPHARMACEUTIQUES EN FRANCE. Direction générale de l'alimentation.
- Ministère de l'écologie et du développement durable. (2005). "6ème programme d'action pour l'environnement." Retrieved 04/07, 2007.
- Ministère de l'écologie et du développement durable. (2006, 05/07/2006). "Plan interministériel de réduction des risques liés aux pesticides 2006-2009." Retrieved 03/05, 2007.
- Mission Interservice de l'Eau MISE. (2004). "Atlas de l'eau Gers." Retrieved 30/07, 2007.
- Mohr, S., M. Feibicke, R. Berghahn, R. Schmiediche and R. Schmidt (In press). "Response of plankton communities in freshwater pond and stream mesocosms to the herbicide metazachlor." *Environmental Pollution* In Press, Corrected Proof.
- Molander, S. and H. Blanck (1992). "Detection of Pollution-Induced Community Tolerance (Pict) in Marine Periphyton Communities Established under Diuron Exposure." *Aquatic Toxicology* 22(2): 129-144.
- Morschel, J. and F. Dennis (2004). "Une méthode de cartographie du risque érosif: Application au collines du Terrefort lauragais." *M@ppemonde*(76).
- Mouget, J. L., P. Rosa, C. Vachoux and G. Tremblin (2005). "Enhancement of marennine production by blue light in the diatom *Haslea ostrearia*." *Journal of Applied Phycology* 17(5): 437-445.
- Munaron, D. (2004). Etude des apports en herbicides et en nutriments par la Charente: Modélisation de la dispersion de l'atrazine dans le bassin de Marennes-Oléron. Océanologie Chimique et Environnement. Paris, Paris VI: 342.
- Munaron, D. (2004). Etude des apports en herbicides et nutriments par la Charente : modélisation de la dispersion de l'atrazine dans le bassin de Marennes-Oléron: 341.
- Munoz, I., M. Real, H. Guasch, E. Navarro and S. Sabater (2001). "Effects of atrazine on periphyton under grazing pressure." *Aquatic Toxicology* 55(3-4): 239-249.
- Narbonne, J. F. (1979). Etude en microscopie électronique de l'effet du Phenoclor DP 6 sur la morphologie du foie de rat. COMPTE RENDU DES REUNIONS ANNUELLES DU GROUPE FRANCAIS DES PESTICIDES, Bordeaux, Perpignan, SOCIETE DE PHARMACIE DE MONTPELLIER.
- Narbonne, J. F. and J. L. Gallis (1979). "*In vivo* and *in vitro* effects of phenochlor DP6 on drug metabolizing activity in mullet liver " *Bull. Environ. Contamin. Toxicol.* 23(3): 338-343.
- Navarro, E., H. Guasch and S. Sabater (2002). "Use of microbenthic algal communities in ecotoxicological tests for the assessment of water quality: the Ter river case study." *Journal of Applied Phycology* 14(1): 41-48.
- Nelson, D. M., P. Tréguer, M. A. Brzezinski, A. Leynaert and B. Quéguiner (1995). "Production and dissolution of biogenic silica in the ocean: revised global estimates, comparison with regional data and relationship to biogenic sedimentation." *Global Biogeochemical Cycles* 9: 359-732.
- Nelson, K. J., K. D. Hoagland and B. D. Siegfried (1999). "CHRONIC EFFECTS OF ATRAZINE ON TOLERANCE OF A BENTHIC DIATOM." *Environmental Toxicology and Chemistry* 18(5): 1038-1045.
- Neumann, M., M. Liess and R. Schulz (2003). "A qualitative sampling method for monitoring water quality in temporary channels or point sources and its application to pesticide contamination." *Chemosphere* 51(6): 509-513.
- Nichols (1973). Growth media - freshwater. Handbook of Phycological methods: Culture Methods and Growth Measurements. In: S. JR (Eds.), Cambridge Univ. Press Ed., New York, pp. 7-24.
- Nystrom, B., K. Becker-van Slooten, A. Berard, D. Grandjean, J. C. Druart and C. Leboulanger (2002). "Toxic effects of Irgarol 1051 on phytoplankton and macrophytes in Lake Geneva." *Water Research* 36(8): 2020-2028.

- Nystrom, B., B. Bjornsater and H. Blanck (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." *Aquatic Toxicology* 47(1): 9-22.
- Office International de l'Eau. (2000, Décembre 2000). "La loi sur l'eau: 4 principes fondamentaux." Retrieved 22/06, 2007.
- Ohe, T., T. Watanabe and K. Wakabayashi (2004). "Mutagens in surface waters: a review." *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 567(2-3): 109-149.
- Okay, O. S. and A. Gaines (1996). "Toxicity of 2,4-D acid to phytoplankton." *Water Research* 30(3): 688-696.
- Othoniel, C. (2006). LA CROISSANCE DU BIOFILM PHOTOSYNTHETIQUE : UN INDICATEUR DU STATUT TROPHIQUE DES RIVIERES ? Bordeaux, Université de Bordeaux 1: 303.
- Penalver, F. and C. Longueval (1995). Vallées secondaires Terrasses d'alluvions anciennes (et glaciaires de limons soliflues) Sud de la Gascogne. Les grands ensembles morpho-pédologiques de Midi-Pyrénées. In: C. Longueval (Eds.), Chambre régionale d'agriculture de Midi-Pyrénées, 2005.
- Pereira, W. E. and C. E. Rostad (1990). "Occurrence, Distributions, and Transport of Herbicides and Their Degradation Products in the Lower Mississippi River and Its Tributaries." *Environ. Sci. Technol.* 24(9): 1400-1406.
- Peres, F., D. Florin, T. Grollier, A. FeurtetMazel, M. Coste, F. Ribeyre, M. Ricard and A. Boudou (1996). "Effects of the phenylurea herbicide isoproturon on periphytic diatom communities in freshwater indoor microcosms." *Environmental Pollution* 94(2): 141-152.
- Perrin, A.-S., A. Probst and J.-L. Probst (2006). "Impact of nitrogen fertilizers on natural weathering processes: Evident role on CO₂ consumption." *GEOCHIMICA ET COSMOCHIMICA ACTA* 70(18): A483-A483 Suppl. S.
- Peterson, H. G., C. Boutin, K. E. Freemark and P. A. Martin (1997). "Toxicity of hexazinone and diquat to green algae, diatoms, cyanobacteria and duckweed." *Aquatic Toxicology* 39(2): 111-134.
- Pickett-Heaps, J. (1991). "Cell Division in Diatoms." *International Review of Cytology* 128: 63-108.
- Pickett-Heaps, J., D. H. Tippit and J. A. Andreozzi (1979). "Cell division in the Pennate Diatom *Pinnularia* V-Observations on Live Cells." *Biol. Cellulaire* 35: 295-304.
- Pinto, E., T. C. S. Sigaud-Kutner, M. A. S. Leitao, O. K. Okamoto, D. Morse and P. Colepicolo (2003). "Heavy metal-induced oxidative stress in algae." *Journal of Phycology* 39(6): 1008-1018.
- Pipe, A. E. and C. D.R. (1984). "Influence of Five Phenylurea Herbicides on the Diatom *Hantzschia* in a Sandy Loam Soil." *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*(33): 439-443.
- Plumley, F. and D. E. Davis (1980). "The effect of a photosynthesis inhibitor, atrazine, on salt marsh edaphic algae, in culture, microecosystems, and in the field. ." *Estuaries* 3: 217-223.
- Pointereau, P. and L. Bisault. (2006, 14 novembre 2006). "La monoculture et ses dangers pour l'environnement." Retrieved 11/06, 2007.
- Potapova, M. and D. F. Charles (2005). "Diatom metrics for monitoring eutrophication in rivers of the United States." *Ecological Indicators* In Press, Corrected Proof.
- Prieur, C. (2006). La maladie de Parkinson reconnue comme pathologie professionnelle. Le monde. Paris.
- Provost, D., A. Gruber, L. Pierre, A. Jaffre, V. Loyant, H. Loiseau, A. Vital, P. Brochard and I. Baldi (2007). "Brain tumors and exposure to pesticides: a case-control study in southwestern France." *Occup Environ Med: oem*.2006.028100.
- Prygiel, J. and M. Coste (1993). "Utilisation des indices diatomiques pour la mesure de la qualité des eaux du bassin Artois-Picardie : bilan et perspectives." *Annales de Limnologie* 29((3-4)): 255-267.
- Prygiel, J. and M. Coste (1996). "Diatoms and diatom indices in the networks for quality measurement of French watercourses: Short history and future." *Bulletin Francais De La Peche Et De La Pisciculture*(341-42): 65-79.
- Prygiel, J. and M. Coste, Eds. (2000). Guide Méthodologique pour la mise en oeuvre de l'Indice Biologique Diatomées NF T 90-354.
- Puisseux-Dao, S. (1989). "PHYTOPLANKTON MODEL" IN ECOTOXICOLOGY. *AQUATIC ECOTOXICOLOGY: FUNDAMENTAL CONCEPTS and METHODOLOGIES*. In: A. Boudou and F. Ribeyre (Eds.), CRC PRESS, Boca Raton (Florida), II.
- Quéguiner, B. (2007). "Structure et Fonctionnement des Ecosystèmes Pélagiques Marins." Retrieved 12/07, 2007.
- Rabaud, V. (2003). Davantage de traitements mais réduction des doses. AGRESTE Primeur. 137.

- Rabaud, V. (2004). Peu de pratiques alternatives en grandes cultures. AGRESTE Primeur. Paris, AGRESTE. 149.
- Ramade, F. (1977). Ecotoxicologie. Paris, Masson.
- Ramade, F. (1992). Précis d'écotoxicologie. Paris, Masson.
- Rank, J. and M. H. Nielsen (1997). "Allium cepa anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate." *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 390(1-2): 121-127.
- Raven, P. H., S. E. Eichhorn and R. F. Evert, Eds. (2000). Biologie végétale. Bruxelles, De Boeck université.
- Reviere, B. (1953). Biologie et phylogénie des algues. Paris, Belin.
- Rijstenbil, J. W. (2001). "Effects of periodic, low UVA radiation on cell characteristics and oxidative stress in the marine planktonic diatom *Ditylum brightwellii*." *European Journal of Phycology* 36(1): 1-8.
- Rijstenbil, J. W. (2003). "Effects of UVB radiation and salt stress on growth, pigments and antioxidative defence of the marine diatom *Cylindrotheca closterium*." *Marine Ecology-Progress Series* 254: 37-47.
- Rijstenbil, J. W., J. W. M. Derksen, L. J. A. Gerringa, T. C. W. Poortvliet, A. Sandee, M. Vandenberg, J. Vandrie and J. A. Wijnholds (1994). "Oxidative Stress-Induced by Copper - Defense and Damage in the Marine Planktonic Diatom *Ditylum-Brightwellii*, Grown in Continuous Cultures with High and Low Zinc Levels." *Marine Biology* 119(4): 583-590.
- Rimet, F., M. H. De Lacotte, C. Leboulanger, J. C. Druart and A. Berard (1999). "Comparaison des effets de l'atrazine et du nicosulfuron sur les communautés phytoplanctoniques du Léman. Atrazine and Nicosulfuron effects on phytoplanktonic communities of Lake of Geneva." *Archives Des Sciences de Genève* 52(2): 111-122.
- Rosenberg, D. M. and V. H. Resh (1993). *Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrates*. New York, Chapman & Hall.
- Rott, E., H. C. Duthie and E. Pipp (1998). "Monitoring organic pollution and eutrophication in the Grand River, Ontario, by means of diatoms." *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 55(6): 1443-1453.
- Round, F. E., R. M. Crawford and D. G. Mann (1990). *The Diatoms. Biology & morphology of the genera*. Cambridge, Cambridge University Press.
- Ruggiu, D., A. Lugli, A. Cattaneo and P. Panzani (1998). "Paleoecological evidence for diatom response to metal pollution in Lake Orta (N. Italy)." *Journal of Paleolimnology* 20(4): 333-345.
- Sabater, S. (2000). "Diatom communities as indicators of environmental stress in the Guadiamar River, S-W. Spain, following a major mine tailings spill." *Journal of Applied Phycology* 12(2): 113-124.
- Schmitt-Jansen, M. and R. Altenburger (2005). "Toxic effects of isoproturon on periphyton communities - a microcosm study." *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 62(3): 539-545.
- Schreiber, U., J. F. Müller, A. Haugg and R. Gademann (2002). "New type of dual-channel PAM chlorophyll fluorometer for highly sensitive water toxicity biotests." *Photosynthesis Research* 74(3): 317-330.
- Schulz, R. (2001). "Rainfall-induced sediment and pesticide input from orchards into the lourens river, western cape, south africa: importance of a single event." *Water Research* 35(8): 1869-1876.
- Seguin, F., J. C. Druart and R. Le Cohu (2001). "Effects of atrazine and nicosulfuron on periphytic diatom communities in freshwater outdoor lentic mesocosms." *Annales De Limnologie-International Journal of Limnology* 37(1): 3-8.
- Seguin, F., C. Leboulanger, F. Rimet, J. C. Druart and A. Berard (2001). "Effects of atrazine and nicosulfuron on phytoplankton in systems of increasing complexity." *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 40(2): 198-208.
- Sekar, R., V. P. Venugopalan, K. Nandakumar, K. V. K. Nair and V. N. R. Rao (2004). "Early stages of biofilm succession in a lentic freshwater environment." *Hydrobiologia* 512(1 - 3): 97-108.
- Simonet, F. (2001). "LE NOUVEAU SYSTÈME D'ÉVALUATION DE LA QUALITÉ DE L'EAU DES RIVIÈRES : LE SEQ-EAU." *Revue de l'Agence de l'Eau Adour-Garonne* 81: 7-9.
- Spalding, R. F. and D. D. Snow (1989). "Streamlevels of agrichemicals during a spring discharge event." *Chemosphere* 19(8-9): 1129-1140.
- Spurck, T. P. and J. Pickett-Heaps (1994). "The effect of diazepam on mitosis and the microtubule cytoskeleton, I. Observations on the diatoms *Hantzschia amphioxys* and *Surirella robusta*." *Journal of Cell Science* 107: 2643-2651.

- Stevenson, R. J. and Y. Pan (1999). Assessing environmental conditions in rivers and streams with diatoms. *The Diatoms - Applications for the Environmental and Earth Sciences*. In: E. F. Stoermer and J. P. Smol (Eds.), Cambridge University Press., Cambridge.
- Stoermer, E. F. (1998). BOOMERANG -SHAPED *SYNEDRA* IN LAKE SUPERIOR: AN EXAMPLE OF A SURVIVING MUTANT TAXON.
- Stoermer, E. F. (2004). ATYPICAL TABULARIA IN COASTAL LAKE ERIE. *North American Diatom Symposium*.
- Strickland, J. D. H. and T. R. Parsons (1968). *A practical handbook of seawater analysis*. Pigment analysis. Ottawa, Fisheries Research Board of Canada.
- Sudo, Y., H. Okawara and E. Oshima (1991). "Growth-Rate of *Phaeodactylum-Tricornutum*." *Kagaku Kogaku Ronbunshu* 17(3): 484-490.
- Tang, J., K. D. Hoagland and B. D. Siegfried (1998). "Uptake and bioconcentration of atrazine by selected freshwater algae." *Environmental Toxicology and Chemistry* 17(6): 1085-1090.
- Tang, J. X., K. D. Hoagland and B. D. Siegfried (1997). "Differential toxicity of atrazine to selected freshwater algae." *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 59(4): 631-637.
- Tang, J. X., B. D. Siegfried and K. D. Hoagland (1998). "Glutathione-S-transferase and in vitro metabolism of atrazine in freshwater algae." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 59(3): 155-161.
- Ter Braak, C. J. F. and H. Van Dam (1989). "Inferring pH from Diatoms: a comparison of old and new calibration methods." *Hydrobiologia* 178: 209-223.
- TEYSSIER, F. (2006). Consommations d'eau pour irrigation sur 2001-2005 en Midi-Pyrénées. Agreste Midi-Pyrénées Données. **35**.
- Thomas, W. H., J. T. Hollibaugh and D. L. R. Seibert (1980). "Effects of heavy metals on the morphology of some marine phytoplankton." *Phycologia* 19(3): 202-209.
- Tison, J., J. L. Giraudel, M. Coste, Y. S. Park and F. Delmas (2004). "Use of unsupervised neural networks for ecoregional zoning of hydrosystems through diatom communities: case study of Adour-Garonne watershed (France)." *Archiv Fur Hydrobiologie* 159(3): 409-422.
- Truhaut, R. (1977). "Ecotoxicology: Objectives, principles and perspectives." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 1(2): 151-173.
- Turpin, V., J. M. Robert, P. Gouletquer, G. Masse and P. Rosa (2001). "Oyster greening by outdoor mass culture of the diatom *Haslea ostrearia* Simonsen in enriched seawater." *Aquaculture Research* 32(10): 801-809.
- Van Dam, H., A. Mertens and J. Sinkeldman (1994). "A coded checklist and ecological indicator values of freshwater diatoms from the Netherlands." *Netherlands Journal of Aquatic Ecology* 28(1): 117-133.
- Van Den Hoek, C., D. G. Mann and H. M. Jahns (1995). *Algae - An introduction to phycology*, Cambridge University Press.
- Verneaux, J. and G. Tuffery (1967). "Une méthode zoologique pratique de détermination de la qualité des eaux courantes, Indices biotiques." *Ann. Sci. Univ. Besançon* 2: 79-89.
- Villey-Desmeserets, F., D. Ballay, C. Henry de Villeneuve and D. Tricard (2001). *La politique de préservation de la ressource en eau destinée à la consommation humaine-Rapport d'évaluation*. Paris, Commissariat au plan.: 80.
- Watanabe, T., J. Capblancq and A. Dauta (1998). "Utilisation des bioessais "in situ" (substrats artificiels) pour caractériser la qualité des eaux de rivière à l'aide du périphyton." *Annales de Limnologie* 24(2): 111-125.
- Wauchope, R. D. (1978). "The pesticide content of surface water draining from agricultural fields - A review." *Journal of Environmental Quality* 7(4): 459-471.
- Weiner, J. A., M. E. DeLorenzo and M. H. Fulton (2007). "Atrazine induced species-specific alterations in the subcellular content of microalgal cells." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 87(1): 47-53.
- Wessel, N., S. Rousseau, X. Caisey, F. Quiniou and F. Akcha (2007). "Investigating the relationship between embryotoxic and genotoxic effects of benzo[a]pyrene, 17[alpha]-ethinylestradiol and endosulfan on *Crassostrea gigas* embryos." *Aquatic Toxicology* 85(2): 133-142.
- White, P. A. and L. D. Claxton (2004). "Mutagens in contaminated soil: a review." *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 567(2-3): 227-345.
- Whitton, B. A. and M. G. Kelly (1995). "Use of Algae and Other Plants for Monitoring Rivers." *Australian Journal of Ecology* 20(1): 45-56.
- Williams, R. J., D. N. Brooke, P. Matthiessen, M. Mills, A. Turnbull and R. M. Harrison (1995). "Pesticide Transport to Surface Waters within an Agricultural Catchment." *Journal of the Institution of Water and Environmental Management* 9(1): 72-81.

Bibliographie

- Wilt, F. H. (2005). "Developmental biology meets materials science: Morphogenesis of biomineralized structures." *Developmental Biology* 280: 15-25.
- Yang, J.-R. and H. C. Duthie (1993). "Morphology and ultrastructure of teratological forms of the diatoms *Stephanodiscus niagarae* and *S. parvus* (Bacillariophyceae) from Hamilton Harbour (Lake Ontario, Canada)." *Hydrobiologia* 269-270(1): 57-66.

Liste des figures

Figure 1 : Le marché mondial 2005, en chiffres d'affaire, des pesticides par région et par catégorie de produits (Source : UIPP http://www.uipp.org/).....	15
Figure 2 : Les marchés des produits phytosanitaires en Europe en 2004 en millions d'euros (Source : UIPP http://www.uipp.org/)	16
Figure 3 : Historique des tonnages de substances actives de 1979 à 2001	17
Figure 4 : Historique des tonnages de substances actives vendues en France entre 1990 et 2005 (Source : UIPP http://www.uipp.org/)	17
Figure 5 : Evolution de la diversité des cultures en France entre 1970 et 2000.....	19
Figure 6 : Schéma synthétique de la directive 91/414/CE concernant l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) d'un produit phytosanitaire.....	22
Figure 7 : Evolution de la qualité des eaux, du point de vue des concentrations en nitrates, sur les différents points de mesure entre 1970 et 2005.....	24
Figure 8 : Répartition des émissions nettes d'azote dans l'eau selon les types de pression humaines (Source IFEN 2002)	25
Figure 9 : Schéma du SEQ-eau (Source : Simonet F. 2001)	27
Figure 10 : La qualité des eaux sur les stations du RNB en fonction des concentrations, en pesticides en 2004 (Source: IFEN 2006)	29
Figure 11 : La qualité des eaux sur les stations du bassin Adour-Garonne (A.G.), en fonction des concentrations en pesticides, en 2005 (Source: Agence de l'eau A.G. 2006).....	31
Figure 12 : Carte de la qualité des eaux potables distribuées sur le bassin Adour-Garonne du point de vue des concentrations en pesticides (Source : Agence de l'Eau A.G. et DDASS/DRASS 2003)..	32
Figure 13 : Représentation schématique de la structure de l'IBD	46
Figure 14 : Représentation schématique de la première étape du calcul de l'IBD	47
Figure 15 : Représentation schématique de la deuxième étape du calcul de l'IBD	48
Figure 16 : Représentation schématique de la systématique chez les diatomées.....	52
Figure 17 : Représentation schématique de l'évolution saisonnière des peuplements algaux (Source : Leitão et Couté 2005)	54
Figure 18 : Schéma des relations trophiques dans un écosystème aquatique	55
Figure 19 : Vue en microscopie à épifluorescence de diatomées pennées des genres <i>Nitzschia</i> et <i>Gomphonema</i> dont le noyau (bleu), marqué par du Hoescht 33342, est entouré de deux chloroplastes (rouges)	56
Figure 20 : Coupe transversale vue en MET d' <i>Amphipleura pellucida</i> (CHL : Chloroplaste, EV : Epivalve, G : Appareil de Golgi, HVN : Hypovalve de la cellule fille, M : Mitochondries, N : Noyau, OM : Matière organique entourant le frustule, PY : Pyrénolide, RT : Raphé en continu, VD : Vésicule avec un contenu noir)	57
Figure 21 : Vues aux microscopes électroniques à transmission (MET) et à balayage (MEB) de l'ultra-structure cellulaire de diatomées pennées	58
Figure 22 : Coupe transversale, visualisée au MET, d'une diatomée en fin de division, deux nouvelles valves (NV) ayant été sécrétées dans l'épivalve (EV) et l'hypovalve (HV) et Vue au microscope à épifluorescence de diatomées en division (a/ anaphase ou télophase les parois étant synthétisée ; b/ métaphase le noyau étant divisé en deux le long d'un axe transapical en blanc).....	60
Figure 23 : Photos au microscope optique de frustules normaux et anormaux de différentes espèces de diatomées benthiques.....	64
Figure 24 : Représentation schématique de la démarche scientifique suivie au cours du travail de thèse	81
Figure 25 : Réseau hydrographique des coteaux de Gascogne	84

Figure 26: Carte pédologique simplifiée de la zone des coteaux de Gascogne (Source : M. BALESTRAT, N. de la Ville d'AVRAY, K. PETIT, ADBX-Cemagref Bordeaux 2007)	85
Figure 27 : Les surfaces cultivées de maïs par canton sur la zone d'étude (rectangle) et pour la région Midi-Pyrénées.....	87
Figure 28 : Carte de la culture des céréales (céréales à paille et maïs) pour la région Midi-Pyrénées en 2004	87
Figure 29 : L'irrigation du maïs en Midi-Pyrénées	88
Figure 30 : Carte du réseau de stations suivies en 2005 et 2006 sur les cours d'eau des coteaux de Gascogne (Source : K. PETIT, ADBX-Cemagref Bordeaux 2007)	90
Figure 31 : Le dispositif expérimental	93
Figure 32 : Protocole de colonisation des lames de verre au cours d'une campagne de prélèvements	94
Figure 33 : Protocole de prélèvement du matériel biologique fixé sur les lames de verre pour le dosage de la Matière En Suspension (MES), de la Matière Volatile en Suspension (MVS), des pigments chlorophylliens par spectrophotométrie et pour l'identification et le dénombrement des espèces.	96
Figure 34: Evolution du régime hydraulique sur la Save au printemps 2005	99
Figure 35: Evolution du régime hydraulique sur le Touch au printemps 2006	99
Figure 36 : Evolution de la qualité des eaux en fonction des concentrations en nitrates (N-NO ₃ en mg/L) sur les stations des coteaux de Gascogne aux différentes dates de prélèvement en 2005.....	99
Figure 37 : Carte récapitulative des plus fortes concentrations totales en herbicides mesurées en 2005 et en 2006 sur les stations des coteaux de Gascogne	99
Figure 38: Evolution des indices biologiques « diatomées » (IBD et IPS) calculés à partir des communautés de diatomées benthiques prélevées sur les lames de verre (SA : Substrat Artificiel) en 2006	99
Figure 39: Evolution spatiale et temporelle de la concentration en matière organique dans les biofilms prélevés sur les lames de verre lors des campagnes 2005 et 2006.....	99
Figure 40 : Evolution spatiale et temporelle de la concentration en « chlorophylle a » dans les biofilms prélevés sur les lames de verre lors des campagnes 2005 et 2006.....	99
Figure 41 : Carte des abondances relatives cumulées en formes anormales dénombrées sur les substrats artificiels en 2005.....	99
Figure 42: Analyse des Correspondances Canoniques des communautés de diatomées benthiques prélevées sur les substrats artificiels le 09 mai 2005 à partir des concentrations totales en nitrates et en herbicides comme variables environnementales	99
Figure 43 : Analyse des Correspondances Canoniques des communautés de diatomées benthiques prélevées sur les substrats artificiels le 09 mai 2005, en fonction des préférences trophiques des espèces (<i>hypereutrophe</i> , <i>eutrophe</i> , <i>méso-eutrophe</i> , <i>indifférent</i> , <i>mésotrophe</i> , <i>oligo-mésotrophe</i> , <i>oligotrophe</i>)	99
Figure 44 : Carte bilan des données et résultats obtenus sur les trois principaux bassins versants étudiés	99
Figure 45: Représentation schématique des deux hypothèses avancées pour expliquer la baisse de production de biomasse algale observée entre le 09 mai et le 30 mai 2005	99
Figure 46: Dispositif de collecte des diatomées benthiques dans le milieu naturel pour l'expérimentation en microcosmes	99
Figure 47: Microcosme utilisé lors de l'étude	99
Figure 48 : Protocole d'exposition	99

Figure 49 : Evolution des quatre paramètres biologiques quantitatifs étudiés dans le canal témoin et les canaux exposés à de l'isoproturon (* différence significative avec le témoin ; ANOVA $P < 0,05$; test de Tukey)	99
Figure 50 : Evolution des quatre paramètres biologiques quantitatifs étudiés dans le canal témoin et les canaux exposés à du s-métolachlore (* différence significative avec le témoin ; ANOVA $P < 0,05$; test de Tukey)	99
Figure 51 : Evolution des quatre paramètres biologiques quantitatifs étudiés dans le canal témoin et les canaux exposés à de l'oxadiazon (* différence significative avec le témoin ; ANOVA $P < 0,05$; test de Tukey)	99
Figure 52 : Evolution des notes d'IBD et d'IPS pour les microcosmes exposés à de l'isoproturon, du s-métolachlore et de l'oxadiazon	99
Figure 53 : Evolution de la composition en espèces à $t=12$ jours entre les différents canaux et de l'abondance relative (A.R.) des espèces MVAR, NPAL et EOMI au cours de l'expérimentation dans les communautés de diatomées benthiques exposées à de l'isoproturon	99
Figure 54 : Evolution de la composition en espèces à $t=12$ jours entre les différents canaux et de l'abondance relative (A.R.) des espèces MVAR, CPLA et NRCH au cours de l'expérimentation dans les communautés de diatomées benthiques exposées à du s-métolachlore.....	99
Figure 55 : Evolution de la composition en espèces à $t=12$ jours entre les différents canaux et de l'abondance relative (A.R.) des espèces MVAR, APED et CPLA au cours de l'expérimentation dans les communautés de diatomées benthiques exposées à de l'oxadiazon	99
Figure 56 : Evolution de la composition en espèces de communautés selon leur voie métabolique entre le canal témoin et les canaux traités avec de l'isoproturon (si lettres différentes entre deux traitements, différence significative ANOVA test de Tukey $P < 0,05$) (A.R. : Abondance Relative)	99
Figure 57 : Evolution de la composition en espèces de communautés selon leur préférences trophiques entre le canal témoin et les canaux traités avec de l'isoproturon (si lettres différentes entre deux traitements, différence significative ANOVA) (A.R. : Abondance Relative).....	99
Figure 58 : Comparaison de deux méthodes de comptage (FA 1000 et FA) des diatomées anormales suite à l'exposition d'une communauté de diatomées benthiques à différentes concentrations d'un herbicide, l'Hydrazide Maléique (H.M.)	99
Figure 59 : Représentation schématique du calcul du différentiel d'accroissement de la biomasse algale pour une même station entre deux périodes consécutives de développement	99
Figure 60 : Comparaison des notes de qualité des eaux obtenues avec l'IBD classique et l'IBD recalculé prenant en compte le différentiel d'accroissement de la biomasse algale pour les échantillons prélevés sur substrat naturel en 2005	99

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les différentes classes de qualité du SEQ-eau utilisées pour les pesticides (Source : IFEN 2006)	26
Tableau 2 : Evolution des concentrations en nutriments dans les différents canaux au cours des deux expérimentations	99
Tableau 3 : Evolution des concentrations en substances actives dans les différents canaux	99

Annexes

Annexe A

Les différentes normes analytiques suivies pour l'analyse des nutriments

Nutriments	Normes	Limite de quantification (mg/L)
Azote total (N Kjeldahl)	NF EN 25663	0.2
Ammonium (NH_4^+)	NF EN ISO 11732	0.004
Nitrite (NO_2^-)	NF EN ISO 13395	0.002
Nitrate (NO_3^-)	NF EN ISO 13395	0.07
Phosphore Total (P)	NF T90-023	
	<i>Cuve de 1cm</i>	0.02
	<i>Cuve de 10cm</i>	0.002
Orthophosphates (PO_4^{3-})	NF T90-023	
	<i>Cuve de 1cm</i>	0.02
	<i>Cuve de 10cm</i>	0.002

Annexe B

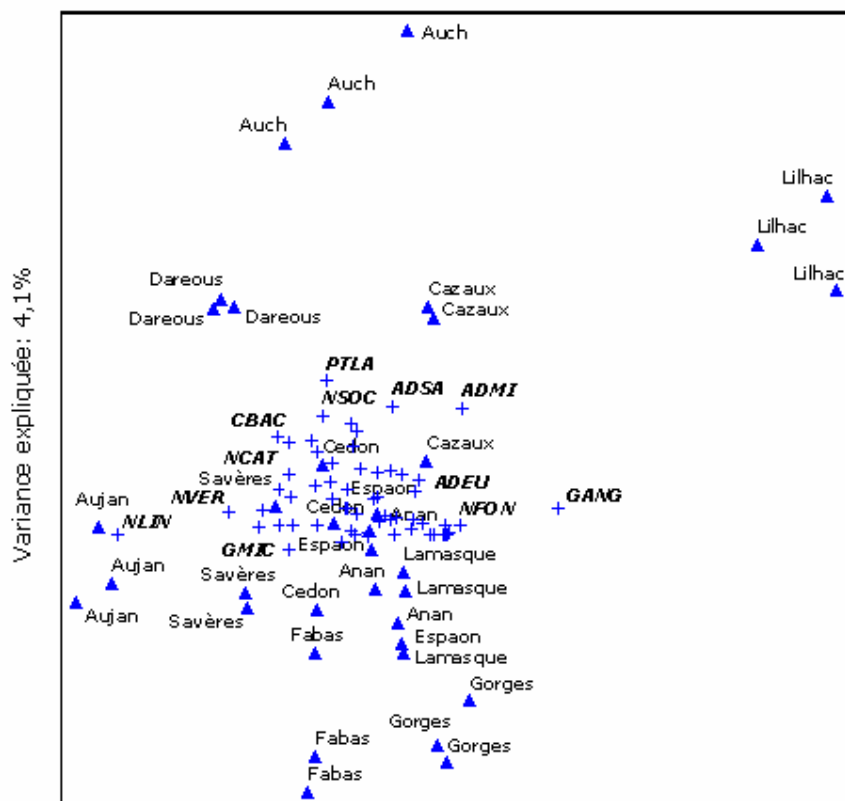
Liste des molécules herbicides recherchées et de leurs limites respectives de détection et de quantification

Herbicides recherchés	Limites de détection (µg/l)	Limites de quantification (µg/l)
Acetochlor	0,04	0,05
Aclonifen	0,04	0,05
Ametryn	0,005	0,02
Atrazine	0,005	0,02
DEA	0,005	0,02
Bromacil	0,005	0,02
Chlortoluron	0,005	0,02
Cyanazine	0,005	0,02
Diuron	0,005	0,02
DCPMU	0,005	0,02
DCPU	0,005	0,02
Hexazinone	0,005	0,02
Isoproturon	0,005	0,02
IPPMU	0,005	0,02
IPPU	0,005	0,02
Linuron	0,005	0,02
Metobromuron	0,005	0,02
Metolachlor	0,04	0,05
Metoxuron	0,005	0,02
Monolinuron	0,005	0,02
Monuron	0,005	0,02
Prometryn	0,005	0,02
Propazine	0,005	0,02
Simazine	0,005	0,02
DIA	0,005	0,02
Terbuthylazine	0,005	0,02
DET	0,005	0,02
Terbutryn	0,005	0,02

Annexe C

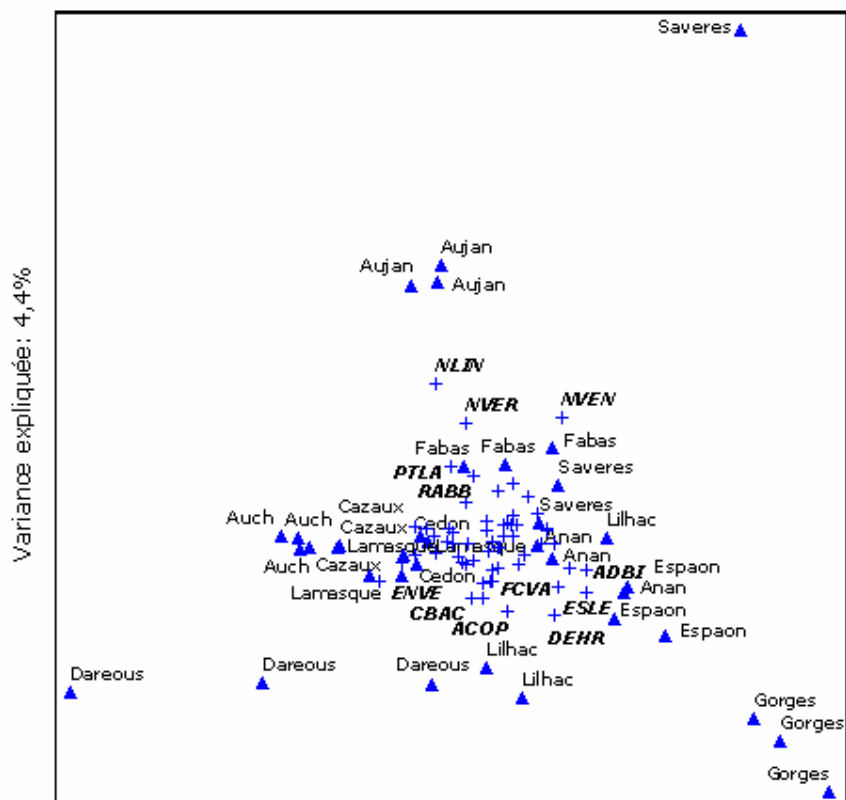
Représentations graphiques des Analyses des Correspondances Canoniques (ACC) réalisées sur les données de composition en espèces pour chaque date de prélèvement en 2005 et 2006

12 avril 2005



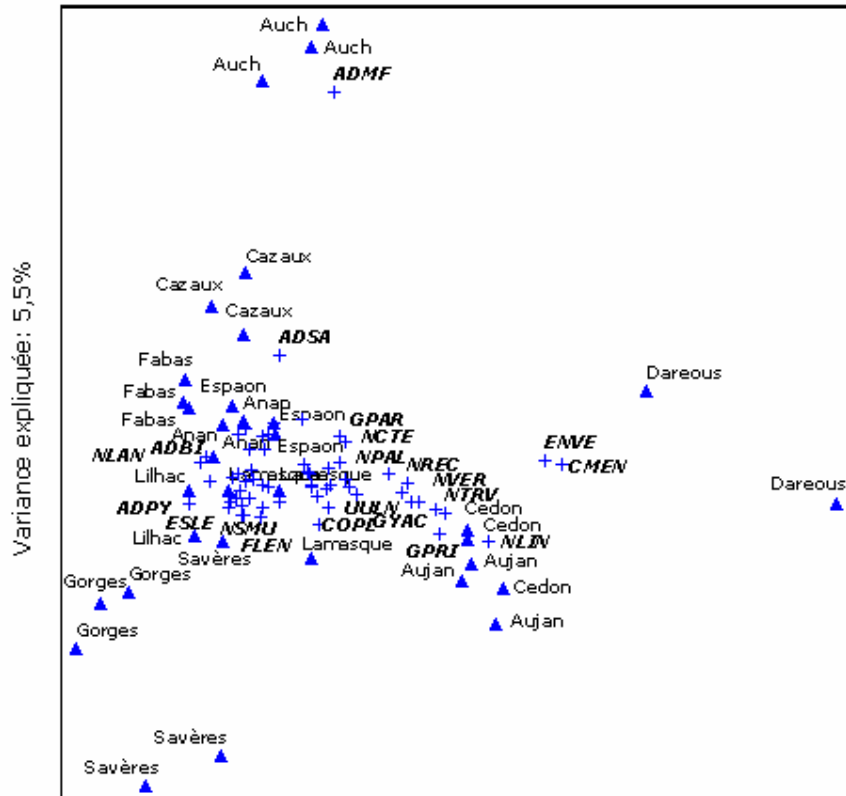
Variance expliquée: 12,0%

30 mai 2005

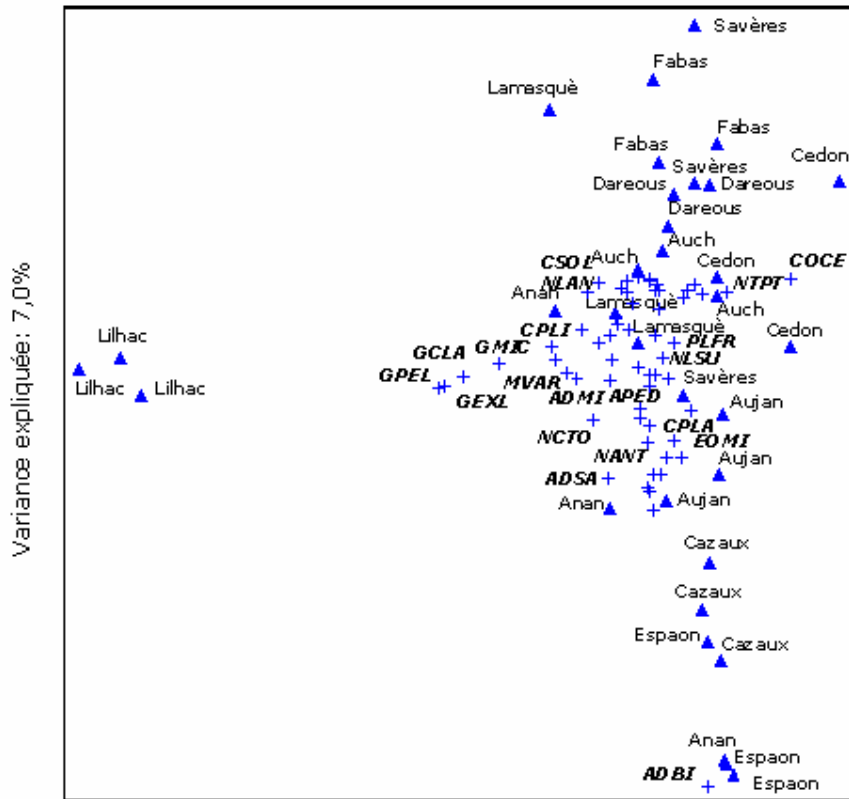


Variance expliquée: 6,3%

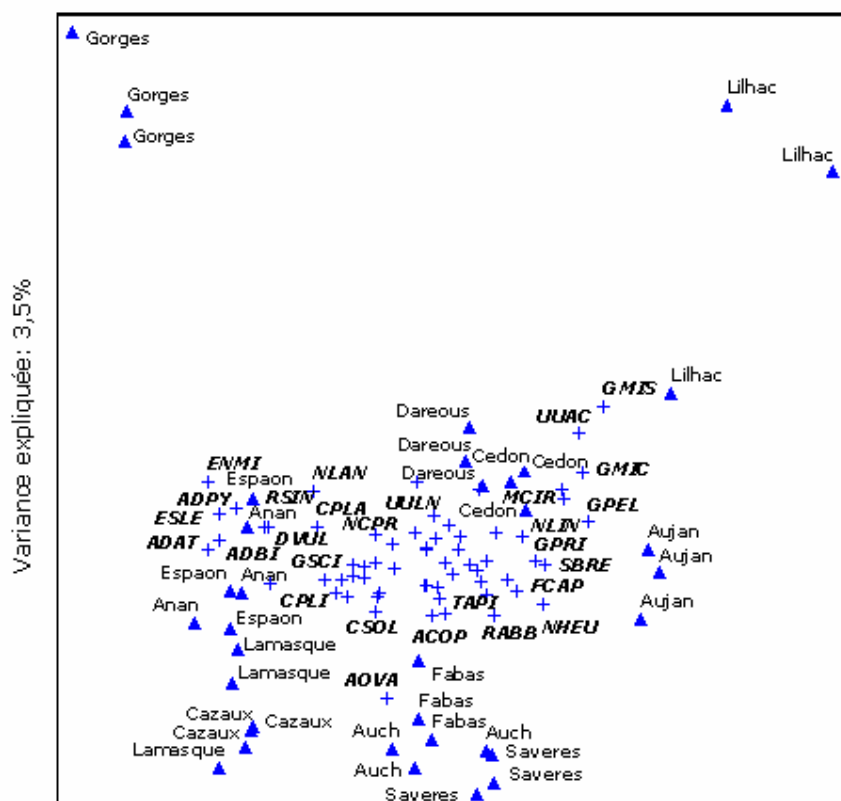
21 juin 2005



18 avril 2006

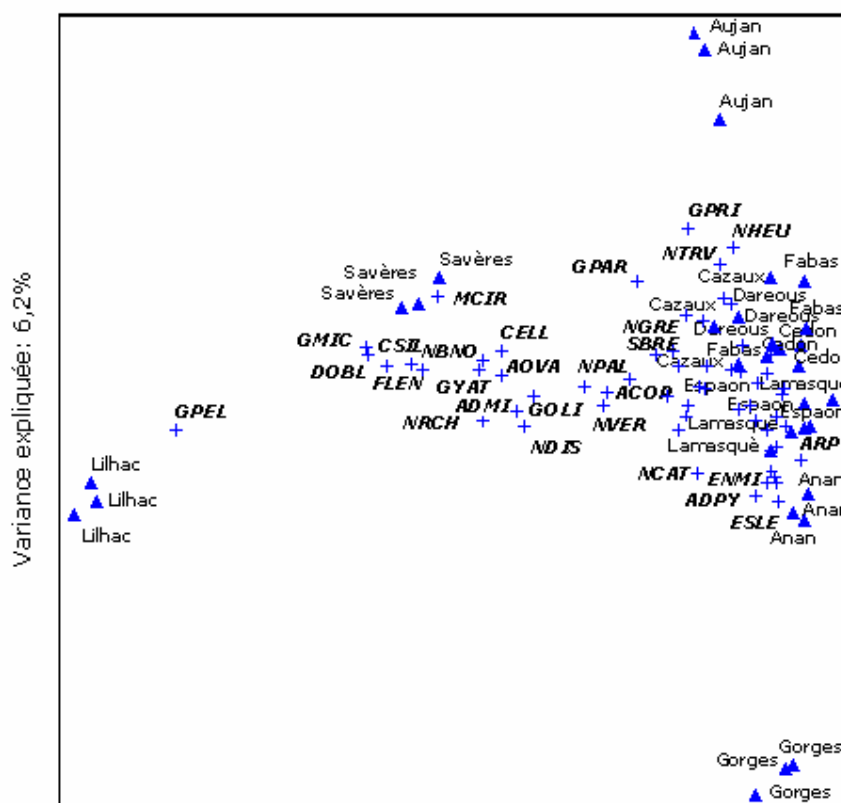


09 mai 2006



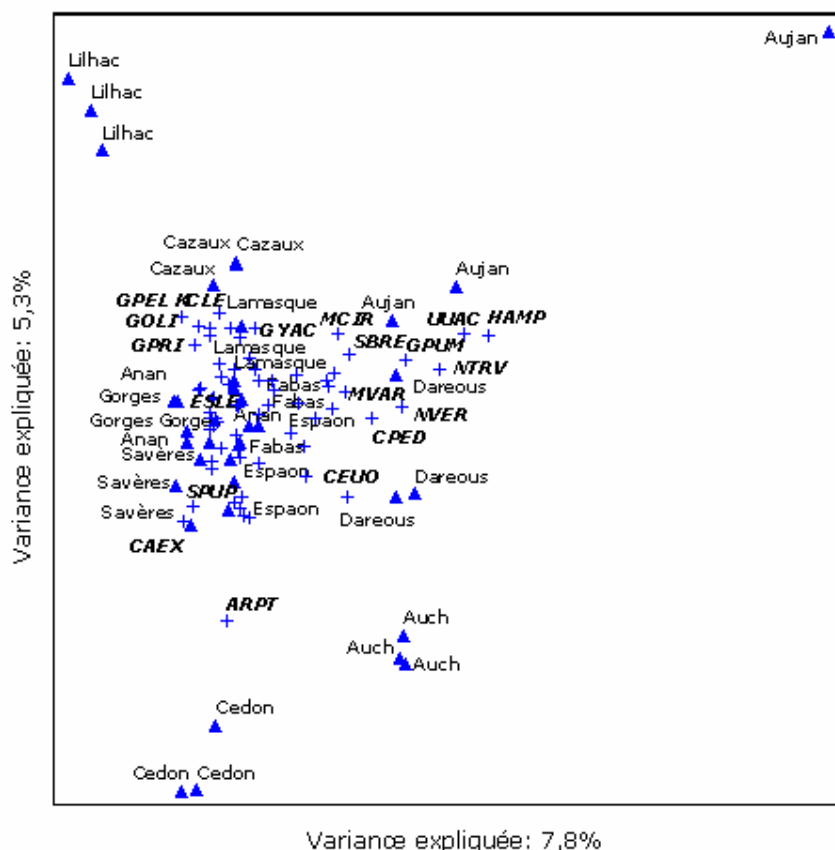
Variance expliquée: 13,3%

30 mai 2006

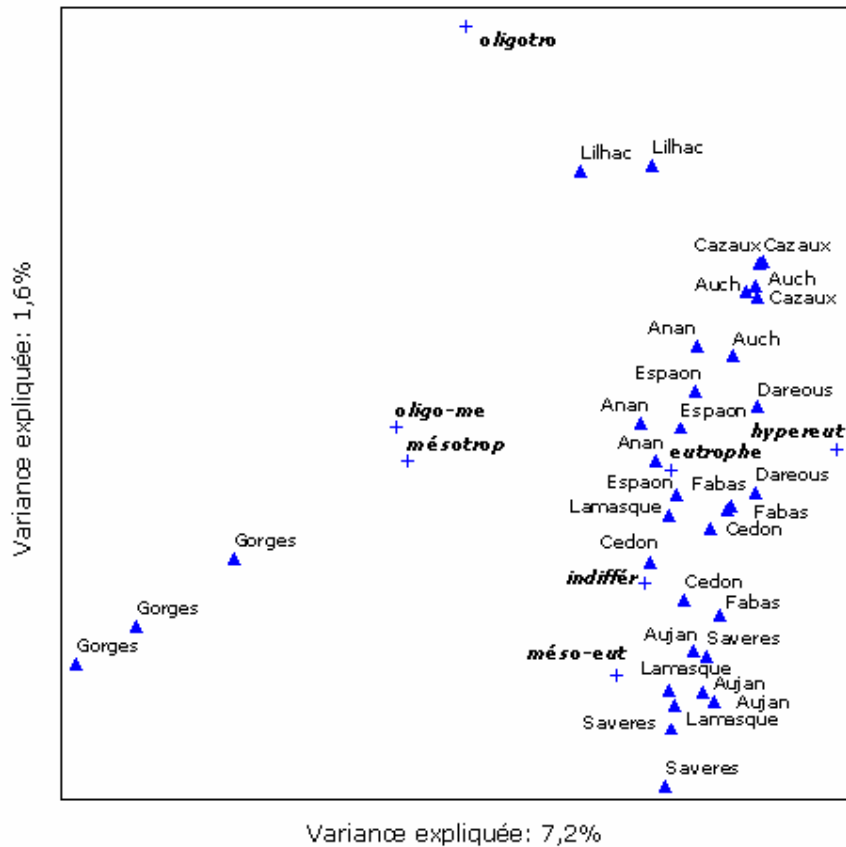


Variance expliquée: 22,9%

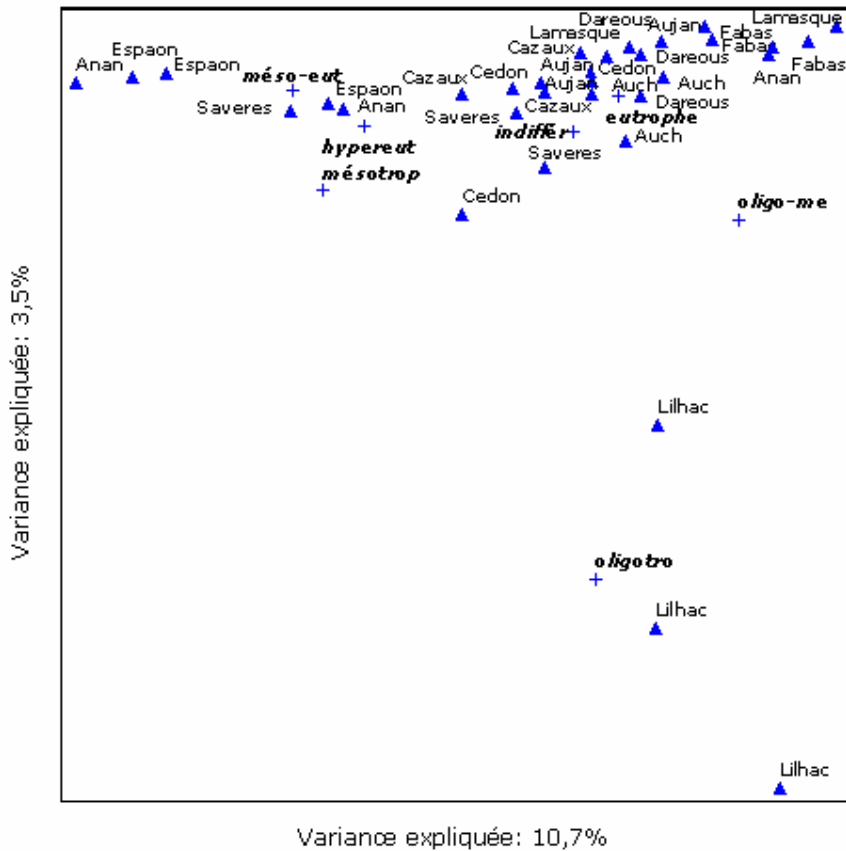
21 juin 2006



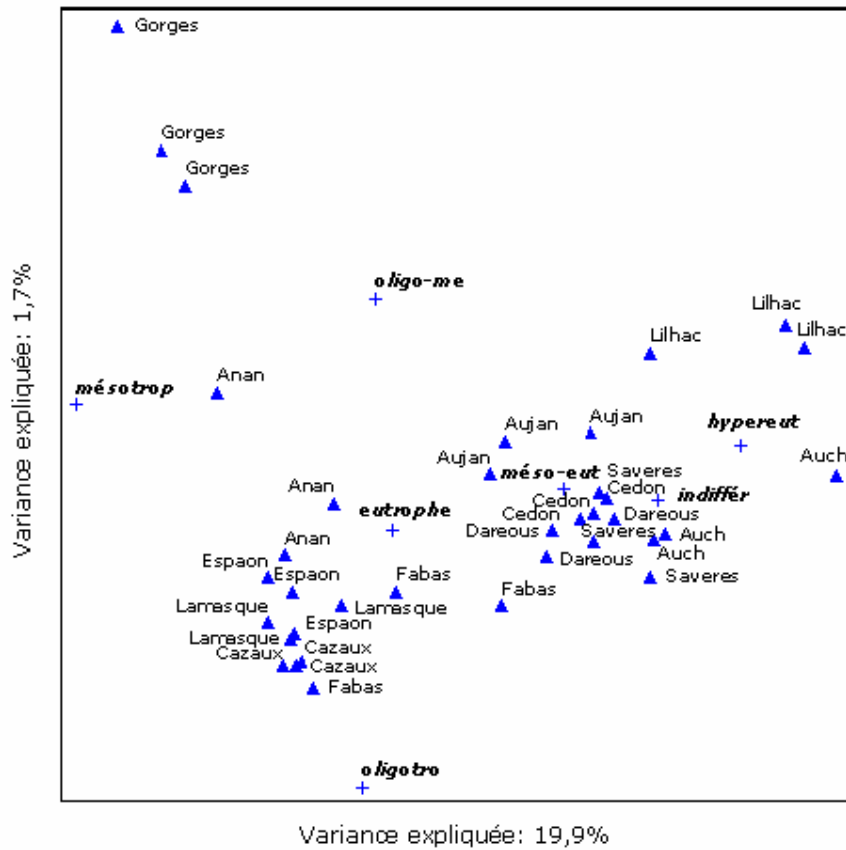
21 juin 2005



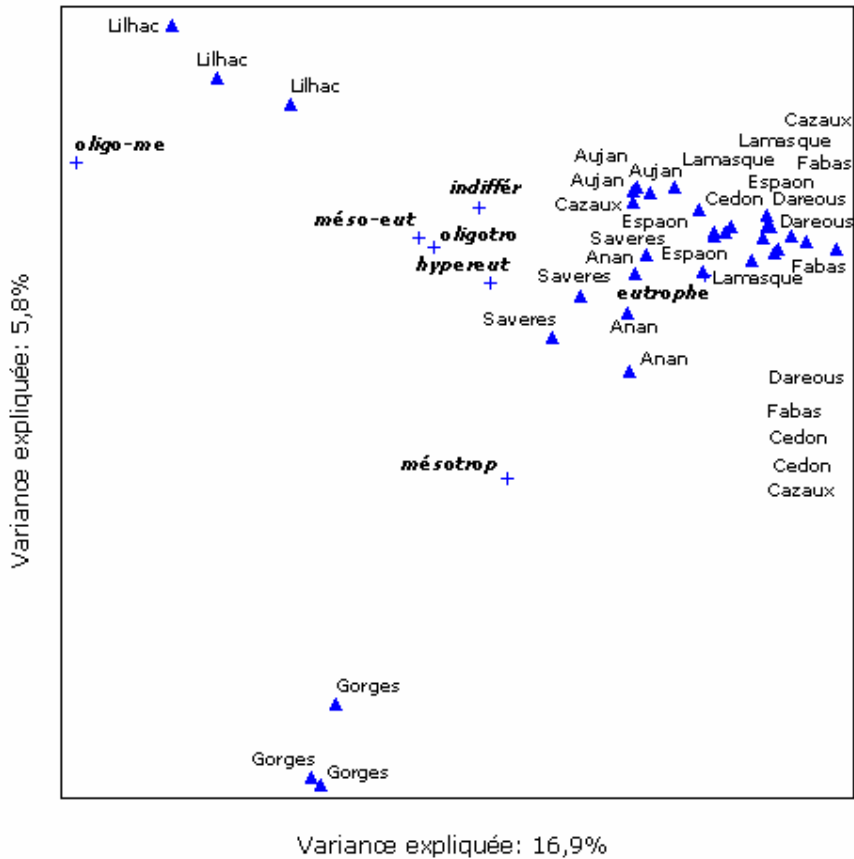
18 avril 2006



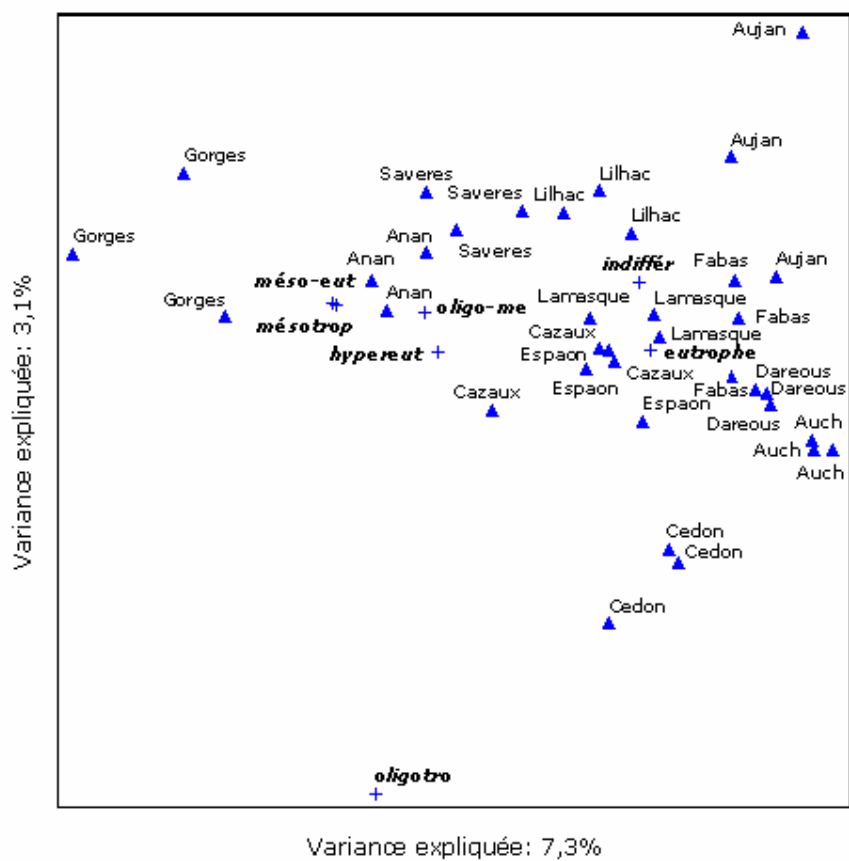
09 mai 2006



30 mai 2006



21 juin 2006



Annexe E

Liste des codes utilisés pour les espèces de diatomées

Code	Espèce
ACOP	<i>Amphora copulata</i> (Kutz) Schoeman & Archibald
ADAT	<i>Achnantheidium atomus</i> (Hustedt) Monnier, Lange-Bertalot & Ector
ADBI	<i>Achnantheidium biasolettianum</i> (Grunow in Cl. & Grun.) Lange-Bertalot
ADMF	<i>Achnantheidium minutissima</i> (Kütz.) Czarn. var. <i>affinis</i> (Grun.) Bukht.
ADPY	<i>Achnantheidium pyrenaicum</i> (Hustedt) Kobayasi
ADSA	<i>Achnantheidium saprophila</i> (Kobayasi et Mayama) Round & Bukhtiyarova
AOVA	<i>Amphora ovalis</i> (Kützing) Kützing
APED	<i>Amphora pediculus</i> (Kützing) Grunow
ARPT	<i>Achnanthes rupestoides</i> Hohn
CAEX	<i>Cymbella excisa</i> Kützing var. <i>excisa</i>
CELL	<i>Cymatopleura elliptica</i> (Brebisson) W. Smith var. <i>elliptica</i>
CEUO	<i>Cocconeis euglyptoides</i> (Geitler) Lange-Bertalot
CINV	<i>Cyclostephanos invisitatus</i> (Hohn & Hellerman) Theriot Stoermer & Hakansson
CMEN	<i>Cyclotella meneghiniana</i> Kützing
COCE	<i>Cyclotella ocellata</i> Pantocsek
COPL	<i>Cocconeis pseudolineata</i> (Geitler) Lange-Bertalot
CPED	<i>Cocconeis pediculus</i> Ehrenberg
CSIL	<i>Caloneis silicula</i> (Ehr.) Cleve
CSOL	<i>Cymatopleura solea</i> (Brebisson in Breb. & Godey) W. Smith var. <i>solea</i>
DEHR	<i>Diatoma ehrenbergii</i> Kützing
DOBL	<i>Diploneis oblongella</i> (Naegeli) Cleve-Euler
ENMI	<i>Encyonema minutum</i> (Hilse in Rabh.) D.G. Mann
ENVE	<i>Encyonema ventricosum</i> (Agardh) Grunow
EOMI	<i>Eolimna minima</i> (Grunow) Lange-Bertalot
ESLE	<i>Encyonema silesiacum</i> (Bleisch in Rabh.) D.G. Mann
FCAP	<i>Fragilaria capucina</i> Desmazieres var. <i>capucina</i>
FLEN	<i>Fallacia lenzi</i> (Hustedt) Lange-Bertalot
FSAP	<i>Fistulifera saprophila</i> (Lange-Bertalot & Bonik) Lange-Bertalot
GANG	<i>Gomphonema angustatum</i> (Kützing) Rabenhorst
GMIC	<i>Gomphonema micropus</i> Kützing var. <i>micropus</i>
GMIN	<i>Gomphonema minutum</i> (Ag.) Agardh f. <i>minutum</i>
GMIS	<i>Gomphonema minusculum</i> Krasske
GOLI	<i>Gomphonema olivaceum</i> (Hornemann) Brébisson var. <i>olivaceum</i>
GPAR	<i>Gomphonema parvulum</i> (Kützing) Kützing var. <i>parvulum</i> f. <i>parvulum</i>
GPEL	<i>Gomphonema pumilum</i> var. <i>elegans</i> Reichardt & Lange-Bertalot
GPRI	<i>Gomphonema pumilum</i> var. <i>rigidum</i> Reichardt & Lange-Bertalot
GPUM	<i>Gomphonema pumilum</i> (Grunow) Reichardt & Lange-Bertalot
GSCI	<i>Gyrosigma sciotense</i> (Sullivan et Wormley) Cleve
GYAC	<i>Gyrosigma acuminatum</i> (Kützing) Rabenhorst
HAMP	<i>Hantzschia amphioxys</i> (Ehr.) Grunow in Cleve et Grunow 1880
KCLE	<i>Karayevia clevei</i> (Grunow) Bukhtiyarova
MAPE	<i>Mayamaea atomus</i> var. <i>permitis</i> (Hustedt) Lange-Bertalot
MCIR	<i>Meridion circulare</i> (Greville) C.A. Agardh var. <i>circulare</i>
MVAR	<i>Melosira varians</i> Agardh
NANT	<i>Navicula antonii</i> Lange-Bertalot
NCAT	<i>Navicula catalanogermanica</i> Lange-Bertalot & Hofmann

NCTO	<i>Navicula cryptotenelloides</i> Lange-Bertalot
NDIS	<i>Nitzschia dissipata</i> (Kützing)Grunow var. <i>dissipata</i>
NFON	<i>Nitzschia fonticola</i> Grunow in Cleve et Möller
NHEU	<i>Nitzschia heufferiana</i> Grunow
NLAN	<i>Navicula lanceolata</i> (Agardh) Ehrenberg
NLIN	<i>Nitzschia linearis</i> (Agardh) W.M.Smith var. <i>linearis</i>
NLSU	<i>Nitzschia linearis</i> (Agardh) W.M.Smith var. <i>subtilis</i> (Grunow) Hustedt
NPAL	<i>Nitzschia palea</i> (Kützing) W.Smith
NRCH	<i>Navicula reichardtiana</i> Lange-Bertalot var. <i>reichardtiana</i>
NREC	<i>Nitzschia recta</i> Hantzsch in Rabenhorst
NSMU	<i>Navicula submuralis</i> Hustedt
NTPT	<i>Navicula tripunctata</i> (O.F.Müller) Bory
NTRV	<i>Navicula trivialis</i> Lange-Bertalot var. <i>trivialis</i>
NVER	<i>Nitzschia vermicularis</i> (Kützing)Hantzsch
PLFR	<i>Planothidium frequentissimum</i> (Lange-Bertalot)Lange-Bertalot
PTLA	<i>Planothidium lanceolatum</i> (Brebisson ex Kützing) Lange-Bertalot
RABB	<i>Rhoicosphenia abbreviata</i> (C.Agardh) Lange-Bertalot
RSIN	<i>Reimeria sinuata</i> (Gregory) Kociolek & Stoermer
SBRE	<i>Surirella brebissonii</i> Krammer & Lange-Bertalot var. <i>brebissonii</i>
SPUP	<i>Sellaphora pupula</i> (Kützing) Mereschkowsky
SSUE	<i>Surirella suecica</i> Grunow
TAPI	<i>Tryblionella apiculata</i> Gregory
UUAC	<i>Ulnaria ulna</i> (Nitzsch.) Compère var. <i>acus</i> (Kütz.) Lange-Bertalot
UULN	<i>Ulnaria ulna</i> (Nitzsch.) Compère