

# THÈSE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITÉ DE NANTES  
COMUE UNIVERSITÉ BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N°598  
*Sciences de la Mer et du littoral*  
Spécialité : Biologie des Organismes

Par

**Valentin DUPRAZ**

**Étude de la toxicité de pesticides seuls et en mélanges sur des microalgues marines et la larve d'huître creuse : approche combinant des tests miniaturisés en laboratoire avec l'utilisation d'extraits d'échantillonneurs passifs de type POCIS**

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 12 décembre 2018

Unité de recherche : Laboratoire d'Écotoxicologie, Ifremer Nantes

Thèse N° :

## **Rapporteurs avant soutenance :**

Soizic Morin, Chargée de recherche, HDR, IRSTEA Bordeaux

Thierry Caquet, Directeur de recherche, HDR, INRA Centre de recherche Bretagne-Normandie

## **Composition du Jury :**

Président : Joël Fleurence, Professeur, Université de Nantes

Examineurs : Chloé Bonnineau, Chargée de recherche, IRSTEA Lyon

Christophe Lambert, Ingénieur de recherche, HDR, Université de Bretagne Occidentale

Ian Allan, Professeur, NIVA Oslo (Norvège)

Dir. de thèse : Farida Akcha, Chargée de recherche, Ifremer Nantes

Co-dir. de thèse : Hélène Budzinski, Directrice de recherche, Université de Bordeaux

## **Invitée**

Encadrante de thèse : Sabine Stachowski-Haberkorn, Chargée de recherche, Ifremer Nantes



# Table des matières

---

Remerciements.....	9
Avant-propos.....	13
Valorisation scientifique .....	15
Liste des Figures.....	19
Liste des Tableaux.....	29
Liste des abréviations .....	33
Contexte et objectifs de la thèse.....	37
<b>Chapitre 1 – Introduction.....</b>	<b>43</b>
1. Les pesticides .....	46
1.1. Historique .....	46
1.2. Utilisation associée à la viticulture.....	47
1.3. Utilisation dans les peintures anti-salissures.....	48
1.4. Transfert des pesticides vers les écosystèmes aquatiques .....	49
1.5. Réglementation .....	55
1.6. État des lieux de la contamination chimique des écosystèmes aquatiques par les pesticides .....	58
1.7. Mesure des pesticides dans les écosystèmes aquatiques .....	64
2. Les microalgues, producteur primaire à la base des réseaux trophiques aquatiques .....	72
2.1. Généralités.....	72
2.2. Les Bacillariophycées (diatomées).....	74
2.3. Les Chlorodendrophycées .....	75
2.4. Les Prymnesiophycées .....	75
2.5. La photosynthèse .....	76
3. L’huître creuse, consommateur primaire et organisme sentinelle .....	80
3.1. Généralités.....	80
3.2. Biologie et cycle de vie de l’huître creuse, <i>Crassostrea gigas</i> .....	80
4. Mesure de la toxicité des pesticides pour les organismes aquatiques .....	83

4.1.	Généralités.....	83
4.2.	Intérêt de miniaturiser les tests de toxicité .....	84
4.3.	Valeurs standards en toxicologie et modélisation de la toxicité .....	89
4.4.	Toxicité des pesticides pour les organismes aquatiques .....	92
5.	Étude de la toxicité de pesticides en mélange.....	108
5.1.	Problématique des mélanges de pesticides.....	108
5.2.	Modèles de référence pour l'étude de la toxicité de substances en mélange.....	108
5.3.	Mélanges binaires .....	113
5.4.	Mélanges complexes .....	121
<b>Chapitre 2 – Matériels et Méthodes .....</b>		<b>129</b>
1.	Pesticides étudiés.....	131
1.1.	Choix des pesticides .....	131
1.2.	Préparation des solutions.....	131
2.	Test de toxicité réalisés sur les microalgues marines.....	132
2.1.	Microalgues marines .....	132
2.2.	Expérimentations contrôlées en laboratoire .....	134
2.3.	Lecteur de microplaques.....	138
2.4.	Cytométrie en flux .....	139
2.5.	Calcul du taux de croissance des microalgues .....	143
2.6.	Mesure de l'efficacité photosynthétique par PAM-fluorescence.....	144
2.7.	Séquençage des ARN messagers codant pour la protéine D1 du photosystème II chez la souche mutante de <i>T. suecica</i> .....	145
3.	Tests de toxicité réalisés avec les extraits de POCIS.....	146
3.1.	Contexte et généralités .....	146
3.2.	Description du site d'étude .....	147
3.3.	Préparation, pose et récupération des POCIS.....	149
3.4.	Extraction des POCIS .....	152
3.5.	Évaluation du potentiel toxique des extraits de POCIS pour les microalgues marines.. .....	156

4.	Analyses chimiques .....	159
4.1.	Dosage du diuron et de l'irgarol .....	159
4.2.	Dosage du cuivre .....	159
4.3.	Dosage du ZnPT et du CuPT .....	159
4.4.	Dosage des autres pesticides .....	159
4.5.	Dosage des extraits de POCIS .....	159
5.	Tests de toxicité réalisés sur les larves d'huître.....	162
5.1.	<i>Crassostrea gigas</i> Thundberg, 1793.....	162
5.2.	Expérimentations contrôlées en laboratoire .....	162
6.	Analyses statistiques et modélisation .....	169

### **Chapitre 3 – Toxicité de cinq biocides antifouling, seuls et en mélanges, chez trois espèces de microalgues marines ..... 173**

1.	Avant-propos.....	175
2.	Article 1 : Différence de sensibilité entre une souche résistante au diuron et deux souches sauvages de microalgues exposées au diuron et à l'irgarol, seuls et en mélanges .....	176
	Introduction .....	176
	Synthèse.....	189
3.	Article 2 : Effets combinés de biocides antifouling sur la croissance de trois espèces de microalgues marines.....	191
	Introduction .....	191
	Supplementary material.....	206
	Figure.....	206
	Tables .....	206
	Synthèse.....	208
4.	Conclusion générale .....	210

### **Chapitre 4 – Toxicité de 17 pesticides, seuls et en mélanges, sur la croissance et la physiologie de deux microalgues marines, et sur le développement embryo-larvaire de l'huître creuse ..... 213**

1.	Avant-propos.....	215
----	-------------------	-----

2. Article 3 : Démonstration de la nécessité de caractériser l’environnement chimique dans un système de test en microplaques : application au criblage de toxicité de seize pesticides vis-à-vis de deux microalgues marines.....	217
Introduction .....	217
Keywords .....	218
Highlights .....	218
Abstract.....	219
2.1. Introduction .....	220
2.2. Material and methods.....	223
2.3. Results .....	230
2.4. Discussion.....	237
2.5. Conclusion .....	243
2.6. Acknowledgments .....	244
2.7. Supplementary material .....	245
Figures.....	245
Tables .....	247
Synthèse.....	251
3. Article 4 : Toxicité de mélanges binaires de pesticides pour les microalgues marines <i>Tisochrysis lutea</i> et <i>Skeletonema marinoi</i> : interactions entre les substances et impacts physiologiques.....	254
Introduction .....	254
Keywords .....	255
Highlights .....	255
Abstract.....	256
3.1. Introduction .....	257
3.2. Materials and methods.....	259
3.3. Results .....	267
3.4. Discussion.....	276
3.5. Conclusion .....	284
3.6. Acknowledgements.....	285

3.7. Supplementary material .....	286
Figures.....	286
Tables .....	288
Synthèse.....	294
4. Criblage de la toxicité de 17 pesticides sur le développement embryolaire de <i>Crassostrea gigas</i> .....	298
4.1. Introduction .....	298
4.2. Matériels et méthodes.....	298
4.3. Résultats .....	299
4.4. Discussion.....	311
4.5. Conclusion .....	313
5. Conclusion générale .....	315
<b>Chapitre 5 – Utilisation d’extraits d’échantillonneurs passifs de type POCIS pour l’étude de la toxicité de mélanges environnementaux de pesticides sur deux microalgues marines.....</b>	<b>319</b>
1. Avant-propos.....	321
2. Utilisation d’extraits d’échantillonneurs passifs de type POCIS pour l’étude de la toxicité de mélanges environnementaux de pesticides sur deux microalgues marines.....	322
2.1. Introduction .....	322
2.2. Matériels et méthodes.....	323
2.3. Résultats .....	323
2.4. Discussion.....	336
2.5. Conclusion .....	347
2.6. Matériel supplémentaire.....	349
<b>Chapitre 6 – Synthèse générale et perspectives.....</b>	<b>351</b>
1. Toxicité des pesticides seuls .....	355
1.1. Application d’un test de toxicité en microplaques pour l’étude de la toxicité de pesticides .....	355
1.2. Quels sont les pesticides les plus toxiques ? .....	357

1.3. Qu'apporte l'étude des effets sur la physiologie ?.....	360
1.4. Place de la variabilité interspécifique et des phénomènes de résistance intraspécifique dans l'étude de la toxicité de pesticides chez les microalgues marines .....	363
2. Toxicité des mélanges de pesticides .....	367
2.1. Étude des mélanges binaires de pesticides : avantages et limites des approches utilisées .....	367
2.2. Avantages des échantillonneurs passifs pour l'étude de la toxicité des mélanges complexes issus de l'environnement .....	372
3. Quelle est la place de ces travaux dans l'évaluation du risque environnemental ? .....	377
<b>Bibliographie (hors articles 1 et 2) .....</b>	<b>381</b>
<b>Annexe .....</b>	<b>423</b>

# Remerciements

---

Je voudrais commencer par remercier chaleureusement les membres de mon jury de thèse pour avoir accepté de lire et critiquer ces travaux de thèse. Merci donc à Soizic Morin, Chloé Bonnineau, Thierry Caquet, Ian Allan, Christophe Lambert et Joël Fleurence, et plus particulièrement à Soizic Morin et Thierry Caquet pour avoir accepté de rapporter ma thèse. Ce fut pour moi un honneur d'échanger avec un jury si prestigieux.

J'adresse ensuite mes remerciements aux membres de mon comité de thèse. Merci à Philippe Soudant, Dominique Munaron et Christophe Leboulanger pour avoir toujours su apporter un regard critique et pertinent à l'égard de mes travaux. Vos conseils et votre bienveillance furent un atout de taille pour mener à bien cette thèse.

Je remercie le LabEx COTE pour avoir participé de manière non-négligeable à ces travaux de thèse en me permettant, entre autres, d'obtenir une bourse qui m'a permis d'effectuer un séjour de trois mois à l'Université de Copenhague. Merci notamment à Claire Gouny et Héléne Katz pour leur gentillesse et leur disponibilité.

Cette aventure qu'est la thèse n'aurait bien entendu pas été possible sans l'encadrement et les enseignements de mes trois directrices de thèse Farida Akcha, Sabine Stachowski-Haberkorn et Héléne Budzinski. Je voudrais commencer par remercier du fond du cœur Farida et Sabine, que j'ai côtoyées presque quotidiennement pendant ces cinq dernières années (déjà !) au sein du laboratoire d'Écotoxicologie.

Sabine, je me souviens encore de notre première rencontre au laboratoire en 2013 à l'occasion de l'entretien que je passais pour mon stage de Master 2. À l'époque, je n'avais pas idée de l'aventure qui nous attendait... et quelle aventure ! C'est donc avec une certaine émotion que j'écris ces lignes, puisqu'en plus d'avoir fait naître en moi cet attrait pour la recherche, tu as toujours été là pour moi pendant ces cinq dernières années. Tu m'as apporté ton soutien, tu m'as aidé en toutes circonstances et tu m'as poussé à sans cesse dépasser mes limites. En plus d'être une personne formidable, c'est sans aucun doute grâce la rigueur de tes enseignements que j'ai pu accomplir cette thèse. Au-delà d'une encadrante formidable, tu es devenue une amie et je me félicite d'avoir passé ces cinq dernières années en ta compagnie, que ce soit pour les manips, les fous-rires, les débats du midi (et les cours d'orthographe :-P) et tout le reste... Tu es quelqu'un que j'admire et une chercheuse très talentueuse avec qui j'aurai un plaisir immense à travailler dans le futur. Encore une fois, merci pour tout.

Farida, pendant ces cinq années durant lesquelles nous nous sommes côtoyés, j'ai toujours été fasciné par ta bonne humeur, ton dynamisme et ton enthousiasme. Au-delà d'être une excellente chercheuse, tu as su me redonner le sourire dans les moments difficiles et ta formidable détermination m'a poussé à toujours me surpasser. J'ai beaucoup appris à travers nos nombreuses discussions et je t'en remercie. Je garde de très bons souvenirs de tous ces moments passés au laboratoire, en manip ou autour d'un café, et notamment de notre

mission en mer. J'espère sincèrement que nous aurons un jour l'occasion de renouveler l'expérience ! Ce fut un réel plaisir de travailler avec toi !

Hélène, tu es une chercheuse de grand talent et tu m'as énormément appris. Je me félicite d'avoir pu m'initier à la chimie environnementale sous tes conseils avisés lors de mes séjours au LPTC. J'ai beaucoup apprécié de discuter et travailler avec toi, ton expertise aura sans aucun doute été une plus-value capitale pour la réalisation de ces travaux. Au-delà des aspects scientifiques, tu m'as toujours soutenu et pour ça je te remercie profondément.

J'en profite pour remercier également tous les membres du laboratoire LPTC, et notamment Nathalie Tapie qui m'a formé à l'extraction des POCIS et m'a aidé plus d'une fois pour les analyses chimiques. Un grand merci à Juliette Gaillard pour sa gentillesse et sa disponibilité. Je garde un excellent souvenir de nos sorties terrains à Marcillac. J'espère sincèrement avoir l'occasion de te recroiser un de ces quatre, bon courage pour la suite ! Merci également à Manon, Geoffroy, Caro, Vincent et tous les autres thésards et post-doc du labo avec qui j'ai partagé quelques moments autour d'un café ou d'un déjeuner, pour leur gentillesse et leur bienveillance, bon courage à tous pour la suite !

Un grand merci à Francis Macary, coordonnateur du projet PhytoCOTE, pour son expertise du site d'étude et des pratiques agricoles sur le bassin versant de Marcillac, ainsi que pour sa bienveillance et sa disponibilité. Je remercie également Betty Chaumet pour sa gentillesse et sa collaboration dans le projet PhytoCOTE, et Naouel Aouadi pour son travail réalisé sur le terrain auprès des viticulteurs.

J'adresse également des chaleureux remerciements à Nina Cedergreen. Merci infiniment pour ta disponibilité et ta simplicité. J'ai énormément appris durant ce séjour passé à Copenhague et c'est grâce à toi que j'ai pu me former à l'étude de la toxicité des mélanges de substances, un aspect crucial de ces travaux de thèse. Au-delà d'une excellente chercheuse, tu es une personne formidable. Merci également à Anja pour son aide et sa bienveillance, et à toute l'équipe des thésards pour leur accueil et leur gentillesse. Tak for alt !

À mes collègues Nantais, l'équipe de choc, je ne vois pas d'autre mot. Un énorme merci à tous pour ces cinq dernières années passées en votre compagnie. Franchement, je n'aurais pas pu rêver meilleur laboratoire pour réaliser ma thèse. Votre bonne humeur, votre gentillesse et vos délicates attentions m'ont permis de passer ces trois ans de thèse avec le sourire et je vous en remercie du fond du cœur.

Nathalie, que de délires depuis cinq ans déjà ! Je me félicite d'avoir été ton apprenti, bien que, c'est vrai, je n'ai pas toujours été « saze » ! Tu as toujours été là pour moi et j'admire ta rigueur et ta détermination. Nos nombreuses discussions m'ont toujours été bénéfiques. Tu m'as toujours soutenu, même dans certains moments de panique totale au labo, je pense que tu sais de quoi je parle ;-). Tu m'as transmis ce que le Seigneur t'avait lui-même transmis, la parole sainte et pour ça je te remercie. Je garde de merveilleux souvenirs de toutes les soirées en l'honneur de notre Seigneur, mais également de nos diverses chamailleries au bureau ! Je te souhaite le meilleur pour la suite, et j'espère sincèrement que nous aurons l'occasion de travailler à nouveau ensemble ! Jetlag – Au goulag !

Dom, mon cher Dom, je crois bien que sans toi je ne serais pas allé bien loin ! Alors merci pour ces heures passées ensemble, notamment sous la tête sous la hotte et au cytomètre. Tu as été mon fidèle compère avant et surtout pendant ces années de thèse et je te remercie du fond du cœur d'avoir toujours été là pour m'aider, me soutenir et me supporter :-P. Je suis ravi d'avoir pu participer à ta dernière mission en mer, j'en garde un joyeux souvenir. Je te souhaite tout le meilleur pour ta retraite, et à un de ces quatre en Nouvelle-Calédonie ;-) !

Julien, merci d'avoir toujours été là pour toutes les merdes qui me sont arrivées au labo, par exemple lorsque j'essayais de lancer un lave-vaisselle sans avoir ouvert l'arrivée d'eau en disant « ça marche pas ». Merci également d'avoir toujours été un bon compagnon lors des pots et diverses soirées... on a bien ri... à quand la prochaine ?

Rossana, je me dois d'abord de te remercier, ainsi que ton cher et tendre, pour m'avoir chaleureusement accueilli juste avant ma soutenance. Je me souviendrais de cette délicate attention, nul doute que vous y êtes pour quelque chose dans ma réussite ;-). J'ai beaucoup apprécié ta compagnie au laboratoire, grazie mille !

Même si tu n'es plus Nantaise, merci à toi Audrey, la hyène comme dirait Sabine, pour ton énergie, ta bonne humeur et tous ces fous-rires au café !

Un grand merci à Nath pour tous ces moments passés ensemble, à quand le prochain concert des Soviet Suprem ? Bises à vous trois ;-)

Larissa, un grand merci pour ta bienveillance et ta gentillesse. J'ai apprécié ta compagnie, ainsi que les discussions que nous avons pu avoir.

Thierry, merci beaucoup de m'avoir accueilli au sein de l'unité BE. Merci également pour ta bienveillance et tes précieux conseils durant ces trois années, ainsi que pour toutes ces histoires que tu as pu nous raconter, tes talents d'orateur ne sont plus à prouver ;-).

J'aimerais également remercier tous les stagiaires que j'ai pu côtoyer au laboratoire. Notamment, je remercie Claire du fond du cœur pour avoir été une formidable stagiaire. J'ai beaucoup apprécié de travailler avec toi, même si les manip n'ont pas toujours marché comme on voulait ^^ ! Je te souhaite le meilleur pour la suite. Un grand merci à Jérémy qui m'a été d'une aide cruciale lors d'une partie de mes expérimentations. Tu as un énorme potentiel je suis sûr que tu iras loin ! Merci à Jonas, alias Jojo la fripouille, pour sa bonne humeur quotidienne, je sais maintenant que les pigeons se reproduisent par mitose :-O !

Un grand merci à toute l'unité BE, notamment Aourell et Tiphaine, pour leur jovialité et tous les moments passés ensemble ! Merci à Bass, Nico et Teddy pour avoir rendu les pots de BE et les repas de Noël bien plus séduisants ! Merci à Marie-Jo pour sa bonne humeur et sa disponibilité.

Bruno, JB, merci pour ces pauses clopes et autres joyeusetés au cours desquelles nous avons pu fraterniser durant ces dernières années, c'est un réel plaisir de vous avoir rencontrés.

Merci à Judith, Francesco, Charlotte, Jérémy, Nour, Maxime, Sylvain, Arthur, Floriane et tous les autres thésards de l'Ifremer pour les moments passés, parfois à se morfondre, le plus souvent à rire ! Votre présence fut un bol d'air nécessaire, merci beaucoup !

Un grand merci à Stéphane du LER-PC pour m'avoir aidé à comprendre R... tu m'as épargné de longues prises de tête !

Un immense merci à tous les amis Nantais, notamment Michou, Paulin, Momo, Antoine, Stan, Vince pour toutes ces soirées « boire bières, brûler village » au cours desquelles notre résistance à l'éthanol fut mise à rude épreuve, ainsi que pour votre soutien durant la dernière ligne droite. À mon magicien préféré, Urbain, et à ma petite Ali, un grand merci à vous deux pour avoir toujours réussi à me changer les idées, vous êtes des amours. Un gros gros merci à mon pote Xav qui a toujours été là pour moi et qui a toujours cru en moi !

Merci infiniment à ma famille d'adoption, GPV, Roger et Seigneur tout puissant Maître de l'Univers, vous êtes incroyables. On est fin prêt pour l'apocalypse zombie, prévoyez les munitions pour notre retraite finale au bunker.

À tous les Savoyards qui me supportent maintenant depuis un bout de temps, merci infiniment d'avoir (presque :-P) toujours cru en moi ! Merci Bat et Pierrot, vous avez toujours été là malgré la distance, vous êtes comme des frères pour moi. Et merci pour ce week-end mémorable à Munich ;-). Merci à mon fidèle acolyte Mavelous, notamment pour ces soirées passées à Nantes avec toi, ou « un verre » se transformait en « dix verres et un Dubrown ». Merci à Robin, Mick, Marie, Tristan, Olivia, Yoyo, Bibi pour tous ces moments passés ensemble dans le ter-ter Savoyard ! Vous me manquez tous !

Tout ce chemin, je n'aurai pu le parcourir sans l'amour de ma vie, ma Caroline. Tu m'as toujours poussé à donner le meilleur de moi-même, et pendant toutes ces années tu m'as soutenu. Tel un ange tombé du ciel, tu as rempli ma vie de bonheur depuis le jour où nous nous sommes rencontrés et je te remercie infiniment pour tous ces moments passés ensemble, ainsi que ceux à venir. Je remercie également toute ma belle-famille du fond du cœur, Marie-Josée, Gilbert et Antoine pour leur incroyable gentillesse, leur générosité et leur soutien indéfectible.

Enfin, je remercie ma famille de tout mon cœur pour m'avoir toujours aidé à surmonter les obstacles. Un immense merci à mes grands-parents qui m'ont toujours soutenu durant cette aventure, j'espère sincèrement vous avoir rendu fiers. Un grand merci également à tous mes oncles et tantes, ainsi qu'à mon cousin Camille qui m'a hébergé plus d'une fois lors de mes séjours Bordelais. Un énorme merci à ma grande sœur Julie et à mon frère Maxime, pour avoir toujours su me redonner le sourire. Maman, Papa, merci infiniment pour tout ce que vous avez fait pour moi. Il est difficile de résumer cela en quelques mots, mais merci pour votre soutien, votre aide, votre confiance durant toutes ces années.

Voilà, c'est donc une très belle aventure qui se termine, et ce n'est pas sans regrets que je quitte cette belle région nantaise où j'ai fait de formidables rencontres. Une nouvelle page débute désormais pour moi et j'espère qu'elle sera tout aussi réussie !

# Avant-propos

---

Cette thèse s'inscrit dans le cadre du projet PhytoCOTE : « Usage des produits phytosanitaires dans les agrosystèmes, transferts potentiels vers les écosystèmes et effets des changements de pratiques agricoles », plus précisément dans le groupe de travail 2 (GT2) s'intéressant aux transferts des pesticides, risques de contamination et impact dans le continuum agrosystèmes & écosystèmes estuarien. Le projet PhytoCOTE réunit les équipes ISPA, SAVE et EGFV de l'INRA de Bordeaux, EPOC de l'Université de Bordeaux, l'Irstea de Bordeaux et l'Ifremer autour d'un site d'étude expérimental, le bassin versant de la commune de Marcillac (Gironde, France). Le projet est coordonné par Francis Macary, ingénieur-chercheur en agroenvironnement à Irstea-Bordeaux, Marie-Hélène Devier, enseignant-chercheur à l'Université de Bordeaux (UMR CNRS 5805 EPOC) et Jean-Marie Lescot, ingénieur-chercheur en agroenvironnement à Irstea-Bordeaux. Ce projet est financé par le Laboratoire d'Excellence (LabEx) COTE (ANR-10-LABX-45) via le programme Investissements d'avenir. La bourse de thèse a été obtenue au concours de l'école doctorale (ED) anciennement VENAM (Végétal, Environnement, Nutrition, Agroalimentaire, Mer), dont la composante « Mer » a désormais fusionné avec les différentes ED des régions Bretagne et Pays de Loire, pour devenir l'EDSML : École Doctorale des Sciences de la Mer et du Littoral. J'ai donc été, durant cette thèse, salarié de l'Université de Nantes en accueil au Centre Atlantique de l'Ifremer à Nantes.

La majeure partie des travaux effectués dans cette thèse, consacrés à l'étude de la toxicité de pesticides sur deux organismes marins, a été réalisée au laboratoire d'Écotoxicologie (LEX) à l'Ifremer de Nantes, sous la direction de Farida Akcha, chargée de recherche et directrice de thèse, et sous l'encadrement de Sabine Stachowski-Haberkorn, chercheur.

Pour répondre à certaines questions posées par ce sujet de thèse, l'apprentissage et l'utilisation de techniques de chimie analytique a été nécessaire. Ainsi, il avait été convenu dès le départ que les travaux ayant trait à la chimie analytique soient réalisés au Laboratoire Physico et Toxico chimie de l'environnement (LPTC) de l'UMR 5805 CNRS EPOC de l'Université de Bordeaux, sous la direction d'Hélène Budzinski, directeur de recherche et co-directrice de thèse. Ces travaux concernaient plus particulièrement :

- La préparation et l'analyse d'échantillons contenant des pesticides par chromatographie liquide ou gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CL ou CG-SM/SM)

- La préparation d'échantillonneurs passifs de type POCIS (Polar Organic Chemical Sampler), leur dépôt dans le milieu échantillonné ainsi que leur récupération et leur extraction.

Une autre partie de ce sujet de thèse concernait l'étude des effets d'interaction de plusieurs molécules en mélange. Un séjour à l'étranger a donc été planifié, dès le début de la thèse, dans le but d'apprendre la méthodologie appropriée pour la mise en œuvre et de ces expérimentations et le traitement des données qui en résulte. Cet apprentissage a été réalisé sous la direction de Nina Cedergreen, professeur à l'Université de Copenhague (Département des Sciences Environnementales et Végétales, Section Physique et Chimie Environnementale), qui est une des pionnières dans l'étude des effets toxiques et d'interaction des mélanges de pesticides. Cette mobilité internationale de trois mois, réalisée du 04/08/2016 au 04/11/2016, a été permise par le soutien financier du LabEx COTE.

# Valorisation scientifique

---

## Valorisation des travaux issus de la thèse

### Quatre publications scientifiques de rang A (trois parues, une en révision)

**Dupraz V.**, Ménard D., Akcha F., Budzinski H., Stachowski-Haber Korn S. Toxicity of binary mixtures of pesticides to the marine microalgae *Tisochrysis lutea* and *Skeletonema marinoi*: substance interactions and physiological impacts. *Soumise au journal Aquatic Toxicology*.

**Dupraz V.**, Stachowski-Haber Korn S., Wicquart J., Tapie N., Budzinski H., Akcha F. Demonstrating the need of chemical exposure characterisation in a microplate test system: application to the toxicity screening of sixteen pesticides towards two marine microalgae, 2019. *Chemosphere* **221**, 278-291. doi:10.1016/j.chemosphere.2019.01.035.

**Dupraz V.**, Stachowski-Haber Korn S., Ménard D., Limon G., Akcha F., Budzinski H., Cedergreen N., 2018. Combined effects of antifouling biocides on the growth of three marine microalgal species. *Chemosphere* **209**, 801-814. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.06.139.

**Dupraz V.**, Coquillé N., Ménard D., Sussarellu R., Haugarreau L., Stachowski-Haber Korn S., 2016. Microalgal sensitivity varies between a diuron-resistant strain and two wild strains when exposed to diuron and irgarol, alone and in mixtures. *Chemosphere* **151**, 241-252. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.02.073.

### Deux communications orales internationales

**Dupraz V.**, Ménard, D., Tapie, N., Akcha, F., Budzinski, H., Stachowski-Haber Korn, S. How to interpret the toxicity of complex environmental mixtures? a method combining analytical chemistry and mixture modelling approaches. *Forum SEM (Santé, Environnement Molécule) 2018, Octobre 2018, Fondation Rovaltain, Valence-TGV, France. Retransmise sous forme de Webinar sur le réseau international Ecotoxicomic.*

**Dupraz V.**, Stachowski-Haberkorn S., Ménard D., Akcha F., Budzinski H., Cedergreen N. Toxicity of antifouling binary mixtures towards three species of marine microalgae: are the interactions species-dependent? *27<sup>ème</sup> congrès annuel de la SETAC Europe, Mai 2017, Bruxelles, Belgique.*

### Trois communications orales nationales

**Dupraz V.**, Stachowski-Haberkorn S., Ménard D., Akcha F., Devier M-H., Budzinski H. Development of a toxicity screening test in microplates to evaluate the toxicity of pesticides towards two marine phytoplankton species. *Congrès GFP, Mai 2016, Bordeaux, France.*

**Dupraz V.**, Coquillé N., Ménard D., Sussarellu R., Haugarreau L., Stachowski-Haberkorn S. Effects of diuron and irgarol towards two strains of *Tetraselmis suecica*: Does diuron resistance goes with irgarol resistance? *3<sup>ème</sup> journées d'écotoxicologie microbienne, Mars 2016, Valence, France.*

**Sussarellu R., Dupraz V.**, Coquillé N., Akcha F., Budzinski H., Stachowski-Haberkorn S. Molecular mechanisms of adaptation of the microalga *Tetraselmis suecica* to diuron: consequences on the sensitivity to a complex pesticides mixture. *3<sup>ème</sup> journées d'écotoxicologie microbienne, Mars 2016, Valence, France.*

### Deux communications par affiche

**Dupraz V.**, Ménard, D., Akcha, F., Budzinski, H., Stachowski-Haberkorn, S. Toxicity of POCIS passive sampler extracts from a vineyard area in Bordeaux towards two marine microalgae. *1<sup>ère</sup> conférence internationale sur l'écotoxicologie microbienne, EcotoxicoMic 2017, Novembre 2017, Lyon, France.*

**Dupraz V.**, Stachowski-Haberkorn S., Ménard D., Akcha F., Devier M-H., Budzinski H. Toxicity screening of pesticides towards two marine phytoplankton species. *26<sup>ème</sup> congrès annuel de la SETAC Europe, Mai 2016, Nantes, FRANCE.*

## Valorisation de travaux auxquels j'ai collaboré pendant ma thèse

### Une publication scientifique de rang A

Coquillé N., Ménard D., Rouxel J., **Dupraz V.**, Éon M., Pardon P., Budzinski H., Morin S., Parlanti É., Stachowski-Haberkorn S., 2018. The influence of natural dissolved organic matter on herbicide toxicity to marine microalgae is species-dependent. *Aquatic Toxicology* **198**, 103-117. doi:10.1016/j.aquatox.2018.02.019.

### Une communication orale internationale

Coquillé N., Ménard D., Rouxel J., **Dupraz V.**, Éon M., Budzinski H., Morin S., Parlanti É., Stachowski-Haberkorn S. Influence of natural dissolved organic matter on herbicide toxicity to two marine microalgae. *1<sup>ère</sup> conférence internationale sur l'écotoxicologie microbienne, EcotoxicoMic 2017, Novembre 2017, Lyon, France.*

### Deux communications orales nationales

Coquillé N., Stachowski-Haberkorn S., Morin S., Parlanti E., Ménard D., Rouxel J., Haugarreau L., **Dupraz V.**, Eon M., Vedrenne J., Boutry S., Rosebery J., Ezzedine J., Grégoire J-C., Budzinski H., Tapie N., Pardon P., Chevance-Demars L. Is the toxicity of herbicides towards microalgae influenced by natural dissolved organic matter (DOM)? *3<sup>ème</sup> journées d'écotoxicologie microbienne, Mars 2016, Valence, France.*

Coquillé N., **Dupraz V.**, Ménard D., Sussarellu R., Haugarreau L., Morin S., Parlanti É., Stachowski-Haberkorn S. Impacts of two antifouling biocides, irgarol 1051 and diuron on the physiology of the marine microalga *Tetraselmis suecica*. *Congrès SEFA, Juillet 2015, Bordeaux, France.*

### Trois communications par affiche

Sussarellu R., **Dupraz V.**, Menard D., Budzinski H., Stachowski-Haberkorn S. Responses of two strains of the marine microalga *Tetraselmis suecica* to binary mixtures of two PSII inhibitors. *1<sup>ère</sup> conférence internationale sur l'écotoxicologie microbienne, EcotoxicoMic 2017, Novembre 2017, Lyon, France.*

Coquillé N., **Dupraz V.**, Ménard D., Sussarellu R., Haugarreau L., Stachowski-Haberkorn S. Toxicity of two antifouling biocides, irgarol 1051 and diuron, on two marine phytoplankton species commonly used in aquaculture. *25<sup>ème</sup> congrès annuel de la SETAC Europe, Mai 2015, Barcelone, Espagne.*

**Dupraz V.**, Coquillé N., Parlanti E., Morin S., Stachowski-Haberkorn S., Guo Y., Haugarreau L., Ménard D., Rouxel J., Auby I., Maurer D., Barbier-Méteignier C., Rigouin L., Rumebe M., *et al.* Effects of pesticides towards microalgae of the freshwater – marine water continuum: influence of natural dissolved organic matter? *2<sup>ème</sup> journées d'écotoxicologie microbienne, Mars 2014, Banyuls-sur-mer, France.*

# Liste des Figures

---

- Figure 1 : Schéma résumant les différents processus de transfert des pesticides vers les eaux de surface douces et marines. Modifié d'après Coquillé 2017..... 52
- Figure 2 : Moyennes géométriques des concentrations totales en pesticides ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) en 2014 par sous-secteur hydrologique. Sources : agences et offices de l'Eau ; BRGM, banque ADES et BD Lisa ; Meem, BDCarthage<sup>®</sup>. Traitements : SOeS, 2017..... 60
- Figure 3 : Taux de présence dans les analyses des dix pesticides les plus quantifiés dans les cours d'eau en 2014 ; l'aire des cercles représente le pourcentage des analyses pour lesquelles la concentration dépasse  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$  (par exemple, 31% pour l'AMPA) ; DEDIA : déséthyl-desisopropyl-atrazine. Sources : agences et offices de l'Eau ; Ineris, BNVD, 2016. Traitements : SOeS, 2017. .... 61
- Figure 4 : Cinétique d'accumulation des contaminants dans un échantillonneur passif. D'après Vrana *et al.* 2005..... 66
- Figure 5 : Un POCIS, fermé à gauche et ouvert à droite..... 68
- Figure 6 : Phylogénie consensus des principaux groupes d'eucaryotes basée sur des données de phylogénétique moléculaire et d'ultrastructure (Baldauf, 2003). D'après Baldauf (2008). .... 73
- Figure 7 : À gauche, cellules de *Skeletonema marinoi* formant une chaîne, observées par microscopie optique (Bengt Karlson<sup>©</sup>). À droite, cellules de *S. marinoi* observée en microscopie électronique à balayage (MEB) (Lars Edler et Gustaaf Hallegraeff<sup>©</sup>)..... 74
- Figure 8 : À gauche, cellules de *Tetraselmis suecica*, observées par microscopie confocale (Emily Roberts<sup>©</sup>). À droite, cellule de *Tetraselmis indica* observée en microscopie électronique à balayage (MEB) (Arora *et al.*, 2013)..... 75
- Figure 9 : À gauche, cellule d'*Emiliana huxleyi* observée en microscopie électronique à balayage (MEB ; Alison R. Taylor<sup>©</sup>). À droite, cellules de *Tisochrysis lutea*, observées par microscopie (Raymond Kaas<sup>©</sup>)..... 76
- Figure 10 : Schéma général de la photosynthèse oxygénique. PS II : photosystème II ; CEO : complexe d'émission d'oxygène ; e- : électron ; PQ/PQH2 : plastoquinone ; b6f : complexe cytochrome b6f ; PC : plastocyanine ; PS I : photosystème I ; Fd : ferrédoxine ; FNR : ferrédoxine-NADP+ réductase. Modifié d'après Educaplay<sup>©</sup>, Yikrazuul<sup>©</sup> et SchoolMouv<sup>©</sup>..... 77

Figure 11 : Cycle de vie de l'huître creuse, *Crassostrea gigas* (hpf, jpf et mpf = heures/jours/mois post-fécondation). ..... 82

Figure 12 : Exemple de courbe concentration-réponse obtenue après exposition de la microalgue *Tisochrysis lutea* à un herbicide, l'isoproturon, pendant 96 h. .... 92

Figure 13 : Concept des surfaces concentration-réponse et de l'isobologramme. La réponse (allant de 0 à 1, 1 correspondant à la limite-haute = réponse des témoins) diminue en fonction des concentrations croissantes de la substance *B* (courbe du haut) et du ratio de mélange 50%<sub>A</sub>:50%<sub>B</sub> (courbe transversale) (a) ; les courbes concentration-réponse des deux substances seules *A* et *B* et des trois ratios de mélanges sont affichées (b) ; la surface concentration-réponse est projetée sur un plan 2D selon l'effet d'inhibition choisi, ici 50%, correspondant aux CE<sub>50</sub> respectives induites par les différents ratios de mélange (c) ; les isoboles de cinq effets d'inhibition (10%, 25%, 50%, 75% et 100%) sont affichées en 2D sur l'isobologramme (d). Notons que dans cet exemple, le mélange binaire suit parfaitement le concept d'addition des concentrations. D'après Cedergreen *et al.* (2013) et Gessner (1995)..... 115

Figure 14 : Illustration d'un isobologramme résultant d'un mélange synergique, par rapport aux prédictions des modèles CA et IA, entre deux substances, *A* et *B*. Les deux axes représentent les concentrations des substances *A* (abscisses) et *B* (ordonnées) en mélange ; les différents ratios de mélanges sont représentés par les lignes pointillées. Les points ( $\pm$  intervalle de confiance à 95%) représentent les CE<sub>50</sub> déterminées expérimentalement. La ligne pleine noire en gras représente l'isobole du modèle CA ; la courbe en points-tirets représente l'isobole du modèle IA. La courbe rouge au-dessus de l'isobole CA est un exemple d'isobole décrivant une interaction antagoniste ; la courbe verte en-dessous de l'isobole CA est l'isobole décrivant l'interaction synergique observée. .... 118

Figure 15 : Cellules de *Chaetoceros calcitrans* observées par microscopie photonique (M. Hoppenrath<sup>©</sup>). ..... 132

Figure 16 : Cellules de *Skeletonema marinoi* observées par microscopie à contraste de phase (gauche,  $\times 400$ ), par microscopie électronique à balayage (droite). Creative Commons Attribution 3.0<sup>©</sup> ..... 133

Figure 17 : Cellule de *Tetraselmis suecica* observée par microscopie optique (CCMP<sup>©</sup>)..... 133

Figure 18 : Cellules de *Tisochrysis lutea* observées par microscopie optique (CCAP<sup>©</sup>)..... 134

Figure 19 : Synoptique des expérimentations concentration-réponse réalisées en microplaques avec les microalgues marines. (A) contamination du milieu de culture en erlenmeyer ou ballon de culture ; (B) répartition du milieu de culture contaminé en triplicats dans les puits de la microplaque (0,90 mL/puits) ; (C) ajout de 0,10 mL d'une dilution appropriée de culture microalgale afin d'atteindre la densité cellulaire initiale souhaitée ( $2 \times 10^4$ cellules mL <sup>-1</sup> ).....	135
Figure 20 : Synoptique des expérimentations réalisées en ballons de culture (ici symbolisés par des erlenmeyers). (A) contamination du milieu de culture ; (B) ajout de 1,00 mL d'une dilution appropriée de culture microalgale dans le milieu de culture préalablement contaminé afin d'atteindre la densité cellulaire initiale souhaitée ( $2 \times 10^4$ cellules mL <sup>-1</sup> ).....	137
Figure 21 : Photo illustrant une expérimentation en ballons de culture. Photo V. Dupraz.....	138
Figure 22 : Photo du lecteur de microplaques SAFIRE. Photo V. Dupraz.....	138
Figure 23 : Cytomètre en flux BD-Accuri C6.....	139
Figure 24 : Illustration du fonctionnement d'un cytomètre en flux (modifié d'après un schéma d'Invitrogen <sup>®</sup> ).....	140
Figure 25 : Exemples de cytogrammes des cultures de <i>T. lutea</i> (T'iso, en vert, à gauche) et <i>S. marinoi</i> (Skm, en marron, à droite). Sur l'axe des abscisses, la fluorescence rouge (FL4-H), sur l'axe des ordonnées, la fluorescence verte (FL1-H) ; les deux axes sont en échelle logarithmique. ....	141
Figure 26 : Aquapen-C AP-C 100.....	145
Figure 27 : Localisation de la zone d'étude expérimentale (point rouge) dans la région du Blayais en Gironde (à droite) par rapport à la carte de la France (à gauche). ....	146
Figure 28 : Carte du bassin versant de Marcillac. Le contour du BV est affiché en rouge ; les deux cours d'eau principaux, Les Souches et La Livenne, sont affichés en bleu. Le village, ainsi que la distillerie, la STEP et leurs fossés de drainage respectifs sont affichés en violet. SCAN25 <sup>®</sup> (IGN), UR ETBX Irstea- Bordeaux. ....	148
Figure 29 : Localisation des stations échantillonnées par les POCIS. Les stations en couleur, L1, SE et L4, ont fait l'objet d'un suivi spécifique visant à tester le potentiel toxique des extraits de POCIS. Les stations en gris ont uniquement fait l'objet d'un suivi visant à évaluer la contamination chimique.	

Les parcelles en violet représentent les parcelles de viticulture. Sources : UR ETBX, Irstea-Bordeaux, SCAN25® (IGN), BD TOPO (IGN). Modifié d'après J. Gaillard, 2017. ....	150
Figure 30 : Photos des trois stations suivies : A, L1-MEN ; B, SE-REG et C, L4-VIG. Photos J. Gaillard et V. Dupraz. ....	151
Figure 31 : Cage contenant six POCIS, récupérée après un mois d'immersion. Photo V. Dupraz.	151
Figure 32 : Photo du système d'extraction en phase solide (SPE) utilisé pour l'extraction des POCIS. Il se compose d'une cuve d'extraction sur laquelle sont montées douze cartouches SPE et d'un entonnoir permettant le transfert de la phase. En bas à droite, un POCIS ouvert où l'on peut voir la phase (en marron-jaune) sur la membrane PES. Photo V. Dupraz. ....	152
Figure 33 : Photo de la cuve d'extraction contenant les flacons ambrés dans lesquels ont été éluées les cartouches SPE contenant la phase issue des POCIS. ....	153
Figure 34 : À gauche, évaporation sous flux d'azote de l'éluat pré-concentré ; à droite, éluat final après concentration. ....	154
Figure 35 : Extraits de POCIS concentrés de ~280 µL issus des trois stations de suivi pour la période avril-mai. ....	155
Figure 36 : Synthétique des expérimentations réalisées avec les extraits de POCIS en microplaques avec les microalgues. (A) contamination du milieu de culture en tubes de culture ; (B) répartition du milieu de culture contaminé en triplicats dans les puits de la microplaque (0,90 mL/puits) ; (C) ajout de 0,10 mL d'une dilution appropriée de la culture microalgale afin d'atteindre la densité cellulaire souhaitée ( $2 \times 10^4$ cellules mL <sup>-1</sup> ). ....	157
Figure 37 : Huître creuse ( <i>Crassostrea gigas</i> ) adulte et ouverte (G. Lancia®). ....	162
Figure 38 : Huîtres creuses en stabulation dans un bac d'eau de mer oxygénée (A) ; géniteur mâle isolé dans un cristalliseur pendant la libération des spermatozoïdes (B). ....	163
Figure 39 : Synthétique des expérimentations concentration-réponse réalisées en microplaques avec les larves d'huître. (A) contamination du milieu de culture en tubes de culture ; (B) répartition du milieu de culture contaminé en triplicats dans les puits de la microplaque (2,00 mL/puits) ; (C) ajout de 0,01-0,02 mL d'une dilution appropriée du mix de fécondation afin d'atteindre la densité de zygotes souhaitée (100 zygotes mL <sup>-1</sup> ). ....	164

- Figure 40 : Illustration d'une larve D normale (A et F), ainsi que des différentes anomalies observables : anomalie du développement de la coquille (B et G) ; hypertrophie du manteau (C et H) ; anomalie de coquille et hypertrophie du manteau (D et I) et arrêt de développement (E et J). Photos prises au microscope photonique inversé ( $\times 400$  ; A à E) et au microscope électronique à balayage ( $\times 1000$  ; F à J), d'après Nogueira *et al.* 2017..... 165
- Figure 41 : Photo de l'expérimentation réalisée pour l'étude de la génotoxicité des pesticides sur les larves de l'huître creuse. .... 166
- Figure 42 : Illustration d'une comète. Le pourcentage d'ADN dans la tête (*% Head DNA*) et la queue (*% Tail DNA*) de la comète est mesuré par l'intensité de fluorescence à l'aide du logiciel Komet. 168
- Figure 43: Principal component analysis (PCA) illustrating the relationships between concentrations measured in the microplate wells after 0, 6 and 96 h of exposure and physicochemical properties of the chemicals ( $\text{Log } K_{ow}$ ,  $\text{Log } H$ ,  $\text{Log } S$ ) added as supplementary variables. On the left (A) is the projection of individuals grouped by pesticide class: green for herbicides, orange for insecticides and pink for fungicides. Individuals are named using the first three letters of the chemical and the concentration level (*i.e.* 1 for C1 etc.). On the right (B) is the factor map of variables on the two first axes (supplementary quantitative variables are represented in blue with dashed arrows). ..... 231
- Figure 44: Concentration-response curves for all substances tested on *Tisochrysis lutea*. Points (in triplicates; dots: nominal concentration; squares: corrected nominal concentration; triangles: measured concentration) correspond to the 96 h growth rate. Lines (straight line: nominal concentration; dashed line: corrected nominal concentration; dotted line: measured concentration) correspond to the fitted three parameter log-logistic model with their respective 95% confidence interval in gray..... 234
- Figure 45: Concentration-response curves for all substances tested on *Skeletonema marinoi*. Points (in triplicates; dots: nominal concentration; squares: corrected nominal concentration; triangles: measured concentration) correspond to the 96 h growth rate. Lines (straight line: nominal concentration; dashed line: corrected nominal concentration; dotted line: measured concentration) correspond to the fitted three parameter log-logistic model with their respective 95% confidence interval in gray..... 235
- Figure 46: Comparison of concentration-response curves obtained in microplate and culture flasks for *Tisochrysis lutea* (A, B) and *Skeletonema marinoi* (C, D). Points (in triplicates; dots: microplate; triangles: culture flasks) correspond to the 96 h growth rate. Lines (microplate: straight line; culture

flasks: dashed line) correspond to the fitted three parameter log-logistic model with their respective 95% confidence interval in gray. ....236

Figure 47 : Isobolograms resulting from the binary mixtures of isoproturon with diuron (A), azoxystrobin (B), spiroxamine (D) or quinoxifen (E), as well as spiroxamine with quinoxifen (C) or chlorpyrifos-methyl (F), tested on *Tisochrysis lutea* in microplates. The points represent the  $EC_{50} \pm 2$  standard-error, s.e. The straight solid line is the CA isobole; the dot-dashed line is the IA isobole; the curved solid line (when displayed) is the best fitting isobole model when there is a significant interaction. ....270

Figure 48 : Isobolograms resulting from the binary mixtures of isoproturon with diuron (A), azoxystrobin (B), spiroxamine (D), quinoxifen (E) or metazachlor (G), as well as spiroxamine with quinoxifen (C) or chlorpyrifos-methyl (F), tested on *Skeletonema marinoi* in microplates. The points represent the  $EC_{50} \pm 2$  standard-error, s.e. The straight solid line is the CA isobole; the dot-dashed line is the IA isobole; the curved solid line (when displayed) is the best fitting isobole model when there is a significant interaction. ....271

Figure 49 : Effects, measured as the % of variation compared with solvent controls, of isoproturon (ISO), diuron (DIU) and their binary mixtures (MIX) on the PSII quantum yield ( $\Phi'_M$ ), esterase activity (FL1<sub>FDA</sub>), relative lipid content (FL1<sub>BOD</sub>), cytoplasmic membrane potential (FL1<sub>DIB</sub>) and ROS content (FL1<sub>DCF</sub> and FL2<sub>DHE</sub>) in *T. lutea* and *S. marinoi*. Concentrations are expressed as TUs. Only significant effects relative to solvent controls are displayed; letters denote significant differences between treatments (ANOVA,  $p < 0.05$ ). ....272

Figure 50 : Effects, measured as the % of variation compared with solvent controls, of isoproturon (ISO), spiroxamine (SPI) and their binary mixtures (MIX) on the PSII quantum yield ( $\Phi'_M$ ), esterase activity (FL1<sub>FDA</sub>), relative lipid content (FL1<sub>BOD</sub>), cytoplasmic membrane potential (FL1<sub>DIB</sub>) and ROS content (FL1<sub>DCF</sub> and FL2<sub>DHE</sub>) in *T. lutea* and *S. marinoi*. Concentrations are expressed as TUs. Only significant effects relative to solvent controls are displayed; letters denote significant differences between treatments (ANOVA,  $p < 0.05$ ). \*For *S. marinoi*, effects of SPI 1.5 TU are not displayed due to total inhibition of microalgal growth. ....274

Figure 51 : Effects, measured as the % of variation compared with solvent controls, of isoproturon (ISO), metazachlor (MET) and their binary mixture (MIX), on (A) the PSII quantum yield\* ( $\Phi'_M$ ) esterase activity (FL1<sub>FDA</sub>), relative lipid content (FL1<sub>BOD</sub>), cytoplasmic membrane potential (FL1<sub>DIB</sub>) and ROS content (FL1<sub>DCF</sub> and FL2<sub>DHE</sub>) in *S. marinoi*. \*A focus on the quantum yield is also shown in

part B. Concentrations are expressed in TUs. Only significant effects relative to solvent controls are displayed; letters denote significant differences between treatments (ANOVA,  $p < 0.05$ ).....276

Figure 52 : Comparaison des courbes concentration-réponse obtenues après test d'une gamme de cuivre via le test embryo-larvaire dans des microplaques 12-puits (en rouge), et 24-puits (en bleu). Les valeurs de  $CE_{50}$  sont données avec un intervalle de confiance à 95% ( $IC_{95}$ ) également symbolisé par l'aire autour des courbes.....299

Figure 53 : Boîtes à moustaches représentant le pourcentage de normalité en fonction du pourcentage de méthanol (A) et d'acétone (B) à l'issue du test embryo-larvaire réalisé en microplaques 24-puits. Les lettres représentent les différences significatives entre les traitements. ....300

Figure 54 : Courbe concentration-réponse obtenue après test d'une gamme de cuivre via le test embryo-larvaire. Les valeurs de  $CE_{50}$  et  $CE_{10}$  sont données avec un intervalle de confiance à 95% ( $IC_{95}$ ) également symbolisé par l'aire autour des courbes. ....301

Figure 55 : Boîtes à moustaches représentant le pourcentage de normalité des larves D après 24 h de développement en fonction de la concentration de la substance testée (en  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), après exposition au diuron (A), à l'isoproturon (B), au diquat (C) et au flazasulfuron (D). Les lettres représentent les différences significatives entre les traitements (test de Tukey). ....302

Figure 56 : Boîtes à moustaches représentant le pourcentage de normalité des larves D après 24 h de développement en fonction de la concentration de la substance testée (en  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), après exposition au métazachlore (E), au S-métolachlore (F), au glyphosate (G) et à l'AMPA (H). Les lettres représentent les différences significatives entre les traitements (test de Tukey). ....303

Figure 57 : Boîtes à moustaches représentant le pourcentage de normalité des larves D après 24 h de développement en fonction de la concentration de la substance testée (en  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), après exposition au fipronil (A), à l' $\alpha$ -cyperméthrine (B), à l'acrinathrine (C), au chlorpyrifos (D), au chlorpyrifos-méthyl (E) et à l'imidaclopride (F). Les lettres représentent les différences significatives entre les traitements (test de Tukey).....305

Figure 58 : Boîtes à moustaches représentant le pourcentage de normalité des larves D après 24 h de développement en fonction de la concentration de la substance testée (en  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), après exposition à l'azoxystrobine (A), au krésoxim-méthyl (B), au quinoxyfène (C) et à la spiroxamine (D). Les lettres représentent les différences significatives entre les traitements (test de Tukey).....306

- Figure 59 : Courbes concentration-réponse modélisées avec un modèle log-logistique à trois paramètres à partir du pourcentage de normalité des larves D après 24 h d'exposition au diuron (A), à l'isoprotruron (B) et au métazachlore (C). Les points représentent les valeurs du pourcentage de normalité pour chaque réplicat/concentration. L'aire autour de la courbe symbolise l'intervalle de confiance à 95% ( $IC_{95}$ ).....307
- Figure 60 : Courbes concentration-réponse modélisées avec un modèle log-logistique à trois paramètres à partir du pourcentage de normalité des larves D après 24 h d'exposition à l'acrinathrine (A), à l'azoxystrobine (B), au krésoxim-méthyl (C) et à la spiroxamine (D). Les points représentent les valeurs du pourcentage de normalité pour chaque réplicat/concentration. L'aire autour de la courbe symbolise l'intervalle de confiance à 95% ( $IC_{95}$ ).....308
- Figure 61 : Boîtes à moustaches représentant le pourcentage d'ADN dans la queue de la comète (% *tail DNA*) des larves d'huître après 6 h de développement en fonction de la concentration de la substance testée (en  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), après exposition au diuron (A) à l'acrinathrine (B), à l'azoxystrobine (C) et à la spiroxamine (D). Les lettres représentent les différences significatives entre les traitements (test de Tukey), l'étoile rouge représente un effet significatif par rapport aux témoins ( $p < 0,05$  ; test de Newman-Keuls).....310
- Figure 62 : Nombre de traitements phytosanitaires par mois, classés par usage, recensés sur le site d'étude de janvier à juin 2017. Les barres cumulées par couleur représentent différentes substances. SDP : stimulateurs de défense des plantes. Données : Irstea-Bordeaux, N. Aouadi.....323
- Figure 63 : Nombre de traitements par produit phytosanitaire, classés par usages. La fréquence, pour chaque substance par rapport aux autres substances du même usage, est affichée au sommet de chaque barre. Données : Irstea-Bordeaux, N. Aouadi. ....325
- Figure 64 : Valeurs de  $CE_{50}$  ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ,  $\pm IC_{95\%}$ ) déterminées pour les témoins positifs phase (T-POS, en vert clair) et solvant (T-POS-SOLV, en vert foncé), pour chaque période de suivi, sur *T. lutea* (à gauche) et *S. marinoi* (à droite).....326
- Figure 65 : Illustration des trois courbes dilution-réponse obtenues avec *T. lutea* pour la période avril-mai. En bleu, L1-MEN, en rouge, SE-REG et en violet, L4-VIG.....327
- Figure 66 : Évolution des valeurs de  $FD_{50}$  (sans unité,  $\pm IC_{95\%}$ ) déterminées pour les extraits de POCIS issus des stations L1-MEN (en bleu), SE-REG (en rouge) et L4-VIG (en violet), pour les

quatre périodes de suivi, sur <i>T. lutea</i> (à gauche) et <i>S. marinoi</i> (à droite). Plus la valeur de $FD_{50}$ est élevée et plus la toxicité de l'extrait est importante. ....	327
Figure 67 : Concentrations mesurées (en $ng L^{-1}$ ) dans les extraits de POCIS dilués au 1/400 <sup>ème</sup> dans le milieu de culture f/2 pour les huit pesticides recherchés (en vert, les herbicides ; en rose, les fongicides ; le quinoxyfène n'a jamais été détecté à des concentrations supérieures à sa LQ), pour chaque station et chaque période de suivi. ....	333
Figure 68 : Concentrations (uniquement > LQ, en $ng g^{-1}$ de phase, échelle logarithmique) des pesticides présents dans les extraits de POCIS « chimie » issus des stations L1-MEN, SE-REG et L4-VIG pour les périodes janvier-février et mars-avril. Données : LPTC-EPOC, J. Gaillard. ....	342
Figure 69 : Concentrations (uniquement > LQ, en $ng g^{-1}$ de phase, échelle logarithmique) des pesticides présents dans les extraits de POCIS « chimie » issus des stations L1-MEN, SE-REG et L4-VIG pour les périodes avril-mai et mai-juin. Données : LPTC-EPOC, J. Gaillard. ....	343
Figure 70 : Concentration de pesticides (en $\mu g g^{-1}$ de biofilm) aux différentes stations suivies (+ L2 et L3, non suivies pour l'étude du potentiel toxique des extraits) pour la période mai-juin. Données : Irstea-Bordeaux, B. Chaumet. ....	345
Figure 71 : Schéma bilan récapitulatif des expérimentations réalisées dans cette thèse et les principaux résultats obtenus. ....	353
Figure 72 : Schéma illustratif de l'approche d'analyse dirigée par l'effet (EDA). Modifié d'après Brack (2003). ....	373
Figure 73 : Photo d'un Maxi-Imaging PAM (Heinz Walz GmbH <sup>®</sup> ). ....	375



# Liste des Tableaux

---

Tableau 1 : Liste des 45 substances prioritaires de l'annexe X de la DCE. Les NQE sont exprimées en $\mu\text{g L}^{-1}$ , MA : moyenne annuelle ; CMA : concentration maximale admissible. ....	57
Tableau 2 : Liste des pesticides testés, de leurs propriétés physico-chimiques et de leur mode d'action (PPDB, <i>Pesticide Properties Database</i> , Lewis <i>et al.</i> , 2016). ....	94
Tableau 3 : Toxicité aiguë des pesticides étudiés au cours de la thèse sur le taux de croissance ( $\mu$ ) de microalgues dulçaquicoles <sup>(D)</sup> ou marines <sup>(M)</sup> . Les nombres entre parenthèses représentent l'intervalle de confiance à 95% (si disponible). ....	98
Tableau 4 : Toxicité des pesticides étudiés sur le développement embryo-larvaire de l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> , ou de la moule commune, <i>Mytilus edulis</i> , ou méditerranéenne, <i>Mytilus galloprovincialis</i> . En cas d'absence de toxicité, la concentration maximale testée est donnée entre parenthèses. ....	106
Tableau 5 : Exemple de calcul d'une gamme de six concentrations pour évaluer l'interaction de deux substances, A (en rouge) et B (en bleu), en mélange binaire suivant un <i>ray design</i> . ....	114
Tableau 6 : Principaux avantages et limites associés à l'utilisation des échantillonneurs passifs pour l'étude de la toxicité de mélanges complexes ; modifié d'après Kim Tiam <i>et al.</i> (2016). ....	124
Tableau 7 : Concentration finale ( $C_f$ , en $\mu\text{M}$ ) et temps d'incubation ( $T_{inc}$ , en min) de chaque fluorochrome utilisé pour chaque espèce. L'incubation est systématiquement réalisée à l'obscurité à température ambiante ( $\sim 20^\circ\text{C}$ ). ....	143
Tableau 8 : Paramètres d'utilisation du RapidVap <sup>®</sup> pour l'évaporation du dichlorométhane et du méthanol dans les éluats de la phase des POCIS. ....	154
Table 9 : Chemicals tested in this study, their physicochemical properties, known modes of action (MoA). Substances displayed as biocides are no longer allowed in any agricultural applications, while all the remaining are phytosanitary products (PPs) allowed in viticulture or other agricultural applications. (sources: Pesticide Properties DataBase, Lewis <i>et al.</i> , 2016, E-Phy / ANSES, <a href="https://ephy.anses.fr/">https://ephy.anses.fr/</a> and European chemical agency (ECHA): <a href="https://echa.europa.eu/fr/home">https://echa.europa.eu/fr/home</a> ). ....	224
Table 10 : $\text{EC}_{50}$ values ( $\pm 95\%$ confidence interval) computed with the three expressions of exposure concentrations (2.6.1) (see the description below the table) for the two species of microalgae. Note	

that only chemicals with data permitting the calculation of the EC<sub>50</sub> are displayed; data for diuron and S-metolachlor come from preliminary experiments and therefore did not permit to compute the “Measured” and “Cell density” modalities. ....233

Table 11 : EC<sub>50</sub> values ( $\pm$  95% confidence interval) computed with the three expressions of exposure concentrations (§3.2.6.1) (see the description below the table) for the two species of microalgae. Note that only chemicals with data permitting the calculation of the EC<sub>50</sub> are displayed; data for diuron and S-metolachlor come from preliminary experiments and therefore did not permit to compute the “Measured” and “Cell density” modalities. ....259

Table 12 : EC<sub>50</sub> values ( $\pm$  95% confidence interval) computed with the three expressions of exposure concentrations (§3.2.6.1) (see the description below the table) for the two species of microalgae. Note that only chemicals with data permitting the calculation of the EC<sub>50</sub> are displayed; data for diuron and S-metolachlor come from preliminary experiments and therefore did not permit to compute the “Measured” and “Cell density” modalities. ....269

Table 13 : Comparison of growth rate inhibition percentages (GRi%) and  $\Sigma$ TU<sub>50:50</sub> ( $\pm$  95% confidence interval) obtained for the three single substances tested in culture flasks and their binary mixtures for both microalgal species. The ‘TU’ column indicates the targeted GRi% expressed in TU: 0.5 TU = 25%; 1 TU = 50%; 1,5 TU = 75%. ....279

Tableau 14 : LOEC, CE<sub>10</sub> et CE<sub>50</sub> (en  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) mesurées pour les substances testées lors du criblage de toxicité réalisé sur les larves de l’huître *C. gigas*. Les valeurs de CE<sub>10</sub> et CE<sub>50</sub> sont données avec leur intervalle de confiance à 95% ; n.d. : valeur non déterminée ; - : pas de toxicité dans la gamme testée. ....309

Tableau 15 : Concentration des huit pesticides recherchés dans les échantillons de milieu de culture f/2 contaminés avec les extraits de POCIS à différentes dilutions.....330

Tableau 16 : Somme des unités toxiques ( $\Sigma$ TU extrait, sans unités), FD<sub>50</sub> prédit (FD50<sub>pred</sub>) et expérimental (FD50<sub>exp</sub>), pourcentage du FD<sub>50</sub> mesuré expliqué par le FD<sub>50</sub> théorique en utilisant toutes les concentrations (% expliqué) ou seulement la spiroxamine (% expliqué [SPI]), pour chaque extrait de POCIS dilué dans le milieu de culture (et pour lesquels les huit pesticides sélectionnés ont été recherchés) en fonction des différentes stations et périodes suivies. ....335

Tableau 17 : Synthèse des différentes publications ayant étudié la toxicité de mélanges complexes constitués par des échantillons environnementaux (eau ou échantillonneurs passifs) sur des microalgues et d'autres organismes.....337

Tableau 18 : Taux d'échantillonnage POCIS  $R_s$  (en  $L j^{-1}$ ) issus de la littérature des huit pesticides analysés dans les échantillons de milieu de culture f/2 contaminé avec les extraits de POCIS. ....339

Tableau 19 : Résumé des analyses chimiques réalisées par le LPTC-EPOC. Nombre de pesticides quantifiés par usage et concentrations moyennes, maximales et totales pour les quatre périodes et les trois stations suivies. ....344

Tableau 20 : Récapitulatif des  $CE_{50}$  (en  $\mu g L^{-1}$ ,  $\pm IC_{95}$ ) pour chacun des 21 pesticides testés sur les microalgues *T. lutea*, *S. marinoi* et *T. suecica*, issues des différentes expérimentations menées durant ces travaux de thèse. ....355

Tableau 21 : Résumé des effets d'interaction, déterminés par rapport au modèle CA, et des  $\Sigma TU$  calculées pour le ratio de mélange 50:50%, induits par les mélanges binaires testés en microplaques pour les microalgues *T. lutea*, *S. marinoi* et *T. suecica*. ....368



# Liste des abréviations

---

<b>ADN</b>	acide désoxyribonucléique
<b>ADP</b>	adénosine diphosphate
<b>AFB</b>	agence française pour la biodiversité
<b>AFNOR</b>	association française de normalisation
<b>AMPA</b>	acide aminométhylphosphonique
<b>ANOVA</b>	<i>analysis of variance</i> , analyse de variance
<b>ARN</b>	acide ribonucléique
<b>ATP</b>	adénosine triphosphate
<b>CA</b>	<i>concentration addition</i>
<b>CAT</b>	catalase
<b>CE<sub>x</sub>/CL<sub>x</sub></b>	concentration effective/léthale induisant X% d'effet/de mortalité
<b>CG-SM/SM</b>	chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse tandem
<b>CL-SM/SM</b>	chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse tandem
<b>CuPT</b>	cuivre pyrithione
<b>DCE</b>	Directive-Cadre sur l'Eau
<b>DCOIT</b>	4,5-dichloro-2-octyl-2H-isothiazol-3-one
<b>DCSMM</b>	Directive-Cadre Stratégie Milieu Marin
<b>DDT</b>	dichlorodiphényltrichloroéthane
<b>DEPHY</b>	démonstration, expérimentation et production de références sur des systèmes de culture économes en produits phytosanitaires
<b>DGT</b>	<i>diffusive gradient in thin-film</i>
<b>DIA</b>	déisopropyl-atrazine
<b>DL<sub>x</sub></b>	dose léthale induisant X% de mortalité
<b>DMSO</b>	diméthylsulfoxyde
<b>DO</b>	densité optique
<b>DR/DL</b>	<i>dose-ratio/ dose-level</i>
<b>ECHA</b>	<i>European Chemicals Agency</i>
<b>EDA</b>	<i>effect-directed analysis</i>
<b>EDTA</b>	acide éthylènediaminetétraacétique
<b>ERO</b>	espèces réactives de l'oxygène
<b>FD<sub>50</sub></b>	facteur de dilution induisant 50% d'inhibition
<b>FSC</b>	<i>forward scatter</i>

<b>GR</b>	glutathione réductase
<b>GST</b>	glutathione-S-transférase
<b>GT</b>	groupe de tâche
<b>HAP</b>	hydrocarbures aromatiques polycycliques
<b>HPDE</b>	<i>high-density polyethylene</i>
<b>IA</b>	<i>independent action</i>
<b>IFT</b>	indice de fréquence de traitement
<b><math>K_{ow}</math></b>	coefficient de partage octanol/eau
<b>LL.3</b>	modèle log-logistique à trois-paramètres
<b>LOEC</b>	<i>lowest observed effect concentration</i>
<b>LPDE</b>	<i>low-density polyethylene</i>
<b>MCPA</b>	acide 2-méthyl-4-chlorophénoxyacétique
<b>MESCO</b>	<i>membrane-enclosed silicone collector</i>
<b>MOD</b>	matière organique dissoute
<b>NADP</b>	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
<b>NOEC/CSEO</b>	<i>no-observed effect concentration</i> / concentration sans effet observe
<b>NPQ</b>	<i>non-photochemical quenching</i>
<b>NQE</b>	norme de qualité environnementale
<b>OCDE</b>	Organisation de coopération et de développement économiques
<b>OIS/ISO</b>	Organisation internationale de normalisation
<b>OMI</b>	Organisation maritime internationale
<b>ONEMA</b>	Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques
<b>OTU</b>	<i>operational taxonomic unit</i>
<b>PAM</b>	<i>pulse-amplitude modulated</i>
<b>PAMM</b>	plan d'action pour le milieu marin
<b>PDMS</b>	polydiméthylsiloxane
<b>PEC</b>	<i>predicted environmental concentration</i>
<b>PEDB</b>	<i>pesticide ecotoxicity database</i>
<b>PES</b>	polyéthersulfone
<b>PICT</b>	<i>pollution-induced community tolerance</i>
<b>PNEC</b>	<i>predicted no-effect concentration</i>
<b>POCIS</b>	<i>polar organic chemical integrative sampler</i>
<b>POS</b>	<i>polar organic sampler</i>
<b>PPDB</b>	<i>pesticide properties database</i>

<b>PQ/PQH2</b>	plastoquinone
<b>PRC</b>	<i>performance reference compounds</i>
<b>PSI</b>	photosystème I
<b>PSII</b>	photosystème II
<b>QR/RQ</b>	quotient de risque/ <i>risk quotients</i>
<b>REACH</b>	<i>Registration, Evaluation, Authorisation and restriction of Chemicals</i>
<b>ROCCH</b>	réseau d'observation de la contamination chimique du littoral
<b>S/A</b>	<i>synergism/antagonism</i>
<b>SAU</b>	surface agricole utile
<b>SDAGE</b>	schéma directeur d'aménagement et de gestion des eaux
<b>SDB-RPS</b>	styrène-divinylbenzène- <i>reverse phase sorbent</i>
<b>SOD</b>	superoxyde dismutase
<b>SOeS</b>	Service de l'observation et des statistiques
<b>SPE</b>	<i>solid-phase extraction</i>
<b>SPMD</b>	<i>semipermeable membrane device</i>
<b>SR</b>	<i>silicon rubber</i>
<b>SSC</b>	<i>side scatter</i>
<b>STEP</b>	station d'épuration
<b>TBT</b>	tributylétain
<b>TEQ/DEQ</b>	<i>toxic equivalent concentration/ diuron equivalent concentration</i>
<b>TWA</b>	<i>time-weighted average (concentration)</i>
<b>TU/ΣTU</b>	<i>toxic units/ sum of toxic units</i>
<b>UE</b>	Union Européenne
<b>UV</b>	ultra-violet
<b>VLCFA</b>	<i>very long chain fatty acid</i>
<b>YES</b>	<i>yeast estrogen screen</i>
<b>ZEE</b>	zone économique exclusive
<b>ZnPT</b>	zinc pyrithione



# Contexte et objectifs de la thèse

---

Les pesticides (biocides et produits phytosanitaires) sont des substances chimiques notamment utilisées pour le contrôle des nuisibles, *i.e.* des organismes qui entraînent une nuisance pour la santé publique et/ou certaines activités humaines, comme par exemple la viticulture ou le transport maritime. Une proportion plus ou moins importante de ces substances est inévitablement perdue pendant ou après leur application, entraînant la contamination des milieux aquatiques situés à proximité des zones d'application. Ainsi, partout à travers le monde, des pesticides ont été retrouvés, depuis les cours d'eau proches des parcelles agricoles, jusque dans les estuaires et les eaux côtières. Malgré la mise en place d'une réglementation européenne et française concernant l'usage de ces substances, la contamination chimique des milieux aquatiques par les pesticides constitue aujourd'hui encore une problématique majeure.

Tous les milieux aquatiques sont peuplés d'une multitude d'organismes organisés en réseaux trophiques plus ou moins complexes, dont le bon fonctionnement assure la pérennité de ces écosystèmes. À la base des écosystèmes aquatiques marins, le phytoplancton joue un rôle essentiel en tant que producteur primaire : il est responsable de près de la moitié de la fixation de dioxyde de carbone et de la production d'oxygène sur Terre, grâce au processus de photosynthèse. En milieu côtier, ces microorganismes constituent la source de nourriture principale des larves et juvéniles de nombreuses espèces animales permettant ainsi le développement de réseaux trophiques riches et complexes. Parmi ces organismes, qualifiés de consommateurs primaires, on retrouve notamment les larves de l'huître creuse, dont l'espèce *Crassostrea gigas* constitue une précieuse ressource, tant au niveau économique qu'écologique.

Bien que la majorité des pesticides possèdent un mode d'action toxique qui est spécifique des organismes ciblés, les effets délétères de ces substances ont pu être mis en évidence pour d'autres organismes, appelés alors organismes non-cibles. Parmi ceux-ci, le phytoplancton possède de nombreuses similitudes physiologiques avec les végétaux supérieurs. De fait, les herbicides, qui ciblent généralement les plantes adventices des cultures, sont potentiellement très toxiques pour ces microorganismes photosynthétiques. Par ailleurs, les premiers stades larvaires de nombreux organismes aquatiques, dont l'huître creuse, sont également particulièrement sensibles aux contaminants chimiques, parmi lesquels les pesticides : par exemple, la plupart des insecticides ciblent le système nerveux aussi présent chez ce mollusque bivalve.

Par conséquent, la contamination chimique des milieux aquatiques pourrait contribuer à des perturbations majeures dans le fonctionnement et la résilience de ces écosystèmes. Partant de ce constat, de nombreux tests ont été développés afin de pouvoir évaluer la toxicité de diverses

substances pour les organismes pouvant y être exposés dans leur milieu naturel. Néanmoins, du fait du nombre grandissant de substances chimiques susceptibles de contaminer les milieux aquatiques, et pour répondre à la réglementation relative à leur utilisation, ces tests ont été standardisés et certains miniaturisés pour permettre un criblage haut-débit de la toxicité des substances. Ainsi, la toxicité d'une multitude de pesticides a pu être évaluée, via la détermination de valeurs standards, comme les  $CE_{50}$  (*i.e.*, la concentration effective induisant un effet de 50% sur le paramètre suivi, par rapport aux témoins). Ces valeurs ont en outre permis de classer les substances chimiques selon leur toxicité, dans le but de déterminer les substances les plus toxiques, ainsi que les organismes les plus sensibles.

Néanmoins, les organismes aquatiques étant exposés, dans leur milieu naturel, à une multitude de contaminants, un autre problème peut être soulevé : « l'effet cocktail ». Celui-ci se définit par la toxicité potentiellement supérieure d'un mélange de substances chimiques par rapport à la toxicité des substances seules. Pour répondre à cette problématique, des approches issues des domaines pharmaceutique, médical ou enzymologique ont été appliquées à l'écotoxicologie : le but était, dans un premier temps, d'évaluer les effets d'interaction résultant d'un mélange binaire de substances chimiques. Appliquées avec succès, ces approches ont permis de mettre en évidence l'interaction synergique de certaines substances, démontrant la nécessité absolue d'inclure l'étude des mélanges dans la réglementation actuelle. Ainsi, plusieurs modèles permettant de prédire la toxicité de mélanges ont été validés, que ce soit pour des substances possédant des modes d'action toxiques similaires ou différents. Les outils dont nous disposons aujourd'hui nous permettent donc d'étudier la toxicité potentielle des pesticides pour les organismes non-cibles, comme les microalgues marines et les larves d'huître, au travers d'approches au laboratoire combinant bioessais et modélisation des effets d'interaction de mélanges de substances. Pour autant, ces tests constituent encore aujourd'hui une « simplification » de la réalité.

Dans le but d'accroître le réalisme environnemental des conditions d'exposition à la contamination chimique des études écotoxicologiques menées en laboratoire, une nouvelle approche a récemment été développée : elle consiste à reproduire, de manière relativement fidèle, la contamination d'un milieu naturel afin de pouvoir tester son potentiel toxique. Cette approche fait appel à des outils, appelés échantillonneurs passifs, accumulant les substances chimiques présentes dans un milieu aquatique. Une fois la période d'échantillonnage terminée, ces dispositifs sont extraits en laboratoire et les extraits peuvent ensuite être testés pour leur toxicité, sur différents organismes, via l'utilisation des bioessais précédemment décrits.

Dans le cadre de ces travaux de thèse, cette approche permet ainsi d'évaluer la toxicité de mélanges complexes de contaminants, représentatifs de la contamination d'un cours d'eau exposé à une source

de pollution d'origine viticole, et donc de se placer au plus près de ce qui se passe réellement dans le milieu naturel.

Dans ce contexte, ces travaux de thèse visaient à étudier la toxicité de substances, utilisées comme biocides dans les peintures anti-salissures (*antifouling*) appliquées sur les coques de bateaux ou en tant que produits phytosanitaires en viticulture, pour des microalgues marines et la larve d'huître. Pour ce faire, cinq objectifs ont été fixés :

1. Étudier la toxicité de deux biocides *antifouling*, seuls et dans deux mélanges binaires, sur la croissance et la physiologie de deux espèces de microalgues marines, dont une souche sélectionnée pour sa résistance au diuron.
2. Déterminer la toxicité et les effets d'interaction résultant des mélanges binaires de cinq biocides *antifouling* sur la croissance de trois espèces de microalgues marines, par des approches de modélisation.
3. Réaliser le criblage de toxicité de 17 pesticides (dont quatorze produits phytosanitaires utilisés en viticulture et trois biocides) et un métabolite, sur : i) la croissance de deux espèces de microalgues marines et ii) le développement embryon-larvaire de la larve de l'huître creuse.
4. Approfondir l'étude des substances ayant induit une toxicité significative, en évaluant leurs effets sur la physiologie des deux microalgues marines exposées aux substances seules et en mélanges binaires.
5. Évaluer le potentiel toxique d'extraits d'échantillonneurs passifs issus d'un cours d'eau soumis à une source de pollution viticole, sur la croissance des deux espèces de microalgues marines.

Pour répondre à ces objectifs, ce manuscrit de thèse se présente sous la forme de six chapitres :

Le premier chapitre introduit de manière détaillée les différents éléments étudiés dans ce manuscrit, à savoir : les pesticides, les microalgues marines et les larves d'huître, les méthodes de mesure de la contamination chimique et de la toxicité associée, ainsi que les concepts relatifs à l'évaluation de la toxicité des mélanges de substances chimiques.

Le deuxième chapitre décrit les matériels et méthodes utilisées dans ce manuscrit, dont la description du site d'étude expérimental du projet PhytoCOTE, du matériel biologique et chimique, du principe des différentes expérimentations réalisées et des analyses biologiques et chimiques.

Les résultats sont ensuite présentés et discutés dans les chapitres 3, 4 et 5 et visent à répondre aux cinq objectifs principaux présentés ci-dessus.

Le troisième chapitre a été consacré à l'étude des effets toxiques de biocides *antifouling*, seuls et en mélanges, sur des microalgues marines : l'haptophyte *Tisochrysis lutea*, les diatomées *Chaetoceros calcitrans* et *Skeletonema marinoi* ainsi que la chlorophyte *Tetraselmis suecica*.

Pour répondre au premier objectif, l'article 1 visait à évaluer les effets du diuron et de l'irgarol, et notamment du mélange de ces deux substances, sur la croissance et la physiologie de *C. calcitrans* et *T. suecica*, dont une souche de *T. suecica* résistante au diuron. L'un des objectifs était d'identifier la cause de la résistance au diuron chez cette souche, et d'évaluer si cette résistance s'appliquait également à une autre substance possédant un mode d'action similaire au diuron, l'irgarol. Un deuxième objectif était d'observer la réponse induite par deux combinaisons du mélange diuron et irgarol sur la croissance et la physiologie des deux espèces, incluant la souche résistante au diuron.

Dans l'article 1, des réponses inattendues ont été obtenues suite à l'exposition des deux microalgues marines aux deux combinaisons testées. Cela nous a conduit à approfondir notre démarche afin d'utiliser la méthodologie appropriée pour l'évaluation de la toxicité et des effets d'interaction résultant d'un mélange binaire. Ces travaux sont présentés dans l'article 2 : la méthodologie d'étude des mélanges binaires, faisant appel à différents modèles de prédiction, a ainsi été appliquée au mélange diuron et irgarol, mais également à d'autres biocides utilisés dans les peintures anti-salissures et suspectés d'interagir de manière synergique en mélange binaire. Ainsi, pour chaque mélange testé, la surface de réponse complète résultant de l'interaction des deux substances a été déterminée pour la croissance des microalgues *T. lutea*, *S. marinoi* et *T. suecica*, répondant donc au deuxième objectif.

Le quatrième chapitre de ce manuscrit avait pour but de réaliser le criblage de toxicité de 18 substances chimiques sur les microalgues marines *T. lutea* et *S. marinoi*, ainsi que la larve de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Il s'agissait également d'approfondir l'étude des substances les plus toxiques, en explorant leurs effets, seuls et en mélanges binaires, sur la croissance et la physiologie des deux microalgues marines.

Pour répondre au troisième objectif de cette thèse, 17 pesticides et un métabolite ont été préalablement sélectionnés d'après leur fréquence/quantité d'utilisation obtenues auprès des usagers du site d'étude (source : F. Macary, coordinateur du projet PhytoCOTE). Un bioessai en microplaque a ensuite été adapté pour permettre le criblage de leur toxicité sur la croissance des microalgues marines *T. lutea* et *S. marinoi*, dans le but d'identifier les substances les plus toxiques. Deux questions principales se posaient lors de la miniaturisation du test de toxicité dans un système en microplaque : est-ce que la stabilité chimique des substances testées est suffisante pour la durée du test de toxicité ? Est-ce que la mesure de la toxicité dans le système développé est cohérente avec celle obtenue dans le système classique en ballons de culture ? Ces questions, ainsi que les moyens mis en œuvre pour y répondre, sont détaillés dans l'article 3 de ce quatrième chapitre.

Dans l'optique d'approfondir les résultats obtenus dans l'article 3, les effets sur la physiologie des deux espèces de microalgues ont été évalués pour les sept substances les plus toxiques et sont présentés dans l'article 4. Pour répondre au quatrième objectif général de la thèse, les objectifs de l'article 4 consistaient à : i) déterminer les effets d'interaction de plusieurs mélanges binaires constitués de substances ayant des modes d'action différents, afin de mettre en évidence de potentielles interactions synergiques ; ii) explorer les effets induits sur la physiologie des microalgues afin d'améliorer notre compréhension du mode d'action toxique des substances seules et des effets combinés résultant des mélanges testés. Pour y répondre, le bioessai en microplaque a tout d'abord été utilisé afin de déterminer les effets d'interactions de huit mélanges binaires, puis, des expérimentations en ballons ont été menées sur trois de ces mélanges dans le but d'explorer leurs effets sur la physiologie des deux espèces de microalgues.

Enfin, la dernière partie de ce chapitre présente les résultats du criblage de toxicité, réalisé cette fois-ci sur des larves de l'huître creuse *Crassostrea gigas* au moyen du test embryo-larvaire. De manière analogue, il s'agissait ici aussi de déterminer les substances les plus toxiques pour le développement embryo-larvaire de l'huître creuse parmi les 18 sélectionnées, afin de répondre au troisième objectif de cette thèse.

Dans le but de répondre au cinquième et dernier objectif de cette thèse, le cinquième chapitre a été consacré à l'étude du potentiel toxique d'extraits d'échantillonneurs passifs issus de cours d'eau soumis à une source de pollution viticole, pour les microalgues marines *T. lutea* et *S. marinoi*.

Les travaux présentés dans ce chapitre sont axés autour de deux objectifs : i) valider l'utilisation du bioessai en microplaque pour évaluer le potentiel toxique des extraits d'échantillonneurs passifs sur *T. lutea* et *S. marinoi* ; ii) expliquer et interpréter la toxicité induite par les extraits d'échantillonneurs passifs pour les deux espèces de microalgues. Pour répondre à ces objectifs, les extraits d'échantillonneurs passifs ont été obtenus à partir de deux cours d'eau situés dans le bassin versant de Marcillac (Gironde, France), site d'étude choisi pour le projet PhytoCOTE. Trois stations ont ainsi été échantillonnées sur quatre périodes d'un mois, permettant de tester douze extraits sur les deux espèces de microalgues. Pour ce faire, un protocole spécifique a été développé, incluant des témoins négatifs et positifs de toxicité. Afin d'aller plus loin dans l'interprétation de la toxicité observée, les résultats obtenus sur la toxicité des substances testées dans le chapitre 4, dont la plupart ont pu être identifiées dans les extraits par les partenaires du projet PhytoCOTE, avec des modèles de prédictions d'effets de mélanges.

Enfin, le manuscrit se termine par un dernier chapitre consacré à une synthèse générale des travaux réalisés, présentant les résultats majeurs obtenus dans cette thèse ainsi que les perspectives qui en découlent.

## Chapitre 1 – Introduction

---



Le premier chapitre de ce manuscrit de thèse introduit les différents éléments et concepts abordés dans ces travaux.

La première partie s'intéresse aux pesticides. Après un bref historique concernant l'apparition et l'utilisation de ces substances, leur usage en viticulture et pour la protection des coques de bateaux est décrit. Les différents processus conduisant au transfert de ces substances dans les milieux aquatiques, ainsi que la réglementation associée à leur commercialisation et usage sont ensuite détaillés. Finalement, un état des lieux de la contamination chimique par les pesticides des masses d'eau douces et marines est dressé et les techniques utilisées pour leur mesure dans l'environnement sont décrites.

La deuxième partie s'intéresse aux microalgues marines, représentant l'un des deux types d'organisme étudié dans ces travaux. Chacune des trois classes auxquelles appartiennent les quatre espèces étudiées sont présentées. Le processus de photosynthèse, vital à la survie de ces organismes, est également détaillé.

La troisième partie présente l'huître creuse *Crassostrea gigas*, dont les premiers stades de développement larvaires ont été utilisés dans cette thèse. La biologie et le cycle de reproduction de cette espèce y sont décrits.

La quatrième partie aborde la toxicité des pesticides pour les organismes étudiés, ainsi que les méthodes permettant de la mesurer. Les tests de toxicité classiquement réalisés et l'intérêt de les miniaturiser, ainsi que les valeurs obtenues via ces tests, sont décrits. Cette partie se termine par la présentation de la toxicité des pesticides sélectionnés dans ces travaux pour les organismes étudiés.

Enfin, la cinquième et dernière partie se consacre à la présentation des concepts relatifs à l'étude des mélanges de pesticides. L'intérêt représenté par l'étude des mélanges binaires et complexes (plus de deux substances), ainsi que les principaux modèles et approches expérimentales utilisés y sont détaillés. Deux exemples d'étude de la toxicité de mélanges complexes sont finalement décrits pour clore cette partie.

## 1. Les pesticides

Les pesticides regroupent toutes les substances pouvant être utilisées pour lutter contre les différents organismes nuisibles aux cultures. Ce terme regroupe les biocides, utilisés plus généralement comme produits d'hygiène générale (par exemple, algicides, bactéricides, rodenticides, *etc.*) et les produits phytosanitaires (ou produits phytopharmaceutiques), plus spécifiquement utilisés pour l'élimination et/ou la prévention des maladies associées aux organismes végétaux. Les produits phytosanitaires sont également classés selon en fonction de leur utilisation (herbicides, insecticides, fongicides, nématicides, molluscicides, taupicides, *etc.*). Les produits phytosanitaires les plus utilisés appartiennent aux groupes des :

- herbicides, utilisés pour le contrôle des plantes indésirables pour les cultures (également appelées « mauvaises herbes » ou adventices) ;
- insecticides, ciblant spécifiquement les insectes potentiellement nuisibles pour les cultures comme par exemple, la tordeuse de la grappe ou la cicadelle de la flavescence dorée ;
- fongicides, utilisés pour la destruction et la prévention des maladies liées aux champignons telles que l'oïdium, le mildiou ou le botrytis.

Notons qu'il est également possible de classer les pesticides selon la famille chimique (en relation avec leur structure chimique) à laquelle ils appartiennent, par exemple : triazines, phénylurées, strobilurines, carbamates, organophosphorés, *etc.*

### 1.1. Historique

La première utilisation documentée de pesticides remonte à l'antiquité, avec l'utilisation de plantes toxiques comme moyen de protection des cultures (Rao *et al.*, 2007). Plus tard, plusieurs auteurs grecs et romains mentionnent l'utilisation du soufre et de l'arsenic pour lutter contre la pourriture des cultures (rouille et mildiou, entre autres) et certains insectes nuisibles (Smith et Secoy, 1976 ; Calvet, 2005). En 1761, l'utilisation du sulfate de cuivre, aussi connu sous le nom de bouillie bordelaise et toujours largement utilisé de nos jours, est mentionnée pour le traitement des semences contre le charbon du blé (Smith et Secoy, 1976). Avec la découverte, en 1939, des propriétés insecticides du 4,4'-DDT (DDT, dichlorodiphényltrichloroéthane) par Paul Hermann Müller, les pesticides synthétiques, notamment les organochlorés et les organophosphorés, ont connu une utilisation exponentielle durant la seconde guerre mondiale du fait de leur large spectre d'action. La réduction considérable des coûts de production et l'augmentation significative des rendements (Boland *et al.*, 2004) associées, entre autres, à l'utilisation de ces substances donna à cette période d'après-guerre le nom de « Révolution Verte ». Au milieu des années 1960, la publication par Rachel Carlson du livre « Le printemps silencieux », dénonçant pour la première fois les effets potentiellement nocifs

des pesticides modernes sur la santé humaine et l'environnement, incita l'industrie phytopharmaceutique à se concentrer davantage sur le développement de substances plus ciblées et donc utilisables en moins grande quantité. En 1974 fut introduit le très célèbre et controversé herbicide glyphosate (vendu sous la marque Roundup® par Monsanto), suivi dans les années 1980-1990 par l'arrivée de nouvelles familles chimiques de molécules possédant des modes d'action plus spécifiques, réduisant ainsi partiellement les impacts des pesticides sur la santé humaine et l'environnement. À l'heure actuelle, pas moins de 1233 substances actives sont autorisées, ou en cours d'approbation, en Europe (European Chemicals Agency, 2018 ; European Commission, 2018), dont 741 pour les biocides et 492 pour les produits phytosanitaires.

## 1.2. Utilisation associée à la viticulture

La France occupe la seconde place, derrière l'Espagne et devant l'Italie, concernant la quantité totale de pesticides vendus en 2016 en Europe, avec un peu plus de 72 000 tonnes. Toutefois, une fois rapportée à la surface agricole utile (SAU) totale, la France se retrouve à la 9<sup>ème</sup> position du classement Européen avec 2,5 kg/ha, l'Espagne et l'Italie occupant respectivement la cinquième et la sixième position (Eurostat, 2018).

Occupant seulement 3% de la SAU Française, la viticulture regroupe à elle seule pas moins de 20% des usages de produits phytosanitaires (Aubertot *et al.*, 2005 ; Butault *et al.*, 2011), induisant ainsi une pression potentielle non-négligeable pour les écosystèmes à proximité des exploitations viticoles. En effet, l'indice de fréquence de traitement (IFT : nombre de doses homologuées/ha/an) moyen pour la viticulture était de 19,0 en 2013 (pour l'ensemble des bassins viticoles et des traitements ; Ambiaud, 2015), contre 18,1 pour la pomme de terre en 2014 (IFT le plus élevé parmi les grandes cultures ; Soleilhavoup, 2016) et 34,1 pour la pomme en 2011 (IFT le plus élevé parmi l'arboriculture ; Pujol, 2014).

Parmi les trois classes majeures de produits phytosanitaires, ce sont les fongicides qui sont les plus utilisés en viticulture, avec un IFT moyen de 15,1 (regroupant fongicides et bactéricides avec action anti-mildiou/oïdium), contre 1,8 pour les insecticides/acaricides et 2,2 pour les herbicides. En effet, les herbicides, dont l'usage cible, entre autres, les adventices pouvant compromettre la qualité de la vigne (Wisler et Norris, 2005), ont vu leur utilisation diminuer de manière significative ces dernières années, avec 19% des surfaces viticoles n'ayant fait l'objet d'aucun désherbage chimique en 2010, contre 10% en 2006 (Ambiaud, 2012). En cause, une application bien moins fréquente et plus localisée des herbicides et une priorisation donnée au couvert végétal et/ou paillage (Steinmaus *et al.*, 2008 ; Gómez *et al.*, 2011). Concernant les insecticides, l'utilisation de la technique de confusion sexuelle, introduite dans le milieu des années 1970 pour le contrôle des insectes nuisibles à la vigne

(cochylis et eudémis de la vigne notamment, aussi appelés « ver de la grappe » ou « tordeuse ») s'est avérée être une alternative viable (Kovanci *et al.*, 2005 ; Vassiliou, 2009), permettant ainsi une réduction de leur utilisation. Il est en revanche plus compliqué de limiter l'usage des fongicides, dont les principales cibles sont l'oïdium, le mildiou et le botrytis, du fait de l'impact dévastateur que peuvent avoir ces maladies sur les récoltes et la qualité du vin (Calonnec *et al.*, 2004 ; Stummer *et al.*, 2005 ; Wightwick *et al.*, 2010), encourageant ainsi le traitement à titre préventif. Récemment, plusieurs études ont mis en évidence les impacts potentiels des fongicides de synthèse et du cuivre (autorisé en agriculture biologique) sur la santé humaine et l'environnement (Milenkovski *et al.*, 2010 ; Pearson *et al.*, 2016). En conséquence, des pistes alternatives, comme les agents de biocontrôle et autres stimulateurs des mécanismes de défense des plantes (éliciteurs) sont à l'étude (Dagostin *et al.*, 2011 ; Delaunois *et al.*, 2014).

D'une manière générale, la prise de conscience vis-à-vis de la potentielle toxicité des produits phytosanitaires pour la santé humaine et l'environnement, couplée aux différents dispositifs européens et nationaux (REACH, Ecophyto II, section 1.5 de ce chapitre) visant à réduire l'utilisation de telles substances ont permis le développement de l'agriculture dite « raisonnée » mais aussi de l'agriculture biologique. Le nombre d'exploitations « BIO » a augmenté de 20% entre 2010 et 2013 (Massis et Hild, 2016) et particulièrement en viticulture, avec 9% de parcelles conduites en agriculture biologique en 2016 (par rapport à la SAU totale ; Agence Française pour le Développement et la Promotion de l'Agriculture Biologique, 2016).

Cette section s'intéressait notamment à l'usage des pesticides organiques en viticulture, et concernait donc davantage les produits phytosanitaires. Comme mentionné dans l'introduction de la partie 1, le terme « pesticides » comprend aussi les biocides. Dans la partie suivante, nous nous intéresserons donc à l'utilisation des biocides, et notamment ceux inclus dans la composition des peintures anti-salissures appliquées sur la coque des bateaux.

### 1.3. Utilisation dans les peintures anti-salissures

Selon l'OMI (Organisation Maritime Internationale), les peintures anti-salissures (*antifouling* en anglais) sont utilisées pour enduire la coque des bateaux afin d'empêcher divers organismes aquatiques, tels que les algues et les mollusques, de s'y attacher (OMI, 2018). En effet, l'encrassement biologique (*biofouling* en anglais) est responsable d'une résistance supérieure, entraînant une consommation excessive de carburant (jusqu'à 40% supérieure) et une diminution importante de la vitesse de croisière (Abbott *et al.*, 2000 ; Champ, 2000 ; Schultz, 2007). L'utilisation de ces peintures

permet également de limiter le transport d'espèces invasives et de protéger la coque de la corrosion (Tezdogan et Demirel, 2013).

Historiquement, ces peintures étaient composées d'une matrice soluble ou insoluble associée à divers oxydes métalliques connus pour leur toxicité, comme le cuivre, le zinc, l'arsenic ou le mercure, alors utilisés comme pigments et biocides. Dans les années 1970, la plupart des peintures anti-salissures se composaient d'un revêtement auto-polissant contenant un organoétain, le TBT (tributylétain). D'une efficacité redoutable contre l'encrassement biologique, celui-ci s'est également avéré extrêmement toxique pour l'environnement marin (Oehlmann *et al.*, 1996 ; Alzieu, 2000 ; Quiniou et Compère, 2009). En conséquence, la France fût le premier pays à interdire son utilisation pour les bateaux de moins de 25 m en 1982, tandis que la production de peintures anti-salissures contenant du TBT (et autres organoétains) a été mondialement interdite par l'OMI en 2003. D'autres substances ont donc été choisies pour être utilisées comme biocides « *booster* » dans les peintures sans TBT à base de cuivre. Ces substances renforcent l'effet biocide du cuivre. Parmi ces substances, on retrouve le diuron (également utilisé en tant qu'herbicide jusqu'en 2008), l'irgarol, le chlorothalonil, le dichlofluanide, le cuivre pyrithione, le zinc pyrithione, le SeaNine™ 211 (substance active : DCOIT) et le Zineb. Cependant, certaines de ces substances, notamment le diuron et l'irgarol, se sont également avérées très toxiques pour le milieu marin (Fernandez-Alba *et al.*, 2002 ; Arrhenius *et al.*, 2006 ; Koutsaftis et Aoyama, 2006), et ont également été interdites dans la composition des peintures antifouling (règlements (EU) No 528/2012 et No 2016/107, respectivement).

De ce fait, des alternatives ayant un impact limité sur l'environnement marin, sont aujourd'hui à l'étude : utilisation de biocides naturels empêchant l'adhésion des organismes ; développement de surfaces antiadhésives en silicone ; utilisation de robots ou autres équipements contrôlés à distance pour le nettoyage de la coque (Almeida *et al.*, 2007).

Malgré une utilisation de plus en plus encadrée et une volonté claire de réduire leur usage, des pesticides sont encore fréquemment détectés dans les masses d'eau douces et marines en Europe du fait des multiples sources de contamination existantes et de la persistance de certaines substances.

## 1.4. Transfert des pesticides vers les écosystèmes aquatiques

### 1.4.1. Transfert des pesticides vers les eaux de surface

La contamination des écosystèmes aquatiques par des pesticides peut être issue d'une source ponctuelle, localisée en un point unique et identifié, induisant une contamination directe et importante sur le court terme. Elle peut par exemple résulter d'une mauvaise gestion des fonds de cuve ayant contenu des pesticides (dilution insuffisante, déversement à proximité d'un cours d'eau).

Cependant, les efforts déployés par les récentes réglementations quant à une utilisation durable des pesticides tendent à faire disparaître ce type de pollution.

Ainsi, la source principale de contamination rencontrée de nos jours est la source diffuse. Elle induit une contamination indirecte des eaux superficielles et souterraines par perte et transfert des produits phytosanitaires appliqués lors d'un traitement. Du fait de la fréquence importante des traitements, et de l'étendue des surfaces concernées, cette pollution représente un risque non-négligeable pour l'environnement. En effet, les multiples processus à l'origine de cette pollution la rendent difficilement maîtrisable (Figure 1).

À l'échelle de la parcelle (< 1 km), le premier processus influant sur le devenir d'une substance est la dispersion, entraînant le transport de la substance du point d'application aux écosystèmes adjacents (air, eau et sol ; Aubertot *et al.*, 2005). Durant l'application d'une substance, par exemple par pulvérisation (95% des techniques d'épandage), le premier risque de perte est lié à la dérive (*spray-drift* en anglais) avec une dispersion associée estimée entre 20 et 50% de la dose appliquée (Wauchope *et al.*, 2003 ; Ravier *et al.*, 2005). Cette dispersion peut toutefois être significativement réduite par l'utilisation de buses anti-dérive. La quantité perdue par dérive dépend entre autres : de la formulation du produit (présence ou non d'adjuvants) ; des conditions météorologiques (un vent fort et une température élevée peuvent accroître la dérive des substances volatiles) ; de la taille des gouttelettes (plus elles sont petites et plus elles peuvent voyager sur de longues distances) et des buses de pulvérisation (avec ou sans récupérateur, par exemple) (Hilz et Vermeer, 2013).

Après l'application, d'autres processus, comme la volatilisation, peuvent entraîner une contamination du compartiment aérien. La dispersion de la phase gazeuse, dont les concentrations après application peuvent être élevées, est responsable de dépôts secs significatifs dans la zone traitée. L'érosion éolienne contribue à la dispersion des particules du sol ou de la surface foliaire traitée, son intensité restant encore mal connue.

Différents processus mis en mouvement par l'action de l'eau vont ensuite disperser les substances présentes sur les feuilles puis sur le sol. Depuis les feuilles, le lessivage foliaire (dépendant néanmoins de l'intensité et de la durée de la pluie) peut engendrer des pertes de 70-80% pour les pesticides les plus polaires et de 5-10% pour les plus lipophiles (Leonard, 1990). Au sol, le ruissellement de surface, qui se produit lorsque l'intensité de la pluie est supérieure à la capacité d'infiltration du sol, ou lorsque celui-ci est saturé, représente le principal facteur de contamination, avec des concentrations pouvant atteindre l'ordre du mg L<sup>-1</sup> (Lennartz *et al.*, 1997). Pour ce qui concerne le lessivage des sols, une partie des pesticides présents à la surface des sols va être retenue et/ou dégradée en fonction des propriétés physico-chimiques de la substance en question, mais aussi de facteurs abiotiques (température,

humidité) et biotiques (microflore). Sous l'action de l'eau, une faible quantité de substances pourra toutefois contaminer les écosystèmes adjacents par drainage et/ou percolation.

À l'échelle du bassin versant, l'action des différents processus décrits ci-dessus va être modifiée en fonction des caractéristiques des compartiments traversés et de l'hydrosystème en général. Des échanges entre les processus de ruissellement et de percolation peuvent par exemple avoir lieu, influant sur les eaux de surface et les eaux souterraines, respectivement. Des conditions météorologiques exceptionnelles comme les crues et/ou de très fortes précipitations, vont également avoir une influence capitale sur les quantités de pesticides perdues pendant et après l'application (Louchart *et al.*, 2004 ; Zonta *et al.*, 2005 ; Saison *et al.*, 2008 ; Topaz *et al.*, 2018). La topographie/morphologie des parcelles va également jouer un rôle pour limiter le transfert des substances vers les écosystèmes proches via la présence de zones tampons (bandes enherbées, prairies, zones humides *etc.* ; Lacas *et al.*, 2005 ; Carluer *et al.*, 2011). En ralentissant les flux d'écoulement, celles-ci vont permettre d'augmenter la rétention des pesticides dans ces environnements riches en matière organique et activité biologique, favorisant l'adsorption et/ou la dégradation de ces substances. Enfin, le respect des bonnes pratiques d'utilisation des pesticides compte également parmi les principaux leviers pour minimiser les sources de pollution diffuse.

Dans le cas plus spécifique des biocides utilisés dans les peintures anti-salissures, le transfert de ces substances vers les eaux de surface va avoir lieu directement depuis la surface où a été appliquée la peinture. Il peut se faire aussi bien directement depuis la coque du bateau (Readman *et al.*, 1993 ; Takahashi, 2009) que depuis les particules de peintures arrachées à la coque (Turner *et al.*, 2008 ; Turner, 2010 ; Hasan *et al.*, 2014) (Figure 1). Le relargage des biocides dans l'environnement marin est étroitement lié à la formulation de la peinture et notamment aux caractéristiques physico-chimiques du liant utilisé, mais il dépend aussi du biocide lui-même (Thouvenin *et al.*, 2002). Certaines activités, comme le nettoyage des coques avec des jets d'eau haute pression, ou le décapage des coques avant l'application d'une nouvelle peinture, vont générer de nombreuses particules de peintures. Ces particules sont responsables de près de 75% des biocides retrouvés dans les eaux de lavage et persistent par la suite dans le sédiment, représentant de ce fait une potentielle source de pollution sur le long terme (Tolhurst *et al.*, 2007).

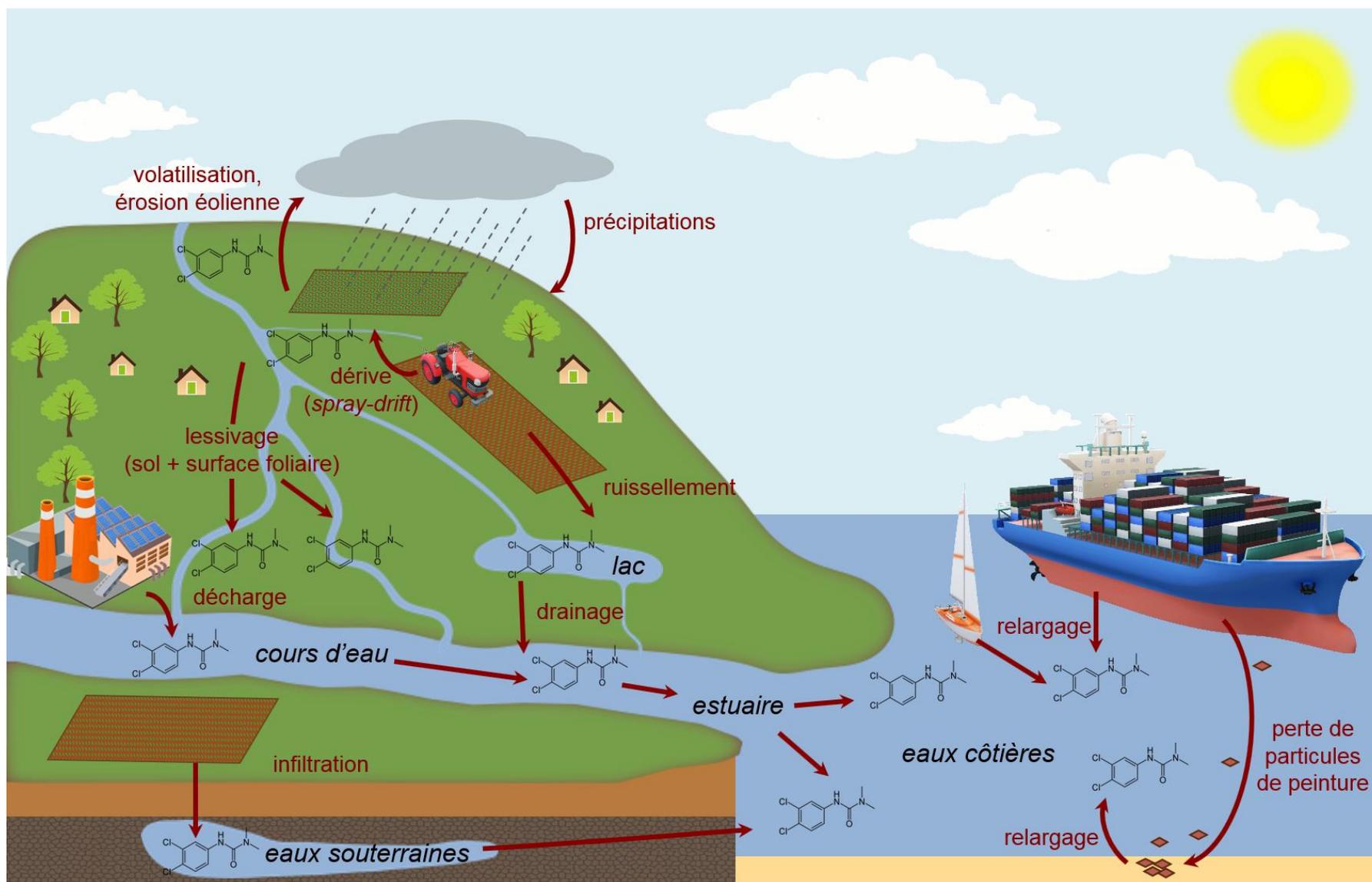


Figure 1 : Schéma résumant les différents processus de transfert des pesticides vers les eaux de surface douces et marines. Modifié d'après Coquillé 2017.

## 1.4.2. Devenir des pesticides organiques dans les eaux de surface

Une fois dans les eaux de surface, les pesticides sont transportés tout le long du continuum eau douce – eau marine, depuis l'exutoire du bassin versant où ils ont été appliqués, jusque dans les eaux côtières (Hapeman *et al.*, 2002 ; Gimeno *et al.*, 2004 ; Gómez-Gutiérrez *et al.*, 2006 ; Cruzeiro *et al.*, 2015), en passant par les estuaires (Emelogu *et al.*, 2013a ; Cruzeiro *et al.*, 2017 ; Rodrigues *et al.*, 2018). Au cours de ce transport, ces substances peuvent subir une dégradation, d'origine abiotique et/ou biotique, modifiant leur biodisponibilité, c'est-à-dire ce qui est librement disponible pour traverser la membrane (cellulaire) d'un organisme depuis le milieu où celui-ci se trouve, à un instant  $t$  donné (Semple *et al.*, 2006).

Les différents processus de dégradation abiotiques sont les suivants :

- l'hydrolyse, réaction chimique se produisant par l'action de l'eau et entraînant la coupure d'une liaison covalente. Cette réaction est davantage documentée pour certaines familles chimiques (organophosphorés, carbamates) puisqu'elle est spécifique de certains groupements fonctionnels, et dépend largement des caractéristiques du milieu, telles que le pH, la température ou la présence d'un environnement chimique particulier catalysant la réaction (Gao *et al.*, 2012 ; Fenner *et al.*, 2013) ;
- l'oxydation, réaction qui dépend de nombreux facteurs environnementaux, parmi lesquels on peut citer la quantité d'oxygène, la concentration en ions métalliques ou le pH. Le glyphosate peut par exemple être oxydé en présence d'ions manganèse (Barrett et McBride, 2005 ; Gao *et al.*, 2012 ; Fenner *et al.*, 2013) ;
- la photolyse, pouvant être directe, lorsque l'absorption des UV se fait par la substance elle-même, dépendant donc de la structure chimique de la substance en question ; ou indirecte (plus commun), par l'action d'espèces réactives (oxygène singulet, radicaux superoxyde, par exemple) formées lors de l'absorption des UV par d'autres molécules, comme la matière organique dissoute (MOD). Cette réaction chimique est d'une importance considérable pour la dégradation des pesticides, mais nécessite néanmoins des niveaux élevés d'UV (Gao *et al.*, 2012 ; Fenner *et al.*, 2013).

La dégradation biotique ne concerne que la fraction biodisponible d'une substance, c'est à dire la fraction accessible aux différents organismes pouvant la dégrader. La fraction non disponible, pouvant être adsorbée sur d'autres molécules modulant la dégradation, comme la MOD (Canonica, 2009), n'est pas considérée. La dégradation biotique, ou biodégradation, est reconnue comme étant la voie principale de dégradation des pesticides, permettant la minéralisation partielle ou totale de ces molécules, c'est-à-dire le passage de l'état organique à inorganique. De manière générale, la biodégradation s'exprime par la métabolisation/transformation des substances chimiques : les

organismes eucaryotes, tels que les animaux, plantes et champignons, transforment les pesticides à des fins de détoxification ou de manière fortuite via des enzymes à large spectre ; les organismes procaryotes, tels que les bactéries, métabolisent généralement ces substances pour les assimiler en tant que nutriments et source d'énergie. Par exemple, l'atrazine (herbicide) est métabolisée par de nombreuses bactéries en 2-hydroxyatrazine puis en dioxyde de carbone et en ammoniac (Fenner *et al.*, 2013).

### 1.4.3. Devenir des pesticides organiques dans les organismes aquatiques

Le devenir des contaminants dans les organismes aquatiques est généralement caractérisé par les termes suivants (Borgà *et al.*, 2004 ; Gobas *et al.*, 2009) :

- bioconcentration, lorsque l'on parle d'une accumulation mesurée en conditions contrôlées en laboratoire et pour laquelle les organismes ont été exclusivement exposés par l'eau ;
- bioaccumulation, lorsque l'on parle d'une accumulation mesurée sur le terrain ou en laboratoire et pour laquelle les organismes ont été exposés par leur nourriture et l'eau ;
- bioamplification (ou biomagnification), lorsque l'on parle d'une accumulation mesurée en laboratoire ou sur le terrain, pour laquelle les organismes ont été exposés par leur nourriture (laboratoire) ou par leur nourriture, l'eau et l'air (terrain) et dans le cas où la concentration de la substance considérée dans l'organisme excède celle mesurée dans sa nourriture.

En raison de la nécessité de traverser certaines barrières biologiques, comme les membranes plasmiques, la structure et les propriétés physico-chimiques des molécules vont influencer sur leur capacité à s'accumuler. Ainsi, le caractère hydrophile ou hydrophobe d'une molécule, exprimé par le coefficient de partage octanol/eau  $K_{OW}$ , va jouer un rôle important dans le passage des membranes. Du fait de leur structure bicouche composée de phospholipides ayant une partie hydrophile à l'extérieur et hydrophobe à l'intérieur, les molécules hydrophiles devront passer par des pores/canaux ou autres transporteurs pour rentrer dans les cellules ; au contraire, les molécules hydrophobes pourront diffuser passivement à travers la membrane.

Une fois à l'intérieur de l'organisme, la substance bioaccumulée peut être métabolisée ou éliminée via divers processus, regroupés sous le terme de biotransformation. Celle-ci se divise en deux phases (Williams, 1959) : la phase I, produisant des métabolites par hydrolyse et oxydation enzymatique ; la phase II, ayant pour but de faciliter l'excrétion des métabolites préalablement produits en augmentant leur hydrosolubilité via l'addition de composés hydrosolubles. La phase I fait principalement appel au cytochrome P450, alors que la réaction de phase II est opérée par des enzymes de conjugaison (glutathion-S-transférase, par exemple ; Thies *et al.*, 1996, Xiong *et al.*, 2018). Ce phénomène de biotransformation a été démontré aussi bien chez les microalgues (Ghasemi *et al.*, 2011 ; Xiong *et al.*,

2018) que chez les mollusques bivalves, notamment l'huître creuse (*Crassostrea gigas*; Geret *et al.*, 2013; Mottier *et al.*, 2015). Les molécules ainsi biotransformées sont par la suite excrétées dans le milieu extérieur via différents processus.

Les nombreuses substances actives aujourd'hui autorisées dans la composition des pesticides peuvent donc être transférées depuis leur point d'application jusque dans les écosystèmes aquatiques dulçaquicoles et côtiers et entraîner *in fine* une contamination de ces milieux. Face à ce constat, il apparaît donc nécessaire d'établir une réglementation appropriée, à la fois vis-à-vis de la production et commercialisation de ces substances, mais également pour assurer la surveillance de la contamination des masses d'eau.

## 1.5. Réglementation

La réglementation des substances actives (*i.e.* la molécule responsable de l'effet biologique recherché pour un pesticide) utilisées dans la préparation des pesticides s'effectue à plusieurs niveaux : pour les substances chimiques elles-mêmes, avec le dispositif européen « enregistrement, évaluation et autorisation des produits chimiques » (REACH, 1907/2006 CE) ; pour des écosystèmes spécifiques, avec la Directive-Cadre sur l'Eau (DCE, 2000/60/CE) et la Directive-Cadre Stratégie Milieu Marin (DCSMM, 2008/56/CE), visant au suivi de la qualité des masses d'eau douces et marines.

### 1.5.1. Dispositifs visant à encadrer l'autorisation et la vente des substances chimiques

Le règlement REACH, entré en vigueur le 1<sup>er</sup> juin 2007, impose aux entreprises d'identifier et de gérer les risques potentiels associés à la fabrication et à la commercialisation de substances chimiques au sein de l'Union Européenne (UE). Cette démarche vise principalement à améliorer la protection de la santé humaine et de l'environnement, mais aussi à renforcer la collaboration entre les industriels via le partage des connaissances acquises sur les substances chimiques enregistrées. Afin d'assurer une bonne coordination des actions requises pour l'application du dispositif REACH, l'Agence européenne des produits chimiques (ECHA, *European Chemical Agency*) a été créée par la Commission européenne le 18 décembre 2006. C'est à elle qu'incombe, via la consultation de comités d'experts, la responsabilité d'autoriser ou de restreindre l'usage des substances chimiques enregistrées. Toute substance produite ou importée dans des quantités supérieures à une tonne/an doit être enregistrée via un dossier contenant les potentiels risques associés à la production ou à l'utilisation de cette substance, ainsi que les moyens mis en œuvre pour les maîtriser. Via le processus d'autorisation, des alternatives économiquement et techniquement viables à l'usage des substances identifiées comme

extrêmement préoccupantes sont proposées. Tout État membre, au même titre que l'ECHEA, peut, sur demande de la Commission Européenne, entamer une procédure visant à limiter ou interdire la production (et l'importation), la commercialisation ou l'utilisation d'une substance dont les risques pour la santé humaine et/ou l'environnement lui paraissent inacceptables.

En complément de la réglementation européenne (REACH) concernant la vente, l'autorisation et l'utilisation des substances chimiques, deux autres dispositifs visent à suivre la contamination chimique des masses d'eau douce et marine : la DCE et la DCSMM.

### **1.5.2. Dispositifs visant à prévenir la pollution des masses d'eau dulçaquicoles et marines**

La DCE est une directive européenne datant de 2000 et transposée dans le droit français le 21 avril 2004. Elle avait pour objectif d'atteindre, à l'échéance 2015, le bon état de toutes les masses d'eaux souterraines, superficielles et côtières (jusqu'à un mille nautique du trait de côte ou ligne de base) y compris dans les départements et régions d'outre-mer. Au niveau national, la mise en place de cette directive est gérée par les agences et offices de l'eau pour chaque bassin hydrographique, via les SDAGE (schémas directeurs d'aménagement et de gestion des eaux). Afin de statuer sur l'état général d'une masse d'eau, l'état chimique et l'état écologique (qui se déclinent en trois états, biologique, hydromorphologique et physico-chimique) sont évalués, chacun étant défini par des indicateurs de qualité. L'état global d'une masse d'eau est ensuite défini par l'état le moins bon parmi tous les indicateurs mesurés. L'état chimique des masses d'eau est tributaire de la présence d'une ou plusieurs des 45 substances prioritaires listées dans l'annexe X de la directive modifiée en 2013 (2013/39/UE, passage de 33 à 45 substances prioritaires), parmi lesquelles figurent des pesticides, dont certains font l'objet de ces travaux de thèse, mais également des métaux lourds, des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), et d'autres polluants industriels (Tableau 1). Si l'une de ces substances est présente à une concentration supérieure à la norme de qualité environnementale (NQE), définie comme la « concentration d'un polluant ou d'un groupe de polluants dans l'eau, les sédiments ou le biote qui ne doit pas être dépassée, afin de protéger la santé humaine et l'environnement », la masse d'eau sera classée en mauvais état. L'objectif initial de la DCE n'ayant pu être atteint à échéance, un second plan de gestion (2016-2021) a été mis en œuvre pour atteindre le bon état écologique et chimique des masses d'eau au plus tard en 2027.

Tableau 1 : Liste des 45 substances prioritaires de l'annexe X de la DCE. Les NQE sont exprimées en  $\mu\text{g L}^{-1}$ , MA : moyenne annuelle ; CMA : concentration maximale admissible.

Famille chimique	Nom de la substance prioritaire	Identifiée comme substance dangereuse prioritaire	NQE-MA Eaux de surface intérieures	NQE-MA Autres eaux de surface	NQE-CMA Eaux de surface intérieures	NQE-CMA Autres eaux de surface
<b>Pesticides</b>	Aclonifène		0,12	0,012	0,12	0,012
	Alachlore		0,3	0,3	0,7	0,7
	Atrazine		0,6	0,6	2	2
	Bifénox		0,012	0,0012	0,04	0,004
	Chlorfénvinphos		0,1	0,1	0,3	0,3
	Chlorpyrifos		0,03	0,03	0,1	0,1
	Composés du tributylétain	X	0,0002	0,0002	0,0015	0,0015
	Cybutryne (Irgarol)		0,0025	0,0025	0,016	0,016
	Cyperméthrine		$8 \times 10^{-5}$	$8 \times 10^{-6}$	$6 \times 10^{-4}$	$6 \times 10^{-5}$
	Dichlorvos		$6 \times 10^{-4}$	$6 \times 10^{-5}$	$7 \times 10^{-4}$	$7 \times 10^{-5}$
	Dicofol	X	$1,3 \times 10^{-3}$	$3,2 \times 10^{-5}$		
	Diuron		0,2	0,2	1,8	1,8
	Endosulfan	X	0,005	0,0005	0,01	0,004
	Heptachlore et époxyde d'heptachlore	X	$2 \times 10^{-7}$	$1 \times 10^{-8}$	$3 \times 10^{-4}$	$3 \times 10^{-5}$
	Isoproturon		0,3	0,3	1	1
	Lindane (Hexachlorocyclohexane)	X	0,02	0,002	0,04	0,02
	Quinoxifène	X	0,15	0,015	2,7	0,54
	Simazine		1	1	4	4
Terbutryne		0,065	0,0065	0,34	0,034	
Trifluraline	X	0,03	0,03			
<b>Métaux lourds</b>	Cadmium et ses composés (classe selon dureté de l'eau)		$\leq 0,08$ (1)	0,2	$\leq 0,45$ (1)	$\leq 0,45$ (1)
			0,08 (2)		0,45 (2)	0,45 (2)
			0,09 (3)		0,6 (3)	0,6 (3)
			0,15 (4)		0,9 (4)	0,9 (4)
			0,25 (5)		1,5 (5)	1,5 (5)
	Mercuré et ses composés	X			0,07	0,07
	Nickel et ses composés		4	8,6	34	34
	Plomb et ses composés		1,2	1,3	14	14
<b>Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)</b>	Anthracène	X	0,1	0,1	0,1	0,1
	Benzène		10	8	50	50
	Benzo(a)pyrène		$1,7 \times 10^{-4}$	$1,7 \times 10^{-4}$	0,27	0,027
	Benzo(b)fluor-anthène				0,017	0,017
	Benzo(g,h,i)perylène				$8,2 \times 10^{-3}$	$8,2 \times 10^{-4}$
	Benzo(k)fluor-anthène				0,017	0,017
	Dioxines et composés de type dioxine	X				
Fluoranthène		0,0063	0,0063	0,12	0,12	
Indeno(1,2,3-cd)-pyrène						
Naphtalène		2	2	130	130	
<b>Chlorobenzènes</b>	Hexachlorobenzène	X			0,05	0,05
	Pentachlorobenzène	X	0,007	0,0007		
	Pentachlorophénol		0,4	0,4	1	1
	Trichlorobenzène		0,4	0,4		
<b>Solvants chlorés</b>	1,2-dichloroéthane		10	10		
	Dichlorométhane		20	20		
	Trichlorométhane		2,5	2,5		
<b>Autres</b>	Acide perfluorooctanesulfonique et ses dérivés	X	$6,5 \times 10^{-4}$	$1,3 \times 10^{-4}$	36	7,2
	Chloroalcanes, C10-13	X	0,4	0,4	1,4	1,4
	Di(2-ethylhexyle)phthalate (DEHP)	X	1,3	1,3		
	Diphényléthers bromés	X			0,14	0,014
	Hexabromocyclododécane (HBCDD)	X	0,0016	0,0008	0,5	0,05
	Hexachlorobutadiène	X			0,6	0,6
	Nonylphénols	X	0,3	0,3	2	2
Octylphénols		0,1	0,01			

En parallèle de la DCE, la DCSMM, entrée définitivement en vigueur dans le droit français le 5 mai 2011 (code de l'environnement, articles L. 219-9 à L. 219-18 et R. 219-2 à R. 219-17), est la version marine de la DCE. Elle vise l'atteinte ou le maintien du bon état écologique pour le milieu marin à l'échéance 2020. Cette directive s'applique, pour chaque pays membre, à la ZEE (zone économique

exclusive) qui s'étend de la ligne de base à 200 milles nautiques (environ 370 km) au large. La France totalise 11 millions de km<sup>2</sup> de zone marine (second domaine maritime mondial), cependant, la DCSMM ne s'applique qu'aux eaux marines métropolitaines, divisées en quatre sous-régions marines : Manche-mer du Nord ; mers celtiques ; golfe de Gascogne ; Méditerranée occidentale. La mise en place de cette directive s'effectue par l'application d'un PAMM (plan d'action pour le milieu marin) élaboré spécifiquement pour chaque sous-région marine par les autorités compétentes et en collaboration avec les acteurs concernés. Les travaux réalisés dans le cadre d'autres conventions, comme la convention OSPAR (Oslo-Paris) ou la convention de Barcelone, œuvrant respectivement pour la protection du milieu marin de l'Atlantique Nord-Est et de la Méditerranée, sont également pris en compte dans la DCSMM. Afin d'évaluer l'état écologique du milieu marin, onze descripteurs qualitatifs (communs à tous les états membres), reflétant le fonctionnement des écosystèmes au niveau biologique, physique, chimique et sanitaire, ont été choisis. Deux descripteurs s'intéressent plus particulièrement à la contamination du milieu marin par des substances chimiques : le descripteur 8, visant à évaluer les effets potentiels liés à la présence de contaminants chimiques ; le descripteur 9, contrôlant la présence de contaminants chimiques dans les poissons et fruits de mer destinés à la consommation humaine et s'assurant que les concentrations retrouvées ne dépassent pas les seuils fixés par la législation en vigueur. Après une évaluation initiale réalisée en 2012 (définition du bon état écologique et fixation des principaux objectifs), une élaboration et mise en place du programme de surveillance en 2014-2015, puis du programme de mesures en 2016, la première révision de l'évaluation initiale aura lieu courant 2018.

Grâce à la réglementation actuelle en matière de surveillance environnementale, de nombreuses données concernant la contamination de ces écosystèmes aquatiques par les pesticides ont été accumulées. Ainsi, l'ensemble des données issues des réseaux de surveillance et de la littérature scientifique permet de dresser un état des lieux de la contamination récemment reportée pour les cours d'eau et masses d'eau côtières en Europe et en France.

## **1.6. État des lieux de la contamination chimique des écosystèmes aquatiques par les pesticides**

### **1.6.1. Contamination des cours d'eau en Europe et en France**

La contamination chimique des cours d'eau par les pesticides est un phénomène d'ordre mondial. Face à cette problématique, des efforts ont été déployés pour améliorer et étendre les réseaux de surveillance de la qualité chimique des eaux. De nombreuses études se sont également intéressées au suivi de ces substances et à la compilation des résultats obtenus par les réseaux de surveillance. Cette

partie synthétise les principaux résultats de quelques-unes de ces études, dans un premier temps pour l'Europe, puis plus spécifiquement pour la France.

La première étude visant à mesurer les concentrations de 35 substances polaires organiques, dont sept herbicides et deux métabolites associés, par chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM) dans plus de 100 échantillons d'eau issus des rivières de 27 pays a été publiée par Loos *et al.* en 2009. Deux herbicides de la famille des sulfonylurées, l'isoproturon et le diuron, ont été retrouvés aux concentrations suivantes : en moyenne 0,052 et 0,041  $\mu\text{g L}^{-1}$ , contre 1,96 et 0,86  $\mu\text{g L}^{-1}$  pour le maximum, respectivement. Les autres herbicides et métabolites ont quant à eux été retrouvés à des concentrations moyennes plus faibles, inférieures à 0,010  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Trois des quatre herbicides inscrits sur la liste des substances prioritaires de la DCE (atrazine, diuron et isoproturon) ont été retrouvés dans 70% des échantillons. Plus récemment, deux études ont recherché un spectre de substances plus large mais dans des zones géographiques plus restreintes. L'article de Meffe et de Bustamante (2014) fait la synthèse d'études menées entre 1997 et 2013, concernant, entre autres, les concentrations de 138 pesticides recherchés dans les eaux de surface et les eaux souterraines en Italie. Concernant les eaux de surface, neuf molécules ont été mesurées (CL-SM/SM) à des concentrations dépassant la dizaine de  $\mu\text{g L}^{-1}$ , parmi lesquelles : le diuron, la terbuthryne et le métolachlore, avec des concentrations maximales respectives de 30,0, 18,0 et 16,5  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Ces fortes concentrations étaient probablement dues à un ruissellement important de ces molécules, conséquence de fortes pluies survenues après un traitement (Griffini *et al.*, 1997 ; Curini *et al.*, 2001). Les trois molécules les plus fréquemment détectées étaient, dans l'ordre décroissant et faisant fi de l'AMPA dont les sources ne sont pas uniquement dues à la métabolisation du glyphosate : le glyphosate, la terbuthylazine et la déséthyl-terbuthylazine. En Suisse, plus de 249 substances (couvrant 86% des pesticides vendus et utilisés en zones agricoles et urbaines) et 134 métabolites ont été recherchés dans cinq rivières échantillonnées entre mars et juillet 2012 (Moschet *et al.*, 2014). Au total, 104 substances (soit 42% des substances recherchées) ont été détectées dans au moins un des échantillons analysés : 54 herbicides, 31 fongicides, 17 insecticides et deux biocides. Parmi les herbicides les plus fréquemment détectés, on retrouve le S-métolachlore, l'isoproturon (détectés dans tous les échantillons) et le diuron (détecté dans 89% des échantillons), avec des concentrations maximales respectives de 0,96, 0,35 et 0,052  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Parmi les fongicides, on peut noter la présence de l'azoxystrobine dans 98% des échantillons, avec une concentration maximale de 0,12  $\mu\text{g L}^{-1}$ , alors que l'insecticide fipronil a été détecté dans 67% des échantillons avec une concentration maximale de 0,014  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Le glyphosate et l'AMPA, ainsi que d'autres familles chimiques comme les organophosphorés (chlorpyrifos-éthyl et méthyl), ne pouvaient être détectés par la méthode analytique utilisée. Dans 70% des échantillons, au moins une substance dépassait la NQE-MA (MA :

moyenne annuelle) ; le diuron, le métazachlore et le S-métolachlore dépassant ces valeurs dans treize, douze et neuf échantillons, respectivement. Au total, la somme des concentrations dépassait  $1,00 \mu\text{g L}^{-1}$  dans 78% des échantillons et était en moyenne de 1,60 à  $2,50 \mu\text{g L}^{-1}$  pour chaque rivière échantillonnée.

En France, la surveillance de la qualité des eaux superficielles et souterraines effectuée dans le cadre de la DCE par les Agences et Offices l'Eau, ainsi que par d'autres organismes comme l'AFB (Agence française pour la biodiversité, anciennement Onema), permet la production annuelle d'une quantité importante de données vis-à-vis de la contamination des cours d'eau par des pesticides notamment. Ainsi, chaque année, le SOeS (Service de l'observation et des statistiques) synthétise l'ensemble des données récoltées sous la forme d'un rapport disponible publiquement sur son site internet (SOeS, 2017). Le dernier rapport disponible fait la synthèse des données récoltées pour l'année 2014. Sur près de 700 substances surveillées, 389 (56%) sont quantifiées dans les cours d'eau, et au moins une fois pour 87% des 3052 points de mesure.

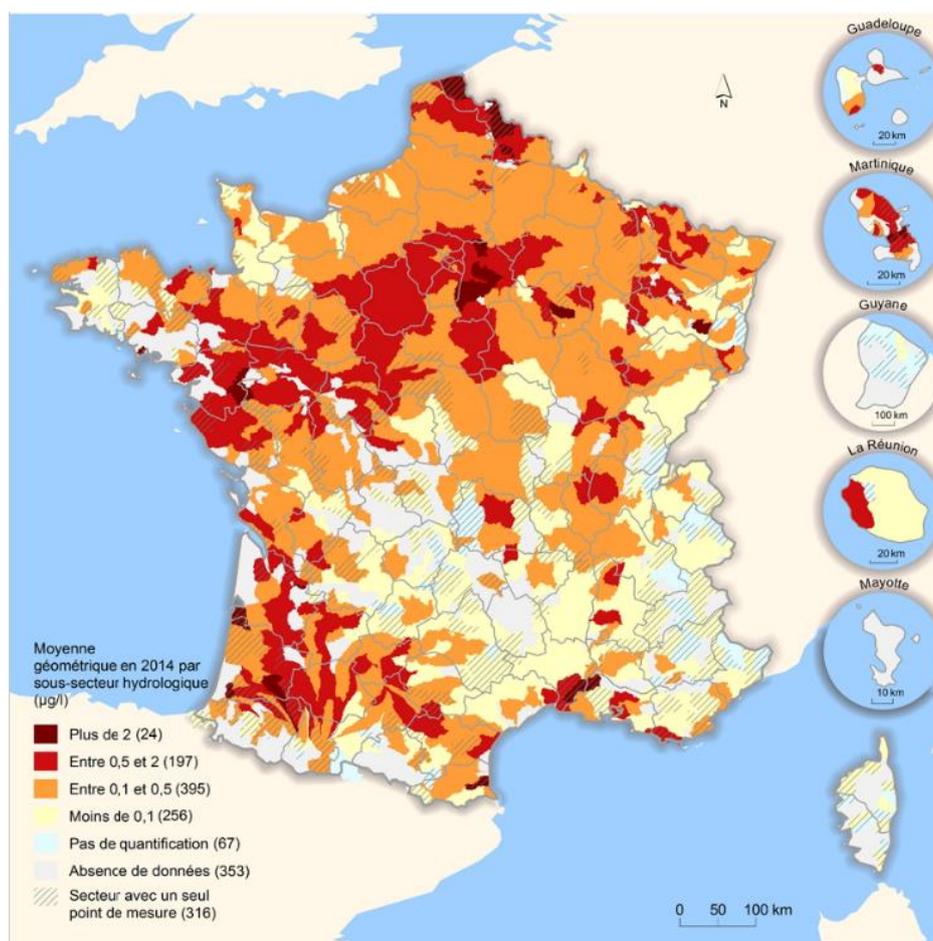


Figure 2 : Moyennes géométriques des concentrations totales en pesticides ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) en 2014 par sous-secteur hydrologique. Sources : agences et offices de l'Eau ; BRGM, banque ADES et BD Lisa ; Meem, BDCarthage®. Traitements : SOeS, 2017.

Dans près de la moitié des cours d'eau échantillonnés (48%), la moyenne de la concentration totale en pesticides par point en 2014 est supérieure ou égale à  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$  (Figure 2). Les sous-secteurs hydrologiques les plus contaminés correspondent aux zones de grandes cultures, d'arboriculture et de viticulture. Les herbicides représentent 81% des pesticides quantifiés, alors que les fongicides et les insecticides représentent seulement 11% et 6%, respectivement. Parmi les herbicides quantifiés, près de 34% sont des substances (et métabolites de ces substances) interdites aujourd'hui. Enfin, dix herbicides et métabolites représentent à eux seuls 41% des pesticides quantifiés dans les cours d'eau, parmi lesquels on retrouve, en fonction de leur classement par taux de présence dans les analyses par ordre descendant : l'AMPA (53%), le glyphosate (38%), le métolachlore (27%) et l'isoproturon (19%) (Figure 3). On notera également que, onze ans après son interdiction, l'atrazine, ainsi que trois de ses métabolites, font toujours partie des dix pesticides les plus quantifiés, démontrant la très forte persistance de ces molécules dans l'environnement, notamment dans le sols.

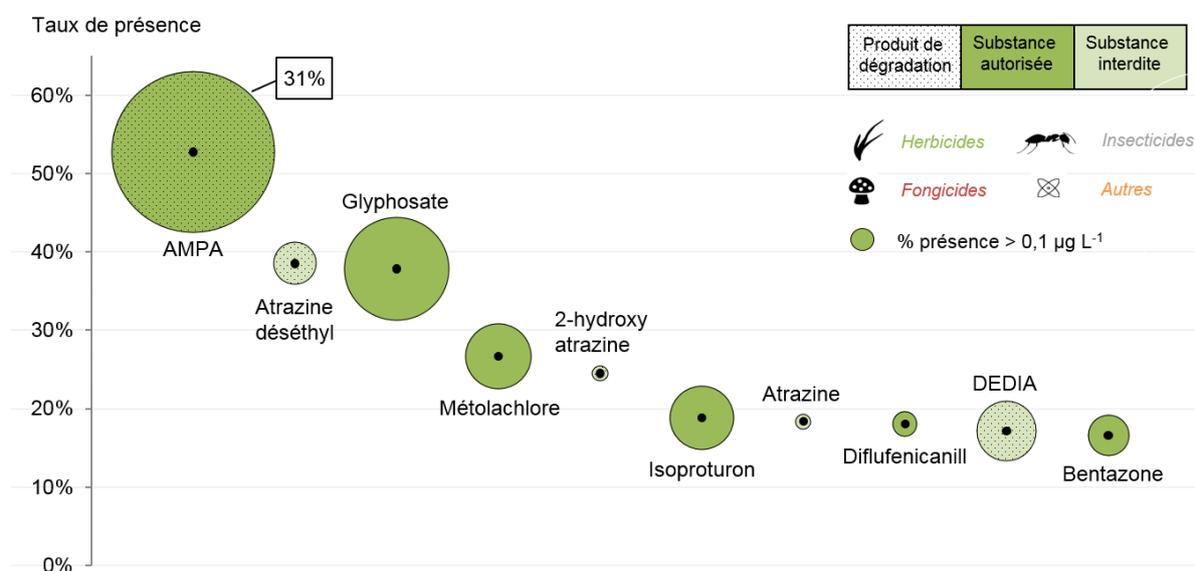


Figure 3 : Taux de présence dans les analyses des dix pesticides les plus quantifiés dans les cours d'eau en 2014 ; l'aire des cercles représente le pourcentage des analyses pour lesquelles la concentration dépasse  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$  (par exemple, 31% pour l'AMPA) ; DEDIA : déséthyl-desisopropyl-atrazine. Sources : agences et offices de l'Eau ; Ineris, BNVD, 2016. Traitements : SOeS, 2017.

Avant d'atteindre le milieu marin, les contaminants présents dans les cours d'eau traversent des estuaires, milieux complexes jouant un rôle important tant au niveau écologique qu'économique. Trois études menées par Cruzeiro *et al.* (2016a, 2016b, 2017), ont étudié la contamination par 56 pesticides des estuaires du Douro, du Mondego et du Tage, situés au Portugal. Les concentrations moyennes annuelles cumulées (pour toutes les molécules détectées) s'élevaient, pour les stations échantillonnées de 2010 à 2011, à  $16,3$ ,  $5,73$  et  $2,83 \mu\text{g L}^{-1}$  pour les estuaires du Douro, du Mondego et du Tage, respectivement. Pour les estuaires du Douro et du Mondego, il n'y avait pas de différences significatives dans les concentrations moyennes en pesticides (toutes classes confondues) avec la

saison d'échantillonnage, illustrant ainsi une contamination constante tout au long de l'année. Concernant les classes de pesticides détectées, les insecticides ont été détectés à des concentrations supérieures pour les estuaires du Douro (concentration cumulée moyenne entre  $3,60 \mu\text{g L}^{-1}$  en été et  $5,07 \mu\text{g L}^{-1}$  en hiver) et du Tage (concentration cumulée moyenne entre  $0,68 \mu\text{g L}^{-1}$  en hiver et  $3,97 \mu\text{g L}^{-1}$  au printemps), suivis par les herbicides (concentration moyenne annuelle cumulée de  $1,05$  et  $0,72 \mu\text{g L}^{-1}$  pour le Douro et le Tage, respectivement) puis les fongicides (concentration moyenne annuelle cumulée de  $0,63$  et  $0,09 \mu\text{g L}^{-1}$  pour le Douro et le Tagus, respectivement). Les concentrations bien supérieures mesurées dans l'estuaire du Douro suggèrent de mauvaises pratiques vis-à-vis du traitement des eaux résiduaires dans ce bassin versant. C'est également dans cet estuaire que plusieurs substances interdites, dont le 4,4'-DDT et l'heptachlore, ont été retrouvées à des concentrations dépassant très largement les normes établies par la DCE. Le ratio molécule mère/métabolite qui est d'ailleurs supérieur à 1 suggère une utilisation régulière de ces substances pourtant interdites.

En France, une étude plus ancienne réalisée au niveau du delta du Rhône par Comoretto *et al.* (2007) a suivi les concentrations de 24 pesticides sur une période de 6 mois en 2004. La majorité (90%) des pesticides détectés étaient associés à la culture du riz, parmi lesquels le prétilachlore, l'oxadiazon, le MCPA (acide 2-méthyl-4-chlorophénoxyacétique) et la bentazone. Les concentrations cumulées mesurées de ces quatre herbicides fluctuaient, de  $0,45 \mu\text{g L}^{-1}$  mi-mars à  $1,6 \mu\text{g L}^{-1}$  fin septembre, en passant par des pics de  $7,7$ ,  $8,5$  et  $11,1 \mu\text{g L}^{-1}$  correspondant à l'application des herbicides pré- et post-émergence fin avril et début juin, respectivement. Enfin, les travaux de thèse de Belles (2012) se sont également intéressés à l'estuaire de la Gironde : les molécules majoritairement retrouvées étaient le métolachlore et ses métabolites, les dérivés sulfonique (ESA) et oxanilique (OXA) du métolachlore, à des concentrations allant jusqu'à  $1,50 \mu\text{g L}^{-1}$  en période de traitement (avril-mai).

### 1.6.2. Contamination des eaux côtières en Europe et en France

Les eaux côtières constituent le réceptacle final des contaminants présents dans les eaux de surface continentales. Cependant, contrairement aux cours d'eau, la contamination des milieux littoraux et marins est moins bien renseignée.

Concernant la contamination des eaux côtières Françaises par les pesticides, quelques études s'intéressant à la contamination des différentes façades maritimes sont disponibles. Buisson *et al.* (2008) se sont intéressés à la contamination par quinze pesticides de deux zones situées dans la Baie des Veys en Normandie. Deux herbicides, le diuron et l'isoproturon, ont été retrouvés en mai 2006 à des concentrations de  $0,13$  et  $0,042 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivement, alors que ces mêmes molécules avaient

été retrouvées à des concentrations de 0,25 et 0,053  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivement, dans la rivière Vire, un peu plus en amont.

Réalisés dans les années 2006-2007, les travaux de Caquet *et al.* (2013) se sont quant à eux intéressés au transfert de 30 pesticides depuis la rivière d'Arzal jusque dans la Baie de Vilaine, située en Bretagne, en passant par l'estuaire de la Vilaine. Vingt-cinq des 30 pesticides recherchés ont ainsi été identifiés au moins une fois, parmi lesquels on retrouve entre autres le diuron, l'isoproturon, l'irgarol et le métolachlore, avec des concentrations maximales détectées en amont du barrage d'Arzal de 0,27, 0,19, 0,19 et 0,094  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivement. Le diuron, l'isoproturon et le métolachlore sont les seules molécules à avoir été retrouvées plus au large, dans la Baie de Vilaine, avec des concentrations maximales mesurées à marée haute de 0,075, 0,094 et 0,068  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivement. Ces plus faibles concentrations s'expliquent probablement par la présence d'un barrage sur la Vilaine, réduisant ainsi le transfert des contaminants vers l'estuaire et la baie. On peut également noter que le diuron est la seule molécule à avoir été quantifiée au niveau de tous les points d'échantillonnage, à des concentrations parfois élevées. Cela est probablement dû à son double usage, comme herbicide en agriculture (utilisation par la suite interdite en 2008) et comme biocide dans les peintures anti-salissures.

Plus récemment, et dans la continuité des trois études menées dans les estuaires de trois rivières au Portugal, Cruzeiro *et al.* (2015) ont suivi la présence de 56 pesticides dans les eaux côtières du lagon du parc naturel de la Ria Formosa. Parmi les 54 échantillons prélevés, 89% des pesticides recherchés ont pu être détectés et quantifiés. Les concentrations cumulées annuelles moyennes par classe de pesticides étaient de 9,00, 1,40, et 0,58  $\mu\text{g L}^{-1}$  pour les insecticides, fongicides et herbicides, respectivement. Ces trois classes étaient majoritairement représentées par : la lambda-cyhalothrine, l'alpha-cyperméthrine (alphaméthrine) et la deltaméthrine pour les insecticides ; l'azoxystrobine, le difénoconazole et le tébuconazole pour les fongicides ; la pendiméthaline et la terbuthylazine pour les herbicides. Les auteurs remarquent également la présence de 4,4'-DDT, à des concentrations allant jusqu'à 0,37  $\mu\text{g L}^{-1}$  pendant l'été, bien qu'il ait été interdit dans les années 1990 au Portugal, témoignant ainsi de sa forte persistance et/ou d'une utilisation illégale de cette substance.

Enfin, la contamination des eaux côtières Méditerranéennes a également été étudiée par Munaron *et al.* (2012) durant l'été 2008 (à l'exception de deux stations, échantillonnées plus tard dans l'année), via l'utilisation de POCIS (*polar organic chemical integrative sampler*, section 1.7.2.). Cette étude ciblait 27 pesticides hydrophiles, ainsi que des substances pharmaceutiques et des alkylphénols. Parmi les pesticides recherchés, 15 herbicides et un biocide ont été détectés. Le diuron est la seule substance à avoir été détectée dans tous les échantillons, démontrant une fois encore le caractère ubiquiste de ce contaminant. L'irgarol, a été détecté dans 77% des échantillons, contre 69% pour l'isoproturon et le

S-métolachlore. Les baies et lagons étant des environnements confinés, le temps de renouvellement des eaux est très long. Par conséquent ces milieux présentent une contamination supérieure, avec des concentrations moyennées dans le temps de 0,033, 0,026 et 0,011  $\mu\text{g L}^{-1}$  pour le diuron et 0,0025, 0,0005 et 0,002  $\mu\text{g L}^{-1}$  pour l'irgarol, dans les étangs de Thau, de Berre et la Baie de Lazaret, respectivement.

D'autres substances, comme les biocides présents dans les peintures anti-salissures, sont retrouvées dans les eaux côtières, notamment dans les marinas et aires portuaires. Deux études relatent la présence d'irgarol dans plusieurs marinas, en Allemagne et au Royaume-Uni dans les années 2000. Cette molécule est alors largement utilisée en remplacement des organoétains (comme le TBT), interdits du fait de leur très forte toxicité. Des concentrations d'irgarol allant jusqu'à 0,62  $\mu\text{g L}^{-1}$ , mesurées entre mars et mai dans une marina de la mer du Nord, ont ainsi été retrouvées, alors que dans d'autres marinas de la mer Baltique, des concentrations entre 0,30 et 0,50  $\mu\text{g L}^{-1}$  ont été mesurées (Biselli *et al.*, 2000). Dans une autre étude visant à évaluer la contamination des aires de carénages de plusieurs ports Français, Cozic et Durand (2013) ont mesuré des concentrations maximales allant jusqu'à 2,60 et 0,82  $\mu\text{g L}^{-1}$ , pour le diuron et l'irgarol, respectivement. Après son interdiction au Royaume-Uni en Septembre 2000 (pour les bateaux d'une longueur inférieure à 25 m), Cresswell *et al.* (2006) ont mesuré les concentrations en irgarol dans trois marinas : les concentrations moyennes retrouvées, allant de 0,008 à 0,026  $\mu\text{g L}^{-1}$ , montrent une réduction importante des teneurs en irgarol, attribuable à l'interdiction de cette molécule.

La plupart des études ci-dessus font mention de concentrations mesurées par des méthodes d'échantillonnage ponctuel, en général via des prélèvements d'eau réalisés à un instant  $t$ . Cependant, ce type d'échantillonnage présente plusieurs contraintes. Depuis les années 1990, une nouvelle méthode d'échantillonnage dite « passive » a vu le jour et se révèle prometteuse pour le suivi de la contamination des masses d'eau douces et marines par les pesticides.

## 1.7. Mesure des pesticides dans les écosystèmes aquatiques

Le suivi de la contamination chimique d'une masse d'eau peut se faire via l'utilisation de deux principales techniques d'échantillonnage :

- l'échantillonnage ponctuel ou actif ;
- l'échantillonnage passif ou intégratif.

### 1.7.1. Échantillonnage ponctuel

L'échantillonnage ponctuel est aujourd'hui privilégié pour la surveillance des masses d'eau, comme dans le cas de la DCE par exemple, où il se limite à quatre prélèvements par an et par site suivi pour réduire les coûts associés (Gauroy *et al.*, 2012). Ce type d'échantillonnage permet d'obtenir une image de la contamination chimique à un instant  $t$  (au moment où le prélèvement est réalisé). Cependant, dans l'optique du suivi de la contamination d'un cours d'eau par les pesticides, dont les concentrations peuvent fluctuer très rapidement (dans le cas d'une forte pluie entraînant un ruissellement important, par exemple), il devient rapidement contraignant car il doit alors être opéré très fréquemment. En outre, en utilisant une fréquence d'échantillonnage trop faible, un pic de contamination (lors d'une crue par exemple) peut être manqué, si personne n'est présent sur place pour effectuer le prélèvement au moment adéquat.

L'utilisation d'échantillonneurs automatiques permet de s'affranchir de certaines de ces contraintes en permettant un échantillonnage intégré avec un pas de temps fixe, un volume passé fixe ou un déclenchement en fonction du débit. Cependant, ce type d'échantillonnage amène également d'autres contraintes logistiques liées à son utilisation sur le terrain, comme par exemple le gel dans la tuyauterie qui alimente l'échantillonneur automatique (Vermeirssen *et al.*, 2005), le besoin de maintenance parfois important ou encore la nécessité d'une alimentation électrique. De plus, certains biais peuvent également être introduits, comme une modification/contamination de l'échantillon (présence de biofilm, interactions avec les matériaux) ainsi qu'une dégradation de celui-ci (Desgranges, 2015) s'il n'est pas stocké de façon appropriée et/ou traité assez rapidement.

Pour pallier ces différentes contraintes, ainsi que les coûts élevés parfois associés, une alternative s'est développée depuis les années 1990 : l'échantillonnage passif.

### 1.7.2. Échantillonnage passif

L'échantillonnage passif intégratif représente une alternative intéressante à l'échantillonnage ponctuel (Górecki et Namienik, 2002). Les échantillonneurs passifs se composent d'une phase réceptrice entourée par une membrane, le tout étant le plus souvent encapsulé ou maintenu par une structure secondaire (tube, disque). Il existe différents types d'échantillonneurs, spécifiques du suivi de différents types de contaminants, mais tous exploitent le même principe : les contaminants ciblés par l'échantillonneur sont séquestrés par une phase réceptrice pour laquelle ils possèdent une affinité supérieure à celle du milieu dans lequel ils se trouvent. La présence d'un gradient de concentration entre le milieu échantillonné et les différents compartiments de l'échantillonneur permet aux contaminants de diffuser simplement à travers la couche limite d'eau (interface eau-membrane).

L'accumulation se fait donc de manière passive, sans apport d'énergie. La sélectivité de l'échantillonneur passif est principalement déterminée par les caractéristiques de la membrane (taille des pores, matériau utilisé).

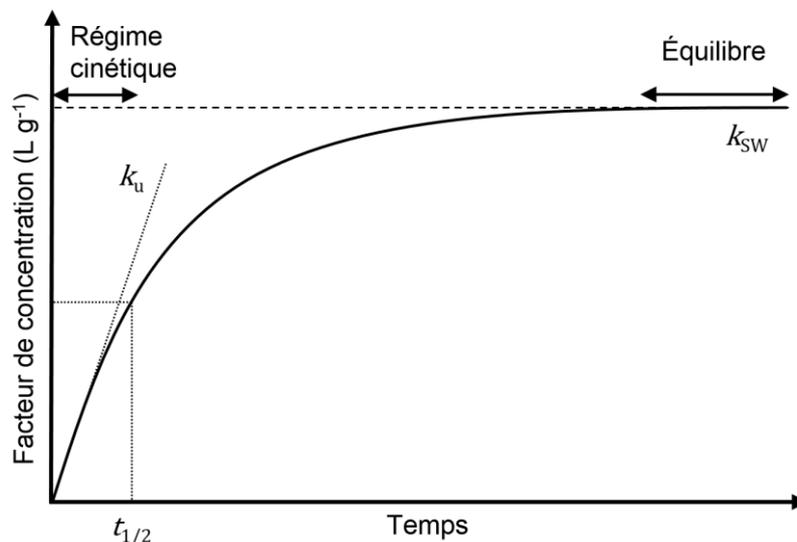


Figure 4 : Cinétique d'accumulation des contaminants dans un échantillonneur passif. D'après Vrana *et al.* 2005.

L'accumulation est régie par une cinétique de premier ordre et se décompose en deux régimes (Figure 4) : i) le régime cinétique (ou intégratif) pour une durée d'exposition  $t < t_{1/2}$ , durant lequel l'accumulation se fait à une vitesse supposée constante ; ii) le régime d'équilibre, pour une durée d'exposition  $t \gg t_{1/2}$  et pour lequel les contaminants atteignent leur équilibre thermodynamique entre la phase aqueuse et la phase réceptrice ( $k_{sw}$ , coefficient de partage phase réceptrice/eau, en  $L g^{-1}$ ). Les échantillonneurs passifs intégratifs sont utilisés sur des temps suffisamment courts pour que le système reste dans un régime d'ordre cinétique, les contaminants sont ainsi accumulés par l'échantillonneur en quantité proportionnelle à la durée d'exposition et à leur concentration dans le milieu échantillonné. Dans ce régime, l'équation (1), basée sur la 1<sup>ère</sup> loi de Fick, décrit de façon réaliste l'accumulation des contaminants dans la phase réceptrice,

$$C_w = \frac{C_s}{k_u t} \quad (1)$$

où  $C_w$  ( $\mu g$  ou  $ng L^{-1}$ ) représente la concentration de l'analyte considéré dans l'eau au cours de la période d'exposition (aussi appelée  $C_{TWA}$ , *time-weighted average concentration*, concentration moyennée dans le temps),  $C_s$  ( $\mu g$  ou  $ng g^{-1}$ ) la concentration d'analyte dans la phase réceptrice,  $k_u$  ( $j^{-1}$ ) la constante cinétique d'accumulation de l'analyte (préalablement déterminée en laboratoire) et  $t$  le temps (j).

L'équation (1) peut ensuite être réarrangée en équation (2), en introduisant  $M_s$  (g) la masse de phase réceptrice et  $R_s$  ( $L j^{-1}$ ) le taux d'échantillonnage de l'analyte considéré,

$$C_W = \frac{C_S M_S}{R_S t} \quad (2)$$

ou plus simplement dans l'équation (3),

$$C_W = \frac{N_S}{R_S t} \quad (3)$$

avec  $N_S$  ( $\mu\text{g}$  ou  $\text{ng}$ ) la masse de l'analyte séquestré dans la phase réceptrice.

Parmi les différents types d'échantillonneurs passifs, on peut citer :

- le SPMD (*semipermeable membrane device*), le plus ancien (Huckins *et al.*, 1990), et le LDPE (*low-density polyethylene*; Muller *et al.*, 2007) permettant l'échantillonnage des composés hydrophobes ( $\log K_{OW} > 3$ ), tels que les HAP ;
- le MESCO (*membrane-enclosed silicone collector*) et le SR ou PDMS (*silicon rubber* ou polydiméthylsiloxane), convenant également aux composés hydrophobes (Paschke *et al.*, 2006 ; Rusina *et al.*, 2010) ;
- le Chemcatcher<sup>®</sup>, adaptable pour différents types de contaminants (Kingston *et al.*, 2000) et parfois désigné sous le terme général de POS (*polar organic sampler*), utilisant la plupart du temps des disques d'extraction Empore<sup>™</sup> (3M<sup>™</sup>) SDB-RPS (*styrène-divinylbenzène-reverse phase sorbent*) ;
- le DGT (*diffusive gradient in thin-film*), spécifique aux contaminants métalliques (Zhang et Davison, 1995) ;
- le POCIS (*polar organic chemical integrative sampler*), utilisé principalement pour les composés pharmaceutiques et les pesticides (Alvarez, 1999 ; Alvarez *et al.*, 2004).

Parmi ces dispositifs, c'est le POCIS qui est le plus adapté au suivi de la concentration des pesticides en milieu aquatique.

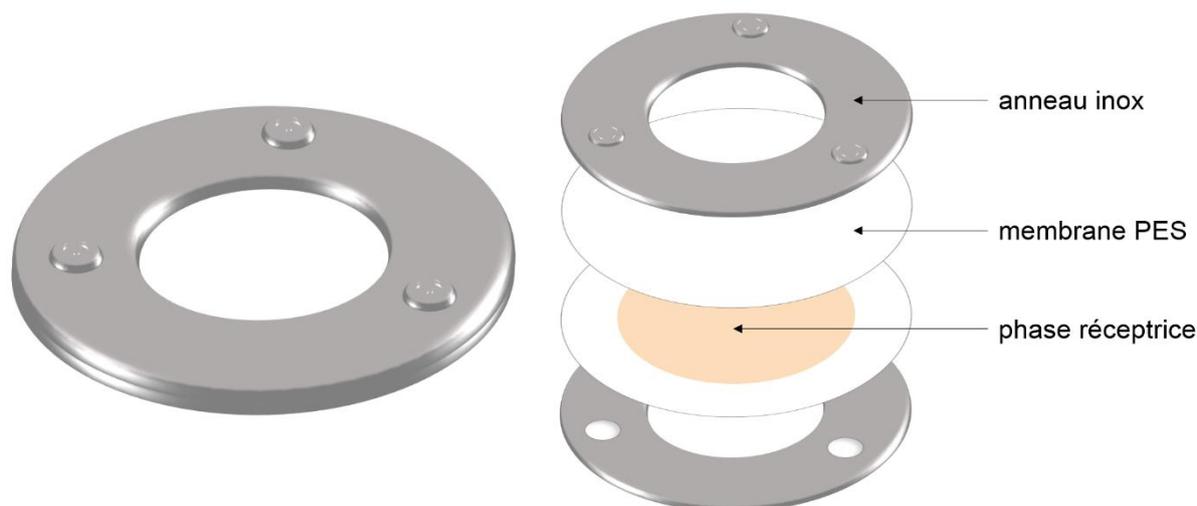


Figure 5 : Un POCIS, fermé à gauche et ouvert à droite.

Il se compose d'une phase réceptrice (adsorbant poreux, 200 mg/POCIS) séquestrée entre deux membranes PES (polyéthersulfone, 0,1  $\mu\text{m}$  de diamètre de pore), le tout compressé par deux anneaux en acier inoxydable vissés l'un à l'autre (Figure 5). Deux configurations commerciales existent pour la phase réceptrice : la configuration « pesticide », avec un adsorbant triphasique (Isolute ENV+, Biobeads S-X3 et Amborsorb 1500) ; la configuration « pharmaceutique », composée d'un copolymère de divinylbenzène et de N-vinylpyrrolidone (lipophile-hydrophile) appelée Oasis<sup>®</sup> HLB. Cette dernière configuration s'avère la plus adaptée pour l'échantillonnage des pesticides polaires, tels que les herbicides (Vermeirssen *et al.*, 2005 ; Mazzella *et al.*, 2007). De manière plus générale, ces POCIS sont bien adaptés à l'échantillonnage des composés hydrophiles à moyennement hydrophobes, ayant un  $\log K_{\text{OW}}$  compris entre 0 et 4 (Mazzella *et al.*, 2007 ; Martínez Bueno *et al.*, 2009 ; Lissalde *et al.*, 2011 ; Belles, 2012 ; Fauvelle, 2012 ; Ibrahim, 2013). C'est par exemple le cas des herbicides de la famille des chloroacétanilides, triazines et phénylurées, ainsi que des fongicides de la famille des morpholines et strobilurines.

Cependant, pour plusieurs substances très hydrophiles ( $\log K_{\text{OW}} < 2$ ) ou très hydrophobes ( $\log K_{\text{OW}} > 4$ ), l'utilisation des POCIS « pharmaceutiques » peut s'avérer moins adaptée : les composés très hydrophiles (par exemple, les herbicides très polaires de la famille des sulfonilurées) atteignent trop rapidement un régime d'équilibre entre la phase réceptrice et la phase aqueuse extérieure, ou possèdent un taux d'échantillonnage trop faible (Mazzella *et al.*, 2007 ; Belles, 2012 ; Fauvelle, 2012) ; c'est l'inverse pour les composés très hydrophobes (par exemple, les insecticides de la famille des organophosphorés), où un temps de latence (*lag effect* en anglais), correspondant au temps entre l'immersion du POCIS dans le milieu et le début de l'accumulation du composé dans la phase réceptrice, a été observé avec les membranes en PES (Belles, 2012 ; Vermeirssen *et al.*, 2012). Une partie des travaux de thèse d'Angel Belles (Belles, 2012) a été consacrée au développement de

POCIS remédiant aux problèmes cités ci-dessus : l'utilisation d'un gel diffusif entre la membrane et la phase réceptrice peut permettre le ralentissement de l'accumulation des composés très hydrophiles et donc une atteinte plus lente du régime d'équilibre ; l'utilisation de membranes en nylon très poreuses (30  $\mu\text{m}$  de diamètre de pore) peut permettre de gommer le temps de latence pour l'accumulation des composés très hydrophobes (Belles *et al.*, 2014).

Outre les caractéristiques physico-chimiques des substances, différents paramètres environnementaux vont également influencer sur le taux d'échantillonnage :

- le débit : une augmentation du débit aura pour conséquence la diminution de l'épaisseur de la couche statique d'eau (ou couche limite d'eau, à l'interface entre la phase aqueuse externe et la membrane). Cela induira alors un transfert plus rapide des molécules à travers cette couche, pouvant mener dans certaines conditions à une augmentation du taux d'échantillonnage. L'influence de ce paramètre reste cependant modérée, et ne s'applique pas aux composés hydrophobes dont le transfert vers la phase réceptrice est davantage déterminé par la membrane (Li *et al.*, 2010b) ;
- la température : une augmentation de la température favorise les processus de diffusion et a donc pour conséquence un accroissement de la vitesse d'accumulation. Cependant, l'augmentation de température réduit également l'affinité des composés pour la phase réceptrice. Ainsi, c'est la combinaison de ces deux phénomènes qui dictera l'augmentation ou la diminution du taux d'échantillonnage en fonction de la température (Togola et Budzinski, 2007 ; Li *et al.*, 2010a) ;
- l'encrassement biologique (ou *biofouling*) : lors de l'immersion prolongée d'un échantillonneur passif, celui-ci va être sujet à la colonisation par divers microorganismes, comme le biofilm, notamment dans les eaux chaudes et en présence d'une intensité lumineuse suffisante. Cela peut avoir pour conséquence une diminution du taux d'échantillonnage du fait de l'ajout d'une couche supplémentaire à traverser pour les composés et du potentiel colmatage des pores par les microorganismes (Alvarez *et al.*, 2004) ;
- la matière organique dissoute : la présence de MOD ( $< 0,45 \mu\text{m}$ ) peut diminuer le taux d'échantillonnage des molécules hydrophobes en raison de la formation de complexes, alors trop gros pour traverser les membranes. C'est davantage vrai pour les SPMD, dont les membranes ont un diamètre de pore d' $1 \text{ \AA}$ , alors que pour les POCIS, les membranes en PES ont un diamètre de pore supérieur, égal à  $0,1 \mu\text{m}$  (Belles, 2012) ;
- enfin, le pH et la salinité peuvent également influencer légèrement le taux d'échantillonnage : pour le pH, cela est notamment vrai pour les composés dont le  $pK_a$  est compris dans la gamme de pH de la phase aqueuse échantillonnée. Le taux d'échantillonnage augmente avec le pH

pour les composés basiques alors que c'est l'inverse pour les composés acides (Li *et al.*, 2011) ; une légère diminution peut être observée, notamment pour les composés acides, lors de l'augmentation de la salinité. Ce phénomène est probablement dû à une augmentation de la force ionique de la phase aqueuse avec la salinité, diminuant la solubilité des composés et ralentissant leur transfert vers la phase réceptrice (Togola et Budzinski, 2007).

Lors de l'utilisation des échantillonneurs passifs en conditions réelles, c'est-à-dire sur le terrain, les différents paramètres environnementaux énoncés ci-dessus modifient le taux d'échantillonnage des contaminants et invalident de ce fait les mesures réalisées en laboratoire. Pour remédier à ce problème, l'approche des PRC (Performance Reference Compound) a été développée par Huckins *et al.* (2002) pour permettre la détermination *in-situ* des taux d'échantillonnage. Le principe consiste à mesurer la constante cinétique de dissipation *in-situ* d'un composé, le PRC (préalablement ajouté à la phase réceptrice de l'échantillonneur passif), pour ajuster les taux d'échantillonnage des composés suivis selon les conditions du terrain. Les composés utilisés comme PRC doivent être choisis rigoureusement selon plusieurs critères :

- absence du milieu échantillonné (composés marqués avec des isotopes stables tels que le  $^{13}\text{C}$  ou deutérés, par exemple) ;
- comportement similaire aux composés suivis (échange isotrope), l'accumulation des composés suivis et la dissipation du PRC sont donc théoriquement affectés de manière similaire par les conditions environnementales ;
- dissipation mesurable avec précision et quantité résiduelle comprise entre 20 et 80% (Huckins *et al.*, 2002).

Bien que cette approche ait été en premier lieu développée pour les échantillonneurs passifs de type SPMD, Mazzella *et al.* (2010) ont par la suite adapté cette approche aux POCIS via l'utilisation comme PRC de la déisopropylatrazine (DIA), un métabolite de l'atrazine (herbicide de la famille des triazines), dont la dissipation importante de la phase réceptrice (Oasis HLB<sup>®</sup>) vers la phase aqueuse avait été mise en évidence dans une précédente étude (Mazzella *et al.*, 2007). Les couples taux d'échantillonnage des composés d'intérêt ( $R_{S \text{ labo}}, \text{L g}^{-1}$ ) / constante de dissipation des PRC ( $K_{e \text{ labo}}, \text{j}^{-1}$ ) sont préalablement déterminés en conditions calibrées en laboratoire. Ensuite, le taux d'échantillonnage des composés *in-situ* ( $R_{S \text{ in-situ}}, \text{L g}^{-1}$ ) est corrigé après mesure de la constante de dissipation des PRC *in-situ* ( $K_{e \text{ in-situ}}, \text{j}^{-1}$ ), via l'équation (4) :

$$R_{S \text{ in-situ}} = R_{S \text{ labo}} \frac{K_{e \text{ in-situ}}}{K_{e \text{ labo}}} \quad (4)$$

La correction du taux d'échantillonnage *in-situ* suivant les paramètres environnementaux du milieu échantillonné en utilisant l'approche PRC permet donc une mesure plus précise de la concentration moyenne intégrée des composés durant la période d'échantillonnage. Cependant, du fait des nombreux critères de sélection à respecter pour l'utilisation de PRC, notamment concernant l'échange isotrope qui n'a pour le moment été démontré que pour deux molécules (DIA et cyanazine) avec la phase Oasis HLB® (Mazzella *et al.*, 2010 ; Belles *et al.*, 2014), l'application de cette approche pour les POCIS reste pour le moment limitée (Morin *et al.*, 2018). De ce fait, les concentrations déterminées à l'aide de POCIS sont toujours marquées par une certaine incertitude (Miège *et al.*, 2015). Cependant, d'autres travaux, tels que ceux réalisés par Poulier *et al.* (2014), discutent et proposent des solutions concernant l'utilisation des POCIS pour la surveillance environnementale réglementaire, telle que celle imposée par la DCE.

Dans ce manuscrit, une approche combinant : i) l'utilisation de POCIS, pour évaluer la contamination d'un site d'étude à influence majoritairement viticole, et ii) un microbioessai, développé dans le but de déterminer le potentiel toxique des extraits de POCIS sur la croissance de deux espèces de microalgues marines, a été utilisée pour répondre au cinquième objectif général de la thèse.

La première partie de ce manuscrit montre que les pesticides sont à l'origine d'une contamination des eaux superficielles continentales et côtières, faisant suite à leur utilisation à la fois en viticulture et dans les peintures anti-salissures appliquées sur la coque des bateaux. Cette utilisation est encadrée rigoureusement par une réglementation à plusieurs niveaux, et est mesurable via différents outils, dont les échantillonneurs passifs qui présentent plusieurs avantages par rapport aux techniques d'échantillonnage plus classiques.

Les parties suivantes présentent les organismes utilisés pour ces travaux, des microalgues marines et des larves d'huître. La toxicité de différents pesticides testés dans ces travaux pour ces organismes, ainsi que les méthodes disponibles pour la mesurer, sont également décrites.

## 2. Les microalgues, producteur primaire à la base des réseaux trophiques aquatiques

### 2.1. Généralités

Les microalgues jouent un rôle essentiel dans le fonctionnement des écosystèmes aquatiques. Ces organismes eucaryotes, unicellulaires et photosynthétiques, dont la taille varie d'un à plusieurs centaines de micromètres, sont responsables de près de la moitié du CO<sub>2</sub> fixé et de l'O<sub>2</sub> rejeté annuellement, au niveau global, grâce au processus de photosynthèse (Chuecas *et al.*, 2016). Les microalgues sont majoritairement aquatiques. Elles vivent de manière libre dans la colonne d'eau (pour les espèces pélagiques/planctoniques, le phytoplancton) ou fixées à un substrat (périphyton, responsable de l'encrassement biologique ; microphytobenthos pour les espèces benthiques).

La diversité des microalgues est très vaste. L'article de de Vargas *et al.* (2015), issu des résultats obtenus par la campagne *Tara Oceans*, donne une estimation de cette diversité en se basant sur les unités taxonomiques opérationnelles (*operational taxonomic units*, OTU en anglais) ; une OTU correspondant à un regroupement d'individus d'une même espèce dont les séquences d'ARN (acide ribonucléique) ribosomal (18S) présentent une forte similitude. Ainsi, alors qu'environ 4350 espèces de phytoplancton marin sont aujourd'hui décrites au niveau morphologique et cataloguées, environ 12 000 OTUs ont été identifiées, impliquant une diversité potentielle quasiment trois fois supérieure par rapport à celle actuellement connue. Cette remarquable diversité génétique et phénotypique permet aux microalgues d'avoir une répartition quasi ubiquiste dans la biosphère, s'adaptant aux milieux les plus extrêmes comme les sources géothermales (Costas *et al.*, 2008).

Historiquement, les réseaux trophiques pélagiques étaient considérés de manière très basique, avec l'existence de seulement trois niveaux (Steele, 1974). Le concept de « boucle microbienne » fut ensuite introduit par Azam *et al.* (1983), démontrant l'importance des microorganismes hétérotrophes. Par la suite, Sherr et Sherr (1988) proposèrent un nouveau concept de réseau trophique appelé « réseau trophique microbien » dans lequel les microorganismes autotrophes et hétérotrophes jouent un rôle clé pour le soutien des niveaux trophiques supérieurs et le fonctionnement des écosystèmes. Plus récemment, des approches recourant à la modélisation ont permis de décrire de nouvelles structures pour les réseaux trophiques (Hlaili *et al.*, 2014). Toutes ces études ont un point commun : elles illustrent l'importance du phytoplancton et de son rôle de producteur primaire dans les réseaux trophiques.

En plus de leur rôle clé dans les écosystèmes aquatiques, les microalgues représentent une ressource largement exploitée par diverses activités humaines, parmi lesquelles on peut citer :

- l'aquaculture, exploitant diverses espèces de microalgues pour le nourrissage direct des stades larvaires de mollusques bivalves, crustacés, poissons, ou indirect via le zooplancton (crevettes, poissons) (Muller-Feuga *et al.*, 2007) ;
- diverses applications ayant trait à la biotechnologie, comme la production de composés utilisés comme cosmétiques ( $\beta$ -carotène), compléments alimentaires (acides gras polyinsaturés), médicaments, et biocarburant, ainsi que pour le traitement des eaux usées/polluées (Venkatesan *et al.*, 2015).

En plus d'une bonne représentativité au niveau environnemental, comme souligné ci-dessus, les microalgues présentent également de nombreux avantages relatifs à leur utilisation dans des expérimentations contrôlées en laboratoire (section 4.1) et sont donc considérées comme un organisme modèle en écotoxicologie.

Dans ces travaux, trois espèces, appartenant à trois classes distinctes, les Bacillariophycées (diatomées), les Chlorodendrophytcées et les Prymnesiophycées (Figure 6), ont été étudiées.

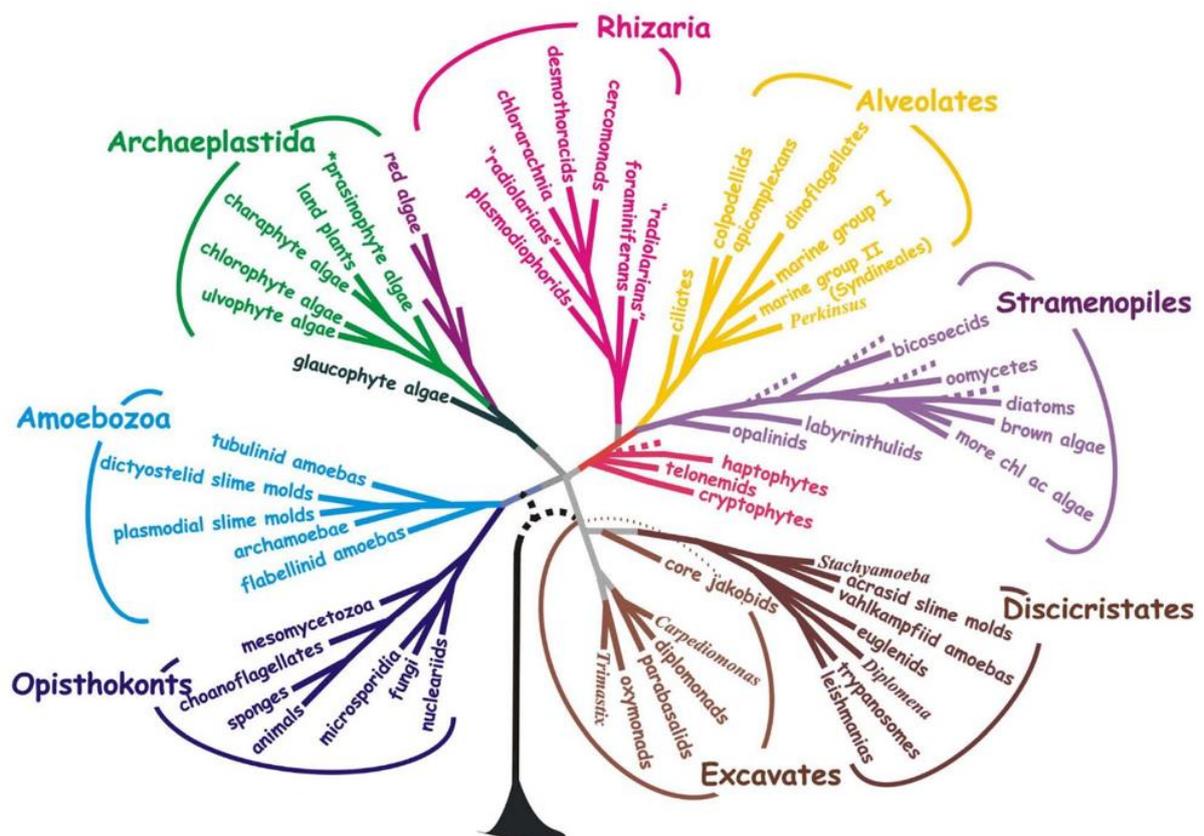


Figure 6 : Phylogénie consensus des principaux groupes d'eucaryotes basée sur des données de phylogénétique moléculaire et d'ultrastructure (Baldauf, 2003). D'après Baldauf (2008).

## 2.2. Les Bacillariophycées (diatomées)

Les Bacillariophycées, plus communément appelées diatomées, appartiennent à l'une des classes regroupant le plus d'espèces décrites tous milieux confondus (eaux douces, saumâtres et marines). Les diatomées seraient responsables de la moitié de la fixation totale de carbone d'origine marine et d'1/5<sup>ème</sup> de la production totale d'oxygène sur Terre (van den Hoek *et al.*, 1995 ; Amato, 2010). Cette classe se démarque par la présence d'un frustule, paroi siliceuse composée de deux valves, l'hypovalve et l'épivalve, reliées entre elle par une ceinture appelée le cingulum. Les diatomées sont divisées en deux ordres selon le plan de symétrie du frustule, radial pour les Centrales et bilatéral pour les Pennales. Concernant leur composition pigmentaire, deux formes de chlorophylle sont retrouvées chez les diatomées : la chlorophylle *a* et *c* (majoritairement  $c_1$  et  $c_2$ ). Plusieurs pigments caroténoïdes sont également retrouvés, par exemple le  $\beta,\beta$ -carotène qui est un précurseur de la vitamine A, ou encore des xanthophylles tels que la diatoxanthine ou la diadinoxanthine, jouant un rôle important dans la protection contre la photoinhibition (Kuczynska *et al.*, 2015). Les lipides peuvent représenter jusqu'à 25% du poids sec total chez les diatomées, d'où leur place de potentielles candidates pour la production des biocarburants du futur (Levitan *et al.*, 2014). Certaines espèces, comme *Skeletonema marinoi* (Figure 7) et *Chaetoceros calcitrans*, sont également très utilisées en aquaculture (nourrissage des larves d'huître, par exemple ; Alonso *et al.*, 2012). Leur reproduction se fait majoritairement de manière asexuée par division cellulaire, donnant naissance à deux cellules filles, une de taille identique à la cellule mère et l'autre de taille inférieure. La reproduction sexuée a lieu principalement lorsque la taille des cellules atteint une taille minimale (inférieure à un certain seuil), mais peut également permettre de survivre dans un environnement présentant des conditions défavorables.

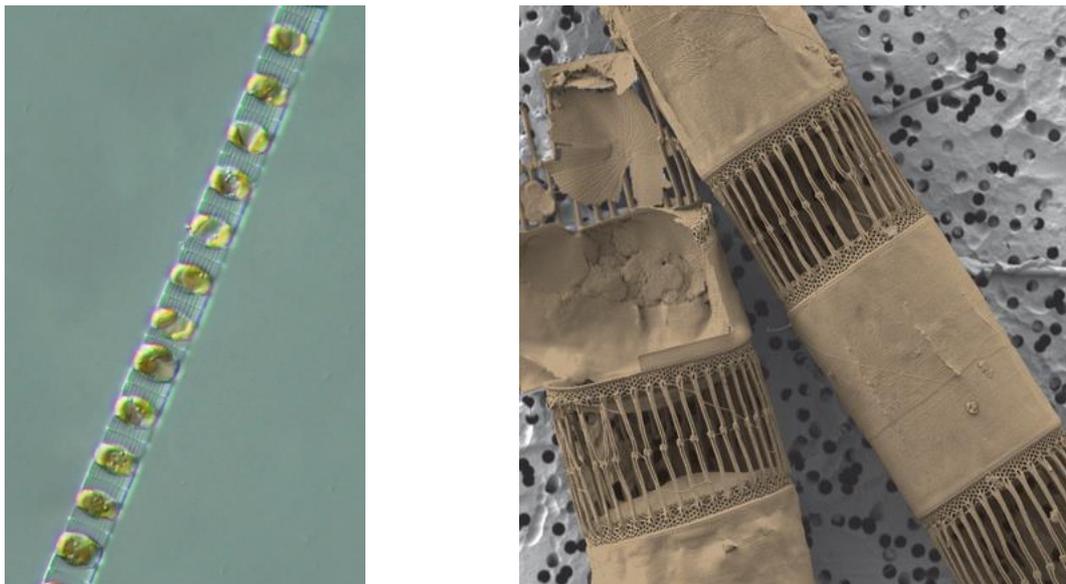


Figure 7 : À gauche, cellules de *Skeletonema marinoi* formant une chaîne, observées par microscopie optique (Bengt Karlson<sup>©</sup>). À droite, cellules de *S. marinoi* observées en microscopie électronique à balayage (MEB) (Lars Edler et Gustaaf Hallegraeff<sup>©</sup>).

### 2.3. Les Chlorodendrophycées

La classe des Chlorodendrophycées, appartenant précédemment à la classe des Prasinophycées (Massjuk, 2006 ; Fučíková *et al.*, 2014), compte aujourd'hui 46 espèces décrites, tous milieux confondus (Guiry et Guiry, 2017). Les cellules peuvent être non mobiles (parfois sous forme de colonies) ou mobiles, possédant alors, dans la plupart des cas, quatre flagelles. Les cellules possèdent une paroi cellulaire faite d'une seule ou plusieurs couches. Cette paroi, aussi appelée thèque, est constituée d'une multitude de sous-unités similaires à des écailles (Domozych *et al.*, 2012). Les pigments retrouvés chez cette classe sont principalement la chlorophylle *a* et *c*, des caroténoïdes et des xanthophylles. Concernant le stockage des lipides, celui-ci se fait principalement sous forme de gouttelettes (Chirapart *et al.*, 2015). Enfin, leur reproduction se fait principalement par division cellulaire. Plusieurs espèces de cette classe, dont la microalgue *Tetraselmis suecica* (Figure 8), sont parmi les espèces les plus utilisées en aquaculture (Alonso *et al.*, 2012) et en biotechnologie (Montero *et al.*, 2011), du fait de leur contenu cellulaire riche en lipides (jusqu'à 25% du poids sec).



Figure 8 : À gauche, cellules de *Tetraselmis suecica*, observées par microscopie confocale (Emily Roberts<sup>©</sup>). À droite, cellule de *Tetraselmis indica* observée en microscopie électronique à balayage (MEB) (Arora *et al.*, 2013).

### 2.4. Les Prymnesiophycées

Les Prymnesiophycées sont présentes dans tous les milieux aquatiques, bien qu'elles soient davantage retrouvées dans les océans tropicaux et subtropicaux. Ce sont des organismes unicellulaires mobiles, généralement pourvus de deux flagelles et d'un haptonème (appendice filiforme jouant un rôle sensoriel, d'ancrage et dans la nutrition) et d'un ou deux chloroplastes (Edwardsen *et al.*, 2000). C'est dans cette classe que l'on retrouve les coccolithophoridés qui ont la particularité d'être recouverts d'écailles calciques appelées coccolithes. Après sédimentation, ces écailles forment une craie, qui

constitue aujourd'hui (en grande partie) les falaises de Douvres et d'Étretat. Certaines espèces, comme *Emiliana huxleyi* (Figure 9), sont également responsables d'efflorescences (*bloom* en anglais). Les principaux pigments retrouvés sont la chlorophylle *a*, *c*<sub>1</sub>, *c*<sub>2</sub> et *c*<sub>3</sub> ainsi que les caroténoïdes  $\beta,\beta$ -carotène, diatoxanthine, diadinoxanthine and fucoxanthine (Berger *et al.*, 1977 ; Vaultot *et al.*, 1994). Comme pour les deux autres classes décrites précédemment, certaines Prymnesiophycées, comme la microalgue tropicale *Tisochrysis lutea* (Figure 9) sont aussi très utilisées en aquaculture (Alonso *et al.*, 2012) et en biotechnologie (Garnier *et al.*, 2014).

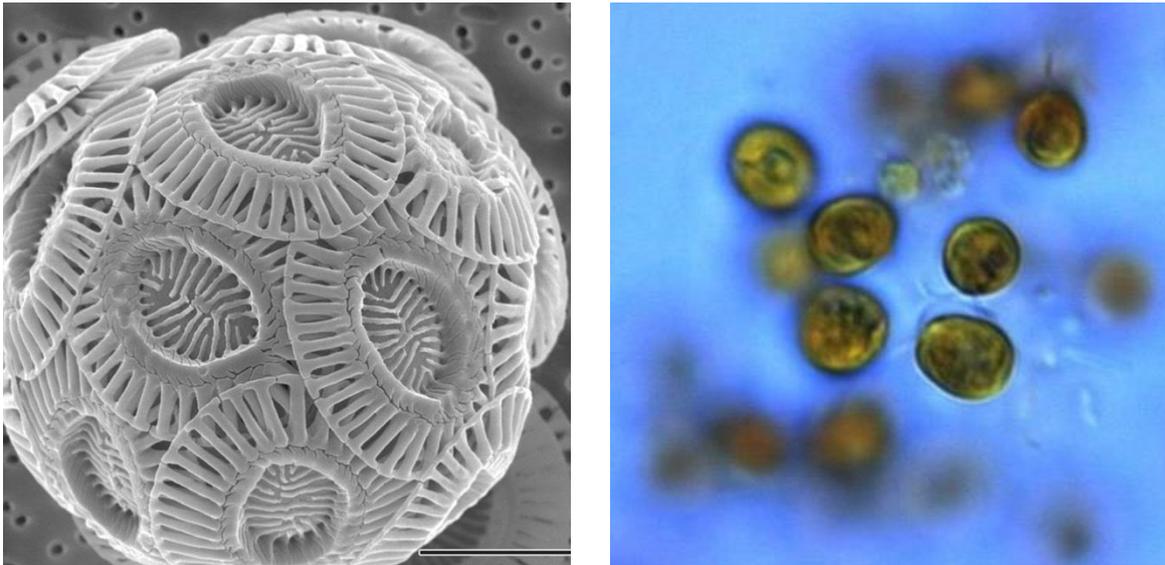


Figure 9 : À gauche, cellule d'*Emiliana huxleyi* observée en microscopie électronique à balayage (MEB ; Alison R. Taylor<sup>©</sup>). À droite, cellules de *Tisochrysis lutea*, observées par microscopie (Raymond Kaas<sup>©</sup>).

## 2.5. La photosynthèse

Les microalgues sont des organismes phototrophes : elles synthétisent leur propre matière organique à partir du dioxyde de carbone en utilisant l'énergie lumineuse des photons et produisent ainsi de l'oxygène par la dissociation de l'eau, via le processus de photosynthèse oxygénique (Figure 10). Ce processus permet de maintenir constant le taux d'oxygène dans l'atmosphère et fournit également la majorité de la matière organique et de l'énergie utilisées par les organismes terrestres (Bryant et Frigaard, 2006).

La photosynthèse prend place au niveau de la membrane des thylakoïdes, dans le chloroplaste. Elle se divise en deux réactions :

- la réaction claire (ou photophosphorylation) qui permet la production d'ATP (adénosine triphosphate), assure le stockage de l'énergie photonique sous forme chimique, et la production de NADP (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, une coenzyme), par oxydation de l'eau ;

- la réaction sombre, ne nécessitant pas l'énergie des photons, permet la fixation du carbone via le cycle de Calvin en utilisant l'ATP et le NADP produits lors de la réaction claire.

L'équation générale de la photosynthèse est la suivante :  $n\text{CO}_2 + n\text{H}_2\text{O} \rightarrow (\text{CH}_2\text{O})_n + n\text{O}_2$ .

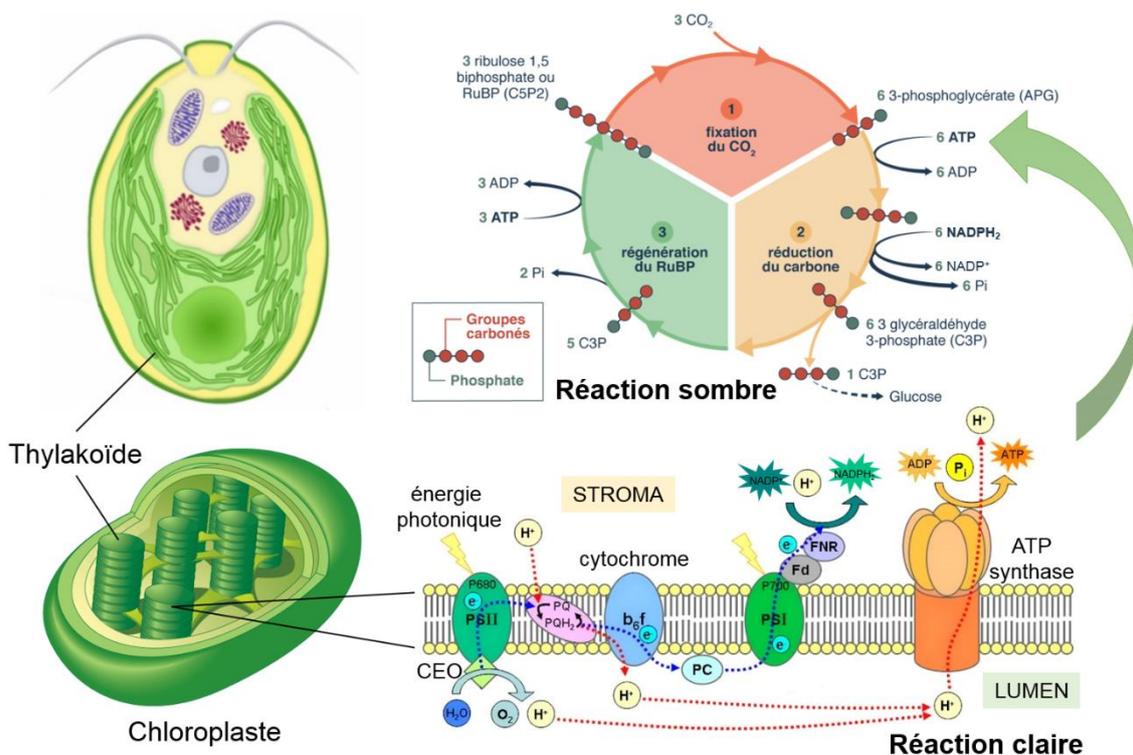


Figure 10 : Schéma général de la photosynthèse oxygénique. PS II : photosystème II ; CEO : complexe d'émission d'oxygène ; e<sup>-</sup> : électron ; PQ/PQH<sub>2</sub> : plastoquinone ; b<sub>6</sub>f : complexe cytochrome b<sub>6</sub>f ; PC : plastocyanine ; PS I : photosystème I ; Fd : ferrédoxine ; FNR : ferrédoxine-NADP<sup>+</sup> réductase. Modifié d'après Educaplay<sup>©</sup>, Yikrazuul<sup>©</sup> et SchoolMouv<sup>©</sup>.

La réaction claire débute au niveau du photosystème II (PSII) situé dans la membrane des thylakoïdes. L'énergie d'un photon est captée par l'antenne collectrice et transférée au complexe P<sub>680</sub>, composé d'un ensemble de pigments et de protéines associés à la chlorophylle *a*. Le complexe alors excité (P<sup>\*<sub>680</sub></sup>) émet un électron (e<sup>-</sup>) qui rejoint alors un accepteur d'électron primaire, la phéophytine. Après l'émission de cet électron, le P<sup>\*<sub>680</sub></sup> oxydé (P<sup>†<sub>680</sub></sup>) retrouve son état fondamental grâce aux électrons produits par la dissociation d'une molécule d'eau (photolyse de l'eau) au niveau du complexe d'émission d'oxygène (CEO). L'électron émis par le P<sup>\*<sub>680</sub></sup> transite ensuite par une chaîne de transport d'électrons : quinones A et B, plastoquinone (PQ/PQH<sub>2</sub>) et cytochrome b<sub>6</sub>f jusqu'à une protéine, la plastocyanine (PC). De là, il rejoint le centre réactionnel du photosystème I (PSI), le complexe P<sub>700</sub>. L'énergie accumulée au niveau du P<sup>\*<sub>700</sub></sup>, lui aussi excité par l'énergie d'un photon (transmis par l'antenne collectrice du PSI), permet un regain d'énergie à l'électron provenant de la plastocyanine. Cet électron rejoint ensuite une autre protéine, la ferrédoxine (Fd), en transitant par une seconde

chaîne de transport d'électrons. Il est finalement utilisé par la coenzyme ferrédoxine-NADP<sup>+</sup> réductase (FNR) catalysant la réduction du NADP<sup>+</sup> en NADPH<sub>2</sub>.

La production d'ATP a lieu de manière simultanée. Les ions H<sup>+</sup> produits par la photolyse de l'eau, additionnés à ceux transférés du stroma vers le lumen lors du passage des électrons à travers le complexe cytochrome b<sub>6</sub>f, établissent un gradient de protons de part et d'autre de la membrane des thylakoïdes. C'est ce gradient électrochimique qui permettra le fonctionnement de l'ATP-synthase et donc la phosphorylation de l'ADP en ATP.

D'après Björkman et Demmig (1987), plus de 90% de l'énergie lumineuse absorbée sont utilisés pour la photosynthèse. Il est intéressant de noter que l'émission d'un électron ne constitue pas l'unique processus de retour à l'état fondamental du P<sup>\*</sup><sub>680</sub> : celui-ci peut également revenir à son état fondamental par l'émission de fluorescence de la chlorophylle *a* (Krause et Weis, 1991) ou par émission de chaleur. En effet, l'émission de fluorescence par la chlorophylle *a* a permis le développement de diverses méthodes aujourd'hui utilisées pour mesurer la croissance ou le rendement photosynthétique des organismes végétaux, dont les microalgues (Maxwell et Johnson, 2000). C'est notamment le cas du test d'inhibition de croissance microalgale réalisé en microplaques et utilisé dans ces travaux de thèse (section 4.2 de ce chapitre et chapitres 3, 4 et 5).

L'accumulation d'énergie au niveau de la chlorophylle *a* aussi pour effet d'entraîner une production d'espèce réactives de l'oxygène (ERO). En absence de stress, les ERO sont produites par le processus de photosynthèse et participent à la signalisation cellulaire : d'une part, la chlorophylle excitée entraîne la formation d'oxygène singulet (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) ; d'autre part, le transport d'électrons induit la formation d'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), et de radical hydroxyle (HO<sup>•</sup>), après réaction avec le dioxygène et l'eau, respectivement (Pospíšil, 2016 ; Prasad *et al.*, 2016). Les ERO étant très réactives, elles peuvent endommager les protéines et les lipides de la membrane des thylakoïdes par oxydation (Nestler *et al.*, 2012). Un système antioxydant permet cependant d'éliminer efficacement ces composés, évitant ainsi qu'ils ne s'accumulent et deviennent toxiques pour la cellule. Il peut être de nature enzymatique via l'action de la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), l'ascorbate peroxydase (APx) ou la glutathione réductase (GR) (Lozano *et al.*, 2014). Il peut également être de nature non-enzymatique, comme le cycle des xanthophylles (qui sont des pigments caroténoïdes) chez les diatomées (Jeffrey et Vesk, 1997 ; Latowski *et al.*, 2011) qui permet la dissipation efficace de l'énergie accumulée par la chlorophylle, empêchant ainsi la production excessive d'ERO. Certains contaminants, comme par exemple les herbicides inhibiteurs du PSII, induisent une surproduction d'ERO qui, en s'accumulant, deviennent toxiques pour les constituants cellulaires (section 4.4.1 de ce chapitre et article 4 du chapitre 4).

La réaction sombre de la photosynthèse prend place dans le stroma et permet la fixation du carbone, via le cycle de Calvin-Benson : l'enzyme RuBisCO (Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase) va permettre la combinaison du CO<sub>2</sub> atmosphérique avec un sucre comportant cinq atomes de carbone, le ribulose 1,5-bisphosphate (RuBP), pour former deux molécules de 3-phosphoglycérate (ou acide 3-phosphoglycérique, APG, sous sa forme protonée). En présence d'ATP et de NADPH<sub>2</sub>, produits durant la réaction claire, le 3-phosphoglycérate sera réduit en glycéraldéhyde 3-phosphate (C3P), aussi appelé triose phosphate. La majorité des trioses phosphate seront utilisés pour la régénération du ribulose 1,5-bisphosphate. Le triose phosphate non recyclé permettra la production d'hexoses phosphate par la suite utilisés pour produire du saccharose, de l'amidon, de la cellulose, ainsi que des précurseurs d'acides aminés et de lipides (Masojídek *et al.*, 2004).

La photosynthèse constitue un processus majeur, permettant la fixation de CO<sub>2</sub> et la production d'O<sub>2</sub> en utilisant l'énergie des photons. Nous verrons dans les parties suivantes que différentes étapes de la photosynthèse constituent une cible pour de nombreux herbicides. La toxicité résultant de l'exposition des microalgues à ces contaminants est mesurable via plusieurs paramètres physiologiques.

Dans les réseaux trophiques marins, le phytoplancton est la source de nourriture principale d'une multitude d'organismes, appelés consommateurs primaires. Parmi ceux-ci, l'huître creuse *Crassostrea gigas* est un mollusque bivalve présentant un intérêt tant au niveau économique qu'écologique. Les premiers stades de développement larvaire de cet organisme étant particulièrement sensibles aux contaminants, cet organisme a également été utilisé dans plusieurs études écotoxicologiques.

### 3. L'huître creuse, consommateur primaire et organisme sentinelle

#### 3.1. Généralités

L'huître creuse, également appelée huître du Pacifique, est un mollusque bivalve de la famille des Ostréidés. Récemment, les travaux de Salvi *et al.* (2014) et Salvi et Mariottini (2017) ont proposé le changement du genre *Crassostrea* en *Magallana*, actuellement accepté par le WoRMS (*World Register of Marine Species*), sur la base de preuves phylogénétiques et biogéographiques. Ce changement de nom a cependant été fermement contesté par un groupe de 27 scientifiques dans l'article de Bayne *et al.* (2017), demandant le retour au genre *Crassostrea*. Le nom de genre le plus répandu étant *Crassostrea*, nous l'utiliserons pour le reste du manuscrit.

L'huître creuse n'a pas toujours été l'espèce majoritairement exploitée en France. Son implantation remonte aux années 1970. Elle fait suite au déclin des populations d'huître portugaise (*Crassostrea angulata*), alors très répandue au niveau du bassin d'Arcachon et de la région de Marennes-Oléron, affectée de manière successive par des maladies et infections virales qui ont entraîné sa disparition (Comps, 1983). Deux opérations visant à planter l'huître creuse en France ont été réalisées, afin d'assurer la création de gisements naturels (opération « resur » de 1971 à 1975) et de fournir des naissains importés du Japon (de 1971 à 1977) aux ostréiculteurs Français.

La production mondiale d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, s'élevait à un peu plus de 570 000 t en 2016, dont 450 000 t produites en Asie. Sans compter la Chine, la France est le troisième producteur mondial avec 64 200 t en 2016, derrière le Japon (près de 160 000 t) et la Corée du Sud (près de 270 000 t ; FAO, 2018). Avec un chiffre d'affaire total des ventes pour la consommation de 565 M€ HT (hors taxes) en 2012 pour la France (Agreste, 2015), l'huître creuse représente donc une ressource économique importante.

Outre l'aspect économique, l'huître creuse, qui est un organisme filtreur, est également utilisée pour sa capacité à bioaccumuler les contaminants et donc pour le suivi de la contamination des eaux côtières. Enfin, les stades larvaires étant particulièrement sensibles aux contaminants, ils sont également utilisés pour évaluer la toxicité de contaminants retrouvés dans les eaux côtières, via notamment le test de toxicité basé sur le développement embryon-larvaire (section 4.1 et partie 3 du chapitre 4).

#### 3.2. Biologie et cycle de vie de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*

*C. gigas* est un organisme filtreur, considéré comme une espèce « ingénieure », se développant sur substrat dur ou mou, en zone intertidale ou subtidale peu profonde. Présente à de fortes densités,

cette espèce est capable de créer des structures tridimensionnelles qui, en augmentant la diversité et la complexité des habitats, permet d'accroître la diversité et l'abondance des espèces associées (Lango-Reynoso *et al.*, 2006 ; Walles *et al.*, 2015). C'est un organisme hermaphrodite irrégulier à tendance protandre. En général, on observe une dominance de mâles chez les jeunes individus, et l'inverse chez les individus plus âgés. L'huître du Pacifique a été sélectionnée pour sa capacité de croissance rapide, pouvant atteindre 15 cm après 2 à 4 années, selon les conditions environnementales du milieu. Elle est relativement résiliente face aux variations de température et de salinité et peut se maintenir à des températures de -1,9°C à 28,9°C et de 5 à 40 de salinité (Shatkin *et al.*, 1997 ; Carrasco et Barón, 2010).

Pour certains contaminants chimiques, l'existence d'une relation linéaire entre la concentration dans le milieu externe et la concentration à l'intérieur d'un organisme (Amiard, 2011) a promu l'utilisation des organismes marins filtreurs tels que les moules ou les huîtres comme organismes « sentinelles » pour le suivi de la contamination des masses d'eau. Ce type de suivi est utilisé dans des programmes de surveillance, tel que « *Mussel Watch* » aux États-Unis ou encore le ROCCH en France. En plus de cette capacité à absorber et bioaccumuler certains contaminants chimiques, l'huître est également utilisée comme organisme modèle pour l'évaluation de la toxicité de diverses substances.

Son cycle de vie (Figure 11) est maîtrisé en laboratoire. Dans le milieu naturel, il débute par la rencontre de l'ovocyte (bloqué en métaphase) et du spermatozoïde (fécondation externe), qui a pour effet de déclencher la maturation des ovocytes. Les premières divisions ont lieu après émission des globules polaires, et aboutissent au stade morula. Au stade blastula, l'embryon est cilié et peut donc se déplacer doucement. Après la gastrulation, le premier stade larvaire est atteint : la larve trochophore, possédant une couronne de cils au pôle apical (prototroche), ressemble en général à une toupie. Au cours de ce stade se forment la bouche, l'estomac, l'intestin et l'anus. Environ 24 heures après la fécondation, le stade larve D est atteint. La larve prend la forme d'un « D » et possède alors un organe de nage appelé vélum, rétractable dans une coquille formée de deux valves et entourant les organes. Le tube digestif devient fonctionnel : la larve passe d'un mode de nourrissage endotrophe (consommation des réserves vitellines) à exotrophe (capture de nourriture externe). Le stade véligère va ainsi durer environ une semaine, permettant la mise en place d'une coquille secondaire et préparant la larve à une profonde métamorphose. Le développement d'un pied, permettant de ramper, caractérise l'entrée dans le stade pédivéligère, toutefois, la présence du vélum permet toujours la nage libre de la larve. Sous l'action de facteurs externes de l'environnement, la larve cherche un support approprié pour s'y fixer définitivement et entamer sa métamorphose, réponse morphogénétique induite par des facteurs endogènes. Au cours de ce processus, le vélum dégénère, des ébauches branchiales et des palpes labiaux permettant le nourrissage apparaissent. Le

Le pied sécrète un ciment permettant la fixation au support choisi, avant de disparaître. La phase de vie benthique débute et une nouvelle coquille se forme dans le prolongement de la précédente. Le naissain est similaire à l'huître adulte et possède tous les organes à l'exception des gonades qui n'apparaîtront que l'année suivante lors de la première maturation.

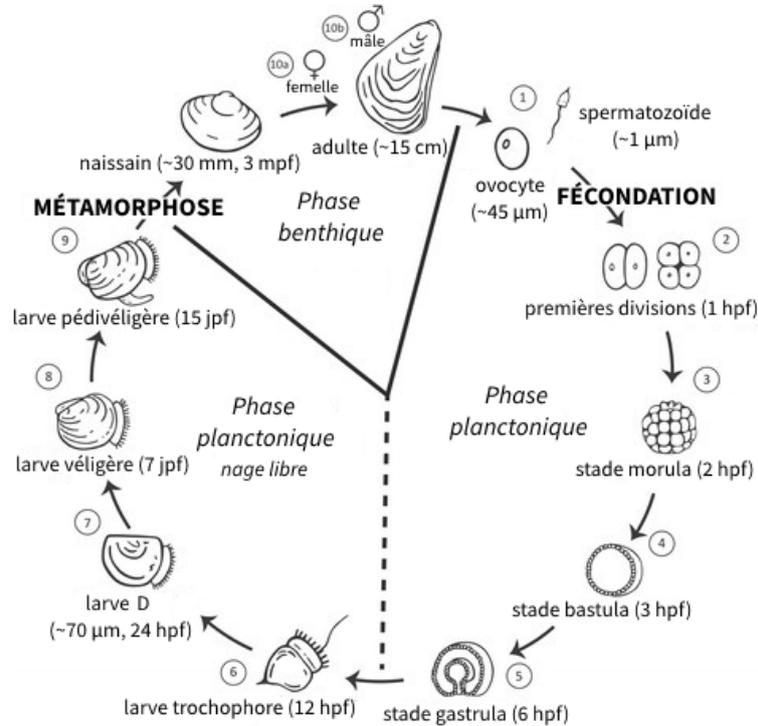


Figure 11 : Cycle de vie de l'huître creuse, *Crassostrea gigas* (hpf, jpf et mpf = heures/jours/mois post-fécondation).

## 4. Mesure de la toxicité des pesticides pour les organismes aquatiques

### 4.1. Généralités

Le grand nombre de substances aujourd'hui utilisées comme pesticides, regroupant des modes d'action et des propriétés physico-chimiques très variés, peut générer un risque toxique pour les organismes qui y sont exposés, aussi appelés organismes « non-cibles ». En effet, la majorité des pesticides ne sont pas sélectifs et sont donc potentiellement toxiques pour l'homme et tous les autres organismes qui y sont exposés. On distingue généralement la toxicité « aiguë » de la toxicité « chronique » :

- La toxicité aiguë décrit les effets toxiques d'une substance suite à une exposition unique ou répétée sur une période de temps restreinte, généralement inférieure à 24 h et pouvant aller jusqu'à 14 jours (IUPAC, 2014). Généralement, celle-ci est mesurée via des valeurs réglementaires (section 4.3) telles que la  $CE_{50}$  (concentration effective induisant une diminution de 50% du paramètre choisi, le plus souvent la croissance), ou  $CL_{50}$  : concentration induisant la mort de 50% des organismes exposés à une substance donnée.
- La toxicité chronique décrit les effets persistants sur le long terme, qu'ils se produisent juste après l'exposition ou qu'ils soient différés. Dans ce cas, les effets sont généralement sublétaux, ayant un impact significatif sur la croissance, la reproduction ou le comportement. La toxicité chronique se mesure également via la détermination de valeurs réglementaires (section 4.3) telles que la NOEC (de l'anglais *no effect concentration*, concentration sans effet observable).

Les organismes aquatiques subissent l'influence directe de la pollution des eaux par les pesticides. Situés dans les premiers maillons de la chaîne trophique, le phytoplancton et les huîtres constituent une ressource écologique précieuse qu'il est nécessaire de préserver.

Étant donné que de nombreuses espèces de microalgues sont cultivables en laboratoire et possèdent un temps de génération court, elles peuvent être utilisées pour des expérimentations en conditions contrôlées et/ou conservées dans des souchothèques pour des besoins ultérieurs. Ainsi, le domaine de l'écotoxicologie a lui aussi su tirer parti des nombreux avantages liés à l'utilisation des microalgues comme organismes modèles, notamment pour le développement de tests de toxicité standardisés permettant la mise en œuvre de directives européennes telles que REACh. Le premier document donnant la ligne directrice à suivre pour un test de toxicité standardisé basé sur l'inhibition de croissance de microalgues dulçaquicoles date de 1984 : c'est le test n°201 de l'OCDE (Organisation de coopération et de développement économiques). Il est aujourd'hui disponible dans sa version révisée (OCDE, 2006). Des tests normalisés, issus de l'OIS (Organisation internationale de

normalisation, ISO en anglais) ont également vu le jour, pour les microalgues d'eau douce (ISO 8692:2012, 2012) et marine (ISO 10253:2016, 2016). Cela a pour but d'harmoniser les méthodes utilisées pour l'évaluation de la toxicité de diverses substances vis-à-vis des organismes aquatiques. Ces tests normalisés permettent la production de jeux de données robustes et reproductibles, sur lesquels il est possible de s'appuyer pour, par exemple, autoriser ou non la mise sur le marché d'une molécule ou encore décider de son interdiction compte tenu de sa toxicité.

Comme c'est le cas pour les microalgues, l'utilisation des stades larvaires de mollusques bivalves présente de nombreux avantages pour la réalisation de bioessais visant à évaluer la toxicité potentielle d'une substance pour le milieu marin. D'une part, les larves sont moins tolérantes aux polluants que les organismes adultes (Martin *et al.*, 1981 ; Quiniou *et al.*, 2005), ce qui permet d'accroître la sensibilité du test. D'autre part, la reproduction des huîtres et l'obtention des premiers stades de développement larvaire sont facilement réalisables en laboratoire. Ainsi, la norme ISO 17244:2015 (2015) décrit un test de toxicité basé sur le développement embryo-larvaire de l'huître creuse ou de la moule commune ou méditerranéenne (*Mytilus edulis* et *galloprovincialis*) comme bioindicateur de la toxicité potentielle des milieux aquatiques.

Les programmes visant à la surveillance et à la protection de l'environnement requièrent une capacité de criblage à la fois performante, rapide mais également rentable pour les laboratoires qui doivent les appliquer. Dans ces travaux de thèse, tester la toxicité d'un grand nombre de substances sur plusieurs espèces, ainsi que déterminer l'effet d'interaction de substances en mélange (par modélisation, section 5.3.1 de chapitre) a également demandé de produire une quantité conséquente de données de toxicité, et nécessitait donc une capacité de criblage importante. Les bioessais standards ne permettent pas forcément de répondre à ces critères et entraînent parfois la mise en œuvre d'expérimentations lourdes et coûteuses. La partie suivante a donc pour but de rappeler l'intérêt de miniaturiser les bioessais, pour une évaluation de la toxicité rapide, fiable et peu coûteuse, permettant de répondre aux enjeux actuels.

## 4.2. Intérêt de miniaturiser les tests de toxicité

### 4.2.1. Historique et généralités

Historiquement, les tests de toxicité étaient réalisés uniquement sur des organismes entiers (macrobioessais) appartenant à des niveaux élevés du réseau trophique, comme par exemple les poissons. Cependant, il a par la suite été mis en évidence que la toxicité dépendait également du niveau trophique, ainsi que des spécificités des polluants testés et des méthodes d'exposition et de

mesure utilisées (Rand et Petrocelli, 1985 ; Rand, 1995). Pour répondre à cette problématique, plusieurs microbioessais furent développés dès les années 1970, utilisant des microorganismes à la base des réseaux trophiques comme les bactéries (Bulich, 1979) et les microalgues (Chiaudani et Vighi, 1978). Face à la quantité croissante de nouvelles substances chimiques produites par l'homme chaque année, et en réponse aux demandes de plus en plus coûteuses des programmes de surveillance de l'environnement, Cram (1989) alerta la communauté scientifique sur le besoin urgent de développer des méthodes rapides, rentables et performantes pour assurer l'évaluation du risque. Le développement et la diversification des microbioessais se sont ainsi accélérés dans les années 1980, avec l'arrivée de tests de toxicité chronique (Blaise *et al.*, 1986 ; Persoone, 1986) et la commercialisation de kits permettant l'évaluation de la toxicité pour divers microorganismes (Vanhaecke et Persoone, 1984 ; Fish *et al.*, 1987). Par la suite, les avancées technologiques et les progrès réalisés dans les domaines de la biologie moléculaire, la génétique et la biotechnologie ont permis d'améliorer considérablement l'efficacité et le débit analytique des bioessais. Encore très peu utilisée aujourd'hui, la capacité de criblage des microbioessais pourrait permettre une surveillance environnementale rentable et performante dans les années à venir. De plus, les applications de ces tests se sont diversifiées, et permettent par exemple la production de jeux de données extensifs nécessaires à diverses méthodes de modélisation, comme par exemple l'étude de l'interaction de substances en mélange.

Des tests en microplaques visant à évaluer l'effet toxique de divers contaminants ont été adaptés avec succès pour les organismes testés dans ces travaux de thèse. Les deux parties suivantes présentent les applications de cette méthodologie aux microalgues et aux larves d'huître, respectivement.

#### 4.2.2. Application aux microalgues

Les microalgues font partie des organismes se prêtant particulièrement bien aux microbioessais. De 1978 à 1996, le nombre de publications relatant l'utilisation de microalgues dans des tests de toxicité miniaturisés en microplaques a été multiplié par six (Blaise *et al.*, 1997). Ce système d'exposition en microplaques présente de nombreux avantages par rapport au test de toxicité de référence réalisé dans des flacons de culture en verre (type « Erlenmeyer » ou ballons de culture) (Blaise *et al.*, 1986) :

- économie d'espace, de milieu de culture et de vaisselle (microplaques à usage unique) ;
- nombre supérieur de conditions/réplicats pouvant être testés simultanément ;
- élimination de biais liés à la réutilisation de verrerie mal lavée et/ou contaminée ;
- fort potentiel d'automatisation et rapidité de mesure accrue (avec l'utilisation d'un lecteur de microplaques, par exemple).

En raison des nombreux facteurs pouvant moduler la toxicité observée lors d'une exposition prolongée à un polluant (changement de pH, adaptation des microalgues, dégradation biotique et/ou abiotique du polluant testé), la plupart des tests développés se font sur des temps courts, en général de 48 à 96 h. Cependant, partant de l'hypothèse que les microalgues peuvent être exposées dans leur milieu naturel à des pics de pollution relativement courts, plusieurs variantes de tests de toxicité aiguë ont été développées pour être réalisées sur des périodes d'exposition très courtes, de 4 à 5 h seulement (Hickey *et al.*, 1991 ; Galgani *et al.*, 1992). Concernant les méthodes utilisées pour l'évaluation de la toxicité, l'inhibition de la croissance est le paramètre le plus souvent exploité via la mesure de la densité cellulaire (par cytométrie en flux, comptage au microscope ou par absorbance/fluorescence). Toutefois, d'autres paramètres comme le contenu intracellulaire en ATP, l'activité estérase ou la motilité ont également été utilisés. Récemment, plusieurs études ont combiné l'utilisation de microplaques à la technique de PAM-fluorescence (*Pulse Amplitude Modulation*) pour étudier la toxicité d'herbicides seuls et en mélange chez plusieurs espèces de microalgues (Escher *et al.*, 2006 ; Magnusson *et al.*, 2010, 2012 ; Sjollema *et al.*, 2014). Cette technique permet la mesure rapide et non-invasive de plusieurs paramètres liés à la photosynthèse, dont son rendement quantique, et donc une évaluation rapide de la toxicité de la substance testée. Toutefois, cette approche est réservée à une certaine catégorie de substances (les herbicides inhibiteurs de la photosynthèse), puisqu'elle cible spécifiquement la photosynthèse.

La majorité de ces tests ont pour but la détermination de valeurs standard de toxicité, telles que les NOEC, ou CE<sub>50</sub> (section 4.3).

Le bioessai parfait n'existant pas, les tests de toxicité en microplaques ne sont pas exempts de biais potentiels. Toutefois, comme c'est le cas pour n'importe quel test de toxicité, le test en microplaques permet l'obtention de résultats fiables à condition de le conduire dans les bonnes conditions. Les principaux facteurs pouvant influencer le résultat du test ont été rigoureusement documentés par Blaise *et al.* (1997) :

- l'évaporation excessive du milieu de culture, principalement due au fait que les couvercles des microplaques sont perméables aux échanges gazeux et permettent ainsi l'évaporation du milieu de culture. Pour pallier ce problème, il est conseillé de placer les microplaques dans un plastique scellé, ou d'entourer la microplaque de parafilm tout en perçant de petits trous à des endroits stratégiques afin de permettre les échanges gazeux *a minima*. Le maintien d'un pourcentage d'humidité atmosphérique élevé (> 50%) est également efficace ;
- « l'effet bord » (*edge effect* en anglais) peut se traduire par une évaporation plus importante ou des échanges gazeux accrus sur les puits situés sur les bords et augmente considérablement la variabilité. Une solution relativement simple consiste à ne pas utiliser ces puits pour

l'expérimentation et à les remplir d'eau afin d'augmenter le pourcentage d'humidité de la microplaque, aidant ainsi à contrecarrer le problème d'évaporation ;

- l'adsorption des substances testées aux parois en polystyrène des microplaques est probablement le problème majeur de ce genre de test (Brown *et al.*, 2001 ; Hirmann *et al.*, 2007 ; Riedl et Altenburger, 2007 ; Stadnicka-Michalak *et al.*, 2014). Bien que ce problème soit également rencontré pour les flacons de culture en verre, l'adsorption en microplaque pourrait être exacerbée en raison d'un rapport volume de culture/volume du contenant supérieur (Hörnström, 1990). L'adsorption dépendant à la fois du matériau utilisé et des propriétés physico-chimiques de la substance évaluée, il conviendra de déterminer si celle-ci est acceptable ou non pour la durée envisagée du test ;
- la contamination croisée, notamment lors de l'utilisation de substances volatiles (Riedl et Altenburger, 2007), peut être facilement évaluée en modifiant la disposition expérimentale des puits : en plaçant des puits « contrôle » à la fois proches de concentrations faibles et fortes, on devrait logiquement remarquer une croissance amoindrie pour les puits contrôles proche de la plus forte concentration si la volatilité (souvent exprimée par le  $\log H$ , logarithme de la « constante de Henry »  $H$ , elle-même basée sur la Loi de Henry) de la substance s'avère significative ;
- les substances colorées et/ou altérant certaines méthodes de mesure comme la fluorescence. Un effluent riche en MOD peut effectivement biaiser la mesure de croissance par fluorescence, la MOD étant elle-même fluorescente. D'autre part, certaines substances, comme certains herbicides ciblant le photosystème II, peuvent modifier la fluorescence de la chlorophylle, biaisant par la même occasion la mesure de la croissance algale.

Cette liste n'est pas exhaustive, mais regroupe les principaux facteurs qu'il est nécessaire de prendre en compte lors de la mise en place d'un microbioessai utilisant des microplaques. Notons que ces biais sont surtout présents pour les tests réalisés sur plusieurs jours. On peut donc imaginer que leur influence reste très limitée pour des périodes d'exposition de quelques heures.

Dans l'optique de faciliter l'acceptation des microbioessais réalisés en microplaques par la communauté scientifique, de nombreuses études se sont attelées à démontrer la reproductibilité du système de test en microplaques face à la méthode de référence utilisant des flacons de culture en verre. La plupart de ces tests ont été réalisés en utilisant des substances toxiques de référence telles que des éléments-traces métalliques ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Sn}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{6+}$ ), du phénol, du dichromate de potassium ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ), du chlorate de potassium ( $\text{KClO}_3$ ), mais aussi quelques herbicides et effluents industriels (Blaise *et al.*, 1986 ; Thellen *et al.*, 1989 ; St-Laurent *et al.*, 1992 ; Eisentraeger *et al.*, 2003 ; Pavlić *et al.*, 2006). L'étude de Thellen *et al.* (1989) est particulièrement informative puisqu'elle

présente les résultats d'un exercice d'intercalibration réalisé par trois laboratoires québécois. Dans cette étude, l'influence d'autres variables spécifiques comme la méthode de culture des microalgues, la présence ou non d'EDTA (acide éthylènediaminetétraacétique) dans le milieu de culture ou d'échanges gazeux actifs (réalisés par aspiration/refoulement à l'aide d'une pipette) a par ailleurs été évaluée. Par comparaison des valeurs de  $CI_{50}$  (concentration inhibitrice médiane du paramètre de toxicité choisi) obtenues dans les deux systèmes de test, tous ces articles ont démontré une très bonne correspondance de la toxicité obtenue, mis à part quelques rares exceptions, démontrant ainsi la fiabilité des tests de toxicité en microplaques.

### 4.2.3. Application aux larves d'huître

En ce qui concerne les bioessais utilisant les larves d'huître, la dernière norme disponible (ISO 17244:2015, 2015) préconise l'utilisation de flacons de culture d'une capacité allant de quelques millilitres à plusieurs litres. Ils peuvent être en verre (lavés et stérilisés) ou en polystyrène transparent dans le cas de l'utilisation de microplaques à usage unique. Le volume des flacons utilisés pour l'expérimentation dépendra donc des objectifs de l'étude : flaconnage de grand volume ( $\geq 1$  L) pour des besoins analytiques nécessitant une grande quantité de matériel biologique (Damiens *et al.*, 2004 ; Wessel *et al.*, 2007) ; flaconnage de petits volume ( $\leq 30$  mL) pour le criblage de la toxicité d'un nombre important de molécules. De ce fait, les avantages associés à l'utilisation d'un système miniaturisé sont les mêmes que ceux décrits dans la partie précédente. La mesure de la toxicité pour ce genre de test se fait par comptage au microscope inversé du pourcentage de larves D anormales après une période de développement de 24 h. Ainsi, l'utilisation de flaconnage de faible volume permet l'évaluation du pourcentage de normalité directement dans le flacon utilisé pour l'expérimentation et permet d'éviter un biais associé à un potentiel sous-échantillonnage lors de l'utilisation de flacons de grand volume. Deux études ont été menées dans le but d'évaluer les effets de la taille du flaconnage sur la concentration et la toxicité des substances testées. L'étude de Cherr *et al.* (1990) a évalué la toxicité de l'azoture de sodium ( $NaN_3$ ) sur le développement embryo-larvaire de *Mytilus californianus* en utilisant des béciers contenant 400 mL d'eau de mer et des mini-chambres de culture en polystyrène contenant 3 mL d'eau de mer. Trois tests appariés ont été réalisés. Les  $CE_{50}$  moyennes déterminées étaient de 25,5 et 26,2  $mg\ L^{-1}$  pour les béciers et les mini chambres de culture, respectivement. Hunt *et al.* (1997) ont mené une étude sur la toxicité du cuivre (sous la forme  $CuCl_2$ ) et du pentachlorophénate de sodium ( $C_6OCl_5Na$ ) sur le développement embryo-larvaire de l'ormeau rouge (*Haliotis rufescens*), en utilisant soit des béciers en verre et en plastique contenant 200 mL d'eau de mer ; soit des flacons à scintillations en verre et des flacons en HDPE (*high-density polyethylene* en anglais, polyéthylène haute densité) contenant 10 mL d'eau de mer. Peu de variations entre les

concentrations de cuivre au début et à la fin de l'expérimentation (48 h) ont été mises en évidence pour la plupart des échantillons. Les parois des contenants utilisés ont été rincées trois fois à l'acide pour analyser la part de cuivre adsorbée aux parois : davantage de cuivre était adsorbé aux parois en plastique, la taille du contenant n'ayant pas ou peu d'influence sur l'adsorption du cuivre. La comparaison de la toxicité obtenue dans les différents contenants, via le calcul de valeurs de  $CE_{50}$  pour les deux substances testées, a démontré une toxicité légèrement supérieure dans les petits contenants. Le matériau utilisé ne semblait pas avoir d'influence sur la toxicité observée. De ce fait, les auteurs recommandent l'utilisation de petits contenants pour la réalisation de ce genre d'expérimentations.

Aujourd'hui, la majorité des bioessais visant à évaluer la toxicité de diverses substances sur le développement embryo-larvaire de l'huître creuse utilisent des petits volumes de test, en microplaques 24-puits (1,8 mL) (Mai *et al.*, 2012, 2013, 2014 ; Gamain *et al.*, 2016) ; ou dans des pots plastiques ou béciers en verre (25-30 mL) (Wessel *et al.*, 2007 ; Akcha *et al.*, 2012 ; Mottier *et al.*, 2013, 2014, 2015). Toutefois, d'autres études visant à mesurer les effets toxiques via d'autres paramètres, par exemple la génotoxicité (test des comètes, mesure de la base oxydée 8-oxo-2'-désoxyguanosine), ou les analyses génomiques/transcriptomiques, nécessitent davantage de matériel biologique et sont par conséquent réalisées en grands volumes (1-3 L) (Barranger *et al.*, 2014, 2016 ; Sussarellu *et al.*, 2018).

Les tests en microplaques permettent, dans la plupart des cas, de tester la toxicité de substances chimiques pour une large gamme de concentrations. Les données issues de ces tests permettent donc le calcul de valeurs standards, nécessitant une gamme de réponse complète, qui sont ensuite utilisées pour comparer la toxicité de différentes substances entre elles, et pour divers organismes. La partie suivante définit les différentes valeurs pouvant être obtenues, ainsi que les méthodes utilisées pour les obtenir.

### 4.3. Valeurs standards en toxicologie et modélisation de la toxicité

Afin de pouvoir évaluer et comparer la toxicité des substances entre elles et entre les différents organismes testés, il a été nécessaire de déterminer des valeurs standard pouvant être utilisées pour l'évaluation de la toxicité des substances chimiques. Cette partie décrit les différents types de valeurs retrouvées dans la littérature, ainsi que les modèles utilisés pour les obtenir et leur utilisation pour diverses applications.

Les valeurs les plus souvent retrouvées sont :

- la  $CL_{50}$ , correspondant à la concentration létale médiane causant la mort de 50% des individus dans la population exposée.
- la  $CE_{50}$ , correspond à la concentration effective pour laquelle 50% de l'effet maximal sur le paramètre suivi (autre que la mort des individus) est observé. Par exemple, si le paramètre suivi est le taux de croissance, cette valeur correspondra à la concentration effective pour laquelle le taux de croissance équivaut à 50% par rapport à celui des témoins (le taux de croissance des témoins étant considéré comme le taux de croissance maximal pour l'expérimentation). Une variante de cette valeur est la  $CI_{50}$ , concentration inhibitrice moyenne, induisant une inhibition de 50% d'une fonction choisie. Toutefois, cette approche cible davantage l'action sur une fonction bien spécifique, par exemple l'action d'une substance sur un récepteur spécifique. Elle est donc moins souvent employée lorsque le paramètre choisi est la croissance, son inhibition pouvant résulter d'une atteinte simultanée de multiples fonctions physiologiques. Notons également que, bien que la valeur la plus souvent retrouvée se base sur un effet égal à 50%, cette valeur peut aussi bien être déterminée pour des valeurs égales à 10, 20 ou 100% ( $CE_{10}$ ,  $CE_{20}$ ,  $CE_{100}$ ) ;
- la CSEO (concentration sans effet observée) ou NOEC (*no observed effect concentration* en anglais) est la concentration maximale testée pour laquelle aucun effet n'est observé. De manière analogue, la LOEC (*lowest observed effect concentration* en anglais) correspond à la concentration minimale testée pour laquelle un effet est observé. Toutefois, plusieurs études ont alerté la communauté scientifique sur les biais associés à l'utilisation de la NOEC : celle-ci dépend de la gamme de concentration testée, ainsi que de la « qualité » de la condition témoin (Chapman *et al.*, 1996 ; Scholze, *et al.*, 2001 ; Fox *et al.*, 2012). Ainsi, il a été proposé d'utiliser à la place une valeur de  $CE_x$ , le problème restant alors de déterminer quel niveau d'inhibition choisir. L'étude récente menée par Beasley *et al.* (2015) semble démontrer que la  $CE_{10}$  serait la plus à même de remplacer la NOEC.
- la PNEC (*predicted no effect concentration* en anglais) correspond à la concentration prédite comme n'induisant aucun effet pour l'écosystème considéré. Contrairement aux autres valeurs, celle-ci est utilisée dans un but davantage « conservateur ». Elle est fréquemment utilisée pour l'évaluation du risque. Elle est calculée à partir des valeurs citées ci-dessus ( $CE_x$ , NOEC), lesquelles sont alors divisées par un facteur d'évaluation ou de sécurité (*assessment factor* en anglais) allant de 1 à 1000. Plus la fiabilité des valeurs utilisées pour sa détermination est élevée, plus ce facteur sera petit, cependant, sa valeur dépend également de l'écosystème considéré. Un guide permettant d'évaluer le facteur d'évaluation à appliquer est fourni par l'ECHA.

La détermination de ces valeurs est recommandée par les différentes normes ISO décrivant les procédures standards pour réaliser un test de toxicité avec des microalgues d'eau douce (ISO 8692:2012, 2012), d'eau marine (ISO 10253:2016, 2016) et les larves d'huître (ISO 17244:2015, 2015) et également dans le règlement REACH. Ces valeurs sont donc indispensables pour l'évaluation du risque chimique, mais sont également utilisées à des fins de modélisation pour la prédiction de la toxicité de molécules seules ou en mélanges.

Le calcul de ces valeurs se fait la plupart du temps via des modèles de régression non-linéaires permettant l'obtention des courbes sigmoïdes dite « courbes concentration-réponse ». Les plus connus se basent sur des fonctions de la distribution normale (modèle Probit), logistique (modèle Logit) ou de Weibull (modèle de Weibull). Les plus utilisés pour la détermination des  $CE_x$  sont les modèles log-logistique, dont l'équation (5) pour le modèle à quatre paramètres est

$$f(z, (b, d, e)) = c + \frac{d}{1 + \exp\{b(\log(z) - \log(e))\}} \quad (5)$$

où la réponse, par exemple le taux de croissance  $\mu$ , est décrite par :  $z$ , la concentration de la substance testée ;  $b$ , la pente de la courbe concentration-réponse ;  $c$  et  $d$ , les limites asymptotiques basses et hautes ;  $e$ , la  $CE_{50}$ . Par ailleurs ce modèle peut se simplifier en un modèle à trois paramètres en faisant l'hypothèse que la limite basse  $c$  (par exemple, le taux de croissance minimal) tendra vers 0 dans le cas d'une exposition à des concentrations infiniment grandes d'un polluant. Un exemple de courbe dose-réponse est illustré par la Figure 12.

La courbe concentration-réponse modélisée par le modèle log-logistique est antisymétrique par rapport à l'effet médian (inhibition de 50% du taux de croissance). De ce fait, ce modèle manque parfois de flexibilité, contrairement au modèle de Weibull qui lui est asymétrique et peut donc s'appliquer à un plus grand nombre de cas (Scholze, *et al.*, 2001).

Certains logiciels, tels que le logiciel R (R Development Core Team, 2008) avec le package 'drc', incluent une fonction permettant de tester les différents modèles concentration-réponse et de choisir le plus adapté en conséquence (Ritz *et al.*, 2015). Cependant, cette approche n'a pas été retenue dans ce manuscrit, et seul le modèle log-logistique à trois paramètres a été utilisé pour tous les calculs de  $CE_x$ . Il apparaît en effet préférable de comparer des valeurs de  $CE_x$  issues d'un même modèle pour les différentes espèces et substances testées. Ce modèle, ainsi que d'autres variantes tels que les modèles log-logistique généralisés ou impliquant une transformation Box-Cox de la variable indépendante  $x$ , sont parmi les plus utilisés pour la détermination de  $CE_x$  en écotoxicologie.

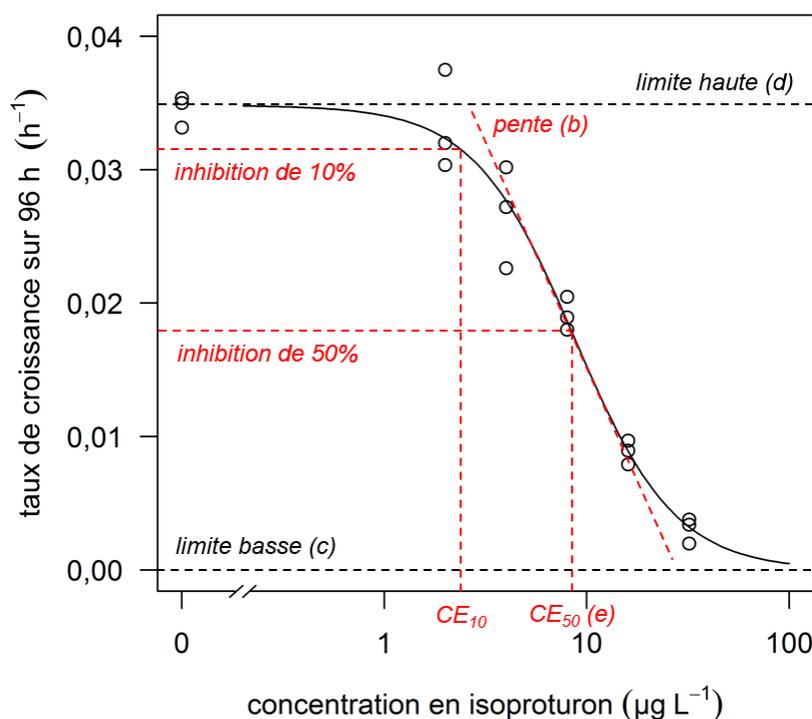


Figure 12: Exemple de courbe concentration-réponse obtenue après exposition de la microalgue *Tisochrysis lutea* à un herbicide, l'isoproturon, pendant 96 h.

#### 4.4. Toxicité des pesticides pour les organismes aquatiques

Le phytoplancton marin et les larves d'huître sont considérés comme des organismes non-cibles. À ce titre, la physiologie de ces organismes peut être significativement affectée par la présence de pesticides dans les milieux aquatiques qu'ils occupent, en raison de la similarité de certaines de leurs structures avec les organismes cibles visés par les pesticides. Dans ce manuscrit, 18 substances chimiques ont été testées sur la larve d'huître creuse et 22 sur les microalgues marines. Ces substances sont présentées dans le Tableau 2.

Parmi ces substances on retrouve sept biocides, dont cinq sont (ZnPT, CuPT et cuivre) ou étaient (diuron et irgarol, interdits (UE) n° 528/2012 et (UE) n° 2016/107) utilisés dans les peintures *antifouling*. L'isoproturon et le diuron sont encore autorisés comme produits de protection pour les pellicules et matériaux de construction. Le fipronil est quant à lui principalement utilisé en tant qu'insecticide et acaricide notamment à des fins de traitements vétérinaires. Ensuite on retrouve quatorze produits phytosanitaires dont l'utilisation est approuvée en viticulture : cinq herbicides et un métabolite, cinq insecticides et quatre fongicides.

Ces substances ont été sélectionnées dans deux buts distincts : les cinq biocides *antifouling* ont été sélectionnés car ils sont fréquemment retrouvés, ou suspectés d'être retrouvés, dans les eaux côtières

à proximité des marinas, des ports et aires de carénages. Ils ont permis de répondre aux questions posées dans le chapitre 3.

L'isoproturon et le fipronil (mais aussi le diuron), sont quant à eux des contaminants ubiquistes fréquemment quantifiés dans les cours d'eau en Europe. Enfin, les quatorze produits phytosanitaires ont été sélectionnés suite à des enquêtes menées sur le site d'étude expérimental du projet PhytoCOTE (voir chapitre 2, première partie), et ont permis, en plus des trois biocides ubiquistes, de répondre aux questions posées dans les chapitres 4 et 5.

Les sections suivantes s'intéressent aux effets aigus et chroniques des pesticides sélectionnés sur la croissance, la physiologie et la reproduction des microalgues marines et des larves d'huître.

Tableau 2 : Liste des pesticides testés, de leurs propriétés physico-chimiques et de leur mode d'action (PPDB, *Pesticide Properties Database*, Lewis *et al.*, 2016).

Classe	Substance	Famille chimique	Log $K_{ow}^{(1)}$	Log $H^{(1)}$	Log $S^{(1)}$	Photolyse $TD_{50}^{(2)}$ (j)	Hydrolyse $TD_{50}$ (j)	Mode d'action
<b>Biocides<sup>(3)</sup></b>	diuron	phénylurée	2,87	-7,52	4,54	43,00	stable	
	isoproturon	phénylurée	2,50	-4,84	4,85	48,00	stable	inhibition de la photosynthèse au niveau du PSII
	irgarol	triazine	3,95	<i>n.d.</i>	3,85	14,00	stable	
	zinc pyriothione (ZnPT)	organométal	0,90 <sup>(4)</sup>	<i>n.d.</i>	3,90 <sup>(4)</sup>	0,01 <sup>(4)</sup>	> 90,0 <sup>(4)</sup>	dépolarisation membranaire, inhibition du transport membranaire <sup>(5)</sup>
	cuivre pyriothione (CuPT)	organométal	0,90 <sup>(4)</sup>	<i>n.d.</i>	3,00 <sup>(4)</sup>	0,02 <sup>(4)</sup>	12,9 <sup>(4)</sup>	cibles multiples <sup>(6)</sup>
	sulfate de cuivre	métal	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	8,30	stable	stable	blocage des canaux chlorures associés aux récepteurs du GABA et du glutamate
<b>Herbicides</b>	diquat dibromide	bipyridine	-4,60	-11,30	8,86	7,00	stable	inhibition de la photosynthèse au niveau du PSI
	flazasulfuron	sulfonylurée	-0,06	-5,59	6,32	stable	11,00	inhibition de l'acétolactate synthase (ALS)
	métazachlore	chloroacétanilide	2,13	-4,23	5,65	stable	stable	inhibition des élongases
	S-métolachlore	chloroacétanilide	2,90	-2,66	5,68	stable	stable	et de la géranylgeranyl-pyrophosphate (GGPP)
	glyphosate	glycine	-3,20	-6,68	7,02	69,00	stable	inhibition de l'EPSP <sup>(7)</sup> synthase
	AMPA	(métabolite)	-1,63	-0,80	9,17			<i>n.d.</i>
<b>Insecticides</b>	$\alpha$ -cyperméthrine	pyréthrianoïde	5,50	-1,16	0,60	6,30	70,00	modulation de la fermeture des canaux sodium voltage-dépendants
	acrinathrine	pyréthrianoïde	5,24	-1,97	0,34	2,30	stable	
	chlorpyrifos	organophosphoré	4,70	-0,32	3,02	29,60	16,00	inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE)
	chlorpyrifos-méthyl	organophosphoré	4,24	-0,63	3,44	1,74	21,00	
	imidaclopride	néonicotinoïde	0,57	-9,77	5,79	0,20	stable	agoniste des récepteurs nicotiniques à acétylcholine
<b>Fongicides</b>	azoxystrobine	strobilurine	2,50	-8,13	3,83	8,70	stable	inhibition de la chaîne respiratoire au niveau du complexe III
	krésoxim-méthyl	strobilurine	3,40	-3,44	3,30	18,20	35,00	
	quinoxifène	quinoléine	4,66	-1,50	1,67	0,80	stable	perturbation de la signalisation cellulaire
	spiroxamine	morpholine	2,89	-2,42	5,61	50,50	stable	inhibition de la synthèse des stérols

<sup>(1)</sup> Log  $K_{ow}$  : hydrophile si < 3, hydrophobe si > 3 ; Log  $H$  : non-volatile si < -5.61, volatile si > -5.61 (Tanneberger *et al.*, 2013) ; Log  $S$ , solubilité à 20°C pH 7 (solubilité supérieure pour des valeurs supérieures) ; <sup>(2)</sup> demie-vie (temps mis par la substance pour perdre la moitié de son activité) ; <sup>(3)</sup> le diuron, l'isoproturon (herbicides) et le fipronil (insecticide) étaient précédemment utilisés comme produits phytosanitaires mais sont aujourd'hui autorisés uniquement en tant que biocides. Le sulfate de cuivre est autorisé et utilisé en tant que fongicide en agriculture. L'irgarol (usage interdit en Europe depuis 2016, (EU) 2016/107), le ZnPT et le CuPT (autorisés) sont utilisés en tant que biocides antifouling ; <sup>(4)</sup> (Turley *et al.*, 2000 ; Yamada, 2007) ; <sup>(5)</sup> (Chandler et Segel, 1978 ; Ermolayeva *et al.*, 1995 ; Reeder *et al.*, 2011) ; <sup>(6)</sup> inhibition de la photosynthèse, division cellulaire, induction de dommages aux constituants cellulaires et à la membrane plasmique chez les microalgues (Franklin *et al.*, 2001) ; induction de génotoxicité et malformations larvaires chez les larves de *C. gigas* (Mai *et al.*, 2012 ; Sussarellu *et al.*, 2018) ; *n.d.* : non-déterminé ; <sup>(7)</sup> 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate..

#### 4.4.1. Toxicité générale pour les microalgues

La toxicité peut être mesurée au niveau de différents paramètres chez les microalgues. Dans une majorité d'études, la toxicité d'une substance est évaluée par la mesure de l'inhibition du taux de croissance, calculée après une période d'exposition donnée (souvent 72 ou 96 h). De nombreuses études visant à évaluer la toxicité d'inhibiteurs du PSII (diuron, irgarol, isoproturon) utilisent également l'inhibition de l'efficacité photosynthétique, mesurée par PAM-fluorescence. Ces deux méthodes mesurent une toxicité générale pour l'espèce étudiée ; cependant, de nombreuses autres techniques permettent d'évaluer la toxicité d'un contaminant de manière plus spécifique, en ciblant des fonctions physiologiques particulières.

La cytométrie en flux pour l'étude de la toxicité de divers contaminants sur les microalgues a été largement appliquée. En effet, cette technique permet la détermination rapide et précise de la densité cellulaire d'un échantillon de culture contenant des microalgues (Marie *et al.*, 2005), mais peut également être utilisée pour la mesure de différents paramètres morphologiques :

- la taille et la complexité relative des cellules, qui peuvent être évaluées par la mesure de la diffraction de la lumière aux petits (FSC) et grands angles (SSC), respectivement ;
- l'intensité de la fluorescence de la chlorophylle des microalgues, relative au contenu cellulaire en chlorophylle.

Ainsi, plusieurs études ont pu démontrer des effets significatifs de pesticides sur ces paramètres. L'étude réalisée par Prado *et al.* (2011) a pu démontrer un effet significatif de l'herbicide paraquat (inhibiteur du PSI) sur la taille, la complexité et la fluorescence relative des cellules de la microalgue d'eau douce *Chlamydomonas moenvisii*. Une fluorescence nettement inférieure à celle des témoins a été observée pour les cellules exposées à des concentrations élevées (par rapport aux concentrations environnementales), de 9,31 à 37,3  $\mu\text{g L}^{-1}$  de paraquat. Cette diminution s'explique par une destruction quasi-totale des pigments chlorophylliens, faisant probablement suite à l'accumulation d'ERO induite par le paraquat. Dans une seconde étude, Stachowski-Haberkorn *et al.* (2013) ont observé une diminution de la taille et de la complexité cellulaire relative, ainsi qu'une augmentation de la fluorescence de la chlorophylle, chez la microalgue marine *T. suecica* exposée à 5  $\mu\text{g L}^{-1}$  de diuron (inhibiteur du PSII).

L'utilisation de marqueurs fluorescents permet de mesurer les effets toxiques des pesticides sur une multitude d'autres fonctions physiologiques (Hyka *et al.*, 2013). Un paramètre souvent étudié est la quantité relative d'ERO. En effet, comme nous avons pu le voir dans la section 2.5, les ERO sont naturellement produites par le processus de photosynthèse et différents systèmes permettent d'éviter leur accumulation. Cependant, lors de l'exposition de microalgues à un contaminant, il arrive que

celles-ci s'accumulent et deviennent toxiques pour la cellule : dans l'étude de Stachowski-Haberkorn *et al.* (2013), la fluorescence des cellules marquées au H<sub>2</sub>DCFDA (fluorochrome relatif au contenu intracellulaire en ERO) était près de trois fois supérieure chez les cellules exposées au diuron, par rapport aux témoins, indiquant une quantité supérieure d'ERO. Une augmentation significative de la fluorescence des cellules de la microalgue *C. moennsii* exposées au paraquat (concentrations similaires à celles de Prado *et al.* 2011) et marquées au dihydroethidium (un autre fluorochrome relatif au contenu intracellulaire en ERO), a également été mise en évidence (Prado *et al.*, 2012), indiquant également une accumulation d'ERO. Cette accumulation peut entraîner des dommages significatifs à plusieurs constituants cellulaires, dont les pigments et la membrane plasmique, et peut donc être responsable d'une partie de la toxicité observée.

L'effet des pesticides sur d'autres fonctions physiologiques, comme le métabolisme des estérases et le potentiel d'action membranaire a également été exploré. Esperanza *et al.* (2015) ont observé une diminution de 29% l'activité métabolique des estérases, mesurée par le marqueur fluorescent FDA, chez la microalgue *C. reinhardtii* exposée pendant 24 h à 54 µg L<sup>-1</sup> d'atrazine (inhibiteur du PSII). Dans la même étude, une augmentation de 31% de cellules dépolarisées a été observée après 24 h d'exposition, en utilisant le fluorochrome potentiométrique DiBAC<sub>4</sub>(3). Les auteurs concluent que l'étude de ces deux paramètres permet donc d'observer une réponse précoce induite par l'exposition à un contaminant et corrobore la toxicité générale observée.

Enfin, le contenu relatif en lipides a été évalué par cytométrie en flux chez différentes espèces de microalgues, cependant, une majorité de ces études avaient trait à la biotechnologie. Une seule étude semble s'être intéressée à l'effet toxique du diuron, de l'irgarol (inhibiteurs du PSII) et du S-métolachlore (inhibiteur de la synthèse des VLCFA ; Tableau 2) sur le contenu relatif en lipides chez deux espèces de microalgues marines. Une diminution de 30% et 50% de la fluorescence des cellules marquées au BODIPY<sup>505/515</sup> (fluorochrome spécifique des lipides de réserve) a pu être observée pour *C. calcitrans* et *T. suecica*, respectivement, après une exposition de six jours à 0,5 µg L<sup>-1</sup> d'irgarol (Coquillé *et al.*, 2018). Étant donné que la production des lipides est liée au processus de photosynthèse, l'effet inhibiteur de l'irgarol sur la photosynthèse pourrait expliquer cette diminution.

Ainsi, l'utilisation de la cytométrie en flux s'avère être un outil particulièrement adapté à l'étude des microalgues, notamment couplée à l'utilisation de marqueurs fluorescents spécifiques de certaines fonctions physiologiques. En effet, l'analyse des effets de contaminants sur la physiologie microalgale permet notamment : i) d'évaluer la réponse de paramètres complémentaires à la croissance, pouvant répondre de manière précoce à l'exposition à un contaminant ; ii) d'explorer et améliorer la compréhension du mode d'action toxique des substances testées.

La liste des différentes fonctions physiologiques pouvant être affectées par l'exposition à un pesticide et présentées ci-dessus n'est pas exhaustive : par exemple, le contenu pigmentaire est également fréquemment étudié, puisqu'il est également relativement sensible à la présence de contaminants (Couderchet et Vernet, 2003 ; Magnusson *et al.*, 2012).

Néanmoins, les différentes fonctions physiologiques présentées ci-dessus ont été étudiées, suite à l'exposition de plusieurs pesticides seuls et en mélanges binaires, dans ces travaux de thèse (article 4 du chapitre 4).

#### **4.4.2. Toxicité des pesticides étudiés pour les microalgues**

La toxicité aiguë des pesticides étudiés dans ce manuscrit (Tableau 2) pour différentes espèces de microalgues dulçaquicoles et marines est présentée dans le Tableau 3 ci-après.

Tableau 3 : Toxicité aiguë des pesticides étudiés au cours de la thèse sur le taux de croissance ( $\mu$ ) de microalgues dulçaquicoles <sup>(D)</sup> ou marines <sup>(M)</sup>. Les nombres entre parenthèses représentent l'intervalle de confiance à 95% (si disponible).

Substance	Espèce <sup>(D)</sup> testée	Paramètre étudié	CE <sub>50</sub> en $\mu\text{g L}^{-1}$	Référence(s)
diuron	<i>S. costatum</i> <sup>(M)</sup>	$\mu$ (96h)	5,90 (4,70 - 7,40)	Bao <i>et al.</i> 2011
	<i>T. pseudonana</i> <sup>(M)</sup>		4,30 (3,70 - 4,90)	
	<i>C. gracilis</i> <sup>(M)</sup>	$\mu$ (72 h)	26,8 (24,3 - 30,0)	Arzul <i>et al.</i> 2006
isoproturon	<i>C. reinhardtii</i> <sup>(D)</sup>	$\mu$ (72 h)	43,3	Bi <i>et al.</i> 2012
	<i>S. vacuolatus</i> <sup>(D)</sup>	$\mu$ (24 h)	47,1 (45,6 - 51,8)	Backhaus <i>et al.</i> 2004
irgarol	<i>S. costatum</i> <sup>(M)</sup>	$\mu$ (96h)	0,57 (0,41 - 0,81)	Bao <i>et al.</i> 2011
	<i>T. pseudonana</i> <sup>(M)</sup>		0,38 (0,34 - 0,43)	
ZnPT	<i>S. costatum</i> <sup>(M)</sup>		1,60 (1,30 - 2,70)	
CuPT	<i>T. tetrabele</i> <sup>(M)</sup>	$\mu$ (72 h)	19,0 (13,0 - 45,0)	Onduka <i>et al.</i> 2010
	<i>S. costatum</i> <sup>(M)</sup>		1,50 (1,40 - 1,90)	
CuSO <sub>4</sub>	<i>T. tetrabele</i> <sup>(M)</sup>		12,0 (10,0 - 19,0)	
	<i>C. gracilis</i> <sup>(M)</sup>	$\mu$ (72 h)	1200 (880 - 2400)	Koutsaftis et Aoyama 2006
<i>T. pseudonana</i> <sup>(M)</sup>	970 (870 - 1100)		Bao <i>et al.</i> 2008	
fipronil	<i>D. tertiolacta</i> <sup>(M)</sup>	$\mu$ (96 h)	631	Overmyer <i>et al.</i> 2007
diquat dibromide Reglone <sup>®(2)</sup>	<i>R. subcapitata</i> <sup>(D)</sup>	$\mu$ (24 h)	<i>pas d'effet</i> 80,0 ( $\pm$ 16,0)	Cedergreen et Streibig 2005
flazasulfuron	<i>R. subcapitata</i> <sup>(D)</sup>	$\mu$ (72 h)	1,29	Mohammad <i>et al.</i> 2005
métazachlore	<i>S. vacuolatus</i> <sup>(D)</sup>	$\mu$ (24 h)	46,5 (43,1 - 51,9)	Faust <i>et al.</i> 2003
S-métolachlore	<i>D. breightwellii</i> <sup>(M)</sup>	$\mu$ (72 h)	423 (254 - 625)	Ebenezer et Ki 2013
	<i>T. suecica</i> <sup>(M)</sup>		21 300 (19 850 - 22 190)	
glyphosate Roundup <sup>®(2)</sup>	<i>R. subcapitata</i> <sup>(D)</sup>	$\mu$ (24 h)	270 000 ( $\pm$ 22 800) 64 700 ( $\pm$ 8740)	Cedergreen et Streibig 2005
AMPA	<i>R. subcapitata</i> <sup>(D)</sup>	$\mu$ (72 h)	> 100 000	Di Poi <i>et al.</i> 2017
$\alpha$ -cypermethrine	<i>C. marina</i> <sup>(M)</sup>		191 (134 - 272)	
	<i>S. trochoidea</i> <sup>(M)</sup>	$\mu$ (96h)	205 (142 - 295)	Wang <i>et al.</i> 2012
	<i>S. costatum</i> <sup>(M)</sup>		71,4 (51,5 - 99,1)	
acrinathrine	<i>C. vulgaris</i> <sup>(D)</sup>	-	35,0	PPDB et AGRITOX <sup>(3)</sup>
	<i>R. subcapitata</i> <sup>(D)</sup>	$\mu$ (72 h)	870	
chlorpyrifos	<i>A. gracilis</i> <sup>(D)</sup>	$\mu$ (96 h)	22 400 (18 280 - 26 800)	Asselborn <i>et al.</i> 2015
	<i>C. pyrenoidosa</i> <sup>(D)</sup>	$\mu$ (72 h)	11 460 (8 360 - 15 710)	Chen <i>et al.</i> 2016
chlorpyrifos-méthyl	<i>R. subcapitata</i> <sup>(D)</sup>	$\mu$ (72 h)	570	PPDB
imidaclopride	<i>D. subspicatus</i> <sup>(D)</sup>	$\mu$ (96 h)	<i>pas d'effet</i> (max = 157 500)	Malev <i>et al.</i> 2012
azoxystrobine	<i>R. subcapitata</i> <sup>(D)</sup>	$\mu$ (72 h)	230 (190 - 270)	Ochoa-Acuña <i>et al.</i> 2009
	<i>S. costatum</i> <sup>(M)</sup>	$\mu$ (120 h)	453 (386 - 532)	PEDB - U.S. EPA <sup>(3)</sup>
krésoxim-méthyl	<i>R. subcapitata</i> <sup>(D)</sup>	$\mu$ (120 h)	59,4	AGRITOX
	<i>S. costatum</i> <sup>(M)</sup>	$\mu$ (96 h)	293	PEDB - U.S. EPA
quinoxyfène	<i>R. subcapitata</i> <sup>(D)</sup>		28,0	AGRITOX
	<i>S. costatum</i> <sup>(M)</sup>	$\mu$ (120 h)	130 (62 - 280)	PEDB - U.S. EPA
spiroxamine	<i>S. costatum</i> <sup>(M)</sup>	$\mu$ (96 h)	1,30	AGRITOX
			1,18 (0,63 - 1,29)	PEDB - U.S. EPA

<sup>(1)</sup> Espèces (dans l'ordre d'apparition) : *Skeletonema costatum*<sup>(M)</sup> ; *Thalassiosira pseudonana*<sup>(M)</sup> ; *Chaetoceros gracilis*<sup>(M)</sup> ; *Chlamydomonas reinhardtii*<sup>(D)</sup> ; *Scenedesmus vacuolatus*<sup>(D)</sup> ; *Tetraselmis tetrabele*<sup>(M)</sup> ; *Dunaliella tertiolacta*<sup>(M)</sup> ; *Raphidocelis subcapitata*<sup>(D)</sup> ; *Ditylum brightwellii*<sup>(M)</sup> ; *Tetraselmis suecica*<sup>(M)</sup> ; *Chattonella marina*<sup>(M)</sup> ; *Scrippsiella trochoidea*<sup>(M)</sup> ; *Chlorella vulgaris*<sup>(D)</sup> ; *Ankistrodesmus gracilis*<sup>(D)</sup> ; *Chlorella pyrenoidosa*<sup>(D)</sup> ; *Desmodesmus subspicatus*<sup>(D)</sup> ; <sup>(2)</sup> formulation commerciale de la substance active mentionnée au-dessus ; <sup>(3)</sup> Lewis *et al.*, (2016) ; ANSES, (2018) ; U.S. EPA, (2018).

Seules des valeurs de CE<sub>50</sub> calculées sur le taux de croissance ( $\mu$ ), après différents temps d'exposition, sont reportées dans ce tableau, celles-ci étant les plus fréquemment retrouvées dans la littérature.

Les microalgues partagent avec les plantes supérieures un grand nombre de structures leur permettant de réaliser la photosynthèse et sont à ce titre des cibles potentielles pour les herbicides (Readman *et al.*, 1993 ; DeLorenzo *et al.*, 2001). Ainsi, parmi les trois catégories de produits phytosanitaires, ce sont sans aucun doute les herbicides (ainsi que les biocides ayant un mode d'action similaire) qui présentent la plus forte toxicité vis-à-vis de ces organismes. Les herbicides et biocides présentent toutefois une toxicité variable en fonction de leurs propriétés physico-chimiques et de leur mode d'action. Parmi les plus toxiques, on retrouve les inhibiteurs du photosystème II, qui, en se fixant sur le site de fixation de la quinone B au niveau de la protéine D1, bloquent le transfert des électrons (Nimbal *et al.*, 1996 ; Jones et Kerswell, 2003). En plus d'empêcher la réalisation de la photosynthèse et des autres processus qui en dépendent, l'exposition à ce type d'inhibiteurs a pour autre conséquence une accumulation d'énergie par la chlorophylle qui sera dissipée par émission de chaleur (NPQ, *non-photochemical quenching*) ou par émission de fluorescence. Cette accumulation d'énergie pourra également induire une accumulation d'ERO, toxiques pour les constituants cellulaires (voir section 2.5). Ainsi, comme nous pouvons le voir dans le Tableau 3, les trois inhibiteurs du PSII testés dans cette étude comptent parmi les substances les plus toxiques pour le phytoplancton dans la liste des substances choisies. Par ordre de toxicité décroissante, on obtient : irgarol > diuron > isoproturon ; l'irgarol étant environ dix fois plus toxique que le diuron, lui-même cinq à dix fois plus toxique que l'isoproturon. Deux biocides utilisés dans les peintures antifouling, le zinc pyrithione (ZnPT) et le cuivre pyrithione (CuPT) s'avèrent également très toxiques pour les microalgues marines, mais leur mode d'action toxique sur les microalgues soit mal connu. Pour une autre substance, le flazasulfuron (inhibiteur de l'ALS ; Tableau 2), la  $CE_{50}$  reportée dans le Tableau 3 ( $1,29 \mu\text{g L}^{-1}$ ) semble indiquer une forte toxicité pour une microalgue d'eau douce (*R. subcapitata*). Cependant, cette valeur provient de la seule étude à avoir estimé une  $CE_{50}$  pour cette substance sur la croissance d'une microalgue et pourrait donc fortement varier pour une autre espèce.

Les autres substances herbicides testées présentent, en général, une toxicité plus faible pour les microalgues marines, du fait d'un mode d'action plus spécifique des plantes supérieures et/ou de leurs propriétés physico-chimiques. Certaines substances actives nécessitent d'être utilisées en formulation (*i.e.* avec des adjuvants permettant d'optimiser l'efficacité de la substance active) : c'est le cas des herbicides diquat, un inhibiteur du PSI, et glyphosate, un inhibiteur de l'EPSP synthase, qui sont bien plus toxiques en formulation commerciale que seuls. Cependant, même en formulation commerciale, ces herbicides semblent peu toxiques pour le phytoplancton, en comparaison des inhibiteurs du PSII. Le métabolite majeur du glyphosate, l'AMPA (acide aminométhylphosphonique) est également très peu toxique pour les microalgues. Le S-métolachlore et le métazachlore, inhibant la synthèse des acides gras à très longue chaîne carbonée (VLCFA, *very long chain fatty acids*), présentent

une toxicité variable selon l'espèce considérée. Bien qu'une seule étude ait évalué la toxicité du métazachlore sur la croissance d'une microalgue, celui-ci semble néanmoins plus toxique que le S-métolachlore, avec une valeur de  $CE_{50}$  similaire à celle de l'isoproturon. Enfin, le cuivre, qui est un élément-trace métallique essentiel à la croissance des microalgues, n'exerce une toxicité significative qu'à partir de concentrations élevées, de l'ordre du  $mg L^{-1}$ , et est donc considéré comme peu toxique.

Ainsi, parmi les herbicides, et les biocides ayant un mode d'action apparenté, ce sont les inhibiteurs du PSII qui sont les plus toxiques pour les microalgues. D'autres substances, comme le ZnPT, le CuPT et le flazasulfuron, semblent exercer une toxicité du même ordre de grandeur bien que leur mode d'action diffère.

Les substances insecticides testées dans ces travaux de thèse ont une plus faible toxicité aiguë pour les microalgues. Ce devrait également être le cas du fipronil qui n'est aujourd'hui autorisé qu'en tant que biocide acaricide à usage vétérinaire et qui possède un mode d'action propre aux insecticides. En effet, leurs modes d'action (Tableau 2) ciblent des structures du système nerveux situées au niveau de la synapse cholinergique, qui ne sont pas retrouvées chez les microalgues. La cyperméthrine, un mélange de multiples isomères dont l' $\alpha$ -cyperméthrine, s'avère toutefois relativement toxique, avec des  $CE_{50}$  de l'ordre de la centaine de  $\mu g L^{-1}$ , mesurées sur la croissance à 96 h de trois microalgues marines. Un autre pyréthrianoïde, l'acrinathrine, semble présenter une toxicité aiguë équivalente, bien que sa toxicité varie de manière importante entre les deux valeurs reportées dans le Tableau 3. La toxicité du chlorpyrifos (chlorpyrifos-éthyl) pour le phytoplancton a été largement étudiée : des  $CE_{50}$  très élevées ( $> 10\ 000 \mu g L^{-1}$ ) ont été obtenues, témoignant d'une toxicité quasi-nulle pour les microalgues. La toxicité du chlorpyrifos-méthyl a été moins étudiée, cependant la  $CE_{50}$  déterminée pour cette substance ( $570 \mu g L^{-1}$ ) est bien inférieure à celles déterminées pour le chlorpyrifos-éthyl. Concernant le fipronil, la toxicité du mélange racémique (50% de chaque énantiomère (R, -) et (S, +)) semble relativement faible ( $631 \mu g L^{-1}$ ). Enfin aucune  $CE_{50}$  n'a pu être calculée pour l'imidaclopride, du fait de la très faible toxicité observée dans la gamme testée (jusqu'à  $157\ 500 \mu g L^{-1}$ ).

Du fait de leur mode d'action spécifique des structures du système nerveux, les insecticides exercent une toxicité faible à nulle pour le phytoplancton.

Contrairement aux insecticides, les fongicides sont considérés comme davantage toxiques pour les microalgues en raison d'un mode d'action à large spectre puisque les champignons partagent un grand nombre de structures et d'enzymes avec les organismes végétaux et animaux (Stenersen, 2004). Cependant, la toxicité des fongicides de synthèse vis-à-vis du phytoplancton est globalement très peu documentée. Les deux fongicides de la famille des strobilurines, l'azoxystrobine et le krésoxim-méthyl

semblent peu toxiques pour les microalgues, malgré leur mode d'action ciblant l'activité respiratoire des mitochondries (Tableau 2) : des  $CE_{50}$  de quelques centaines de  $\mu\text{g L}^{-1}$  sont indiquées dans les bases de données. Une  $CE_{50}$  avoisinant  $60 \mu\text{g L}^{-1}$  a été obtenue pour le krésoxim-méthyl, témoignant d'une toxicité potentielle légèrement supérieure à celle de l'azoxystrobine. Le quinoxyfène, dont le mode d'action n'a été que récemment élucidé (Tableau 2 ; Agrow, 2010), est reporté comme modérément toxique pour les microalgues et semble davantage toxique que les strobilurines, avec des  $CE_{50}$  mesurées sur la croissance de 28 et  $130 \mu\text{g L}^{-1}$ . Enfin, concernant la spiroxamine, une morpholine inhibant la synthèse des stérols, très peu d'informations sont disponibles en dehors des bases de données. Des  $CE_{50}$  de 1,18 et  $1,30 \mu\text{g L}^{-1}$  figurent dans les bases de données, témoignant d'une toxicité importante pour les microalgues.

Les fongicides possèdent un mode d'action plus large qui cible généralement des structures retrouvées chez les microalgues. Il en résulte une toxicité potentielle supérieure à celle des insecticides, notamment pour la spiroxamine, dont la toxicité semble être supérieure à toutes les autres substances mentionnées dans le Tableau 3, excepté l'irgarol.

Cet aperçu de la littérature relatant les effets toxiques des pesticides étudiés dans le cadre de cette thèse pour le phytoplancton met en évidence la toxicité supérieure des biocides et herbicides ciblant le photosystème II. Cependant, d'autres substances n'ayant pas, *a priori*, un mode d'action ciblant spécifiquement les microalgues s'avèrent également particulièrement toxiques (ZnPT, CuPT et spiroxamine, par exemple).

Pour certaines de ces substances, notamment les fongicides, la toxicité vis-à-vis des microalgues n'a pas été estimée dans des études spécifiques. Pourtant, si l'on prend l'exemple de la spiroxamine, sa toxicité *a priori* très élevée mériterait que l'on s'y intéresse spécifiquement, via des mesures de cette substance dans l'environnement et des tests de toxicité robustes ciblant la croissance, mais également d'autres fonctions physiologiques plus spécifiques.

Dans ces travaux de thèse, la toxicité de ces substances sur la croissance de deux (voire trois pour certaines substances) espèces de microalgues marines a été évaluée via un microbioessai réalisé en microplaques. Les substances exerçant une toxicité significative ont également été testées en mélanges binaires et les effets sur plusieurs fonctions physiologiques ont été mesurés. En plus de la mesure de leur toxicité pour les organismes étudiés, les concentrations de la quasi-totalité de ces substances ont été mesurées dans les cours d'eau du bassin versant de Marcillac (site d'étude du projet PhytoCOTE, section 3 du chapitre 2) à influence majoritairement viticole.

### 4.4.3. Tolérance et résistance aux contaminants chez les microalgues

Les organismes aquatiques pouvant être exposés de manière chronique à des mélanges de contaminants dans les écosystèmes aquatiques qu'ils occupent, leur capacité d'adaptation est cruciale pour la survie des populations ou communautés. Une étude réalisée par Nyström *et al.* (1999) a évalué la sensibilité de 40 espèces de microalgues (20 dulçaquicoles et 20 marines) à deux herbicides (chlorsulfuron et metsulfuron-méthyl) : un facteur de  $10^6$  séparait la  $CE_{50}$  la plus faible de la plus élevée, démontrant une variabilité inter-espèce considérable. Cependant, cette variabilité inter-espèce ne constitue pas le seul moteur de survie pour les communautés phytoplanctoniques vivant dans un environnement contaminé :

- d'une part, l'importante plasticité phénotypique des microalgues résulte d'adaptations physiologiques modulées par l'expression des gènes : c'est ce qu'on désigne sous les termes de tolérance/sensibilité ou d'acclimatation physiologique (Bradshaw et Hardwick, 1989 ; Fogg, 2001 ; Huertas *et al.*, 2010) ;
- d'autre part, lorsque le stress induit par l'environnement contaminé dépasse les limites physiologiques des espèces qui y vivent, la survie de celles-ci reposera alors exclusivement sur l'évolution adaptative issue de la sélection de mutations, induites ou préexistantes, conférant une résistance au stress : c'est ce que l'on désigne sous les termes de résistance/évolution adaptative ou adaptation génétique (Sniegowski et Lenski, 1995 ; Sniegowski, 2005 ; Huertas *et al.*, 2010).

Les mécanismes de tolérance et de résistance à différents stress ont été largement étudiés chez de nombreuses espèces de phytoplancton. En effet, les microalgues présentent de multiples avantages pour mener ce genre d'études, parmi lesquels :

- une très large diversité et un rôle clé dans les écosystèmes aquatiques (voir section 2.1) ;
- facilité à la manipulation de plusieurs générations en laboratoire (Flores-Moya *et al.*, 2008) et temps de génération court, favorisant l'apparition des phénomènes de tolérance et/ou résistance à un stress.

Dans la littérature scientifique, la plupart des études décrivant la capacité de tolérance des microalgues à des pesticides a été observée via une approche utilisant des communautés phytoplanctoniques : le PICT (*pollution-induced community tolerance* ; Blanck *et al.* 1988). Le PICT est mesuré par comparaison de la tolérance d'un paramètre, comme par exemple l'efficacité de photosynthèse, pour différents échantillons de communautés phytoplanctoniques issus d'environnement plus ou moins contaminés. Afin d'appliquer le PICT, quatre prérequis sont nécessaires :

1. La tolérance peut être mesurée de manière significative dans des bioessais de courte durée ;

2. Le PICT peut être détecté et distingué d'autres causes de variations dans la tolérance des communautés ;
3. Le PICT est associé à des effets significatifs sur les communautés et mesuré par des méthodes conventionnelles ;
4. La spécificité de la pression de sélection est élevée, ou des schémas compréhensifs de co-tolérance peuvent être observés.

Ainsi, le principe du PICT a pu être appliqué avec succès dans plusieurs études. Dans l'étude de Pesce *et al.* (2010), du biofilm (ensemble de la microflore, composée de microalgues, bactéries et champignons se développant sur un substrat immergé) prélevé en amont et en aval de la rivière Morcille (Beaujolais, France) a été exposé à du diuron pendant 3h30. À l'issue de l'exposition, le rendement quantique du photosystème II a été mesuré : la  $CE_{50}$  obtenue pour le biofilm prélevé en aval, et donc exposé à des concentrations plus élevées de diuron dans son environnement naturel, était 20 fois plus élevée par rapport au biofilm prélevé en amont, témoignant d'une tolérance accrue induite par une exposition chronique à des herbicides. Le PICT a également été appliqué à l'étude de la restauration de la qualité de l'eau du lac Léman en comparant la tolérance de communautés phytoplanctoniques prélevées mensuellement en 1999 et 2011 à l'herbicide atrazine et au cuivre (Larras *et al.*, 2016). Une diminution de la tolérance à l'atrazine et au cuivre, ainsi qu'une modification de la composition taxonomique concordant avec la diminution des concentrations d'herbicides mesurées dans le lac entre 1999 et 2011 a ainsi été observée.

Concernant l'environnement marin, Blanck et Dahl (1996) ont observé que la toxicité du TBT pour des communautés de périphyton marin était réduite lorsque celles-ci avaient été précédemment exposées à du TBT dans leur milieu naturel. Dans une autre étude réalisée par Blanck *et al.* (2009), la tolérance de communautés périphytiques marines à l'irgarol, un biocide *antifouling*, a été analysée de 1994 à 2005. Les concentrations d'irgarol au niveau des sites étudiés sont restées relativement constantes sur la période étudiée. L'étude des résultats obtenus sur les dix ans de suivi tend à montrer que, bien que le potentiel de PICT était relativement faible au début de l'étude du fait du peu de différence dans la sensibilité des espèces composant les communautés, la pression de sélection constante a finalement favorisé des espèces ou des génotypes tolérants à l'irgarol.

Les différentes études citées ci-dessus montrent donc que le concept du PICT a été appliqué à différents types de communautés (phytoplancton, périphyton), d'environnements (cours d'eau, lac, eaux côtières) et de contaminants (herbicides, métaux, biocides *antifouling*), démontrant sa solidité et sa validité dans de nombreux cas de figure, comme souligné dans la review de Blanck (2002).

Pour autant les résultats obtenus au moyen du PICT ne mettent en évidence que la résultante d'une séquence d'évènements aboutissant à la restructuration et la tolérance des communautés exposées.

Sans avoir eu la possibilité préalable d'effectuer un suivi des populations et/ou communautés avant l'épisode de contamination chronique, il semble difficile de statuer entre une acclimatation physiologique (tolérance induite par le contaminant) et une adaptation génétique (présence de variants génétiquement résistants à ce contaminant).

En effet, les mécanismes de résistance aux contaminants résultent généralement de mutations pré-sélectives, rares et spontanées. L'expérience de Luria-Delbrück (Luria et Delbrück, 1943), également appelée test de fluctuation, permet de vérifier l'hypothèse selon laquelle les mutations surviennent de manière aléatoire et ne sont pas induites par le contaminant. Par l'application de ce test, deux études ont pu démontrer que la résistance au diuron, à la simazine (inhibiteurs du photosystème II) et au diquat (inhibiteur du photosystème I) chez deux chlorophycées d'eau douce, *Dictyosphaerium chlorelloides* et *Scenedesmus intermedius* (clones axéniques des souches sauvages Dc et SiM, *Universidad Complutense de Madrid*), étaient le résultat de mutations spontanées présentes avant l'exposition aux contaminants (Costas *et al.*, 2001 ; Marvá *et al.*, 2010). Plusieurs mutations à l'origine de la résistance aux herbicides inhibiteurs du photosystème II ont déjà été décrites dans la littérature au niveau de la séquence codante du gène *psbA* codant pour la protéine D1 du photosystème II (Erickson *et al.*, 1989 ; Oettmeier, 1999). Ces mutations peuvent ainsi entraîner la substitution d'un ou plusieurs acides aminés dans la séquence de la protéine D1. Plusieurs études ont ainsi pu corroborer la présence d'une telle mutation avec une résistance à l'herbicide diuron (Brusslan et Haselkorn, 1989 ; Thuillier-Bruston *et al.*, 1996). Étonnamment, aucune mutation de ce type n'a pu être identifiée chez des communautés périphytiques démontrant une tolérance à l'irgarol, un biocide possédant un mode d'action similaire au diuron (Eriksson *et al.*, 2009). Il reste donc difficile de statuer de manière définitive quant au rôle exact de cette mutation dans les phénomènes de résistance ou de tolérance aux inhibiteurs du photosystème II.

En plus des phénomènes d'acclimatation physiologique et d'adaptation génétique, un troisième processus découvert récemment joue également un rôle dans la tolérance et/ou la résistance au stress : l'épigénétique. Ce processus se définit comme l'étude des changements héréditaires et réversibles dans la régulation de l'expression des gènes sans modification de la séquence d'ADN (Vandegheuchte et Janssen, 2011 ; Collotta *et al.*, 2013 ; Fneich, 2014). Deux études se sont intéressées à la méthylation de l'ADN, processus inhibant l'expression d'un gène par la méthylation de la cytosine en 5-méthylcytosine, chez les diatomées marines *Phaeodactylum tricorutum* et *Thalassiosira pseudonana*, dans le but d'améliorer la compréhension de l'évolution de ce processus chez les eucaryotes (Veluchamy *et al.*, 2013 ; Rastogi *et al.*, 2015). L'application de l'épigénétique au domaine de l'écotoxicologie pourrait améliorer notre compréhension des mécanismes moléculaires liés aux effets

toxiques induits par l'exposition à des substances chimiques, dont les pesticides (Vandegheuchte et Janssen, 2011, 2014 ; Collotta *et al.*, 2013).

L'article 1 du chapitre 3 de ce manuscrit illustre l'importance de prendre en compte des phénomènes de tolérance et résistance décrits ci-dessus. Dans cet article, une souche de la microalgue marine *T. suecica*, résistante au diuron et possédant une mutation au niveau de la séquence du gène *PsbA* codant pour la protéine D1 du PSII (site de fixation des inhibiteurs du PSII) a été exposée à du diuron, à de l'irgarol ainsi qu'à un mélange de ces deux substances.

Le phytoplancton constitue la base des réseaux trophiques aquatiques en y occupant la place de producteur primaire. Nous avons pu voir dans les parties précédentes que les microalgues pouvaient être affectées de manière significative par les pesticides, mais également qu'elles avaient la capacité de s'acclimater et/ou s'adapter au stress subi. Les microalgues constituent également la source de nourriture principale des larves d'huître, organismes occupant la place de consommateur primaire dans les réseaux trophiques aquatiques. Ainsi, la section suivante d'intéresse aux effets des pesticides sur les premiers stades larvaires des huîtres.

#### 4.4.4. Toxicité pour les larves d'huître

Les stades larvaires représentent une étape clé du développement de l'huître et sont particulièrement sensibles au stress chimique. La plupart des études se sont intéressées à l'évaluation de l'embryotoxicité des polluants chimiques, à savoir leur impact sur le développement embryo-larvaire. D'autres études ont également évalué les effets sur la métamorphose des larves et l'intégrité de leur génome. Comme illustré dans le Tableau 4, pour plus de la moitié des substances testées dans ces travaux de thèse (13/22), aucune étude ne s'est intéressée aux effets toxiques sur le développement embryo-larvaire de l'huître creuse ou de la moule commune ou méditerranéenne.

Tableau 4 : Toxicité des pesticides étudiés sur le développement embryo-larvaire de l'huître creuse *Crassostrea gigas*, ou de la moule commune, *Mytilus edulis*, ou méditerranéenne, *Mytilus galloprovincialis*. En cas d'absence de toxicité, la concentration maximale testée est donnée entre parenthèses.

Substance	Espèce testée	LOEC <sup>(1)</sup> en $\mu\text{g L}^{-1}$	CE <sub>50</sub> en $\mu\text{g L}^{-1}$	Référence(s)
<b>diuron</b>	<i>C. gigas</i>	< 0,05	< 0,05	Akcha <i>et al.</i> , 2012
	<i>C. gigas</i>	0,04	2332	Mai <i>et al.</i> 2013
<b>isoproturon</b>	<i>C. gigas</i>	<i>n.d.</i>	370 <sup>(2)</sup>	His et Seaman 1993
<b>irgarol</b>	<i>C. gigas</i>	0,01	196	Mai <i>et al.</i> 2012, 2013
<b>ZnPT</b>	<i>M. edulis</i>	0,90 <sup>(4)</sup>	2,00	Bellas <i>et al.</i> 2005
<b>CuPT</b>		–	–	
<b>CuSO<sub>4</sub><sup>(3)</sup></b>	<i>C. gigas</i>	0,10	12,5	Mai <i>et al.</i> 2012
	<i>C. gigas</i>	1,00	7,40 – 14,8	Gamain <i>et al.</i> 2016
	<i>C. gigas</i>	<i>n.d.</i>	9,10	Sussarellu <i>et al.</i> 2018
<b>fipronil</b>		–	–	
<b>diquat dibromide</b>		–	–	
<b>flazasulfuron</b>		–	–	
<b>métazachlore</b>		–	–	
<b>S-métolachlore</b>	<i>C. gigas</i>	0,01 <sup>(4)</sup>	672	Mai <i>et al.</i> 2012, 2013
	<i>C. gigas</i>	0,001	<i>n.d.</i>	Gamain <i>et al.</i> 2016
<b>glyphosate</b>	<i>C. gigas</i>	<i>pas d'effet</i>	<i>pas d'effet</i> (max = 5,00)	Akcha <i>et al.</i> , 2012
	<i>C. gigas</i>	13 457	28 315	Mottier <i>et al.</i> 2013
<b>AMPA</b>	<i>C. gigas</i>	<i>pas d'effet</i>	<i>pas d'effet</i> (max = 200)	His <i>et al.</i> 1999
	<i>C. gigas</i>	10 299	40 617	Mottier <i>et al.</i> 2013
<b><math>\alpha</math>-cyperméthrine</b>		–	–	
<b>acrinathrine</b>		–	–	
<b>chlorpyrifos</b>	<i>M. galloprovincialis</i>	79,1 <sup>(4)</sup>	154	Beiras et Bellas 2008
<b>chlorpyrifos-méthyl</b>		–	–	
<b>imidaclopride</b>		–	–	
<b>azoxystrobine</b>		–	–	
<b>krésoxim-méthyl</b>		–	–	
<b>quinoxifène</b>		–	–	
<b>spiroxamine</b>		–	–	

<sup>(1)</sup> concentration reportée comme étant la plus faible induisant une toxicité significative par rapport aux témoins dans les études citées ; <sup>(2)</sup> CL<sub>50</sub> calculée après 9 jours d'exposition ; <sup>(3)</sup> utilisé comme témoin de toxicité dans le test normalisé ISO 17244:2015 : la CE<sub>50</sub> doit être comprise entre 6 et 16  $\mu\text{g L}^{-1}$  ; <sup>(4)</sup> valeurs correspondant à la CE<sub>10</sub>.

Seules quatre substances semblent correctement documentées : le diuron, le cuivre, le S-métolachlore et le glyphosate. Cela est notamment dû au fait que ces molécules sont fréquemment retrouvées dans les eaux côtières, à proximité des zones de conchyliculture (section 1.6.2.).

En se basant sur la LOEC, et dans certains cas la CE<sub>10</sub>, le diuron, l'irgarol, le ZnPT, le cuivre et le S-métolachlore semblent être très toxiques pour les larves de mollusques bivalves, avec des valeurs inférieures à 1  $\mu\text{g L}^{-1}$  et fréquemment inférieures à 0,05  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Le chlorpyrifos semble moyennement toxique, avec une valeur proche de la centaine de  $\mu\text{g L}^{-1}$ , alors que le glyphosate et l'AMPA sont plus de 1000 fois moins toxiques. En considérant les valeurs de CE<sub>50</sub> disponibles dans la littérature, le ZnPT semble être la substance la plus toxique avec une valeur de 2,00  $\mu\text{g L}^{-1}$ , bien que Akcha *et al.*

(2012) aient observé, pour le diuron, une  $CE_{50}$  proche de  $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$ , qui diffère cependant largement de celle observée par Mai *et al.* (2013), estimée à plus de  $2000 \mu\text{g L}^{-1}$ . Le cuivre est également assez toxique avec des valeurs de  $CE_{50}$  de l'ordre de la dizaine de  $\mu\text{g L}^{-1}$ . On observe une toxicité bien moindre pour l'irgarol, le S-métolachlore et le chlorpyrifos, avec des valeurs de  $CE_{50}$  de quelques centaines de  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

La partie 4.4 synthétise les effets toxiques des pesticides sélectionnés dans ces travaux de thèse : les impacts de ces substances seules sur différents paramètres physiologiques et pour deux types d'organismes situés à la base des réseaux trophiques aquatiques, les microalgues et les larves d'huître, ont été documentés. Cependant, comme nous l'avons observé dans la section 1.6, les eaux de surface continentales et côtières sont contaminées par une multitude de substances chimiques, et fréquemment, plusieurs dizaines, voire centaines, de contaminants coexistent dans un même milieu. De ce constat découle la nécessité de prendre en compte « l'effet cocktail », *i.e.* la prise en compte des effets toxiques des mélanges de plusieurs substances.

## 5. Étude de la toxicité de pesticides en mélange

### 5.1. Problématique des mélanges de pesticides

Dans le milieu naturel, une multitude de substances chimiques coexistent. Ces mélanges de substances peuvent être issus de sources diverses, dont :

- des produits contenant plus d'une substance : c'est le cas de nombreuses formulations commerciales de produits phytosanitaires, où la substance active est utilisée en combinaison avec une ou plusieurs autres substances (adjuvant, seconde substance active, par exemple) ;
- des substances issues d'une source de pollution commune : par exemple, plusieurs pesticides utilisés conjointement sur une parcelle pourront ensuite être retrouvés en mélange dans les écosystèmes aquatiques à proximité ;
- des substances issues de différentes sources de pollution se rencontrant dans le milieu aquatique : par exemple, une pollution par les pesticides en amont se combinant avec celle d'une station d'épuration (STEP) en aval.

Ce constat, fait il y a de nombreuses années déjà, a amené les autorités compétentes et la communauté scientifique à réfléchir à la manière dont cette problématique devait être traitée dans le cadre réglementaire (Kepner, 2004 ; Backhaus et Faust, 2010). La principale préoccupation vis-à-vis des mélanges de substances est « l'effet cocktail », se traduisant par une toxicité d'un mélange potentiellement supérieure par rapport à celle prédite en additionnant la toxicité des substances seules. Comme nous l'avons vu dans la section 1.5, la réglementation actuelle impose la détermination de valeurs seuils pour évaluer la potentielle toxicité des substances chimiques connues, telles que la NOEC ou la PNEC. Cependant, des études réalisées sur des microalgues seules et des communautés périphtiques ont démontré que des mélanges d'herbicides, présents à des concentrations individuelles inférieures ou égales à leurs NOEC respectives, pouvaient induire une toxicité significative (Faust *et al.*, 2001 ; Arrhenius *et al.*, 2004). D'autres études aboutissant à des conclusions similaires sont citées dans le rapport de Kortenkamp *et al.* (2009) qui présente l'état de l'art sur la toxicité des mélanges de contaminants. De ce constat découle la nécessité d'établir une méthodologie adaptée à l'étude de la toxicité des mélanges dans le cadre de la réglementation actuelle.

### 5.2. Modèles de référence pour l'étude de la toxicité de substances en mélange

En termes de réglementation, il n'est pas envisageable de tester la toxicité de toutes les combinaisons possibles et imaginables des substances retrouvées dans l'environnement. Ainsi, deux modèles permettant la prédiction de la toxicité de plusieurs substances en mélange sont principalement

utilisés : le modèle « d'additivité des concentrations » (*Concentration Addition*, CA en anglais, Loewe et Muischnek 1926) et le modèle « d'action indépendante » (*Independent Action*, IA en anglais, Bliss 1939). Le modèle CA est considéré comme étant davantage adapté aux mélanges de substances possédant un mode d'action similaire, alors que le modèle IA serait plus adapté aux mélanges de substances dont le mode d'action diffère. Nous verrons cependant que cela ne se vérifie pas systématiquement. On reconnaît généralement trois types d'interaction pouvant résulter d'un mélange de plusieurs substances :

- l'additivité se caractérise par une toxicité observée similaire à celle prédite par le modèle CA et/ou IA ;
- l'antagonisme se caractérise par une toxicité observée inférieure à celle prédite par le modèle CA et/ou IA ;
- la synergie se caractérise par une toxicité observée supérieure à celle prédite par le modèle CA et/ou IA.

Il est important de préciser qu'une interaction se définit toujours par comparaison avec les prédictions réalisées par un modèle de référence, CA ou IA. En effet, dans certains cas de figure, l'interaction observée pourra être antagoniste par rapport aux prédictions du modèle CA et synergique par rapport à celles du modèle IA et *vice versa*. On peut également se demander à partir de quand une interaction peut être considérée comme biologiquement significative pour l'organisme testé. Certaines interactions, *a priori* significatives en considérant le résultat du test statistique réalisé, induisent en réalité une toxicité très proche de celle prédite par le modèle de référence. Ainsi, Belden *et al.* (2007) préconisent l'utilisation d'une différence d'un facteur  $\geq 2$  entre la toxicité prédite par le modèle de référence et celle prédite par le modèle décrivant l'interaction afin de considérer cette interaction comme significative au niveau biologique pour l'organisme testé.

### 5.2.1. Additivité des concentrations, CA

Le modèle CA fait l'hypothèse que des substances ayant le même mode d'action et n'interagissant pas entre elles ne diffèrent que par leur potentiel toxique et peuvent donc être considérées comme des dilutions d'une même substance (Cedergreen *et al.*, 2008). En effet, un mélange de différentes dilutions d'une même substance suivra inévitablement le principe d'additivité. De ce fait, il suffit de connaître la toxicité, via les valeurs de  $CE_{50}$  par exemple, et les concentrations individuelles des différentes substances, pour prédire la toxicité du mélange considéré suivant le modèle CA, en utilisant l'équation (6),

$$\sum_{i=1}^n \frac{z_i}{CE_{x_i}} = 1 \quad (6)$$

où  $z_i$  correspond à la concentration de la substance  $i$  dans le mélange induisant un effet de  $x\%$  et  $CE_{x_i}$  sa concentration effective induisant un effet similaire au mélange. D'un point de vue pratique, un effet de 50% est dans la plupart des cas utilisé, car il permet d'utiliser des valeurs de  $CE_{50}$  qui sont les plus communes en écotoxicologie. Le quotient  $z_i/CE_{x_i}$  correspond à la valeur d'unité toxique (*toxic unit*, TU en anglais) permettant d'évaluer la contribution relative de chaque substance à la toxicité du mélange. Une unité toxique, soit 1 TU, correspond donc à un effet d'inhibition de 50%. Ainsi, si deux substances possédant le même mode d'action sont mélangées à des concentrations correspondant à la moitié de leurs  $CE_{50}$  respectives, soit 0,5 TU (ou 25% d'inhibition), on obtient bien une somme égale à 1, soit un effet du mélange égal à 50%.

Pour un mélange de deux substances,  $X$  et  $Y$ , l'équation (7) est utilisée pour calculer les concentrations des substances induisant, dans cet exemple, une inhibition de 50%, et suivant le modèle CA,

$$y = CE_{50}Y - x \left( \frac{CE_{50}Y}{CE_{50}X} \right) \quad (7)$$

où  $x$  et  $y$  sont les concentrations des substances  $X$  et  $Y$ , respectivement. Les concentrations  $x$  et  $y$  induisant un effet d'inhibition de 50% sont ensuite utilisées pour construire l'isobole du modèle CA (voir section 3.3.1).

Dans le cas d'un mélange complexe ( $n > 2$ ), il est possible de prédire la concentration effective du mélange induisant un effet d'inhibition de  $x\%$  selon CA,  $CE_{x_{MIX}}$ , avec l'équation (8),

$$CE_{x_{MIX}} = \left( \sum_{i=1}^n \frac{p_i}{CE_{x_i}} \right)^{-1} \quad (8)$$

où  $p_i$  est la proportion de la substance  $i$  dans le mélange, avec  $p_i = z_i / z_{MIX}$  et  $CE_{x_i}$  sa concentration effective induisant un effet similaire au mélange. Ainsi, connaissant les relations concentration-réponse individuelles de chaque substance en mélange, cette approche permet de prédire la relation concentration-réponse complète du mélange complexe étudié, selon le modèle CA.

Bien que ce modèle soit relativement simple, il permet d'obtenir de très bonnes prédictions, comme souligné dans l'article de Belden *et al.* (2007), où 207 études ayant utilisé le modèle CA pour prédire la toxicité de mélanges de substances appartenant à diverses familles chimiques ont été examinées. Le ratio médian entre les  $CE_{50}$  déterminées expérimentalement et via le modèle CA se situait autour de 1, et un facteur 2 séparait ces deux valeurs pour seulement 10% des mélanges testés, démontrant la très bonne fiabilité de ce modèle. Bien que ce modèle soit *a priori* davantage adapté aux mélanges

de substances possédant un mode d'action similaire, les résultats obtenus pour des substances ayant des modes d'action différents sont acceptables, les erreurs de prédiction n'excédant pas un facteur 2. De plus, dans la plupart des cas, l'effet toxique prédit est surestimé par rapport à l'effet toxique mesuré expérimentalement, ce qui s'accorde avec le principe de précaution souvent mis en avant dans les textes réglementaires.

### 5.2.2. Action indépendante, IA

Tout comme le modèle CA, le modèle IA se base sur l'hypothèse selon laquelle les substances chimiques en mélanges n'interagissent pas entre elles. Cependant, contrairement au modèle CA, le modèle IA considère que des substances n'ayant pas le même mode d'action contribuent de manière indépendante à la toxicité du mélange, en agissant sur des cibles différentes de manière binaire : affecté ou non-affecté. L'image utilisée par Berenbaum (1981) illustre bien la logique derrière ce modèle : si on lance une poignée de clous et de cailloux sur des œufs, les clous et les cailloux ne vont pas coopérer pour casser les œufs. Au contraire, chaque unité (clous ou cailloux) aura une probabilité individuelle et différente de toucher un œuf. Les dommages cumulés sur les œufs seront donc le résultat de la combinaison des probabilités individuelles de chaque unité d'induire un dommage aux œufs. L'équation (9) décrit l'effet d'un mélange de  $n$  substances prédit par le modèle IA,

$$E(z_{\text{MIX}}) = E(z_1 + \dots + z_N) = 1 - \prod_{i=1}^n [1 - E(z_i)] \quad (9)$$

où  $E(z_{\text{MIX}})$  représente l'effet d'inhibition prédit (allant de 0 à 1) d'un mélange de  $n$  substances,  $z_{\text{MIX}}$  est la somme des concentrations des substances en mélange,  $z_i$  la concentration de la substance  $i$  et  $E(z_i)$  l'effet de cette concentration lorsque cette substance est testée seule.

La réponse d'un mélange de deux substances,  $X$  et  $Y$ , suivant les prédictions du modèle IA correspond donc à la multiplication des réponses relatives, allant de 0,5 (50% d'inhibition sur le paramètre de réponse choisi, par exemple le taux de croissance) à 1 (aucune inhibition), et peut être décrite comme :

$R_{\text{MIX}} = R_X \times R_Y$  ; dans un mélange induisant une inhibition de 50%, la réponse de la substance  $Y$  est :  $R_Y = 0,5 / R_X$ . En connaissant la réponse induite par la substance  $Y$  pour une concentration donnée de la substance  $X$ , il est possible de calculer la concentration correspondante pour la substance  $Y$  ( $y$ ) en résolvant l'équation du modèle concentration-réponse choisi (dans cet exemple, le modèle log-logistique ; équation 5). En utilisant l'équation (5) avec  $d = 1$ , et en la résolvant pour la concentration  $z$ , on obtient l'équation (10),

$$z = CE_{50} Y \left( \frac{1}{U} - 1 \right)^{1/b} \quad (10)$$

où  $y$  peut être déterminé en utilisant la  $CE_{50}$  et la pente  $b$  issues de la courbe concentration-réponse de la substance  $Y$ ,  $U$  correspondant à l'effet d'inhibition observé. Comme pour le modèle CA, les concentrations  $x$  et  $y$  induisant un effet d'inhibition de 50% sont alors utilisées pour construire l'isobole du modèle IA (voir section 3.3.1).

L'effet d'inhibition de  $x\%$  induit par un mélange complexe selon IA peut être calculé en utilisant l'équation (11),

$$x\% = 1 - \prod_{i=1}^n [1 - F_i(p_i(CE_{x_{MIX}}))] \quad (11)$$

obtenue par substitution des termes de l'équation (9) :  $E(z_i)$  par  $F_i(z_i)$ , avec  $F_i$  la fonction concentration-réponse individuelle pour la substance  $i$ , et où  $p_i$  est la proportion de la substance  $i$  dans le mélange, avec  $p_i = z_i / z_{MIX}$  où  $z_{MIX} = CE_{x_{MIX}}$  lorsque l'effet du mélange  $E(z_{MIX})$  est égal à  $x\%$ . La concentration effective du mélange complexe induisant un effet de  $x\%$  selon IA,  $CE_{x_{MIX}}$ , peut ensuite être calculée de manière itérative.

L'une des principales critiques adressées à ce modèle vient du fait qu'il repose sur l'hypothèse selon laquelle les substances agissent indépendamment. Si la réponse suivie est le taux de croissance, qui est une réponse graduelle et non binomiale, il est peu probable que l'effet d'inhibition d'un contaminant sur le taux de croissance n'affecte pas celle d'un second contaminant. L'hypothèse de base de ce modèle n'est donc pas respectée. Cependant, plusieurs études ont pu démontrer sa fiabilité pour prédire la toxicité de mélanges de substances ayant un mode d'action différent, sur de l'épipsammon (microalgues benthiques vivant sur le sable) (Backhaus *et al.*, 2004) et des microalgues dulçaquicoles (Faust *et al.*, 2003 ; Cedergreen *et al.*, 2008).

Dans l'étude de Belden *et al.* (2007), il a été observé que le modèle IA donnait de moins bonnes prédictions que le modèle CA pour les mélanges de substances possédant le même mode d'action. La toxicité du mélange était, la plupart du temps, sous-estimée. En revanche, le modèle IA semblait donner de meilleures prédictions que le modèle CA lorsqu'il s'agissait de substances ayant un mode d'action différent, bien que les écarts entre les deux modèles soient faibles. Cedergreen *et al.* (2008) ont examiné 158 mélanges binaires testés sur un total de sept organismes différents, afin de comparer les prédictions des modèles CA et IA. Aucun des deux modèles ne s'est avéré meilleur que l'autre s'agissant de leur capacité de prédiction.

Le modèle CA donne des prédictions qui, la plupart du temps, surestiment la toxicité des mélanges, alors que le modèle IA a davantage tendance à la sous-estimer. En termes de réglementation, et en

suivant le principe de précaution du « pire scénario possible », il apparaît donc préférable d'utiliser le modèle CA, davantage conservateur, par rapport au modèle IA (Junghans *et al.*, 2006 ; Kortenkamp *et al.*, 2009 ; Backhaus et Faust, 2010).

### 5.3. Mélanges binaires

La plupart des modèles utilisés aujourd'hui pour l'étude des effets d'interaction des mélanges de contaminants sont issus d'approches développées pour répondre à des problèmes liés aux domaines pharmaceutique, médical ou enzymologique. Dans ces approches, l'interaction de seulement deux substances est étudiée. Rapportée au domaine de l'écotoxicologie, ce type d'approche reste bien évidemment une simplification de la réalité où plusieurs dizaines, voire centaines de substances peuvent coexister, comme nous avons pu le voir dans la section 1.6. L'étude des mélanges binaires est néanmoins justifiée par le fait que, dans un échantillon environnemental contenant un mélange de pesticides, la toxicité est parfois causée par seulement deux à trois substances, le reste ne contribuant que de façon marginale à la toxicité observée (Junghans *et al.*, 2006 ; Baas *et al.*, 2009).

La méthode des isobogrammes décrite ci-dessous ne s'applique pour l'instant qu'à des mélanges binaires et permet l'évaluation complète et précise de l'interaction entre deux substances : l'effet d'interaction d'un mélange binaire peut ainsi être évalué pour toutes les combinaisons (*i.e.* quel que soit le ratio de chacune des substances dans le mélange) de concentrations possibles induisant un effet d'inhibition choisi de  $x\%$ . Elle est de ce fait considérée comme la plus informative et élaborée pour l'étude de la toxicité de mélanges binaires (Cedergreen *et al.*, 2013). Une approche alternative à celle des isobogrammes, le modèle MIXTOX, est également présentée, puisqu'elle a également été utilisée au cours ces travaux de thèse.

#### 5.3.1. Principe des isobogrammes

En biochimie, un isobogramme est défini comme un diagramme permettant de visualiser des combinaisons variables de quantités de substrat et d'inhibiteur induisant une activité enzymatique constante. Appliqué à l'écotoxicologie, et notamment aux effets toxiques d'un mélange binaire de contaminants, un isobogramme représente donc les combinaisons binaires de concentrations requises pour produire un effet d'inhibition similaire, dans notre exemple égal à 50%. Un isobogramme est composé d'une ou plusieurs isoboles, lignes reliant deux points induisant le même effet d'inhibition.

L'approche des isobogrammes, également appelée approche des surfaces concentration-réponse, appliquée au domaine de l'écotoxicologie, a été décrite par plusieurs auteurs (Altenburger *et al.*, 1990 ;

Gessner, 1995 ; White *et al.*, 2004). Elle a pour but la description complète de la surface concentration-réponse du mélange de deux substances pour un organisme choisi. Pour ce faire, le design expérimental doit être établi avec soin, afin de permettre l'obtention d'un jeu de données couvrant l'ensemble des combinaisons de concentrations possibles entre les deux substances testées. Deux méthodes peuvent être utilisées : un « *ray design* », utilisé dans ces travaux de thèse et décrit par la suite ; un design factoriel, où des concentrations fixes de substances sont combinées.

Dans le *ray design*, les deux substances sont testées :

- seules, dans le but d'obtenir les courbes concentration-réponse individuelles et spécifiques des deux substances testées ;
- en mélange binaires, selon des ratios de mélanges choisis pour couvrir la surface de réponse de manière équivalente en se basant sur un effet d'inhibition prédéfini.

Prenons l'exemple de deux substances,  $A$  et  $B$ , d'un effet d'inhibition choisi égal à 50%, et de trois ratios de mélanges. Les ratios vont être choisis en se basant sur des proportions d'effet par rapport à l'effet d'inhibition choisi du mélange. Par exemple, pour un des trois ratios, 50% de la toxicité sera issue de la substance  $A$  (50% <sub>$A$</sub> ) et les 50% restants seront issus de la substance  $B$  (50% <sub>$B$</sub> ). Pour couvrir équitablement la surface de réponse, les autres ratios choisis seront 75% <sub>$A$</sub> :25% <sub>$B$</sub>  et 25% <sub>$A$</sub> :75% <sub>$B$</sub> . Pour calculer les concentrations à tester, il suffira donc d'appliquer les pourcentages choisis aux gammes de concentrations respectives des deux substances  $A$  et  $B$  testées seules, celles-ci étant considérées comme les ratios 100% <sub>$A$</sub> :0% <sub>$B$</sub>  et 0% <sub>$A$</sub> :100% <sub>$B$</sub> , respectivement (Tableau 5).

Tableau 5 : Exemple de calcul d'une gamme de six concentrations pour évaluer l'interaction de deux substances,  $A$  (en rouge) et  $B$  (en bleu), en mélange binaire suivant un *ray design*.

	Concentration ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )									
	100% <sub><math>A</math></sub> :0% <sub><math>B</math></sub>		75% <sub><math>A</math></sub> :25% <sub><math>B</math></sub>		50% <sub><math>A</math></sub> :50% <sub><math>B</math></sub>		25% <sub><math>A</math></sub> :75% <sub><math>B</math></sub>		0% <sub><math>A</math></sub> :100% <sub><math>B</math></sub>	
	$A$	$B$	$A$	$B$	$A$	$B$	$A$	$B$	$A$	$B$
$C_1$	4	0	3	0,25	2	0,5	1	0,75	0	1
$C_2$	8	0	6	0,5	4	1	2	1,5	0	2
$C_3$	16	0	12	1	8	2	4	3	0	4
$C_4$	32	0	24	2	16	4	8	6	0	8
$C_5$	64	0	48	4	32	8	16	12	0	16
$C_6$	128	0	96	8	64	16	32	24	0	32

Une fois l'expérience terminée, le jeu de données peut être traité. En appliquant un modèle log-logistique (équation (5) ; d'autres modèles de régression non-linéaire peuvent également être utilisés) à l'ensemble du jeu de données, utilisant une limite haute ( $d$ ) fixe (par exemple, le taux de croissance des conditions témoins) et des pentes ( $b$ ) et  $CE_{50}$  ( $e$ ) variables, on obtient cinq courbes concentration-

réponse : une par ratio, correspondant aux deux substances testées seules et aux trois ratios de mélange (Figure 13).

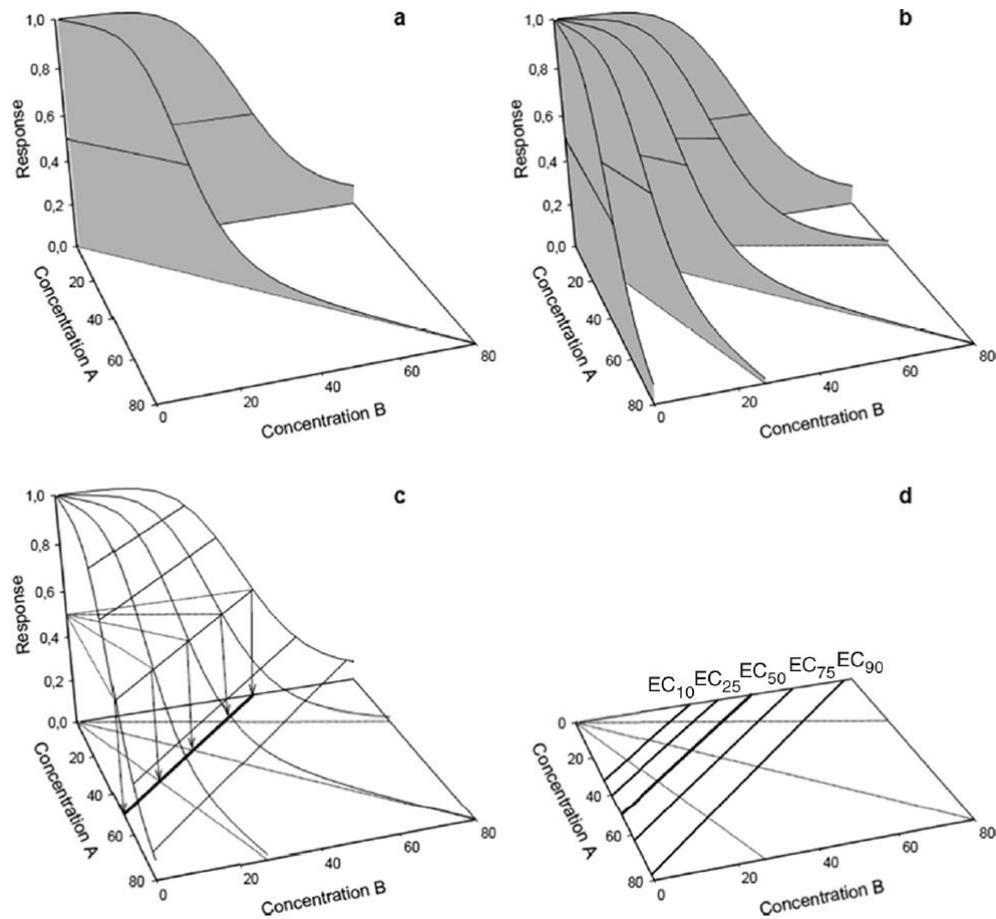


Figure 13 : Concept des surfaces concentration-réponse et de l'isobologramme. La réponse (allant de 0 à 1, 1 correspondant à la limite-haute = réponse des témoins) diminue en fonction des concentrations croissantes de la substance *B* (courbe du haut) et du ratio de mélange 50%<sub>A</sub>:50%<sub>B</sub> (courbe transversale) (a) ; les courbes concentration-réponse des deux substances seules *A* et *B* et des trois ratios de mélanges sont affichées (b) ; la surface concentration-réponse est projetée sur un plan 2D selon l'effet d'inhibition choisi, ici 50%, correspondant aux  $CE_{50}$  respectives induites par les différents ratios de mélange (c) ; les isoboles de cinq effets d'inhibition (10%, 25%, 50%, 75% et 100%) sont affichées en 2D sur l'isobologramme (d). Notons que dans cet exemple, le mélange binaire suit parfaitement le concept d'addition des concentrations. D'après Cedergreen *et al.* (2013) et Gessner (1995).

Dans ces travaux de thèse, le logiciel R avec le *package* 'drc' (Ritz et Streibig, 2014) a été utilisé pour modéliser les courbes concentration-réponse et construire les isobologrammes résultant des mélanges binaires testés. Une fois que l'isobologramme de base, compilant les courbes concentration-réponse expérimentales résultant du mélange binaire testé, a été obtenu (représentant dans notre cas uniquement l'isobole correspondant à un effet d'inhibition de 50%), d'autres isoboles issues des modèles CA et IA, mais également d'autres modèles plus complexes, pourront être ajoutés et testés contre le jeu de données expérimentales.

Bien que cette approche soit la plus répandue, une autre approche, le modèle MIXTOX, permet également le traitement de jeux de données résultant d'un mélange binaire.

### 5.3.2. Le modèle MIXTOX

L'utilisation de l'approche des isobogrammes peut s'avérer fastidieuse du fait des contraintes imposées par le design expérimental et du traitement des données parfois complexe suivant l'expérimentation. Plus facile d'utilisation, le modèle MIXTOX développé par Jonker *et al.* (2005) est implémenté dans Microsoft Excel<sup>®</sup> sous la forme d'une macro. Il décrit également une surface concentration-réponse, cependant, contrairement à l'approche des isoboles, il ne le fait pas à partir des courbes concentration-réponse des différents ratios de mélanges testés, mais modélise mathématiquement l'intégralité de la surface en utilisant l'ensemble du jeu de données. Cela implique deux choses : i) le design expérimental ne nécessite pas d'être formaté d'une manière particulière, mais doit cependant couvrir la majorité de la surface concentration-réponse ; ii) la surface modélisée peut contenir des relations concentration-réponse ne suivant pas la forme sigmoïde « classique » typique (Figure 12) des relations concentration-réponse (Scholze, *et al.*, 2001).

Les modèles CA et IA, ainsi que plusieurs déviations plus complexes de ces modèles, sont implémentés dans MIXTOX et permettent la description des effets d'interaction résultant des mélanges testés. La modélisation des effets d'interaction via l'approche des isoboles et du modèle MIXTOX est discutée dans la section suivante.

### 5.3.3. Modélisation des effets d'interaction de deux molécules en mélange

Pour l'approche des isobogrammes comme pour celle du modèle MIXTOX, la démarche consistant à évaluer l'effet d'interaction résultant du mélange binaire de deux substances est la même. Une fois que le jeu de données expérimentales issu du mélange binaire de deux substances a été obtenu, il est possible de le confronter aux prédictions des modèles de référence CA et IA. En fonction de l'approche choisie, et donc du logiciel utilisé pour l'analyse (R ou Microsoft Excel<sup>®</sup>), il est possible d'évaluer l'adéquation (le *fit* en anglais) du modèle choisi par rapport au jeu de données expérimentales. L'adéquation repose sur la présence ou non d'une différence significative entre le jeu de données expérimentales et les prédictions du modèle choisi : via un test  $F$  (test de Fisher) pour l'approche des isobogrammes ; via un test du  $\chi^2$  pour le modèle MIXTOX. Deux cas de figure se présentent ensuite :

- aucune différence significative entre le jeu de données expérimentales et les prédictions du modèle choisi : l'interaction entre les deux substances peut être expliquée par le modèle de référence choisi et sera donc considérée comme additive ;
- une différence significative est observée entre le jeu de données expérimentales et les prédictions du modèle choisi : l'interaction entre les deux substances ne peut être expliquée par le modèle de référence choisi.

Dans le premier cas de figure, il est inutile d'aller plus loin. On préférera en effet expliquer l'interaction observée par le modèle le plus simple possible afin d'éviter une surinterprétation des résultats.

Dans le deuxième cas de figure, il est possible de tester d'autres modèles plus complexes qui sont des déviations des modèles de références CA et IA (modèles imbriqués), et permettent d'évaluer la présence d'interactions antagonistes ou synergiques. Ces déviations diffèrent selon l'approche considérée, néanmoins, le principe reste similaire : l'ajout d'un ou deux paramètres d'interaction supplémentaires au modèle de référence permet d'augmenter la capacité du modèle à s'ajuster au jeu de données expérimentales. Ainsi, ces déviations pourront décrire des interactions synergiques ou antagonistes selon la valeur du/des paramètre(s) d'interaction. Par souci de clarté, nous appellerons ces modèles complexes « modèle d'interaction (à un ou deux paramètres) ». Afin d'évaluer si l'adéquation du modèle d'interaction avec le jeu de données expérimentales est significativement meilleure que celle du modèle de référence, un nouveau test statistique (similaire à celui décrit précédemment) est réalisé. S'il existe une différence significative entre les deux modèles, cela signifie que le modèle d'interaction explique mieux les données expérimentales que le modèle de référence. Il est également possible de comparer l'adéquation de deux modèles d'interaction, avec un et deux paramètres ajoutés, respectivement, afin d'évaluer celui expliquant le mieux les données expérimentales. Cependant, en l'absence d'une différence significative entre les deux modèles d'interaction comparés, le modèle le plus simple, avec un seul paramètre ajouté, sera choisi, dans le but d'éviter une surinterprétation des données. Notons que la description complète des modèles d'interaction à un et deux paramètres utilisés dans ces travaux de thèse est disponible dans l'Article 2 du Chapitre 3.

L'interprétation de l'effet d'interaction du mélange peut se faire via l'analyse des résultats des tests statistiques réalisés, mais également graphiquement via les isobogrammes (Figure 14). La/les valeur(s) du/des paramètre(s) d'interaction renseigne sur le type d'interaction observée. Pour les modèles d'interaction à un paramètre (interaction symétrique), la valeur de ce paramètre indiquera une interaction antagoniste ou synergique. Pour les modèles à deux paramètres (interaction asymétrique), les valeurs des deux paramètres doivent être prises en compte : l'interaction peut alors être antagoniste, synergique, ou un mélange des deux selon le ratio ou l'effet d'inhibition considéré.

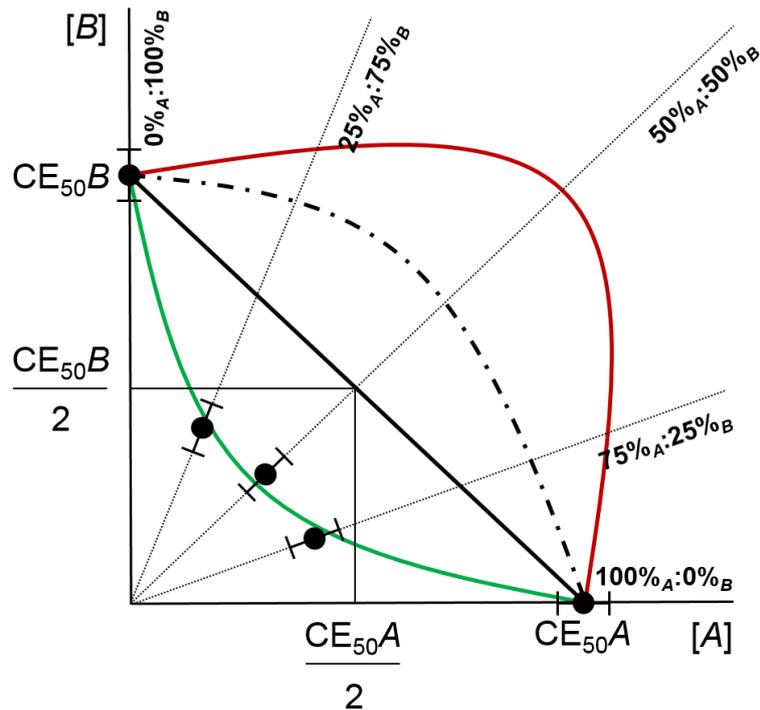


Figure 14 : Illustration d'un isobologramme résultant d'un mélange synergique, par rapport aux prédictions des modèles CA et IA, entre deux substances,  $A$  et  $B$ . Les deux axes représentent les concentrations des substances  $A$  (abscisses) et  $B$  (ordonnées) en mélange ; les différents ratios de mélanges sont représentés par les lignes pointillées. Les points ( $\pm$  intervalle de confiance à 95%) représentent les  $CE_{50}$  déterminées expérimentalement. La ligne pleine noire en gras représente l'isobole du modèle CA ; la courbe en points-tirets représente l'isobole du modèle IA. La courbe rouge au-dessus de l'isobole CA est un exemple d'isobole décrivant une interaction antagoniste ; la courbe verte en-dessous de l'isobole CA est l'isobole décrivant l'interaction synergique observée.

Graphiquement, il est facile d'appréhender, grâce aux isobologrammes, le type d'interaction produite par le mélange binaire de deux substances. La figure 14 illustre un exemple de synergie. Sur cet exemple, on retrouve l'isobole du modèle CA : au niveau de son point d'intersection avec le « rayon » du ratio de mélange 50% $_A$ :50% $_B$ , on obtient des concentrations pour les substances  $A$  et  $B$  égales à la moitié de leur  $CE_{50}$  respectives. C'est tout à fait logique : en suivant le principe d'additivité du modèle CA, une inhibition de 50% (l'effet d'inhibition choisi) sera obtenue en additionnant la moitié de la  $CE_{50}$  de chacune des deux substances constitutives du mélange. Une telle interprétation visuelle n'est pas possible pour le modèle IA (la courbe noire en points-tirets représentée sur la figure 14 est donnée à titre d'exemple) puisque l'allure de l'isobole du modèle IA dépend de facteurs plus complexes, notamment de la pente des courbes concentration-réponse des deux substances testées. Dans l'exemple illustré, la courbe verte en-dessous de l'isobole CA correspond à un modèle d'interaction de type synergie. Il décrit correctement les données expérimentales (les points noirs) : si l'on se place à l'intersection de cette courbe avec le « rayon » du ratio 50% $_A$ :50% $_B$ , on remarque que les concentrations nécessaires pour induire 50% d'inhibition sont inférieures à la moitié de leurs  $CE_{50}$  respectives. On en déduit donc bien que les concentrations nécessaires de chaque substance pour

induire 50% d'inhibition sont inférieures à celles prédites par le modèle CA. La toxicité expérimentale du mélange est donc supérieure à celle prédite par le modèle CA : c'est la définition de la synergie. Le même raisonnement peut être appliqué pour une interaction antagoniste (courbe en rouge au-dessus de l'isobole CA).

### 5.3.4. Toxicité des mélanges binaires de pesticides

Cette section a pour but de donner un aperçu des possibles interactions rencontrées lors de l'exposition de microalgues d'eau douce ou marine à des mélanges binaires de pesticides, notamment ceux constitués des substances sélectionnées pour ces travaux de thèse (Tableau 2).

L'étude de Cedergreen (2014) montre que les mélanges binaires de biocides utilisés dans les peintures anti-salissures (*antifouling*) sont davantage suspectés d'induire des interactions synergiques : 26% des 136 mélanges binaires de biocides *antifouling* examinés dans l'étude ont induit une synergie significative (facteur de différence entre effet prédit et observé > 2). Les mélanges synergiques étaient composés dans la plupart des cas d'au moins une de ces substances : diuron, irgarol, ZnPT, CuPT et Cu. De manière plus générale, la synergie observée résultait, pour la majorité des mélanges observés, d'une combinaison entre un inhibiteur du PSII et un métal, et moins fréquemment, de deux inhibiteurs du PSII ou un inhibiteur du PSII et une autre substance dont le mode d'action est non-spécifique. Le cas particulier du mélange entre le ZnPT et le Cu a été largement étudié. Une interaction chimique se produit lorsque le ZnPT et des ions Cu (en excès) sont mélangés dans une solution. Les ions Cu ayant une affinité supérieure aux ions Zn pour le complexe pyrithione, le ZnPT se transforme en CuPT par transchélation, comme démontré par plusieurs études (Thomas, 1999 ; Maraldo et Dahllöf, 2004 ; Grunnet et Dahllöf, 2005), ainsi qu'au cours de la présente thèse (Article 2 du chapitre 3). Le CuPT étant généralement plus toxique que le ZnPT, cette transformation induit inévitablement une interaction synergique entre le ZnPT et le Cu (Koutsaftis et Aoyama, 2006 ; Mochida *et al.*, 2006 ; Zhou *et al.*, 2006 ; Bao *et al.*, 2008).

Dans la publication de Cedergreen (2014), seuls 7% des 194 mélanges binaires de pesticides testés (en l'occurrence, des produits phytosanitaires) ont induit une synergie significative, soit une fréquence presque quatre fois moins importante que dans le cas des biocides *antifouling*. Dans 95% des cas, les synergies observées impliquaient un inhibiteur de la cholinestérase ou un fongicide de la famille des azoles. Aucun cas de synergie n'a été observé pour des organismes autotrophes (plantes et algues/microalgues). Au contraire, une forte proportion d'interactions antagonistes a pu être observée pour ces organismes. Cette observation a pu être confirmée par deux autres études. Cedergreen *et al.* (2006) ont testé des mélanges binaires impliquant le prochloraze, un fongicide de la famille des imidazoles suspecté d'être un potentiel synergiste (*i.e.* une substance qui agit en synergie

avec une autre), et d'autres pesticides (dont le diquat et l'azoxystrobine) sur plusieurs organismes : aucune interaction synergique n'a été observée pour la plante aquatique *Lemma minor* et la microalgue *Raphidocelis subvcapitata*, alors que des cas de synergie ont été observés pour le crustacé d'eau douce *Daphnia magna* et la bactérie *Vibrio fischeri*. Dans une autre étude, la moitié des mélanges d'herbicides testés sur *R. subvcapitata* (différents modes d'action) ont également induit une interaction antagoniste, l'autre moitié se conformant aux prédictions du modèle CA. Des schémas d'interaction similaires ont été observés pour les autres organismes testés, parmi lesquels les plantes terrestres *Tripleurospermum inodorum* et *Stellaria media* et la plante aquatique *L. minor*.

Ainsi, la nature de l'interaction résultant d'un mélange binaire peut donc varier en fonction :

- du type de substances testées (produits phytosanitaires *vs.* biocides *antifouling*) ;
- du type d'organismes exposés (animal *vs.* photosynthétique).

Comme nous l'avons vu dans la partie 4.4.1, plusieurs paramètres physiologiques peuvent être suivis pour évaluer la toxicité d'une substance ou d'un mélange de substances. Pour un même critère d'évaluation de la toxicité, par exemple le taux de croissance de la population pour une microalgue, différents paramètres, comme la densité cellulaire ou la fluorescence de la chlorophylle, peuvent être utilisés pour effectuer les calculs. L'étude de Cedergreen et Streibig (2005b) portant sur *L. minor*, a exploré l'influence du paramètre choisi pour la détermination du taux de croissance sur l'effet d'interaction de deux herbicides (metsulfuron-méthyl et terbuthylazine) en mélange binaire. Les quatre paramètres utilisés pour évaluer le taux de croissance étaient : la surface des frondes ; le nombre de frondes ; le poids frais et le poids sec. Les interactions observées, ainsi que les prédictions des modèles CA et IA, étaient significativement différentes selon le paramètre utilisé pour calculer le taux de croissance. Cela peut s'expliquer par des différences de sensibilité aux contaminants entre les paramètres choisis pour le calcul du taux de croissance : les caractéristiques des relations concentration-réponse de chaque paramètre, comme la pente, peuvent être significativement différentes en fonction du type de contaminant choisi.

Enfin, une autre étude s'est également intéressée à la reproductibilité des résultats issus d'un mélange binaire, *i.e.* la nature de l'interaction déterminée est-elle fiable et reproductible ? Cedergreen *et al.* (2007) ont montré que ces effets sont fiables et reproductibles dès lors que la variabilité du paramètre sélectionné est faible. Dans ces travaux de thèse, les effets de mélanges binaires sur le taux de croissance de trois espèces de microalgues ont été évalués. Une attention particulière a été portée aux paramètres suivis dans le cadre de l'étude présentée sur les effets des mélanges binaires sur trois espèces (voir article 2 du chapitre 3).

Les mélanges binaires, et la méthodologie d'analyse qui leur est associée, permet l'évaluation complète et précise de l'effet d'interaction entre deux substances, et ce pour différents ratios de mélanges et

effets d'inhibition. Cependant, cette approche est réservée, à l'heure actuelle, aux mélanges binaires, lesquels constituent une simplification de la réalité concernant la contamination chimique des milieux aquatiques. Ainsi, d'autres méthodes ont été développées pour l'étude des effets de mélanges plus complexes (nombre de substances > 2). Elles sont décrites dans la section suivante.

## 5.4. Mélanges complexes

Dans ce manuscrit, tous les mélanges comportant plus de deux substances sont considérés comme des mélanges complexes, par opposition aux mélanges binaires traités dans la partie précédente. Du fait du nombre supérieur de substances en mélanges, il est actuellement très difficile de décrire le schéma d'interaction complet d'un mélange complexe, comme dans l'approche des isobogrammes. L'étude de Cedergreen *et al.* (2012) a démontré qu'il était possible d'appliquer des modèles d'interaction à des mélanges ternaires. Cependant, la mise en œuvre, tout comme l'interprétation des résultats, se révèle complexe et doit donc être réservée à des cas d'étude bien spécifiques, par exemple lorsqu'une forte synergie est suspectée entre les trois substances. En revanche, les modèles de référence CA et IA peuvent être utilisés pour prédire la toxicité d'un mélange de plus de deux substances avec une bonne fiabilité. C'est également le cas d'autres approches méthodologiques visant à étudier la toxicité de mélanges environnementaux. Ces approches sont décrites ci-après.

### 5.4.1. Approches utilisées pour l'étude de la toxicité des mélanges complexes

L'étude de Warne et Hawker (1995) tend à affirmer que le nombre de substances constituant un mélange complexe influe sur la réponse observée (additivité, antagonisme ou synergie). Plus le nombre de substances est important (des stupéfiants dans l'étude citée, dont la toxicité est non spécifique), plus la réponse observée tendra vers l'additivité : c'est l'hypothèse de l'entonnoir (*funnel hypothesis* en anglais). Cette hypothèse a été partiellement vérifiée par McCarty et Borgert, (2006), notamment pour des pesticides organochlorés et lorsqu'un nombre important de contaminants (> 10) participent de manière relativement équivalente à la toxicité générale du mélange. Dans le cas où seules quelques substances (< 5) participent à la toxicité, il y a davantage de chances pour que l'interaction diffère d'une simple additivité. Plusieurs études ont pu démontrer qu'il était possible d'appliquer les modèles CA et IA pour prédire avec une bonne fiabilité la toxicité de mélanges complexes.

Dans ces études, les substances composant les mélanges complexes étudiés ont été préalablement testées séparément sur l'organisme sélectionné pour permettre l'obtention des relations

concentration-réponse individuelles pour chaque substance (pente,  $CE_x$ ). Dans le cas de mélanges de substances ayant un mode d'action similaire, la toxicité prédite par le modèle CA s'est révélée plus proche de la toxicité observée par rapport à celle prédite par le modèle IA (Altenburger *et al.*, 2000 ; Backhaus *et al.*, 2000, 2004 ; Faust *et al.*, 2001). Au contraire, Faust *et al.* (2003) ont montré que pour des substances possédant des modes d'action différents, le modèle IA donnait de meilleures prédictions que le modèle CA. Cependant, il est important de souligner que dans le milieu naturel, des substances ayant à la fois des modes d'action similaires et différents coexistent. Partant de ce constat, plusieurs études ont donc développé une approche hybride combinant les modèles CA et IA (Altenburger *et al.*, 2004, 2005 ; de Zwart et Posthuma, 2005). La toxicité combinée des substances possédant le même mode d'action est prédite par le modèle CA, constituant un sous-groupe correspondant à un mode d'action donné, puis, la toxicité combinée des différents sous-groupes est prédite par le modèle IA. Cette approche a permis de prédire avec une précision supérieure aux modèles CA et IA seuls la toxicité d'un mélange complexe constitué de substances ayant des modes d'action similaires et différents.

Ces différentes études démontrent qu'il est possible d'appliquer avec succès les modèles CA, IA ainsi qu'un modèle hybride combinant ces deux approches, pour évaluer la toxicité de mélanges complexes. Ces études se focalisent cependant sur des mélanges de composition connue réalisés en laboratoire et pour lesquels les relations concentration-réponse des différents constituants du mélange ont été établies au préalable. Lorsque ce n'est pas le cas, l'évaluation de la toxicité d'un mélange complexe s'avère plus délicate. Ces mélanges environnementaux complexes sont davantage représentatifs de la contamination réellement présente dans l'environnement et peuvent être :

- prédits, notamment via des modèles d'exposition, comme le modèle EUSES (*European Union System for the Evaluation of Substances*, Vermeire *et al.* 2005) : des concentrations environnementales prédites (*predicted environmental concentration*, PEC en anglais) seront alors utilisées pour les substances sélectionnées (par exemple, tous les produits phytosanitaires autorisés et utilisés sur la zone étudiée) ;
- un prélèvement d'eau, ou un extrait d'échantillonneurs passifs, afin d'évaluer la contamination d'un site d'étude préalablement choisi.

Ainsi, s'agissant d'élargir l'étude des mélanges complexe à l'évaluation du risque, Backhaus et Faust (2012) proposent un cadre conceptuel permettant de choisir l'approche à appliquer par le calcul de quotients de risque QR (*risk quotients*, RQ en anglais). Cette approche s'applique à plusieurs groupes d'organismes (par exemple, algues, daphnies et poissons) et utilise les concentrations PEC et les PNEC ou les  $CE_{50}$  (si elles sont connues) des organismes souhaités dans l'évaluation du risque. Cette approche ne sera cependant pas décrite en détail, car elle n'a pas été utilisée dans ces travaux. Un

autre outil pour l'évaluation de la toxicité de mélanges complexes de pesticides, nommé *Pesticide Toxicity Index* (PTI) a récemment été développé par Nowell *et al.* (2014). Comme pour le cadre conceptuel décrit ci-dessus, cette approche a pour but d'évaluer la toxicité potentielle d'un mélange environnemental de pesticides pour différents groupes d'organismes en se basant sur le modèle CA.

Dans ces travaux de thèse, une approche utilisant une technique d'échantillonnage passif a été utilisée pour évaluer la toxicité de mélanges complexes de pesticides, représentatifs de la contamination issue d'une source de pollution diffuse : la viticulture.

#### 5.4.2. Utilisation d'extraits d'échantillonneurs passifs pour l'étude des mélanges complexes

Bien que les échantillonneurs passifs soient davantage utilisés pour la mesure de la contamination chimique (voir section 1.7.2), ils ont d'ores et déjà été utilisés dans plusieurs études afin d'évaluer la toxicité de substances chimiques variées. Parrott *et al.* (1999) furent les premiers à utiliser des SPMD pour concentrer les substances chimiques d'un effluent issu d'une raffinerie de pétrole au niveau de la rivière Mackenzie (Canada) et tester la toxicité des extraits sur des lignées cellulaires de poisson (*Poeciliopsis lucida*). Plusieurs études mentionnent l'usage d'échantillonneurs passifs, comme les SPMD (Rogers *et al.*, 2005), les LPDE (Allan *et al.*, 2012), les PDMS (Emelogu *et al.*, 2013a, 2013b, 2014 ; Claessens *et al.*, 2015) et les Chemcatcher<sup>®</sup>/POS (Escher *et al.*, 2006 ; Muller *et al.*, 2007, 2008 ; Shaw *et al.*, 2009 ; Vermeirssen *et al.*, 2009), couplés à des tests de toxicité, pour évaluer la toxicité de mélanges complexes de différents types de contaminants (HAP, PCB, pesticides) sur des organismes variés (poisson zèbre, lignées cellulaires, daphnies, microalgues d'eau douce/marine, bactéries).

Concernant plus particulièrement les POCIS, ils ont également été utilisés pour étudier la toxicité de mélanges complexes issus de différentes sources de pollution. Plusieurs études ont évalué la toxicité d'effluents issus de stations d'épuration, en ciblant notamment les effets de type perturbateurs endocriniens, via l'application du test d'œstrogénicité sur levures (*yeast estrogen screen*, YES en anglais ; Vermeirssen *et al.*, 2005 ; Alvarez *et al.*, 2008 ; Liscio *et al.*, 2009 ; Balaam *et al.*, 2010). Les études de Pesce *et al.* (2011), Morin *et al.* (2012) et Kim Tiam *et al.* (2014) se sont quant à elles intéressées à la toxicité d'extraits de POCIS issus des rivières Morcille (Beaujolais, France) et Ruiné (Charente, France) pour des communautés naturelles de biofilm. Enfin, la toxicité d'extraits de POCIS a également été étudiée sur des microalgues d'eau douce (*R. subcapitata* ; Vermeirssen *et al.*, 2010) et marine (*D. tertiolacta* ; Booiij *et al.*, 2013, 2014).

Toutes ces études démontrent un intérêt grandissant pour l'utilisation d'échantillonneurs passifs dans le cadre de l'étude de la toxicité de mélanges complexes. Kim Tiam *et al.* (2016) ont récemment publié

un article sur de l'usage d'échantillonneurs passifs ciblant les substances organiques polaires (principalement POCIS et Chemcatcher<sup>®</sup>/POS) pour l'étude de la toxicité de leurs extraits sur des microalgues.

L'utilisation des échantillonneurs passifs pour l'étude de la toxicité de mélanges complexes de contaminants chimiques présente certains avantages, mais aussi plusieurs limites (Tableau 6).

Tableau 6 : Principaux avantages et limites associés à l'utilisation des échantillonneurs passifs pour l'étude de la toxicité de mélanges complexes ; modifié d'après Kim Tiam *et al.* (2016).

Avantages	Limites
(1) Bonne représentativité par rapport à la contamination du milieu échantillonné	Les substances ne possédant pas le même taux d'échantillonnage, les concentrations présentes dans les extraits des échantillonneurs passifs représentent donc une image déformée de la contamination <i>in situ</i>
(2) Intégration des pics de contamination	Pas de notion de succession temporelle d'exposition aux contaminants. La toxicité d'un extrait est issue de toutes les substances présentes simultanément, et non de manière séquentielle comme c'est le cas dans l'environnement.
(3) Intégration des effets d'interaction des substances en mélange (additivité, antagonisme, synergie)	Impossibilité d'identifier la/les substance(s) responsable(s) de la toxicité observée
(4) Évaluation de la toxicité d'un extrait sans connaissance préalable de la nature des substances qui le composent (substances suspectées d'être présentes + substances inconnues)	Seulement représentatif de la phase dissoute, de plus, chaque type d'échantillonneur passif échantillonne une certaine gamme de contaminants selon leurs propriétés physico-chimiques (toutes les substances dissoutes ne sont pas échantillonnées)
(5) Pertinence écotoxicologique : mime l'accumulation par les organismes (fraction biodisponible)	Ne prend pas en compte l'accumulation depuis la phase particulière, ainsi que les processus de métabolisation des contaminants
(6) Étude au cas par cas	Difficulté à standardiser

Il apparaît en effet évident que l'interprétation de la toxicité induite par des extraits d'échantillonneurs passifs doit tenir compte des limites du type d'échantillonneur passif utilisé et des connaissances relatives à la composition du mélange testé. La limite énoncée dans le point (3) du tableau ci-dessus est par exemple discutable : la connaissance, même partielle, des substances composant le mélange ainsi que de leur toxicité permet d'évaluer la contribution relative de chaque substance à la toxicité globale du mélange via différentes approches, dont celle des unités toxiques (section 5.3.1).

La limite énoncée par le point (6) constitue probablement un des principaux inconvénients de cet outil. Un effort de standardisation semble néanmoins avoir été fait. Dans la plupart des études (citées ci-dessus) visant à évaluer la toxicité d'extraits pour des microalgues, les résultats sont donnés de façon assez homogène par la détermination des concentrations effectives d'extrait induisant x% d'inhibition de l'efficacité photosynthétique et/ou du taux de croissance. Plus de la moitié de ces études ont exprimé ces concentrations en « équivalent diuron » (*diuron equivalent concentration*, DEQ en

anglais ; décrit en détail dans la section 5.4.3) ; les autres ont choisi de les exprimer en équivalent d'extrait par mL, ou en unités toxiques (section 5.2.1). Cet effort de standardisation concerne également les méthodes utilisées pour le déploiement, l'extraction et l'évaluation de la toxicité des extraits d'échantillonneurs passifs. Il est nécessaire et doit être poursuivi pour permettre la comparaison des résultats obtenus entre les différentes études, et peut-être un jour permettre l'utilisation de ces outils pour l'évaluation du potentiel toxique d'extraits environnementaux dans le cadre réglementaire.

Deux exemples d'étude de la toxicité de mélanges complexes dans des contextes différents sont décrits ci-dessous.

### 5.4.3. Toxicité des mélanges complexes de pesticides

Dans cette partie, deux scénarios d'étude de la toxicité de mélanges complexes sont abordés, afin de présenter un aperçu des principales méthodologies utilisées :

- (1) étude d'un mélange complexe constitué en laboratoire de substances connues dont on connaît la toxicité individuelle;
- (2) étude d'un mélange complexe, échantillonné dans l'environnement et dont la composition est partiellement connue. La toxicité individuelle des substances n'a pas été évaluée, ou ne l'a été que très partiellement.

De nombreuses études ont abordé le scénario n°1 pour évaluer la capacité de prédiction des modèles CA et IA dans le cas de mélanges complexes. L'étude réalisée par Junghans *et al.* (2006) est probablement celle qui illustre le mieux ce cas de figure. Un mélange complexe composé de 22 herbicides et trois insecticides a été constitué pour simuler un scénario d'exposition représentatif de la charge médiane en produits phytosanitaires dans les eaux de ruissellement d'une zone agricole d'Europe centrale, après application des traitements pré-émergence printaniers. Les substances ont été mélangées selon un design expérimental avec ratio fixe, déterminé par le scénario d'exposition. Différentes concentrations de mélange (concentration max = 15 × concentration prédite par le scénario) ont été testées, dont celle prédite par le scénario, pour permettre le calcul de la courbe concentration-réponse associée. Le mélange complexe composé des concentrations individuelles prédites de chaque substance par le scénario a induit une inhibition de la croissance de la microalgue d'eau douce *Scenedesmus vacuolatus* (24 h d'exposition, une génération) égale à 46%, alors que les pourcentages d'inhibition prédits par les modèles CA et IA étaient de 49% et 39%, respectivement. Comme mentionné précédemment, les prédictions du modèle CA s'avèrent plus proches du résultat expérimental par rapport au modèle IA. De plus, comme souligné par les auteurs, dans l'hypothèse où l'on favorise la prédiction du « pire scénario » par principe de précaution, l'utilisation du modèle

CA, surestimant légèrement la toxicité, sera préférée au modèle IA qui sous-estime la toxicité observée. Le calcul des unités toxiques de chaque constituant du mélange permet d'observer que deux inhibiteurs du PSII (terbuthylazine et atrazine ; sur 25 substances testées), sont responsables de plus de la moitié de la toxicité du mélange, avec une somme d'unité toxique égale à 0,57 TU, contre 0,98 pour la totalité du mélange. La somme des unités toxiques des huit inhibiteurs du PSII équivaut à environ 0,80 TU. Ainsi, on peut considérer que la toxicité du mélange est principalement due à ces substances possédant toutes le même mode d'action, ce qui explique aussi pourquoi les prédictions du modèle CA sont plus précises que celle du modèle IA.

Ainsi, cette étude démontre la fiabilité de l'utilisation des modèles CA et IA pour prédire la toxicité de mélanges complexes de pesticides. Cependant, cette approche nécessite également la détermination préalable des relations concentration-réponse individuelles de chaque substance du mélange. Ce travail préalable est difficilement réalisable pour des mélanges complexes environnementaux dont la composition exacte n'est pas connue : c'est le cas du scénario (2).

La composition d'un mélange échantillonné dans l'environnement naturel ne peut être complètement connue. En effet, seules les substances suspectées d'être retrouvées, par exemple des pesticides si l'on étudie la contamination d'un cours d'eau en zone agricole, seront recherchées dans l'extrait environnemental. Avec les outils de la chimie analytique, on ne trouve que ce que l'on recherche. Par conséquent, la toxicité du mélange complexe ne peut être expliquée dans sa totalité par les seules substances ayant fait l'objet d'une recherche d'identification et de quantification dans l'extrait. Deux exemples seront ainsi donnés pour illustrer le scénario (2).

Dans le premier exemple, deux études ont couplé une approche utilisant des échantillonneurs passifs de type *silicon rubber* (SR) et un test en microplaques visant à évaluer l'inhibition du taux de croissance de la microalgue marine *Diacronema lutheri* (pavlovophycées ; haptophyte) après 72 h d'exposition aux extraits. Ces études ont été réalisées en Écosse, au niveau du Firth of Forth (Emelogu *et al.*, 2013a), et au niveau du captage du fleuve Ythan (Emelogu *et al.*, 2014). Dans chaque étude, les extraits ont été testés selon une série géométrique de cinq dilutions, exprimées en masse équivalente de SR par mL de DMSO (mg SREQ mL<sup>-1</sup>). Dans chaque étude, des extraits de SR non exposés (témoin négatif) ont également été testés et n'ont induit aucune inhibition de croissance ; un témoin positif de toxicité, le 3,5-dichlorophénol, a également été utilisé pour valider l'utilisation du test d'inhibition de croissance en microplaques. Les extraits de SR issus des milieux d'étude ont induit une toxicité significative par rapport aux témoins, cependant, les résultats n'ont pas permis de calculer des CE<sub>50</sub> : à la place, des CE<sub>10</sub> ont été utilisées pour comparer la toxicité des extraits entre eux. En parallèle des tests de toxicité en microplaques, les auteurs ont réalisé des analyses chimiques ciblant des HAP, PCB et plusieurs pesticides, dont le diuron, l'isoproturon, le métazachlore et le chlorpyrifos. Cependant,

les concentrations de ces substances dans le milieu de culture n'ont pas été mesurées et seules des concentrations en  $\text{ng g}^{-1}$  SR ont été mesurées dans les extraits, donnant uniquement une information qualitative quant à la contamination des sites échantillonnés. Toutefois, les auteurs soulignent tout de même la bonne correspondance obtenue entre la toxicité pour la microalgue marine et la contamination relative observée pour les deux sites suivis. Les auteurs ont pu observer une toxicité supérieure pour les extraits issus du captage du fleuve Ythan, davantage contaminé, par rapport à ceux issus de l'estuaire du Forth. Ces deux études ont donc permis la validation de l'approche couplée échantillonneur passif/bioessai pour l'étude de la contamination environnementale de deux sites d'étude, bien que la toxicité observée n'ait pas pu être associée à des contaminants en particulier.

Dans le deuxième exemple, Vermeirssen *et al.* (2010) ont étudié la toxicité de 21 extraits de POCIS issus d'effluents de STEP situés au nord de la Suisse. Dans cette étude, les auteurs tentent d'expliquer la toxicité des extraits en utilisant l'approche des *toxic equivalent concentrations* (TEQs) mise au point par Escher *et al.* (2008). Dix-huit substances ont été quantifiées dans les extraits de POCIS, dont six herbicides inhibiteurs du PSII parmi lesquels le diuron, l'irgarol et l'isoproturon. En utilisant cette approche, la toxicité des extraits peut être expliquée de deux manières :

- par la présence des six inhibiteurs du PSII sélectionnés, en mesurant l'inhibition de la photosynthèse induite par les extraits sur la microalgue *R. subcapitata* après 2 h d'exposition aux extraits de POCIS. La toxicité de l'extrait est alors exprimée par une valeur de  $\text{DEQ}_{\text{bio}}$ , (*diuron equivalent concentration*, en  $\text{ng POCIS}^{-1}$ ) =  $\text{CE}_{50}(\text{diuron})/\text{CE}_{50}(\text{extrait})$ . Grâce à la quantification des inhibiteurs du PSII présents dans l'extrait, une valeur de  $\text{DEQ}_{\text{chem}}$  (en  $\text{ng POCIS}^{-1}$ ) peut également être calculée :  $\text{DEQ}_{\text{chem}} = \sum_{i=1}^n \text{RP}_i \cdot C_i$ , avec  $\text{RP}_i$  la potentialité relative du composé  $i$ , égale dans cet exemple à  $\text{CE}_{50}(\text{diuron})/\text{CE}_{50}(i)$ , et  $C_i$  la concentration de la substance  $i$  dans l'extrait (en  $\text{ng POCIS}^{-1}$ ) ;
- par la présence d'autres substances induisant une « toxicité de base », en mesurant l'inhibition du taux de croissance de *R. subcapitata* après 24 h d'exposition aux extraits de POCIS. La toxicité est alors exprimée par une valeur de *baseline*- $\text{TEQ}_{\text{algae,bio}}$  (en  $\text{mg POCIS}^{-1}$ ) =  $\text{CE}_{50}(\text{contaminant virtuel})/\text{CE}_{50}(\text{extrait})$ , en utilisant un contaminant virtuel de référence ayant une  $\text{CE}_{50} = 18,8 \text{ mg L}^{-1}$  (Escher *et al.*, 2008).

Les auteurs ont obtenu une très bonne corrélation ( $r^2 = 0,98$ ) entre les valeurs de  $\text{DEQ}_{\text{bio}}$  et  $\text{DEQ}_{\text{chem}}$ , démontrant que la toxicité des extraits de POCIS ( $\text{DEQ}_{\text{bio}}$ ) était bien expliquée, à hauteur de 65%, par les six herbicides quantifiés. La valeur de  $\text{DEQ}_{\text{chem}}$  était expliquée à 87% par trois herbicides : le diuron, l'irgarol et l'isoproturon. Sur 21 sites échantillonnés, le diuron était la substance majoritairement retrouvée (par rapport aux autres inhibiteurs du PSII quantifiés) au niveau de 17 sites, contre trois pour l'irgarol et un seul pour la terbutryne. En plus d'expliquer une grande partie

de la toxicité observée pour les extraits testés, la très bonne corrélation entre les deux valeurs de DEQ calculées démontre la fiabilité de cette approche pour l'évaluation de la toxicité d'extraits environnementaux. Les auteurs soulignent également que, bien que les valeurs de  $DEQ_{bio}$  déterminées dans cette étude soient fiables et étroitement corrélées avec celles de  $DEQ_{chem}$ , l'analyse chimique des extraits environnementaux est nécessaire pour identifier, ne serait-ce qu'en partie, les substances responsables de la toxicité observée. Enfin, les auteurs précisent également que ces résultats devront être confirmés pour d'autres sites d'étude, dont la contamination serait majoritairement due au ruissellement de pesticides utilisés sur des cultures spécifiques, par exemple. En effet, dans le cas où les résultats des analyses biologiques (toxicité des extraits) et chimiques (quantification des substances présentes dans les extraits) diffèrent, une analyse dirigée par l'effet (*effect directed analysis*, EDA en anglais ; Brack 2003) pourrait être privilégiée. Concernant les valeurs de *baseline*- $TEQ_{algae,bio}$ , une relation linéaire ( $r^2 = 0,85$ ) avec les valeurs de  $DEQ_{bio}$  a été obtenue, démontrant que la toxicité de base des extraits était largement influencée par la présence des inhibiteurs du PSII. Les auteurs en concluent donc que ce test ne permet pas de déterminer la part de toxicité non-spécifique des extraits environnementaux dans le cas étudié.

Ce deuxième exemple utilise une approche différente du premier, permettant d'expliquer avec une bonne fiabilité la toxicité des extraits de POCIS issus d'effluents de STEP. Cependant, dans le cas où la toxicité des extraits étudiés ne serait pas due à un groupe de substances possédant un mode d'action similaire (dans l'exemple cité, des inhibiteurs du PSII), cette technique pourrait ne pas être en mesure d'expliquer correctement la toxicité observée.

Dans ces travaux de thèse, la toxicité d'extraits de POCIS issus d'un bassin versant, dont la contamination est principalement issue de la viticulture, a été étudiée sur deux espèces de microalgues marines. En fonction des données disponibles, une combinaison des deux scénarios décrits dans cette section a été utilisée pour tenter d'expliquer la toxicité des extraits de POCIS (voir Chapitre 5).

## Chapitre 2 – Matériels et Méthodes

---



## 1. Pesticides étudiés

### 1.1. Choix des pesticides

Les pesticides utilisés dans ces travaux de thèse sont décrits dans le Tableau 2 présenté dans la section 4.4 du chapitre 1. Les données phytosanitaires issues des enquêtes réalisées sur le site d'étude expérimental du projet PhytoCOTE (voir section 3.1 de ce chapitre) ont été utilisées pour sélectionner les quatorze produits phytosanitaires (herbicides, insecticides et fongicides, Tableau 2) testés dans ces travaux (voir Chapitres 4 et 5). Pour ce faire, les données relatives à leur fréquence d'utilisation et aux quantités utilisées ont été recoupées avec leurs CE<sub>50</sub>, NOEC ou PNEC respectives issues de différentes bases de données (Lewis *et al.*, 2016 ; ANSES, 2018 ; U.S. EPA, 2018). Ainsi, les substances les plus représentées et/ou présentant la plus forte toxicité potentielle pour les microalgues et les larves d'huître ont pu être sélectionnées.

### 1.2. Préparation des solutions

Les solutions de diuron et d'irgarol utilisées dans l'article 1 ont été spécifiquement préparées pour les expérimentations décrites dans cet article. Pour plus de détails, se reporter à la section matériels et méthodes de l'article 1 du chapitre 3.

Les substances pures ont été achetées chez Sigma-Aldrich (standard analytique PESTANAL<sup>®</sup>), à l'exception du CuPT qui a été acheté chez Santa Cruz Biotechnology. Les concentrations des solutions mères de pesticides utilisées dans les expérimentations sont disponibles : pour les *antifoulings* spécifiquement, dans le Tableau S3 de la section « Supplementary material » de l'article 2 du chapitre 3 ; pour les pesticides, dans le Tableau S3a de la section « 2.7. Supplementary material » de l'article 3 du chapitre 4. La majorité des solutions de pesticides utilisées a été préparée par gravimétrie dans du méthanol pur ( $\geq 99\%$ ) ; le diuron, l'irgarol, le ZnPT et le CuPT ont été préparés dans du DMSO pur (diméthylsulfoxyde,  $\geq 99\%$ ) ; le flazasulfuron, l'acrinathrine et la spiroxamine ont été préparés dans de l'acétone pur ( $\geq 99\%$ ) ; le CuSO<sub>4</sub>, le diquat, le glyphosate et l'AMPA ont été préparés dans de l'eau milli-Q stérile filtrée sur 0,22  $\mu\text{m}$ . Toutes les solutions filles et les solutions de travail ont été préparées dans leurs solvants respectifs.

## 2. Test de toxicité réalisés sur les microalgues marines

### 2.1. Microalgues marines

Quatre espèces de microalgues marines ont été utilisées dans ces travaux de thèse. La diatomée *Chaetoceros calcitrans* (CCMP 1315) et la chlorophyte *Tetraselmis suecica* (CCMP 904, souche sauvage) proviennent du *Provasoli-Guillard National Center for Marine Algae and Microbiota* (NCMA). La souche de *T. suecica* résistante au diuron a été obtenue à partir de la souche sauvage CCMP 904 après des expérimentations réalisées par Stachowski-Haberkorn *et al.* (2013). La diatomée *Skeletonema marinoi* (AC 174) a été achetée à la Collection de Cultures de Microalgues de l'Université de Caen (Algobank-Caen). L'haptophyte *Tisochrysis lutea* (CCAP 927/14) a été achetée au *Culture Center of Algae and Protozoa* (CCAP). Sauf exceptions mentionnées dans les matériels et méthodes des articles, les espèces ont été cultivées dans une enceinte thermostatée à  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ , sous une intensité lumineuse moyenne de  $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (quantomètre Li-Cor Li-250 équipé d'un capteur sphérique) avec un cycle jour nuit 16:8 h. Ces microalgues ont été cultivées dans des ballons de culture borosilicatés stérilisés par autoclavage 20 min à  $121^\circ\text{C}$ , préalablement pyrolysés à  $450^\circ\text{C}$  pendant 6 h, et remplis avec 50 mL de milieu de culture f/2 ou f/2-Si (supplémenté en silice pour les diatomées ; Guillard et Ryther, 1962 ; Guillard, 1975). Le milieu de culture a été préparé en ajoutant 3,5 mL de milieu f/2 concentré (composition disponible en annexe) à 1 L d'eau de mer naturelle (pointe de la Varde, Saint-Malo, France) filtrée sur  $0,22 \mu\text{m}$  et autoclavée.

#### 2.1.1. *Chaetoceros calcitrans* (Paulsen) H. Takano, 1968

*Chaetoceros calcitrans* (Figure 15) est une diatomée marine planctonique appartenant à la famille des Chaetocerotacées et couramment retrouvée dans les eaux tempérées. Les cellules, d'une taille généralement située entre 5 et  $10 \mu\text{m}$ , arborent sur leurs deux valves une paire d'expansions siliceuses latérales munies d'épines appelées soies (Ricard, 1987 ; Robert *et al.*, 2004). Elle est couramment utilisée comme algue fourrage dans les écloserie pour le nourrissage des larves de mollusques du fait de sa composition riche en lipides de la classe des stérols, comme le cholestérol ou le fucostérol (Soudant *et al.*, 1998 ; Muller-Feuga *et al.*, 2003 ; Robert *et al.*, 2004).

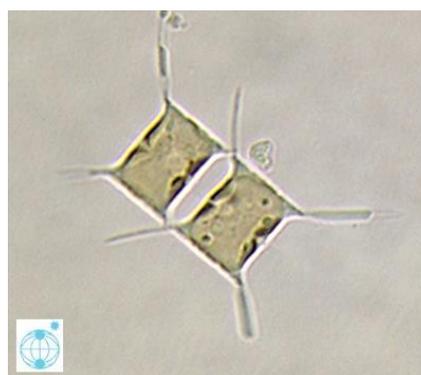


Figure 15 : Cellules de *Chaetoceros calcitrans* observées par microscopie photonique (M. Hoppenrath<sup>©</sup>).

### 2.1.2. *Skeletonema marinoi* Sarno & Zingone, 2005

L'espèce la plus souvent mentionnée appartenant au genre *Skeletonema* a longtemps été *Skeletonema costatum*, cependant l'étude de Sarno *et al.* (2005) a permis de distinguer huit entités distinctes, dont quatre sont nouvelles. Parmi celles-ci, l'espèce *Skeletonema marinoi* (Figure 16) est couramment retrouvée dans les eaux

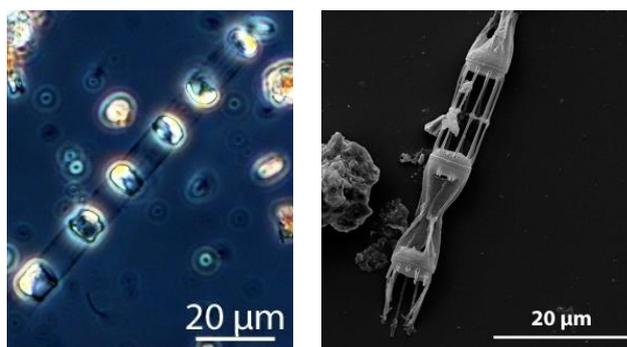


Figure 16 : Cellules de *Skeletonema marinoi* observées par microscopie à contraste de phase (gauche,  $\times 400$ ), par microscopie électronique à balayage (droite). Creative Commons Attribution 3.0<sup>©</sup>.

où elle est responsable d'efflorescences (*bloom* en anglais) durant la période hivernale. Elle a également été observée dans les eaux côtières de Hong Kong et sur la côte est des États-Unis. Les cellules d'un diamètre de 2 à 12  $\mu\text{m}$  sont de forme cylindrique et forment de longues chaînes. Les cellules contiennent chacune un à deux chloroplastes. Cette espèce est également très utilisée en aquaculture, du fait de sa facilité de mise en culture et de son contenu riche en différents stérols (cholestérol, campestérol, 24-méthylène cholestérol,  $\beta$ -sitostérol and fucostérol ; Muller-Feuga *et al.* 2003a).

### 2.1.3. *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butcher, 1959

La chlorophyte marine *Tetraselmis suecica* (Figure 17) est une espèce planctonique cosmopolite appartenant à la famille des Chlorodendracées et retrouvée dans les mers tempérées. Les cellules sont ovoïdes et comprimées latéralement, et présentent un puits flagellaire à deux lobes dans lequel viennent s'insérer quatre flagelles de même longueur, ou légèrement plus courts que la cellule (Robert et His, 1987). Les cellules, d'une taille de 8 à 15  $\mu\text{m}$ , ont une paroi lisse et possèdent un plaste vert (Robert *et al.*, 2004). Cette espèce est



Figure 17 : Cellule de *Tetraselmis suecica* observée par microscopie optique (CCMP<sup>©</sup>)

également beaucoup utilisée en éclosion pour sa forte teneur en stérols (campestérol et 24-méthylène cholestérol, principalement) et en acides gras polyinsaturés (Muller-Feuga *et al.*, 2003a, 2003b ; Støttrup, 2003). Du fait de sa forte teneur en lipides, cette espèce est également étudiée pour la production de biocarburant (Montero *et al.*, 2011 ; Santos-Ballardo *et al.*, 2015).

### 2.1.4. *Tisochrysis lutea* Bendif & Probert, 2013

La microalgue *Tisochrysis lutea* (Figure 18), précédemment identifiée comme *Isochrysis affinis galbana* clone Tahiti (*T-iso*), est une haptophyte de la famille des Isochrysidacées généralement retrouvée dans les eaux côtières tropicales (Bendif *et al.*, 2013). Les cellules, d'une taille de 4 à 6  $\mu\text{m}$ , sont recouvertes par une couche dense d'écailles organiques, ont une forme sphérique ou ovale/oblongue et possèdent un à deux plastes jaunes-dorés ainsi que deux

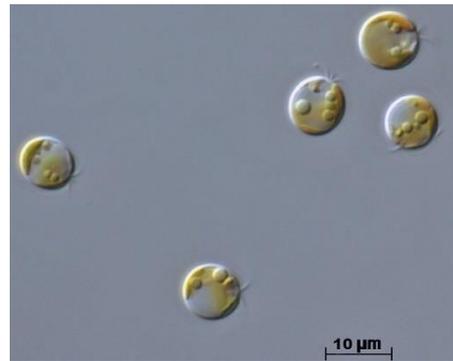


Figure 18 : Cellules de *Tisochrysis lutea* observées par microscopie optique (CCAP<sup>©</sup>).

flagelles égaux et un haptonème court (Robert et His, 1987 ;

Bendif *et al.*, 2013). Comme les trois autres espèces décrites ci-dessus, *T. lutea* est très utilisée en aquaculture pour le nourrissage des juvéniles de mollusques et crustacés (Robert *et al.*, 2004). Cela est dû à son contenu riche en lipides comme les stérols (principalement brassicastérol), mais également à la présence d'acides gras polyinsaturés comme l'acide docosahexaénoïque (DHA ; Muller-Feuga *et al.*, 2003a). Sa forte teneur en acides gras totaux, notamment sous carence azotée (Bougaran *et al.*, 2012), en fait une bonne candidate pour la production de biocarburant (Sánchez *et al.*, 2013).

## 2.2. Expérimentations contrôlées en laboratoire

### 2.2.1. Expérimentations concentration-réponse

Les expérimentations concentration-réponse réalisées dans ces travaux de thèse visaient à déterminer des valeurs de  $CE_{50}$  pour les pesticides testés. Ces expérimentations ont été menées en microplaques 48-puits pour les microalgues et 24-puits pour les larves d'huître. Elles consistaient en l'exposition à cinq ou six concentrations de la substance sélectionnée, testées en triplicat, en prenant soin de choisir une gamme de concentrations suffisamment large pour obtenir une inhibition répartie entre 0 et 100%. Chaque expérimentation était réalisée sous une hotte à flux laminaire pour éviter toute contamination bactérienne des cultures.

Les tests de toxicité effectués sur les microalgues marines ont été réalisés dans des microplaques 48-puits transparentes en polystyrène (Greiner Bio-One GmbH, cat. 677102, non-traitées), en accord avec les normes actuelles recommandées pour ce type de bioessais (OCDE, 2006 ; ISO 10253:2016, 2016). La durée d'exposition de ces tests était de 96 h (quatre jours), permettant ainsi de lancer un test le lundi et de le terminer le vendredi de la même semaine. En outre, la durée d'exposition permettait également, pour chaque microalgue testée, d'atteindre la troisième voire la quatrième

génération. Les conditions de culture étaient par ailleurs similaires à celles décrites dans la section 2.1 ci-dessus.

Chaque concentration à tester a été préparée dans des erlenmeyers individuels, stériles et pyrolysés (450°C, 6 h) par dilution de la solution mère de pesticide dans 25,0 mL de milieu de culture f/2 ou f/2-Si (Figure 19A). Pour chaque expérimentation, le pourcentage de solvant était fixé et similaire pour les témoins-solvant et les différentes concentrations testées. À l'aide d'une pipette électronique,  $3 \times 0,90$  mL étaient ensuite distribués dans les puits de manière à avoir des réplicats d'exposition pour chaque concentration testée (Figure 19B). La disposition des six concentrations testées (numérotées de 1 à 6) ainsi que celle des témoins-solvant (SC, pour *solvent-control*) est indiquée sur le schéma de la microplaque de la Figure 19. Une fois la microplaque remplie entièrement, la densité cellulaire de la culture-mère de microalgues (en phase exponentielle de croissance) était mesurée par cytométrie en flux. Une dilution appropriée ( $2 \times 10^5$  cellules mL<sup>-1</sup>) était alors préparée, et 0,10 mL de cette dilution était ajouté à chaque puits, afin d'atteindre une densité cellulaire initiale de  $2 \times 10^4$  cellules mL<sup>-1</sup> au début de l'expérimentation (Figure 19C). Le volume final dans chaque puits était de 1,00 mL.

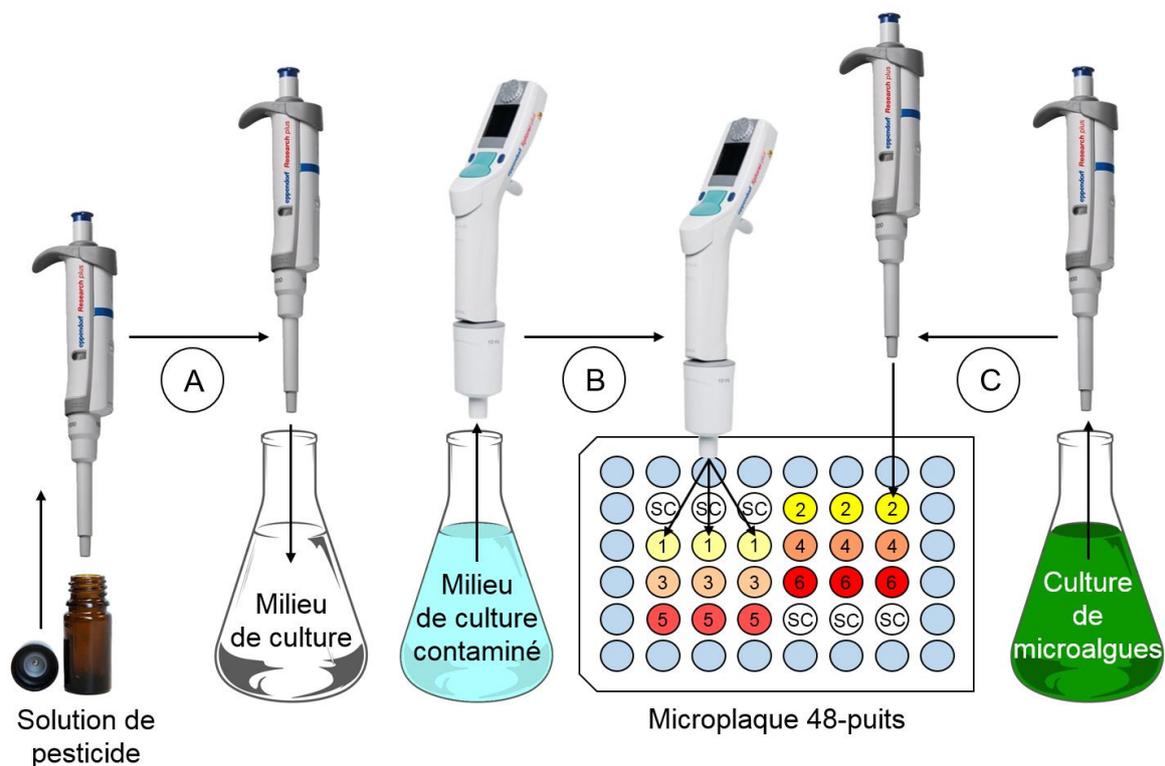


Figure 19 : Synoptique des expérimentations concentration-réponse réalisées en microplaques avec les microalgues marines. (A) contamination du milieu de culture en erlenmeyer ou ballon de culture ; (B) répartition du milieu de culture contaminé en triplicats dans les puits de la microplaque (0,90 mL/puits) ; (C) ajout de 0,10 mL d'une dilution appropriée de culture microalgale afin d'atteindre la densité cellulaire initiale souhaitée ( $2 \times 10^4$  cellules mL<sup>-1</sup>).

Les microplaques étaient maintenues fermées par le couvercle fourni, permettant les échanges gazeux. Les 24 puits périphériques n'étaient pas utilisés afin d'éviter « l'effet bord » (*edge effect* en anglais, voir section 4.2.2). Afin de réduire au maximum l'évaporation du milieu de culture pendant la durée de l'expérimentation, les puits périphériques étaient remplis avec 1,00 mL d'eau milli-Q stérile afin de maintenir un pourcentage d'humidité élevé. Trois témoins-solvant (SC, Figure 19) étaient placés à côté de la plus faible concentration testée (1, Figure 19) et les trois autres à côté de la plus forte (6, Figure 19), afin d'intégrer les potentiels risques de contamination croisée, notamment pour les composés volatils.

### 2.2.2. Expérimentations en mélanges binaires

Le principe des expérimentations en mélanges binaires réalisées avec les microalgues marines est détaillé dans l'introduction (Chapitre 1, section 5.3). Ces expérimentations ont été réalisées en microplaques, en suivant exactement le même protocole que pour les expérimentations concentration-réponse, comme décrit ci-avant (section 4.2.1, Figure 19). Pour chaque mélange binaire, une gamme de six concentrations adaptée à la détermination d'une  $CE_{50}$  est choisie pour les deux substances (A et B) à tester en mélange. Les deux substances sont testées seules dans l'expérimentation, dans deux microplaques individuelles, représentant les ratios  $100\%_A:0\%_B$  et  $0\%_A:100\%_B$ . Ensuite, les ratios de mélanges  $A\%:B\%$  sont choisis. Dans toutes les expérimentations en mélanges binaires réalisées dans ce manuscrit, trois ratios de mélange ont été testés :  $75\%_A:25\%_B$  ;  $50\%_A:50\%_B$  et  $25\%_A:75\%_B$ . Les gammes de six concentrations pour les trois ratios de mélanges ont été calculées comme décrit dans le Tableau 5. Ainsi, en plus des deux microplaques correspondant aux deux substances testées seules, trois microplaques supplémentaires étaient réalisées pour les trois ratios de mélanges. La seule différence par rapport au protocole décrit dans la section 4.2.1 étant qu'au lieu d'ajouter un seul pesticide dans le milieu de culture (Figure 19A), deux pesticides étaient successivement ajoutés.

### 2.2.3. Expérimentations en ballons de culture

Les expérimentations réalisées en ballons de culture étaient destinées à l'étude approfondie de la toxicité des pesticides sélectionnés pour ces travaux de thèse. En effet, le volume de culture de 50,0 mL permet de réaliser des analyses supplémentaires, en plus du suivi de la croissance effectué par mesure quotidienne de la densité cellulaire, via l'utilisation :

- de fluorochromes, permettant le suivi de diverses fonctions physiologiques d'intérêt ;
- de la technique de PAM-fluorescence, permettant la mesure de l'efficacité photosynthétique.

Ces tests de toxicité ont été réalisés en ballons de culture stériles et pyrolysés (450°C pendant 6 h), d'une contenance totale de 100 mL, en accord avec les normes actuelles recommandées pour ce type de bioessais (OCDE, 2006 ; ISO 10253:2016, 2016). La durée d'exposition de ces tests était de 144 ou 96 h, (six ou quatre jours), permettant d'atteindre plusieurs générations pour chaque microalgue testée.

Chaque concentration était testée en triplicat. La contamination a été réalisée directement dans les ballons de culture, stériles et pyrolysés (450°C, 6 h) par dilution de la solution mère de pesticide dans les 49,0 mL de milieu de culture f/2 ou f/2-Si stérile (Figure 20A). Pour chaque expérimentation, le pourcentage de solvant était fixé et similaire pour les témoins-solvant et les différentes concentrations testées. Une fois que tous les ballons étaient préparés, la densité cellulaire de la culture-mère de microalgue à tester était mesurée par cytométrie en flux. Une dilution appropriée ( $1 \times 10^6$  cellules  $\text{mL}^{-1}$ ) était alors préparée, et 1,00 mL de cette dilution était ajouté à chaque ballon, afin d'atteindre une densité cellulaire initiale de  $2 \times 10^4$  cellules  $\text{mL}^{-1}$  au début de l'expérimentation (Figure 20B). Le volume final de chaque ballon était de 50,0 mL.

Les cultures de microalgues étaient ensuite rangées dans l'armoire de culture de manière aléatoire, et leur disposition était modifiée toutes les 24 h, afin d'éviter de potentielles différences d'illumination entre les conditions testées (Figure 21).

Au cours de l'exposition, chaque culture était prélevée quotidiennement (0,50 mL/culture) afin de mesurer sa densité cellulaire par cytométrie en flux (voir section 2.4.2). À la fin de la durée d'exposition choisie, des prélèvements additionnels étaient réalisés pour mesurer les effets induits par les polluants testés sur : différentes fonctions physiologiques via l'utilisation de fluorochromes (0,20-0,50 mL/culture et fluorochrome, voir section 2.4.3) ; l'efficacité photosynthétique par PAM-fluorescence (2,00 mL/culture, section 2.6 de ce chapitre).

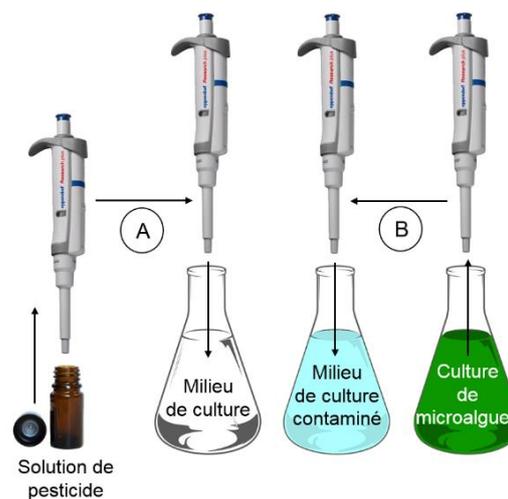


Figure 20 : Synoptique des expérimentations réalisées en ballons de culture (ici symbolisés par des erlenmeyers). (A) contamination du milieu de culture ; (B) ajout de 1,00 mL d'une dilution appropriée de culture microalgale dans le milieu de culture préalablement contaminé afin d'atteindre la densité cellulaire initiale souhaitée ( $2 \times 10^4$  cellules  $\text{mL}^{-1}$ ).

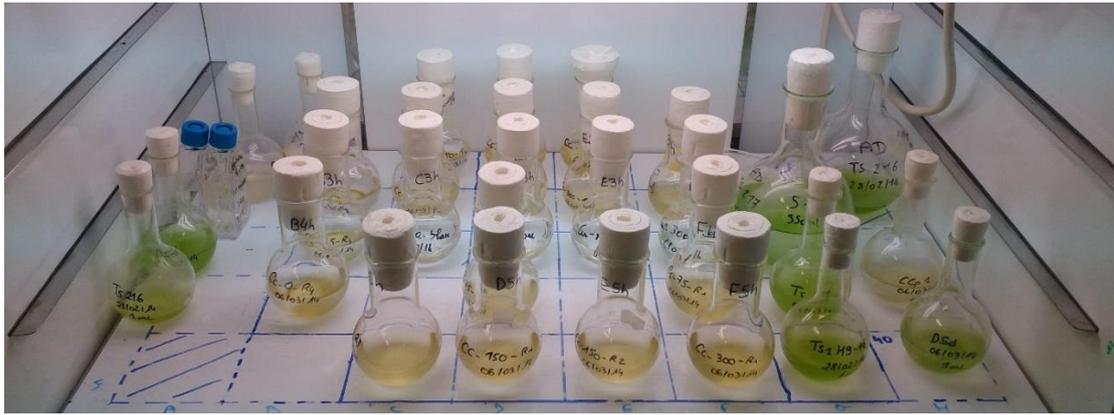


Figure 21 : Photo illustrant une expérimentation en ballons de culture. Photo V. Dupraz.

### 2.3. Lecteur de microplaques

Afin d'évaluer la croissance des microalgues lors des expérimentations concentration-réponse, un lecteur de microplaques SAFIRE (TECAN), relié à un ordinateur équipé de la macro Excel® *XFluor* v. 4.00 beta, a été utilisé (Figure 22).

Cet appareil permet de lire des microplaques à partir de 6 puits et jusqu'à 1536 puits. Il est équipé d'une lampe à décharge au Xénon et d'un monochromateur permettant de sélectionner la longueur d'onde d'excitation souhaitée.

Les microalgues, du fait de leur contenu intracellulaire riche en chlorophylle, présentent l'avantage d'être « autofluorescentes », c'est-à-dire qu'elles émettent naturellement une fluorescence lorsqu'elles sont excitées à des longueurs d'ondes spécifiques, notamment dans le bleu, et à moindre mesure dans le rouge. En retour, les cellules excitées émettent une fluorescence rouge (section 2.5 du chapitre 1). Ainsi, plus il y a de microalgues dans un puits, plus la fluorescence du puits augmente, en raison d'un contenu plus élevé en chlorophylle. Des expériences préliminaires (non détaillées dans ce manuscrit) ont ainsi permis d'observer une très bonne corrélation entre les valeurs de fluorescence mesurées par le lecteur de microplaques et la densité cellulaire mesurée par cytométrie en flux (section 2.4.2 de ce chapitre).

Les paramètres de lecture étaient les suivants : mode de lecture : fluorescence ; longueur d'onde d'excitation/émission : 450/684 nm ; largeur de bande : 10 nm ; nombre de mesures/puits : 9 ; temps d'intégration : 20  $\mu$ s + lecture par le dessous (important à préciser) Le gain a également été ajusté



Figure 22 : Photo du lecteur de microplaques SAFIRE. Photo V. Dupraz.

pour chaque espèce afin de pouvoir détecter la fluorescence des cellules durant toute la durée de l'expérimentation : il était de 120 pour *T. lutea* et 100 pour *T. suecica* et *S. marinoi*. Avant chaque lecture, la microplaque était agitée durant 20 s à l'aide d'un agitateur de microplaque Orbis Plus (Mikura Ltd) en mode orbital. Pendant l'agitation, le couvercle de la microplaque était maintenu à l'aide de deux élastiques. La moyenne des neuf valeurs de fluorescence mesurées pour chaque puits était récupérée à l'aide de la macro *XFluor* v. 4.00 beta et utilisée pour le calcul du taux de croissance individuel de chaque puits (voir section 2.5).

## 2.4. Cytométrie en flux

Les mesures par cytométrie en flux ont été réalisées sur un cytomètre BD-Accuri C6 (Becton Dickinson Accuri™, Figure 23) équipé d'un laser bleu (488 nm) et d'un laser rouge (640 nm), de deux détecteurs de diffraction laser permettant la mesure de la diffusion lumineuse aux petits angles (*forward scatter*, *FSC*) et grands angles (*side scatter*, *SSC*), ainsi que quatre détecteurs de fluorescence : FL1 (fluorescence verte,  $530 \pm 15$  nm), FL2 (fluorescence orange,  $585 \pm 20$  nm) et FL3 (fluorescence rouge,  $> 670$  nm) pour le laser bleu ; FL4 (fluorescence rouge,  $675 \pm 12.5$  nm) pour le laser rouge.



Figure 23 : Cytomètre en flux BD-Accuri C6.

### 2.4.1. Principe

Le principe de base de la cytométrie en flux est de réaliser l'analyse multiparamétrique des particules (dont cellules) présentes dans un échantillon (Figure 24). Pour ce faire, les particules sont focalisées en un flux par l'action de deux pompes péristaltiques qui aspirent le liquide de gaine (eau milli-Q filtrée sur  $0,22 \mu\text{m}$ ) et qui entraîne à son tour la suspension de cellules à une vitesse choisie par l'utilisateur (Ronot *et al.*, 2006). Les cellules sont ensuite illuminées individuellement par une source d'excitation lumineuse, dans notre cas deux lasers (bleu et rouge). Différents détecteurs permettent l'analyse de la lumière diffusée par les particules, ainsi que de la fluorescence émise par ces particules :

- deux détecteurs de diffraction, permettant l'analyse de la diffusion de la lumière aux petits angles (FSC) et grands angles (SSC), et correspondant à une mesure relative de la taille et de la complexité (granulosité) des particules illuminées, respectivement ;

- quatre détecteurs de fluorescence, permettant l'analyse de la fluorescence émise par les cellules pour plusieurs plages de longueurs d'ondes données :  $530 \pm 15$  nm (FL1, vert) ;  $585 \pm 20$  nm (FL2, orange) ;  $> 670$  nm (FL3, rouge) et  $675 \pm 12.5$  nm (FL4, rouge).

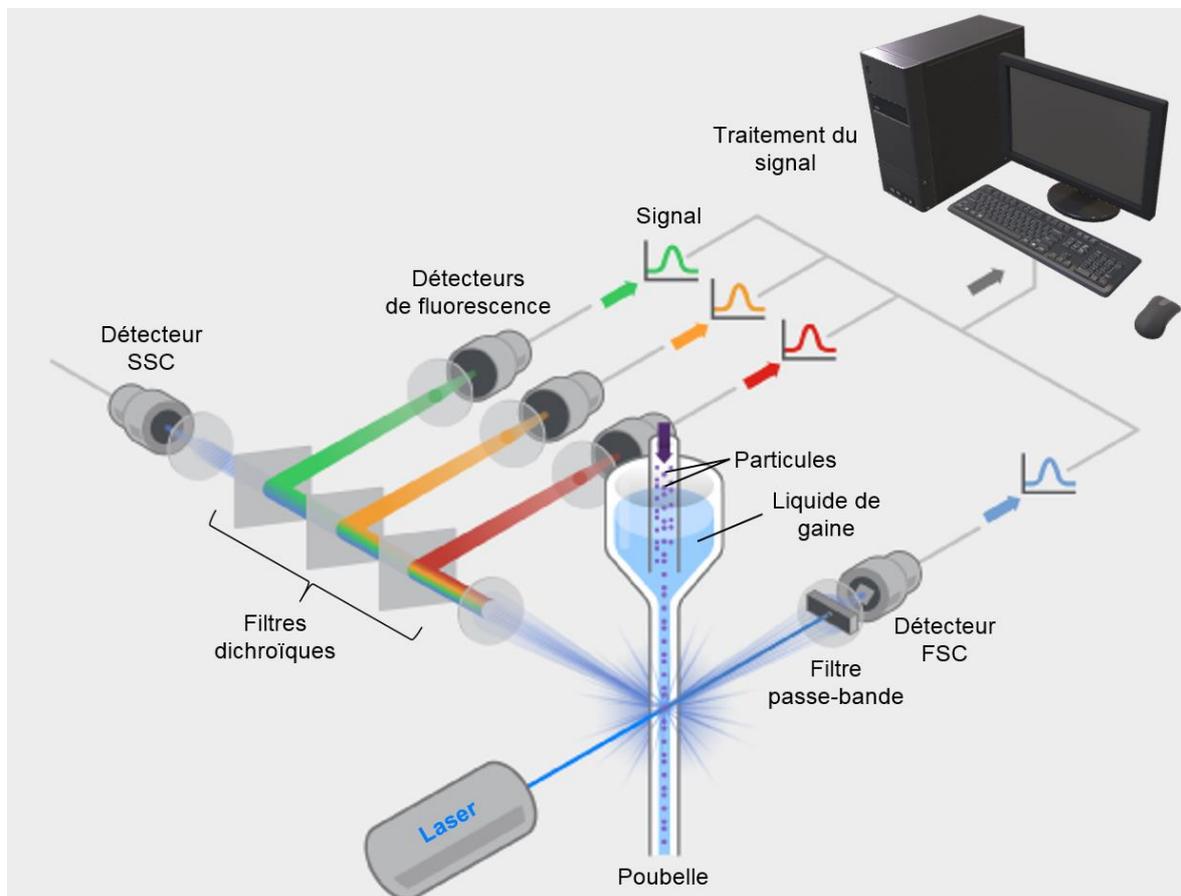


Figure 24 : Illustration du fonctionnement d'un cytomètre en flux (modifié d'après un schéma d'Invitrogen®).

La fluorescence émise par les cellules est dirigée vers les différents détecteurs par un jeu de miroirs dichroïques, ne laissant passer qu'une plage de longueurs d'ondes spécifiques, puis traverse des filtres passe-bande réduisant encore davantage la plage de longueurs d'ondes acquises par le détecteur. Le signal obtenu est alors traité par l'ordinateur relié au cytomètre à l'aide du logiciel BD Accuri™ C6 Software v. 1.0.264.21.

Du fait de l'autofluorescence des microalgues, on obtient un signal de fluorescence significatif au niveau des détecteurs FL3 et FL4 (détecteurs de la fluorescence rouge) ce qui permet de repérer facilement les populations de microalgues sur les cytogrammes (*i.e.* le graphique obtenu après analyse d'un échantillon par cytométrie en flux, Figure 25). Dans ces travaux, la fluorescence verte (détecteur FL1) a souvent été utilisée en complément de la fluorescence rouge (FL3 ou FL4) pour isoler les populations de microalgues (Figure 25) des nuages de débris/bruit électronique.

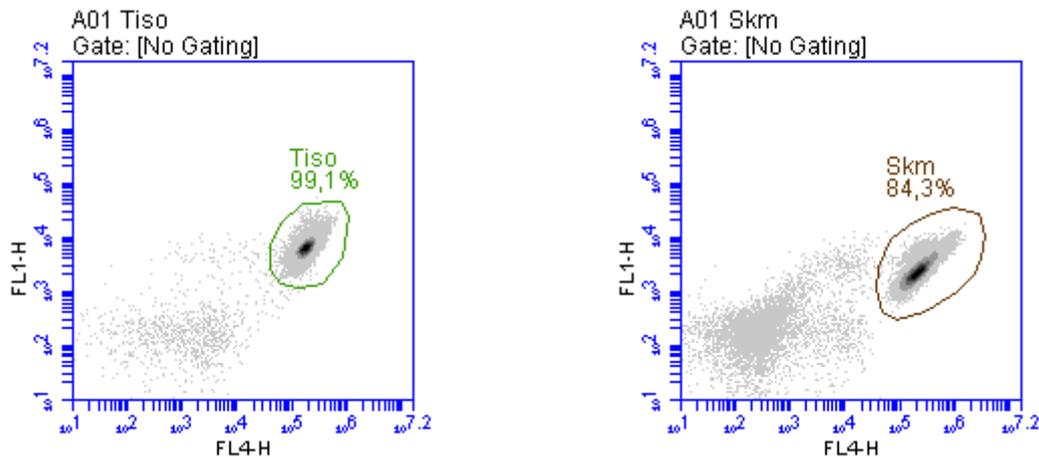


Figure 25 : Exemples de cytogrammes des cultures de *T. lutea* (Tiso, en vert, à gauche) et *S. marinoi* (Skm, en marron, à droite). Sur l'axe des abscisses, la fluorescence rouge (FL4-H), sur l'axe des ordonnées, la fluorescence verte (FL1-H) ; les deux axes sont en échelle logarithmique.

En plus des paramètres relatifs à la morphologie et à la fluorescence naturelle des cellules, il est également possible de suivre l'évolution de certaines fonctions physiologiques en utilisant des fluorochromes (section 2.4.3 ci-après). Par exemple, les fluorochromes peuvent permettre d'évaluer l'activité des estérases ou du potentiel de la membrane cytoplasmique, ou de détecter les ERO intracellulaires et les lipides neutres de réserve. La plupart de ces marqueurs fluorescents n'émettent aucune fluorescence avant d'entrer dans la cellule. Ils peuvent généralement diffuser naturellement à travers la membrane plasmique des cellules. Une fois à l'intérieur, certaines enzymes, comme les estérases, sont parfois requises pour rendre le fluorochrome actif. Pour d'autres, c'est la réaction avec des groupements moléculaires spécifiques des molécules à détecter qui induira l'émission de fluorescence.

## 2.4.2. Mesure de la croissance

Pour évaluer la croissance des différentes espèces de microalgues durant les expérimentations réalisées en ballons de culture, la densité cellulaire a été mesurée quotidiennement par cytométrie en flux. Pour ce faire, des échantillons de 300-500  $\mu\text{L}$  ont été prélevés quotidiennement. Pour *T. suecica* et *C. calcitrans*, il était nécessaire de fixer les cellules au glutaraldéhyde (concentration finale 0,25% ; 10 min d'incubation à l'obscurité et température ambiante) avant le dénombrement cellulaire, afin que les cellules soient correctement séparées les unes des autres dans la suspension. Les échantillons de culture étaient systématiquement vortexés avant chaque analyse. Le dénombrement cellulaire se faisait à une vitesse d'aspiration de l'échantillon de  $66 \mu\text{L min}^{-1}$  et 50 ou 100  $\mu\text{L}$  de culture étaient analysés par échantillon. Un minimum de 1000 cellules était analysé pour chaque échantillon. La densité cellulaire des cultures microalgales de *T. lutea*, *S. marinoi* et *T. suecica* a été mesurée à partir des

populations isolées sur les cytogrammes représentant la fluorescence rouge (FL4) en abscisse et verte (FL1) en ordonnée (Figure 25). Pour l'espèce *C. calcitrans*, la population microalgale a été isolée par un cytogramme représentant la fluorescence rouge (FL3) en abscisse et la granulométrie cellulaire (SSC) en ordonnée.

Dans le cas où les échantillons de microalgues ne pouvaient être analysés directement après le prélèvement, les suspensions cellulaires étaient fixées au glutaraldéhyde (comme décrit ci-dessus) puis stockées dans l'azote liquide (-196°C) jusqu'à l'analyse.

La densité cellulaire des cultures mesurées quotidiennement était ensuite utilisée pour le calcul du taux de croissance (section 2.5 ci-après).

### 2.4.3. Fluorochromes

Dans ces travaux de thèse, différents fluorochromes ont été utilisés afin de suivre l'évolution de certaines fonctions physiologiques d'intérêt au cours des expérimentations réalisées en ballons de culture. Tous les marqueurs fluorescents décrits ci-dessous ont été achetés chez Sigma-Aldrich. Les solutions mères et filles ont été préparées dans du DMSO pur ( $\geq 99\%$ ).

Les fluorochromes suivants ont été utilisés :

- le FDA (fluorescéine diacétate), pour la mesure de l'activité métabolique des estérases intracellulaires non spécifiques chez les microalgues *T. lutea* et *S. marinoi* (article 4 du chapitre 4) ;
- le Bodipy<sup>505/515</sup> (4,4-difluoro-1,3,5,7-tétraméthyle-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacène), pour la mesure de la quantité relative de lipides neutres de réserve chez toutes les espèces de microalgues étudiées (article 1 du chapitre 3, article 4 du chapitre 4) ;
- le DiBAC<sub>4</sub>(3) (bis-(acide 1,3-dibutylbarbiturique) triméthine oxonol), pour la mesure du potentiel de la membrane cytoplasmique chez *T. lutea* et *S. marinoi* (article 4 du chapitre 4) ;
- le H<sub>2</sub>DCFDA (aussi appelé DCFH-DA, diacétate de dichlorodihydrofluorescéine 2',7'), utilisé pour la mesure de la quantité relative d'ERO comme le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ou les radicaux hydroxyles (HO<sup>•</sup>) chez toutes les espèces de microalgues étudiées (article 1 du chapitre 3, article 4 du chapitre 4) ;
- le dihydroéthidium (aussi appelé hydroéthidine, 5-éthyle-6-phényle-6H-phénanthridine-3,8-diamine), utilisé pour la mesure de la quantité relative d'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) chez *T. lutea* et *S. marinoi* (article 4 du chapitre 4) .

Pour chaque fluorochrome et chaque espèce, des expérimentations préliminaires ont été réalisées afin d'optimiser la concentration finale et le temps d'incubation (Tableau 7).

Tableau 7 : Concentration finale ( $C_f$ , en  $\mu\text{M}$ ) et temps d'incubation ( $T_{inc}$ , en min) de chaque fluorochrome utilisé pour chaque espèce. L'incubation est systématiquement réalisée à l'obscurité à température ambiante ( $\sim 20^\circ\text{C}$ ).

	<i>T. lutea</i> <sup>(1)</sup>		<i>S. marinoi</i> <sup>(1)</sup>		<i>T. suecica</i> <sup>(2)</sup>		<i>C. calcitrans</i> <sup>(2)</sup>	
	$C_f$	$T_{inc}$	$C_f$	$T_{inc}$	$C_f$	$T_{inc}$	$C_f$	$T_{inc}$
<b>FDA</b>	2,50	10,0	5,00	10,0				
<b>Bodipy<sup>505/515</sup></b>	0,48	10,0	0,48	10,0	0,48	5,00	0,30	6,00
<b>DiBAC<sub>4</sub>(3)</b>	0,97	10,0	0,97	10,0				
<b>H<sub>2</sub>DCFDA</b>	60,0	30,0	60,0	30,0	80,0	30,0	80,0	30,0
<b>Dihydroethidium</b>	15,9	30,0	15,9	30,0				

<sup>(1)</sup> pourcentage final de DMSO : 1%, sauf le FDA et *T. lutea* (0,5%) ; <sup>(2)</sup> Pourcentage final de DMSO pour le H<sub>2</sub>DCFDA : 0,08% ; pour le Bodipy<sup>505/515</sup> : 0,6% (*C. calcitrans*) et 1% (*T. suecica*).

Le principe de fonctionnement de chacun des cinq fluorochromes utilisés dans ces travaux de thèse, ainsi que leur protocole détaillé d'utilisation pour chaque espèce, sont disponibles dans : les sections « 2.4.2. Reactive oxygen species (ROS) » et « 2.4.3. Relative intracellular lipid content » du matériels et méthodes de l'article 1 (chapitre 3) pour *T. suecica* et *C. calcitrans* ; la section « 3.2.5.3. Physiological endpoints » du matériels et méthodes de l'article 4 (chapitre 4) pour *T. lutea* et *S. marinoi*.

## 2.5. Calcul du taux de croissance des microalgues

Dans ces travaux de thèse, le taux de croissance des cultures de microalgues a été calculé en utilisant deux proxy de la croissance : la fluorescence de la chlorophylle *a* pour les expérimentations en microplaques ; la densité cellulaire pour les expérimentations en ballons. Dans les deux cas, le calcul du taux de croissance des microalgues a été réalisé selon l'équation 12,

$$N_t = N_0 e^{\mu t} \quad (12)$$

où  $N_t$  est la valeur du proxy de croissance au temps  $t$  : densité cellulaire ( $\text{cellules mL}^{-1}$ ) en ballons de culture, fluorescence (u.a.) en microplaques ;  $N_0$  est la valeur initiale du proxy de croissance au début de l'expérimentation ( $t = 0$  h),  $\mu$  est le taux de croissance ( $\text{h}^{-1}$ ) et  $t$  le temps (h).

Pour faciliter le calcul du taux de croissance, les données du proxy de croissance sont linéarisées par application d'une transformation de type logarithme népérien. La droite de régression linéaire appliquée au nuage de point ainsi obtenue est décrite par l'équation 13,

$$\ln(N_t) = \mu t + \ln(N_0) \quad (13)$$

et le coefficient directeur de cette droite,  $\mu$ , correspond au taux de croissance et s'obtient par l'équation 14,

$$\mu = \frac{\ln(N_t) - \ln(N_0)}{t} \quad (14)$$

En plus du calcul du taux de croissance  $\mu$ , le temps de doublement  $T_D$  (h), c'est-à-dire le temps mis par une population pour doubler son nombre de cellules, a également été calculé (voir chapitre 3, article 1), avec l'équation 15,

$$T_D = \frac{\ln(2)}{\mu} \quad (15)$$

## 2.6. Mesure de l'efficacité photosynthétique par PAM-fluorescence

La photosynthèse étant un processus vital pour les microalgues, il est intéressant de disposer d'une technique fiable et rapide permettant sa mesure. La PAM-fluorescence est une technique non-destructive, également basée sur l'émission de fluorescence par la chlorophylle excitée et permettant la mesure de plusieurs paramètres liés à la photosynthèse. Dans ces travaux, c'est le rendement opérationnel (ou rendement quantique) du PSII ( $\Phi'_M$ ) qui a été mesuré.

Comme mentionné dans la section 2.5 du chapitre 1, plusieurs voies existent pour ramener une molécule de chlorophylle *a* excitée à son état fondamental. Le rendement quantique opérationnel ( $\Phi'_M$ ) consiste à mesurer l'efficacité relative de la fluorescence par rapport aux autres voies (Genty *et al.*, 1989). Pour ce faire, les microalgues préalablement adaptées à une lumière actinique (*i.e.* exerçant une action chimique sur diverses substances, en l'occurrence sur la chlorophylle) sont exposées à un pulse lumineux puissant d'une intensité de  $3000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Ce pulse bloque la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique par saturation des photosystèmes et force de ce fait la dissipation de l'énergie accumulée par fluorescence. Du fait de la courte durée du pulse lumineux, la dissipation non-photochimique (NPQ) n'est pas affectée, ainsi, l'émission de fluorescence est maximale. La valeur de  $\Phi'_M$  est ensuite calculée avec l'équation 16,

$$\Phi'_M = \frac{(F'_M - F'_0)}{F'_M} \quad (16)$$

où  $F'_M$  correspond à la fluorescence maximale émise suite au pulse de lumière saturant et  $F'_0$  la fluorescence minimale et constante obtenue sous lumière actinique.

Dans l'article 1 du chapitre 3, ainsi que l'article 4 du chapitre 4, le fluorimètre Aquapen-C AP-C 100 (Photon System Instruments<sup>®</sup>, Figure 26) a été utilisé pour mesurer le rendement quantique du PSII des cultures de microalgues lors d'expérimentations en ballons de culture. Pour cela, à la fin de l'exposition aux pesticides testés, 2,00 mL de culture ont été prélevés et placés dans une cuve spectrophotométrique en plastique de section carrée. La cuve était alors placée dans le fluorimètre et trois mesures successives étaient réalisées, lesquelles étaient ensuite moyennées pour chaque culture.



Figure 26 : Aquapen-C AP-C 100.

Dans le cas où l'appareil de mesure arrivait à saturation, les cultures étaient diluées au 1/2 avec du milieu de culture f/2.

## 2.7. Séquençage des ARN messagers codant pour la protéine D1 du photosystème II chez la souche mutante de *T. suecica*

Cette partie est spécifique à l'article 1 du chapitre 3 et décrite dans la section « 2.6. D1 protein mRNA sequencing » du matériels et méthodes de cet article.

### 3. Tests de toxicité réalisés avec les extraits de POCIS

Une partie des informations utilisées pour la description du bassin versant (BV) expérimental de Marcillac sont issues du rapport de stage d'Izza Benkirane intitulé « Contribution à la connaissance et au raisonnement des pratiques de protection sanitaire du vignoble dans le Bordelais (bassin versant de Marcillac) », réalisé de mai à août 2015, sous l'encadrement de F. Macary (Irstea-Bordeaux) coordinateur du projet PhytoCOTE. Ces travaux ont été réalisés dans le cadre du groupe de tâche 1 (GT1), visant à évaluer les risques de transfert des produits phytosanitaires vers les eaux de surface à l'échelle parcellaire du bassin versant sélectionné. Ils avaient pour objectif de caractériser les pratiques agricoles des différentes exploitations présentes sur le vignoble afin de proposer par la suite des changements de mode de conduite.

#### 3.1. Contexte et généralités

Le site d'étude du projet se situe dans la région du Blayais (Figures 27 et 28), en Gironde, qui représente un vignoble d'une superficie de 6000 ha en vin rouge et 250 ha en vin blanc, regroupant environ 700 viticulteurs. Le cours d'eau principal de ce bassin versant (BV), la Livenne, débouche dans la Gironde et permet donc de faire le lien avec l'estuaire, condition requise par le LabEx COTE dans le choix du bassin versant.

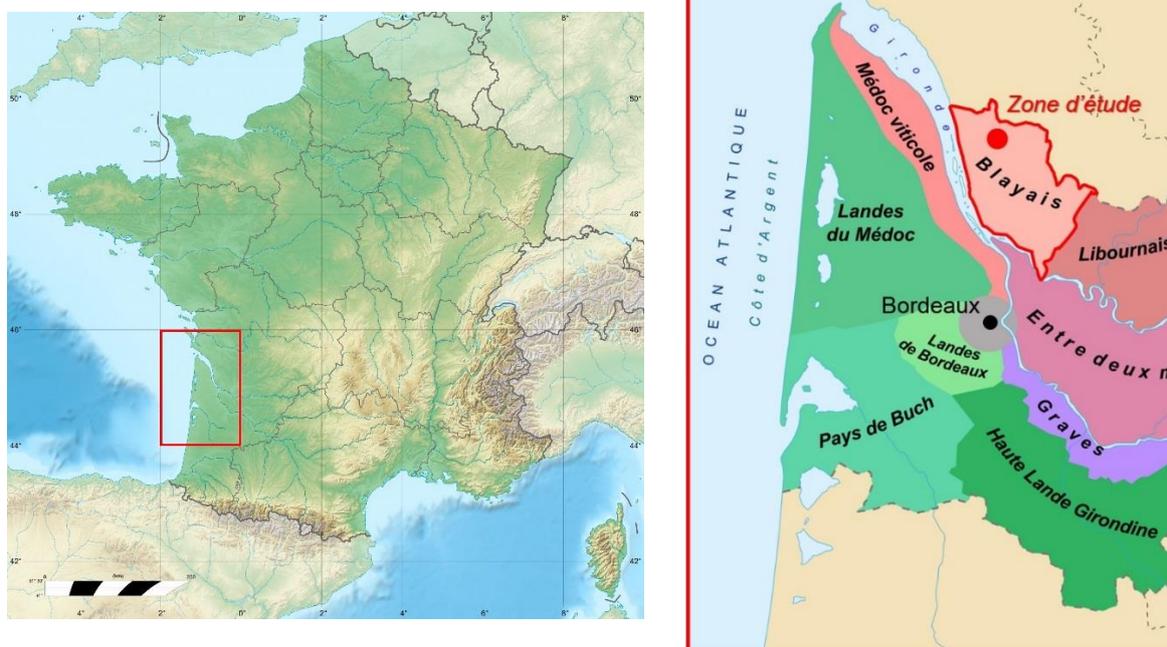


Figure 27 : Localisation de la zone d'étude expérimentale (point rouge) dans la région du Blayais en Gironde (à droite) par rapport à la carte de la France (à gauche).

L'activité économique principale de la commune de Marcillac est la viticulture, dominée par l'appellation Blaye-Côte de Bordeaux. Une majorité des vigneron (32 sur 36) présents sur le BVE de Marcillac sont adhérents à la cave coopérative de Tutiac « Les Vignerons de Tutiac », qui regroupe 550 vigneron (plus de 4 000 ha). Cette cave et ses adhérents sont engagés depuis 2008 dans la démarche 3D (Destination Développement Durable), s'inscrivant dans les objectifs du projet Ecophyto II, et possèdent depuis 2001 la certification Agri Confiance® (normes AFNOR NF V01 005 et NF V01 007), démontrant la volonté de la cave et des vigneron à trouver des solutions alternatives pour la réduction des intrants phytosanitaires. Ce contexte n'est pas anodin, puisqu'il a permis, en collaboration avec la cave coopérative et le syndicat des vins de Blaye-Côtes de Bordeaux, d'établir un dialogue entre les équipes de recherche et les vigneron, nécessaire au bon déroulement du projet.

Ainsi, des enquêtes ont pu être réalisées dans le cadre du stage précité afin d'obtenir des informations renseignant les caractéristiques globales de l'exploitation et les pratiques culturelles à l'échelle de chaque parcelle, ainsi que les calendriers annuels de traitement. Le questionnaire portait aussi sur la compréhension des mécanismes d'aide à la décision pour chaque viticulteur rencontré (professionnel ou double actif) en matière de pratiques culturelles et d'orientations pour le futur.

### 3.2. Description du site d'étude

Le BV expérimental de Marcillac représente une surface totale de 835 ha dont 75% (626 ha) sont cultivés. La SAU est occupée à 75% par des vignes (444 ha), le quart restant étant constitué de prairies permanentes, ainsi que de quelques parcelles de maïs et d'asperges. On notera la présence de deux autres activités notables pouvant participer à la contamination des cours d'eau sur le BV : la station d'épuration des eaux usées (STEP) de la commune de Marcillac et de sa cave coopérative et une distillerie de traitement des matières organiques résiduelles de la vinification ou marcs de raisins (pellicules des baies, pépins, rafles).

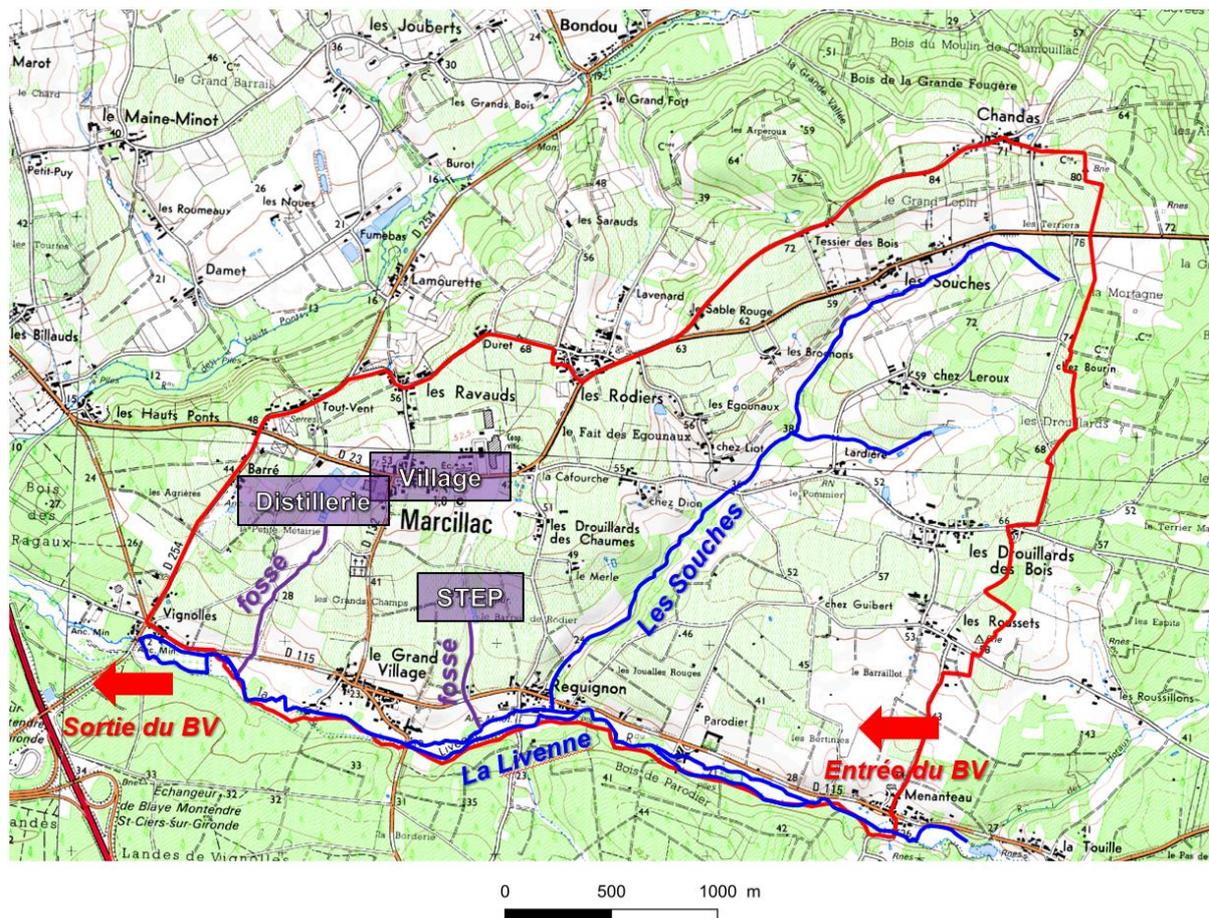


Figure 28 : Carte du bassin versant de Marcillac. Le contour du BV est affiché en rouge ; les deux cours d'eau principaux, Les Souches et La Livenne, sont affichés en bleu. Le village, ainsi que la distillerie, la STEP et leurs fossés de drainage respectifs sont affichés en violet. SCAN25® (IGN), UR ETBX Irstea- Bordeaux.

Dans le cadre des travaux menés par le GT1, l'évaluation des risques de transfert des produits phytosanitaires a été réalisée par analyse multicritère pour l'aide à la décision (AMCD) spatialisée dans le but d'identifier la contribution de chaque parcelle viticole au risque de transfert des pesticides vers les eaux de surface et notamment les parcelles les plus à risque en vue d'une aide à la décision. Les critères retenus avaient trait d'une part à la sensibilité du milieu : pente moyenne de la parcelle, type de sol (perméabilité) et connexion hydrologique (qualité, distance) ; d'autre part, aux pratiques agricoles et environnementales : zone tampon (qualité, largeur), mode de conduite (enherbement, travail du sol orientation des rangs) et pression phytosanitaire (IPP<sup>1</sup>, mesuré pour les substances actives à partir des formulations commerciales). Cinq catégories de risque, de très fort à très faible, ont été identifiées, et les pourcentages correspondant au quotient surface catégorisée/surface traitée ont été calculés pour les molécules à tendance hydrophile et hydrophobe. Ainsi, concernant les molécules à tendance hydrophile, 1% des parcelles présentaient un risque de transfert très fort, 12% un risque fort et 49% un risque moyen, le reste (38%) présentant un risque faible à très faible. Pour

<sup>1</sup> IPP : Indice de Pression Phytosanitaire ou IFT<sub>SA</sub> (source F. Macary, Irstea-Bordeaux)

ce qui est des molécules à tendance hydrophobe, 1% présentaient un risque très fort, 21% un risque fort et 57 % un risque moyen.

### 3.3. Préparation, pose et récupération des POCIS

Les échantillonneurs passifs de type POCIS ont été déployés au niveau de trois stations selon un gradient de contamination présumé, et ce pendant quatre périodes d'un mois (Figure 29). Les trois stations suivies étaient :

- la Livenne à Menanteau (L1-MEN ; Figure 30A), constituant le point d'entrée du BV et représentant donc le « bruit de fond » de contamination ;
- l'exutoire du ruisseau des Souches à Reguignon (SE-REG, Figure 30B) juste avant sa connexion avec La Livenne, étant théoriquement contaminé de façon majoritaire par les activités viticoles des parcelles situées le long de ce ruisseau ;
- la Livenne à Vignolles (L4-VIG, Figure 30C), constituant le point de sortie du BV et représentant donc la contamination potentielle la plus élevée, combinant la contamination d'origine viticole du ruisseau des Souches avec les effluents de la STEP et de la distillerie.



Figure 29 : Localisation des stations échantillonnées par les POCIS. Les stations en couleur, L1, SE et L4, ont fait l'objet d'un suivi spécifique visant à tester le potentiel toxique des extraits de POCIS. Les stations en gris ont uniquement fait l'objet d'un suivi visant à évaluer la contamination chimique. Les parcelles en violet représentent les parcelles de viticulture. Sources : UR ETBX, Irstea-Bordeaux, SCAN25® (IGN), BD TOPO (IGN). Modifié d'après J. Gaillard, 2017.

Ces stations ont été suivies durant les périodes suivantes :

- du 20/01/2017 au 20/02/2017, constituant la période témoin, du fait de la quasi-absence de traitements réalisés durant cette période ;

puis, durant trois périodes de traitements phytosanitaires :

- du 22/03/2017 au 24/04/2017 ;
- du 24/04/2017 au 24/05/2017 ;
- du 24/05/2017 au 22/06/2017.

Notons qu'en plus des POCIS déployés spécifiquement pour les études de toxicité basées sur l'utilisation de bioessais (travaux réalisés dans cette thèse), d'autres POCIS (avec PRC) ont été déployés par des partenaires du projet PhytoCOTE (Université de Bordeaux, LPTC, UMR CNRS 5805 EPOC) sur toutes les stations affichées sur la Figure 29, pour des périodes d'un mois et durant la totalité de l'année 2017, afin de suivre la contamination chimique.

Douze POCIS ont été préparés pour chaque période et chaque point de suivi. Un lot supplémentaire de douze POCIS, constituant les témoins négatifs, a également été préparé et stocké à  $-20^{\circ}\text{C}$  avant extraction, pour chaque période de suivi. Notons qu'il a été décidé de travailler avec douze POCIS (qui sont ensuite poolés en un seul extrait, voir section 3.4 ci-après) afin de concentrer au maximum les substances présentes dans le milieu échantillonné. Ce choix a été fait dans l'optique d'obtenir une toxicité significative lors de l'évaluation du potentiel toxique des extraits de POCIS, afin de pouvoir calculer des valeurs de  $\text{FD}_{50}$  (*i.e.* facteur de dilution induisant une inhibition de 50% sur le paramètre de croissance choisi ; sections 3.5 et 6 ci-après).

Chaque POCIS était constitué de 0,2 g de phase Oasis<sup>®</sup> HLB (copolymère de divinylbenzène et de N-vinylpyrrolidone), pesé et disposé entre deux membranes en PES (polyéthersulfone), le tout maintenu fermé par deux anneaux en acier inoxydable, comme décrit par la Figure 5 (Chapitre 1, partie 1.7.2). Chaque lot de douze POCIS était réparti dans deux cages contenant chacune six POCIS, fixés de manière à être orientés de façon transversale au courant du cours d'eau. Les deux cages étaient ensuite attachées, à proximité l'une de l'autre, à deux piquets métalliques permettant leur maintien à environ 15-20 cm de la surface pendant toute la période d'immersion (Figure 30).



Figure 30 : Photos des trois stations suivies : A, L1-MEN ; B, SE-REG et C, L4-VIG. Photos J. Gaillard et V. Dupraz.

Une fois la période d'immersion terminée, les cages étaient détachées puis ramenées sur la rive (Figure 31). Là, chaque POCIS était détaché, puis rincé une première fois dans l'eau du cours d'eau échantillonné afin d'enlever les débris, la vase *etc.* Ils étaient ensuite rincés une deuxième fois à l'eau milli-Q, puis séchés, emballés individuellement dans une feuille d'aluminium, puis dans du papier bulle et conservés dans une glacière avant stockage définitif à  $-20^{\circ}\text{C}$  avant extraction.



Figure 31 : Cage contenant six POCIS, récupérée après un mois d'immersion. Photo V. Dupraz.

### 3.4. Extraction des POCIS

Les POCIS ont été extraits via une technique d'extraction en phase solide (*solid phase extraction*, SPE en anglais) qui s'est déroulée en trois étapes : i) préparation des cartouches SPE et transfert de la phase des POCIS dans les cartouches ; ii) élution des cartouches SPE et iii) évaporation, pool et concentration des extraits de POCIS. Le protocole ci-dessous est issu de la publication de Tapie *et al.* (2011) et a été appliqué à chaque lot de douze POCIS (correspondant à une station et une période donnée) issus du site d'étude, ainsi qu'aux POCIS témoins (T-NEG).

Chaque cartouche SPE en verre, préalablement lavée et pyrolysée à 450°C pendant 6 h, contenant deux frittés en téflon (un en bas de la cartouche et un au sommet) a été pesée, puis le sommet de la cartouche a été recouvert d'aluminium afin d'éviter une quelconque contamination. Douze cartouches SPE sont ensuite montées sur une cuve d'extraction à 12 positions (Supelco Visiprep™), préalablement nettoyée à l'éthanol et placée sous une hotte chimique, reliée à une pompe permettant l'aspiration des liquides en excès. Après décongélation, chaque POCIS est ouvert afin de transférer la phase contenue dans une cartouche SPE. Pour ce faire, un entonnoir est placé au-dessus de la cartouche dans laquelle la phase est transférée. La pompe est alors activée et les deux membranes PES (polyéthersulfone) sur lesquelles se trouve la phase sont rincées délicatement (en évitant au maximum le transfert de débris pouvant être mélangés à la phase) à l'aide d'une pipette plastique en utilisant de l'eau de source Vittel (eau de source standard utilisée par le laboratoire) (Figure 32).



Figure 32 : Photo du système d'extraction en phase solide (SPE) utilisé pour l'extraction des POCIS. Il se compose d'une cuve d'extraction sur laquelle sont montées douze cartouches SPE et d'un entonnoir permettant le transfert de la phase. En bas à droite, un POCIS ouvert où l'on peut voir la phase (en marron-jaune) sur la membrane PES. Photo V. Dupraz.

Après avoir rincé l'entonnoir avec de l'eau Vittel, la phase doit sécher pendant un minimum de deux heures avant de procéder à l'élution. Une fois la phase sèche, le fritté supérieur est poussé au contact de la phase à l'aide d'une pipette pasteur retournée. Si l'élution ne s'effectue pas dans la foulée, les cartouches sont protégées dans une feuille d'aluminium et scellées individuellement dans une poche plastique avant stockage à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Pour l'élution, douze flacons ambrés d'une contenance de 60 mL, lavés et pyrolysés, sont placés à l'intérieur de la cuve d'extraction, sous les douze cartouches SPE contenant la phase des POCIS. Trois solvants ou mélange de solvants sont alors successivement utilisés pour éluer de la phase dans les flacons ambrés : 10 mL de méthanol, puis 10 mL d'un mélange 50:50% (v/v) de méthanol et dichlorométhane et enfin 10 mL de dichlorométhane. L'élution doit s'effectuer à faible vitesse, selon un goutte à goutte pour éviter la création d'un passage préférentiel des solvants dans la phase, et est initiée par la mise sous vide de la cuve (Figure 33).



Figure 33 : Photo de la cuve d'extraction contenant les flacons ambrés dans lesquels ont été éluées les cartouches SPE contenant la phase issue des POCIS.

Une fois les cartouches éluées et sèches, elles peuvent à nouveau être pesées afin de calculer la masse de phase extraite pour chaque POCIS.

Les douze flacons ambrés contenant les éluats de la phase des POCIS doivent ensuite être concentrés, puis poolés en un seul extrait et concentrés à nouveau. Pour cela, les douze flacons contenant les éluats sont placés dans un bain à ultrasons pendant 5 min, puis disposés dans un RapidVap<sup>®</sup> (LABCONCO) préalablement nettoyé à l'éthanol. Les paramètres suivants sont utilisés pour l'évaporation du dichlorométhane, puis du méthanol (Tableau 8) :

Tableau 8 : Paramètres d'utilisation du RapidVap® pour l'évaporation du dichlorométhane et du méthanol dans les éluats de la phase des POCIS.

	Dichlorométhane	Méthanol
Vitesse (%)	40	40
Température (°C)	50	60
Temps (min)	20	10 (puis ajuster <sup>(1)</sup> )
Pression (mBar)	700	300

<sup>(1)</sup> ajuster le temps pour obtenir un volume final de 1 à 2 mL.

Les douze éluats de 1 à 2 mL sont ensuite poolés dans un flacon ambré, en prenant soin de bien rincer les parois de chaque flacon avec 300 µL de méthanol à l'aide d'une pipette pasteur en verre. L'éluat poolé est ensuite à nouveau évaporé à l'aide du RapidVap, puis l'éluat concentré est transféré dans un autre flacon en verre d'une contenance de 7 mL, propre et pyrolysé.

La dernière étape consiste à concentrer encore davantage l'éluat. En effet, comme mentionné dans la section 1.3, le choix a été fait de concentrer au maximum les substances accumulées par les POCIS afin d'obtenir une toxicité significative pour les microalgues. Pour ce faire, un évaporateur chauffant relié à un flux d'azote (N<sub>2</sub>) est utilisé : le flacon contenant l'éluat préconcentré est placé dans le compartiment chauffant de l'évaporateur, réglé à une température de 55°C. Une tige métallique, préalablement lavée par immersion dans un bain de méthanol et par sonication durant 3 min, est alors plongée dans le flacon et positionnée juste au-dessus de l'éluat. Le flux d'azote est alors ajusté afin de créer un léger vortex à la surface de l'éluat et permettre l'évaporation du méthanol jusqu'à ce qu'il ne reste qu'un fond de liquide dans le flacon (Figure 34).

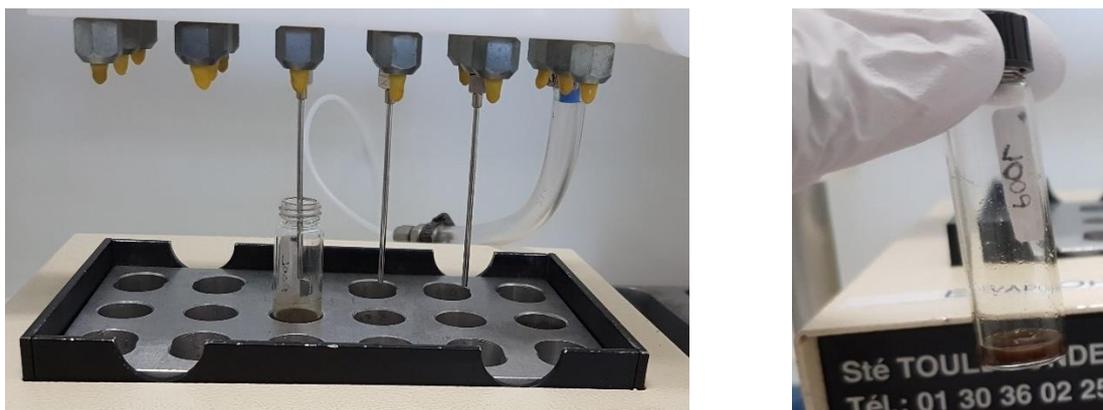


Figure 34 : À gauche, évaporation sous flux d'azote de l'éluat pré-concentré ; à droite, éluat final après concentration.

L'éluat concentré est finalement transféré dans un vial d'injection de 1,5 mL muni d'un restricteur de 500  $\mu\text{L}$  préalablement pesé, en prenant soin de rincer le flacon contenant l'éluat avec l'éluat puis avec du méthanol. Afin d'atteindre un volume final d'environ 330  $\mu\text{L}$ , l'éluat est dilué avec du méthanol ou reconcentré sous flux d'azote. Le vial muni du restricteur contenant l'éluat est ensuite pesé, permettant de calculer la masse exacte d'extrait. Finalement, les 330  $\mu\text{L}$  d'éluat (extrait de POCIS) sont divisés en deux vials munis de restricteurs : 280  $\mu\text{L}$  seront utilisés pour évaluer le potentiel toxique de l'extrait de POCIS et 50  $\mu\text{L}$  seront utilisés pour la caractérisation chimique de l'extrait (Figure 35). Les vials contenant les extraits de POCIS sont conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$  avant utilisation.



Figure 35 : Extraits de POCIS concentrés de  $\sim 280 \mu\text{L}$  issus des trois stations de suivi pour la période avril-mai.

Pour ce qui est des témoins négatifs solvant (T-NEG-SOLV), le même protocole a été utilisé, en commençant directement à l'étape de concentration des éluats avec le RapidVap. Pour remplacer l'éluat, 10 mL de méthanol, 10 mL de mélange méthanol:dichlorométhane (50:50% v/v) et 10 mL de dichlorométhane ont été introduits dans chacun des 12 flacons ambrés de 60 mL et traités comme décrit ci-dessus.

Concernant les témoins positifs solvant (T-POS-SOLV), la même procédure a été appliquée, cependant, une quantité connue de diuron a été ajoutée gravimétriquement dans le mélange de solvants avant la phase d'évaporation. Pour les témoins positifs avec phase (T-POS), 0,20 g de phase Oasis HLB a été directement ajouté par gravimétrie dans les cartouches SPE, puis, une quantité connue de diuron (similaire à celle ajoutée dans les T-POS-SOLV) a été ajoutée gravimétriquement. Les cartouches SPE ainsi constituées ont ensuite été extraites selon le protocole décrit ci-dessus.

La masse de diuron a été calculée pour que la concentration en diuron dans l'extrait soit égale à  $4 \text{ mg L}^{-1}$ . En effet, cette concentration permettait d'obtenir après dilution une gamme adaptée à la détermination d'une  $\text{CE}_{50}$  pour les deux espèces de microalgues (1,25 ; 2,50 ; 5,00 ; 10,0 ; 20,0). Comme la masse de diuron était ajoutée par gravimétrie, il était ensuite possible de calculer la concentration nominale théorique de diuron dans l'extrait pour chaque témoin positif et pour chaque période de suivi.

### 3.5. Évaluation du potentiel toxique des extraits de POCIS pour les microalgues marines

Le protocole détaillé ci-après a été utilisé pour l'extraction des POCIS issus du site d'étude ainsi que des autres POCIS non exposés (stockés directement au laboratoire à -20°C après fabrication) constituant les témoins négatifs (T-NEG, une série pour chaque période de suivi). En effet, les T-NEG ont permis de mesurer l'impact potentiel de la phase utilisée (Oasis HLB) et du protocole d'extraction sur la toxicité finale de l'extrait. Des témoins négatifs solvant (T-NEG-SOLV) ont également été préparés afin de mesurer l'impact des solvants seuls (méthanol et dichlorométhane) après évaporation et reconcentration (théoriquement, tout le dichlorométhane est évaporé et il ne reste que du méthanol). Enfin, des témoins positifs ont également été préparés par ajout d'un contaminant dont la toxicité est connue, le diuron, directement à la phase Oasis HLB (T-POS) ou au mélange de solvants utilisé pour l'extraction (T-POS-SOLV). Ces témoins avaient pour but de valider le protocole d'extraction et permettait de s'assurer que le contaminant ajouté était bel et bien retrouvé après extraction. Notons que trois lots de témoins positifs et négatifs ont été préparés : les deux premiers lots ont été préparés conjointement à l'extraction des extraits de POCIS des périodes janvier-février et mars-avril ; le dernier lot a été préparé pour les deux dernières périodes de suivi, avril-mai et mai-juin, puisque les POCIS de ces deux périodes ont été extraits simultanément.

Différents extraits étaient testés pour chaque période de suivi dans le but d'évaluer le potentiel toxique des substances hydrophiles présentes dans l'eau des différents sites d'étude. Pour chaque période, étaient testés, comme décrit ci-dessus (section 4.5.1) :

- les trois extraits de POCIS issus des trois stations suivies au niveau du site d'étude (L1-MEN, SE-REG et L4-VIG) ;
- un témoin négatif (T-NEG) et un témoin négatif solvant (T-NEG-SOLV) ;
- un témoin positif (T-POS) et un témoin positif solvant (T-POS-SOLV).

Ces sept conditions ont été testées pour chaque période de suivi. Chaque condition a fait l'objet de la préparation d'une microplaque par espèce. La synoptique de ces expérimentations était très proche de celle des expérimentations concentration-réponse (section 4.2.1), avec toutefois quelques nuances (Figure 36).

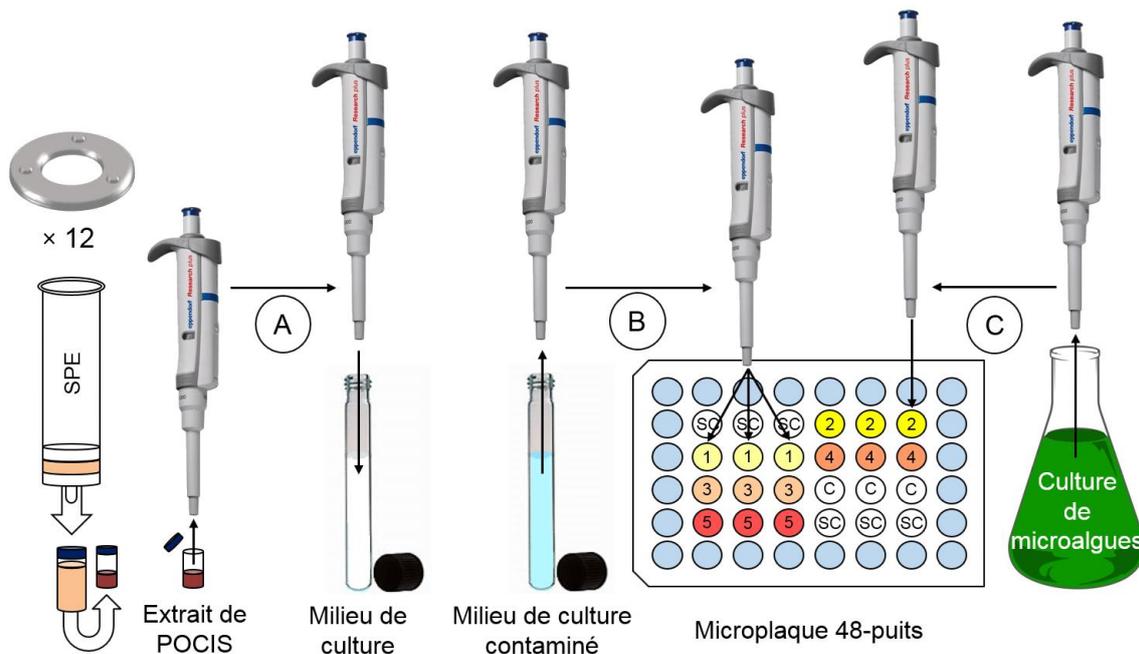


Figure 36 : Synoptique des expérimentations réalisées avec les extraits de POCIS en microplaques avec les microalgues. (A) contamination du milieu de culture en tubes de culture ; (B) répartition du milieu de culture contaminé en triplicats dans les puits de la microplaque (0,90 mL/puits) ; (C) ajout de 0,10 mL d'une dilution appropriée de la culture microalgale afin d'atteindre la densité cellulaire souhaitée ( $2 \times 10^4$  cellules mL<sup>-1</sup>).

Concernant la contamination du milieu de culture, cinq dilutions des extraits ont été testées, choisies selon une série géométrique :  $1/200^{\text{ème}}$  ;  $1/400^{\text{ème}}$  ;  $1/800^{\text{ème}}$  ;  $1/1600^{\text{ème}}$  et  $1/3200^{\text{ème}}$  (correspondant respectivement aux chiffres 1 à 5 sur la microplaque de la Figure 36). Pour s'assurer d'obtenir une toxicité significative avec les extraits de POCIS, la série géométrique devait commencer par la dilution la plus faible possible : celle-ci a été choisie en fonction du pourcentage maximum de solvant (méthanol) n'induisant aucun effet sur la croissance des deux espèces de microalgues testées. Aussi, dans le but de réduire au maximum le volume d'extrait utilisé, qui n'est que de 280  $\mu$ L, les dilutions des extraits de POCIS ont été réalisées dans seulement 5 mL de milieu de culture stérile, dans des tubes de culture en verre stériles et pyrolysés (450°C, 6 h). Ainsi, pour la dilution au  $1/200^{\text{ème}}$ , 25  $\mu$ L d'extrait ont été dilués dans 5 mL de milieu de culture, pour un pourcentage final de méthanol égal à 0,5%. Pour les autres dilutions, le volume de méthanol a été ajusté afin d'atteindre un pourcentage final de 0,5% également. Ainsi, pour chaque tube de culture contenant le milieu de culture contaminé,  $3 \times 0,90$  mL étaient distribués dans les puits (triplicats) de la microplaque (Figure 36A), 1 mL était placé dans une microplaque constituant le blanc de fluorescence (voir ci-après) et 1 mL était conservé dans un vial d'injection à -20°C pour analyse chimique ultérieure.

Comme seulement cinq dilutions étaient testées dans chaque microplaque (quinze puits), et que six puits étaient occupés par les témoins-solvants (SC, Figure 36), les trois puits restants ont été utilisés comme témoins sans-solvant (milieu de culture sans aucun ajout ; C sur la Figure 36) afin de s'assurer

à nouveau que le pourcentage de solvant testé n'induisait aucun effet sur la croissance des microalgues.

En plus des sept microplaques correspondant aux différentes conditions testées : extraits de POCIS et témoins négatifs et positifs ; deux microplaques additionnelles étaient utilisées comme témoins de fluorescence. En effet, les extraits des POCIS issus du site d'étude étaient très concentrés et colorés (Figure 35), et émettaient une fluorescence significative lors du passage des microplaques dans le lecteur, probablement du fait de la présence de matière organique fluorescente. Cette fluorescence s'ajoutant à la fluorescence naturelle des microalgues biaisait de fait la mesure de la croissance. Pour pallier cela, des microplaques spécifiques contenant uniquement une dilution de chaque condition sans microalgues (blanc de fluorescence) étaient réalisées en parallèle des autres microplaques et étaient ensuite traitées exactement de la même façon (paramètres de mesure similaires). Ainsi, lors du traitement des données, le blanc de fluorescence était soustrait à la fluorescence des puits contenant les microalgues exposées aux extraits de POCIS et ce pour chaque condition et dilution testée.

## 4. Analyses chimiques

Les standards internes deutérés utilisés pour la quantification des pesticides ont été achetés chez Cluzeau Info Lab et les solutions ont été préparées par gravimétrie dans du méthanol pur ( $\geq 99\%$ ).

### 4.1. Dosage du diuron et de l'irgarol

Le dosage du diuron et de l'irgarol est détaillé dans la section « 2.4.1. Diuron and irgarol » du matériels et méthodes de l'article 2 du chapitre 3 de ce manuscrit.

### 4.2. Dosage du cuivre

Le dosage du cuivre est détaillé dans la section « 2.4.2. Copper » du matériels et méthodes de l'article 2 du chapitre 3 de ce manuscrit.

### 4.3. Dosage du ZnPT et du CuPT

Le dosage du ZnPT et du CuPT est détaillé dans la section « 2.4.3. ZnPT and CuPT » du matériels et méthodes de l'article 2 du chapitre 3 de ce manuscrit.

### 4.4. Dosage des autres pesticides

Le dosage des autres pesticides (incluant également le diuron), est détaillée dans la section « 2.2.4. Chemical analyses » du matériel et méthodes, ainsi que dans le Tableau S3d de la section « 2.7. Supplementary material », de l'article 3 du chapitre 4 de ce manuscrit.

### 4.5. Dosage des extraits de POCIS

#### 4.5.1. Échantillons de milieu de culture f/2 contaminé avec les extraits de POCIS

L'analyse des huit pesticides sélectionnés (diuron, isoproturon, métazachlore, S-métolachlore, azoxystrobine, krésoxim-méthyl, quinoxifène et spiroxamine) dans les échantillons de milieu de culture f/2 contaminés avec les extraits de POCIS (voir section 3.5 de ce chapitre) a été réalisée en utilisant la même méthode que celle décrite dans la section précédente « 4.4. Dosage des autres pesticides ».

### 4.5.2. Analyse multi-résidus

La méthode utilisée pour l'analyse multi-résidus présentée dans la section « 2.4. Discussion » du chapitre 5, réalisée par J. Gaillard (LPTC-EPOC) est brièvement décrite ci-dessous. Les POCIS utilisés pour l'analyse multi-résidus étaient différents de ceux utilisés pour préparer les extraits qui ont été testés pour leur toxicité : ceux-ci comportaient des PRC (voir ci-dessous) et étaient déployés par lot de trois ; les stations et périodes échantillonnées, ainsi que le protocole d'extraction étaient cependant strictement similaires. Le protocole ci-dessous a été rédigé par J. Gaillard.

Les POCIS déployés se composent de 200 mg de phase Oasis® HLB séquestrée entre deux membranes en PES maintenues ensemble par deux anneaux en acier inoxydable (diamètre interne : 5,4 cm). La phase Oasis® HLB est enrobée avec des composés référence de performance (PRC : caféine-13C, DIA-d5, isoproturon-d6 et salbutamol-d3) permettant l'application de l'approche PRC (Mazzella *et al.*, 2010 ; Belles *et al.*, 2014b). Trois POCIS protégés dans une cage en acier inoxydable sont immergés par point. Deux blancs terrain sont réalisés pour chacun des triplicats. Il s'agit d'un duplicat de POCIS non exposé dans les eaux mais transporté dans les mêmes conditions. Après déploiement dans le cours d'eau, les POCIS sont rincés à l'eau ultrapure et conservés à - 18°C jusqu'à leur élution.

Les POCIS sont élués selon le protocole décrit par Tapie *et al.* (2011). Après démontage des POCIS, la phase Oasis® HLB est transférée dans des cartouches SPE en verre entre deux frittés en polypropylène. La phase est séchée sous vide durant 1 h et pesée afin de déterminer la masse de phase extraite. L'élution est effectuée à l'aide de deux solvants selon la séquence suivante : 10 mL de MeOH, 10 mL de MeOH/DCM (50:50, v/v) et 10 mL de DCM. Le flacon récepteur contient les étalons internes correspondant à un niveau de dopage de 100 ng g<sup>-1</sup> de phase. L'extrait obtenu est ensuite reconcentré jusqu'à 300 µL par un système d'évaporation sous vide (RapidVap®) suivi d'une évaporation sous flux d'azote. Pour chaque série d'élution, un blanc protocole est réalisé afin de prendre en compte d'éventuelles contaminations introduites lors de la manipulation. Les performances du protocole d'extraction sont vérifiées pour chaque série en l'appliquant à un échantillon artificiellement enrichi constitué de phase Oasis® HLB dopée avec les analytes cibles (n = 125) et les étalons internes (n = 47) (100 ng g<sup>-1</sup> de phase). Les taux de recouvrement et les limites de quantification des analytes sont ainsi suivis pour chaque élution.

L'analyse des 125 substances est faite par chromatographie en phase liquide (Agilent 1290) couplée à la spectrométrie de masse en tandem (Agilent 6495). Les dosages ont été réalisés par étalonnage interne. Cette méthode d'étalonnage permet la quantification des contaminants à l'aide de traceurs isotopiquement marqués appelés étalons internes. Les limites de quantification sont estimées à partir

des échantillons artificiels sur la base de 10 fois le rapport entre la concentration de l'analyse et le rapport signal sur bruit. En cas de contamination des blancs, la limite de quantification est définie comme 3 fois la valeur du blanc. Les limites de quantification obtenues sont inférieures à 1 ng g<sup>-1</sup> pour 97 substances, comprises entre 1 et 10 ng g<sup>-1</sup> pour 22 substances et supérieures à 10 ng g<sup>-1</sup> pour six substances. Les taux de recouvrement sont compris entre 50% et 150% pour 118 substances, inférieurs à 50% pour cinq substances et supérieurs à 150% pour une substance. Les concentrations des échantillons ont été corrigées par soustraction de la valeur du blanc correspondant à la même série d'élution. En l'absence de contamination des blancs, un analyte est quantifié lorsque la valeur du signal sur bruit dans l'échantillon est supérieure à 10. Les concentrations des échantillons n'ont pas été corrigées par les taux de recouvrement.

## 5. Tests de toxicité réalisés sur les larves d’huître

### 5.1. *Crassostrea gigas* Thundberg, 1793

L’huître creuse *Crassostrea gigas* (Figure 37), également appelée huître du Pacifique, est un mollusque bivalve de la famille des Ostréidés et est la plus cosmopolite de toutes les espèces d’huîtres. Elle est originaire du Pacifique Nord-Ouest et est aujourd’hui retrouvée sur la plupart des côtes tempérées du monde. Elle croît en général en zone intertidale ou subtidale, sur un substrat dur ou mou. L’huître creuse s’entoure d’une coquille bivalve composée de trois couches permettant de protéger son corps, dont les deux valves sont reliées par un muscle dit adducteur. Le corps de l’huître est constitué :



Figure 37 : Huître creuse (*Crassostrea gigas*) adulte et ouverte (G. Lancia<sup>©</sup>).

- d’un manteau, un tégument impliqué dans la croissance et la calcification de la coquille ;
- de deux branchies, permettant d’assurer la respiration ;
- d’un appareil digestif, comprenant une bouche, un court œsophage puis un estomac entouré d’une masse tissulaire appelée masse digestive, formant des boucles autour de l’estomac et se terminant par un anus débouchant au-dessus du muscle adducteur ;
- d’organes reproducteurs comprenant un double système de tubules très ramifiés de part et d’autre du corps qui se réunissent en un seul conduit excréteur, et sont généralement à peine visible l’hiver mais très visibles au printemps et en été après leur développement.

L’huître possède également un cœur, situé au-dessus du muscle adducteur, ainsi que des artères et veines permettant la circulation de l’hémolymphe (le sang de l’huître), constituée des cellules hyalines et des amibocytes. Enfin, son système nerveux est peu développé et comprend deux paires de cellules nerveuses agrégées reliées entre elles : une près de la bouche (ganglion cérébro-pleural) et une autre, plus grande, sous le muscle adducteur (ganglion viscéral).

### 5.2. Expérimentations contrôlées en laboratoire

#### 5.2.1. Obtention des larves de l’huître creuse *Crassostrea gigas*

Les géniteurs matures, mâles et femelles, de *Crassostrea gigas* sont achetés à l’écloserie commerciale *Guernsey Sea Farms* (Royaume-Uni). Après réception, les huîtres sont conservées pour une durée maximale de deux jours dans de l’eau de mer à 12°C, maintenue oxygénée par un système de bullage (Figure 38A). L’eau de mer utilisée provient de la station Ifremer d’Argenton, et est préalablement

filtrée sur  $0,22\ \mu\text{m}$  et conservée à  $4^{\circ}\text{C}$  pendant un maximum de trois jours avant utilisation. La fécondation est réalisée dans une pièce thermostatée à  $25^{\circ}\text{C}$ . Afin d'induire l'émission des gamètes, les géniteurs sont transférés dans un bain d'eau de mer à  $29^{\circ}\text{C}$  pendant 30 min. Pendant cette période, les individus sont observés de façon continue de manière à pouvoir détecter au plus vite le début d'émission des gamètes. Lorsque la ponte est effective, les individus sont vite transférés de façon individuelle dans des cristallisoirs remplis d'eau de mer à  $29^{\circ}\text{C}$  (Figure 38B). Une fois la ponte terminée (10 min maximum), un échantillon d'eau de mer de chaque cristallisoir est observé au microscope optique inversé (Olympus CK40,  $\times 40$  et  $\times 10$  pour les spermatozoïdes et les ovocytes, respectivement) pour déterminer i) s'il s'agit de gamètes mâles ou femelles, et de ce fait déterminer ainsi le sexe de chaque individu ayant pondu, ii) la qualité des gamètes obtenues : forme en poire évoluant vers une forme ronde pour les ovocytes, mobilité et densité pour les spermatozoïdes.

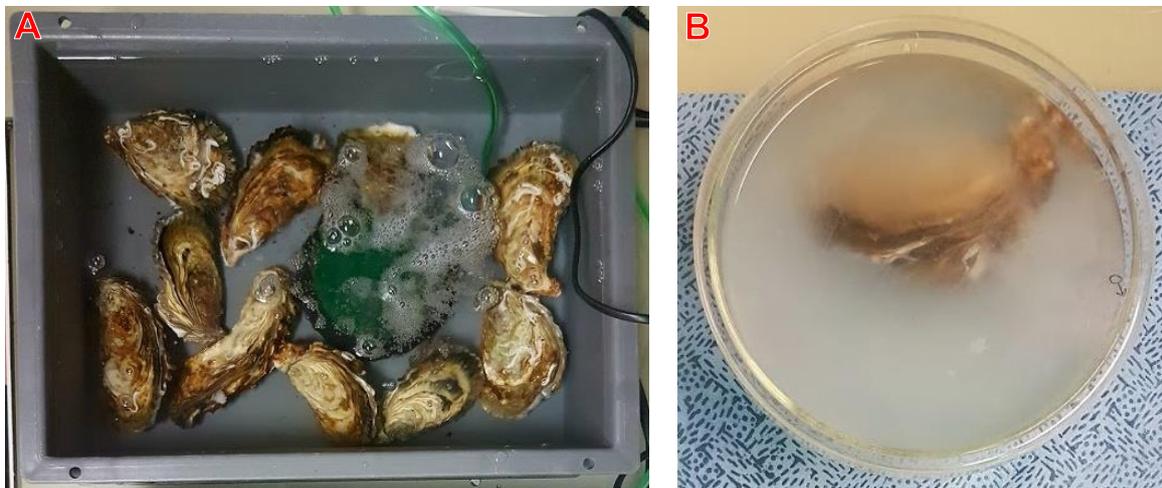


Figure 38 : Huitres creuses en stabulation dans un bac d'eau de mer oxygénée (A) ; géniteur mâle isolé dans un cristallisoir pendant la libération des spermatozoïdes (B).

Le contenu des cristallisoirs est ensuite poolé par sexe. Les suspensions d'ovocytes et de spermatozoïdes sont ensuite filtrées sur  $100\ \mu\text{m}$  et  $40\ \mu\text{m}$ , respectivement, afin d'éliminer les débris. La concentration en ovocytes de la suspension obtenue pour les individus femelles est ensuite déterminée grâce à l'utilisation d'une cellule de Thoma (hématimètre permettant de compter le nombre de cellules dans un volume donné de suspension cellulaire). La fécondation est déclenchée par l'ajout des spermatozoïdes dans la suspension contenant les ovocytes, le volume ajouté devant permettre d'obtenir un ratio de dix spermatozoïdes par ovocyte. Dans les 15 min suivant la fécondation, un prélèvement est réalisé pour vérifier au microscope inversé l'émission du globule polaire afin de valider la fécondation. Les zygotes (mix de fécondation, Figure 39) peuvent ensuite être utilisés pour le test de développement embryon-larvaire décrit ci-après (voir section 5.2.2).

### 5.2.2. Test de développement embryo-larvaire

Parallèlement aux expérimentations concentration-réponse réalisées sur les microalgues marines, le test de développement embryo-larvaire normalisé (ISO 17244:2015, 2015) a été adapté en microplaques afin d'effectuer le criblage de toxicité pour les larves d'huître des pesticides sélectionnées. Des expérimentations préliminaires ont été réalisées dans le but de valider l'utilisation des microplaques pour réaliser ce test généralement conduit en volume de 30 mL, et afin de déterminer les pourcentages maximaux de solvant véhiculé utilisé pour la dissolution des pesticides hydrophobes. Les résultats des expériences préliminaires sont décrits dans le Chapitre 4, section 3. Pour chaque expérimentation, une gamme de cuivre est systématiquement réalisée dans les mêmes conditions d'exposition. Le cuivre est utilisé comme témoin positif du fait de son embryotoxicité connue pour le développement de la larve d'huître. Le protocole suivi était très similaire à celui utilisé pour les microalgues (Figure 39).

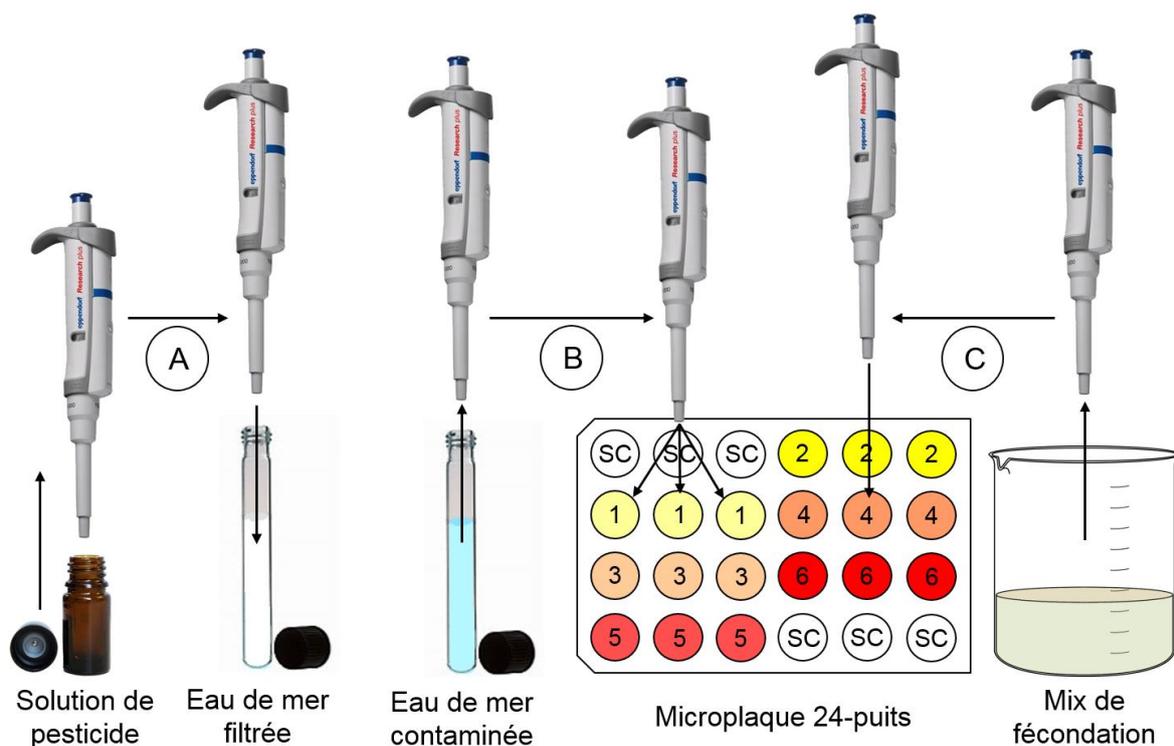


Figure 39 : Synoptique des expérimentations concentration-réponse réalisées en microplaques avec les larves d'huître. (A) contamination du milieu de culture en tubes de culture ; (B) répartition du milieu de culture contaminé en triplicats dans les puits de la microplaque (2,00 mL/puits) ; (C) ajout de 0,01-0,02 mL d'une dilution appropriée du mix de fécondation afin d'atteindre la densité de zygotes souhaitée (100 zygotes mL<sup>-1</sup>).

Pour chaque concentration de pesticide à tester, une solution d'eau de mer contaminée est préparée dans un tube de culture en verre stérile et pyrolysé (450°C, 6h). Elle est obtenue par dilution de la solution mère de pesticide dans l'eau de mer filtrée (Figure 39A). Pour chaque solution des pesticides testée, le volume de solvant est ajusté afin de travailler avec un pourcentage de solvant identique pour

toutes les concentrations testées. À l'aide d'une micropipette, le milieu de culture ainsi contaminé est distribué dans les puits (3 triplicats par concentration, 2,00 mL par triplicat/puits ; Figure 39B). Pour chaque microplaque, six puits sont réservés pour la réalisation de puits témoins-solvant (SC), correspondant au pourcentage de solvant dans l'eau de mer présent dans toutes les conditions testées. Une fois la microplaque entièrement remplie, un volume fixe du mix de fécondation préalablement dilué (voir section 5.2) est ajouté dans chaque puits, afin d'atteindre une concentration de 100 embryons mL<sup>-1</sup> au début de l'exposition (Figure 39C). Le volume final de chaque puits est de 2,00 mL. Chaque microplaque permet ainsi d'étudier la toxicité d'un pesticide en offrant la possibilité de tester 6 concentrations différentes.

Une fois la plaque remplie, elle est maintenue fermée par son propre couvercle, et le développement embryo-larvaire se déroule pendant 24 h, à l'obscurité, dans une pièce thermostatée à 25°C, afin que les larves d'huître atteignent le stade de larve D (Figure 11 et Figure 40, A et F). À l'issue des 24 h, le développement des larves est stoppé par ajout de formol neutre à 8%, et chaque plaque est scellée par un film plastique transparent. Chaque plaque peut ensuite être observée au microscope inversé afin de déterminer le pourcentage de larves normales dans chaque puits. Cent larves sont observées pour chaque puits. Les anomalies observables sont les suivantes (Figure 40) :

- anomalie du développement de la coquille (Figure 40, B et G) ;
- hypertrophie du manteau (Figure 40, C et H) ;
- anomalie du développement de la coquille et hypertrophie du manteau (Figure 40, D et I) ;
- arrêt du développement (Figures 40, E et J).

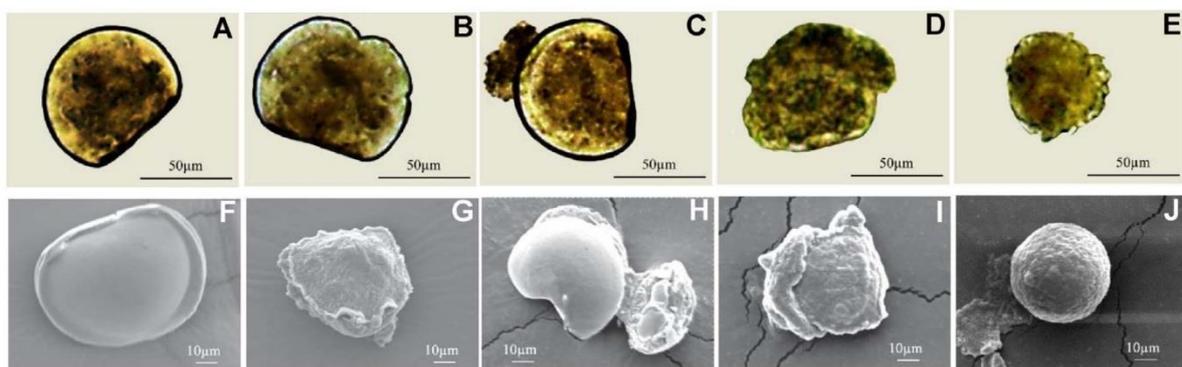


Figure 40 : Illustration d'une larve D normale (A et F), ainsi que des différentes anomalies observables : anomalie du développement de la coquille (B et G) ; hypertrophie du manteau (C et H) ; anomalie de coquille et hypertrophie du manteau (D et I) et arrêt de développement (E et J). Photos prises au microscope photonique inversé ( $\times 400$  ; A à E) et au microscope électronique à balayage ( $\times 1000$  ; F à J), d'après Nogueira *et al.* 2017.

Il convient dans un premier temps d'observer la microplaque correspondant à la gamme de cuivre : la CE<sub>50</sub> obtenue pour le cuivre doit être située entre 6 et 16  $\mu\text{g L}^{-1}$ , et les témoins-solvant doivent avoir un pourcentage de normalité (Figure 40, A et F) supérieur à 80% (ISO 17244:2015, 2015) pour

valider le test.. Si les conditions de validité du test sont remplies, les autres microplaques sont observées et le pourcentage d'anomalies, toutes anomalies confondues, est déterminé pour chaque concentration testée. Les pourcentages de normalité (ou d'anormalité) sont ensuite utilisés pour calculer une  $CE_{50}$  pour chaque pesticide testé.

### 5.2.3. Étude de la génotoxicité des substances testées : le test des comètes

Afin d'aller plus loin dans l'évaluation des effets toxiques des substances testées en microplaques, la génotoxicité (induction directe ou indirecte de dommages à l'ADN) des quatre substances les plus embryotoxiques a été étudiée via le test des comètes. Ce test nécessitant une quantité importante de larves d'huître, les expérimentations ont été réalisées en grand volume, dans des pots en verre de 2 L, dans une pièce thermostatée à 25°C. Ces pots étaient remplis avec 0,50 L d'eau de mer filtrée, dont l'oxygénation était assurée par un système de bullage (Figure 41).



Figure 41 : Photo de l'expérimentation réalisée pour l'étude de la génotoxicité des pesticides sur les larves de l'huître creuse.

Pour chaque pesticide testé, trois concentrations d'exposition ont été définies et pour chaque concentration l'exposition a été réalisée en triplicats (voir section 4.3.3 du chapitre 4). La contamination de l'eau de mer filtrée est réalisée par dilution directe de la solution mère de pesticide dans le pot en verre. Contrairement au test de développement embryo-larvaire, la durée d'exposition des embryons aux pesticides a été de 6 h, le développement des larves s'est donc arrêté au stade gastrula (Figure 11). Le protocole du test des comètes est issu de la publication d'Akcha *et al.* (2012).

Une fois l'exposition terminée, le contenu des pots en verre est filtré sur 40,0 µm et les larves sont récupérées dans des microtubes dans un volume final de 2,00 mL d'eau de mer filtrée. Les larves sont ensuite centrifugées 5 min à 2500 rpm (rotations min<sup>-1</sup>). Le culot de larves est ensuite repris avec 2,00 mL de tampon phosphate salin (*phosphate buffer saline*, PBS en anglais ; NaCl 137 mM, KCl 2,70 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10,0 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,80 mM, pH 7,4) et à nouveau centrifugé 5 min à 2500 rpm. La dissociation des cellules est ensuite réalisée par digestion douce des larves dans 2,00 mL de trypsine à 0,25% (une enzyme permettant l'hydrolyse des liaisons peptidiques) pendant 3 min, avec agitation et à température ambiante. L'action de la trypsine est ensuite stoppée par ajout de 1,20 mL de milieu de culture *Roswell Park Memorial Institute medium* (RPMI) supplémenté avec du sérum de veau fœtal (RPMI-SVF 20%), puis la solution est filtrée sur un tamis cellulaire de 30 µm et à nouveau centrifugée 5 min à 2500 rpm pour la récupération des cellules larvaires dissociées. Le culot est alors repris avec 160 µL d'agarose à bas point de fusion 0,5% (*low melting point agarose*, LMPA en anglais) à 37°C, et 75 µL sont déposés sur une lame de microscope, déjà recouverte d'un premier gel d'agarose à point de fusion normal à 0,5% (*normal melting point agarose*, NMPA en anglais) la veille de l'expérimentation. Les lames sont ensuite placées à 4°C pendant quelques minutes afin de permettre à l'agarose de se solidifier. Un dernier gel constitué de LMPA est ensuite coulé sur la lame ; les cellules dissociées se trouvant ainsi prises en sandwich entre deux gels d'agarose. Une fois la lamelle de chaque lame retirée, l'ensemble des lames est incubé une nuit à 4 °C dans le tampon de lyse cellulaire (NaCl 2,50 M, EDTA, Na<sub>2</sub> 0,10 M, Tris base 0,01 M, N-sarcosinate 1%, DMSO 10%, Triton X100 1%, pH 10) pour la digestion des membranes cellulaires. Une fois la lyse terminée, les lames sont placées dans une cuve à électrophorèse et recouvertes du tampon de dénaturation qui sert également à l'électrophorèse (NaOH 0,30 M, EDTA 1,00 mM, pH 13). Une incubation pendant 15 min dans l'obscurité et à température ambiante, permet au tampon de dénaturation de digérer les histones et de permettre à l'ADN de chaque noyau de passer d'une structure super enroulée à une structure relâchée, facilitant ainsi la migration électrophorétique de l'ADN. A la fin de cette étape, l'électrophorèse est ensuite réalisée dans le même tampon pendant 20 min à une tension électrique

de 13 V (champ électrique  $E = 0,66 \text{ V cm}^{-1}$ ). Les lames sont ensuite retirées du bac d'électrophorèse, incubées  $2 \times 8 \text{ min}$  dans le tampon de neutralisation (Tris base 0,40 M, pH 7,5) puis fixée à l'éthanol absolu pendant un minimum de 10 min. Après séchage, les lames peuvent être conservées plusieurs mois avant analyse.

Pour la lecture des lames, l'ADN est coloré par le dépôt sur chaque lame de  $75 \mu\text{L}$  de GelRed® (marqueur fluorescent des acides nucléiques), et étalé à l'aide d'une lamelle. Les lames sont stockées au minimum une heure dans une boîte humide à  $4^\circ\text{C}$ . Les lames peuvent ensuite être analysées par lecture au microscope à fluorescence (Olympus BX60 ; barrière filtre : 580 nm ;  $\times 400$ ) couplé à une source d'excitation lumineuse verte (Olympus U-RFL-T) et à une caméra CCD ultrasensible (*charge coupled device* ; Luca-S, Andor Technology). L'analyse du signal est réalisée grâce à un ordinateur équipé du logiciel Komet

(Komet 6, Kinetic Imaging Ltd.). Deux lames sont préparées par échantillon et 50 noyaux sont analysés pour chaque lame. Pour chaque noyau observé, le pourcentage d'ADN présent dans la queue de la comète (*% Tail DNA*) est mesuré via le logiciel Komet (Figure 42).

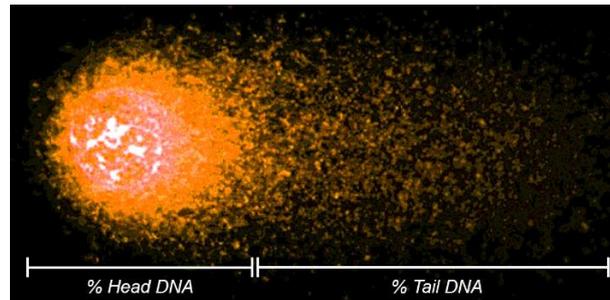


Figure 42 : Illustration d'une comète. Le pourcentage d'ADN dans la tête (*% Head DNA*) et la queue (*% Tail DNA*) de la comète est mesuré par l'intensité de fluorescence à l'aide du logiciel Komet.

## 6. Analyses statistiques et modélisation

Différents types d'analyses statistiques ont été réalisées afin d'interpréter les résultats obtenus dans les différentes sections de ce manuscrit. Pour chaque partie de résultats, qu'elle soit sous forme d'article ou sous une autre forme, les analyses statistiques réalisées sont précisément détaillées dans une partie matériels et méthodes spécifique.

De manière générale, la significativité des différences obtenues entre les différents traitements dans les expérimentations biologiques a été mise en évidence par une analyse de variance (ANOVA). Afin de vérifier les hypothèses nécessaires à l'application de l'ANOVA, la normalité des données a été vérifiée par un test de Shapiro-Wilk ainsi que diagramme quantile-quantile (diagramme Q-Q). Puis, l'homogénéité des variances (homoscédasticité) a été vérifiée par un test de Barlett (test paramétrique) et un test de Fligner-Killeen (test non-paramétrique). Après application de l'ANOVA, les tests *a posteriori* de Tukey (différence significative honnête, DSH) et/ou Newman-Keuls, selon les expérimentations, ont été réalisés afin de mettre en évidence les différences significatives entre les conditions testées. Une différence significative était considérée pour  $p < 0,05$ .

Pour modéliser les relations concentration-réponse, le modèle log-logistique à trois paramètres (LL.3) a été utilisé, comme décrit dans la section 4.3 de l'introduction. L'adéquation du modèle LL.3 aux données était alors vérifiée visuellement, mais également via un test *lack-of-fit*, permettant de vérifier si la régression non-linéaire décrit les données correctement en comparaison d'une ANOVA. L'adéquation d'une régression linéaire appliquée aux données est ensuite comparée avec celle du modèle de régression non-linéaire LL.3 via le test du critère d'information d'Akaike (*Akaike information criterion*, AIC) afin de vérifier que le modèle LL.3 est bien le mieux adapté pour décrire les données obtenues (le meilleur modèle est celui avec le critère d'information d'Akaike le plus faible). Concernant plus particulièrement le calcul des valeurs de  $FD_{50}$  théoriques ( $FD_{50_{pred}}$ ) dans le chapitre 5, la méthode suivante a été utilisée :

Soit un extrait de POCIS pur auquel on attribue une somme de TU,  $\Sigma TU_{pur}$ . La somme des TU d'une dilution  $x$  connue de l'extrait pur,  $\Sigma TU_{1/x}$ , est connue (Équation 17),

$$\frac{\Sigma TU_{pur}}{x} = \Sigma TU_{1/x} \quad (17)$$

il est donc possible de calculer la dilution  $y$  de l'extrait pur induisant une inhibition de 50%, *i.e.* pour laquelle  $\Sigma TU_{1/y} = 1$  (Équation 18),

$$\frac{\Sigma TU_{pur}}{y} = \Sigma TU_{1/y} = 1$$

soit, (18)

$$y = \Sigma TU_{pur} = FD50_{pred} = \Sigma TU_{1/x} \times x$$

Où  $FD50_{pred}$  est le facteur de dilution de l'extrait induisant 50% d'inhibition, prédit à partir des concentrations des pesticides mesurés dans l'extrait dilué à la dilution  $x$ .

Notons que cette approche a également été réalisée en utilisant uniquement la valeur de TU de la spiroxamine à la place de la somme des TU.

Pour ce qui est de la modélisation des effets d'interaction, il convient de différencier les procédures utilisées pour la méthode des isobogrammes de celles implémentées dans l'outil MIXTOX. Les procédures détaillées sont décrites dans la section « 2.6.2. Mixture analysis » du matériels et méthodes de l'article 2 du chapitre 3 de ce manuscrit.

Dans la méthode des isobogrammes, le modèle CA est appliqué au jeu de données (modèle à cinq paramètres) puis testé contre un modèle LL.3 appliqué simultanément à l'ensemble du jeu de données (cinq courbes concentration-réponse, onze paramètres) avec des  $CE_{50}$  et pentes variables et une limite haute commune. Ces deux modèles sont comparés via un test de Fisher (test  $F$ ) : si aucune différence significative n'est observée entre ces deux modèles ( $p > 0,05$ ), le jeu de données est correctement expliqué par le modèle le plus simple, dans le cas présent le modèle CA. Si le test  $F$  met en évidence une différence significative ( $p < 0,05$ ), les modèles étendus de Hewlett (un paramètre supplémentaire) et Vølund (deux paramètres supplémentaires) sont alors testés. De la même manière, un test  $F$  est alors réalisé pour évaluer l'adéquation du modèle de Hewlett au jeu de données par rapport au modèle CA, et de la même manière entre les modèles de Vølund et Hewlett et Vølund et CA : si  $p < 0,05$ , le modèle plus complexe explique mieux le jeu de données que le modèle plus simple et *vice versa*.

Concernant l'outil MIXTOX, les modèles implantés dans la macro Excel (CA, IA, S/A, DR et DL) sont appliqués au jeu de données, puis, en utilisant la fonction « Solveur » d'Excel, les paramètres déterminés pour chaque modèle sont optimisés selon la méthode GRG (*generalized reduced gradient*) non-linéaire permettant de minimiser la somme des carrés des résidus (*residual sum of squares*, SS). L'adéquation des différents modèles au jeu de données est ensuite estimée par un test du  $\chi^2$  : le modèle S/A est comparé aux modèles CA/IA et les modèles DR/DL aux modèles S/A et CA/IA. Si  $p < 0,05$ , le modèle plus complexe explique mieux le jeu de données que le modèle plus simple, et *vice versa*.

Concernant les données issues des expérimentations de chimie, une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée afin de mettre en évidence des corrélations entre les propriétés physico-chimiques des pesticides testés et la stabilité de leur concentration dans le système de test en microplaques pendant une période de 96 h. Cette analyse est détaillée dans la section « 2.2.6.2 Principal component analysis » du matériels et méthodes de l'article 3 (chapitre 4).

La plupart des tests statistiques ont été réalisés avec le logiciel R v. 3.5.1 (R Development Core Team, 2008) via l'utilisation de différents modules (*packages*), dont le module « drc » (Ritz et Streibig, 2005, 2014 ; Ritz *et al.*, 2015) permettant la modélisation des relations concentration-réponse et des effets d'interactions des mélanges. La plupart des graphiques ont également été réalisés sous R via le module « ggplot2 » (Wickham, 2009). L'outil MIXTOX (Jonker *et al.*, 2005) a été utilisé avec le logiciel Microsoft Excel®.



## Chapitre 3 – Toxicité de cinq biocides antifouling, seuls et en mélanges, chez trois espèces de microalgues marines

---



## 1. Avant-propos

Ce premier chapitre de résultats a pour but de répondre aux deux premiers objectifs généraux identifiés pour ces travaux de thèse à travers deux articles scientifiques publiés dans la revue *Chemosphere*.

La première partie de ce chapitre est consacrée à l'étude de la toxicité de deux biocides *antifouling*, le diuron et l'irgarol, seuls et en mélange, sur la croissance et la physiologie de deux espèces de microalgues marines, *Tetraselmis suecica* et *Chaetoceros calcitrans*. L'originalité de cette étude réside dans l'utilisation d'une souche de la microalgue *T. suecica* résistante au diuron (Stachowski-Haber Korn *et al.*, 2013). Dans ce contexte, les objectifs de cette étude étaient : d'une part, d'identifier la cause de la résistance au diuron chez la souche de *T. suecica* et d'évaluer sa capacité de résistance face à un autre biocide possédant le même mode d'action que le diuron, l'irgarol ; d'autre part, d'observer la réponse induite par deux mélanges composés de diuron et d'irgarol, sur la croissance et la physiologie des deux espèces, incluant la souche résistante au diuron.

Ces travaux sont présentés sous la forme d'une publication parue dans le journal *Chemosphere* « *Microalgal sensitivity varies between a diuron-resistant strain and two wild strains when exposed to diuron and irgarol, alone and in mixtures* ».

Notons que, bien que cette publication ait été rédigée dans sa majorité durant ma première année de thèse, les résultats qui y sont présentés ont été obtenus antérieurement durant un stage de Master 2 réalisé au laboratoire d'écotoxicologie et en collaboration avec Nathalie Coquillé, alors en thèse dans ce laboratoire et sous la direction de Sabine Stachowski-Haber Korn.

Les réponses inattendues obtenues lors de l'exposition des deux espèces (dont la souche de *T. suecica* résistante au diuron) aux deux combinaisons du mélange diuron et irgarol nous ont conduit à faire le choix d'approfondir l'étude des effets d'interaction des mélanges binaires de biocides *antifouling*. Ces résultats ont donc constitué un socle déterminant pour l'orientation d'une partie de mes travaux de thèse : ainsi, les travaux présentés dans la deuxième partie de ce chapitre sont issus notamment d'un séjour de trois mois réalisé à la fin de ma première année de thèse à l'Université de Copenhague sous la direction de Nina Cedergreen, pionnière dans le domaine de la modélisation et de l'interprétation des effets de mélanges.

Ainsi, dans cette deuxième partie, l'objectif était de déterminer les effets d'interaction de cinq substances *antifouling* en mélanges binaires afin de mettre en évidence de potentiels effets synergiques sur la croissance des microalgues *Tisochrysis lutea*, *Skeletonema marinoi* et *T. suecica* (souche sauvage). Pour ce faire, différents modèles permettant la prédiction de la toxicité résultant d'un mélange binaire ont été appliqués. Ces travaux font l'objet d'une deuxième publication parue dans le journal *Chemosphere* « *Combined effects of antifouling biocides on the growth of three marine microalgal species* ».

## 2. Article 1 : Différence de sensibilité entre une souche résistante au diuron et deux souches sauvages de microalgues exposées au diuron et à l'irgarol, seuls et en mélanges

### Introduction

Les microalgues marines sont exposées dans leur environnement naturel à une multitude de substances chimiques, parmi lesquelles les pesticides (Caquet *et al.*, 2013 ; Cruzeiro *et al.*, 2015). Certains pesticides, comme les biocides *antifouling* utilisés dans les peintures anti-salissures appliquées sur les coques de bateaux, sont de puissants algicides et peuvent en conséquence induire une toxicité significative aux microalgues qui y sont exposées (Buma *et al.*, 2009 ; Bao *et al.*, 2013).

Une grande majorité des études écotoxicologiques s'intéressent généralement à la toxicité des substances seules, et évalue les effets de ces substances uniquement sur la croissance des organismes testés. Or, les contaminants présents sous forme de mélanges dans le milieu naturel peuvent induire une toxicité supérieure lorsque leurs effets sont combinés (Cedergreen, 2014). De plus, bien qu'un effet significatif observé sur la croissance tende à démontrer une toxicité significative de la substance testée pour l'organisme exposé, il ne révèle en aucun cas les causes de cette toxicité, qui peuvent être multiples. Enfin, il a également été démontré que l'exposition prolongée de microalgues à des contaminants peut entraîner l'apparition de souches de microalgues résistantes issues de mutations pré-sélectives (López-Rodas *et al.*, 2001).

Dans ce contexte, l'étude qui suit visait à exposer les microalgues marines *T. suecica* (dont une souche résistante au diuron) et *C. calcitrans* à deux biocides *antifouling*, le diuron et l'irgarol, seuls et en mélange binaire, en conditions contrôlées de laboratoire. Ces deux substances agissent par inhibition de la photosynthèse en se fixant sur le site de fixation de la quinone Q<sub>B</sub> situé au niveau la protéine D1 du PSII, empêchant le transfert des électrons vers le cytochrome b<sub>6</sub>f.

À l'issue des 144 h d'exposition, l'effet des substances seules et des deux mélanges testés a été observé sur la croissance, mais aussi sur l'efficacité photosynthétique par PAM-fluorescence ainsi qu'au niveau de la quantité relative d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de lipides par cytométrie en flux. Le gène *psbA*, codant pour la protéine D1 du photosystème II a également été séquencé chez la souche résistante au diuron afin de tenter d'élucider la cause possible de cette résistance.



## Microalgal sensitivity varies between a diuron-resistant strain and two wild strains when exposed to diuron and irgarol, alone and in mixtures



Valentin Dupraz<sup>a,1</sup>, Nathalie Coquillé<sup>a,b,c,d,1</sup>, Dominique Ménard<sup>a</sup>, Rossana Sussarellu<sup>a</sup>, Larissa Haugarreau<sup>a</sup>, Sabine Stachowski-Haberkorn<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Ifremer, Laboratoire d'Écotoxicologie, rue de l'île d'Yeu, BP 21105, F-44311 Nantes Cedex 03, France

<sup>b</sup> Irstea, UR EABX, Centre de Bordeaux, 50 avenue de Verdun, F-33612 Cestas Cedex, France

<sup>c</sup> Université de Bordeaux, UMR 5805, EPOC, Laboratoire de Physico Toxico Chimie de l'environnement, 351 Cours de la Libération, CS 10004, F-33405 Talence Cedex, France

<sup>d</sup> CNRS, UMR 5805, EPOC, Laboratoire de Physico Toxico Chimie de l'environnement, 351 Cours de la Libération, CS 10004, F-33405 Talence Cedex, France

### HIGHLIGHTS

- Two microalgal species were exposed to irgarol, diuron, and mixtures of both.
- At 0.5  $\mu\text{g L}^{-1}$ , irgarol was more toxic than diuron, for both species.
- A mutation was found in the *psbA* gene coding sequence of the diuron-resistant strain.
- The mutation induced no resistance to irgarol in the diuron-resistant strain.
- Mixture (D5+I0.5) induced stronger effects than I0.5 in the diuron-resistant strain.

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 13 November 2015

Received in revised form

12 February 2016

Accepted 16 February 2016

Available online 15 March 2016

Handling Editor: David Volz

#### Keywords:

Microalgae

Herbicides

Antifouling

Irgarol

Diuron

Diuron resistance

### ABSTRACT

A wild strain of *Chaetoceros calcitrans* and wild and diuron-resistant strains of *Tetraselmis suecica*, were exposed to the PSII inhibitor herbicides diuron and irgarol, individually and in mixtures. The effects of three concentrations of diuron and irgarol and four binary mixtures were evaluated on doubling time, relative reactive oxygen species and lipid content by flow cytometry, and on photosynthetic efficiency by pulse amplitude modulated fluorescence.

In both wild strains, significant effects were observed for each molecule at the highest concentration tested: at irgarol 0.5  $\mu\text{g L}^{-1}$ , *C. calcitrans* was shown to be more sensitive than *T. suecica* (+52% and +19% in doubling time, respectively), whereas at diuron 5  $\mu\text{g L}^{-1}$ , *T. suecica* was more affected (+125% in doubling time) than *C. calcitrans* (+21%). Overall, irgarol had a higher toxicity at a lower concentration than diuron (no effect at diuron 0.5  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) for both wild strains. The strongest mixture (irgarol 0.5  $\mu\text{g L}^{-1}$  + diuron 5  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) increased doubling time by 356% for *T. suecica*, thus showing amplified effects when the two compounds were mixed.

Sequencing of the diuron-resistant strain demonstrated a single mutation in the *psbA* gene coding sequence. Although resistance of this strain to diuron was confirmed with no effect at the highest diuron concentration, no resistance to irgarol was shown. In addition, the mutant strain exposed to the strongest mixture showed a 3.5-fold increase in doubling time compared with irgarol alone, thereby supporting the hypothesis of a biochemical interaction between these two compounds.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Irgarol (2-methylthio-4-tertbutylamino-6-cyclopropylamino-s-triazine) and diuron (1-(3,4 dichlorophenyl)-3,3 dimethyl urea) are two biocides commonly used in copper-based antifouling paints to replace TBT (Tributyltin) (Manzo et al., 2006). Diuron has also been

\* Corresponding author.

E-mail address: [Sabine.Stachowski.Haberkorn@ifremer.fr](mailto:Sabine.Stachowski.Haberkorn@ifremer.fr) (S. Stachowski-Haberkorn).

<sup>1</sup> These first authors contributed equally to this article.

used as an herbicide in agriculture. The use of diuron as a biocide and herbicide was prohibited in France in 2008 (Directive biocide 98/8/CE and Arrêté du 21/08/2008). However, its persistence in the environment means that it is still found in rivers and coastal waters. In the Water Framework Directive (2000/60/EC), diuron, and later irgarol (Directive 2013/39/UE), were included in the list of “48 priority pollutants to be monitored in European waters”, which will lead to their progressive prohibition over the next 20 years. While diuron is no longer used in most European countries, it is still of great concern in other countries, such as in Australia where it is known to be harmful to the Great Barrier Reef (Lewis et al., 2009; Holmes, 2012). In contrast, irgarol is still widely used in antifouling paints all around the world despite reports of high toxicity in some studies from the U.K. (Thomas et al., 2001; Chesworth et al., 2004), where its use in antifouling paints has been prohibited. Along the French coasts, average irgarol concentrations from 10 to 40 ng L<sup>-1</sup> were found in Arcachon Bay, while concentrations up to 0.1 µg L<sup>-1</sup> were reported in Arcachon port (Auby and Maurer, 2004). More recently, irgarol concentrations up to 0.186 µg L<sup>-1</sup> were reported in Vilaine Bay (Caquet et al., 2013). In Singaporean coastal waters, irgarol concentrations in the range of 3–4 µg L<sup>-1</sup> have been reported (Basheer et al., 2002). As for diuron, concentrations from 11 to 33 ng L<sup>-1</sup> were reported in Mediterranean coastal waters (Munaron et al., 2012), and 0.268 µg L<sup>-1</sup> in Vilaine Bay (Caquet et al., 2013). The highest concentrations reported in European rivers and ground waters have been 0.279 µg L<sup>-1</sup> and 0.864 µg L<sup>-1</sup>, respectively (Loos et al., 2009, 2010). In addition, diuron and irgarol have been measured at maximal concentrations of 2.583 and 0.824 µg L<sup>-1</sup>, respectively, in careening areas of several ports (Cozic and Durand, 2013).

Irgarol, a triazine, and diuron, a phenylurea, both act as photosystem II (PSII) inhibitors: their binding action on the D1 protein in PSII prevents electron transfer between quinones Q<sub>A</sub> and Q<sub>B</sub>, impeding Hill's reaction (Nimbal et al., 1996; Jones and Kerswell, 2003). As PSII structure is very well conserved among plants and microalgae, numerous non-target organisms could suffer deleterious effects if environmental pollution occurs (Readman et al., 1993).

Effects on phytoplankton have been recorded in a number of studies. Koutsafitis and Aoyama (2006) reported 72 h IC<sub>50</sub> values of 1.1 µg L<sup>-1</sup> and 36 µg L<sup>-1</sup> for irgarol and diuron respectively, on the growth of the microalga *Chaetoceros gracilis*. Nyström et al. (2002) established that irgarol concentrations ranging from 441 to 647 ng L<sup>-1</sup> were responsible for 50% photosynthesis inhibition in Lake Geneva phytoplankton. Larras et al. (2013) assessed the sensitivity of benthic diatoms to diuron and irgarol under both planktonic and benthic conditions. They established EC<sub>50</sub> values of 4.27 and 10.07 µg L<sup>-1</sup> for planktonic conditions and 9.50 and 0.070 µg L<sup>-1</sup> for benthic conditions, for diuron and irgarol, respectively, based on the 96 h growth rate of the population. Devilla et al. (2005) established EC<sub>50</sub> values based on 72 h cell number inhibition of 2.26 and 0.25 µg L<sup>-1</sup> for diuron and irgarol, respectively, on the microalga *Emiliania huxleyi*. For diuron, tropical estuarine microalgae species *Navicula* sp. and *Navicula pyriformis* showed EC<sub>50</sub> values of 7.8 and 8 µg L<sup>-1</sup>, respectively, based on 72 h growth rate (Magnusson et al., 2008). In another study, Magnusson et al. (2010) found diuron IC<sub>50</sub> values of 2.6, 2.01, 2.71 and 4.4 µg L<sup>-1</sup> for *Navicula* sp., *N. pyriformis*, *Phaeodactylum tricorutum* and *Cylindrotheca closterium*, respectively, based on photosynthetic efficiency.

In the environment, organisms are exposed to cocktails of chemicals, it is thus of interest to study the effects induced by mixtures of contaminants. Fernández-Alba et al. (2002) showed that a mixture of irgarol and diuron resulted in a synergistic interaction impacting three different organisms, including a microalga. Gatidou and Thomaidis (2007) showed that the harmful effects of interactions between irgarol and its metabolites were additive on

phytoplankton, while the interaction between diuron and its metabolites was shown to be synergistic. Recently, Cedergreen (2014) reviewed the main interactions resulting from different types of pollutants: metals, pesticides and antifouling agents, revealing that synergistic interaction often occurred with antifouling mixtures.

Following chronic exposure to many different chemicals, genetic variants resistant to certain types of molecules might arise in some species. It was demonstrated that PSII inhibitor resistance was mainly due to a mutation in the gene sequence coding for the D1 protein (Erickson et al., 1989; Oettmeier, 1999). However, according to the literature available, such mutations were not involved in resistance to irgarol (Eriksson et al., 2009). Cells resistant to contaminants arise randomly by rare spontaneous pre-selective mutation during replication (Costas et al., 2001; López-Rodas et al., 2001). In the case of environmental pollution, such mutants would allow a population to become resistant (López-Rodas et al., 2009; Carrera-Martinez et al., 2011; Romero-Lopez et al., 2012). In the particular case of diuron resistance, it has been demonstrated that diuron itself was not responsible for the first appearance of resistant cells (López-Rodas et al., 2001).

The microalgae used in this study were the chlorophyte *Tetraselmis suecica* and the diatom *Chaetoceros calcitrans*. In addition to their use in aquaculture, both of these species are encountered in the temperate coastal waters of the East Atlantic. The testing of species from two different phyla enabled us to cover a broader range of potential responses to pesticide exposure. Furthermore, two different strains of *T. suecica* were used in this study: (i) a “wild” strain and (ii) a diuron-resistant strain (Stachowski-Haberhorn et al., 2013).

In order to understand to what extent environmental contamination with herbicides can affect microalgal populations, this study aimed:

1. To evaluate the toxicity of diuron and irgarol separately and to explore the effects of binary mixtures, on four physiological endpoints, using two species of microalgae.
2. To identify the mutation responsible for diuron resistance in the mutant strain of *T. suecica*.
3. To investigate the effects on the mutant strain of irgarol and of binary mixtures of both herbicides.

To answer these questions, the impacts of irgarol and diuron (individually and in mixtures) were assessed on three strains of two marine phytoplankton species. The genetic basis of the resistance to diuron was investigated and effects of the herbicides were measured on four parameters. Growth, measured by doubling time (T<sub>D</sub>), is a parameter obviously related to the survival process in microalgae. Two other parameters related to the physiological status of the strains are expected to vary because of photosynthesis inhibition caused by diuron and irgarol: the photosynthetic efficiency (ϕ<sub>M</sub>) and the relative reactive oxygen species (ROS; FL1<sub>ROS</sub>) content. Since the two phytoplankton species are commonly used in aquaculture, the relative lipid content (FL1<sub>Lipids</sub>) was also measured, as it is related to the nutritive quality of the cells.

One major interest of the present study is that, to our knowledge, no ecotoxicological studies have yet established the effects of herbicide mixtures toward both wild and resistant strains of the same phytoplankton species.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemical/toxicant preparation

Irgarol (Irgarol Pestanal<sup>®</sup> ≥ 98.4%) and diuron (>98%) were purchased from Sigma Aldrich. Stock solutions of irgarol

(500 mg L<sup>-1</sup>) and diuron (500 mg L<sup>-1</sup>) were then prepared in pure methanol. These solutions were diluted, using sterile ultra-pure water to make working solutions of 0.02 mg L<sup>-1</sup> (0.004% methanol) and 0.06 mg L<sup>-1</sup> (0.012% methanol) for irgarol; and 0.1 mg L<sup>-1</sup> (0.02% methanol) and 1 mg L<sup>-1</sup> (0.2% methanol) for diuron.

## 2.2. Microalgal cultures

The marine microalgae *T. suecica* (CCMP 904) (“wild” strain: *T. wild*) and *C. calcitrans* (CCMP 1315) (“wild” strain: *C. wild*) were obtained from the Provasoli–Guillard National Center for Marine Algae and Microbiota (NCMA). A *T. suecica* strain resistant to diuron (diuron-resistant mutant: *T. mutant*) was obtained from wild strain CCMP 904 after experiments performed by Stachowski-Haberkorn et al. (2013).

Microalgal cultures were maintained in sterile f/2 and f/2-silica medium (Guillard and Ryther, 1962; Guillard, 1975) at 17 ± 1 °C, in a thermostatic chamber ST5+ (POL-EKO-Aparatura®, Poland) at 105 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (Quantometer Li-Cor Li-250 equipped with a spherical sensor), with a dark:light cycle of 8:16 h. Cultures were grown in 100 mL round borosilicate sterile glass flasks previously heated to 450 °C for 6 h and autoclaved 20 min at 121 °C.

For exposure experiments, cultures were grown in 60 mL sterile f/2 medium for *T. suecica* and f/2-Si medium for *C. calcitrans*: cultures were inoculated using stock cultures in exponential growth phase. The initial concentrations of cells were 20,000 cell mL<sup>-1</sup> for each species at the beginning of exposure.

## 2.3. Exposure experiments

Six-day exposure experiments were run. Preliminary experiments performed with each biocide separately showed that above 0.5 µg L<sup>-1</sup> irgarol or 5 µg L<sup>-1</sup> diuron, no algal growth was observed for at least one of the three strains. Each strain was therefore exposed to each biocide singly (irgarol: 0.05 (I0.05), 0.1 (I0.1) and 0.5 (I0.5) µg.L<sup>-1</sup>; diuron: 0.5 (D0.5), 1 (D1) and 5 (D5) µg.L<sup>-1</sup>) and to four binary mixtures of irgarol and diuron: M(D5+I0.5), M(D5+I0.1), M(D1+I0.5) and M(D1+I0.1). All concentrations are expressed as nominal concentrations. Only the two highest concentrations of each biocide were tested in the mixtures, as no effects were expected with the lowest concentrations. Two control treatments were included in the experiments. Control cultures (C) contained only microalgae and culture medium; solvent-control cultures (C<sub>S</sub>) contained microalgae, culture medium and the highest methanol concentration corresponding to either M(D5+I0.5) (0.0011% methanol) or diuron 5 µg L<sup>-1</sup> (0.001% methanol), which are more than 700 fold lower than the maximum methanol concentration recommended for algal bioassays (Abou-Waly, 2000). Five independent experiments were run in order to expose the three strains to all the treatments. Cultures were carried out in triplicate (exposed conditions) or in quadruplicate (control conditions). Every day, 500 µL of each culture were sampled to measure cell concentrations. On the last day (day 6), when control cultures reached the end of exponential growth, a further 1400 µL were sampled in each culture to assess the effects of exposures on different physiological endpoints: photosystem II effective quantum yield (1000 µL), relative intracellular ROS content (200 µL) and relative intracellular lipid content (200 µL).

## 2.4. Microalgal analysis using flow cytometry

Samples were run on an Accuri C6 flow cytometer (Becton Dickinson Accuri™) equipped with a blue (488 nm) and a red (640 nm) laser. Preliminary experiments made it possible to select the optimal protocol (staining duration and concentration) for each

fluorescent dye and species.

### 2.4.1. Doubling time measurement

In order to measure the cell density daily in each culture, 500 µL were sampled and fixed using glutaraldehyde (final concentration 0.25%). Tubes were mixed and left for 15 min at room temperature in the dark before analysis. Preliminary experiments made it possible to choose the parameters best suited to discriminate the species: cells of *T. suecica* strains were counted on a FL1 (green fluorescence, 530/30 nm) vs. FL4 (red fluorescence, 675/25 nm, chlorophyll-related) cytogram. Cells of *C. calcitrans* were counted on a SSC (Side Scatter) vs. FL3 (red fluorescence, > 670 nm) cytogram.

Observation of culture samples by microscopy confirmed that *C. calcitrans* did not produce chains of cells under these experimental conditions. Counts were available directly in the BD Accuri™ C6 software, including the analyzed volume.

For each culture, growth parameters were calculated as follows: the growth rate (µ, hours<sup>-1</sup>) was the slope of the regression line from the plot of Ln (cell.mL<sup>-1</sup>) on time (hours). The doubling time (T<sub>D</sub>, hours) was calculated as: T<sub>D</sub> = Ln(2)/µ.

### 2.4.2. Reactive oxygen species (ROS)

The fluorescent dye 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCFDA) was used to check for effects of irgarol, diuron and their mixtures on intracellular ROS production (Molecular probes, Eugene, OR, USA). H<sub>2</sub>DCFDA is a non-polar dye which can enter the cells: in presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ROO• or ONOO<sup>-</sup>, acetate groups are cleaved and oxidized by intracellular esterases, resulting in the conversion from non-fluorescent H<sub>2</sub>DCFDA to highly fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF). This fluorescent compound can be measured by green fluorescence (FL1, 530/30 nm). The following protocol was adapted from Stachowski-Haberkorn et al. (2013): a stock solution of 100 mM H<sub>2</sub>DCFDA in dimethyl sulfoxide (DMSO) was used to make a 2 mM working solution in phosphate-buffered saline (137 mM NaCl; 2.7 mM KCl, pH 7.4, 2% final DMSO concentration in the working solution). Preliminary experiments were carried out to determine the optimal H<sub>2</sub>DCFDA concentration and incubation time to use for *T. suecica* and *C. calcitrans* cultures, using cultures exposed to 1 mM or 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (final concentration as a positive control. In the present experiment, H<sub>2</sub>DCFDA was used at a final concentration of 80 µM (0.08% DMSO) in fresh 200 µL samples. Samples were incubated in the dark at room temperature for 30 min before analysis.

### 2.4.3. Relative intracellular lipid content

The relative intracellular lipid content was estimated by the use of a green lipophilic fluorochrome: 4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (BODIPY<sup>505/515</sup> Life Technologies®, Carlsbad, CA, USA). This fluorescent compound is accumulated in the intracellular lipid bodies (which are morphologically diverse) by a diffusion mechanism and subsequent trapping. This dye easily crosses cell and organelle membranes due to its high oil/water partition coefficient (Akimoto and Mimuro, 2007; Cooper et al., 2010). BODIPY<sup>505/515</sup> can be measured by green fluorescence (FL1, 530/30 nm). The following protocol was adapted from Brennan et al. (2012): a working solution of 12 µg L<sup>-1</sup> was prepared from a 5000 mg L<sup>-1</sup> stock solution in pure DMSO. BODIPY was used at 0.075 µg L<sup>-1</sup> final concentration (0.6% DMSO) for *C. calcitrans* and 0.12 µg L<sup>-1</sup> final concentration (1.0% DMSO) for *T. suecica* in fresh 200 µL samples. Before analysis, samples were incubated in the dark at room temperature for 6 and 5 min for *C. calcitrans* and *T. suecica*, respectively.

### 2.5. Photosystem II effective quantum yield

Photosystem II effective quantum yield (operational yield =  $\phi'_M$ ) was measured by Pulse Amplitude Modulated (PAM) fluorescence using an Aquapen-C AP-C 100 fluorometer (Photon system Instruments®, Drasov, Czech Republic). Measurements were made on 2 mL of diluted cultures (1:2 dilution in culture medium) in light adapted conditions (light intensity of the culture chamber). Three measurements were performed for each culture and a mean taken of these values.

### 2.6. D1 protein mRNA sequencing

Triplicate 50-mL cultures of *T\_wild* and *T\_mutant* were grown in control conditions for six days in order to extract total RNA. Cells were centrifuged at 4500 g for 10 min, washed in sterile f/2 medium and re-centrifuged prior to adding 1.5 mL Trizol (Ambion, Life Technologies). Total RNA was extracted according to the Trizol manufacturer's instructions. RNA concentrations were determined using an ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham MA, USA) at 260 nm. RNA integrity was assessed on an Agilent bioanalyzer using RNA 6000 Nano kits (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription was carried out with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Life Technologies), according to manufacturer's instructions, on 2  $\mu$ g total RNA. Primers (Table 1) were designed on the *T. suecica* D1 protein complete CDS (Genbank DQ173249) using Primer-BLAST NCBI tools. The protein was divided into two regions (A and B) in order to obtain PCR products between 500 and 600 bp. For each *T. suecica* strain and primer pair, PCR reactions were performed in triplicate using NEBNext High Fidelity 2X Master mix (New England Biolabs, Ipswich, MA USA) on 3  $\mu$ L cDNA with 25  $\mu$ M of primers. The thermal cycler was programmed, according to manufacturer's instructions, as follows: 98 °C for 30 s for initial denaturation; 15 cycles at 98 °C for 10 s, 65 °C for 30 s and 72 °C for 30 s; then 72 °C for 5 min for the final extension. PCR products were purified with USB ExoSAP-IT PCR Product Cleanup (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) and sequenced in a facility with a Sanger ABI 3730xl (Applied Biosystems, Life Technologies), using the primers in Table 1. Sequences were aligned with Clustal W implemented in MEGA 6 software (Tamura et al., 2013).

### 2.7. Statistical analysis

One-way ANOVAs were performed on each strain/chemical combination to check for significant differences in growth, yield, relative intracellular ROS level and lipid content between control and exposed cultures. A *p*-value < 0.05 was considered statistically significant. When significant differences were observed, a multiple range Newman–Keuls test was used to compare means. All statistical analyses were performed using Statistica (StatSoft, Inc., version 10).

## 3. Results

Neither methanol concentration showed a significant effect on the studied parameters (data not shown) compared with the control without solvent, whatever the species and strain. The results obtained for each species/strain are therefore presented without the solvent-controls. In Table 2, results are expressed as mean values ( $\pm$ standard-error, SE) of raw data. In all the figures, results are shown as the percentage of variation of exposed samples compared with the control without solvent (C).

**Table 1**  
Primers used for D1 protein coding sequence amplification end sequencing.

	Sequence (5'→3')	Product length (bp)
D1 A Fw	GCTAACTCAATGTGGGCTCG	498
D1 A Rv	ACCTAAAGGCATACCATCAGAGA	
D1 B Fw	ACCCAATCGGTCAAGGTTC	578
D1 B Rv	AGCGTTTACAGATGGAGCTTCT	

### 3.1. *C. calcitrans*

#### 3.1.1. Toxicity of single herbicides

Among the three concentrations of diuron tested, only the highest (D5) showed significant effects on the four parameters measured (Table 2), namely: doubling time  $T_D$ , photosynthetic efficiency  $\phi'_M$ , reactive oxygen species-related relative fluorescence  $FL1_{ROS}$  and lipid-related relative fluorescence  $FL1_{Lipids}$ . In the D5-exposed cultures, while  $T_D$  increased by  $21 \pm 2.2\%$  ( $p = 0.0002$ ) compared to the control, the three other parameters decreased (Fig. 1).

Like diuron, irgarol showed no significant effect at the two lowest concentrations (Table 2). At  $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$ , a significant increase of  $T_D$  was demonstrated ( $+52 \pm 3.1\%$ ,  $p = 0.0002$ ); significant decreases were noticed in  $\phi'_M$  and  $FL1_{ROS}$ , although no significant effect was found on  $FL1_{Lipids}$  (Table 2).

#### 3.1.2. Toxicity of herbicide mixtures

The four mixtures used in this study significantly affected *C. calcitrans* for at least one parameter out of the four measured (Table 2, Fig. 1). Indeed, while M(D1+I0.1) induced only a single significant decrease in  $FL1_{Lipids}$ , the three other mixtures had significant effects on all parameters. M(D5+I0.5) and M(D1+I0.5), induced greater effects on  $T_D$  and  $\phi'_M$  than M(D5+I0.1);  $T_D$  was increased by  $87 \pm 11\%$  ( $p = 0.0002$ ) and by  $56 \pm 2.2\%$  ( $p = 0.0003$ ) when the cultures were exposed to M(D5+I0.5) and M(D1+I0.5), respectively. The increase induced by M(D5+I0.1) was lower ( $+35 \pm 5.9\%$ ,  $p = 0.0021$ ). In the same way, these three mixtures caused significant decreases in  $\phi'_M$  from  $-26 \pm 0.8\%$  ( $p = 0.0002$ ), to  $-14 \pm 2.9\%$  ( $p = 0.0002$ ) (Fig. 1).  $FL1_{ROS}$  and  $FL1_{Lipids}$  were affected to nearly the same extent by the three mixtures, with decreases around 60% ( $p = 0.0002$  for all concentrations and both parameters).

### 3.2. *T. suecica*

#### 3.2.1. Wild strain

**3.2.1.1. Toxicity of single herbicides.** Among the three diuron concentrations tested, only the highest (D5) significantly affected all parameters, the greatest effect being on  $T_D$  ( $+125 \pm 24.3\%$ ,  $p = 0.0003$ ) (Table 2 and Fig. 2). At  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ , diuron induced a significant increase in  $FL1_{ROS}$  by  $10 \pm 4.2\%$  ( $p = 0.019$ ) and a significant decrease in  $FL1_{Lipids}$  by  $16 \pm 3.4\%$  ( $p = 0.028$ ), when no effect was detected on  $T_D$  or  $\phi'_M$ . At  $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$  diuron (Table 2), only a significant decrease in  $FL1_{Lipids}$  was demonstrated (Fig. 2).

After exposure to irgarol  $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$ , significant effects were shown on the four parameters (Table 2 and Fig. 2).  $T_D$  and  $FL1_{ROS}$  were increased ( $+19 \pm 2\%$  for  $T_D$ ,  $p = 0.0002$ ), while  $\phi'_M$  and  $FL1_{Lipids}$  were decreased (Fig. 2). With irgarol  $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$ , slight significant effects were noticed on  $\phi'_M$ , which was mildly stimulated, and  $FL1_{ROS}$ , which was lower than the control.

**3.2.1.2. Toxicity of herbicide mixtures.** Among the four mixtures tested in this study, three induced significant deleterious effects on all parameters measured (Table 2). The most concentrated mixture, M(D5+I0.5), led to a  $356 \pm 35\%$  ( $p = 0.0002$ ) increase in  $T_D$ , as well

**Table 2**

 Effects of diuron and irgarol, singly and in mixtures, on *C. calcitrans* and *T. suecica* after six-day exposures.

	Diuron ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )				Irgarol ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )				Mixtures						
	$T_D$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$\phi'_M$	FL1 <sub>ROS</sub> ( $10^3$ a.u.)	FL1 <sub>Lipids</sub> ( $10^3$ a.u.)	$T_D$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$\phi'_M$	FL1 <sub>ROS</sub> ( $10^3$ a.u.)	FL1 <sub>Lipids</sub> ( $10^3$ a.u.)	$T_D$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$\phi'_M$	FL1 <sub>ROS</sub> ( $10^3$ a.u.)	FL1 <sub>Lipids</sub> ( $10^3$ a.u.)			
<i>C_wild</i>	C	18.2 ± 0.1	0.74 ± 0.002	1.61 ± 0.05	371 ± 20	C	16.7 ± 0.1	0.74 ± 0.003	1.89 ± 0.17	420 ± 46	C	18.2 ± 0.1	0.74 ± 0.002	1.61 ± 0.05	371 ± 20
		a	a	a	a		a	a	a	a		a	a	a	a
	D0.5	18.3 ± 0.1	0.73 ± 0.013	1.63 ± 0.22	381 ± 103	10.05	16.9 ± 0.3	0.73 ± 0.004	1.36 ± 0.29	376 ± 38	M(D5+I0.5)	34.0 ± 2.0	0.55 ± 0.006	0.62 ± 0.01	142 ± 16
		a	a	a	a		a	a	ab	a		b	d	b	b
	D1	18.1 ± 0.1	0.73 ± 0.009	1.79 ± 0.23	468 ± 70	10.1	17.1 ± 0.2	0.73 ± 0.001	1.50 ± 0.31	322 ± 3	M(D5+I0.1)	24.5 ± 1.1	0.64 ± 0.02	0.64 ± 0.02	142 ± 9
	a	a	a	a		a	a	ab	a		d	b	b	b	
	D5	22.1 ± 0.4	0.68 ± 0.003	0.71 ± 0.02	133 ± 21	10.5	25.5 ± 0.5	0.6 ± 0.004	0.66 ± 0.01	328 ± 20	M(D1+I0.5)	28.5 ± 0.4	0.59 ± 0.004	0.64 ± 0.00	134 ± 12
		b	b	b	b		b	b	b		c	c	b	b	
											M(D1+I0.1)	18.6 ± 0.2	0.74 ± 0.002	1.66 ± 0.21	193 ± 24
												a	a	a	b
<i>T_wild</i>	C	24.4 ± 0.1	0.75 ± 0.004	16.60 ± 0.34	791 ± 24	C	27.3 ± 0.5	0.76 ± 0.004	17.70 ± 0.10	749 ± 32	C	27.3 ± 0.5	0.76 ± 0.004	17.70 ± 0.10	749 ± 32
		a	a	a	a		a	a	a	a		a	a	a	a
	D0.5	25.4 ± 0.4	0.73 ± 0.01	16.50 ± 0.12	687 ± 43	10.05	27.3 ± 0.2	0.78 ± 0.002	15.80 ± 0.42	726 ± 11	M(D5+I0.5)	124.2 ± 9.5	0.54 ± 0.009	34.50 ± 1.40	475 ± 19
		a	a	a	b		a	b	b	a		d	d	c	c
	D1	26.2 ± 0.5	0.72 ± 0.008	18.30 ± 0.70	662 ± 27	10.1	26.2 ± 0.2	0.77 ± 0.001	16.60 ± 0.53	763 ± 23	M(D5+I0.1)	68.1 ± 2.4	0.58 ± 0.004	31.70 ± 1.00	479 ± 25
	a	a	b	b		a	ab	ab	a		c	c	bc	c	
	D5	54.8 ± 5.9	0.56 ± 0.013	23.70 ± 0.30	493 ± 15	10.5	32.5 ± 0.5	0.75 ± 0.005	25.60 ± 0.82	594 ± 10	M(D1+I0.5)	49.3 ± 0.6	0.65 ± 0.004	29.40 ± 0.77	489 ± 6
		b	b	c	c		b	c	c		b	b	b	c	
											M(D1+I0.1)	28.8 ± 0.8	0.75 ± 0.003	19.60 ± 2.40	622 ± 40
												a	a	a	b
<i>T_mutant</i>	C	29.2 ± 0.3	0.76 ± 0.003	14.10 ± 0.53	885 ± 20	C	29.2 ± 0.3	0.76 ± 0.003	14.10 ± 0.53	885 ± 20	C	29.2 ± 0.3	0.76 ± 0.003	14.10 ± 0.53	885 ± 20
		a	a	a	a		a	a	a	a		a	a	a	a
	D0.5	29.2 ± 0.3	0.75 ± 0.004	14.50 ± 0.56	901 ± 17	10.05	28.8 ± 0.4	0.74 ± 0.005	14.60 ± 0.27	851 ± 26	M(D5+I0.5)	48.3 ± 2.0	0.65 ± 0.005	24.00 ± 1.10	738 ± 17
		a	ab	a	a		a	b	a	a		c	d	c	b
	D1	28.7 ± 1.0	0.75 ± 0.003	14.20 ± 0.29	928 ± 9	10.1	28.4 ± 0.3	0.75 ± 0.004	14.80 ± 0.26	873 ± 15	M(D5+I0.1)	29.1 ± 0.5	0.73 ± 0.007	15.40 ± 0.17	931 ± 23
	a	ab	a	a		a	a	a	a		a	b	a	a	
	D5	28.6 ± 0.1	0.74 ± 0.002	15.30 ± 0.41	884 ± 12	10.5	34.6 ± 1.0	0.70 ± 0.005	17.00 ± 0.71	751 ± 25	M(D1+I0.5)	37.4 ± 0.8	0.70 ± 0.004	18.80 ± 0.34	786 ± 41
		a	b	a	a		b	c	b		b	c	b	b	
											M(D1+I0.1)	28.6 ± 0.2	0.74 ± 0.002	14.60 ± 0.34	897 ± 10
												a	b	a	a

 All values are mean values ( $\pm$ standard-error, SE) of raw data.

 a, b, c, d indicate significant differences between treatments (ANOVA,  $p < 0.05$  followed by Newman–Keuls post-hoc test,  $p < 0.05$ ).

 $T_D$ : doubling time.

 $\phi'_M$ : photosystem II effective quantum yield.

 FL1<sub>ROS</sub>: intracellular ROS relative content.

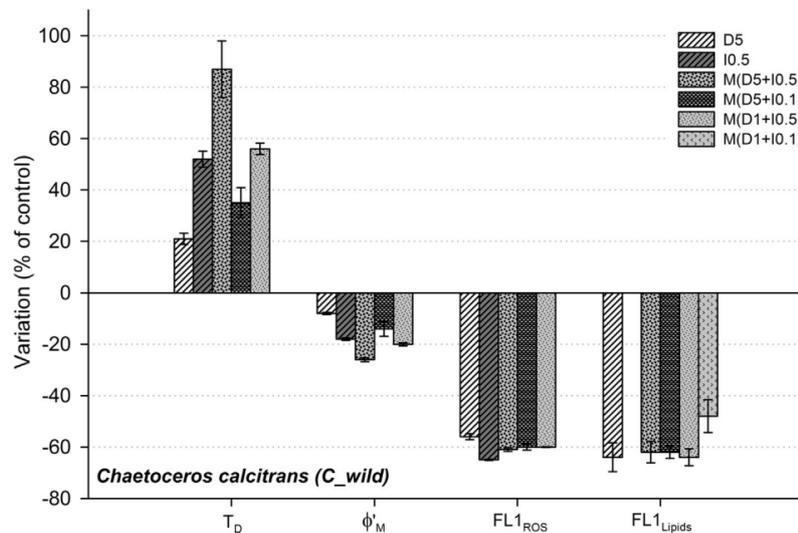
 FL1<sub>lipids</sub>: intracellular lipid relative content.

*C\_wild*: *C. calcitrans* wild strain.

*T\_wild*: *T. suecica* wild strain.

*T\_mutant*: *T. suecica* mutant strain.

C: Control treatment without solvent.



**Fig. 1.** Percentage variation of exposed samples of *C. calcitrans* (C\_wild) compared with the control treatment without solvent (C) for: doubling time (T<sub>D</sub>), photosynthetic efficiency (φ<sub>M</sub>), relative ROS content (FL1<sub>ROS</sub>) and relative lipid content (FL1<sub>Lipids</sub>); after exposure to diuron (D) and irgarol (I), alone and in mixtures (means ± SE). Only significant effects are shown (ANOVA, p < 0.05).

as a 95 ± 8% (p = 0.0002) increase in FL1<sub>ROS</sub> (Fig. 2). The φ<sub>M</sub> and FL1<sub>Lipids</sub> decreased significantly by 29 ± 1.2% (p = 0.0002) and 37 ± 2.6% (p = 0.0003), respectively.

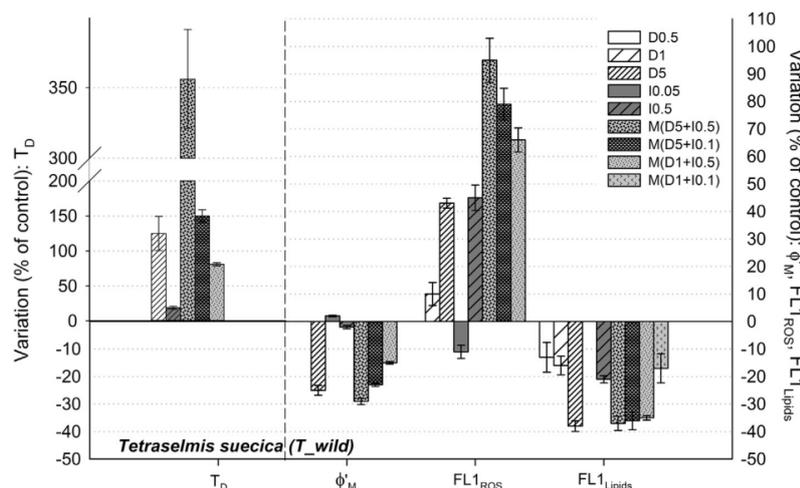
While the increase in T<sub>D</sub> was more than two-fold lower for M(D5+I0.1) (150 ± 8.9%, p = 0.0003) and four-fold lower for M(D1+I0.5) (81 ± 2.2%, p = 0.008), the effects on FL1<sub>Lipids</sub> remained at the same level as for M(D5+I0.5) (around -35%, p = 0.0003 for both) (Fig. 2). The toxicity gradient was also observed in φ<sub>M</sub> with a 23 ± 0.6% (p = 0.0002) decrease for M(D5+I0.1) and a 15 ± 0.5% (p = 0.0002) decrease for M(D1+I0.5), which was half the decrease observed for M(D5+I0.5). FL1<sub>ROS</sub> also showed the same toxicity gradient between mixtures, with 79 ± 5.8% (p = 0.0002) and

66 ± 4.4% (p = 0.0003) increases for M(D5+I0.1) and M(D1+I0.5), respectively.

Finally, the least toxic mixture, M(D1+I0.1), was only responsible for a slight but significant decrease in FL1<sub>Lipids</sub> (Fig. 2).

### 3.2.2. Diuron-resistant strain

**3.2.2.1. D1 protein mRNA sequencing.** The sequence alignment in the resistant strain revealed a mutation from G to A in the quinone binding domain (amplified with primer pair B) at position 661 of the CDS (Fig. 3A). This mutation corresponded to a change in the codons from GTA to ATA, leading to a switch in the amino acid sequence from Valine (V) to Isoleucine (I) at position 221 of the



**Fig. 2.** Percentage variation of exposed samples of *T. suecica* (T\_wild) compared with the control treatment without solvent (C) for: doubling time (T<sub>D</sub>), photosynthetic efficiency (φ<sub>M</sub>), relative ROS content (FL1<sub>ROS</sub>) and relative lipid content (FL1<sub>Lipids</sub>); after exposure to diuron (D) and irgarol (I), alone and in mixtures (means ± SE). Only significant effects are shown (ANOVA, p < 0.05).

protein (Fig. 3B). No other mutations were observed in the sequenced samples.

3.2.2.2. *Toxicity of single herbicides.* Diuron exposure did not show any significant effect on the mutant strain at the three concentrations tested (Table 2), except a slight decrease of  $\phi'_M$  at  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  (Fig. 4).

Irgarol exposure induced significant effects on the mutant strain, in particular at the highest concentration tested ( $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$ ):  $T_D$  and  $FL1_{ROS}$  increased significantly ( $+19 \pm 3.4\%$  for  $T_D$ ,  $p = 0.0002$ ), whereas  $\phi'_M$  and  $FL1_{Lipids}$  decreased significantly (Fig. 4). A slight but significant decrease of  $\phi'_M$  was obtained with the lowest concentration of irgarol ( $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$ ).

3.2.2.3. *Toxicity of herbicide mixtures.* The four mixtures tested did not impact the mutant strain in the same way. On the one hand, M(D5+I0.5) and M(D1+I0.5) significantly affected all parameters tested (Table 2). M(D5+I0.5) was the most toxic mixture, which induced an increase of  $T_D$  and  $FL1_{ROS}$  by  $66 \pm 6.7\%$  ( $p = 0.0002$ ) and  $70 \pm 7.9\%$  ( $p = 0.0002$ ), respectively, while  $\phi'_M$  and  $FL1_{Lipids}$  decreased (Fig. 4). In comparison, M(D1+I0.5) exposure resulted in lower toxicity, with an increase in  $T_D$  by  $28 \pm 2.8\%$  ( $p = 0.0002$ ).  $FL1_{ROS}$  and  $\phi'_M$  also indicated lower effects of M(D1+I0.5).

On the other hand, the two other mixtures did not cause strong deleterious effects on this strain, as the only significant effect was a slightly lower photosynthetic efficiency with M(D5+I0.1) and M(D1+I0.1) (Fig. 4). No significant effect was detected on growth,  $FL1_{ROS}$  or  $FL1_{Lipids}$  (Table 2) with these two mixtures.

## 4. Discussion

### 4.1. Herbicide toxicity towards the two wild strains

The two microalga species were not affected in the same way by the exposure to the herbicides. *C. calcitrans*, when exposed to irgarol  $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$ , showed an increase in  $T_D$  that was 2.5-fold higher than that for *T. suecica*, highlighting a higher sensitivity of the diatom to irgarol. This increase corresponded to a 144 h growth rate inhibition of  $34.3 \pm 1.3\%$  for *C. calcitrans* and  $16.1 \pm 1.4\%$  for *T. suecica* (data not shown), showing that for both species, 144 h  $EC_{50}$  would be higher than  $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$ . Exposure to diuron  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  resulted in a six-fold higher increase in  $T_D$  for *T. suecica* compared with the diatom, corresponding to 144 h growth rate inhibition of  $17.5 \pm 1.6\%$  for *C. calcitrans* and  $54.5 \pm 4.8\%$  for *T. suecica*, the latter being close to the  $EC_{50}$ . In comparison,  $EC_{50}$  based on 72 h growth rate for *Navicula sp* and *N. pyriformis* exposed to diuron were 7.8 and  $8 \mu\text{g L}^{-1}$  (Magnusson et al., 2008). Buma et al. (2009) determined irgarol  $EC_{50}$  (based on 72 h growth rate) from  $0.46 \pm 0.09$  to  $2.44 \pm 0.68 \mu\text{g L}^{-1}$  for four marine microalga species. Devilla et al. (2005) reported 72 h  $EC_{50}$  of  $0.25 \mu\text{g L}^{-1}$  irgarol and  $2.26 \mu\text{g L}^{-1}$  diuron on the growth of the microalga *E. huxleyi*, while 96 h  $EC_{50}$  of  $0.57 \mu\text{g L}^{-1}$  irgarol and  $5.9 \mu\text{g L}^{-1}$  diuron were measured on the growth of the diatom *Skeletonema costatum* (Bao et al., 2011). Our results are thus in agreement with the data available in the literature.

Diuron and irgarol both target photosystem II on which microalgae rely for photosynthesis to produce their organic matter and to divide. Photosynthesis inhibition consequently induces growth inhibition, as shown by these results. Furthermore, other side effects occur due to the action of such molecules on photosystem II.

A					
DQ173249	cds	603	AGGTGTTGCTGGTGTATTTGGTGGTTCATTATCTCAGCTATGCACGGTTCATTAGTAAC	662	
T_wild		57	.....	116	
T_wild		52	.....	111	
T_wild		59	.....	118	
T_wild		120	.....	179	
T_wild		120	.....	179	
T_wild		79	.....	138	
T_mutant		57	.....A.....	116	
T_mutant		55	.....A.....	114	
T_mutant		64	.....A.....	123	
T_mutant		119	.....A.....	178	
T_mutant		120	.....A.....	179	
T_mutant		120	.....A.....	179	
B					
DQ173249	cds	186	VFQAEHNILMHPFHMLGVAGVFGGSLFSAMHGSLVTSLSLIRETTENESANAGYKFGQEEE	245	
T_wild		3	.....-	61	
T_wild		25	.....	84	
T_wild		1	.....---	57	
T_wild		25	.....	84	
T_wild		3	.....	62	
T_wild		11	.....	70	
T_mutant		2	.....I.....	61	
T_mutant		24	.....I.....	83	
T_mutant		2	.....I.....	61	
T_mutant		25	.....I.....	84	
T_mutant		3	.....I.....	62	
T_mutant		25	.....I.....	84	

Fig. 3. Sequence alignments of the mRNA coding for the D1 protein in *T. suecica* wild and diuron-resistant strains. A: nucleotide sequences; B: translated protein sequences. Dots represent identities, dashes represent unidentified amino acids.

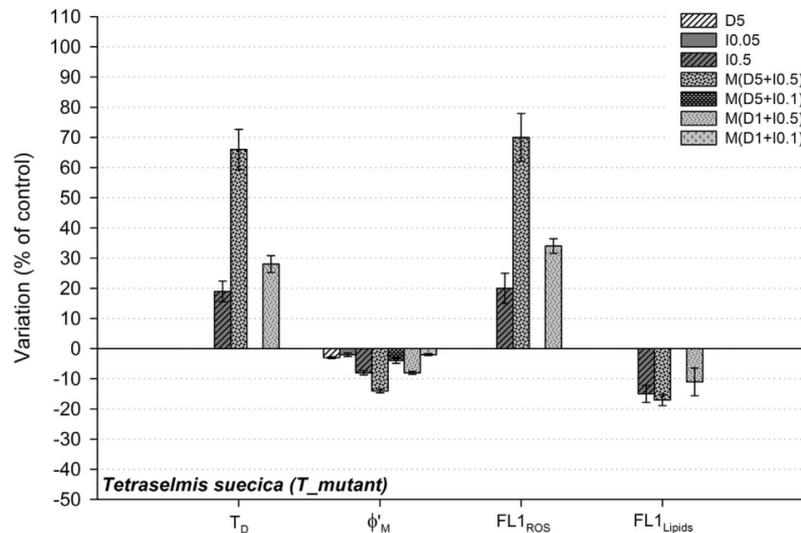


Fig. 4. Percentage variation of exposed samples of *T. suecica* (T<sub>mutant</sub>) compared with the control treatment without solvent (C) for: doubling time (T<sub>D</sub>), photosynthetic efficiency ( $\phi_M$ ), relative ROS content (FL1<sub>ROS</sub>) and relative lipid content (FL1<sub>Lipids</sub>); after exposure to diuron (D) and irgarol (I), alone and in mixtures (means  $\pm$  SE). Only significant effects are shown (ANOVA,  $p < 0.05$ ).

Harmful free radicals such as hydrogen peroxide are produced when the photochemical pathway is blocked (Fuerst and Norman, 1991; Oettmeier, 1992) as it could be by PSII inhibitors. The two molecules tested in the present study were thus particularly expected to induce oxidative stress in the exposed cells. When looking at ROS intracellular levels expressed by FL1<sub>ROS</sub> for each wild strain, the response induced on FL1<sub>ROS</sub> by either diuron or irgarol at the highest concentration ( $5 \mu\text{g L}^{-1}$  and  $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectively) was in the same range: a decrease of about 60% for the diatom and an increase of about 40% for the chlorophyte. Unlike *T. suecica*, in which FL1<sub>ROS</sub> was enhanced, indicating an increase of intracellular reactive oxygen species content, the significant decrease of about 60% observed in FL1<sub>ROS</sub> for the diatom indicates a decrease of intracellular ROS content. Preliminary experiments made it possible to validate the use of H<sub>2</sub>DCFDA with this species, using hydrogen peroxide (1 mM and 100  $\mu\text{M}$ ) as a positive control, and showing an increase in FL1<sub>ROS</sub> (data not shown). Diatoms possess an effective antioxidant system against photo-inhibition and photo-oxidation: it has been demonstrated that fucoxanthin, which is a major carotenoid pigment in diatoms (Pennington et al., 1988), has a very effective ROS scavenging activity (Sachindra et al., 2007; Xia et al., 2013). As a consequence, the decrease of ROS content observed with *C. calcitrans* in the present study could be due to the high ROS scavenging activity of fucoxanthin. Another hypothesis, which could be related to the last, is that the biocides trigger a ROS scavenging system involving enzymes such as SOD and CAT through their inhibition of photosynthesis. Thus, it would be interesting to quantify the fucoxanthin within diatom cells and measure enzymatic activities of SOD and CAT to test these hypotheses.

When herbicide exposure inhibits photosynthesis, ATP production is compromised, impairing biochemical pathways such as lipid synthesis. BODIPY<sup>505/515</sup> was used to measure the relative lipid content in microalgal cells. BODIPY<sup>505/515</sup> stains neutral lipids, which correspond to oil droplets that accumulate inside cells over time (Hu et al., 2008). *T. suecica* was affected at all diuron concentrations tested, even the lowest ( $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$  diuron). For *C. calcitrans*,

FL1<sub>Lipids</sub> decrease was two-fold greater than for the chlorophyte at the highest concentration ( $5 \mu\text{g L}^{-1}$  diuron), but no significant effects were observed at lower concentrations. These results indicate that diuron induced greater effects than irgarol on relative lipid content in both strains. It could be interesting to make further studies on this lipid decrease, to determine and quantify which lipid classes are impacted. This would provide information about the effects of such herbicides on the nutritive quality of these species, since they are commonly used in aquaculture.

Considering growth as the most integrative parameter, *C. calcitrans* appeared to be more sensitive to irgarol than *T. suecica*, which had a higher sensitivity to diuron. However, the concentrations used to assess diuron toxicity were ten-fold higher than the concentrations used to test irgarol, thus illustrating how irgarol has a higher absolute toxicity than diuron, whatever the microalgal species. Several studies already reported higher toxicity of irgarol toward microalgae in comparison with diuron (Devilla et al., 2005; Gatidou and Thomaidis, 2007). The higher toxicity of irgarol seems likely due to its higher affinity for the Q<sub>B</sub> niche and a higher toxicokinetic (Chesworth et al., 2004).

Regarding the effects on the coastal water microalgae *T. suecica* and the diatom *P. tricornutum*, Huertas et al. (2010) demonstrated that the chlorophyte *T. suecica* was more tolerant of simazine (a triazine) than the diatom. Another study found the triazine atrazine to be more toxic to the chlorophytes than to diatoms (Seguin et al., 2001). From the data available in literature, it is still unclear whether diatoms are more sensitive to triazine than other microalgae, since this sensitivity can vary depending on the herbicide (Suresh Kumar et al., 2014) and the diatom species (Larras et al., 2014). Moreover, following a study from Weiner et al. (2004), the sensitivity of microalgae could vary depending on the herbicide uptake, which is itself related to intrinsic properties of the species, like biovolume or surface area.

#### 4.2. Toxicity of single herbicides vs. mixtures in the two wild strains

The sensitivity of these species to the mixtures followed the

same trend as the single molecules. Although M(D5+I0.5) was the most toxic mixture for both species, the increase in doubling-time was four-fold higher for *T. suecica* than for *C. calcitrans*. When looking at the increase in doubling-time, it appeared that *T\_wild* was more sensitive to mixtures containing diuron  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ . On the contrary, *C. calcitrans* was more affected by mixtures containing irgarol  $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$ . These results corroborate the effects obtained with the single molecules. Impacts on  $\phi'_M$  were within the same range for both species and revealed a similar level of toxicity than  $T_D$  for M(D5+I0.5), M(D5+I0.1) and M(D1+I0.5). The decrease in FL1<sub>Lipids</sub> was almost two-fold higher for the diatom. An interesting pattern was obtained for FL1<sub>Lipids</sub> in both species, as the same decrease was caused by the three strongest mixtures (about 60% for the diatom and 35% for the chlorophyte). There might be a threshold beyond which FL1<sub>Lipids</sub> cannot decrease further, corresponding to the lowest concentration of oil droplets allowed by the cell and/or to the background fluorescence value obtained with BODIPY<sup>505/515</sup> for each species. As shown by the single-herbicide exposures, FL1<sub>ROS</sub> results were the opposite between the two species: a threshold was shown in the diatom responses, with the same decrease in FL1<sub>ROS</sub> for M(D5+I0.5), M(D5+I0.1) and M(D1+I0.5). In contrast, *T. suecica* showed an increasing gradient in the FL1<sub>ROS</sub> from M(D1+I0.5) (about 66%) to M(D5+I0.5) (almost 100%), thus indicating an enhanced ROS production in the exposed cells, which is consistent with the results observed on  $T_D$  and  $\phi'_M$ .

When comparing the toxicity of single herbicides and mixtures, M(D1+I0.5) was significantly more toxic than irgarol  $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$  to *T\_wild*. The only difference between these two treatments was the addition of  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  diuron to M(D1+I0.5), which itself was not harmful to the *T. suecica* wild strain. Finally, when M(D5+I0.5) toxicity was compared with added single-herbicide toxicities, it showed a higher toxicity on  $T_D$  than the two biocides together, while the impact on  $\phi'_M$ , FL1<sub>ROS</sub> and FL1<sub>Lipids</sub> remained nearly the same as for single-herbicide exposures. For the diatom *C. calcitrans*, M(D5+I0.5) was as toxic as the added toxicity of the two single biocides on  $T_D$  and  $\phi'_M$ .

When looking at the percentage of variation of doubling time in comparison with the control, the effects of M(D5+I0.5) and M(D1+I0.5) were stronger than a simple addition on the chlorophyte: the added effect of D5 ( $125 \pm 24.3\%$  increase in  $T_D$ ) and I0.5 ( $19 \pm 2\%$  increase in  $T_D$ ) should be around 144% increase in doubling time, when M(D5+I0.5) was responsible for a  $356 \pm 35\%$  increase. Similarly, the summed effects of D1 (no significant effects on  $T_D$ ) and I0.5 ( $19 \pm 2\%$  increase in  $T_D$ ) should be around 19%, while M(D1+I0.5) was responsible for a  $81 \pm 2.2\%$  increase. These results might thus indicate a possible synergistic interaction between these two herbicides, as already reported elsewhere (Fernández-Alba et al., 2002; Koutsaftis and Aoyama, 2006). However, the use of a Concentration Addition (CA) model (Loewe and Muischnek, 1926) is required to prove the additive or synergistic interaction between the two biocides.

Considering the set of parameters, the toxicity of mixtures and single herbicides that induced significant effects on these two species can be ranked as follows:

$$\begin{aligned} C\_wild: & M(D5+I0.5) > M(D1+I0.5) \approx I0.5 > M(D5+I0.1) > D5 \\ T\_wild: & M(D5+I0.5) > M(D5+I0.1) \approx D5 \geq M(D1+I0.5) > I0.5 \end{aligned}$$

When mixed together at the highest concentrations tested, these two herbicides show a higher toxicity than the sum of single toxicities for *T. suecica* and it is very likely that other molecules from the same family or with a similar mode of action would further increase the toxicity of such mixtures (Cedergreen, 2014).

#### 4.3. *psbA* gene mutation: resistance to diuron and comparison with the wild strain

The appearance of species or strains resistant or tolerant to xenobiotics is an increasing problem (López-Rodas et al., 2009; Marvá et al., 2010) and illustrates the selective pressure exerted by pollutants on organisms. For example, in cases of severe pollution in an aquatic environment, the selection pressure exerted will permit the survival of resistant variants among the natural phytoplankton community. However, the surviving community will have a reduced genetic diversity that may not be sufficient to deal with other ecosystem disturbances, such as those expected with climate change for example. In addition, resistance to a pollutant is usually accompanied by diminished primary production (Lardans et al., 1998) that could eventually impair the ecosystem productivity. Some microalga species show resistance to photosynthesis inhibitor herbicides: in the case of PSII inhibitors that specifically bind to D1 protein, the resistance was shown to be due to mutations in the *psbA* gene coding for this protein binding site (Galloway and Mets, 1984; Erickson et al., 1985, 1989). In the present study, the mutation found in the diuron-resistant strain of *T. suecica* was caused by a single nucleotide modification in the *psbA* sequence, and resulted in a change from V to I, as already reported (Erickson et al., 1985). The additional methyl group in Isoleucine could prevent the binding of diuron to the D1 protein by steric blockage (Wildner et al., 1990). This particular mutation was previously shown to confer a resistance to diuron in *Chlamydomonas reinhardtii* (Oettmeier, 1999). Some authors demonstrated that adaptation of microalgae to herbicides might be the result of pre-selective mutations (López-Rodas et al., 2001; Marvá et al., 2010).

In order to assess whether the mutation could affect strain response to another PSII inhibitor, both *T. suecica* strains were exposed to diuron and irgarol. Unlike *T\_wild*, which was heavily affected by diuron  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  exposure (125% increase in  $T_D$ ), *T\_mutant* was not affected by diuron, regardless of the concentration used. Even though exposure to irgarol  $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$  induced an increase of 19% of  $T_D$  in both *T\_wild* and *T\_mutant*, the effects on FL1<sub>ROS</sub> and FL1<sub>Lipids</sub> in *T\_mutant* were lower compared with *T\_wild*. The lower effects on ROS and lipids in *T\_mutant* might be a side-effect of the mutation. The triazine irgarol significantly impacted all studied parameters at the highest concentration in the mutant strain, implying that the mutation did not prevent its toxic action, i.e. it did not prevent irgarol from binding to the D1 protein. The two herbicides share the same mode of action, inhibiting electron transfer between  $Q_A$  to  $Q_B$  by reversely-binding on the  $Q_B$  binding site on the D1 protein (Tischer and Strotmann, 1977; Giardi and Pace, 2005). One reason why the mutation prevents diuron but not irgarol from binding to the D1 protein could be that the two molecules do not necessarily have the same toxicological behavior (Gramatica et al., 2001; Borgert et al., 2004) because they come from different chemical families (phenylureas for diuron and triazines for irgarol). Indeed, the two classes of compounds are structurally different, as demonstrated by Gramatica et al. (2001), and their binding niches therefore differ slightly (Geissbühler et al., 1975; Ohad et al., 1990).

Recently, tolerance to irgarol in marine periphyton was found to be based not on amino acid substitution, but rather on increased D1 degradation (Eriksson et al., 2009). This latter mechanism seems to be linked to the non-conserved amino acid region (PEST region) involved in regulating D1 protein degradation. In any case, in the present study, this region did not show any differences between the two *T. suecica* strains.

The effects of mixtures were also investigated to further examine the toxicity pattern obtained with the single molecules. As expected, the wild strain was a lot more sensitive to the mixtures

M(D5+I0.5) and M(D5+I0.1) than the mutant strain. Regarding the wild strain, M(D5+I0.5) induced an increase in  $T_D$  that was nearly six-fold the increase observed in the mutant strain. Although M(D5+I0.1) induced no significant effect on  $T_{mutant}$ , it was responsible for a 150% increase of doubling-time in the wild strain. Similar impacts were expected on the mutant strain after irgarol 0.5  $\mu\text{g L}^{-1}$ , M(D5+I0.5) and M(D1+I0.5) exposures, because they all contained the same concentration of irgarol. In fact, after M(D5+I0.5) exposure, the increase in  $T_D$  of  $T_{mutant}$  was three-fold higher than with irgarol 0.5  $\mu\text{g L}^{-1}$  alone. As observed to a higher extent in the wild strain, the strongest mixture resulted in amplified effects in the mutant strain as compared to single molecules. This implies that even if diuron alone was not toxic to the mutant strain, at 5  $\mu\text{g L}^{-1}$  it seemed to somehow increase the toxicity of irgarol 0.5  $\mu\text{g L}^{-1}$ . This might be the result of a synergistic effect between these two compounds, but further investigations would be needed to prove this, using a wider range of concentrations in order to apply the CA model. As reviewed by Cedergreen (2014), binary mixtures of PSII inhibitor antifouling agents were mostly responsible for additive or synergistic effects on autotrophic organisms. The present results indicate such synergy also probably occurs with resistant variants, confirming the existence of some interactions between these compounds that are not limited to the known mode of action. From the mutation revealed by sequencing, it is assumed that diuron cannot bind efficiently to the  $Q_B$  niche of the mutant strain. There could be chemical interactions between the two molecules: diuron might facilitate the binding of irgarol with its target. The mechanisms explaining such interactions between these PSII inhibitors remain to be demonstrated (Cedergreen, 2014).

To our knowledge, no other such experiments involving wild and mutant strains exposed to single herbicides and mixtures have yet been performed elsewhere.

On the one hand, the wild strain was obviously more sensitive to the mixtures containing 5  $\mu\text{g L}^{-1}$  diuron: M(D5+I0.5) and M(D5+I0.1). On the other hand, due to its resistance to diuron, the mutant strain was more sensitive to mixtures containing 0.5  $\mu\text{g L}^{-1}$  irgarol. Effects of mixtures and single herbicides can be ranked from the most toxic to the least toxic for the two strains as follows:

$$T_{wild}: M(D5+I0.5) > M(D5+I0.1) \approx D5 \geq M(D1+I0.5) > I0.5 \\ T_{mutant}: M(D5+I0.5) > M(D1+I0.5) \geq I0.5$$

This study demonstrates the great interest of comparing the responses of sensitive and resistant strains exposed to mixtures, in order to figure out what biochemical interactions could lead to an increased toxicity when substances are mixed, especially for resistant strains.

## 5. Conclusions

Significant effects were induced by exposure of two marine microalgal species to diuron 5  $\mu\text{g L}^{-1}$  and irgarol 0.5  $\mu\text{g L}^{-1}$ , showing the higher toxicity of irgarol, which was harmful at a tenth the concentration of diuron. Wild strains of *C. calcitrans* and *T. suecica* did not have the same sensitivity towards the molecules (alone or in mixtures), the first being more sensitive to irgarol 0.5  $\mu\text{g L}^{-1}$  and the second being more sensitive to diuron 5  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

The mutation identified as a single nucleotide change in the *psbA* sequence of a *T. suecica* strain that was resistant to diuron was effective against diuron alone, but failed to confer resistance against irgarol exposure. Thus, unlike the wild strain, the mutant strain was more sensitive to irgarol. In addition, the exposure of the mutant strain to the mixture containing irgarol 0.5  $\mu\text{g L}^{-1}$  and diuron 5  $\mu\text{g L}^{-1}$ , induced stronger effects on growth than irgarol

alone. This study, involving a comparison between a wild and a mutant strain of the species *T. suecica* exposed to two PSII inhibitors, highlighted the fact that: i) a particular mutation was not effective to induce resistance to two molecules from different chemical families; ii) a mutant strain, despite its resistance to one of the molecules tested, could also be subjected to probable additive/synergistic effects; iii) biochemical interactions took place inside the cells between the two molecules, which were, at least for diuron, not directly linked to its binding to  $Q_B$  niche.

This study provides new insights into understanding how pollution in aquatic environment can affect unicellular primary producers, by comparing effects of single-herbicide and mixture exposure towards different species, including a mutant strain resistant to diuron. In addition to the identification of the mutation, further investigations on exposure of this mutant strain to pollutants (gene expression and, epigenetic mechanisms) would help us to improve understanding of the mechanisms of microalgal adaptation to chronic contamination.

## Acknowledgments

This study was carried out with financial support from the French National Research Agency (ANR) as part of the Investments for the Future program, within the Cluster of Excellence COTE (ANR-10-LABX-45). We also want to thank Julien Rouxel for his technical assistance and Hansy Haberkorn for his helpful discussions and suggestions during preparation of the manuscript. We thank Helen McCombie for the English correction. We also thank four anonymous reviewers for their comments, which helped us to improve the quality of this manuscript.

## References

- Abou-Waly, H.F., 2000. Effect of organic solvents on growth of freshwater algae. *Int. J. Environ. Stud.* 57, 411. <http://dx.doi.org/10.1080/00207230008711285>.
- Akimoto, S., Mimuro, M., 2007. Application of time-resolved polarization fluorescence spectroscopy in the Femtosecond range to photosynthetic systems. *Photochem. Photobiol.* 83, 163–170. <http://dx.doi.org/10.1562/2006-02-28-IR-825>.
- Auby, I., Maurer, D., 2004. Étude de la reproduction de l'huître creuse dans le Bassin d'Arcachon. rapport final, p. 327.
- Bao, V.W.W., Leung, K.M.Y., Qiu, J.W., Lam, M.H.W., 2011. Acute toxicity of five commonly used antifouling booster biocides to selected subtropical and cosmopolitan marine species. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 1147–1151. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.02.041>.
- Basheer, C., Tan, K.S., Lee, H.K., 2002. Organotin and Irgarol-1051 contamination in Singapore coastal waters. *Mar. Pollut. Bull.* 44, 697–703. [http://dx.doi.org/10.1016/S0025-326X\(01\)00330-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0025-326X(01)00330-7).
- Borgert, C.J., Quill, T.F., McCarty, L.S., Mason, A.M., 2004. Can mode of action predict mixture toxicity for risk assessment? *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 201, 85–96. <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2004.05.005>.
- Brennan, L., Blanco Fernández, A., Mostaert, A.S., Owende, P., 2012. Enhancement of BODIPY 505/515 lipid fluorescence method for applications in biofuel-directed microalgae production. *J. Microbiol. Methods* 90, 137–143. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2012.03.020>.
- Buma, A.G.J., Sjollem, S.B., van de Poll, W.H., Klamer, H.J.C., Bakker, J.F., 2009. Impact of the antifouling agent Irgarol 1051 on marine phytoplankton species. *J. Sea Res.* 61, 133–139. <http://dx.doi.org/10.1016/j.seares.2008.11.007>.
- Caquet, T., Roucaute, M., Mazzella, N., Delmas, F., Madigou, C., Farcy, E., Burgeot, T., Allenou, J.P., Gabellec, R., 2013. Risk assessment of herbicides and booster biocides along estuarine continuums in the Bay of Vilaine area (Brittany, France). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 651–666. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-012-1171-y>.
- Carrera-Martinez, D., Mateos-Sanz, A., Lopez-Rodas, V., Costas, E., 2011. Adaptation of microalgae to a gradient of continuous petroleum contamination. *Aquat. Toxicol.* 101, 342–350. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.11.009>.
- Cedergreen, N., 2014. Quantifying synergy: a systematic review of mixture toxicity studies within environmental toxicology. *PLoS One* 9. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0096580>.
- Chesworth, J.C., Donkin, M.E., Brown, M.T., 2004. The interactive effects of the antifouling herbicides Irgarol 1051 and Diuron on the seagrass *Zostera marina* (L.). *Aquat. Toxicol.* 66, 293–305. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.10.002>.
- Cooper, M.S., Hardin, W.R., Petersen, T.W., Cattolico, R.A., 2010. Visualizing “green oil” in live algal cells. *J. Biosci. Bioeng.* 109, 198–201. <http://dx.doi.org/10.1016>

- j.jbiosc.2009.08.004.
- Costas, E., Carrillo, E., Ferrero, L.M., Agrelo, M., Garcia-Villada, L., Juste, J., López-Rodas, V., 2001. Mutation of algae from sensitivity to resistance against environmental selective agents: the ecological genetics of Dictyosphaerium chloroeloides (Chlorophyceae) under lethal doses of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1, 1-dimethylurea herbicide. *Phycologia* 40, 391–398. <http://dx.doi.org/10.2216/10031-8884-40-5-391.1>.
- Cozić, V., Durand, G., 2013. Mission d'étude pour réduire les impacts du carénage sur le milieu marin, p. 76. Rapport phase 2 : Evaluer les équipements existants (cales et aires de carénage avec systèmes de traitement).
- Devilla, R.A., Brown, M.T., Donkin, M., Tarran, G.A., Aiken, J., Readman, J.W., 2005. Impact of antifouling booster biocides on single microalgal species and on a natural marine phytoplankton community. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 286, 1–12. <http://dx.doi.org/10.3354/meps286001>.
- Erickson, J.M., Rahire, M., Rochaix, J.D., Mets, L., 1985. Herbicide resistance and cross-resistance: changes at three distinct sites in the herbicide-binding protein. *Science* 228, 204–207. <http://dx.doi.org/10.1126/science.228.4696.204>.
- Erickson, J.M., Pfister, K., Rahire, M., Togaşaki, R.K., Mets, L., Rochaix, J.D., 1989. Molecular and biophysical analysis of herbicide-resistant mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*: structure-function relationship of the photosystem II D1 polypeptide. *Plant Cell* 1, 361–371. <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.1.3.361>.
- Eriksson, K.M., Clarke, A.K., Franzen, L.G., Kylenstierna, M., Martinez, K., Blanck, H., 2009. Community-level analysis of psbA gene sequences and irgarol tolerance in marine periphyton. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 897–906. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01830-08>.
- Fernández-Alba, A.R., Piedra, L., Mezcua, M., Hernando, M.D., 2002. Toxicity of single and mixed contaminants in seawater measured with acute toxicity bioassays. *ScientificWorldJournal* 2, 1115–1120. <http://dx.doi.org/10.1100/tsw.2002.221>.
- Fuerst, E.P., Norman, M.A., 1991. Interactions of herbicides with photosynthetic electron transport. *Weed Sci.* 458–464.
- Galloway, R.E., Mets, L.J., 1984. Atrazine, Bromacil, and diuron resistance in *Chlamydomonas*. *Plant Physiol.* 74, 469–474.
- Gatidou, G., Thomaidis, N.S., 2007. Evaluation of single and joint toxic effects of two antifouling biocides, their main metabolites and copper using phytoplankton bioassays. *Aquat. Toxicol.* 85, 184–191. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.09.002>.
- Geissbühler, H., Martin, H., Voss, G., 1975. The substituted ureas. In: Kearney, P.C., Kaufman, D.D. (Eds.), *Herbicides: Chemistry, Degradation, and Mode of Action*, vol. 1. Marcel Dekker, New York, pp. 209–291.
- Giardi, M.T., Pace, E., 2005. Photosynthetic proteins for technological applications. *Trends Biotechnol.* 23, 257–263. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tbttech.2005.03.003>.
- Gramatica, P., Vighi, M., Consolario, F., Todeschini, R., Finizio, A., Faust, M., 2001. QSAR approach for the selection of congeneric compounds with a similar toxicological mode of action. *Chemosphere* 42, 873–883. [http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535\(00\)00180-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535(00)00180-6).
- Guillard, R.R.L., Ryther, J.H., 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.* 8, 229–239. <http://dx.doi.org/10.1139/m62-029>.
- Guillard, R.R.L., 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith, W., Chanley, M. (Eds.), *Culture of Marine Invertebrate Animals* SE - 3. Springer, US, pp. 29–60. [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4615-8714-9\\_3](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4615-8714-9_3).
- Holmes, G., 2012. Diuron and the Great Barrier Reef – a Review of the Latest Science.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A., 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J.* 54, 621–639. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3113.2008.03492.x>.
- Huertas, I.E., Rouco, M., López-Rodas, V., Costas, E., 2010. Estimating the capability of different phytoplankton groups to adapt to contamination: herbicides will affect phytoplankton species differently. *New Phytol.* 188, 478–487. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03370.x>.
- Jones, R.J., Kerswell, A.P., 2003. Phytotoxicity of Photosystem II (PSII) herbicides to coral. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 261, 149–159. <http://dx.doi.org/10.3354/meps261149>.
- Koutsafits, A., Aoyama, I., 2006. The interactive effects of binary mixtures of three antifouling biocides and three heavy metals against the marine algae *Chaetoceros gracilis*. *Environ. Toxicol.* 21, 432–439. <http://dx.doi.org/10.1002/tox.20202>.
- Lardans, A., Förster, B., Prásil, O., Falkowski, P.G., Sobolev, V., Edelman, M., Osmond, C.B., Gillham, N.W., Boynton, J.E., 1998. Biophysical, biochemical, and physiological characterization of *Chlamydomonas reinhardtii* mutants with amino acid substitutions at the Ala251 residue in the D1 protein that result in varying levels of photosynthetic competence. *J. Biol. Chem.* 273, 11082–11091. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.273.18.11082>.
- Larras, F., Montuelle, B., Bouchez, A., 2013. Assessment of toxicity thresholds in aquatic environments: does benthic growth of diatoms affect their exposure and sensitivity to herbicides? *Sci. Total Environ.* 463–464, 469–477. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.06.063>.
- Larras, F., Keck, F., Montuelle, B., Rimet, F., Bouchez, A., 2014. Linking diatom sensitivity to herbicides to phylogeny: a step forward for biomonitoring? *Environ. Sci. Technol.* 48, 1921–1930. <http://dx.doi.org/10.1021/es4045105>.
- Lewis, S.E., Brodie, J.E., Bainbridge, Z.T., Rohde, K.W., Davis, A.M., Masters, B.L., Mughan, M., Devlin, M.J., Mueller, J.F., Schaffelke, B., 2009. Herbicides: a new threat to the great barrier reef. *Environ. Pollut.* 157, 2470–2484. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2009.03.006>.
- Loewe, S., Mutschnek, H., 1926. Combined effects I Announcement-Implemento to the problem. *Naunyn. Schmiedeberg's. Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 114, 313–326.
- Loos, R., Gawlik, B.M., Locoro, G., Rimaviciute, E., Contini, S., Bidoglio, G., 2009. EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters. *Environ. Pollut.* 157, 561–568. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2008.09.020>.
- Loos, R., Locoro, G., Comero, S., Contini, S., Schwesig, D., Werres, F., Balsaa, P., Gans, O., Weiss, S., Blaha, L., Bolchi, M., Gawlik, B.M., 2010. Pan-European survey on the occurrence of selected polar organic persistent pollutants in ground water. *Water Res.* 44, 4115–4126. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2010.05.032>.
- López-Rodas, V., Agrelo, M., Carrillo, E., Ferrero, L., Larrauri, A., Martín-Otero, L., Costas, E., 2001. Resistance of microalgae to modern water contaminants as the result of rare spontaneous mutations. *Eur. J. Phycol.* 36, 179–190. <http://dx.doi.org/10.1080/09670260110001735328>.
- López-Rodas, V., Carrera-Martínez, D., Salgado, E., Mateos-Sanz, A., Báez, J.C., Costas, E., 2009. A fascinating example of microalgal adaptation to extreme crude oil contamination in a natural spill in Arroyo Minerero, Río Negro, Argentina. *An. la Real Acad. Nac. Farm* 75, 883–889.
- Magnusson, M., Heimann, K., Negri, A.P., 2008. Comparative effects of herbicides on photosynthesis and growth of tropical estuarine microalgae. *Mar. Pollut. Bull.* 56, 1545–1552. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.05.023>.
- Magnusson, M., Heimann, K., Quayle, P., Negri, A.P., 2010. Additive toxicity of herbicide mixtures and comparative sensitivity of tropical benthic microalgae. *Mar. Pollut. Bull.* 60, 1978–1987. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.07.031>.
- Manzo, S., Buono, S., Cremsini, C., 2006. Toxic effects of Irgarol and Diuron on sea urchin *Paracentrotus lividus* early development, fertilization, and offspring quality. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51, 61–68. <http://dx.doi.org/10.1007/s00244-004-0167-0>.
- Marv, F., López-Rodas, V., Rouco, M., Navarro, M., Toro, F.J., Costas, E., Flores-Moya, A., 2010. Adaptation of green microalgae to the herbicides simazine and diquat as result of pre-selective mutations. *Aquat. Toxicol.* 96, 130–134. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.10.009>.
- Munaron, D., Tapie, N., Budzinski, H., Andral, B., Gonzalez, J.L., 2012. Pharmaceuticals, alkylphenols and pesticides in Mediterranean coastal waters: results from a pilot survey using passive samplers. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 114, 82–92. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eccs.2011.09.009>.
- Nimbal, C.I., Yerkes, C.N., Weston, L.A., Weller, S.C., 1996. Herbicidal activity and site of action of the natural product Sorgoleone. *Pestic. Biochem. Physiol.* 54, 73–83. <http://dx.doi.org/10.1006/pest.1996.0011>.
- Nyström, B., Becker-Van Slooten, K., Bérard, A., Grandjean, D., Druart, J.C., Leboulangier, C., 2002. Toxic effects of Irgarol 1051 on phytoplankton and macrophytes in Lake Geneva. *Water Res.* 36, 2020–2028. [http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00404-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00404-3).
- Oettmeier, W., 1992. Chapter 9-Herbicides of photosystem (II). In: Barber, J. (Ed.), *The Photosystems, Topics in Photosynthesis*. Elsevier, Amsterdam, pp. 349–408. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-89440-3.50018-7>.
- Oettmeier, W., 1999. Herbicide resistance and supersensitivity in photosystem II. *Cell. Mol. Life Sci.* 5, 1255–1277. <http://dx.doi.org/10.1007/s00180050370>.
- Ohad, N., Dekel, A.-S., Hiroyuki, K., Yorino, I., Itzhak, O., Joseph, H., 1990. Amino acid substitutions in the D1 protein of photosystem ii affect QB-stabilization and accelerate turnover of D1. *Z. für Naturforsch. C*. <http://dx.doi.org/10.1515/znc-1990-0515>.
- Pennington, F., Guillard, R.R.L., Liaaen-Jensen, S., 1988. Carotenoid distribution patterns in Bacillariophyceae (Diatoms). *Biochem. Syst. Ecol.* 16, 589–592. [http://dx.doi.org/10.1016/0305-1978\(88\)90067-1](http://dx.doi.org/10.1016/0305-1978(88)90067-1).
- Readman, J.W., Kwong, L.L.W., Grondin, D., Bartocci, J., Villeneuve, J.P., Mee, L.D., 1993. Coastal water contamination from a triazine herbicide used in antifouling paints. *Environ. Sci. Technol.* 27, 1940–1942. <http://dx.doi.org/10.1021/es00046a027>.
- Romero-Lopez, J., Lopez-Rodas, V., Costas, E., 2012. Estimating the capability of microalgae to physiological acclimatization and genetic adaptation to petroleum and diesel oil contamination. *Aquat. Toxicol.* 124–125, 227–237. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.08.001>.
- Sachindra, N.M., Sato, E., Maeda, H., Hosokawa, M., Niwano, Y., Kohno, M., Miyashita, K., 2007. Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of marine carotenoid fucoxanthin and its metabolites. *J. Agric. Food Chem.* 55, 8516–8522. <http://dx.doi.org/10.1021/jf071848a>.
- Seguin, F., Leboulangier, C., Rimet, F., Druart, J.C., Bérard, A., 2001. Effects of atrazine and nicosulfuron on phytoplankton in systems of increasing complexity. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 40, 198–208. <http://dx.doi.org/10.1007/s002440010164>.
- Stachowski-Haberhorn, S., Jérôme, M., Rouxel, J., Khelifi, C., Rincé, M., Bargeot, T., 2013. Multigenerational exposure of the microalga *Tetraselmis suecica* to diuron leads to spontaneous long-term strain adaptation. *Aquat. Toxicol.* 140–141, 380–388. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.06.016>.
- Suresh Kumar, K., Dahms, H.U., Lee, J.S., Kim, H.C., Lee, W.C., Shin, K.H., 2014. Algal photosynthetic responses to toxic metals and herbicides assessed by chlorophyll a fluorescence. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 104, 51–71. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.01.042>.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mst197>.
- Thomas, K.V., Fileman, T.W., Readman, J.W., Waldock, M.J., 2001. Antifouling paint booster biocides in the UK coastal environment and potential risks of biological

- effects. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 677–688. [http://dx.doi.org/10.1016/S0025-326X\(00\)00216-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0025-326X(00)00216-2).
- Tischer, W., Strotmann, H., 1977. Relationship between inhibitor binding by chloroplasts and inhibition of photosynthetic electron transport. *Biochim. Biophys. Acta* 460, 113–125. [http://dx.doi.org/10.1016/0005-2728\(77\)90157-8](http://dx.doi.org/10.1016/0005-2728(77)90157-8).
- Weiner, J.A., DeLorenzo, M.E., Fulton, M.H., 2004. Relationship between uptake capacity and differential toxicity of the herbicide atrazine in selected microalgal species. *Aquat. Toxicol.* 68, 121–128. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.03.004>.
- Wildner, G.F., Heisterkamp, U., Trebst, A., 1990. Herbicide cross-resistance and mutations of the *psbA* gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Zeitschrift für Naturforsch. Sect. C J. Biosci. Naturforsch. C* 45, 1142–1150.
- Xia, S., Wang, K., Wan, L., Li, A., Hu, Q., Zhang, C., 2013. Production, characterization, and antioxidant activity of fucoxanthin from the marine diatom *Odontella aurita*. *Mar. Drugs* 11, 2667–2681. <http://dx.doi.org/10.3390/md11072667>.

## Synthèse

Le but de cette étude était d'observer la toxicité induite par le diuron et l'irgarol, seuls et en mélanges, sur la croissance, le rendement quantique du photosystème II ( $\Phi'_M$ ) et le contenu relatif en ERO (FL1<sub>ROS</sub>) et lipides (FL1<sub>Lipids</sub>) chez les microalgues marines *T. suecica*, dont une souche résistante au diuron, et *C. calcitrans*.

Seules les plus fortes concentrations testées, 5,00  $\mu\text{g L}^{-1}$  (D5) pour le diuron et 0,50 (I0,5)  $\mu\text{g L}^{-1}$  pour l'irgarol, ont induit des effets significatifs sur le temps de doublement ( $T_D$ ) pour les deux espèces de microalgues : +21% et +52% pour *C. calcitrans* (*C\_wild*) et +125% et +19% pour la souche sauvage de *T. suecica* (*T\_wild*), respectivement. Conformément à ce qui était attendu, aucun effet du diuron n'a été observé pour la souche mutante de *T. suecica* (*T\_mutant*), en revanche, l'irgarol a induit une inhibition de croissance similaire à celle observée pour la souche sauvage (+19% sur le  $T_D$ ). Il semblerait donc que la chlorophyte *T. suecica* soit davantage sensible au diuron (phénylurée) alors que la diatomée *C. calcitrans* est davantage sensible à l'irgarol (S-triazine). Cependant, les concentrations d'irgarol testées dans cette étude étaient dix fois moins importantes que celles testées pour le diuron, démontrant ainsi la toxicité supérieure de l'irgarol par rapport au diuron. Cette différence de toxicité pourrait s'expliquer par une affinité supérieure de l'irgarol pour le site de fixation de la quinone  $Q_B$  au niveau de la protéine D1 du PSII, et/ou une cinétique de toxicité supérieure (Chesworth *et al.*, 2004).

Les effets des deux biocides sur la croissance des microalgues peuvent être expliqués en partie par une diminution de l'efficacité photosynthétique induite par les deux substances, conformément à leur mode d'action. L'analyse du contenu relatif en ERO et lipides par cytométrie a permis de corroborer en partie les résultats obtenus sur l'efficacité photosynthétique. D'une part, l'inhibition du transfert d'électrons au niveau du PSII induit par les deux biocides implique le blocage de la voie photochimique de conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique. Ce blocage est susceptible d'induire une accumulation d'ERO pouvant endommager les constituants cellulaires (Fuerst et Norman, 1991 ; Oettmeier, 1992). Dans cette étude, une augmentation significative de la fluorescence des cellules marquées au H<sub>2</sub>DCFDA (fluorochrome utilisé pour suivre certaines ERO) a pu être observée après exposition de *T. suecica* aux conditions D5 (pour *T\_wild* seulement) et I0,5. D'autre part, l'inhibition de la photosynthèse implique également une réduction de la production d'ATP, ainsi que de certains précurseurs utilisés par la voie de synthèse des lipides. En conséquence, une diminution de la fluorescence des cellules marquées au BODIPY<sup>505/515</sup> (fluorochrome utilisé pour le suivi des lipides neutres de réserve) a pu être observée pour les deux espèces de microalgues, parfois même à des concentrations n'ayant induit aucun effet sur la croissance.

Des résultats inattendus ont été observés avec les quatre combinaisons testées. De manière similaire à ce qui avait pu être observé avec les molécules seules, *T. suecica* était davantage sensible aux mélanges contenant 5,00  $\mu\text{g L}^{-1}$  de diuron, alors que *C. calcitrans* était davantage sensible aux mélanges contenant 0,50  $\mu\text{g L}^{-1}$  d'irgarol. Concernant les effets des mélanges sur les différents paramètres suivis, des tendances semblables à celles observées pour les substances testées seules ont été mis en évidence. Toutefois, dans certains cas, l'effet du mélange était bien supérieur à celui des deux substances seules additionnées : par exemple, l'effet induit par le mélange D5+I0,5 sur le  $T_D$  pour *T\_wild* (+356%) était bien supérieur à l'effet additionné des deux substances seules (+125% pour D5, +19% pour I0,5). Bien que ces résultats semblent corroborer les résultats d'autres études où une interaction synergique a pu être observée avec un mélange diuron+irgarol (Fernandez-Alba *et al.*, 2002 ; Koutsaftis et Aoyama, 2006), nous ne pouvons ici que supposer cette interaction synergique. En effet, le design expérimental utilisé dans cette étude, ainsi que le traitement des données qui en découle ne permet pas d'apprécier correctement l'interaction entre les deux molécules. Comme souligné dans la discussion de l'article, une comparaison entre la toxicité observée expérimentalement avec celle prédite par un modèle de référence, comme le modèle concentration addition (Loewe et Muischnek, 1926), est requise pour tirer de telles conclusions.

Enfin, le séquençage réalisé dans cette étude a également permis de mettre en évidence une mutation au niveau de la séquence codante du gène *psbA*, codant pour la protéine D1 du PSII chez *T\_mutant*. Cette mutation avait été précédemment décrite (Erickson *et al.*, 1985) et pourrait être la cause de la résistance de cette souche au diuron (Oettmeier, 1999). De manière surprenante, cette mutation ne confère aucune résistance à l'irgarol alors que ce dernier cible également la protéine D1. De plus, au même titre que ce qui a pu être observé avec la souche sauvage, le mélange D5+I0,5 était trois fois plus toxique que l'irgarol à 0,50  $\mu\text{g L}^{-1}$  testé seul. Ainsi, il semblerait que, bien que cette souche soit résistante à 5  $\mu\text{g L}^{-1}$  de diuron, la présence conjointe du diuron et de l'irgarol accroît la toxicité de ce dernier.

Cette étude a permis de démontrer l'importance de mesurer les effets des polluants sur la physiologie des microalgues, en plus des effets observés sur la croissance. L'étude des effets combinés du diuron et de l'irgarol a également permis de mettre en évidence l'interaction potentiellement synergique de ces deux substances, aussi bien chez la souche sauvage que chez la souche mutante de *T. suecica*. Une étude approfondie des effets d'interaction apparaît donc nécessaire pour évaluer précisément la toxicité combinée des substances *antifouling*. Ces travaux préliminaires d'avant-thèse, mais publiés en première année de thèse, ont donc apporté une base pour orienter les travaux présentés dans ce manuscrit sur l'étude approfondie des mélanges, en complément de l'étude des mélanges plus complexes issus de l'environnement.

### 3. Article 2 : Effets combinés de biocides antifouling sur la croissance de trois espèces de microalgues marines

#### Introduction

Les microalgues marines vivant dans les eaux côtières peuvent être la cible de biocides *antifouling* utilisés dans les peintures de bateau et les infrastructures portuaires. Le diuron et l'irgarol ont longtemps été utilisés comme biocides « *booster* » pour renforcer l'effet toxique du cuivre, celui-ci servant de base à la grande majorité des peintures anti-salissures. Cependant, le diuron (règlement (UE) n° 528/2012) et l'irgarol (décision d'exécution (UE) n° 2016/107) ont récemment été interdits en Europe du fait de leur toxicité avérée pour les organismes aquatiques (Cresswell *et al.*, 2006 ; Magnusson *et al.*, 2008 ; Buma *et al.*, 2009). Parmi les autres substances biocides encore autorisées, deux molécules organométalliques, le zinc pyrithione (ZnPT) et le cuivre pyrithione (CuPT) ont été sélectionnées pour cette étude : ces deux substances semblent être relativement toxiques pour le phytoplancton marin, de plus, plusieurs publications ont précédemment pointé du doigt la potentielle synergie résultant du mélange entre le ZnPT et le cuivre (Koutsaftis et Aoyama, 2006 ; Bao *et al.*, 2008, 2011).

Dans la partie précédente, une interaction potentiellement synergique entre le diuron et l'irgarol a été mise en évidence chez deux souches de la microalgue *T. suecica*, dont une résistante au diuron. Cependant, le design expérimental choisi ne permettait pas de modéliser correctement la réponse des mélanges testés, et de fait, l'interaction synergique observée ne pouvait être que supposée. Pour pallier cela, des mélanges binaires composés des cinq biocides *antifouling* sélectionnés ont été testés selon un design expérimental adapté à l'étude des effets d'interaction d'une combinaison binaire : le *ray-design* (Gessner, 1995 ; White *et al.*, 2004).

Ce design expérimental nécessitant de tester un grand nombre de conditions expérimentales, les tests de toxicité ont été réalisés en microplaques et seuls les effets sur la croissance ont été mesurés, celle-ci étant suivie par mesure de la fluorescence de la chlorophylle.

La toxicité et l'effet d'interaction résultant des mélanges diuron+irgarol, ZnPT+CuPT, diuron+Cu, irgarol+Cu, diuron+ZnPT et Cu+ZnPT a donc été évaluée sur la croissance de trois espèces de microalgues marines, *T. lutea*, *S. marinoi* et *T. suecica*, après 96 h d'exposition en microplaques. Des analyses chimiques ont également été réalisées dans le but de suivre la concentration des substances testées dans les puits des microplaques.



Contents lists available at ScienceDirect

Chemosphere

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/chemosphere](http://www.elsevier.com/locate/chemosphere)



## Combined effects of antifouling biocides on the growth of three marine microalgal species



Valentin Dupraz<sup>a, b, \*</sup>, Sabine Stachowski-Haberkorn<sup>a</sup>, Dominique Ménard<sup>a</sup>, Gwendolina Limon<sup>c</sup>, Farida Akcha<sup>a</sup>, Hélène Budzinski<sup>d, e</sup>, Nina Cedergreen<sup>f</sup>

<sup>a</sup> Ifremer, Laboratoire d'Écotoxicologie, rue de l'île d'Yeu, BP 21105, F-44311, Nantes Cedex 03, France

<sup>b</sup> Université de Nantes, UFR Sciences et Techniques, 2, rue de la Houssinière, BP 92208, 44322, Nantes Cedex 03, France

<sup>c</sup> LABOCEA, Unité R&D, 120 Avenue de Rochon, 29280, Plouzané, France

<sup>d</sup> Université de Bordeaux, UMR 5805, EPOC, Laboratoire de Physico Toxico Chimie de l'environnement, 351 Cours de la Libération, CS 10004, F-33405, Talence Cedex, France

<sup>e</sup> CNRS, UMR 5805, EPOC, Laboratoire de Physico Toxico Chimie de l'environnement, 351 Cours de la Libération, CS 10004, F-33405, Talence Cedex, France

<sup>f</sup> Department of Plant and Environmental Sciences, University of Copenhagen, Frederiksberg, Denmark

### HIGHLIGHT

- The toxicity of antifouling binary mixtures was tested on three microalgae species.
- Both methods used to predict interactive effects of mixtures gave similar results.
- Mixtures of similarly acting chemicals were close to the CA model predictions.
- Mixture of ZnPT and Cu induced strong synergism on *Tetraselmis suecica*.
- Transchelation of ZnPT into CuPT in presence of Cu<sup>2+</sup> was demonstrated.

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 27 February 2018

Received in revised form

18 June 2018

Accepted 22 June 2018

Available online 26 June 2018

Handling Editor: Jian-Ying Hu

#### Keywords:

Diuron

Irgarol

Pyrithione

Copper

Microbial ecotoxicology

Mixture model

### ABSTRACT

The toxicity of the antifouling compounds diuron, irgarol, zinc pyrithione (ZnPT), copper pyrithione (CuPT) and copper was tested on the three marine microalgae *Tisochrysis lutea*, *Skeletonema marinoi* and *Tetraselmis suecica*. Toxicity tests based on the inhibition of growth rate after 96-h exposure were run using microplates. Chemical analyses were performed to validate the exposure concentrations and the stability of the compounds under test conditions.

Single chemicals exhibited varying toxicity depending on the species, irgarol being the most toxic chemical and Cu the least toxic. Selected binary mixtures were tested and the resulting interactions were analyzed using two distinct concentration-response surface models: one using the concentration addition (CA) model as reference and two deviating isobole models implemented in R software; the other implementing concentration-response surface models in Excel<sup>®</sup>, using both CA and independent action (IA) models as reference and three deviating models. Most mixtures of chemicals sharing the same mode of action (MoA) were correctly predicted by the CA model. For mixtures of dissimilarly acting chemicals, neither of the reference models provided better predictions than the other. Mixture of ZnPT together with Cu induced a strong synergistic effect on *T. suecica* while strong antagonism was observed on the two other species. The synergy was due to the transchelation of ZnPT into CuPT in the presence of Cu, CuPT being 14-fold more toxic than ZnPT for this species. The two modelling approaches are compared and the differences observed among the interaction patterns resulting from the mixtures are discussed.

© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Diuron (1-(3,4 dichlorophenyl)-3,3 dimethyl urea), irgarol (2-methylthio-4-tertbutylamino-6-cyclopropylamino-s-triazine), Zinc Pyrithione and Copper Pyrithione (ZnPT/CuPT, bis(2-

\* Corresponding author. Ifremer, Laboratoire d'Écotoxicologie, rue de l'île d'Yeu, BP 21105, F-44311, Nantes Cedex 03, France.

E-mail address: [valentin.dupraz@ifremer.fr](mailto:valentin.dupraz@ifremer.fr) (V. Dupraz).

pyridylthio)zinc/copper 1,1'-dioxide) are among the proposed chemicals to be used as “booster” biocides in Cu-based antifouling paints (Konstantinou and Albanis, 2004). These biocides are usually used alone, in combination with Cu, although two can co-occur in some paint formulations (Environment Agency, 1998). Leaching of these substances to the environment occurs directly from both the ship hull (Readman et al., 1993; Takahashi, 2009) and the discarded antifouling paint particles (Turner et al., 2008; Turner, 2010; Hasan et al., 2014), especially during maintenance and cleaning (Links et al., 2006).

Recently, the use of diuron (Regulation (EU) No 528/2012) and irgarol (Regulation (EU) No 2016/107) as biocides has been prohibited in Europe because of their high toxicity towards aquatic life and both have been included in the list of “48 priority pollutants to be monitored in European waters” in the Water Framework Directive (2000/60/EC and 2013/39/EU). Nonetheless, diuron and irgarol are still found in European fresh and coastal waters. Concentrations up to 0.27  $\mu\text{g L}^{-1}$  diuron and 0.19  $\mu\text{g L}^{-1}$  irgarol were reported by Caquet et al. (2013) in Vilaine Bay (Brittany, France) and even higher concentrations up to 2.60  $\mu\text{g L}^{-1}$  diuron and 0.82  $\mu\text{g L}^{-1}$  irgarol were reported in careening areas of several French ports (Cozic and Durand, 2013). Diuron (phenylurea) and irgarol (S-triazine) both act as photosystem II (PSII) inhibitors by competing with the quinone  $Q_B$  on its binding site located in the D1 protein, thus preventing electron transfer between  $Q_A$  and  $Q_B$  and inhibiting Hill's reaction (Nimbal et al., 1996; Jones and Kerswell, 2003). Several studies reported the high toxicity of these compounds towards microalgae: Koutsaftis and Aoyama (2006) determined 72-h inhibitory concentrations (IC50) of 36.0 and 1.10  $\mu\text{g L}^{-1}$  on the growth of the diatom *Chaetoceros gracilis* for diuron and irgarol, respectively. Bao et al. (2011) reported 96-h EC50 values for diuron and irgarol of 5.90 and 0.57  $\mu\text{g L}^{-1}$ , and 4.30 and 0.39  $\mu\text{g L}^{-1}$  on the growth of the marine microalgae *Skeletonema costatum* and *Thalassiosira pseudonana*, respectively.

On contrary to diuron and irgarol, very little is known about the occurrence of the two organometals ZnPT and CuPT in the environment. Indeed, literature about pyriothione concentrations in water is very scarce: to our knowledge, only one study reported the occurrence of pyriothione (PT, Hydroxy-2(1H)-pyridinethione) in the marine environment, at a concentration of  $13.4 \pm 0.60 \mu\text{g L}^{-1}$  measured by cathodic stripping voltammetry in a marina from Mersey estuary (United Kingdom) (Mackie et al., 2004). ZnPT and CuPT usually co-occur in the marine environment as they are both present in antifouling paints, and because ZnPT easily transchelates into CuPT in presence of Cu (Thomas, 1999; Maraldo and Dahllöf, 2004; Grunnet and Dahllöf, 2005). ZnPT has long been used for its bactericidal and fungicidal activity, especially in antidandruff shampoos (Yebrá et al., 2004), and has been proposed as one of the most relevant compounds to replace TBT in antifouling paints during the past decade (Doose et al., 2004). It is assumed to act by disrupting cell membrane integrity and inhibiting ATP synthesis and membrane transport (Chandler and Segel, 1978; Dinning et al., 1998b, 1998a). No study specifically evaluated the mode of action (MoA) of CuPT, though it is reasonable to think that it shares the same mechanism as ZnPT. Regarding their toxicity on microalgae, Yamada (2006) reported 72-h EC50 of 2.10 and 28.4  $\mu\text{g L}^{-1}$  on the growth of *S. costatum*, and 28.0 and 35.0  $\mu\text{g L}^{-1}$  on the growth of *Selenastrum capricornutum*, for ZnPT and CuPT, respectively. In another study on *S. costatum*, the 72-h EC50 were 1.60 and 1.50  $\mu\text{g L}^{-1}$  for ZnPT and CuPT (Onduka et al., 2010), while Devilla et al. (2005) determined a 72-h EC50 of 0.54  $\mu\text{g L}^{-1}$  for ZnPT on the growth of the microalga *Emiliania huxleyi*.

Concerning copper, since its bioavailable form is the dissolved ionic form  $\text{Cu}^{2+}$ , the abbreviation Cu will refer to  $\text{Cu}^{2+}$  ions throughout this article. Most antifouling paints contain copper in

the form of copper(I) oxide (or cuprous oxide,  $\text{Cu}_2\text{O}$ ), or more rarely copper(I)thiocyanate (or cuprous thiocyanate,  $\text{CuSCN}$ ). Once in seawater,  $\text{Cu}_2\text{O}$  and  $\text{CuSCN}$  are oxidized in  $\text{Cu}^{2+}$  (Vetere et al., 1997). As a result, marinas, coastal and estuarine waters are often contaminated by elevated concentrations of Cu in sediments and surface waters. Average dissolved Cu concentrations of 8.50 and 11.2  $\mu\text{g L}^{-1}$  have been reported in marinas of the San Diego region (USA) (Schiff et al., 2007) and beach waters in Acapulco (Mexico) (Jonathan et al., 2011), respectively. Cu is an essential component in many metabolic processes in microalgae, however, concentrations above the optimum level can become toxic (Baron et al., 1995). Toxic MoA of Cu is thought to inhibit electron transport by damaging acceptor and donor sides of the PSII (Patsikka et al., 1998), hence decreasing the photosynthetic efficiency (El Berdey et al., 2000). Regarding its toxicity towards microalgae, a 96-h EC50 of 970  $\mu\text{g L}^{-1}$  was reported by Bao et al. (2008) on the growth of the microalgae *Thalassiosira pseudonana*, while Koutsaftis and Aoyama (2006) determined a 72-h IC50 of 1200  $\mu\text{g L}^{-1}$  on the growth of *Chaetoceros gracilis*.

Numerous studies have shown the importance of studying mixtures of chemicals, as it is more environmentally relevant and because chemicals in mixtures can exhibit higher toxicity than they would alone (Fernandez-Alba et al., 2002; Franklin et al., 2002; Cedergreen et al., 2006; Koutsaftis and Aoyama, 2006). Cedergreen (2014) reported that approximately 5% of the tested pesticide mixtures exhibit larger effects than predicted, while for antifouling mixtures it was approximately 26% of the tested mixtures. Two main reference models are used to predict the toxicity of mixtures. The most frequently used is the concentration addition (CA) model, also referred as Loewe additivity (Loewe and Muischnek, 1926), which is based on the assumption that chemicals sharing the same molecular target can thus be considered as dilutions of each other. On the contrary, the independent action (IA) model considers that chemicals acting on independent targets can result in a binary response: either affected or non-affected. Hence, the probability of surviving a mixture following IA is equal to the product of the probabilities of surviving each of the chemicals individually. Several other models (Hewlett, 1969; Vølund, 1992; Jonker et al., 2005) describe types of deviations from these two reference models, being either synergistic (greater effect than predicted), antagonistic (smaller effect than predicted) or a mixture of the two.

Phytoplankton is responsible for over half of the global annual primary production on earth (Beardall and Raven, 2016) and occupies a key role in the oceanic food web. As many phytoplankton species are living in marinas and harbor areas, they are exposed to cocktails of chemicals, especially antifouling biocides. In this study, binary mixtures of antifouling biocides (including Cu) were tested on three marine microalgal species: the haptophyte *Tisochrysis lutea*, the diatom *Skeletonema marinoi* and the chlorophyte *Tetraselmis suecica*.

To evaluate the extent to which the combined toxicity of antifouling biocides together with Cu can harm marine microalgae, the goals of this study were: i) to determine the toxicity of diuron, irgarol, ZnPT, CuPT and Cu on the three species of microalgae; and ii) to evaluate and compare the interaction patterns of six chosen binary mixtures through two different modelling approaches testing deviations from the CA and IA models.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemical/toxicant preparation

Diuron, irgarol<sup>®</sup>, (PESTANAL<sup>®</sup>, analytical standard), Zinc Pyriothione (ZnPT) and copper(II) sulfate pentahydrate ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\geq 98\%$ ) were purchased from Sigma-Aldrich. Copper Pyriothione (CuPT) was

purchased from Santa Cruz Biotechnology. Internal standards diuron-d6 and irgarol-d9 were purchased from Cluzeau Info Labo (Sainte Foy la Grande, France). Stock solutions of irgarol (0.57 g L<sup>-1</sup>), diuron (1.04 g L<sup>-1</sup>), ZnPT (0.51 g L<sup>-1</sup>) and CuPT (0.49 g L<sup>-1</sup>) were prepared in pure DMSO (≥ 99%) and stock solution of CuSO<sub>4</sub> (3.20 g L<sup>-1</sup>) was prepared in sterile ultra-pure water. All stock solutions were analyzed to ensure their concentrations (2.4; Table 2 and supplementary data Table S3). Stock solutions were diluted to make working solutions; in pure DMSO for irgarol, diuron, ZnPT and CuPT; in sterile ultra-pure water for CuSO<sub>4</sub>.

## 2.2. Microalgal cultures

The marine microalga *Tisochrysis lutea* (*T. lutea*) CCAP 927/14 was purchased from the Culture Center of Algae and Protozoa (CCAP, Oban, Scotland). The marine diatom *Skeletonema marinoi* (*S. marinoi*) AC174, was purchased from the University of Caen Algobank (Caen, France). The marine microalgae *Tetraselmis suecica* (*T. suecica*) CCMP 904 was obtained from the Provasoli–Guillard National Center for Marine Algae and Microbiota (NCMA). Microalgal cultures were maintained in sterile f/2 (*T. lutea* and *T. suecica*) and f/2-Silica (*S. marinoi*) mediums (Guillard and Ryther, 1962; Guillard, 1975) at 20 ± 1 °C, in a thermostatic chamber at 130 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (Quantometer Li-Cor Li-250 equipped with a spherical sensor), with a dark:light cycle of 8:16 h. Cultures were grown in 100 mL round borosilicate sterile glass flasks previously heated to 450 °C for 6 h and autoclaved 20 min at 121 °C and then filled with 50 mL of sterile culture medium. Cultures were diluted weekly in order to maintain an exponential growth phase.

## 2.3. Exposure experiments

### 2.3.1. Concentration-response experiments

Concentration-response experiments were performed for each chemical/mixture to calculate the EC50, meaning the Effective Concentration inducing a 50% inhibition on growth rate after a 96-h exposure. Toxicity assays were run in sterile 48-well transparent polystyrene microplates (Greiner Bio-One GmbH, cat. 677102, untreated), each well being filled with 0.9 mL of sterile f/2 or f/2-Si culture medium and 0.1 mL of microalgal culture. Microplates were covered with their own lid, allowing gas exchanges. Peripheral wells were not used in order to avoid edge effect (Caux et al., 1992; St-Laurent et al., 1992); instead, they were filled with sterile 0.2-μm filtered ultra-pure water to prevent evaporation and maintain high humidity. One assay test was conducted per tested substance/mixture. Each assay consisted in the exposure to six concentrations (supplementary data: Fig. S1, Table S1) in triplicates and six solvent-control (SC) containing the highest solvent

percentage used in the microplate (0.1% of DMSO). Specific growth rates for control with and without solvent are displayed in supplementary data (Table S2). Chemicals and solvent (for solvent-control condition) were spiked in separate sterile glass flasks (one glass flask per tested chemical and concentration) containing 25 mL of sterile culture medium prior to distribution in the triplicate wells of the microplate. After measurement of the cell density by flow cytometry (Accuri C6, Becton Dickinson Accuri™), 0.1 mL of the diluted microalgal culture was added in each assay well to reach a concentration of 20,000 cell mL<sup>-1</sup> at the beginning of exposure. The final volume of each well was 1.0 mL.

For binary mixture experiments, the approach of concentration-response surfaces was chosen (Gessner, 1995; White et al., 2004). This design provides data for the full range of possible combinations between two chemicals, which is data-demanding but remains the most elaborate and informative approach to evaluate the joint toxicity of two chemicals in binary mixture (Cedergreen et al., 2013). For being able to perform these experiments, the EC50 of the single chemicals, which are prerequisite, have been determined in preliminary experiments (Table 1; Fig. 1). Concentration-response experiments were then carried out for single chemicals (considered as mixture ratios 100:0% and 0:100%) and mixtures at three perceived effective concentration ratios of 75:25%, 50:50% and 25:75%, using six concentrations in triplicates and six-solvent controls, as described above. As all possible combinations could not be investigated, six selected binary mixtures were tested using the previously mentioned design: diuron + irgarol; ZnPT + CuPT; diuron + Cu; irgarol + Cu; diuron + ZnPT and Cu + ZnPT.

### 2.3.2. Chemical stability assays

The chemical stability of the biocides selected in this study was investigated in the microplate wells over time, during 24 or 96 h (Table 2 and supplementary data: Table S3). To that aim, an abiotic microplate assay was run for each chemical tested, under the same conditions as the concentration-response experiments (2.3.1). In order to specifically investigate the potential transchelation of ZnPT into CuPT, the microplate assays were run using a mixture of ZnPT and Cu at concentrations for which transchelation was suspected to happen. It is noteworthy that regarding the first results we obtained, transchelation was also assessed in biotic conditions using *T. suecica*. For each condition, 1- to 5-mL of the spiked culture medium were taken off the wells into separate vials at the beginning of the assay, and after 6 and 96 h for diuron and irgarol, after 24 and 96 h for ZnPT, CuPT and the mixture of ZnPT with Cu (with and without algae), and after 24 h for Cu. The vials were then stored at -20 °C before chemical analysis.

**Table 1**

Summary of the toxicity results obtained for the three species of microalgae exposed to the five single chemicals. For each chemical/species, the slope *b* (± standard-error, s.e.) and the EC50 (with 95% confidence interval) were calculated based on the 96-h growth rate using a three-parameter log-logistic regression model (Eq. (1); Fig. 1) with R 'drc' package.

Chemical	Mode of action	<i>Tisochrysis lutea</i>		<i>Skeletonema marinoi</i>		<i>Tetraselmis suecica</i>	
		Slope ( <i>b</i> )	EC50 μg L <sup>-1</sup> (± 95% CI)	Slope ( <i>b</i> )	EC50 μg L <sup>-1</sup> (± 95% CI)	Slope ( <i>b</i> )	EC50 μg L <sup>-1</sup> (± 95% CI)
diuron	PSII inhibitor	1.86 ± 0.13	3.73 ± 0.35	3.01 ± 0.25	10.3 ± 0.80	1.62 ± 0.03	4.20 ± 0.12
irgarol		1.35 ± 0.12	0.34 ± 0.05	2.98 ± 0.15	0.85 ± 0.03	1.96 ± 0.10	0.62 ± 0.04
ZnPT	Membrane disruption	10.7 ± 0.66	1.25 ± 0.07	6.72 ± 0.59	1.98 ± 0.05	3.75 ± 0.87	256 ± 18.1
CuPT		10.3 ± 0.60	1.21 ± 0.04	10.5 ± 0.64	1.16 ± 0.02	6.71 ± 2.40	18.0 ± 1.46
Cu	Multiple targets	5.16 ± 0.67	703 ± 28.8	11.2 ± 2.60	1105 ± 48.3	6.11 ± 0.57	1449 ± 45.6

**Table 2**

Measured concentrations of ZnPT and CuPT following varying conditions in the microplate wells (with and without microalgae) at 0, 24 and 96 h. Concentrations are given both in  $\mu\text{g L}^{-1}$  (left) and nM (right), as the latter is needed to evaluate the stoichiometry of chemical transformations. Note that for each condition,  $5.00 \mu\text{g L}^{-1}$  of  $\text{Zn}^{2+}$  and  $2.50 \mu\text{g L}^{-1}$  of  $\text{Cu}^{2+}$  are included as necessary micronutrients in the f/2 culture medium.

Measured concentrations in microplates wells ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )						Measured concentrations in microplate wells (nM)					
Condition	Chemical	Nominal	t0	t24	t96	Condition	Chemical	Nominal	t0	t24	t96
ZnPT	ZnPT	10.2	6.50	2.40	< LOQ	ZnPT	ZnPT	32.0	20.5	7.60	< LOQ
	CuPT	0.00	5.80	2.30	< LOQ		CuPT	0.00	18.3	7.20	< LOQ
	Zn	5.00					Zn	76.5			
	Cu	2.50					Cu	39.3			
CuPT	ZnPT	0.00	< LOQ	1.90	< LOQ	CuPT	ZnPT	0.00	< LOQ	5.90	< LOQ
	CuPT	9.40	13.7	2.00	< LOQ		CuPT	29.9	43.4	6.50	< LOQ
	Zn	5.00					Zn	76.5			
	Cu	2.50					Cu	39.3			
ZnPT + Cu	ZnPT	15.2	9.60	11.2	< LOQ	ZnPT + Cu	ZnPT	47.9	30.3	35.2	< LOQ
	CuPT	0.00	27.7	17.7	< LOQ		CuPT	0.00	87.8	56.0	< LOQ
	Zn	5.00					Zn	76.5			
	Cu	41.5					Cu	653			
ZnPT + Cu + <i>T. suecica</i>	ZnPT	15.2	9.50	1.50	< LOQ	ZnPT + Cu + <i>T. suecica</i>	ZnPT	47.9	29.8	4.80	< LOQ
	CuPT	0.00	27.6	2.40	< LOQ		CuPT	0.00	87.2	7.70	< LOQ
	Zn	5.00					Zn	76.5			
	Cu	41.5					Cu	653			

## 2.4. Chemical analyses

### 2.4.1. Diuron and irgarol

Classical methods were used to quantify diuron and irgarol and the global protocol was adapted from Coquillé et al. (2018). Each abiotic sample (2.3.2) was diluted in ultra-pure water to reach a theoretical final concentration of  $100 \text{ ng L}^{-1}$  and  $40 \mu\text{L}$  of the diluted samples were directly analyzed by liquid chromatography (1290 Infinity system, Agilent Technologies, USA) coupled to tandem mass spectrometer (6460 triple quadrupole LC/MS system, Agilent Technologies, USA), after adding internal standards (diuron-d6, irgarol-d9). The separation was performed using a Kinetex C18 column and using a gradient of  $5.00 \text{ mM}$  ammonium acetate with  $0.1\%$  acetic acid in ultra-pure water and pure methanol as mobile phases, with a flow rate of  $0.50 \text{ mL min}^{-1}$ . Analyses were performed in multiple reaction monitoring mode (supplementary data: Table S4). The LOQ was  $1.19 \text{ ng L}^{-1}$  for diuron and  $0.24 \text{ ng L}^{-1}$  for irgarol.

### 2.4.2. Copper

A classical method was adapted from Garbarino and Taylor (1996) to quantify Cu. Each abiotic sample (2.3.2) was diluted 50 times in ultra-pure water containing  $0.2\%$   $\text{HNO}_3$ . Dissolved Cu concentrations in samples were determined on a X series II ICP-MS (Thermo Fisher Scientific®). An internal solution, containing In and Rh was added to the samples to correct signal drifts. The LOQ for Cu was  $0.73 \mu\text{g L}^{-1}$ . The accuracy and the precision of the method were evaluated using the NIST 2976 (National Institute of Standard and Technology) and SLRS-5 (National Research Council of Canada (CNRC)) certified reference materials. Measured concentrations of Cu agreed with recommended values to within  $\pm 5\%$ .

### 2.4.3. ZnPT and CuPT

Prior to extraction, the samples containing ZnPT, CuPT or the mixture of ZnPT and Cu (with and without algae; 2.3.2) were centrifuged during 1 min at  $3000 \text{ g}$ . After half dilution with water containing the internal standard,  $1000 \mu\text{L}$  supernatant of the samples were directly injected and extracted using an on-line solid-phase extraction system Waters (Milford, Massachusetts, USA) XBridge® C8 Direct Connect cartridges with elution during the chromatography mobile phase. Separation was achieved by ultra-performance liquid chromatography (Acquity® HClass, Waters), using a Waters Acquity® UPLC BEH C18 column ( $50 \times 2.1 \text{ mm}$ ;

$1.7 \mu\text{m}$ ) and an elution gradient consisting of ammonium acetate  $20.0 \text{ mM}$ /methanol. Detection relied on ultra-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry (MS–MS) (Xevo TQ-S, Waters).

Two curves of six-points calibration, one for ZnPT, one for CuPT were prepared extemporaneously in water and were treated like samples. Concentration range linearity was observed from  $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$  (LOQ) to  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  for CuPT and  $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$  (LOQ) to  $50.0 \mu\text{g L}^{-1}$  for ZnPT.

## 2.5. Analysis of microalgal growth using microplate reader

Microalgal growth was measured every 24 h, during the light phase and at least 2 h after its start, by the chlorophyll fluorescence. Microplates were analyzed using a SAFIRE microplate reader (TECAN) with XFluor4beta Excel® macro as software. Excitation/emission wavelengths were:  $450/684 \text{ nm}$  ( $10 \text{ nm}$  bandwidth), 9 reads were performed per well from the bottom, with an integration time of  $20 \mu\text{s}$ . Each microplate was shaken during 20 s before the reading, using a Orbis Plus (Mikura Ltd) microplate shaker in orbital mode.

For each well, the growth rate was calculated, for each species and substance tested over the 96 h exposure period, with the following equation:  $\mu = \ln(F_t - F_0)/t$ , where  $F_t$  was the fluorescence (a.u.) of the well at  $t$  (h),  $\mu$  ( $\text{h}^{-1}$ ) was the growth rate and  $F_0$  the initial fluorescence intensity at  $t = 0 \text{ h}$ .

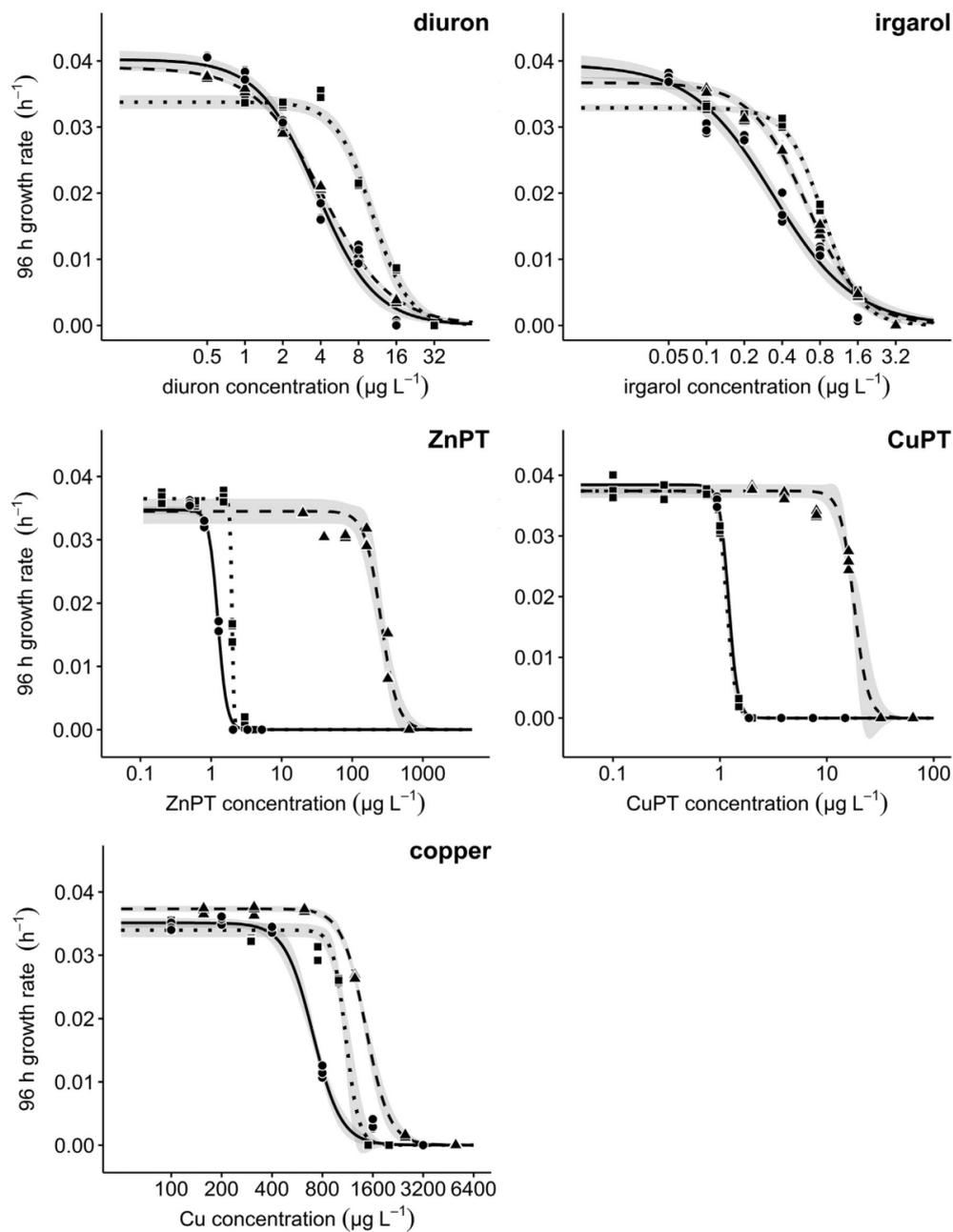
## 2.6. Statistical analysis

### 2.6.1. Concentration-response

Concentration-response analyses were carried out using R software 3.3.2 with 'drc' package (Ritz and Streibig, 2005; Ritz et al., 2015). For each chemical, tested using six concentrations in triplicates, a single three-parameters log-logistic regression model, Equation (1), was applied:

$$U = \frac{d}{\left(1 + \left(\frac{x}{EC50}\right)^b\right)} \quad (1)$$

where  $U$  is the response, in our case the 96 h growth rate ( $\mu$ ,  $\text{h}^{-1}$ ), at the concentration  $x$ ,  $d$  the upper-limit corresponding to the growth rates of the untreated algae and  $b$  is the slope of the curve



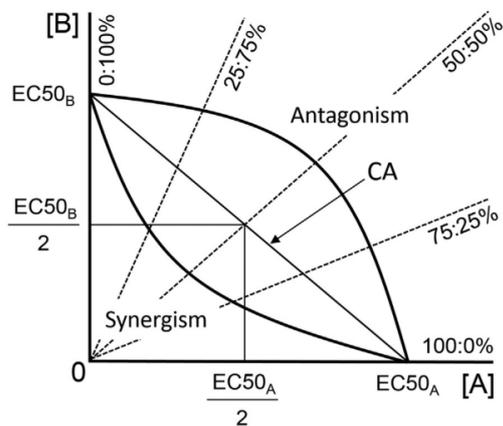
**Fig. 1.** Concentration-response curves for all compounds tested singly on each species. Points (in triplicates; *T. lutea*: circles; *S. marinoi*: squares; *T. suecica*: triangles) correspond to the 96 h growth rate. Lines (*T. lutea*: straight line; *S. marinoi*: dotted line; *T. suecica*: dashed line) correspond to the fitted three parameter log-logistic model with their respective 95% confidence interval in gray.

around EC50.

## 2.6.2. Mixture analysis

**2.6.2.1. Isobole model.** Isobolograms (Fig. 2) permit the visualization of several isoboles, which consist of concentration combinations of two substances that yield the same effect. In this study, a

50% inhibition effect on growth rate was used. Predictions from the two reference isobole models, CA and IA, were calculated for each mixture based on the concentration response parameters of the single chemicals. To calculate the isobole for the CA model, Equation (2) was used:



**Fig. 2.** Illustration of an isobologram. Axes represent the concentration of the two pure substances in mixture A and B, also represented as mixture ratios 100:0% (A) and 0:100% (B). The dashed lines represent mixture ratios 75:25, 50:50 and 25:75% (A:B). The straight solid line identified as ‘CA’ is the CA isobole. The curved solid lines symbolize isoboles illustrating either antagonism (above CA) or synergism (below CA).

$$\sum_{i=1}^n \frac{z_i}{ECx_i} = 1 \quad (2)$$

where,  $z_i$  is the concentration of the chemical  $i$  in the mixture giving  $x\%$  effect and  $ECx_i$  is the effective concentration yielding the same effect as the mixture, in our case,  $EC50_i$  for a 50% inhibition. The quotient  $z_i/ECx_i$  corresponds to the dimensionless Toxic Units ( $TUx_i$ ) that quantifies the relative contribution to toxicity of the individual chemical  $i$  in the mixture of  $n$  chemicals.

The response of a binary mixture of  $X$  and  $Y$  following the IA model predictions corresponds to the multiplication of the relative responses, where maximal growth rates are set to 1 and can be described as:  $R_{mix} = R_x R_y$ ; the response of the chemical  $Y$  in a mixture achieving a 50% inhibition effect is then:  $R_y = 0.5/R_x$ . Knowing the response of  $Y$  at a given concentration of  $X$  makes it possible to calculate the corresponding concentration of  $Y$  by solving the equation of the chosen concentration–response model for  $y$ . Hence, solving Eq. (1) with  $d = 1$  for the concentration  $z$ , gives

$$z = EC50 \left( \frac{1}{U} - 1 \right)^{1/b} \quad (3)$$

and  $y$  can be determined using the  $EC50$  and slope ( $b$ ) given by the concentration–response curve of chemical  $Y$ . The predicted concentrations of  $X$  and  $Y$  yielding a 50% inhibition effect can then be plotted on the isobologram.

The Hewlett and Vølund models (Hewlett, 1969; Vølund, 1992), that are extensions of the CA model were also tested. These two models are based on a four-parameters log-logistic model, with common upper and lower-limit; the latter being fixed to zero, thereby reducing it to a three-parameters model. Both models allow the isobole to describe either synergistic or antagonistic responses relative to CA. The Hewlett model uses the  $EC50$  of the two chemicals  $X$  and  $Y$  and one additional parameter, giving symmetric deviations from CA, while the Vølund model introduces two additional parameters allowing for asymmetric deviations from the CA model (Ritz and Streibig, 2014). Further details about these models are available in (Cedergreen et al., 2007).

The Hewlett isobole model is described by:

$$EC50_{mix} = \left( \left( \frac{pX}{EC50X} \right)^{1/\lambda} + \left( \frac{pY}{EC50Y} \right)^{1/\lambda} \right)^{-\lambda} \quad (4)$$

where  $p_X$  and  $p_Y$  are the proportions of the chemicals  $X$  and  $Y$  in the mixture relative to the  $EC50$  of the mixture, corresponding to multiplying Eq. (2) with  $EC50_{mix}$  (making  $p_i = z_i EC50_{mix}$ ) and  $\lambda$  the interaction parameter that describes combination effects: if  $\lambda = 1$  the equation reduces to concentration addition; if  $\lambda < 1$  the isobole describes antagonism; if  $\lambda > 1$  it describes synergism.

The Vølund isobole model is described by:

$$EC50_{mix} = \frac{EC50X / pX}{\left( 1 + \frac{pY EC50X}{pX EC50Y} \right)^{1-\eta_1} + \left( \frac{pY EC50X}{pX EC50Y} \right)^{\eta_2} \cdot \left( 1 + \frac{pY EC50X}{pX EC50Y} \right)^{1-\eta_2}} \quad (5)$$

using two interaction parameters,  $\eta_1$  and  $\eta_2$ : if  $\eta_1 = \eta_2 = 1$  the model simplifies to the CA model; if  $\eta_1$  and  $\eta_2 > 1$  the isobole shows antagonism; if  $\eta_1$  and  $\eta_2 < 1$  it displays synergism. If  $\eta_1 > 1$   $\eta_2 < 1$ , or vice-versa, the interaction is part synergistic and partly antagonistic.

The CA model (Eq. (2), two chemicals gives 5 parameters) was first tested against a simultaneous fit of all data to five concentration–response curves computed by the three-parameters log-logistic model using freely-varying slopes and  $EC50$ -values and a common upper-limit (11-parameters model). The two fits were compared using an  $F$ -test to test if the extended model describes the data significantly better than the reduced model: if  $p > 0.05$  there is no significant difference between the model predictions, hence, the reduced model (in this case CA) will be preferred. If the hypothesis of the previous test is rejected (i.e. the CA model do not describe the data well), extended models (Hewlett or Vølund) can be tested. To assess if an extended model provides a better fit to the data than the CA model, the extended model is tested against the simpler model (Hewlett vs. CA, and Vølund vs. Hewlett and CA) using the  $F$ -test.

**2.6.2.2. MIXTOX model.** The MIXTOX model provides an alternative approach to Hewlett and Vølund isobole models. The model is implemented in an Excel® macro and was developed by Jonker et al. (2005). The model also describes an entire concentration–response surface, not based on rays following a sigmoid curve, as described above, but rather models the entire surface mathematically including all data. This also means that data achieved using other designs than the ray design described above can be used, providing that the data cover the majority of the concentration–response surface. On the other hand, modelling the entire surface without the restrictions of each ‘ray’ having to follow a sigmoid model, such as is implemented in the Hewlett and Vølund models, may have the consequence of the ‘rays’ having other shapes than the sigmoid shape, which experience have shown most concentration–response relationships follow (Scholze et al., 2001).

In the model developed by Jonker et al. (2005), the CA and IA models are implemented as described above, using knowledge of the upper-limit, slope and  $EC50$  calculated by the three-parameters log-logistic model (Eq. (1)) for the two single compounds. Deviations from the CA or IA models can be described by the addition of a single parameter,  $a$ , pulling the entire concentration–response surface below the plane of the reference model (synergism,  $a < 0$ ) or above the plane (antagonism,  $a > 0$ ). This model extension is called S/A (Synergism/Antagonism). Alternatively, an additional parameter can be added,  $b$ , allowing for asymmetric deviations from the reference model. In the MIXTOX concept, this model extension is called DR/DL (Dose Ratio/Dose Level-dependent

deviation). The mathematical derivations of the models and interpretations are given in Jonker et al. (2005).

In order to fit the models to the experimental data, the built-in solver function (Excel<sup>®</sup>) is used to minimize the residual sum of squares (SS) by interacting with the parameters: upper-limit, slopes and EC50 as well as interaction parameters in the case of S/A and DR/DL model extensions. The lower the residual sum of squares is, the better is the fit of the experimental data to the model. A  $\chi^2$  test is also performed to determine if S/A model extension provides a significantly better fit ( $p < 0.05$ ) than the reference model (CA or IA), and similarly for DR/DL vs. S/A and CA/IA.

### 3. Results

#### 3.1. Chemical analyses

For each chemical, the nominal and measured concentrations of stock solutions (supplementary data: Table S3) were compared by calculating the percentages of variation, which were always below 10%.

The chemical concentrations in the microplate wells remained steady over time for diuron, irgarol or Cu, although the measured concentration at the beginning of the exposure (t0) was slightly lower than targeted for diuron and irgarol (supplementary data: Table S3). The analysis of the samples containing only ZnPT or CuPT (Table 2) showed that more than half of the chemicals had disappeared after 24 h and that the concentrations were below  $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$  (LOQ) after 96 h. Interestingly both ZnPT and CuPT were present at almost equimolar concentration at t0 and t24 in the samples supposed to contain only ZnPT. Note that Cu and Zn, present at nominal concentrations of  $2.50$  and  $5.00 \mu\text{g L}^{-1}$  (Table 2), are part of the f/2 medium as necessary micronutrients for algal growth. Similarly, for CuPT (Table 2), while the concentration at t0 was higher than expected, both ZnPT and CuPT were detected after 24 h, even though no ZnPT was added nor detected at t0. As for ZnPT, no CuPT nor ZnPT were detected ( $< \text{LOQ}$ ) after 96 h.

Samples containing the mixture of ZnPT with Cu without microalgae showed that  $87.8 \text{ nM}$  of CuPT were present at t0, while only  $47.9 \text{ nM}$  of ZnPT were added to the culture medium (Table 2). In the same sample,  $30.3 \text{ nM}$  of ZnPT were also detected, giving a sum of PT-associated metals about twice the concentration added. This was unexpected, but it was confirmed by the analytical method that PT contamination was not occurring in the inserted blank samples. After 24 h, the concentration of CuPT almost decreased by half, while the concentration of ZnPT slightly increased. After 96 h, neither ZnPT nor CuPT were detected ( $< \text{LOQ}$ ). Samples containing the same mixture with *T. suecica* showed very similar results (Table 2), the only difference being a greater decrease after 24 h in both ZnPT and CuPT concentrations.

#### 3.2. Toxicity of single chemicals among microalgal species

For all species tested, the maximum DMSO concentration used in the experiments (0.1%) did not induce any significant differences on growth rate compared to control (supplementary data: Table S2).

The EC50 values obtained for the three algal species ranged from  $0.34$  to  $0.85 \mu\text{g L}^{-1}$  for irgarol,  $3.73$ – $10.3 \mu\text{g L}^{-1}$  for diuron,  $1.60$ – $18.0 \mu\text{g L}^{-1}$  for CuPT,  $1.30$ – $256 \mu\text{g L}^{-1}$  for ZnPT and  $703$ – $1449 \mu\text{g L}^{-1}$  for Cu (Fig. 1, Table 1). *T. lutea* was the most sensitive species for all tested chemicals except CuPT, which exhibited a slightly higher toxicity towards *S. marinoi*. The diatom was the less sensitive to the two PSII inhibitors, whereas *T. suecica* was the less sensitive to Cu and the organometals ZnPT and CuPT. EC50 of ZnPT and CuPT were similar and between  $1$  and  $2 \mu\text{g L}^{-1}$  for *T. lutea*

and *S. marinoi* while much higher values of  $256 \pm 18.1 \mu\text{g L}^{-1}$  and  $18.0 \pm 1.50$  were obtained for *T. suecica*. Based on the EC50, the toxicity of the five tested chemicals can be ranked as follows for the three species, from the most toxic to the least toxic: irgarol > CuPT > ZnPT > diuron > Cu for *T. lutea* and *S. marinoi*; irgarol > diuron > CuPT > ZnPT > Cu for *T. suecica*.

#### 3.3. Toxicity of binary mixtures

##### 3.3.1. Similar mode of action

The mixture toxicity of diuron and irgarol on *T. lutea* (Fig. 3) was found to be additive, as evidenced by the EC50 of the 50:50% mixture ( $\Sigma\text{TU}_{50:50}$ ) of  $1.01 \pm 0.08$  (Table 3). A slight but significant synergism was observed for *S. marinoi* and *T. suecica* (Fig. 3), with  $\Sigma\text{TU}_{50:50}$  of  $0.92 \pm 0.04$  and  $0.79 \pm 0.05$ , respectively (Table 3) and a better fit of the Hewlett model tested against the CA model ( $p = 0.03$ ;  $p < 10^{-3}$ ) was obtained, describing slight synergism for *S. marinoi* and *T. suecica*, respectively.

The mixture toxicity of the two organometals ZnPT and CuPT was additive for *T. lutea*, antagonistic for *S. marinoi* and synergistic for *T. suecica* (Fig. 3) with  $\Sigma\text{TU}_{50:50}$  of  $0.94 \pm 0.05$ ,  $1.15 \pm 0.03$  and  $0.81 \pm 0.57 \text{ TU}$  (Table 3), respectively. The Hewlett model described the data significantly better than the CA model for *S. marinoi* and *T. suecica* ( $p < 10^{-3}$ ;  $p = 0.04$ ). It can be noted that for every case where an extended model provided a better fit than the CA predictions, the Hewlett model was preferred to the Vølund model, thus meaning that the deviations were symmetric compared to the CA isobole.

Using the MIXTOX model, interactive effects were the same as with the isobole model: two mixtures were additive, three were synergistic and one was antagonistic, compared to the CA model predictions. If looking at the best reference model for mixtures of chemicals sharing the same MoA, the CA model always provided a better fit than the IA model. Results for the MIXTOX model are summarized in Table 3.

##### 3.3.2. Dissimilar mode of action

Mixtures of diuron or irgarol together with Cu on *T. lutea* and *T. suecica* led to very similar findings (Fig. 4, Table 3). For *T. lutea*,  $\Sigma\text{TU}_{50:50}$  were  $1.95 \pm 0.05$  and  $1.95 \pm 0.08$ ; for *T. suecica* the  $\Sigma\text{TU}_{50:50}$  were  $1.47 \pm 0.14 \text{ TU}$  and  $1.53 \pm 0.07$ , for diuron:Cu and irgarol:Cu mixtures, respectively. The two-parameter Vølund model was found to better fit the data than the CA and Hewlett models ( $p < 10^{-3}$ ) for both mixtures with *T. lutea* and for the mixture of diuron and Cu for *T. suecica*. The interaction effect was asymmetric and antagonistic compared to the CA model predictions: the magnitude of the antagonism was stronger when 50 or 75% of the effect was due to Cu. Regarding the mixture of irgarol and Cu for *T. suecica*, the Hewlett model was the best fitting model ( $p < 10^{-3}$ ) describing antagonism compared to the CA model. For *S. marinoi*, the  $\Sigma\text{TU}_{50:50}$  of the diuron:Cu mixture was  $1.15 \pm 0.04$ . The Hewlett model provided the best fit ( $p < 10^{-3}$ ), however the antagonism was not as strong as for the two other species (Fig. 4, Table 3). Again, the antagonism was particularly noticeable when 50 or 75% of the mixture effect was due to Cu. The mixture of irgarol and Cu was additive, with a  $\Sigma\text{TU}_{50:50}$  of  $1.03 \pm 0.05$ , for the diatom *S. marinoi*.

For the mixture of diuron and ZnPT on *T. lutea* and *T. suecica* (Fig. 4), the  $\Sigma\text{TU}_{50:50}$  were  $1.25 \pm 0.09$  and  $1.08 \pm 0.08$  (Table 3) and the Hewlett model provided the best fit ( $p < 10^{-3}$ ), describing slight antagonism in both cases. For *S. marinoi*, the  $\Sigma\text{TU}_{50:50}$  was  $0.98 \pm 0.02$ , the CA model provided the best fit to the data, indicating additivity.

The  $\Sigma\text{TU}_{50:50}$  was  $2.20 \pm 0.03$  for the mixture of Cu and ZnPT on *T. lutea* (Table 3), meaning a very strong antagonism for this mixture ratio, which was lower for the two other mixture ratios

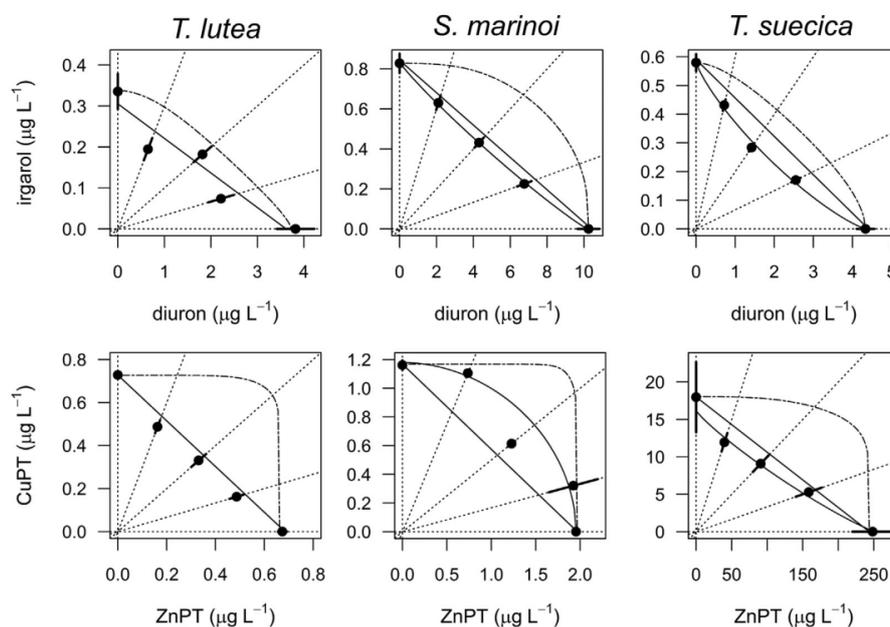


Fig. 3. Isobolograms of binary mixtures of chemicals sharing the same mode of action. The points represent the  $EC_{50} \pm 2$  standard-error, s.e. The straight solid line is the CA isobole; the dot-dashed line is the IA isobole; the curved solid line (when displayed) is the best fitting isobole model when there is a significant interaction.

(Fig. 4). The Hewlett model provided the best fit ( $p < 10^{-3}$ ). The same response pattern was observed for the diatom *S. marinoi*, the  $\Sigma TU_{50:50}$  was  $2.43 \pm 0.25$ , also implying a very strong antagonism for this mixture ratio. Similarly, the Hewlett model provided a better fit than the CA model ( $p < 10^{-3}$ ). Finally, for *T. suecica*, the response pattern was opposite compared to the two other species (Fig. 4), as evidenced by the  $\Sigma TU_{50:50}$  of  $0.16 \pm 0.004$  (Table 3). The Hewlett model provided the best fit ( $p < 10^{-3}$ ), describing a very strong synergism.

Using the MIXTOX model (Table 3), the results were identical to what was found with the isobole model: two mixtures were additive, 9 were antagonistic and one was synergistic, compared to the CA model predictions. Seven mixtures out of 12 were better predicted by the IA model than the CA model (Table 3). Interestingly, in three cases (mixtures of diuron:ZnPT on *T. lutea* and Cu:ZnPT on *T. lutea* and *S. marinoi*) the interactive effect switches from antagonism to synergism when considering the IA model as reference instead of the CA model. Results for the MIXTOX model are summarized in Table 3.

#### 4. Discussion

##### 4.1. Toxicity of the single chemicals

Regarding the toxicity of single chemicals towards the three species of microalgae, it appears that the three species exhibited roughly the same sensitivity towards the tested compounds (Fig. 1, Table 1), except for ZnPT and CuPT to which *T. suecica* was less sensitive. Such values are in agreement with previously reported  $EC_{50}$  values for these compounds (Koutsafitis and Aoyama, 2006; Yamada, 2006; Buma et al., 2009; Onduka et al., 2010; Bao et al., 2011; Avelas et al., 2017).

Even though they share the same MoA, irgarol was approximately 10-fold more toxic than diuron for the three algal species,

likely due to its higher affinity for the  $Q_B$  niche (Chesworth et al., 2004) that might be explained by its higher  $\log K_{OW}$ .

*T. suecica* was less sensitive to the organometals: ZnPT was 200-fold and 130-fold more toxic to *T. lutea* and *S. marinoi* than to *T. suecica*, respectively; CuPT was 15-fold more toxic to *T. lutea* and *S. marinoi* than to *T. suecica*. The chlorophyte also exhibited a different sensitivity to ZnPT and CuPT as CuPT was 14-fold more toxic than ZnPT. It was not the case for *T. lutea* and *S. marinoi*, for which ZnPT and CuPT toxicity was similar (less than 2-fold difference). Since only very few studies reported on the toxicity and MoA of ZnPT and CuPT towards microalgae, these differences in sensitivity are, at the present time, difficult to interpret.

Results of the chemical analyses showed that the presence of Cu as micronutrient in the culture medium induced an almost immediate transchelation of about half of the ZnPT into CuPT (Table 2), hence indicating that the toxicity of ZnPT might have been modified by the presence of newly generated CuPT in the medium. Surprisingly, after 24 h, some CuPT also transchelated into ZnPT in the presence of Zn ions, which were also added as part of the f/2 medium. This was not expected since CuPT is thought to be a more stable PT-metal complex than ZnPT (Grunnet and Dahllöf, 2005). In addition to the interaction between Cu and ZnPT, EDTA, which is part of the f/2 culture medium in the form of  $Na_2EDTA$ , was also shown to interact with ZnPT, by chelating zinc from ZnPT, thus dissociating ZnPT into NaPT (Kim et al., 2017). As NaPT form was not measured in the chemical analyses performed, there is no evidence indicating the formation of this substance in our experiments. Nevertheless, as ZnPT is able to interact with both Cu and EDTA, one should be very careful when testing ZnPT together with these substances. Chemical analyses should be performed and avoiding the presence of Cu and EDTA in the culture medium would probably be required to ensure that the observed toxicity is not due to CuPT or NaPT instead of ZnPT.

Concerning Cu toxicity, the  $EC_{50}$  values obtained in this study

**Table 3**

Summary of mixture interactions on the three species of microalgae. For the isobole model, the best fitting model (BFM) is displayed aside the main interaction effect (EFF.) compared to the CA model; interaction parameters are displayed in the case of antagonism or synergism:  $\lambda$  for Hewlett model or  $\eta_1$  and  $\eta_2$  for Vølund model. For MIXTOX, the BFM is displayed aside the interaction effect, compared to the chosen reference model (REF, CA or IA); interaction parameters are displayed in the case of antagonism or synergism:  $a$  for S/A or  $a$  and  $b$  for DR/DL models; For each model, the  $p$ -value displayed corresponds to the  $F$ -test performed to determine if the extended model provides a significantly better fit ( $p < 0.05$ ) than the less complex model.

	<i>Tisochrysis lutea</i>			<i>Skeletonema marinoi</i>				<i>Tetraselmis suecica</i>				
	$\Sigma TU_{50:50}$	Isobole	MIXTOX	$\Sigma TU_{50:50}$	Isobole	MIXTOX	$\Sigma TU_{50:50}$	Isobole	MIXTOX	$\Sigma TU_{50:50}$	Isobole	MIXTOX
		BFM <sup>(a)</sup> /EFF. <sup>(b)</sup> Int. param. $\pm$ s.e. $p$ -value	Reference model (REF)	BFM/EFF. Int. param. $p$ -value								
Similar MoA <sup>(c)</sup> diuron:irgarol	1.01 $\pm$ 0.08	CA/ADD.	CA	CA/ADD.	0.92 $\pm$ 0.04	Hewlett/SYN. $\lambda = 1.09 \pm 0.042$ $p = 0.03$	CA	DR/ANT. $a = -0.26$ $p = 0.03$	0.79 $\pm$ 0.05	Hewlett/SYN. $\lambda = 1.24 \pm 0.035$ $p < 10^{-3}$	CA	DL/SYN. $a = -0.25$ $b_{DL} = -1.87$ $p = 0.002$
ZnPT:CuPT	0.94 $\pm$ 0.05	CA/ADD.	CA	CA/ADD.	1.15 $\pm$ 0.03	Hewlett/ANT. $\lambda = 0.52 \pm 0.012$ $p < 10^{-3}$	CA	DR/ANT. $a = 19.7$ $b_{ZnPT} = 0.69$ $p < 10^{-3}$	0.81 $\pm$ 0.57	Hewlett/SYN. $\lambda = 1.14 \pm 0.076$ $p = 0.04$	CA	DR/SYN. $a = -0.90$ $b_{ZnPT} = 1.25$ $p = 0.003$
Dissimilar MoA diuron:Cu	1.95 $\pm$ 0.05	Vølund/ANT. $\eta_1 = 1.12 \pm 0.14$ $\eta_2 = 4.42 \pm 1.09$ $p < 10^{-3}$	IA	DR/ANT. $a = 8.86$ $b_{diuron} = -11.5$ $p < 10^{-3}$	1.15 $\pm$ 0.04	Vølund/ANT. $\eta_1 = 2.49 \pm 0.54$ $\eta_2 = 0.44 \pm 0.13$ $p < 10^{-3}$	CA	DR/ANT. $a = 1.73$ $b_{diuron} = -2.50$ $p < 10^{-3}$	1.47 $\pm$ 0.14	Vølund/ANT. $\eta_1 = 0.65 \pm 0.11$ $\eta_2 = 4.10 \pm 0.74$ $p = 1.07 \times 10^{-3}$	IA	DR/ANT. $a = 2.58$ $b_{diuron} = -4.22$ $p < 10^{-3}$
irgarol:Cu	1.95 $\pm$ 0.08	Vølund/ANT. $\eta_1 = 1.17 \pm 0.15$ $\eta_2 = 4.01 \pm 0.86$ $p < 10^{-3}$	IA	DR/ANT. $a = 8.04$ $b_{irgarol} = -10.3$ $p < 10^{-3}$	1.03 $\pm$ 0.05	CA/ADD.	CA	CA/ADD.	1.53 $\pm$ 0.07	Hewlett/ANT. $\lambda = 0.22 \pm 0.093$ $p < 10^{-3}$	IA	DL/ANT. $a = 2.37$ $b_{irgarol} = -3.48$ $p < 10^{-3}$
diuron:ZnPT	1.25 $\pm$ 0.09	Hewlett/ANT. $\lambda = 0.64 \pm 0.06$ $p < 10^{-3}$	IA	DL/SYN. $a = -0.01$ $b_{DL} = -275$ $p < 10^{-3}$	0.98 $\pm$ 0.02	CA/ADD.	CA	CA/ADD.	1.08 $\pm$ 0.08	Hewlett/ANT. $\lambda = 0.74 \pm 0.069$ $p < 10^{-3}$	CA	DL/ANT. $a = 0.39$ $b_{DL} = -1.69$ $p = 0.002$
Cu:ZnPT	2.20 $\pm$ 0.03	Hewlett/ANT. $\lambda = 4.50 \times 10^{-3}$ $\pm 2.90 \times 10^{-5}$ $p < 10^{-3}$	IA	DR/SYN. $a = -9.30$ $b_{Cu} = 16.3$ $p < 10^{-3}$	2.43 $\pm$ 0.25	Hewlett/ANT. $\lambda = 4.80 \times 10^{-3}$ $\pm 3.40 \times 10^{-5}$ $p < 10^{-3}$	IA	DR/SYN. $a = -1.99$ $b_{Cu} = 4.93$ $p < 10^{-3}$	0.16 $\pm$ 0.004	Hewlett/SYN. $\lambda = 3.93 \pm 0.15$ $p < 10^{-3}$	CA	DL/SYN. $a = -10.70$ $b_{Cu} = 0.39$ $p < 10^{-3}$

<sup>a</sup> BFM: Best fitting model, either a reference model (CA or IA) or a more complex model, Hewlett or S/A (one interaction parameter), Vølund or DR/DL (two interaction parameters).

<sup>b</sup> EFF. Main interaction effect retained for the mixture, either additivity (ADD.), antagonism (ANT.) or synergism (SYN.).

<sup>c</sup> MoA: Mode of action.

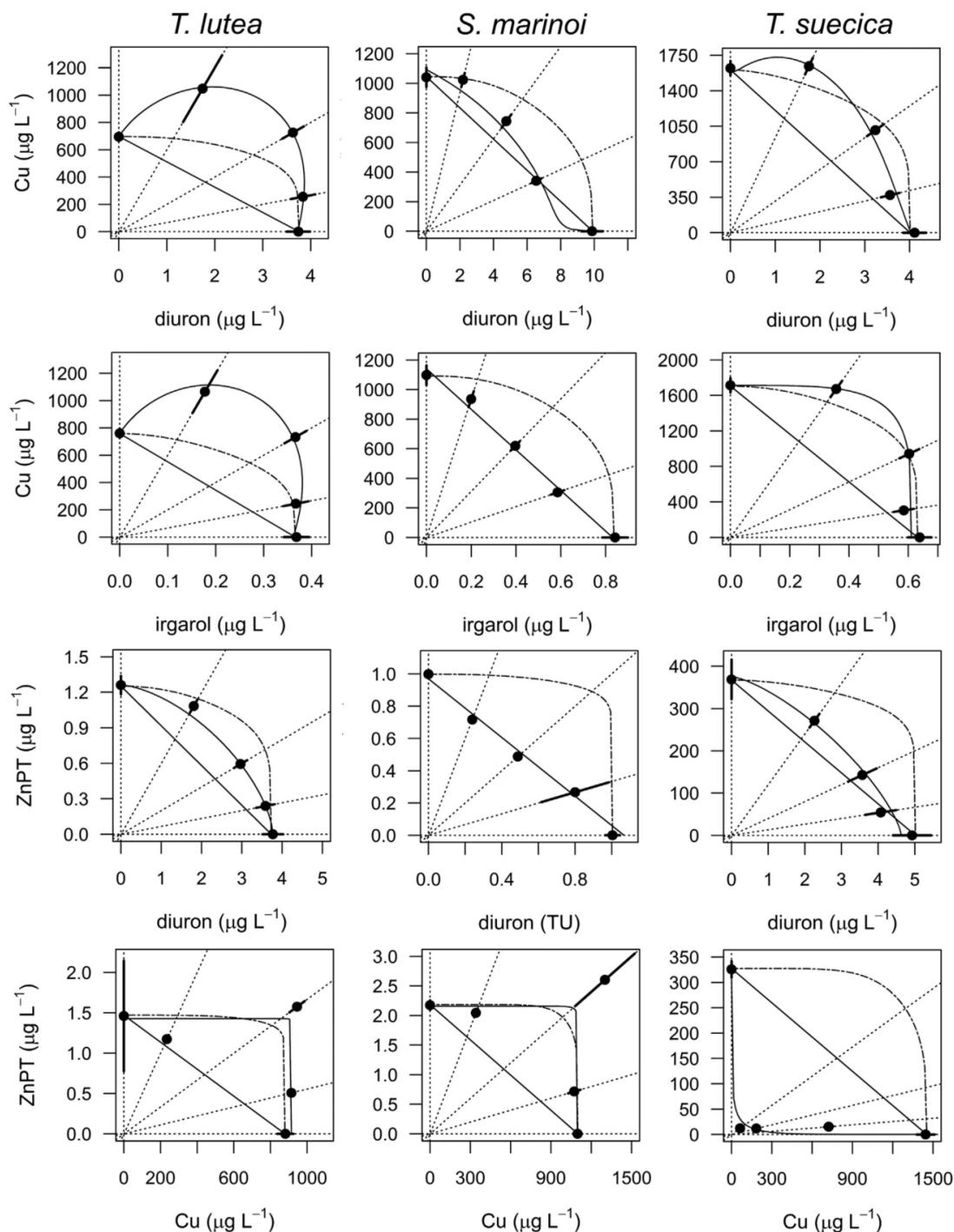


Fig. 4. Isobolograms of binary mixtures of chemicals with dissimilar modes of action. The points represent the  $\text{EC}_{50} \pm 2 \text{ s.e.}$  The straight solid line is the CA isobole; the dot-dashed line is the IA isobole; the curved solid line (when displayed) is the best fitting isobole model when there is a significant interaction.

were within the same range than already reported for the marine microalgae *C. gracilis* and *T. pseudonana* (Koutsaftis and Aoyama, 2006; Bao et al., 2008), while 30- to 140-fold smaller EC50 values were reported for *Tetraslemis* sp. and *Isochrysis* sp. These discrepancies might be due to the presence of EDTA, whose effect on trace metal toxicity is still controversial. Indeed, a recent study conducted by Expósito et al. (2017) showed that the percentage of Cu<sup>2+</sup> ions in test tubes containing 2.50 µg L<sup>-1</sup> of Cu (which is the concentration of Cu in the f/2 medium) in ASTM medium (6.9 µM Na<sub>2</sub>EDTA) represented only 0.02% of the total Cu concentration, the rest of the Cu being complexed with EDTA. Moreover, Tubbing et al. (1994) demonstrated that Cu is biologically available to the microalgae *S. capricornutum* when complexed with EDTA while Ma et al. (2003) observed increasing EC50 values with increasing EDTA concentrations when exposing the microalgae *Scenedesmus subspicatus* to Cu. As a result, the presence of EDTA in the growth medium might have lowered the toxicity of Cu in our tests.

#### 4.2. Mixtures of chemicals with similar modes of action

The principle behind the CA model is that non-interacting chemicals only differ in potency, so if they share the same molecular target, they can be viewed as dilutions of the same chemical, which will always conform to the CA model (Berenbaum, 1989). For that reason, it is generally thought that the CA model is best at predicting mixture toxicity of chemicals that share the same MoA. This was confirmed in this study as the CA model gave better predictions than the IA model for all mixtures of chemicals sharing the same MoA (Table 3).

The mixture of the two PSII inhibitors diuron and irgarol (Fig. 3) was found to be additive for *T. lutea* (Table 3), while it appeared to be slightly synergistic on *S. marinoi* and *T. suecica*. Synergism in diuron:irgarol mixtures has already been reported on the seagrass *Zostera marina* (Chesworth et al., 2004) and microalgae *S. capricornutum*, *C. gracilis* and *T. suecica* (Fernandez-Alba et al., 2002; Koutsaftis and Aoyama, 2006). It has often been argued that, although these two compounds share the same MoA, they come from two different chemical families: phenylureas for diuron and S-triazines for irgarol. Hence, it cannot be excluded that they can have dissimilar toxicokinetic-toxicodynamic (i.e. the processes responsible for toxicity over time at the level of organisms) (Gramatica et al., 2001; Borgert et al., 2004), as well as different secondary targets that could be responsible for the synergism observed in some cases.

Mixture of ZnPT and CuPT (Fig. 3) was additive on *T. lutea* and very close to additivity for *S. marinoi* and *T. suecica* (Table 3). The MoA of these two compounds on microalgae is not well known, however, the additivity resulting from their mixture seems to point out a common MoA.

Regarding mixtures that exhibited a significant deviation from the CA model predictions, one can argue that the deviations are too small to be considered as biologically significant. Indeed, as stated in Belden et al. (2007), a factor of two between expected and observed values should be respected to define biologically significant and repeatable interactions. Moreover, small deviations are very often difficult to reproduce (Cedergreen et al., 2007), although it also depends on the test organism. With respect to these statements, previously mentioned deviations from the CA model cannot be regarded as biologically significant.

#### 4.3. Mixtures of chemicals with dissimilar modes of action

Like the CA model, the IA model is based on the assumption of non-interacting chemicals. It differs, however, as it is based on binomial endpoints and populations of independent organisms

(Greco et al., 1995). Even though such assumptions are not fulfilled when considering the growth rate in a microalgal culture as the endpoint, the IA model has been found to provide good predictions of mixtures of chemicals with dissimilar modes of action (Backhaus et al., 2004). Cedergreen et al. (2008) explored the accuracy of both the CA and IA models on 98 mixtures of pesticides and pharmaceuticals on different organisms, and found that neither CA nor IA gave better predictions than the other. Thus, the predictability of both models was tested in this study.

In a study from Koutsaftis and Aoyama (2006), mixtures of diuron or irgarol together with Cu on the diatom *Chaetoceros gracilis* were found to be synergistic compared to the CA model, the synergism being stronger for the diuron and Cu mixture. It was the opposite in this study, as the mixtures were antagonistic for the three species, especially *T. lutea* and *T. suecica* (Fig. 4, Table 3). Very similar responses were obtained with the diuron:Cu and irgarol:Cu mixtures and interestingly, the magnitude of the antagonism observed for these mixtures depends on the species: strong for *T. lutea*, moderate for *T. suecica* and close to additivity for *S. marinoi*. These differences might indicate that the observed antagonism is not due to a chemical interaction between diuron and Cu happening outside the cell, as if it had been the case, the same pattern would have been expected for the three species. Therefore, the antagonism might rather be due to a specific interaction with the photosynthetic apparatus, since it is the target of both diuron/irgarol and Cu. Teisseire et al. (1999) found a slight antagonistic effect for the mixture of diuron together with Cu on the growth of *Lemna minor* and made the hypothesis that diuron might have a protective effect against Cu by stimulating the activity of antioxidant enzymes like ascorbate peroxidase or glutathione reductase and/or increasing the numbers of photosystems and thus reducing the number of photosystems damaged by Cu.

Mixture of Cu together with ZnPT was previously studied several times (Mochida et al., 2006; Zhou et al., 2006; Bao et al., 2008) to explore the potential transchelation of ZnPT into CuPT which could lead to unpredictable results and sometimes remarkable synergy. In our case, this mixture led to very contrasted results: strong antagonism for *T. lutea* and *S. marinoi* and strong synergism for *T. suecica* (Fig. 4, Table 3). No synergism was expected for this mixture on *T. lutea* and *S. marinoi* because they both exhibit a similar sensitivity to the two organometals. However, the strong antagonism observed for the 50:50% mixture ratio was not expected either and remains to be explained. Performing additional chemical analyses might permit to understand the phenomenon lying behind the antagonism observed. For the chlorophyte *T. suecica*, as CuPT was 14-fold more toxic than ZnPT (Table 1), strong synergism was expected for this mixture, assuming that higher amount of CuPT would be produced when increasing the concentration of Cu mixed with ZnPT. The response obtained was clearly synergistic and was consistent with the chemical analyses which demonstrated the presence of CuPT when ZnPT was mixed with Cu (Table 2). The observed transchelation even yielded more CuPT at t0 than could be accounted for by the PT added as ZnPT. This discrepancy could possibly be explained by the presence of non-complexed pyriothione (Hydroxy-2(1H)-pyridinethione) molecules in the ZnPT stock and working solutions. The magnitude of the synergism varied among the three mixture ratios, which seems to indicate that the amount of CuPT formed might also depend on the concentrations of both ZnPT and Cu in the culture medium. Indeed, the more ZnPT (and so the less Cu) there is in the mixture, the more toxic the mixture gets (Fig. 4), as demonstrated by the ΣTU of the different mixture rays which were 0.54 ± 0.04, 0.16 ± 0.004 and 0.08 ± 0.003 for the 75:25%, 50:50% and 25:75% (Cu:ZnPT) mixtures, respectively.

Contrary to what was found for mixtures of chemical sharing

the same MoA, the IA model was equal, if not better than the CA model, for predicting the toxicity of mixture with dissimilar MoA. However, as already stated in previous studies (Junghans et al., 2006; Kortenkamp et al., 2009), the CA model should be preferred in terms of regulation as it provides more conservative predictions than the IA model. Nearly half of the mixtures of chemicals having dissimilar MoA induced deviations of at least a factor of two from the CA model predictions and could thus be considered as biologically significant, according to Belden et al. (2007).

The two modelling approaches (isobole versus MIXTOX) each have their strengths and weaknesses. The isobole model is easily usable with the 'drc' package in R opensource software and provides visual representations of interactions with isobolograms but requires a specific data format and currently only has CA implemented. The MIXTOX implementation in Excel® has a more user-friendly interface, is more flexible in terms of input data and has both CA and IA implemented. However, it does not provide fitted dose-response parameter, nor a good visual presentation of data. Mathematically deviations from the reference models are described differently in the two approaches, but when applied to data, the results in terms of type and degree of deviation is similar, as also demonstrated in Cedergreen et al. (2007). Thus, one should choose either of the two according to the chosen experimental design and goals of the study.

## 5. Conclusion and outlook

Evaluating the toxicity of antifouling binary mixtures towards three species of marine microalgae revealed several points of interest:

- Both the sensitivity to single chemicals and the interactive effects resulting from mixtures were different among the three microalgal species.
- The two modelling approaches used for predicting the mixture toxicity provided similar results.
- The Concentration Addition (CA) model should be preferred compared to the Independent Action (IA) model, as it provides more conservative predictions, is easier to use and implemented in the opensource software R ('drc' package).
- Even though significant, slight deviations from the reference models should be interpreted very cautiously regarding their "biological" significance.
- The chemical analyses performed pointed out the very low stability of ZnPT and its ability to rapidly transchelate into CuPT in the presence of Cu<sup>2+</sup> ions.
- The demonstrated transchelation of ZnPT into CuPT was responsible for the strong synergy observed in the mixture of ZnPT and Cu towards *T. suecica*.

The results underline the importance of studying mixtures of antifouling chemicals co-occurring in locations close to harbors, careening areas and marinas. As the complex chemistry of organometals together with copper induced severe synergy for one species, it would be interesting to closer investigate the environmental concentrations of these chemicals in contaminated sites together with their resulting toxicity to the local aquatic community.

## Acknowledgements

This study has been carried out with financial support from the French National Research Agency in the frame of the Investments for the future program, within the Cluster of Excellence COTE (ANR-

10-LABX-45). We also want to thank Anja Weibell for her technical assistance, Helle Marcussen, Nikoline Juul Nielsen, Joël Knoery and Emmanuelle Rozuel for the copper analyses and Nathalie Tapie for the diuron and irgarol analyses. We also thank two anonymous reviewers for their comments, which helped us to improve the quality of this manuscript.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.139>.

## References

- Aveleas, F., Martins, R., Oliveira, T., Maia, F., Malheiro, E., Soares, A.M.V.M., Loureiro, S., Tedim, J., 2017. Efficacy and ecotoxicity of novel anti-fouling nanomaterials in target and non-target marine species. *Mar. Biotechnol.* 19, 164–174. <https://doi.org/10.1007/s10126-017-9740-1>.
- Backhaus, T., Arrhenius, A., Blanck, H., 2004. Toxicity of a mixture of dissimilarly acting substances to natural algal communities: predictive power and limitations of independent action and concentration addition. *Environ. Sci. Technol.* 38, 6363–6370. <https://doi.org/10.1021/es0497678>.
- Bao, V.W.W., Leung, K.M.Y., Kwok, K.W.H., Zhang, A.Q., Lui, G.C.S., 2008. Synergistic toxic effects of zinc pyriithione and copper to three marine species: implications on setting appropriate water quality criteria. *Mar. Pollut. Bull.* 57, 616–623. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.03.041>.
- Bao, V.W.W., Leung, K.M.Y., Qiu, J.W., Lam, M.H.W., 2011. Acute toxicities of five commonly used antifouling booster biocides to selected subtropical and cosmopolitan marine species. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 1147–1151. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.02.041>.
- Baron, M., Arellano, J.B., Gorge, J.L., 1995. Copper and photosystem II: a controversial relationship. *Physiol. Plantarum* 94, 174–180.
- Beardall, J., Raven, J.A., 2016. Carbon acquisition by microalgae. In: Borowitzka, M.A., Beardall, J., Raven, J.A. (Eds.), *The Physiology of Microalgae*. Springer International Publishing, pp. 89–99. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-24945-2\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-24945-2_4).
- Belden, J.B., Gilliom, R.J., Lydy, M.J., 2007. How well can we predict the toxicity of pesticide mixtures to aquatic life? *Integrated Environ. Assess. Manag.* 3, 364–372. <https://doi.org/10.1002/ieam.5630030307>.
- Berenbaum, M.C., 1989. What is synergy? *Pharmacol. Rev.* 41, 93. LP-141.
- Borgert, C.J., Quill, T.F., McCarty, L.S., Mason, A.M., 2004. Can mode of action predict mixture toxicity for risk assessment? *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 201, 85–96. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.05.005>.
- Buma, A.G.J.J., Sjollem, S.B., van de Poll, W.H., Klamer, H.J.C., Bakker, J.F., 2009. Impact of the antifouling agent Irgarol 1051 on marine phytoplankton species. *J. Sea Res.* 61, 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2008.11.007>.
- Caquet, T., Roucaute, M., Mazzella, N., Delmas, F., Madigou, C., Farcy, E., Burgeot, T., Allenou, J.-P.P., Gabellec, R., 2013. Risk assessment of herbicides and booster biocides along estuarine continuums in the Bay of Vilaine area (Brittany, France). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 651–666. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1171-y>.
- Caux, P.-Y., Blaise, C., Leblanc, P., Tache, M., 1992. A phytoassay procedure using fluorescence induction. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 549–557. <https://doi.org/10.1002/etc.5620110413>.
- Cedergreen, N., Kamper, A., Streibig, J.C., 2006. Is prochloraz a potent synergist across aquatic species? A study on bacteria, daphnia, algae and higher plants. *Aquat. Toxicol.* 78, 243–252. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.03.007>.
- Cedergreen, N., Kudsk, P., Mathiassen, S.K., Sørensen, H., Streibig, J.C., 2007. Reproducibility of binary-mixture toxicity studies. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 149. <https://doi.org/10.1897/06-196R.1>.
- Cedergreen, N., Christensen, A.M., Kamper, A., Kudsk, P., Mathiassen, S.K., Streibig, J.C., Sørensen, H., 2008. A review of independent action compared to concentration addition as reference models for mixtures of compounds with different molecular target sites. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1621–1632. <https://doi.org/10.1897/07-474.1>.
- Cedergreen, N., Svendsen, C., Backhaus, T., 2013. Toxicity prediction of chemical mixtures. In: *Encyclopedia of Environmental Management*. Taylor & Francis, New York. <https://doi.org/10.1081/E-EEM-120046684>.
- Cedergreen, N., 2014. Quantifying synergy: a systematic review of mixture toxicity studies within environmental toxicology. *PLoS One* 9, e96580. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096580>.
- Chandler, C.J., Segel, I.H., 1978. Mechanism of the antimicrobial action of pyriithione: effects on levels, and protein synthesis mechanism of the antimicrobial action of pyriithione: effects on membrane transport, ATP levels, and protein synthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 14, 60–68. <https://doi.org/10.1128/AAC.14.1.60>. Updated.
- Chesworth, J.C., Donkin, M.E., Brown, M.T., 2004. The interactive effects of the antifouling herbicides Irgarol 1051 and Diuron on the seagrass *Zostera marina* (L.). *Aquat. Toxicol.* 66, 293–305. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.10.002>.
- Coquillé, N., Ménard, D., Rouxel, J., Dupraz, V., Éon, M., Pardon, P., Budzinski, H., Morin, S., Parianti, E., Stachowski-Haberhorn, S., 2018. The influence of natural

- dissolved organic matter on herbicide toxicity to marine microalgae is species-dependent. *Aquat. Toxicol.* 198, 103–117. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.02.019>.
- Cozic, V., Durand, G., 2013. Mission d'étude pour réduire les impacts du carénage sur le milieu marin. Rapport phase 2: Evaluer les équipements existants (cales et aires de carénage avec systèmes de traitement). IDHESA Bretagne Océane.
- Devilla, R.A., Brown, M.T., Donkin, M., Tarran, G.A., Aiken, J., Readman, J.W., 2005. Impact of antifouling booster biocides on single microalgal species and on a natural marine phytoplankton community. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 286, 1–12. <https://doi.org/10.3354/meps286001>.
- Dinning, A.J., Al-Adham, I.S.I., Austin, P., Charlton, M., Collier, P.J., 1998a. Pyriithione biocide interactions with bacterial phospholipid head groups. *J. Appl. Microbiol.* 85, 132–140. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00477.x>.
- Dinning, A.J., Al-Adham, I.S.I., Eastwood, I.M., Austin, P., Collier, P.J., 1998b. Pyriithione biocides as inhibitors of bacterial ATP synthesis. *J. Appl. Microbiol.* 85, 141–146. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00478.x>.
- Doose, C.A., Ranke, J., Stock, F., Bottin-Weber, U., Jastorff, B., Gjersten, B., Doeskeland, S., Jastorff, B., Lanotte, M., 2004. Structure–activity relationships of pyriithiones – IPC-81 toxicity tests with the antifouling biocide zinc pyriithione and structural analogs. *Green Chem.* 6, 259–266. <https://doi.org/10.1039/B314753C>.
- El Berdey, A., Juneau, P., Pirastru, L., Popovic, R., 2000. Application of the PAM fluorometric method for determination of copper toxicity to microalgae and duckweed. In: Persoone, G., Janssen, C., De Coen, W. (Eds.), *New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring*. Springer US, Boston, MA, pp. 135–140. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4289-6\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4289-6_11).
- Environment Agency, 1998. *Environmental Problems from Antifouling Agents: Survey of Manufacturers, Chandlers (Suppliers) and Treatment Sites*. Technical Report, p. 215.
- Expósito, N., Kumar, V., Sierra, J., Schuhmacher, M., Giménez Papiol, G., 2017. Performance of *Raphidocelis subcapitata* exposed to heavy metal mixtures. *Sci. Total Environ.* 601–602, 865–873. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.177>.
- Fernandez-Alba, A.R.R., Piedra, L., Mezcuca, M., Hernando, M.D.D., 2002. Toxicity of single and mixed contaminants in seawater measured with acute toxicity bioassays. *Sci. World J.* 2, 1115–1120. <https://doi.org/10.1100/tsw.2002.221>.
- Franklin, N.M., Stauber, J.L., Lim, R.P., Petocz, P., 2002. Toxicity of metal mixtures to a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.): the effect of interactions between copper, cadmium, and zinc on metal cell binding and uptake. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 2412–2422. <https://doi.org/10.1002/etc.562021121>.
- Garbarino, J.R., Taylor, H.E., 1996. *Inductively Coupled Plasma-mass Spectrometric Method for the Determination of Dissolved Trace Elements in Natural Water*. Open-File Report 94–358. U.S. Geological Survey.
- Gessner, P.K., 1995. Isobolographic analysis of interactions: an update on applications and utility. *Toxicology* 105, 161–179. [https://doi.org/10.1016/0300-483X\(95\)03210-7](https://doi.org/10.1016/0300-483X(95)03210-7).
- Gramatica, P., Vighi, M., Consolero, F., Todeschini, R., Finizio, A., Faust, M., 2001. QSAR approach for the selection of congeneric compounds with a similar toxicological mode of action. *Chemosphere* 42, 873–883. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(00\)00180-6](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(00)00180-6).
- Greco, W.R., Bravo, G., Parsons, J.C., 1995. The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. *Pharmacol. Rev.* 47.
- Grunnet, K.S., Dahllöf, I., 2005. Environmental fate of the antifouling compound zinc pyriithione in seawater. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 3001. <https://doi.org/10.1897/04-627R.1>.
- Guillard, R.R.L., Ryther, J.H., 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.* 8, 229–239. <https://doi.org/10.1139/m62-029>.
- Guillard, R.R.L., 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith, W.L., Chanley, M.H. (Eds.), *Culture of Marine Invertebrate Animals* SE - 3. Springer US, Boston, MA, pp. 29–60. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8714-9\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8714-9_3).
- Hasan, C.K., Turner, A., Readman, J., Frickers, T., 2014. Environmental risks associated with booster biocides leaching from spent anti-fouling paint particles in coastal environments. *Water Environ. Res.* 86, 2330–2337. <https://doi.org/10.2175/106143014X14062131178835>.
- Hewlett, P.S., 1969. Measurement of the potencies of drug mixtures. *Biometrics* 25, 477–487. <https://doi.org/10.2307/2528900>.
- Jonathan, M.P., Roy, P.D., Thangadurai, N., Srinivasalu, S., Rodríguez-Espinosa, P.F., Sarkar, S.K., Lakshumanan, C., Navarrete-López, M., Muñoz-Sevilla, N.P., 2011. Metal concentrations in water and sediments from tourist beaches of Acapulco, Mexico. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 845–850. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.02.042>.
- Jones, R.J., Kerswell, A.P., 2003. Phytotoxicity of Photosystem II (PSII) herbicides to coral. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 261, 149–159. <https://doi.org/10.3354/meps261149>.
- Jonker, M.J., Svendsen, C., Bedaux, J.J.M., Bongers, M., Kammenga, J.E., 2005. Significance testing of synergistic/antagonistic, dose level-dependent, or dose ratio-dependent effects in mixture dose-response analysis. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 2701–2713.
- Junghans, M., Backhaus, T., Faust, M., Scholze, M., Grimme, L., 2006. Application and validation of approaches for the predictive hazard assessment of realistic pesticide mixtures. *Aquat. Toxicol.* 76, 93–110. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.10.001>.
- Kim, T.H., Jung, G.H., Lee, E.H., Park, H.R., Lee, J.K., Kim, H.G., 2017. Development and validation of liquid chromatography–tandem mass Spectrometry method for simultaneous determination of zinc pyriithione and pyriithione in shampoos. *Acta Chromatogr.* 1–6. <https://doi.org/10.1556/1326.2017.00294>.
- Konstantinou, I.K., Albanis, T.A., 2004. Worldwide occurrence and effects of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment: a review. *Environ. Int.* 30, 235–248. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(03\)00176-4](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(03)00176-4).
- Kortenamp, A., Backhaus, T., Faust, M., 2009. State of the Art Report on Mixture Toxicity. Final Report. Report 1–391. [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/pdf/report\\_Mixture%20toxicity.pdf](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/pdf/report_Mixture%20toxicity.pdf).
- Koutsaftis, A., Aoyama, I., 2006. The interactive effects of binary mixtures of three antifouling biocides and three heavy metals against the marine algae *Chaetoceros gracilis*. *Environ. Toxicol.* 21, 432–439. <https://doi.org/10.1002/tox.20202>.
- Links, I., Van Der Jagt, K.E., Christopher, Y., Lurvink, M., Schinkel, J., Tielemans, E., Van Hemmen, J.J., 2006. Occupational exposure during application and removal of antifouling paints. *Ann. Occup. Hyg.* 51, 207–218. <https://doi.org/10.1093/annhyg/mel074>.
- Loewe, S., Muischnek, H., 1926. *Combinated effects I Announcement - implements to the problem*. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 114, 313–326.
- Ma, M., Zhu, W., Wang, Z., Witkamp, G.J., 2003. Accumulation, assimilation and growth inhibition of copper on freshwater alga (*Scenedesmus subspicatus* 86.81 SAG) in the presence of EDTA and fulvic acid. *Aquat. Toxicol.* 63, 221–228. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(02\)00179-0](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(02)00179-0).
- Mackie, D.S., van den Berg, C.M., Readman, J.W., 2004. Determination of pyriithione in natural waters by cathodic stripping voltammetry. *Anal. Chim. Acta* 511, 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.01.033>.
- Maraldo, K., Dahllöf, I., 2004. Seasonal variations in the effect of zinc pyriithione and copper pyriithione on pelagic phytoplankton communities. *Aquat. Toxicol.* 69, 189–198. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.05.006>.
- Mochida, K., Ito, K., Harino, H., Kakuno, A., Fujii, K., 2006. Acute toxicity of pyriithione antifouling biocides and joint toxicity with copper to red sea bream (*Pagrus major*) and toy shrimp (*Heptacarpus futuiostris*). *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 3058–3064. <https://doi.org/10.1897/05-688r.1>.
- Nimbal, C.L., Yerkes, C.N., Weston, L.A., Weller, S.C., 1996. Herbicidal activity and site of action of the natural product sorgoleone. *Pestic. Biochem. Physiol.* 54, 73–83. <https://doi.org/10.1006/pest.1996.0011>.
- Onduka, T., Mochida, K., Harino, H., Ito, K., Kakuno, A., Fujii, K., 2010. Toxicity of metal pyriithione photodegradation products to marine organisms with indirect evidence for their presence in seawater. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 58, 991–997. <https://doi.org/10.1007/s00244-009-9430-8>.
- Patsikka, E., Aro, E., Tyystjarvi, E., 1998. Increase in the quantum yield of photo-inhibition contributes to copper toxicity in vivo. *Plant Physiol.* 117, 619–627. <https://doi.org/10.1104/pp.117.2.619>.
- Readman, J.W., Kwong, L.L.W., Grondin, D., Bartocci, J., Villeneuve, J.P., Mee, L.D., 1993. Coastal water contamination from a triazine herbicide used in antifouling paints. *Environ. Sci. Technol.* 27, 1940–1942. <https://doi.org/10.1021/es00046a027>.
- Ritz, C., Streibig, J.C., 2005. Bioassay analysis using R. *J. Stat. Software* 12, 1–22. <https://doi.org/10.18637/jss.v012.i05>.
- Ritz, C., Streibig, J.C., 2014. From additivity to synergism – a modelling perspective. *Synergy* 1, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.syres.2014.07.010>.
- Ritz, C., Baty, F., Streibig, J.C., Gerhard, D., 2015. Dose–response analysis using R. *PLoS One* 10, e0146021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146021>.
- Schiff, K., Brown, J., Diehl, D., Greenstein, D., 2007. Extent and magnitude of copper contamination in marinas of the San Diego region, California, USA. *Mar. Pollut. Bull.* 54, 322–328. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.10.013>.
- Scholze, M., Boedecker, W., Faust, M., Backhaus, T., Altenburger, R., Grimme, L.H., 2001. A general best-fit method for concentration–response curves and the estimation of low-effect concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 448–457. <https://doi.org/10.1002/etc.5620200228>.
- St-Laurent, D., Blaise, C., Macquarrie, P., Scroggins, R., Trottier, B., 1992. Comparative assessment of herbicide phytotoxicity to *Selenastrum capricornutum* using microplate and flask bioassay procedures. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 7, 35–48. <https://doi.org/10.1002/tox.2530070104>.
- Takahashi, K., 2009. Chapter 1: release rate of biocides from antifouling paints. In: Arai, T., Harino, H., Ohji, M., Langston, W.J. (Eds.), *Ecotoxicology of Antifouling Biocides*. Springer Tokyo Berlin Heidelberg New York, p. 22. <https://doi.org/10.1007/978-4-431-85709-9>.
- Teisseire, H., Couderchet, M., Vernet, G., 1999. Phytotoxicity of diuron alone and in combination with copper or folpet on duckweed (*Lemna minor*). *Environ. Pollut.* 106, 39–45. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(99\)00066-4](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(99)00066-4).
- Thomas, K.V., 1999. Determination of the antifouling agent zinc pyriithione in water samples by copper chelate formation and high-performance liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 833, 105–109. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)01009-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)01009-7).
- Tubbing, D.M.J., Admiraal, W., Cleven, R.F.M.J., Iqbal, M., van de Meent, D., Verweij, W., 1994. The contribution of complexed copper to the metabolic inhibition of algae and bacteria in synthetic media and river water. *Water Res.* 28, 37–44. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(94\)90117-1](https://doi.org/10.1016/0043-1354(94)90117-1).
- Turner, A., Singh, N., Millard, L., 2008. Bioaccessibility and bioavailability of Cu and Zn in sediment contaminated by antifouling paint residues. *Environ. Sci. Technol.* 42, 8740–8746. <https://doi.org/10.1021/es801923e>.
- Turner, A., 2010. Marine pollution from antifouling paint particles. *Mar. Pollut. Bull.* 60, 159–171. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.12.004>.
- Vetere, V.F., Pérez, M.C., Romagnoli, R., Stupak, M.E., Aro, B., 1997. Solubility and toxic effect of the cuprous thiocyanate antifouling pigment on barnacle larvae.

- J. Coating Technol. 69, 39–45. <https://doi.org/10.1007/BF02696144>.
- Vølund, A., 1992. Dose response surface bioassay. In: XVth International Biometric Conference.
- White, D.B., Faessel, H.M., Slocum, H.K., Khinkis, L., Greco, W.R., 2004. Nonlinear response surface and mixture experiment methodologies applied to the study of synergism. *Biom. J.* 46, 56–71. <https://doi.org/10.1002/bimj.200210002>.
- Yamada, H., 2006. Toxicity and Preliminary Risk Assessment of Alternative Anti-fouling Biocides to Aquatic Organisms. <https://doi.org/10.1007/698-5-056>.
- Handb. Environ. Chem. Vol. 5 Water Pollut. 5, 213–226.
- Yebrá, D.M., Kiil, S., Dam-Johansen, K., 2004. Antifouling technology - past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Prog. Org. Coating* 50, 75–104. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2003.06.001>.
- Zhou, X., Okamura, H., Nagata, S., 2006. Remarkable Synergistic Effects in Anti-fouling Chemicals against *Vibrio Fischeri* in a Bioluminescent Assay, vol. 52, pp. 243–251.

## Supplementary material

Below is the supplementary material, Figures and Tables, for the article 2.

### Figure

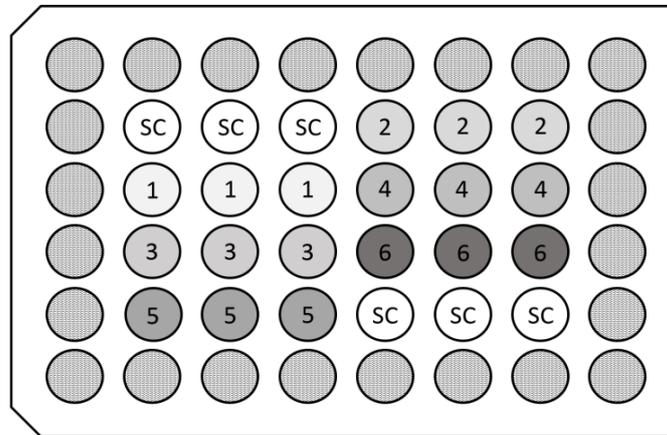


Figure S1: Scheme of the microplate toxicity assay. SC represent the solvent controls; numbers 1 to 6 increasing concentrations of the tested chemical. All peripheral wells are filled with sterile milli-Q water.

### Tables

Table S1: Nominal concentrations tested in the concentration-response experiments for each compound/species.

	Targeted nominal concentrations ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )					
	C1	C2	C3	C4	C5	C6
<i>Tisochrysis lutea</i>						
diuron	0.50	1.00	2.00	4.00	8.00	16.0
irgarol	0.05	0.10	0.20	0.40	0.80	1.60
ZnPT	0.75	1.00	1.25	1.50	2.00	3.00
CuPT	0.75	1.00	1.25	1.50	2.00	3.00
Cu	100	200	400	800	1600	3200
<i>Skeletonema marinoi</i>						
diuron	1.00	2.00	4.00	8.00	16.00	32.0
irgarol	0.10	0.20	0.40	0.80	1.60	3.20
ZnPT	0.20	0.60	1.50	2.00	3.00	4.00
CuPT	0.10	0.30	0.75	1.00	1.50	2.00
Cu	100	300	750	1000	1500	2000
<i>Tetraselmis suecica</i>						
diuron	0.50	1.00	2.00	4.00	8.00	16.0
irgarol	0.10	0.20	0.40	0.80	1.60	3.20
ZnPT	20.0	40.0	80.0	160	320	640
CuPT	2.00	4.00	8.00	16.0	32.0	64.0
Cu	156	313	625	1250	2500	5000

Table S2: Specific growth rates ( $h^{-1}$ ) of the three microalgal species for control and DMSO 0.1% (max solvent percentage used in the experiments).

	<i>Tisochrysis lutea</i>	<i>Skeletonema marinoi</i>	<i>Tetraselmis suecica</i>
	96 h growth rate ( $h^{-1} \pm s.e.$ )		
<b>Control</b>	$0.0357 \pm 0.0001$	$0.0338 \pm 0.0006$	$0.0366 \pm 0.0005$
<b>DMSO 0.1%</b>	$0.0359 \pm 0.0002$	$0.0342 \pm 0.0002$	$0.0362 \pm 0.0008$

Table S3: Nominal and measured concentrations of diuron, irgarol and Cu in the stock solutions (left) and microplate wells following 0,6 and 96 h exposure (diuron and irgarol) or 0 and 24 h exposure (Cu) (right). The percentage of variation is calculated as  $(1 - (\text{measured}/\text{nominal})) \times 100$ .

Chemical	Stock solution concentrations ( $g L^{-1}$ )			Measured concentrations in microplate wells ( $\mu g L^{-1}$ )				
	Nominal	Measured	% Variation	Nominal	t0	t6	t24	t96
<b>diuron</b>	1.02	1.04	1.90	0.100	0.063	0.075		0.076
<b>irgarol</b>	0.62	0.57	-8.80	0.100	0.074	0.069		0.071
<b>ZnPT</b>	0.50	0.51	1.55					
<b>CuPT</b>	0.52	0.49	-5.80				c.f. Table 2	
<b>Cu</b>	3.20	3.20	0.00	100	97		89	

Table S4: Retention time and optimized MS/MS parameters for diuron and irgarol (TQ: transition of quantification, TC: transition of confirmation).

Compound Name	Precursor Ion	Product Ion	Ret Time (min)	Fragmentor (V)	Collision Energy (V)	Cell Accelerator Voltage (V)	Polarity
<b>diuron (TQ)</b>	233.0	72.0	8.50	114	16.0	7.00	Positive
<b>diuron (TC)</b>	233.0	46.1	8.50	114	12.0	7.00	Positive
<b>diuron-d6</b>	239.1	78.0	8.50	109	24.0	7.00	Positive
<b>irgarol (TQ)</b>	254.2	198	10.3	131	16.0	7.00	Positive
<b>irgarol (TC)</b>	254.2	83.0	10.3	131	28.0	7.00	Positive
<b>irgarol-d9</b>	263.2	199	10.3	124	16.0	7.00	Positive

## Synthèse

Cet article avait pour objectif d'évaluer précisément la toxicité et les effets combinés de cinq mélanges binaires composés de biocides *antifouling* sur *T. lutea*, *S. marinoi* et *T. suecica*.

L'évaluation de l'effet d'interaction des mélanges binaires requiert au préalable la détermination d'une CE<sub>50</sub> pour chaque substance testée en mélange. Cela permet aussi de comparer la toxicité des substances testées seules, ainsi que la sensibilité des trois espèces de microalgues choisies. Pour *T. lutea* et *S. marinoi*, les substances peuvent être classées de la plus toxique à la moins toxique comme suit : irgarol > CuPT > ZnPT > diuron >> cuivre, avec toutefois une sensibilité légèrement inférieure pour la diatomée. Concernant la chlorophyte *T. suecica*, l'ordre diffère légèrement : irgarol > diuron > CuPT >> ZnPT > cuivre. Cette espèce est en effet bien moins sensible au CuPT et encore davantage au ZnPT par rapport aux deux autres espèces. Cette différence de sensibilité, bien qu'intrigante, reste difficile à expliquer, la toxicité de ces deux molécules n'étant que peu documentée dans la littérature scientifique.

Les analyses chimiques réalisées ont permis de mettre en évidence une bonne stabilité du diuron, de l'irgarol et du cuivre pendant les 96 h d'exposition des microalgues dans les microplaques. Les deux organométaux étaient en revanche bien moins stables : en plus d'une dégradation rapide dans le milieu de culture (disparition de plus de la moitié après 24 h pour les substances seules) probablement due à une photolyse importante (Grunnet et Dahllöf, 2005), les analyses chimiques ont mis en évidence une transformation du ZnPT en CuPT en présence de cuivre. Ce phénomène, appelé transchélation, avait été précédemment identifié dans la littérature comme la cause potentielle de la synergie résultant entre le ZnPT et le cuivre, le CuPT étant généralement plus toxique que le ZnPT (Grunnet et Dahllöf, 2005 ; Koutsaftis et Aoyama, 2006 ; Bao *et al.*, 2011). Étant donné que du cuivre (2,50 µg L<sup>-1</sup>) est présent en tant qu'élément trace métallique essentiel dans le milieu de culture f/2 utilisé dans ces expérimentations (Guillard et Ryther, 1962 ; Guillard, 1975), la mesure de la toxicité du ZnPT a probablement été altérée par la présence de CuPT généré par transchélation, ce complexe étant plus stable que le ZnPT. De plus, le milieu de culture contenait également du Na<sub>2</sub>EDTA, également connu pour interagir avec le cuivre et le ZnPT (Expósito *et al.*, 2017 ; Kim *et al.*, 2017). De fait, il pourrait être intéressant de tester à nouveau la toxicité du ZnPT, mais également du CuPT et du cuivre en utilisant un milieu de culture dépourvu de cuivre et d'EDTA. Dans tous les cas, au vu de l'instabilité de ces substances, il apparaît nécessaire de vérifier analytiquement les concentrations d'exposition.

Concernant l'étude des effets d'interaction induits par les mélanges testés dans cette étude, deux approches de modélisation complémentaires ont été utilisées : la méthode des isoboles, applicable via le module 'drc' dans R ; l'outil MIXTOX, une macro implémentée dans Excel. Chacune de ces deux

approches possède ses propres avantages et inconvénients et se base sur des principes mathématiques différents, cependant, les types et degrés d'interactions déterminés par ces deux approches sont similaires, comme précédemment démontré dans la publication de Cedergreen *et al.* (2007a). Cette étude a permis de mettre en évidence et de confirmer la supériorité du modèle CA lorsqu'il s'agit de prédire un mélange de substances possédant le même mode d'action. Pour les combinaisons de substances possédant des modes d'action différents, aucun des deux modèles ne s'est montré supérieur à l'autre : pour les mêmes mélanges, le type d'interaction obtenu était souvent partagé par les trois espèces mais avec des degrés d'intensité variables. Tester ces mélanges sur un nombre supérieur d'espèces pourrait potentiellement permettre de déterminer si les interactions obtenues sont espèce-dépendantes.

Finalement, parmi les différents mélanges testés, seuls quelques-uns ont induit une interaction significative au niveau biologique selon Belden *et al.* (2007), c'est-à-dire que la toxicité observée déviait d'un facteur supérieur à 2 par rapport à celle prédite. Ça pourrait être le cas de l'interaction antagoniste résultant du mélange entre le diuron/l'irgarol et le cuivre, notamment chez *T. lutea* et dans une moindre mesure *T. suecica*. Cet antagonisme pourrait s'expliquer par une stimulation des enzymes antioxydantes (ascorbate peroxydase ou glutathione réductase) et/ou une augmentation du nombre de photosystèmes induite par le cuivre, réduisant l'effet des biocides ciblant le PSII.

Pour faire le lien avec l'article précédent, le mélange entre le diuron et l'irgarol a été retesté sur la chlorophyte *T. suecica* : il en résulte effectivement une synergie significative, dont l'intensité, si l'on en croit l'outil MIXTOX, n'est pas symétrique et varie en fonction de l'effet d'inhibition observé. Cependant, en utilisant les données du mélange diuron+irgarol réalisé en microplaque réalisé dans cette étude, et en calculant le temps de doublement ( $T_D$ ) théorique d'un mélange constitué de 5,00  $\mu\text{g L}^{-1}$  de diuron et 0,50  $\mu\text{g L}^{-1}$  d'irgarol selon le modèle CA, on obtient une augmentation de 423% du  $T_D$  par rapport aux témoins. Cette valeur est très proche de celle obtenue dans l'article 1 pour le mélange D5+I0,5 (+356  $\pm$  35%) et permet de démontrer que l'effet observé était finalement conforme aux prédictions du modèle CA. Il faut toutefois garder à l'esprit que les expérimentations réalisées dans les articles 1 et 2 ont été réalisées dans des conditions différentes (ballons de culture *vs.* microplaques).

Enfin, cette étude a également permis de mettre en évidence la très forte synergie résultant du mélange entre le ZnPT et le CuPT sur l'espèce *T. suecica*. Les analyses chimiques réalisées ont confirmé que la cause de cette synergie était la transchélation du ZnPT en CuPT, ce dernier étant quatorze fois plus toxique que le ZnPT. Du fait de la forte toxicité induite par le ZnPT et le CuPT, et notamment du fait de l'interaction du ZnPT avec le cuivre, constituant la base de nombreuses peintures anti-salissures, il apparaît nécessaire de suivre la concentration de ces substances dans les eaux côtières.

## 4. Conclusion générale

Le premier objectif de ce chapitre consistait à étudier la toxicité du diuron et de l'irgarol, seuls et pour quelques mélanges choisis, sur la croissance et la physiologie de la diatomée *C. calcitrans* et de la chlorophyte *T. suecica*, dont une souche résistante au diuron.

Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence une sensibilité variable des deux espèces face aux deux inhibiteurs du PSII testés. L'inhibition de croissance observée a pu être reliée à une diminution de l'efficacité photosynthétique induite par l'action du diuron et de l'irgarol sur le processus de photosynthèse au niveau du PSII. Le blocage de la photosynthèse au niveau du PSII a à son tour induit une accumulation d'ERO pour une des deux espèces, ainsi qu'une diminution du contenu relatif en lipides neutres de réserve pour les deux espèces.

Conformément à ce qui était attendu, la souche mutante de *T. suecica* n'était pas affectée par les concentrations de diuron testées : une mutation au niveau de la séquence *psbA* codant pour la protéine D1 du PSII a pu être identifiée et pourrait être la cause de cette résistance. Toutefois, si cette mutation explique potentiellement la résistance de cette souche au diuron, elle n'induit en revanche aucune résistance à l'irgarol. Cela pourrait traduire un site de fixation moléculaire légèrement différent entre l'irgarol et le diuron, ou encore une affinité bien supérieure de l'irgarol pour le site de fixation, entravant en conséquence l'efficacité de cette mutation pour cette substance.

Enfin, cette étude a également permis de mettre en évidence l'importance de prendre en compte les effets d'interaction résultant des mélanges de substances : les effets observés sur la croissance des deux souches de la microalgue *T. suecica* semblaient effectivement montrer une interaction synergique entre les deux substances. Cependant, le design expérimental n'ayant pas été choisi dans le but d'étudier en détail l'interaction résultant de cette combinaison, la synergie observée pour ce mélange n'a pu être démontrée.

Dans le prolongement de cette première étude, le deuxième objectif de ce chapitre visait à utiliser des approches de modélisation pour étudier la toxicité et les interactions induites par cinq mélanges binaires composés de substances *antifouling* sur trois espèces de microalgues marines.

Deux approches permettant de prédire par modélisation la toxicité d'un mélange binaire ont été comparées : dans la quasi-totalité des cas, les interactions déterminées par les deux modèles étaient en adéquation, démontrant ainsi leur fiabilité. L'utilisation de ces deux approches a également permis d'étudier plus en détail l'interaction du diuron avec l'irgarol sur la microalgue *T. suecica* : une légère synergie a pu être observée pour l'effet d'inhibition étudié (50%). Cette synergie étant effet-dépendante (*i.e.* son intensité varie selon pourcentage d'inhibition observé), elle semble corroborer les résultats précédemment obtenus.

La toxicité des mélanges composés de substances agissant selon un même mode d'action était correctement prédite par le modèle CA. Pour les substances possédant un mode d'action différent, les modèles CA et IA s'avéraient plus ou moins performants selon l'espèce considérée. Deux mélanges se sont avérés particulièrement intéressants du fait de l'intensité de leurs interactions : le mélange du diuron ou de l'irgarol avec le cuivre, résultant en un fort antagonisme potentiellement dû à l'action protectrice de cuivre contre les deux biocides ; le mélange du ZnPT avec le cuivre, induisant une très forte synergie pour la microalgue *T. suecica* et un fort antagonisme pour les deux autres espèces.

Ce mélange a fait l'objet d'une attention toute particulière dans cette étude. La mesure analytique des concentrations de ZnPT et de CuPT a permis de mettre en évidence la transchélation du ZnPT en CuPT en présence de cuivre, expliquant par la même occasion la synergie observée chez *T. suecica* : le CuPT étant quatorze fois plus toxique que le ZnPT, la transchélation de ce dernier en CuPT une fois mélangé avec le cuivre démultiplie en conséquence la toxicité du mélange.

Pour conclure, ce chapitre a également permis de soulever plusieurs questions et/ou points qu'il serait nécessaire d'approfondir :

- Quels sont les mécanismes moléculaires responsables de la synergie observée entre le diuron et l'irgarol sur la souche sauvage de *T. suecica* ?

Une étude approfondie des interactions moléculaires entre le diuron, l'irgarol et leurs sites de fixation respectifs chez *T. suecica* pourrait permettre d'identifier les causes de la synergie observée. Dans le prolongement de ce qui a été réalisé dans l'article 1, il pourrait également être intéressant d'observer les effets du mélange sur le contenu relatif en ERO et en lipides, et envisager d'explorer les effets sur d'autres paramètres physiologiques.

- Quel sont les modes d'action toxiques du ZnPT et du CuPT ?

En effet, ces deux substances se sont avérées très toxiques pour deux des trois espèces de microalgues testées ( $CE_{50} \approx 1-2 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Comme suggéré ci-dessus, l'étude des effets de ces substances sur différentes fonctions physiologiques permettrait probablement d'améliorer notre compréhension de leur mode d'action toxique.

- Quelles sont les concentrations environnementales de ZnPT, CuPT et cuivre auxquelles les microalgues marines peuvent être exposées en milieu côtier ?

L'importante toxicité de ces deux substances, ainsi que la transchélation du ZnPT en CuPT, identifié comme davantage toxique par plusieurs études, posent en effet la question du risque engendré pour les organismes aquatiques qui y sont exposés. C'est notamment le cas des zones portuaires et des marinas, où la pression des biocides *antifouling* est élevée du fait des activités maritimes.



## Chapitre 4 – Toxicité de 17 pesticides, seuls et en mélanges, sur la croissance et la physiologie de deux microalgues marines, et sur le développement embryo-larvaire de l’huître creuse

---



## 1. Avant-propos

Le premier objectif de ce chapitre est d'étudier la toxicité de 17 pesticides, dont quatorze produits phytosanitaires utilisés en agriculture et trois biocides interdits en viticulture, et d'un métabolite, sur deux espèces de microalgues marines et la larve de l'huître creuse. Le choix des produits phytosanitaires à tester a été fait sur la base d'enquêtes réalisées sur le site d'étude (voir section 3.1 du chapitre 2) ; les biocides ont quant à eux été choisis car ce sont des polluants fréquemment détectés dans les cours d'eau français. De fait, il était jugé probable qu'une grande majorité de ces substances puisse être retrouvée dans les extraits de POCIS (voir chapitre 5).

La première partie de ce chapitre est donc consacrée au criblage de toxicité des 18 substances chimiques sélectionnées sur les deux espèces de microalgues marines. Un système de test en microplaques a été adapté afin d'obtenir une capacité de criblage permettant la détermination d'une CE<sub>50</sub> pour les substances testées. Pour améliorer la précision des CE<sub>50</sub> calculées, des analyses chimiques ont été réalisées afin de mesurer analytiquement les concentrations d'exposition réelles des substances dans les puits des microplaques. Enfin, pour certains pesticides, la toxicité observée en microplaques a été confrontée à celle obtenue en ballons de culture, traditionnellement utilisés au laboratoire pour les tests de toxicité sur microalgues.

Les résultats du criblage de toxicité réalisé sur les microalgues marines *T. lutea* et *S. marinoi* sont présentés sous la forme d'un troisième article intitulé « *Demonstrating the need of chemical exposure characterisation in a microplate test system: application to the toxicity screening of sixteen<sup>2</sup> pesticides towards two marine microalgae* » et publié dans le journal *Chemosphere*.

Le deuxième objectif de ce chapitre avait pour but d'approfondir les résultats obtenus avec les microalgues (article 3 cité ci-dessus) en étudiant les effets combinés des pesticides identifiés comme étant les plus toxiques. Des expérimentations ont été réalisées pour étudier la toxicité de mélanges binaires dans le but d'identifier des interactions synergiques entre ces pesticides. Pour ce faire, la même démarche expérimentale que celle employée dans l'article 2 (chapitre 3) a été appliquée pour modéliser les effets d'interaction des combinaisons testées. Suite aux résultats obtenus, il a été décidé d'étudier plus précisément les effets de trois mélanges (et des substances seules les constituant), pour lesquels une interaction additive, antagoniste et synergique, ont été respectivement observés. Les effets sur la physiologie des deux microalgues ont été étudiés par cytométrie en flux et PAM-fluorescence. Cette étude est présentée sous la forme d'une quatrième publication scientifique,

---

<sup>2</sup> Dans l'article 3 (ci-après), seuls seize pesticides (treize produits phytosanitaires et trois biocides) sont présentés : le diquat n'a pas été intégré à l'étude, le laboratoire ayant réalisé les analyses (LPTC-EPOC) ne disposant d'aucune méthode permettant sa quantification.

intitulée « *Toxicity of binary mixtures of pesticides to the marine microalgae *Tisochrysis lutea* and *Skeletonema marinoi*: substance interactions and physiological impacts* » et soumise au journal *Aquatic Toxicology*.

Enfin, la dernière partie de ce chapitre présente les résultats du criblage de toxicité réalisé sur les larves d'huître. De manière analogue à ce qui a été fait pour les microalgues, la toxicité des pesticides a été déterminée via l'application du test de toxicité embryon-larvaire en microplaques. Par la suite, la génotoxicité des pesticides les plus toxiques à l'issue du criblage a été évaluée en réalisant un test des comètes.

## 2. Article 3 : Démonstration de la nécessité de caractériser l'environnement chimique dans un système de test en microplaques : application au criblage de toxicité de seize pesticides vis-à-vis de deux microalgues marines

### Introduction

Les pesticides utilisés en viticulture peuvent contaminer les écosystèmes aquatiques à proximité des zones traitées par des processus de diffusion tels que la perte durant la pulvérisation (*spray drift*), le lessivage foliaire et le ruissellement (Leu *et al.*, 2004 ; Gil et Sinfort, 2005 ; Brady *et al.*, 2006). Ces substances possèdent des modes d'action variés et constituent un risque pour les organismes aquatiques qui y sont exposés (Overmyer *et al.*, 2007 ; Ochoa-Acuña *et al.*, 2009 ; Roubéix *et al.*, 2012). Dans cet article, seize pesticides, dont treize produits phytosanitaires utilisés en viticulture et trois biocides, ainsi qu'un métabolite, ont été sélectionnés du fait de leur présence potentielle dans les cours d'eau du site d'étude expérimental du projet PhytoCOTE. Afin d'évaluer la toxicité des 17 substances sélectionnées vis-à-vis des microalgues marines *T. lutea* et *S. marinoi*, un microbioessai en microplaques a été développé. En effet, malgré les nombreux avantages que présentent les tests de toxicité « classiques » en ballons de culture, leur utilisation n'est pas adaptée à la réalisation d'un criblage de toxicité sur un grand nombre de substances. D'un autre côté, l'utilisation de microplaques peut engendrer plusieurs biais qu'il s'agit d'identifier et de résoudre afin d'obtenir une estimation fiable de la toxicité :

- i. le matériel plastique (polystyrène) constituant les microplaques pourrait favoriser l'adsorption des substances les plus hydrophobes et donc réduire significativement les concentrations d'exposition, amenant à une sous-estimation de leur toxicité ;
- ii. les contaminants chimiques peuvent influencer sur la quantité et/ou la fluorescence de la chlorophylle, dont la fluorescence est utilisée pour mesurer la croissance des microalgues en microplaques, et ainsi biaiser la mesure de la croissance et donc l'estimation de la toxicité.

Dans cette étude, chaque substance a été testée à cinq concentrations (1, 10, 100, 500 et 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  ; à l'exception du diuron dont la toxicité était déjà connue) en triplicats durant des expérimentations de 96 h réalisées dans des microplaques de 48 puits. La croissance a été évaluée quotidiennement par mesure de la fluorescence de la chlorophylle et chaque puits a été prélevé en fin d'expérimentation afin de mesurer la densité cellulaire par cytométrie en flux. En parallèle, des tests abiotiques ont été réalisés dans des conditions identiques à celles du test de toxicité, afin de mesurer analytiquement les concentrations des substances testées dans les puits des microplaques. Enfin, pour deux substances, une comparaison entre la toxicité obtenue en microplaques et celle obtenue en ballons de culture a été réalisée.

## **Demonstrating the need of chemical exposure characterisation in a microplate test system: application to the toxicity screening of sixteen pesticides towards two marine microalgae**

Valentin Dupraz<sup>1,2</sup>, Sabine Stachowski-Haberkorn<sup>1</sup>, Jérémy Wicquart<sup>1</sup>, Nathalie Tapie<sup>3,4</sup>, Hélène Budzinski<sup>3,4</sup>, Farida Akcha<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ifremer, Laboratoire d'Écotoxicologie, rue de l'île d'Yeu, BP 21105, F-44311 Nantes cedex 03, France

<sup>2</sup> Université de Nantes, UFR Sciences et Techniques, 2, rue de la Houssinière, BP 92208, 44322 Nantes Cedex 03, France

<sup>3</sup> Université de Bordeaux, UMR 5805, EPOC, Laboratoire de Physico Toxico Chimie de l'environnement, 351 Cours de la Libération, CS 10004, F-33405 Talence Cedex, France

<sup>4</sup> CNRS, UMR 5805, EPOC, Laboratoire de Physico Toxico Chimie de l'environnement, 351 Cours de la Libération, CS 10004, F-33405 Talence Cedex, France

Corresponding author. E-mail address: [valentin.dupraz@ifremer.fr](mailto:valentin.dupraz@ifremer.fr)

doi:[10.1016/j.chemosphere.2019.01.035](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.035)

### **Keywords**

Microalgae; Microplates; Screening; Pesticides; Toxicity; Exposure characterisation

### **Highlights**

The toxicity of 17 substances was tested on two microalgae species.

A microplate assay was developed for accurate determination of EC<sub>50</sub> values.

Analytical measurement of exposure concentrations was performed.

Significant differences between nominal and measured concentrations were found.

Four herbicides, one insecticide and four fungicides induced a significant toxicity.

## Abstract

The vine-growing activity uses many pesticides which represent a potential risk for the aquatic environment due to drift during application, runoff and soil leaching. The toxicity of sixteen pesticides and one metabolite was evaluated on the growth of two marine microalgae, *Tisochrysis lutea* and *Skeletonema marinoi*, in 96 h exposure assays conducted in microplates. For each substance, concentrations of stock solutions were analytically measured, and abiotic assays were performed to evaluate the chemical stability of pesticides in microplates. For two chemicals out of 17, microalgae exposures were run at the same time in both microplates and culture flasks in order to compare EC<sub>50</sub> calculated from both exposure systems.

Results from chemical analyses pointed out the low stability of hydrophobic pesticides ( $\log K_{OW} > 3$ ). Thereby, for such chemicals, EC<sub>50</sub> values calculated using measured pesticide concentrations were two-fold lower than the ones firstly estimated using nominal concentrations. Photosystem II inhibitors were the most toxic herbicides, with EC<sub>50</sub> values below 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  for diuron and around twice as much for isoproturon. Chlorpyrifos-methyl was the only insecticide to significantly affect the growth of *T. lutea*, with an EC<sub>50</sub> around 400  $\mu\text{g L}^{-1}$ . All fungicides tested induced a significant toxicity for both species: strobilurins exhibited a low overall toxicity with EC<sub>50</sub> values around 400  $\mu\text{g L}^{-1}$ , whereas quinoxifen, and furthermore spiroxamine, caused high toxicity to both species, especially to *T. lutea* with an EC<sub>50</sub> below 1  $\mu\text{g L}^{-1}$  measured for spiroxamine in culture flasks. This study highlights the necessity of performing chemical analyses for reliable toxicity assessment and discusses the advantages and disadvantages of using microplates as an efficient toxicity screening tool.

## 2.1. Introduction

In France, viticulture accounts for about 15% of the total pesticide usage whereas it represents only 3% of the utilized agricultural area (UAA), thus implying a very high phytosanitary pressure (Butault *et al.*, 2011). While still ensuring a good quality of harvest and food protection, the use of pesticides also poses a risk for the surrounding environment, due to drift during application (Gil et Sinfort, 2005) and runoff (Leu *et al.*, 2004; Brady *et al.*, 2006).

Numerous studies pointed out the contamination of watercourses by vineyard activity in some European countries (Hildebrandt *et al.*, 2008; Herrero-Hernández *et al.*, 2013; Fernández *et al.*, 2015), including France (Louchart *et al.*, 2001; Rabiet *et al.*, 2010). In the Spanish wine region La Rioja, 62% of surface waters displayed a cumulative pesticide concentration higher than  $0.50 \mu\text{g L}^{-1}$  (Herrero-Hernández *et al.*, 2013). In France, Rabiet *et al.* (2010) monitored the fate of six pesticides for one year in the Morcille river (Beaujolais) and found concentrations of diuron ranging between 2.00 and  $12.0 \mu\text{g L}^{-1}$  from April to July. In comparison with continental waters, a cumulative annual average concentration of  $10.0 \mu\text{g L}^{-1}$  (for 56 pesticides monitored) was found in the coastal waters of the Ria Formosa Lagoon in Portugal (Cruzeiro *et al.*, 2015).

The term pesticides gathers all phytosanitary products (PPs) and biocides. PPs cover a wide variety of chemicals and can be grouped in several classes (like rodenticides, molluscicides, acaricides, algacides...*etc*), depending on their usage and modes of action (MoA): among these, herbicides, insecticides and fungicides are the three main classes; pesticides can also be sorted according to their chemical families (*i.e.*, phenylureas, organophosphates, strobilurins). Due to the great diversity of their MoA, they can affect many undesired targets due to physiological similarities with the target organisms. Herbicides can be responsible for harmful effects towards aquatic organisms such as phytoplankton (Pérès *et al.*, 1996; Roubeix *et al.*, 2012; Kim Tiam *et al.*, 2014a, 2014b; Moisset *et al.*, 2015). Insecticides can exhibit high toxicity towards zooplankton (Zalizniak and Nugegoda, 2006; Overmyer *et al.*, 2007; López-Mancisidor *et al.*, 2008). Fungicides can be toxic for a wider range of organisms (Ochoa-Acuña *et al.*, 2009) as their MoA is often not specific to fungi (Maltby *et al.*, 2009), involving enzymes that are highly conserved across fungi, plants and animals (Stenersen, 2004).

In order to assess the toxicity of such chemicals on microalgae, the actual standard procedures (OECD 201, 2011 ; ISO 10253:2016, 2016) recommend the use of glassware as testing material. Indeed, these standard procedures using culture flasks are the result of many experiments and years of work and are still considered as one of the most reliable tools for toxicity testing purposes using microalgae. Culture flasks present numerous advantages like, for example, a larger volume of culture which allow to perform multiple analyses on a single culture, that is not possible with microplates due to very reduced well volumes. However, when the main goal of an experiment is to determine

standard toxicity values such as EC<sub>50</sub> (which requires at least five concentrations tested in triplicates) for numerous chemicals, the use of culture flasks can become time- and space-consuming. In comparison, microplate-based phytotoxicity assays have rapidly become more and more common since their first appearance in the early 80's, as several authors pointed out their reliability for toxicity testing by demonstrating a good accordance in the toxicity obtained between microplate and culture flask test systems (Blaise *et al.*, 1986; St-Laurent *et al.*, 1992; Rojíčková *et al.*, 1998; Geis *et al.*, 2000; Eisentraeger *et al.*, 2003; Kim Tiam *et al.*, 2014a).

Most microplate-based assays using microalgae rely on chlorophyll fluorescence measurement as a proxy for algal growth. However, in some cases, it has been demonstrated that certain contaminants like glyphosate, paraquat or diuron significantly affected chlorophyll content and/or fluorescence (Prado *et al.*, 2011; Stachowski-Haberkorn *et al.*, 2013; Smedbol *et al.*, 2018). Consequently, the use of chlorophyll fluorescence for algal growth measurement in a microplate test system can be somehow biased depending on the contaminants tested.

One of the main remaining and often discussed issue in microplate test systems is the bioavailability of the tested chemicals in the microplate wells. Indeed, several studies demonstrated that one should be very careful when testing chemicals with high volatility and /or hydrophobicity as effective concentrations might be lower than nominal concentrations (Simpson *et al.*, 2003; Riedl and Altenburger, 2007). In addition to a higher potential sorption of chemicals to plastic (Stadnicka-Michalak *et al.*, 2014) compared to glass, the high surface/volume ratio in microplates can also induce excessive evaporation and/or sorption (Hörnström, 1990). As a consequence, exposure concentrations can be lower than the ones targeted, thus leading to an underestimation of the measured toxicity for the tested chemicals. It is therefore recommended to perform chemical analyses when testing chemicals with high volatility and/or hydrophobicity (Riedl and Altenburger, 2007; Tanneberger *et al.*, 2013), which is still rarely done in ecotoxicological studies nowadays.

Phytoplankton account for roughly half of the global primary production on Earth (Beardall et Raven, 2016) and occupy the first level of the oceanic food webs. They are considered as environmental quality indicators because of their worldwide distribution and are widely used as model organisms in standard toxicity assays because of their ease of culture in laboratory and short generation time.

In this study, 17 chemicals, including thirteen PPs used in viticulture, three biocides and one PP metabolite, were tested for their toxicity on two marine microalgal species: the haptophyte *Tisochrysis lutea* and the diatom *Skeletonema marinoi*.

To assess the reliability of a microplate-based toxicity assay for the screening of pesticides with various physicochemical properties, this study aimed:

1. To evaluate the stability of the tested chemicals in the culture medium and in the microplate wells over the 96 h experiment period.
2. To perform the toxicity screening of sixteen pesticides and one metabolite on the two species of microalgae using the microplate-based growth inhibition assay.
3. To compare EC<sub>50</sub> values obtained using: i) nominal vs measured concentrations; ii) microplate and culture flask test systems.

To answer these questions, a 96 h growth inhibition assay was adapted (Blaise *et al.*, 1997; Eisentraeger *et al.*, 2003; Riedl and Altenburger, 2007) in 48-well microplates. Abiotic assays were carried out to evaluate the stability of the tested chemicals in microplates by measuring effective exposure concentrations in the culture medium by liquid or gas chromatography tandem mass spectrometry analysis (LC/MS/MS or GC/MS/MS). Microalgae exposure experiments were performed in order to allow comparisons between the toxicity values obtained in microplate and glass flasks. Concentration-response experiments were then achieved in microplates to determine EC<sub>50</sub> values for sixteen selected pesticides and one metabolite on the two microalgal species.

The major interest of this study lies in the combination of both analytical determination of exposure concentrations and comparison of the toxicity response obtained in both microplates and glass flasks, hence allowing the proposal of a reliable unbiased toxicity dataset for the tested substances. The application of the proposed microplate toxicity assay to the toxicity screening of pesticides exhibiting various physicochemical properties is discussed, and recommendations regarding its use are given.

## 2.2. Material and methods

### 2.2.1. Chemical preparation

All chemicals used in this study (Table 9) were purchased from Sigma-Aldrich. Internal standards, diuron-d6, isoproturon-d6, carbofuran-d3, terbutryn-d5, metolachlor-d6, cis-permethrin-13C, chlorpyrifos-d10, chlorpyrifos-methyl-d6, fipronil-13C-15N, imidacloprid-d4, atrazine-d5, quizalofop-ethyl-d3 were purchased from Cluzeau Info Labo (Sainte Foy la Grande, France).

Stock solutions were prepared in pure methanol ( $\geq 99\%$ ) except for glyphosate and AMPA that were prepared in sterile ultra-pure water, and for flazasulfuron, acrinathrin and spiroxamine that were prepared in pure acetone ( $\geq 99\%$ ). These stock solutions were diluted in their respective solvent to make working solutions. The nominal concentrations of the stock and working solutions were calculated from weighed masses of the active substances and solvent. These solutions were then analysed by liquid or gas chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS or GC-MS/MS, 2.2.4) and the measured concentrations are available as supplementary material (Table S3a). The measured concentrations of the stock solutions were then used *a posteriori* to correct the nominal exposure concentrations (then called 'corrected nominal concentrations') in the toxicity assays (see section 2.2.6.1 for further details).

Table 9 : Chemicals tested in this study, their physicochemical properties, known modes of action (MoA). Substances displayed as biocides are no longer allowed in any agricultural applications, while all the remaining are phytosanitary products (PPs) allowed in viticulture or other agricultural applications. (sources: Pesticide Properties DataBase, Lewis *et al.*, 2016, E-Phy / ANSES, <https://ephy.anses.fr/> and European chemical agency (ECHA): <https://echa.europa.eu/fr/home>).

Class	Chemical	Family	Log $K_{ow}$	Log $H$	Log $S$	Photolysis DT <sub>50</sub> (d)	Hydrolysis DT <sub>50</sub> (d)	Mode of action
<b>Biocides</b>	diuron	phenylurea	2.87	-7.52	4.54	43.0	stable	inhibition of photosynthesis at photosystem II
	isoproturon	phenylurea	2.50	-4.84	4.85	48.0	stable	inhibition of photosynthesis at photosystem II
	fipronil	phenylpyrazole	3.75	-3.64	3.58	0.33	stable	GABA-gated chloride channel antagonist
<b>Herbicides</b>	flazasulfuron	sulfonylurea	-0.06	-5.59	6.32	stable	11.0	inhibition of acetolactate synthase (ALS)
	metazachlor	chloroacetanilide	2.13	-4.23	5.65	stable	stable	inhibition of elongase and geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP)
	S-metolachlor	chloroacetanilide	2.90	-2.66	5.68	stable	stable	inhibition of elongase and geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP)
	glyphosate	glycine	-3.20	-6.68	7.02	69.0	stable	inhibition of EPSP synthase
	AMPA	(glyphosate metabolite)	-1.63	-0.80	9.17			
<b>Insecticides</b>	$\alpha$ -cypermethrin	pyrethroid	5.50	-1.16	0.60	6.30	70.00	sodium channel modulator
	acrinathrin	pyrethroid	5.24	-1.97	0.34	2.30	stable	sodium channel modulator
	chlorpyrifos	organophosphate	4.70	-0.32	3.02	29.6	16.0	inhibition of acetylcholine esterase
	chlorpyrifos-methyl	organophosphate	4.24	-0.63	3.44	1.74	21.0	inhibition of acetylcholine esterase
	imidacloprid	neonicotinoid	0.57	-9.77	5.79	0.20	stable	nicotinic acetylcholine receptor agonist
<b>Fungicides</b>	azoxystrobin	strobilurine	2.50	-8.13	3.83	8.70	stable	inhibition of the respiratory chain at the level of Complex III
	kresoxim-methyl	strobilurine	3.40	-3.44	3.30	18.2	35.0	inhibition of the respiratory chain at the level of Complex III
	quinoxifen	quinoline	4.66	-1.50	1.67	0.80	stable	disruption of early cell signalling events
	spiroxamine	morpholine	2.89	-2.42	5.61	50.5	stable	inhibition of sterol biosynthesis

## 2.2.2. Microalgal cultures

The marine microalga *Tisochrysis lutea* (Haptophyta) CCAP 927/14 was purchased from the Culture Center of Algae and Protozoa (CCAP, Oban, Scotland). The marine diatom *Skeletonema marinoi* (Bacillariophyta) AC174, was purchased from the University of Caen Algobank (Caen, France). Microalgal cultures were maintained in sterile f/2 (for *T. lutea*) and f/2-silica (f/2-Si; for *S. marinoi*) medium (Guillard et Ryther, 1962 ; Guillard, 1975) at  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ , in a thermostatic chamber at  $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Quantometer Li-Cor Li-250 equipped with a spherical sensor), with a dark:light cycle of 8:16 h. Cultures were grown in 100 mL round borosilicate sterile glass flasks previously heated to  $450^\circ\text{C}$  for 6 h and autoclaved 20 min at  $121^\circ\text{C}$ , and then filled with 50.0 mL of culture medium. Cultures were diluted weekly in order to maintain an exponential growth phase.

## 2.2.3. Exposure experiments

### 2.2.3.1. Microplate toxicity assay

The microplate toxicity assay consisted in concentration-response experiments conducted with each microalga and chemical to be tested. The aim was to calculate the  $\text{EC}_{50}$  for each chemical, meaning the Effective Concentration inducing a 50% inhibition on growth rate of the microalga after a 96 h exposure. For these experiments, transparent polystyrene 48-well microplates (Greiner Bio-One GmbH, cat. 677102, untreated) were used, each well being filled with 0.90 mL of sterile f/2 (for *T. lutea*) or f/2-Si (for *S. marinoi*) culture medium. Microplates were covered with their own lid, allowing gas exchanges. Peripheral wells were not used in order to avoid edge effect (Caux *et al.*, 1992; St-Laurent *et al.*, 1992); instead, they were filled with 1.00 mL of sterile  $0.20 \mu\text{m}$  filtered milli-Q water to prevent evaporation and maintain high humidity. For the toxicity screening experiments, one test was carried out for each substance to be tested. The test consisted in the exposure to five nominal concentrations, 1.00, 10.0, 100, 500 and  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ , in triplicates (three wells), six solvent-control (SC) containing the highest solvent percentage used in the microplate (max 0.1%) and three controls (C) without solvent (supplementary material: Figure S3a). For diuron, as this chemical had already been tested in preliminary experiments, a refined range was used. When needed, some chemicals were tested a second time using a refined range of six concentrations in order to improve the determination of their  $\text{EC}_{50}$ . Prior to the distribution in the triplicate wells of the microplate, both chemical and solvent solutions were prepared at targeted concentrations in sterile glass flasks (one glass flask per tested chemical and concentration) containing 25.0 mL of sterile culture medium.

After measurement of the cell density by flow cytometry, 0.10 mL of the diluted microalgal culture was added in each assay well to reach a concentration of  $20,000 \text{ cell mL}^{-1}$  at the beginning of exposure.

The final volume of each well was 1.00 mL. After 96 h, the whole content of each well was recovered, fixed using glutaraldehyde (final concentration 0.25%), left in the dark during 10 min before being frozen and stored in liquid nitrogen (-196°C) up to cell density analysis by flow cytometry.

### **2.2.3.2. Culture flask toxicity assay**

Toxicity assays using glass culture flasks were also performed in the same culture conditions as the microplate assays for two selected chemicals (isoproturon and spiroxamine) in order to compare the toxicity response between the two test systems, glass culture flasks versus microplate. These two chemicals were selected because of their high toxicity for both algal species, their different carrier solvent (methanol vs. acetone, 2.2.2.1), as well as their appartenance to two distinct usages and chemical families. For these experiments, microalgae were exposed to a refined range of six concentrations, in triplicates, based on EC<sub>50</sub> values obtained during the previous microplate toxicity assay. Three solvent-controls containing the highest solvent percentage were performed; to note, six wells for the solvent-controls were identified in the microplate toxicity assay. Chemical and solvent solutions were prepared at targeted concentrations in 50.0 mL sterile f/2 (for *T. lutea*) or f/2-Si (for *S. marinoi*) culture medium. For each species, a stock culture was analysed by flow cytometry for the measurement of microalgal cell density: then, depending on the species and cell density, between 0.10 and 0.50 mL of stock culture was added to each flask to reach an initial concentration of 20,000 cell mL<sup>-1</sup> at the beginning of experiment. During the experiment, each culture was sampled daily (0.50 mL) for cell density analysis by flow cytometry.

### **2.2.3.3. Chemical stability of tested substances in the microplates**

In order to investigate the chemical stability of each tested substance in the microplate for the 96 h duration of the test (supplementary material: Tables S3b and S3c), an abiotic assay was run under the same conditions as the microplate toxicity assay (2.2.3.1): strictly the same nominal concentrations, operating mode and experimental design. The only difference was that no microalga was introduced in the wells. Triplicates (three wells) were used for solvent-control and contaminated wells: for each chemical and concentration, 1.00 mL was pipetted out from the first triplicate well in a clean glass vial at the beginning of the test (0 h), the second triplicate was sampled after 6 h and the third and last triplicate was sampled after 96 h. The vials were then stored at -20°C before chemical analysis.

## 2.2.4. Chemical analysis

For each sample (stock solutions and chemical stability assay), serial dilutions in ultra-pure water were performed to reach a final concentration of 0.20 or 0.10  $\mu\text{g L}^{-1}$  before analysis.

The method used to quantify glyphosate and AMPA was adapted from Fauvelle *et al.* (2015). Samples containing glyphosate and AMPA were extracted through solid phase extraction (SPE) on Oasis HLB<sup>®</sup> (60 mg, 3.00 mL, Waters<sup>®</sup>) cartridges after derivatization by FMOC-Cl (9-Fluorenylmethoxycarbonyl chloride). Analyses were then performed by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS; Agilent LC 1290 infinity - 6460 triple quad) equipped with an electrospray ionization (ESI) source used in positive mode.

The method used to quantify diuron, isoproturon, flazasulfuron, metazachlor, S-metolachlor, imidacloprid, azoxystrobin, kresoxim-methyl, quinoxifen and spiroxamine was adapted from Belles *et al.* (2014). Analyses were performed by direct injection ( $V_{\text{injection}} = 40.0 \mu\text{L}$ ) in a liquid chromatography tandem mass spectrometer (LC-MS/MS; Agilent LC 1290 infinity - 6460 triple quad) equipped with an ESI source used in positive mode.

The method used to quantify  $\alpha$ -cypermethrin, acrinathrin, chlorpyrifos, chlorpyrifos-methyl and fipronil was adapted from Belles *et al.* (2014). Analyses were performed by solid phase microextraction (SPME) coupled with gas chromatography tandem mass spectrometry (GC-MS/MS; Agilent GC 7890 - 7000 triple quad).

Analytical methods were validated in terms of extraction recoveries (samples of fortified mineral water at 0.20  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) and limits of quantifications (LOQ: signal to noise ratio  $\geq 10$ ). For each series of analysis, blank experiments (complete procedure but without matrix) were performed. Control calibrating standards (0.20  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) were also injected every 15 samples and analytical blanks were performed.

The detailed analytical method for these analyses is described in supplementary material (Table S3d).

## 2.2.5. Growth measurement in microplates and culture flasks

As pointed out in the introduction, chlorophyll content per microalgal cell, as well as chlorophyll fluorescence, can be modified upon exposure to pesticides. Absorbance at 750 nm, which could have permitted to avoid a potential bias in growth measurement due to chlorophyll alteration, could not be used because the signal was too weak at the beginning of the experiment. Therefore, in order to evaluate to what extent a possible effect on chlorophyll fluorescence could skew growth rate calculation, both chlorophyll fluorescence (using a microplate reader) and cell density (using a flow cytometer) were used to determine the growth rate of microalgal cells in microplates. Due to the

volume required to perform flow cytometry analysis (50-100  $\mu\text{L}$ ), only the final cell density was measured.

Microalgal growth in microplates was measured daily using a SAFIRE microplate reader (TECAN) with XFluor4beta Excel macro as software. Excitation/emission wavelengths were: 450/684 nm (10 nm bandwidth), 9 reads were performed per well from the bottom, with an integration time of 20  $\mu\text{s}$ . Each microplate was shaken during 20 s before the reading, using an Orbis Plus (Mikura Ltd) microplate shaker in orbital mode. For each well, the growth rate was calculated using the following equation:  $\mu = \ln (F_t - F_0) / t$ , where  $F_t$  was the fluorescence (a.u.) of the well at  $t$  (hours),  $\mu$  ( $\text{hours}^{-1}$ ) was the growth rate and  $F_0$  the initial fluorescence intensity at  $t = 0$  h.

For cell density measurement, samples were run on an Accuri C6 flow cytometer (Becton Dickinson Accuri™) equipped with a blue (488 nm) and a red (640 nm) laser, detectors of forward (FSC) and side (SSC) light scatter, along with four fluorescence detectors:  $530 \pm 15$  nm (FL1),  $585 \pm 20$  nm (FL2),  $> 670$  nm (FL3) and  $675 \pm 12.5$  nm (red laser, FL4). FL1 vs FL4 channel density-plots were used to analyse both microalgal species and each species was gated to avoid counting non-microalgal particles. The growth rate was calculated with the following equation:  $\mu = \ln (C_t - C_0) / t$ , where  $C_t$  was the cell concentration ( $\text{cell mL}^{-1}$ ) at  $t$  (hours),  $\mu$  ( $\text{hours}^{-1}$ ) was the growth rate and  $C_0$  the initial cell concentration at  $t = 0$  h.

## 2.2.6. Statistical analysis

### 2.2.6.1. Concentration-response analysis

Concentration-response analysis were carried using R software 3.4.3 with 'drc' package (Ritz and Streibig, 2005; Ritz *et al.*, 2015). For each chemical, the single three parameter log-logistic regression model LL.3, equation (1) was applied:

$$U = \frac{d}{\left(1 + \left(\frac{x}{\text{EC50}}\right)^b\right)} \quad (1)$$

where  $b$  is the slope and  $d$  the upper-limit determined by the fitted concentration-response model, and  $U$  the response, in our case the growth rate ( $\mu$ ), at the concentration  $x$ .

Thanks to the chemical analyses performed on the stock solutions (supplementary material: Table S3a) and their dilutions in the microplate wells (supplementary material: Table S3b), three  $\text{EC}_{50}$  values were calculated for each chemical (except for diuron and S-metolachlor, as only one concentration was measured in the abiotic assay) considering the three possible expressions of exposure concentrations:

- i. nominal concentrations, theoretically calculated using the nominal stock solution concentrations;
- ii. corrected nominal concentrations, theoretically calculated using the measured stock solution concentrations;
- iii. measured concentrations, the chemical concentrations in the wells reached at the beginning of the exposure as measured by chemical analysis.

In addition, a fourth  $EC_{50}$  value was calculated using measured concentrations and cell density (measured at the beginning and at the end of the experiment; 2.2.3.1) instead of fluorescence, to assess the potential bias associated with the use of chlorophyll fluorescence to measure growth rate.

### 2.2.6.2. Principal component analysis

A principal component analysis (PCA) was performed, using the R package 'FactoMineR' (Lê *et al.*, 2008), to illustrate the relationships between the concentrations measured in the microplate wells after 0, 6 and 96 h of exposure (2.2.3.3; supplementary material: Table S3c), and the physicochemical properties of the chemicals (Table S3a), namely: the octanol-water partition coefficient,  $\log K_{OW}$ , reflecting hydrophobicity (chemicals with a  $\log K_{OW} < 3$  are considered as hydrophilic whereas those with a  $\log K_{OW} > 3$  are considered as hydrophobic); Henry's law constant,  $\log H$  (in  $\text{atm m}^3 \text{mol}^{-1}$ ), reflecting volatility (chemicals with a  $\log H < -5.61$  are considered as non-volatile whereas those with a  $\log H > -5.61$  are considered as volatile) (Tanneberger *et al.*, 2013); the solubility at 20°C pH 7 (in  $\text{mg L}^{-1}$ ) in water,  $\log S$  (higher solubility for higher values). As the physicochemical parameters of the chemicals were not measured in our experiment but taken from a database, these variables were considered as supplementary variables, which means they had no influence on the principal components of the analysis but help to interpret the dimensions of variability. Two individuals (out of 65) were considered as outliers and were therefore removed from the dataset before analysis: CYP-3 and KRE-3.

## 2.3. Results

In the “Results” section, and later in the discussion, the substances diuron and isoproturon will be considered as part of the ‘herbicides’ group, as their physicochemical properties and MoA are similar to those of herbicides. Similarly, fipronil will be considered as part of the ‘insecticides’ group.

### 2.3.1. Chemical analyses

When comparing the nominal (calculated from weighed mass, 2.2.1) and measured stock solutions concentrations (supplementary material: Table S3a) it appears that for almost all herbicides, the percentage of variation between the two is often below 30%, except for metazachlor solution S2 and S3, and all AMPA solutions. Regarding insecticides, measured concentrations of imidacloprid and fipronil stock solutions, as well as chlorpyrifos solution S1 were rather close to the nominal concentration. For the other insecticides, the percentage of variation was higher, especially for the two pyrethroid  $\alpha$ -cypermethrin and acrinathrin. Finally, differences between nominal and measured stock solutions for fungicides were comprised between 30% and 65% apart from azoxystrobin and solution S3 of quinoxyfen.

Results from the chemical stability study of tested pesticides in microplate showed that the targeted concentrations (corrected nominal concentrations) at the beginning of the exposure were rarely reached (supplementary material: Tables S3b and S3c). The measured concentrations in the microplate wells at 0 h were usually lower than expected. For herbicides, about at least 60% of the chemical were recovered in the wells at the beginning of the abiotic experiment. For insecticides, percentages of recovery at the beginning of the exposure were lower, especially for  $\alpha$ -cypermethrin, acrinathrin (except at concentration C3 where an anomaly was noticed for both of them) and chlorpyrifos (except at concentration C1). For fungicides, the percentages of chemical recovered at the beginning of the exposure were close to the ones obtained for herbicides (except three lower values for quinoxyfen at C2 and C4 and spiroxamine at C3).

The percentage of chemical recovered after 6 and 96 h (compared to the corrected nominal concentration introduced at the beginning of the test) varied among the tested chemicals too (supplementary material: Table S3c). All herbicides tested showed a good overall stability, except flazasulfuron for which an important loss of concentration was observed after 96 h (5-10% recovered for C1, C2 and C3). On the contrary, insecticides had a poor stability in the test system, especially pyrethroids  $\alpha$ -cypermethrin and acrinathrin, for which less than 10% was recovered after 96 h, regardless of the concentration introduced at the beginning of the test. For the organophosphate chlorpyrifos, important loss in concentration was also observed after 96 h, especially at the highest

tested concentrations (C3, C4 and C5). Imidacloprid and fipronil seemed to have a good stability during the 96 h test period, although only one concentration was tested. For fungicides, the stability was slightly lower than herbicides but higher than insecticides, the percentage recovered after 96 h being generally above 50% for azoxystrobin and kresoxim-methyl (except an anomaly at C3), around 40-50% for spiroxamine (except a small anomaly at C2), and 20-30% for quinoxyfen (except an anomaly at C1 after 6 h).

For all chemicals tested, the percentages recovered at all measurement times (0, 6 and 96 h) were confronted in a PCA (Figure 43), using the physicochemical properties of the chemicals as supplementary variables.

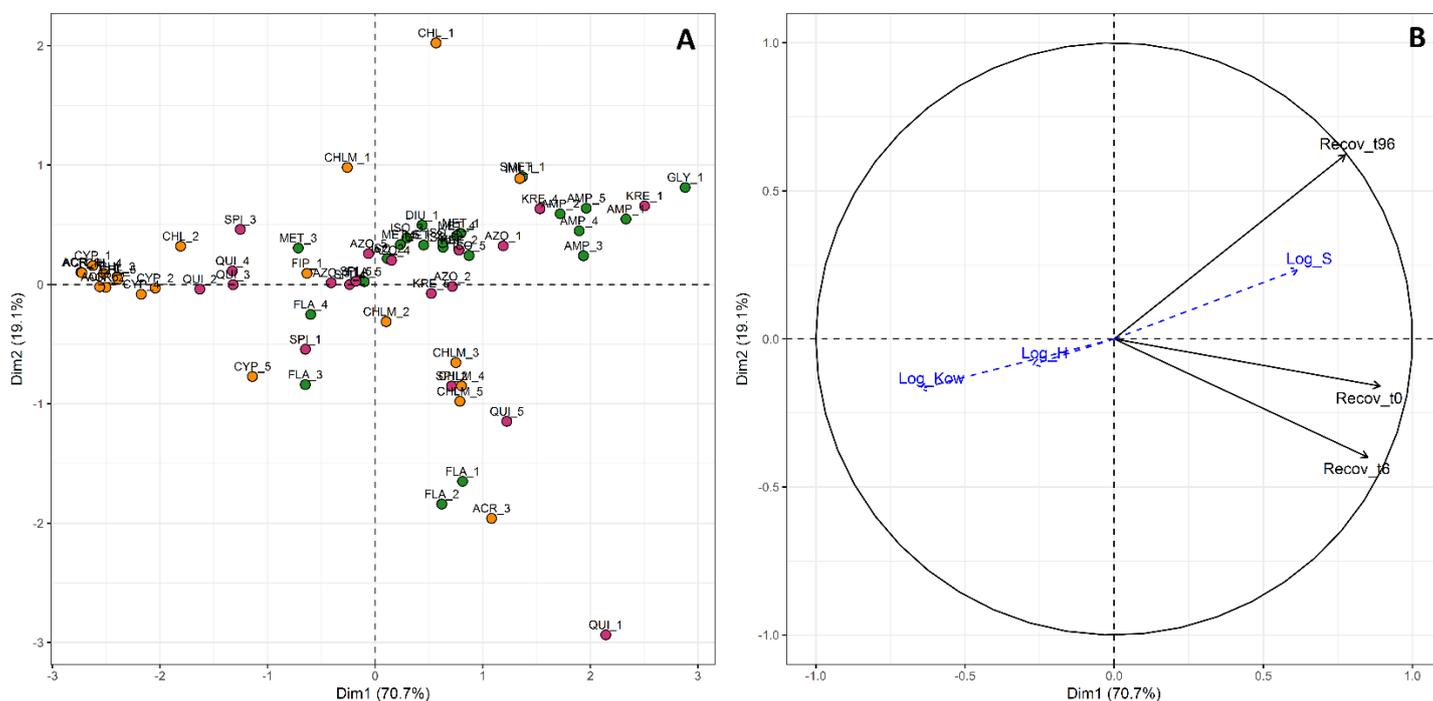


Figure 43: Principal component analysis (PCA) illustrating the relationships between concentrations measured in the microplate wells after 0, 6 and 96 h of exposure and physicochemical properties of the chemicals (Log  $K_{ow}$ , Log  $H$ , Log  $S$ ) added as supplementary variables. On the left (A) is the projection of individuals grouped by pesticide class: green for herbicides, orange for insecticides and pink for fungicides. Individuals are named using the first three letters of the chemical and the concentration level (*i.e.* 1 for C1 etc.). On the right (B) is the factor map of variables on the two first axes (supplementary quantitative variables are represented in blue with dashed arrows).

Regarding the PCA (Figure 43), the first two axes (Dim1 and Dim2) explain around 90% of the total variance. The first axis (Dim1) represents the global percentage of recovery: on the left are the less stable chemicals with very low percentages of recovery at 0, 6 and 96 h, like insecticides  $\alpha$ -cypermethrin (CYP), acrinathrin (ACR) and some fungicides like quinoxyfen (QUI) (Figure 43A); on the right are the most stable chemicals, represented by a majority of herbicides (glyphosate “GLY”, AMPA “AMP”, isoproturon “ISO”, metazachlor “MET”). The vertical axis represents the temporal variation: for example, on the bottom-right corner are pesticides with a high percentage recovered at 0 and/or 6 h but very low percentage of recovery after 96 h (FLA\_1, FLA\_2 and ACR\_3). Two

individuals, CHL\_1 and QUI\_1 are separated from the rest because of their unexpected behaviour: the percentage recovered after 6 h decrease then increase again after 96 h (CHL\_1) or vice versa (QUI\_1). Analysis of the variable factor map (Figure 43B) shows that the percentage of chemical recovered after 96 h (and to a lesser extent after 0 and 6 h) is correlated with the hydrophobicity ( $\log K_{OW}$ ) and solubility ( $\log S$ ) of the chemical: the more hydrophobic (and thus, the less soluble) the chemical is, the lower is the percentage recovered. The volatility of the chemicals ( $\log H$ ) had almost no influence on the percentage of chemical recovered.

In general, herbicides, which are not very hydrophobic ( $\log K_{OW} < 3$ ) and thus well soluble in water exhibited a good stability in microplates. Four insecticides ( $\alpha$ -cypermethrin, acrinathrin, chlorpyrifos and chlorpyrifos-methyl) and one fungicide (quinoxifen), which are very hydrophobic ( $\log K_{OW} > 4$ ) and thus poorly soluble in water, were recovered at very low concentrations at all measurement times and/or exhibited important loss of concentration over time.

### 2.3.2. Toxicity screening of 17 pesticides

Among the 17 chemicals tested, 9 induced sufficient toxicity to allow the calculation of an  $EC_{50}$  (Table 10), namely: herbicides diuron, isoproturon, metazachlor and S-metolachlor; the insecticide chlorpyrifos-methyl and all fungicides. As shown by the different shapes of the concentration-response curves (Figures 44 and 45), tested chemicals exhibited various toxicity patterns, some were characterized by a progressive descending slope like diuron, azoxystrobin, kresoxim-methyl, while others being characterized by steep slopes like quinoxifen and chlorpyrifos-methyl. Looking at the differences in sensitivity between the two tested species, *T. lutea* was not sensitive to the two chloroacetanilides metazachlor and S-metolachlor but exhibited significant sensitivity to the insecticide chlorpyrifos-methyl while *S. marinoi* was not sensitive to this chemical. Only three chemicals were responsible for a 50% inhibition of *T. lutea* growth rate for a concentration below  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ : diuron, isoproturon and spiroxamine.

Table 10 : EC<sub>50</sub> values ( $\pm$  95% confidence interval) computed with the three expressions of exposure concentrations (2.6.1) (see the description below the table) for the two species of microalgae. Note that only chemicals with data permitting the calculation of the EC<sub>50</sub> are displayed; data for diuron and S-metolachlor come from preliminary experiments and therefore did not permit to compute the “Measured” and “Cell density” modalities.

Class	Chemical	<i>Tisochrysis lutea</i>				<i>Skeletonema marinoi</i>			
		EC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )							
		Nominal <sup>(1)</sup>	Corrected nominal <sup>(2)</sup>	Measured <sup>(3)</sup>	Cell density <sup>(4)</sup>	Nominal	Corrected nominal	Measured	Cell density
Biocides	diuron	3.79 $\pm$ 0.16	2.20 $\pm$ 0.071			10.3 $\pm$ 0.80	7.26 $\pm$ 1.23		
	isoproturon	12.1 $\pm$ 5.48	13.0 $\pm$ 6.76	8.55 $\pm$ 3.39	8.24 $\pm$ 5.11	26.7 $\pm$ 2.22	26.9 $\pm$ 2.26	21.2 $\pm$ 1.80	18.3 $\pm$ 1.29
Herbicides	metazachlor					323 $\pm$ 41.4	370 $\pm$ 43.2	245 $\pm$ 24.7	563 $\pm$ 121
	S-metolachlor					937 $\pm$ 130	1032 $\pm$ 138		
Insecticides	chlorpyrifos-methyl	877 $\pm$ 13.7	406 $\pm$ 6.33	449 $\pm$ 6.70	390 $\pm$ 19.3				
Fungicides	azoxystrobin	750 $\pm$ 246	624 $\pm$ 207	434 $\pm$ 144	112 $\pm$ 32.2	1799 $\pm$ 462	1504 $\pm$ 386	917 $\pm$ 189	479 $\pm$ 52.5
	kresoxim-methyl	1220 $\pm$ 262	602 $\pm$ 127	414 $\pm$ 65	261 $\pm$ 34.0	1517 $\pm$ 245	753 $\pm$ 119	482 $\pm$ 56.9	386 $\pm$ 44.4
	quinoxifen	820 $\pm$ 19.0	320 $\pm$ 7.1	378 $\pm$ 29.6	295 $\pm$ 39.3	124 $\pm$ 82.8	68.8 $\pm$ 33.0	33.0 $\pm$ 8.49	47.3 $\pm$ 1.20
	spiroxamine	8.28 $\pm$ 2.34	5.04 $\pm$ 1.37	3.37 $\pm$ 0.74	1.10	67.8 $\pm$ 80.4	45.7 $\pm$ 44.6	12.4 $\pm$ 5.63	11.3 $\pm$ 11.7

<sup>(1)</sup> **Nominal**: nominal concentrations calculated using stock solution concentrations calculated by weighing; <sup>(2)</sup> **Corrected nominal**: corrected nominal concentrations calculated using measured stock solution concentrations; <sup>(3)</sup> **Measured**: measured concentrations in the microplate wells from the chemical stability experiments (2.3.2); <sup>(4)</sup> **Cell density**: EC<sub>50</sub> calculation was estimated using the cell density measured by flow cytometry at the beginning and at the end of the test (0 and 96 h) instead of fluorescence (used for the 3 modalities above) and measured concentrations. Note that, for spiroxamine with *T. lutea*, no confidence interval could be computed due to a poor fit of the model.

As stated in the material and method (2.2.6.1), three different expressions of the exposure concentrations were used to calculate different EC<sub>50</sub> values for each chemical (except for diuron and S-metolachlor). When comparing the three EC<sub>50</sub> values, it appears that they are within the same range for herbicides, with less than two-fold differences, for example:  $12.1 \pm 5.48$ ,  $13.0 \pm 6.76$  and  $8.55 \pm 3.39 \mu\text{g L}^{-1}$  for isoproturon on *T. lutea*, using nominal, corrected nominal and measured concentrations, respectively;  $323 \pm 41.4$ ,  $370 \pm 43.2$  and  $245 \pm 24.7 \mu\text{g L}^{-1}$  for metazachlor on *S. marinoi*, using nominal, corrected nominal and measured concentrations, respectively. For insecticides and fungicides, more than two-fold lower values were obtained using either the corrected nominal or measured concentration, for example:  $877 \pm 13.7$ ,  $406 \pm 6.33$  and  $449 \pm 6.70 \mu\text{g L}^{-1}$  for chlorpyrifos-methyl on *T. lutea* using nominal, corrected nominal and measured concentrations, respectively;  $124 \pm 82.8$ ,  $68.8 \pm 33.0$  and  $33.0 \pm 8,49 \mu\text{g L}^{-1}$  for quinoxifen on *S. marinoi* using nominal, corrected nominal and measured concentrations, respectively.

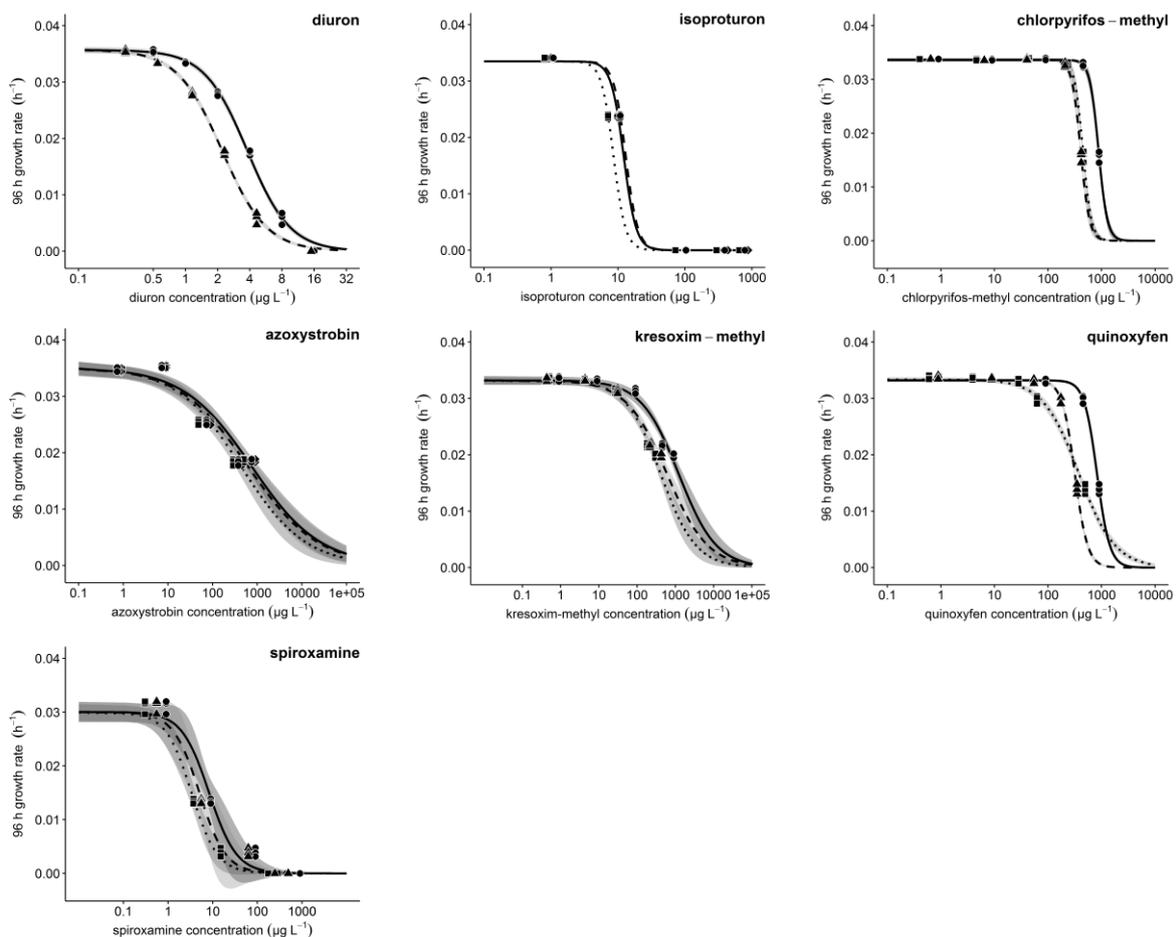


Figure 44: Concentration-response curves for all substances tested on *Tisobrysis lutea*. Points (in triplicates; dots: nominal concentration; squares: corrected nominal concentration; triangles: measured concentration) correspond to the 96 h growth rate. Lines (straight line: nominal concentration; dashed line: corrected nominal concentration; dotted line: measured concentration) correspond to the fitted three parameter log-logistic model with their respective 95% confidence interval in gray.

Looking at the concentration-response curves (Figures 44 and 45), those computed with corrected nominal (dashed line) or measured (dotted line) concentrations are shifted to the right, implying lower  $EC_{50}$  values. If looking at the difference between  $EC_{50}$  values calculated with corrected nominal and measured concentrations, it appears that, for all chemicals (except chlorpyrifos-methyl),  $EC_{50}$  values calculated using the measured concentration were lower. Interestingly, these differences were higher for *S. marinoi* (more than two-fold differences for quinoxifen and spiroxamine) than for *T. lutea* (less than two-fold differences).

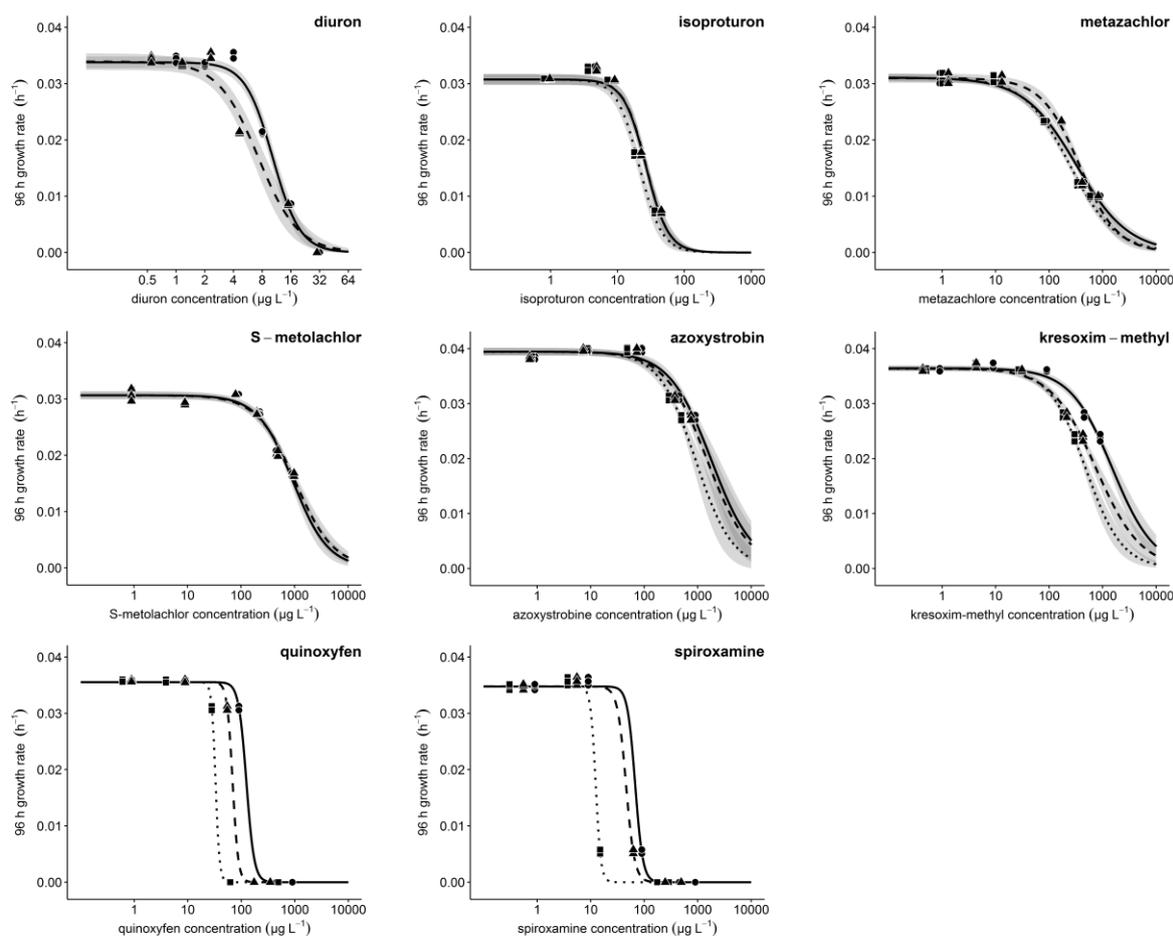


Figure 45: Concentration-response curves for all substances tested on *Skeletonema marinoi*. Points (in triplicates; dots: nominal concentration; squares: corrected nominal concentration; triangles: measured concentration) correspond to the 96 h growth rate. Lines (straight line: nominal concentration; dashed line: corrected nominal concentration; dotted line: measured concentration) correspond to the fitted three parameter log-logistic model with their respective 95% confidence interval in gray.

Both fluorescence (measured daily) and cell density (measured at the beginning and at the end of the exposure) were used to calculate growth rate (Table 10). However,  $EC_{50}$  values using cell density were only calculated based on measured concentrations, as they are considered the most accurate among all. As a consequence,  $EC_{50}$  values based on cell density must only be compared with  $EC_{50}$  values calculated with measured concentrations. The  $EC_{50}$  obtained with *S. marinoi* exposed to metazachlor is two-fold higher when using the cell density ( $563 \pm 121 \mu\text{g L}^{-1}$ ) instead of fluorescence ( $245 \pm$

24.7  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) for growth rate determination. On the contrary,  $\text{EC}_{50}$  values for azoxystrobin and kresoxim-methyl are much lower when using the cell density for both species, with a four-fold difference on *T. lutea* for azoxystrobin ( $112 \pm 32.2$  and  $434 \pm 144 \mu\text{g L}^{-1}$  for cell density and fluorescence, respectively). For isoproturon, chlorpyrifos-methyl and quinoxyfen, there is almost no difference between the two values with *T. lutea*, while two-fold higher value were obtained for quinoxyfen with *S. marinoi*. Finally, regarding spiroxamine, a three-fold lower value was found for *T. lutea*, while no significant difference was observed for *S. marinoi*. However, the very poor fit of the log-logistic model in these cases does not permit to give a reliable interpretation.

### 2.3.3. Comparison between microplate and culture flask exposure systems

Note that, for these experiments, no analytical measurements of the concentrations were made. Thus,  $\text{EC}_{50}$  values given below were calculated using corrected nominal concentrations.

To evaluate the differences in toxicity that could exist when conducting the assay in microplates rather than in culture flasks, two of the most toxic substances, isoproturon (herbicide) and spiroxamine (fungicide), were tested simultaneously in both systems. Contrasted results were obtained depending on the species and/or chemical, as shown by the different patterns obtained for the concentration-response curves (Figure 46).

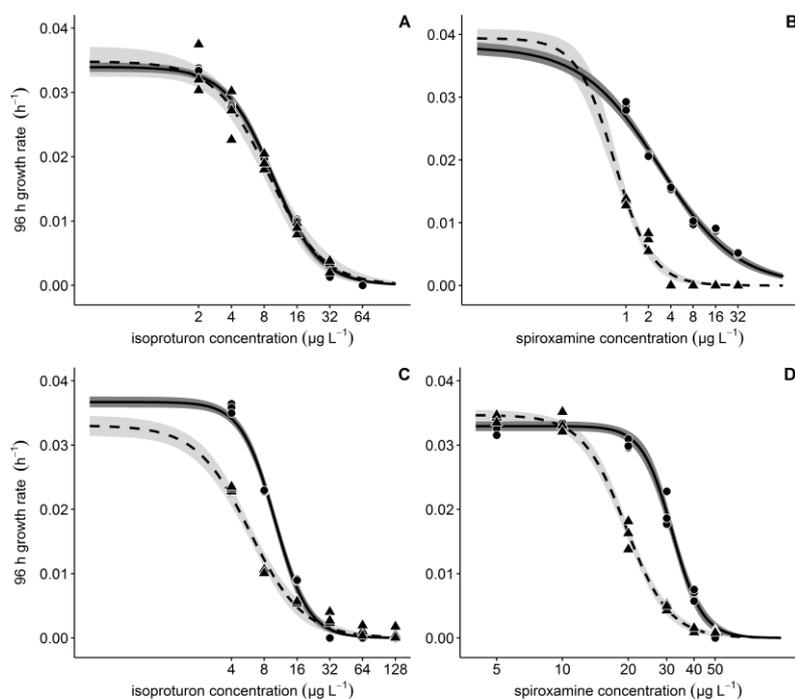


Figure 46: Comparison of concentration-response curves obtained in microplate and culture flasks for *Tisochrysis lutea* (A, B) and *Skeletonema marinoi* (C, D). Points (in triplicates; dots: microplate; triangles: culture flasks) correspond to the 96 h growth rate. Lines (microplate: straight line; culture flasks: dashed line) correspond to the fitted three parameter log-logistic model with their respective 95% confidence interval in gray.

For *T. lutea*, isoproturon exhibited a very similar toxicity between the two test systems, as shown by the two concentration-response curves being superimposed, and EC<sub>50</sub> values of  $9.57 \pm 0.57$  and  $8.68 \pm 1.40 \mu\text{g L}^{-1}$ , for the microplate and the culture flasks respectively. The same experiment conducted with the diatom *S. marinoi* led to a bigger difference in EC<sub>50</sub> values, with values of  $10.0 \pm 0.50$  and  $5.90 \pm 0.59 \mu\text{g L}^{-1}$ , for the microplate and the culture flasks, respectively. The difference is particularly noticeable for the two lower concentrations tested. Looking at the fungicide, spiroxamine exhibited a four-fold higher toxicity in culture flasks compared to the microplate for *T. lutea*, with EC<sub>50</sub> values of  $2.80 \pm 0.35$  and  $0.70 \pm 0.10 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectively. In this case, the difference in toxicity is obvious when looking at the concentration-curves: the two lowest concentrations induced a two-fold higher effect in culture flasks, and higher concentrations resulted in complete inhibition of microalgal growth which was not observed in microplate. Finally, spiroxamine induced a higher toxicity to *S. marinoi* in culture flasks, with an EC<sub>50</sub> of  $19.5 \pm 0.68 \mu\text{g L}^{-1}$  compared to  $31.8 \pm 0.92 \mu\text{g L}^{-1}$  in the microplate, the difference in toxicity being mostly remarkable at 20 and 30  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

## 2.4. Discussion

Several comparative studies between microplate and flask assay exposure systems are available in the literature (St-Laurent *et al.*, 1992; Rojíčková *et al.*, 1998; Eisentraeger *et al.*, 2003; Blaise and Vasseur, 2005; Pavlič *et al.*, 2006), showing similar results between the two test procedures and highlighting the reliability of the microplate test system due to its repeatability and reproducibility. However, chemicals tested in these studies were generally reference toxicants like metals ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{6+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ), phenol,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ,  $\text{KClO}_3$  or herbicides, which all are very soluble in water. In the present study, pesticides with various volatility ( $-9.77 < \log H < -0.32$ ), hydrophobicity ( $-3.20 < \log K_{\text{OW}} < 5.50$ ) and solubility (from  $2.2 \mu\text{g L}^{-1}$  to  $1467 \text{ g L}^{-1}$ ) were tested enabling the evaluation of the robustness of the microplate toxicity assay for a wider range of chemicals.

Only nine chemicals out of 17 exhibited significant toxicity within the tested range of concentrations ( $1 \mu\text{g L}^{-1}$  to  $1 \text{ mg L}^{-1}$ ), regardless of the species tested. We decided not to test concentrations higher than  $1 \text{ mg L}^{-1}$  as it would inevitably exceed the solubility of some of the selected chemicals. For example, acrinathrin,  $\alpha$ -cypermethrin and quinoxifen have a very low solubility in water, 2.20, 3.97 and  $47.0 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectively, while chlorpyrifos ( $1.05 \text{ mg L}^{-1}$ ), kresoxim-methyl ( $2.00 \text{ mg L}^{-1}$ ) and chlorpyrifos-methyl ( $2.74 \text{ mg L}^{-1}$ ) had a solubility close to  $1 \text{ mg L}^{-1}$ . Moreover, the selected range was sufficient to permit the identification of the most toxic substances.

For several chemicals the concentrations measured in the microplate wells were often much lower than the ones targeted and important losses in concentration were observed after 96 h. These issues were principally observed for chemicals with  $\log K_{\text{OW}} > 3$ , exhibiting a low solubility, which is the

case of all tested insecticides except imidacloprid and two fungicides (kresoxim-methyl and quinoxifen). It was already pointed out in previous studies (Riedl and Altenburger, 2007; Tanneberger *et al.*, 2013) that special attention should be given to chemicals with a  $\log K_{OW} > 3$  and  $\log H > -5.61$ . This was well illustrated with the PCA (Figure 43) putting forward that the percentage of chemical recovered at 96 h (and to lesser extent 0 and 6 h) is correlated with the hydrophobicity and solubility of the chemicals, which are directly related by the general solubility equation (GSE, Ran *et al.*, 2001). Indeed, chemicals with very low water solubility such as  $\alpha$ -cypermethrin, acrinathrin and quinoxifen (3.97, 2.20 and 47.0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectively) exhibited very poor stability, and as water solubility decreases with salinity (Voutchkova *et al.*, 2012), using seawater makes it even more difficult to work with such substances. One can however remark the absence of correlation with volatility in our study. Other standard values like hydrolysis or photolysis  $DT_{50}$  (Dissipation Time, also called half-life, defined as the time for a chemical to be reduced by half through degradation; Table 9) were not considered in the PCA as for most chemicals, values were far above the duration of our experiments (4 days). It might however be noted that the hydrolysis  $DT_{50}$  of flazasulfuron is quite low (11 days) and pH sensitive. As already reported by Couderchet and Vernet (2003), a pH variation inducing faster hydrolysis could explain the loss in concentration observed after 96 h in our wells for this chemical. As the pH of the culture medium could increase due to the consumption of dissolved  $\text{CO}_2$  by microalgae in the culture medium, this might explain the degradation observed for this chemical. However, this can't be confirmed as the pH of the enriched seawater was not measured during our experiments.

In addition to the physicochemical properties of the chemicals themselves, the test system material itself plays a role in the stability of the tested chemicals. Previous studies already highlighted stability issues and/or toxicity underestimation due to plastic sorption when testing hydrophobic chemicals in microplates (Brown *et al.*, 2001; Hirmann *et al.*, 2007; Riedl and Altenburger, 2007). Moreover, these issues can be exacerbated due to higher area to volume ratio favouring greater substance adsorption to plastic (Hörnström, 1990). Recently, Stadnicka-Michalak *et al.* (2014) highlighted a good correlation between uptake/elimination rate constants of non-volatile chemicals for the plastic compartment and the  $\log K_{OW}$ , demonstrating that the more hydrophobic the substance is, the more it is subjected to plastic sorption. These findings also corroborate the results obtained between microplate and culture flask test systems. Indeed,  $EC_{50}$  values obtained were systematically lower in culture flasks, which could be explained by lower exposure concentrations in microplates due to plastic sorption, although the substances tested (isoproturon and spiroxamine) are not particularly hydrophobic ( $\log K_{OW}$  of 2.50 and 2.89, respectively). Therefore, it is not possible to generalize

whether or not the toxicity obtained in culture flasks is always higher than in microplates without testing a wider range of chemicals in these two test systems.

Comparing EC<sub>50</sub> values obtained in microplates and culture flasks also implies the use of different methods to estimate growth, which might introduce a bias towards toxicity measurement. Indeed, in microplates, growth was estimated using chlorophyll fluorescence, whereas in culture flasks, cell density was measured. Indeed, even though measurement of the cell density is probably more accurate to estimate growth than fluorescence, it is not possible to perform it with microplates: pipetting out at least 0.20 mL in each well every 24 h, which are required for a cell density analysis by flow cytometry, would excessively reduce the volume of culture in each well throughout the experiment. In addition, measuring the cell density for each well would inevitably be more time-consuming than the measure of chlorophyll fluorescence. Hence, the time-effective aspect of microplate-based assay would no longer be an advantage compared to culture flasks. As a linear relationship exists between chlorophyll fluorescence and cell density in steady experimental conditions (Ichimi *et al.*, 2012), using either of these methods should not introduce any bias regarding growth rate calculation. However, this is only true when chlorophyll fluorescence of individual microalgal cells is not modified by the substance they are exposed to, compared to the control culture. In culture flasks, analysis by flow cytometry permits the measurement of the mean individual chlorophyll fluorescence (red fluorescence, FL3 > 670 nm or FL4 675/25 nm) of fresh microalgal cells. By comparison with the controls, it allows the measurement of a potential effect of the tested substances on this parameter (supplementary material: Figure S3b). For *Tisochrysis lutea*, cells exposed to increasing concentrations of isoproturon (supplementary material: Figure S3b, A) exhibited a significantly higher and concentration-dependent chlorophyll fluorescence (more than 2-fold higher for the three highest concentrations at 96 h). When exposed to spiroxamine (supplementary material: Figure S3b, B), the biggest increase in chlorophyll fluorescence in this species was induced by the three lowest concentrations. When looking at the diatom *Skeletonema marinoi*, a smaller but significant increase in chlorophyll fluorescence was observed following exposure to the three lowest isoproturon concentrations (supplementary material: Figure S3b, C), while almost no effect was observed upon exposure to spiroxamine (supplementary material: Figure S3b, D). Consequently, the higher fluorescence measured by the microplate reader for exposed wells could be attributed to growth when it is in fact due to an increase in the mean individual fluorescence of the exposed microalgal cells: higher growth values for exposed cells might 'virtually' reduce the toxicity observed in microplates. Hence, one should keep in my mind that due to the abovementioned bias, EC<sub>50</sub> values determined with two different endpoints, chlorophyll fluorescence or cell density, will probably differ depending on the tested chemical and species. Although this bias cannot explain the lower toxicity

obtained in culture flasks on its own, it probably played a non-negligible role in this study, along with the potential lower bioavailability of the chemical and/or higher adsorption on the cells in culture flasks. This can also probably explain the differences observed in  $EC_{50}$  values calculated with fluorescence and cell density (Table 10), although cell density was only measured at the beginning and the end of the experiment, adding another bias. Nevertheless,  $EC_{50}$  values calculated with chlorophyll fluorescence and cell density do not differ sufficiently to modify our interpretation of the toxicity, thus,  $EC_{50}$  based on chlorophyll fluorescence can be viewed as reliable.

In several recent studies (Ochoa-Acuña *et al.*, 2009; Malev *et al.*, 2012; Nagai *et al.*, 2013, 2016; Nagai and De Schampelaere, 2016; Nagai, 2017), the toxicity of pesticides towards microalgae was measured using a chlorophyll fluorescence-microplate based assay, similarly to what was performed in this study. However, unlike the present work, none of these studies evaluated the potential bias towards growth measurement associated with the alteration of chlorophyll fluorescence and/or content upon exposure of the microalgal cells to the pesticides tested, which is yet thoroughly documented (Prado *et al.*, 2011; Stachowski-Haberkorn *et al.*, 2013; Smedbol *et al.*, 2018).

The chemical analyses performed, along with the comparison of the toxicity values obtained between microplates and culture flasks, permitted to pinpoint different factors that can bias toxicity assessment in the microplate test system. For herbicides, very similar  $EC_{50}$  values were obtained regardless of the exposure concentration set used, which corroborate their overall good stability in microplates, as shown by the PCA (Figure 43A). On the contrary, significant differences in  $EC_{50}$  values were observed for chlorpyrifos-methyl and fungicides, due to a lower stability in microplates. For these classes of pesticides, two-fold lower values were often obtained when using the corrected nominal and/or measured concentration values. Using the corrected nominal concentration instead of the nominal concentration always resulted in  $EC_{50}$  values closer to those obtained using measured concentrations, thus demonstrating that measuring the concentrations of the stock solutions used can, *a minima*, greatly improve the accuracy of  $EC_{50}$  values. Hence, to obtain the best accuracy for the toxicity assessment of a chosen chemical, one should systematically: i) consider the potential bias associated with the hydrophobicity/solubility of the chemical; ii) perform analytical determination of the concentrations for, at least, the stock solutions and whenever possible for all dilutions performed in the test medium, in similar conditions as the toxicity assay. In the case of highly hydrophobic chemicals ( $\log K_{OW} > 5$ ), specific methods like passive dosing should be considered (Brown *et al.*, 2001; Vicquelin *et al.*, 2011; Stibany *et al.*, 2017b, 2017a) to avoid a distorted estimation of the  $EC_{50}$ . Regarding the toxicity obtained for the pesticides tested on the two microalgal species, four herbicides out of six, one insecticide out of six, and all fungicides induced enough toxicity in the range tested to

permit the calculation of an EC<sub>50</sub>. In order to discuss the toxicity obtained, only EC<sub>50</sub> values calculated using fluorescence and measured concentrations will be used, as they are the most reliable among all. Herbicides were the most likely to cause toxicity to microalgae, especially phenylureas diuron and isoproturon targeting the PSII, as it is a very well-conserved structure among plants and algae (Readman *et al.*, 1993). These two chemicals were among the three that exhibited the highest toxicity, with EC<sub>50</sub> values below 10 µg L<sup>-1</sup>. The toxicity obtained was in accordance with values from the literature. For diuron, EC<sub>50</sub> values of 5.90 and 4.30 µg L<sup>-1</sup> were reported on the growth of *Skeletonema costatum* and *Thalassiosira pseudonana*, respectively, (Bao *et al.*, 2011) and Petersen *et al.* (2014) determined an EC<sub>50</sub> value of 15.6 µg L<sup>-1</sup> on the growth of *S. pseudocostatum*. For isoproturon, Sjollega *et al.* (2014), determined EC<sub>50</sub> values of 8.70, 3.70 and 4.30 on the effective PSII efficiency of *Dunaliella tertiolecta*, *Phaeodactylum tricornutum* and *T. pseudonana*, respectively; the two chloroacetanilides exhibited toxicity only towards the diatom, with EC<sub>50</sub> around 300 and 1000 µg L<sup>-1</sup> for metazachlor and S-metolachlor, respectively, thus showing a different sensitivity of the two microalgal species tested. For S-metolachlor, EC<sub>50</sub> values on growth for *Tetraselmis suecica* and *Ditylum brightwellii*, were 21.3 mg L<sup>-1</sup> and 423 µg L<sup>-1</sup>, respectively (Ebenezer et Ki, 2013); for metazachlor, data are scarce but FAO (1993) determined EC<sub>50</sub> value on the growth of *Chlorella sp.* and *Pseudokirchneriella subcapitata* of 1.63 mg L<sup>-1</sup> and 31 µg L<sup>-1</sup>.

Other herbicides like the sulfonyleurea flazasulfuron or the glycine glyphosate (and its main metabolite AMPA), whose MoA both target amino-acid synthesis, did not induce any toxicity in the range tested. Only one study evaluated the toxicity of flazasulfuron on the microalga *Chlorella vulgaris* and evidenced significant decrease in chlorophyll content from 100 µg L<sup>-1</sup> (Couderchet et Vernet, 2003), although effects on growth were not measured. Regarding glyphosate, the active substance itself was found to exhibit very low toxicity towards microalgae with EC<sub>50</sub> values of several to tens mg L<sup>-1</sup> (Ma, 2002; Ma *et al.*, 2006; Vendrell *et al.*, 2009).

Insecticides were not likely to induce any toxicity as their MoA is very specific to structures that are not found in microalgae, nevertheless, the organophosphate chlorpyrifos-methyl induced a 50% inhibition on the growth rate of *T. lutea* at approximately 400 µg L<sup>-1</sup>. Its mechanism of toxicity in terrestrial plants is thought to act by inhibiting cytochrome P450 monooxygenases (Biediger *et al.*, 1992; Kapusta and Krausz, 1992) although MoA on microalgae remains unclear (DeLorenzo *et al.*, 2001). Chlorpyrifos-methyl was reported to induce low toxicity on algae, with EC<sub>50</sub> of 570 µg L<sup>-1</sup> on the growth of *Raphidocelis subcapitata* (PPDB, Lewis *et al.*, 2016). Regarding fungicides, a potential toxicity was expected due to their MoA that is often not specific to fungi, targeting enzymes that are well conserved across animals, fungi and plants (Stenersen, 2004). Algal toxicity data regarding fungicides tested in this study are very scarce, or non-existent out of databases. The two strobilurines

(azoxystrobin and kresoxim-methyl), inhibiting mitochondrial electron transport (Stenersen, 2004), exhibited a low overall toxicity with EC<sub>50</sub> values around 400 µg L<sup>-1</sup> for *T. lutea* and 500-900 µg L<sup>-1</sup> for *S. marinoi*, respectively. Ochoa-Acuña *et al.* (2009) determined an EC<sub>50</sub> on growth of 230 µg L<sup>-1</sup> for azoxystrobin on the microalga *P. subcapitata*, while Liu *et al.* (2018) determined EC<sub>50</sub> of 3.06 mg L<sup>-1</sup> and 131 µg L<sup>-1</sup> for kresoxim-methyl on the growth of microalgae *C. pyrenoidsa* and *C. vulgaris*, respectively. As for quinoxyfen, its MoA is not common among fungicides and has only been identified recently (Agrow, 2010): it acts by the disruption of signalling processes that are crucial for early stages of powdery mildew development, by targeting numerous pathways that are vital for the pathogen to grow. Though very specific to powdery mildew, this chemical exhibited a higher toxicity than the two strobilurines on the diatom, with an EC<sub>50</sub> close to 30 µg L<sup>-1</sup>; however, its toxicity towards the haptophyta was lower and in a similar range as azoxystrobin and kresoxim-methyl. Quinoxyfen was reported to exhibit moderate toxicity to algae, with an EC<sub>50</sub> value of 27 µg L<sup>-1</sup> on *R. subcapitata* (PPDB, Lewis *et al.*, 2016). Finally, spiroxamine, whose MoA acts by inhibiting the Δ<sup>14</sup>-sterol reductase enzyme and consequently sterol biosynthesis including ergosterol, was the most toxic fungicide. It exhibited a very high toxicity towards *T. lutea*, with EC<sub>50</sub> around 4 µg L<sup>-1</sup> in microplate, and as low as 0.7 µg L<sup>-1</sup> in culture flasks (Figure 46), while the diatom was less sensitive with EC<sub>50</sub> around 20-30 µg L<sup>-1</sup> in microplate/culture flasks. Sterols are very important constituents of cellular membranes (Haines, 2001; Ohvo-Rekilä *et al.*, 2002) and ergosterol is one of the major sterols found in microalgae (Martin-Creuzburg and Merkel, 2016; Brumfield *et al.*, 2017). Hence, the high acute toxicity observed with this chemical might be due to cell membrane disruption. Spiroxamine was already reported as highly toxic for algae, with an EC<sub>50</sub> value of 3 µg L<sup>-1</sup> on *Scenedemus subspicatus* (PPDB, Lewis *et al.*, 2016).

Regarding the potential toxicity of the most toxic pesticides tested in this study towards the environment, few studies performed measurement of some of these substances in estuarine and coastal waters. In The Netherlands, maximum concentrations of diuron and isoproturon of 0.37 and 0.12 µg L<sup>-1</sup> in Western Scheldt (estuarine waters) in 2003, while lower concentrations of 0.030 and 0.088 were found more recently, in 2012 (Booij *et al.*, 2015). In the coastal waters of the Ria Formosa lagoon located in Portugal, azoxystrobin was found at an average concentration of 2.15 µg L<sup>-1</sup> during spring (Cruzeiro *et al.*, 2015). In France, Munaron *et al.* (2012) followed the concentration of 27 hydrophilic pesticides in Mediterranean coastal waters using POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Sampler), and found maximum time-weighted average concentrations of 0.033 µg L<sup>-1</sup> for diuron in the Thau lagoon. In Normandy, concentration of 0.13 and 0.042 µg L<sup>-1</sup> of diuron and isoproturon were measured in may in the Bay of Veys (Buisson *et al.*, 2008). Finally, Caquet *et al.* (2013) measured concentrations of diuron and isoproturon up to 0.075 and 0.094 µg L<sup>-1</sup> in the coastal

waters of the Bay of Vilaine (France), while higher concentrations of 0.27 and 0.19  $\mu\text{g L}^{-1}$  were measured upstream in the Arzal river (France). No studies reported the presence of spiroxamine, one of the most toxic chemicals tested in this study, in the marine environment. The environmental concentrations found in these studies are about 10-fold lower or more than the calculated  $\text{EC}_{50}$  values in this study. However, if considering the  $\text{EC}_{10}$ , an analogue of the NOEC (no-effect-concentration) (Beasley *et al.*, 2015), calculated for diuron on *T. lutea*, it was around 0.68/0.76  $\mu\text{g L}^{-1}$  (culture flasks/microplate, data not shown) which is close some environmental concentrations. Also, important to keep in mind is that the previously mentioned studies only focused on chosen substances and are thus not representative of the 'real' contamination of the area studied. In addition, the potential interactive effects due to the mixture of several substances, which might, in some cases, result in an increased toxicity (Cedergreen, 2014) were not taken into account in this study.

The screening of toxicity performed on a wide range of pesticides used in viticulture (for the most part) using a microplate assay permitted to confirm the value of microplate-based bioassay as a screening tool while pointing out some issues related to chemicals exhibiting high hydrophobicity/low solubility. Although herbicides like diuron or isoproturon were expected to induce high toxicity, it was not the case for fungicides: all induced significant toxicity on both microalgal species, particularly spiroxamine which was highly toxic to *T. lutea* and to a lesser extent to *S. marinoi*.

## 2.5. Conclusion

A microplate bioassay was combined to chemical analyses to provide a reliable calculation of  $\text{EC}_{50}$  values through a toxicity screening experiment performed on two marine microalgae. Only nine substances, among the 17 tested, induced enough toxicity in the range tested to permit the calculation of  $\text{EC}_{50}$  values. Hereby are some recommendations concerning the use of a microplate bioassay:

- At least, analytical determination of the stock solution concentrations should be performed to allow the correction of nominal exposure concentrations.
- For hydrophobic chemicals with a  $\log K_{\text{OW}} > 3$ , measurement of the effective chemical concentration in the test system are required.
- The microplate bioassay is not suitable for highly hydrophobic chemicals ( $\log K_{\text{OW}} > 5$ ); these should be tested using specific exposure methods like passive dosing.
- whenever possible, cell density measurement should be performed in addition to chlorophyll fluorescence, as some chemicals alter chlorophyll fluorescence and consequently bias growth measurement based on this endpoint.

Regarding the toxicity induced by the tested chemicals, herbicides diuron and isoproturon exhibited high acute toxicity ( $EC_{50} < 10 \mu\text{g L}^{-1}$ ) for both microalgal species. Insecticides did not exhibit any toxicity in the range of concentrations tested, apart from chlorpyrifos-methyl which caused moderate toxicity to *T. lutea*. Surprisingly, all fungicides tested exhibited significant toxicity, especially spiroxamine which exhibited very high acute toxicity ( $EC_{50} 0.7-4 \mu\text{g L}^{-1}$ ) to one of the two microalgae tested. Hence, further studies should be performed to assess spiroxamine contamination of aquatic ecosystems in vineyard areas.

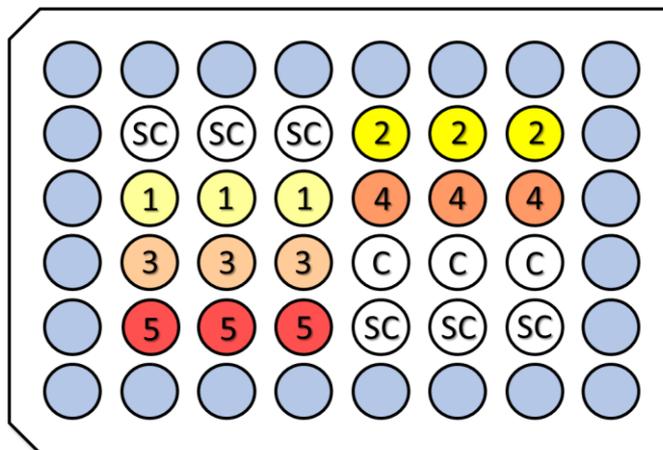
## 2.6. Acknowledgments

This study has been carried out with financial support from the French National Research Agency (ANR) in the frame of the Investments for the future program, within the Cluster of Excellence COTE (ANR-10-LABX-45). We also want to thank Dominique Ménard and Julien Rouxel for their technical assistance.

## 2.7. Supplementary material

Below is the supplementary material, Figures and Tables, for the article 3.

### Figures



---

Figure S3a: Scheme of the microplate toxicity assay. C represents the control wells without solvent; SC represents the solvent control wells; numbers 1 to 5 wells with increasing concentrations of the tested chemical. When six concentrations are tested, the controls without solvent (C) are replaced by a sixth concentration. All peripheral wells are filled with sterile ultra-pure water.

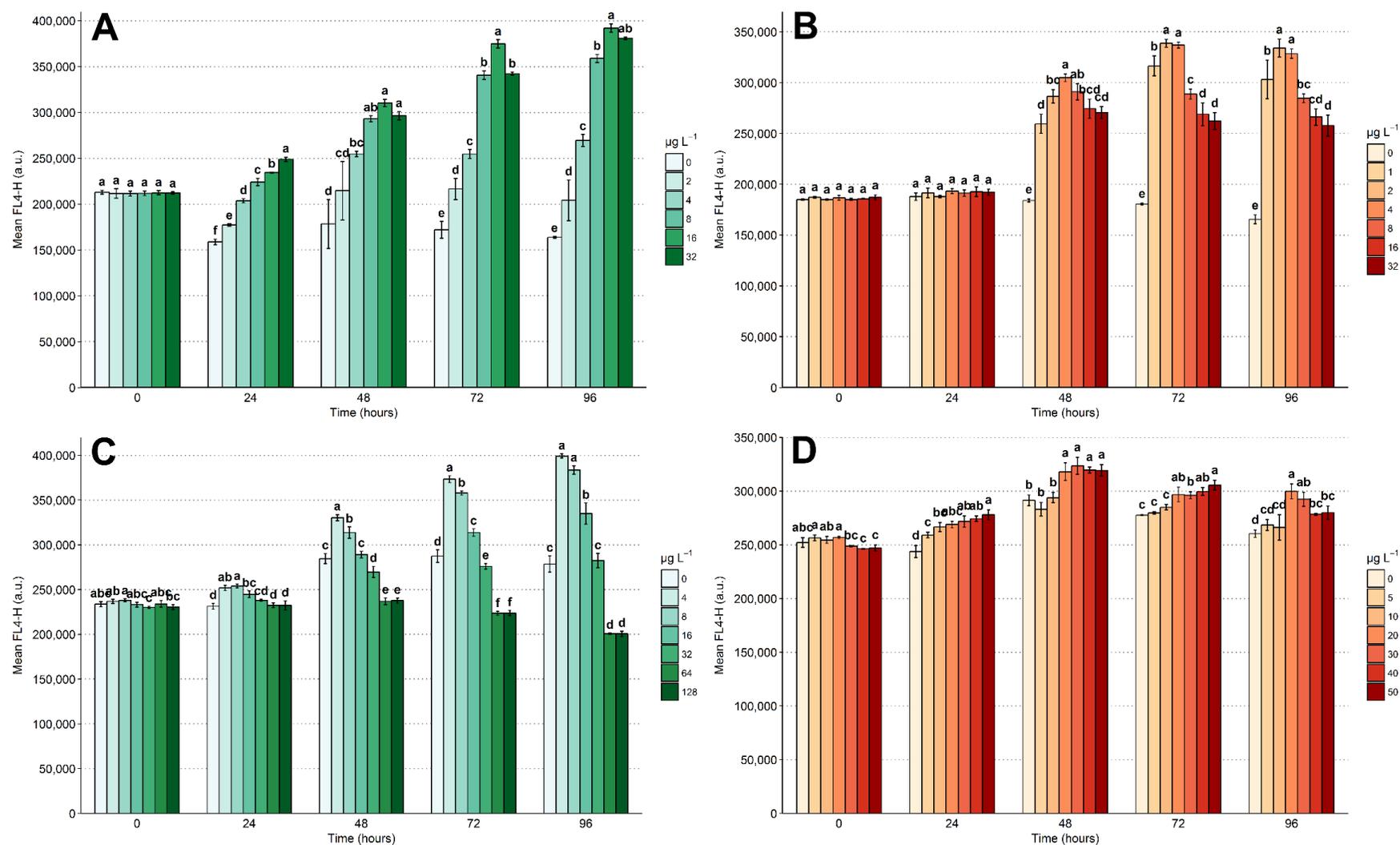


Figure S3b: Mean relative chlorophyll fluorescence (FL4-H  $\pm$  95% confidence interval, a.u.) measured daily by flow cytometry (red fluorescence,  $675 \pm 25$  nm) for *Tisochrysis lutea* (A, B) and *Skeletonema marinoi* (C, D) cells exposed to isoprotruron (in green, A, C) and spiroxamine (in red, B, D). Concentrations are expressed in  $\mu\text{g L}^{-1}$  and mentioned on the right of each graph, the darker the colour the higher is the concentration). Minuscule letters above the bars display significant differences between treatments (ANOVA,  $p < 0.05$  followed by Tukey's HSD post-hoc test,  $p < 0.05$ ).

## Tables

Table S3a: Nominal (calculated from weighed mass) and measured concentrations (chemical analysis, in mg L<sup>-1</sup>) of stock and working solutions used in this study together with the percentage of variation between them.

Concentration in mg L <sup>-1</sup>			
<b>Biocides</b>			
<b>diuron</b>	Nominal	Measured	% variation
S1	102	109	6.45
<b>isoproturon</b>			
S1	972	873	-10.2
S2	114	115	0.52
S3	11.1	12.0	8.17
<b>fipronil</b>			
S1	2007	1852	-7.72
S2	1026	746	-27.3
<b>Herbicides</b>			
<b>flazasulfuron</b>	Nominal	Measured	% variation
S1	1009	966	-4.22
S2	113	130	15.0
S3	14.0	9.80	-29.7
<b>metazachlor</b>			
S1	1020	940	-7.82
S2	101	190	88.3
S3	9.62	13.7	42.4
<b>S-metolachlor</b>			
S1	1960	2130	8.67
S2	197	173	-12.2
S3	20	20	-0.50
<b>glyphosate</b>			
S1	200		
<b>AMPA</b>			
S1	2007	3017	50.3
S2	202	315	55.6
S3	21.4	32.2	50.1
<b>Insecticides</b>			
<b>α-cypermethrin</b>	Nominal	Measured	% variation
S1	1023	432	-57.8
S2	97.6	7.35	-92.5
S3	9.41	2.89	-69.3
<b>acrinathrin</b>			
S1	1028	101	-90.2
S2	110	3.99	-96.4
S3	10.3	1.66	-83.9
<b>chlorpyrifos</b>			
S1	2057	1911	-7.10
S2	200	137	-31.6
S3	22.1	14.7	-33.4
<b>chlorpyrifos-methyl</b>			
S1	2000	926	-53.7
S2	216	96.96	-55.2
S3	21.0	14.5	-30.9
<b>imidacloprid</b>			
S1	2050	1953	-4.73
S2	1007	942	-6.45
<b>Fungicides</b>			
<b>azoxystrobin</b>	Nominal	Measured	% variation
S1	1975	1644	-16.7
S2	197	159	-19.3
S3	18.5		
<b>kresoxim-methyl</b>			
S1	2030	966	-52.4
S2	212	72.9	-65.7
S3	20.8	9.79	-52.8
<b>quinoxifen</b>			
S1	2023	780	-61.4
S2	205	124	-39.6
S3	20.3	20.1	-1.06
<b>spiroxamine</b>			
S1	1500	822	-45.2
S2	141	98.3	-30.2
S3	13.0	8.30	-36.3

Table S3b: Measured concentrations (in  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) in the microplate wells (2.3.3) at the beginning of the exposure and after 6 and 96 h. For  $\alpha$ -cypermethrin, some values were lower than LOQ, and thus expressed as ‘< LOQ value’.

Chemical	Time (h)	Concentration ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )				
		C1	C2	C3	C4	C5
diuron	0	0.063				
	6	0.075				
	96	0.076				
isoproturon	0	0.83	7.08	72.0	296	647
	6	0.82	7.18	68.0	297	648
	96	0.78	6.42	70.0	288	585
fipronil	0	0.055				
	6	0.048				
	96	0.040				
falzasulfuron	0	0.96	8.97	76.7	243	581
	6	0.98	10.2	73.9	252	535
	96	0.12	0.50	12.9	136	420
metazachlor	0	0.98	9.09	79.5	337	580
	6	0.98	9.03	79.8	319	556
	96	0.99	8.72	79.4	325	549
S-metolachlor	0	0.83				
	6	0.85				
	96	1.05				
glyphosate	0	0.72				
	6	0.90				
	96	0.72				
AMPA	0	1.61	12.6	137	742	1449
	6	1.37	13.3	159	640	1281
	96	1.48	13.8	136	664	1432
$\alpha$ -cypermethrin	0	0.023	1.10	23.8	49.5	207
	6	0.012	0.083	13.0	28.7	201
	96	< 0.010	< 0.1	< 1.0	< 5	15.8
acrinathrin	0	0.017	0.34	5.29	3.17	11.0
	6	0.0015	0.093	3.29	1.67	8.35
	96	0.0010	0.0029	0.022	0.61	0.72
chlorpyrifos	0	0.48	2.02	9.00	48.0	182
	6	0.13	0.69	7.00	34.0	47.4
	96	0.70	1.38	4.00	21.0	34.0
chlorpyrifos-methyl	0	0.37	4.59	43.9	237	460
	6	0.24	4.85	31.1	167	359
	96	0.47	2.76	15.8	70.2	128
imidacloprid	0	0.081				
	6	0.086				
	96	0.10				
azoxystrobin	0	0.78	8.73	48.5	289	492
	24	0.51	3.46	35.5	217	433
	96	0.56	3.84	29.4	213	421
kresoxim-methyl	0	0.50	4.28	26.8	180	299
	6	0.47	2.69	47.3	210	377
	96	0.51	2.99	89.0	217	259
quinoxifen	0	0.63	3.86	27.8	62.4	492
	6	2.09	1.76	13.7	62.1	277
	96	0.19	1.31	11.7	49.9	97.6
spiroxamine	0	0.30	3.69	15.0	175	287
	6	0.36	6.64	25.4	129	327
	96	0.12	2.45	27.3	106	241

Table S3c: Percentages of chemical recovered in the microplate wells (2.3.3) at the beginning of the exposure and after 6 and 96 h, compared to the corrected nominal concentration.

		% recovered compared to the corrected nominal concentration				
Chemical	Time (h)	C1	C2	C3	C4	C5
diuron	0	63.0				
	6	75.0				
	96	76.0				
isoproturon	0	76.5	65.5	69.6	75.3	82.3
	6	75.8	66.5	65.7	75.6	82.5
	96	72.0	59.4	67.6	73.3	74.5
fipronil	0	54.7				
	6	48.3				
	96	40.3				
	Time (h)	C1	C2	C3	C4	C5
falzasulfuron	0	107	99.6	65.6	56.0	66.9
	6	109	113	63.1	58.1	61.5
	96	13.6	5.60	11.1	31.3	48.3
metazachlor	0	78.2	72.1	46.5	79.8	68.5
	6	78.0	71.7	46.7	75.4	65.7
	96	78.9	69.2	46.5	76.9	64.9
S-metolachlor	0	83.0				
	6	84.8				
	96	105				
glyphosate	0	72.2				
	6	100				
	96	79.9				
AMPA	0	119	93.3	97.6	110	107
	6	102	98.7	114	94.7	94.7
	96	109	102	97	98.2	106
	Time (h)	C1	C2	C3	C4	C5
$\alpha$ -cypermethrin	0	8.80	42.2	362	25.5	53.3
	6	4.60	3.20	199	14.8	51.8
	96	< 5.00	< 5.00	< 15.0	< 5.00	4.10
acrinathrin	0	9.40	19.1	147	7.00	12.10
	6	0.80	5.20	91.4	3.70	9.20
	96	0.60	0.20	0.60	1.30	0.80
chlorpyrifos	0	80.1	33.7	14.6	11.5	21.8
	6	22.3	11.5	11.4	8.10	5.70
	96	117	23.0	6.50	5.00	4.10
chlorpyrifos-mehtyl	0	58.1	71.3	109	114	110
	6	36.5	75.3	77.1	80.1	86.2
	96	73.3	42.9	39.1	33.7	30.7
imidacloprid	0	81.0				
	6	86.0				
	96	105				
	Time (h)	C1	C2	C3	C4	C5
azoxystrobin	0	108	120	66.7	77.0	65.7
	24	69.8	47.5	48.8	57.8	57.8
	96	77.5	52.9	40.4	56.8	56.1
kresoxim-methyl	0	116	98.6	86.6	84.1	69.7
	6	109	62.0	153	98.1	88.1
	96	117	68.8	288	101	60.4
quinoxifen	0	70.7	43.5	51.0	36.0	142
	6	236	19.9	25.0	35.8	79.9
	96	21.5	14.8	21.5	28.7	28.1
spiroxamine	0	54.9	66.8	24.0	71.0	58.2
	6	65.0	120	40.5	52.4	66.3
	96	22.3	44.4	43.6	43.1	48.9

Table S3d: Detailed description of the chemical analysis methods described in section 2.4 and used for the measurement of the chemicals tested in this study.

Substance	Analysis method				Mass parameters			Internal standard	LOD / LOQ <sup>(4)</sup> (ng L <sup>-1</sup> )	
	Extraction	Instrument	Mobile phase	Column	QT <sup>(1)</sup>	CE <sup>(2)</sup> <sub>QT</sub> (V)	CT <sup>(3)</sup>			CE <sub>CT</sub> (V)
diuron					233.0 > 72.0	16	233.0 > 46.1	12	diuron-d6	0.30 / 1.00
isoproturon					207.2 > 72.0	2	207.2 > 46.1	12	isoproturon-d6	0.20 / 0.50
flazasulfuron					408.1 > 182.0	16	408.1 > 83.0	50	carbofuran-d3	1.00 / 3.00
metazachlor					278.1 > 210	0	278.1 > 134.1	16	terbutryn-d5	0.70 / 2.00
S-metolachlor	Direct injection	LC-MS/MS <sup>(5)</sup>	5.00 mM ammonium acetate with 0.1% acetic acid in ultra-pure water / pure methanol	Kinetex C18 l: 100 mm, ø: 2.10 mm, p: 1.70 µm <sup>(6)</sup>	284.1 > 252.0	12	284.1 > 176.1	24	S-metolachlor-d6	0.70 / 2.00
imidacloprid					256.0 > 175.0	12	256.0 > 209.0	12	imidacloprid-d4	0.30 / 1.00
azoxystrobin					404.1 > 372.1	8	404.1 > 344.1	24	carbofuran-d3	0.70 / 2.00
kresoxim-methyl					314.1 > 267	0	314.1 > 222	8	atrazine-d5	1.70 / 5.00
quinoxifen					308 > 161.9	52	308 > 196.9	36	quizalofop-ethyl-d3	3.00 / 10.0
spiroxamine					298.3 > 144.0	16	298.3 > 100.0	32	quizalofop-ethyl-d3	0.70 / 2.00
glyphosate	SPE <sup>(7)</sup> / derivatization	LC-MS/MS	5.00 mM ammonium acetate in ultra-pure water (adjusted to pH 9 with ammonium hydroxide) / pure acetonitrile	BEH C18 l: 50,0 mm, ø: 2.10 mm, p: 1.70 µm	392.1 > 88	16	292.1 > 179.0	24	-	3.00 / 10.0
AMPA					334.1 > 179	20	334.1 > 155.9	4	-	3.00 / 10.0
fipronil					367 > 213	25	367 > 255	25	fipronil-13C-15N	0.10 / 0.03
α-cypermethrin	SPME <sup>(8)</sup> (PDMS/DVB <sup>(9)</sup> 65.0 µm)	GC-MS/MS <sup>(10)</sup>	Helium	HP-5 MS l: 30.0 m, ø: 0.25 mm, f <sup>(11)</sup> : 0,25 µm	181 > 152	17	181 > 127	22	cis-permethrine-13C	3.30 / 10.0
acrinathrin					208 > 181	13	181 > 152	17	cis-permethrine-13C	0.30 / 1.0
chlorpyrifos					314 > 286	5	314 > 258	14	chlorpyrifos-d10	0.30 / 1.0
chlorpyrifos-methyl					286 > 271	15	286 > 93	18	chlorpyrifos methyl-d6	0.30 / 1.0

<sup>(1)</sup> Quantification transition; <sup>(2)</sup> Collision energy; <sup>(3)</sup> Confirmation transition; <sup>(4)</sup> Limit of detection / Limit of quantification; <sup>(5)</sup> Agilent LC 1290 infinity - 6460 triple quad; <sup>(6)</sup> length (l), inner diameter (ø), porosity (p); <sup>(7)</sup> Solid phase extraction; <sup>(8)</sup> Solid phase microextraction; <sup>(9)</sup> Polydimethylsiloxane/Divinylbenzene; <sup>(10)</sup> Agilent GC 7890 - 7000 triple quad; <sup>(11)</sup> film thickness (f)

## Synthèse

L'objectif de cet article était d'évaluer la toxicité de seize pesticides, dont treize produits phytosanitaires utilisés en viticulture et trois biocides utilisés dans d'autres applications, et un métabolite vis-à-vis des microalgues marines *T. lutea* et *S. marinoi*.

Avant de discuter de la toxicité induite par les substances testées, il apparaît nécessaire d'examiner les résultats des tests abiotiques visant à mesurer la stabilité des pesticides dans les microplaques. Dans cet article, quatre valeurs distinctes de  $CE_{50}$  ont été calculées pour chaque substance. Les trois premières ont été calculées en utilisant le taux de croissance mesuré quotidiennement via la fluorescence de la chlorophylle, associé à différentes façons d'évaluer la concentration d'exposition, dont :

- i. les concentrations **nominales**, calculées à partir des concentrations des solutions mères mesurées par gravimétrie ;
- ii. les concentrations **nominales corrigées**, calculées à partir des concentrations des solutions mères mesurées de manière analytique par chromatographie liquide ou gazeuse couplée à un spectromètre de masse en tandem (CL ou CG-SM/SM) par le laboratoire LPTC ;
- iii. les concentrations effectives **mesurées de manière analytique** dans les puits des microplaques (tests abiotiques) par le laboratoire LPTC.

La dernière valeur a été calculée en utilisant les concentrations mesurées (iii) mais associées cette fois avec :

- iv. le taux de croissance calculé entre 0 et 96 h via la **densité cellulaire** mesurée par cytométrie en flux au début et à la fin de l'expérimentation (au lieu du taux de croissance mesuré quotidiennement via la fluorescence de la chlorophylle).

Pour calculer les trois premières valeurs de  $CE_{50}$ , chaque solution mère de pesticide, ainsi que chaque concentration testée dans les puits des microplaques, ont été mesurées par chimie analytique. Ces mesures ont mis en évidence des différences importantes entre les concentrations nominales et mesurées, aussi bien pour les solutions mères que pour les dilutions dans le milieu de culture  $f/2$ . Les substances pour lesquelles les différences étaient les plus flagrantes étaient également les plus hydrophobes, et donc les moins solubles, comme le montrent les résultats de l'ACP. C'est notamment le cas des deux insecticides de la famille des pyréthriinoïdes, l' $\alpha$ -cyperméthrine et l'acrinathrine, et du fongicide quinoxifène ( $\log K_{OW}$  : 5,50, 5,24 et 4,66 ; solubilité dans l'eau à 20°C pH 7 : 3,97 et 2,20 et 47,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivement). Aucune toxicité n'a pu être mesurée pour ces deux insecticides, probablement du fait des trop faibles concentrations d'exposition et/ou de l'absence des récepteurs cibles de ces substances chez les microalgues. Pour le quinoxifène, des  $CE_{50}$  plus de deux fois plus basses ont été mesurées avec les concentrations nominales corrigées ou mesurées analytiquement.

Pour d'autres substances, comme les herbicides isoproturon ou métazachlore, peu de différences ont été mises en évidence entre les concentrations nominales et mesurées et de ce fait, il y avait peu de variations entre les différentes valeurs de  $CE_{50}$  calculées. Ces mesures permettent ainsi de démontrer que les substances très hydrophobes ne peuvent être testées de manière fiable en microplaques, d'une part du fait de leur faible solubilité et d'autre part car elles ont tendance à s'adsorber aux matières plastiques (Stadnicka-Michalak *et al.*, 2014). En conséquence, il est recommandé d'utiliser des méthodes spécifiquement destinées à l'évaluation de la toxicité de ces composés hydrophobes, telles que le « dosage passif » (Brown *et al.*, 2001 ; Vicquelin *et al.*, 2011 ; Stibany *et al.*, 2017a, 2017b), qui présente néanmoins l'inconvénient de ne pas être miniaturisable. Pour ce qui est des substances moyennement hydrophobes ou dont la stabilité n'est pas assurée, il apparaît aussi nécessaire de réaliser une vérification analytique des concentrations d'exposition afin d'éviter une estimation erronée de leur  $CE_{50}$  : concentration nominale dans les puits surestimée par rapport à la concentration effective, impliquant une sous-estimation de la  $CE_{50}$ .

Le proxy de croissance utilisé pour le calcul du taux de croissance semble également avoir un impact significatif sur la valeur de la  $CE_{50}$  déterminée. En effet, pour certaines substances comme le métazachlore, l'azoxystrobine ou la spiroxamine, des différences d'un facteur 2 à 4, selon l'espèce et la substance considérée, ont été mises en évidence entre les  $CE_{50}$  calculées avec la fluorescence (iii) et celles calculées avec la densité cellulaire (iv). Une des hypothèses envisagées pour expliquer ce phénomène est l'effet significatif de ces substances sur le contenu et/ou la fluorescence de la chlorophylle. En effet, si le paramètre utilisé pour mesurer la croissance est altéré par l'action du contaminant testé, la mesure du taux de croissance et donc de la toxicité de ce contaminant sera elle aussi affectée. Dans la littérature, l'impact significatif de certains herbicides (paraquat, diuron, glyphosate) sur le contenu et/ou la fluorescence de la chlorophylle a été démontré (Prado *et al.*, 2011 ; Stachowski-Haberkorn *et al.*, 2013 ; Smedbol *et al.*, 2018). Cette hypothèse a été en partie validée grâce aux tests visant à comparer la toxicité obtenue en microplaques et en ballons de culture : une augmentation significative de la fluorescence de la chlorophylle a pu être observée par cytométrie en flux (détecteur FL4) chez les cellules des deux microalgues exposées en ballons de culture à l'isoproturon et la spiroxamine. Des différences significatives entre les  $CE_{50}$  mesurées en ballons de culture et en microplaques ont également été mises en évidence : la  $CE_{50}$  de la spiroxamine sur *T. lutea* était quatre fois plus basse en ballons de culture, de même pour celle de l'isoproturon avec *S. marinoi*, qui était quasiment deux fois plus basse en ballons de culture. Ces différences ont probablement été causées par les deux biais mentionnés ci-dessus. D'une part, les conditions d'exposition entre les deux systèmes sont différentes : les substances chimiques, et notamment les plus hydrophobes, ont tendance à s'adsorber plus facilement sur les matériaux plastiques par rapport au verre. De plus, cette

adsorption pourrait être accrue par un rapport surface/volume supérieur en microplaques (Hörnström, 1990). D'autre part, la mesure de l'inhibition de croissance par la fluorescence de la chlorophylle peut être biaisée par l'action des substances testées sur le contenu pigmentaire des microalgues. Ce deuxième point semble cependant avoir un impact réduit par rapport au premier, bien qu'il soit nécessaire d'en tenir compte en effectuant, par exemple, une comparaison entre l'inhibition calculée avec la fluorescence et la densité cellulaire.

Une fois les principaux biais identifiés, le système de test en microplaques s'est révélé être un outil performant pour le criblage de toxicité des substances choisies. Les résultats ont en effet permis d'identifier les pesticides les plus toxiques pour les deux microalgues étudiées, que l'on peut ainsi classer de la plus toxique à la moins toxique en utilisant les valeurs de  $CE_{50}$  calculées avec les concentrations mesurées (iii) :

- pour *T. lutea*, diuron > spiroxamine > isoproturon > quinoxifène  $\approx$  kresoxim-méthyl, azoxystrobine et chlorpyrifos-méthyl ;
- pour *S. marinoi*, diuron > spiroxamine > isoproturon > quinoxifène > métazachlore > kresoxim-méthyl > azoxystrobine.

Ainsi, pour les deux espèces, les quatre substances les plus toxiques sont les mêmes. La forte toxicité du diuron et de l'isoproturon était attendue, ces substances ciblant spécifiquement la photosynthèse par blocage du transfert des électrons au niveau du PSII. En revanche, ce n'était pas le cas des deux fongicides, le quinoxifène et la spiroxamine. Notamment, la spiroxamine s'est montrée presque aussi toxique que le diuron pour l'haptophyte *T. lutea*. Aucune étude ne s'est intéressée à la toxicité de cette substance pour les microalgues et sa présence dans les milieux aquatiques n'est quasiment pas documentée. En conséquence, un suivi de cette substance, notamment dans les milieux soumis à une pollution d'origine viticole, pourrait s'avérer utile du fait de son fort potentiel toxique.

Dans la partie suivante, présentant le quatrième article issu de ces travaux de thèse, les effets d'interaction résultant de mélanges binaires des pesticides les plus toxiques identifiés à la suite du criblage réalisé dans cet article ont été évalués. Les effets de trois de ces mélanges sur la physiologie des microalgues marines *T. lutea* et *S. marinoi* ont ensuite été observés par PAM-fluorescence et via l'utilisation de différents marqueurs fluorescents par cytométrie en flux.

### 3. Article 4 : Toxicité de mélanges binaires de pesticides pour les microalgues marines *Tisochrysis lutea* et *Skeletonema marinoi* : interactions entre les substances et impacts physiologiques

#### Introduction

Les microalgues sont exposées à une multitude de contaminants chimiques dans leur milieu naturel, parmi lesquels des pesticides possédant des modes d'action variés (Caquet *et al.*, 2013 ; Cruzeiro *et al.*, 2015). Le phytoplancton joue un rôle clé dans les écosystèmes aquatiques : il constitue la base des réseaux trophiques (Hlaili *et al.*, 2014) et est responsable de 50% de l'oxygène produit à l'échelle de la planète (Beardall et Raven, 2016). En conséquence, il est nécessaire d'estimer la toxicité des contaminants auxquels ces organismes sont exposés dans leur milieu naturel. Une majorité d'études écotoxicologiques se focalisent sur la mesure de la toxicité d'une seule substance et ne prennent donc pas en compte les effets d'interaction pouvant résulter du mélange de plusieurs contaminants, comme c'est le cas dans l'environnement. Dans certains cas, l'effet combiné de deux substances peut s'avérer plus de deux fois supérieur à celui prédit sur la base de la toxicité des substances seules : c'est ce qu'on appelle la synergie (Cedergreen, 2014). L'effet d'interaction résultant de la combinaison de deux substances en mélange peut être déterminé par des approches de modélisation, cependant, les modèles en question nécessitent la réalisation d'un nombre conséquent d'expérimentations pour obtenir des résultats robustes. En conséquence, dans la plupart de ces études, seul l'effet sur la croissance est étudié. Pour aller plus loin dans l'étude des effets de contaminants sur la physiologie des microalgues, un nombre croissant d'études a recouru à la cytométrie en flux (Prado *et al.*, 2012 ; Esperanza *et al.*, 2015 ; Seoane *et al.*, 2017). Cet outil permet, en plus de la mesure rapide de la densité cellulaire, d'évaluer les effets sur la morphologie des cellules et la fluorescence pigmentaire. De plus, cet outil peut également être utilisé en combinaison avec des marqueurs fluorescents afin d'observer les effets des contaminants testés sur diverses fonctions physiologiques d'intérêt.

Dans ce contexte, cet article visait à :

- i. déterminer l'effet d'interaction de huit mélanges binaires composés des pesticides les plus toxiques pour la croissance des microalgues *T. lutea* et *S. marinoi* (article 3 de ce chapitre) ;
- ii. observer les effets de trois mélanges binaires, illustrant respectivement une interaction additive, antagoniste et synergique, sur la physiologie des deux microalgues par PAM-fluorescence et cytométrie en flux.

Les effets combinés des pesticides en mélanges binaires ont été évalués sur la croissance via l'utilisation d'un test de toxicité en microplaques, puis, des expérimentations en ballons de culture ont été réalisées pour explorer les effets des mélanges choisis sur la physiologie des microalgues.

## **Toxicity of binary mixtures of pesticides to the marine microalgae *Tisochrysis lutea* and *Skeletonema marinoi*: substance interactions and physiological impacts**

Valentin Dupraz<sup>1,2</sup>, Dominique Ménard<sup>1</sup>, Farida Akcha<sup>1</sup>, Hélène Budzinski<sup>3,4</sup>, Sabine Stachowski-Haberkorn<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ifremer, Laboratoire d'Écotoxicologie, rue de l'île d'Yeu, BP 21105, F-44311 Nantes cedex 03, France

<sup>2</sup> Université de Nantes, UFR Sciences et Techniques, 2, rue de la Houssinière, BP 92208, 44322 Nantes Cedex 03, France

<sup>3</sup> Université de Bordeaux, UMR 5805, EPOC, Laboratoire de Physico Toxico Chimie de l'environnement, 351 Cours de la Libération, CS 10004, F-33405 Talence Cedex, France

<sup>4</sup> CNRS, UMR 5805, EPOC, Laboratoire de Physico Toxico Chimie de l'environnement, 351 Cours de la Libération, CS 10004, F-33405 Talence Cedex, France

Corresponding author. E-mail address: valentin.dupraz@ifremer.fr

### **Keywords**

ROS; photosynthesis; lipids; synergy; isoproturon; metazachlor

### **Highlights**

The toxicity of binary pesticide mixtures was evaluated on two microalgal species.

Effects of three selected mixtures were then examined on five physiological functions.

Effects on microalgal physiology were linked to the pesticide's toxic mode of action.

Mixed isoproturon and metazachlor had significant synergistic effects on *S. marinoi*.

Observed synergy could be due to a combined effect on the photosynthetic apparatus.

## Abstract

This study screened binary mixtures of pesticides for potential synergistic interaction effects on growth of the marine microalgae *Tisochrysis lutea* and *Skeletonema marinoi*. It also examined the single and combined effects of three of the most toxic substances on microalgal physiology.

Single substances were first tested on each microalgal species to determine their respective EC<sub>50</sub> and concentration-response relationships. The toxicity of six and seven binary mixtures was then evaluated in microplate experiments on the growth of *T. lutea* and *S. marinoi*, respectively, using two mixture modelling approaches: isobolograms and the MIXTOX tool, based on Concentration Addition (CA) or Independent Action (IA) models. Significant cases of antagonism (for both species) and synergism (for *S. marinoi*) were observed for the mixtures of isoproturon and spiroxamine, and isoproturon and metazachlor, respectively.

These two mixtures, together with that of isoproturon and diuron, for which additivity was observed, were further studied for their impacts on the physiology of each species. Exposures were thus made in culture flasks at three concentrations, or concentration combinations for mixtures, selected to cause 25%, 50% and 75% growth rate inhibition. The effects of the selected pesticides singly and in combination were evaluated at three perceived effect concentrations on esterase metabolic activity, relative lipid content, cytoplasmic membrane potential and reactive oxygen species (ROS) content by flow cytometry, and on photosynthetic quantum yield ( $\Phi'_M$ ) by PAM-fluorescence.

Isoproturon and diuron singly and in mixtures induced 20–40% decreases in  $\Phi'_M$  which was in turn responsible for a significant decrease in relative lipid content for both species. Spiroxamine and metazachlor were individually responsible for an increase in relative lipid content (up to nearly 300% for metazachlor on *S. marinoi*), as well as cell depolarization and increased ROS content. The mixture of isoproturon and metazachlor tested on *S. marinoi* caused a 28–34% decrease in  $\Phi'_M$  that was significantly higher than levels induced by each of substances when tested alone. This strong decrease in  $\Phi'_M$  could be due to a combined effect of these substances on the photosynthetic apparatus, which is likely the cause of the synergy found for this mixture.

### 3.1. Introduction

A significant amount of the pesticides used in agriculture is lost during and after their application due to dispersion processes such as spray-drift, leaching and runoff (Leonard, 1990; Lennartz *et al.*, 1997; Wauchope *et al.*, 2003; Ravier *et al.*, 2005). Thus, numerous pesticides can be detected in environments ranging from freshwater ecosystems near agricultural fields to estuarine and coastal waters (Caquet *et al.*, 2013; Moschet *et al.*, 2014; Cruzeiro *et al.*, 2015). Pesticides can be grouped in many different classes according to their usage (herbicides, insecticides, fungicides, rodenticides, algacides...etc.) and include general biocides (not always permitted in agriculture) and phytosanitary products (PPs). These substances possess various modes of action (MOA) that may potentially harm organisms besides their initial targets, known as non-target organisms.

Microalgae are among the non-target aquatic organisms exposed to pesticides. Indeed, many herbicides target physiological structures (e.g., photosystems) that are the same between microalgae and targeted plants and may therefore have a significant impact. As primary producers, microalgae constitute the basis of aquatic ecological networks, so it is important to study the ways they are impacted by pesticides (Hlaili *et al.*, 2014). Their photosynthesis is responsible for nearly 50% of oxygen production and carbon dioxide fixation on earth (Chapman, 2013 ; Beardall et Raven, 2016). In addition to their ecological relevance, the relatively short generation time of microalgae and their ease of culture in the laboratory have led to the development of several standard toxicity assays using different species. These assays include both freshwater (ISO 8692:2012, 2012) and marine (ISO 10253:2016, 2016) species and allow the establishment of standard ecotoxicological values, such as EC<sub>50</sub> (effective concentration inducing a 50% effect on a selected endpoint) or NOEC (no-observed effect concentration).

In most contaminated aquatic environments, chemicals are present as mixtures. Consequently, testing the toxicity of single substances is not environmentally relevant because their potential interactions should also be considered. In the review by Cedergreen (2014), it was shown that 26% and 7% of the investigated binary mixtures of antifouling biocides and pesticides, respectively, were synergistic, i.e., the toxicity induced by the mixture was at least double the predicted level. Due to the potentially higher toxicity of mixtures, several studies have evaluated the interactive effects resulting from binary mixtures of various chemicals (Altenburger *et al.*, 1990; Cedergreen *et al.*, 2006, 2007, 2013; Koutsaftis and Aoyama, 2006; Sørensen *et al.*, 2007; Bao *et al.*, 2008). In these studies, the Concentration Addition (CA, Loewe and Muischnek, 1926) and/or Independent Action (IA, Bliss, 1939) models were used as references to predict the toxicity resulting from the joint action of chemicals in binary mixtures. The resulting interaction effect of such mixtures was then defined by comparing experimental and predicted (i.e., by the CA or IA model) toxicity responses.

In ecotoxicological studies, growth endpoints such as biomass, growth rate (Vendrell *et al.*, 2009; Bergtold and Dohmen, 2011; Pérez *et al.*, 2011; Nagai and De Schampelaere, 2016) or photosystem II (PSII) quantum yield (Magnusson *et al.*, 2008; Sjollema *et al.*, 2014) are often used to evaluate effects on microalgae. These endpoints measured by using time- and cost-effective short-term assays allow the toxicity of single substances or mixtures to be assessed and have proven very useful for identifying which substances are the most toxic.

A promising tool for examining the underlying causes of toxicity to microalgal growth is flow cytometry. In addition to cell density measurements, flow cytometry can be used to analyse several morphological parameters, such as relative cell size and complexity and relative fluorescence, which is related to pigment content (Marie *et al.*, 2005; Stachowski-Haberkorn *et al.*, 2013; Mansano *et al.*, 2017). Using fluorescent dyes specific to particular physiological functions, several studies have shown the usefulness of flow cytometry to indicate the toxicity of certain chemicals to microalgae (Prado *et al.*, 2009, 2012; Rioboo *et al.*, 2011; Stachowski-Haberkorn *et al.*, 2013; Seoane *et al.*, 2014, 2017; Esperanza *et al.*, 2015; Dupraz *et al.*, 2016). The most commonly investigated physiological functions in these studies are viability, general metabolic activity (often measured by non-specific esterase activity) and reactive oxygen species (ROS), whose accumulation following exposure to certain contaminants can cause oxidative stress and thus cell damage. Effects of pollutants on cytoplasmic membrane potential, relative lipid content and DNA damage have been examined less often. Investigating the effects of chemical substances on such physiological functions can improve our understanding of their toxic MOA.

In this study, seven pesticides, including the biocides isoproturon and diuron and the PPs metazachlor, chlorpyrifos-methyl, azoxystrobin, quinoxifen and spiroxamine, were selected and their effects on the growth and physiology of the marine microalgae *Tisochrysis lutea* and *Skeletonema marinoi* were investigated. Isoproturon and diuron are two PSII inhibitors previously used as herbicides in agriculture and, in the case of diuron, as an antifouling biocide. Today their use is only permitted as films or construction material preservatives (European Chemicals Agency, 2018). Their high toxicity towards microalgae has been reported in numerous studies (Arzul *et al.*, 2006; Bao *et al.*, 2011; Stachowski-Haberkorn *et al.*, 2013; Sjollema *et al.*, 2014; Dupraz *et al.*, 2016, 2018). Metazachlor is a herbicide belonging to the chloroacetamide family that inhibits the synthesis of very long chain fatty acids (VLCFAs) thus disturbing cell division (Götz and Böger, 2004; Vallotton *et al.*, 2008). Its toxicity towards microalgae has only rarely been examined in the literature (Junghans *et al.*, 2003), although another chloroacetamide, S-metolachlor, has received more attention (Debenest *et al.*, 2009; Ebenezer and Ki, 2013; Thakkar *et al.*, 2013; Coquillé *et al.*, 2018). The toxicity of the other PPs to microalgae has rarely been explored, although one study reported the effect of azoxystrobin on a

freshwater alga (Ochoa-Acuña *et al.*, 2009). Consequently, their toxic MOAs towards microalgae are not well known.

To identify potential synergistic interactions, this study aimed first to evaluate the single and combined effects of those pesticides as binary mixtures on the growth of two marine microalgae. In a second step, the toxicity of three out of the eight tested binary mixtures, selected on the basis of their combined effect: additive, synergistic or antagonistic, was investigated at a deeper level. The effects of the single substances and their combinations on the physiology of the two microalgal species were explored to improve our comprehension of the toxic MOA of the interaction resulting from their mixture. To this end, effects on growth, PSII quantum yield and four additional physiological endpoints were examined by flow cytometry: esterase activity, relative lipid content, cytoplasmic membrane potential, and ROS content.

## 3.2. Materials and methods

### 3.2.1. Chemical / toxicant preparation

All chemicals tested in this study (Table 11) were purchased from Sigma-Aldrich (PESTANAL<sup>®</sup>, analytical standard). Stock solutions were prepared in pure methanol ( $\geq 99\%$ ), except for diuron and spiroxamine, which were prepared in pure DMSO ( $\geq 99\%$ ) and acetone ( $\geq 99\%$ ), respectively. These stock solutions were diluted in their respective solvents to make working solutions. All solutions were quantified by liquid or gas chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS or GC-MS/MS). The chemical analysis method used for quantification and the concentrations measured are available in the supplementary material (Table S4a). In all toxicity tests, the nominal concentrations were calculated using the measured concentrations of the stock solutions.

Table 11 : EC<sub>50</sub> values ( $\pm 95\%$  confidence interval) computed with the three expressions of exposure concentrations (§3.2.6.1) (see the description below the table) for the two species of microalgae. Note that only chemicals with data permitting the calculation of the EC<sub>50</sub> are displayed; data for diuron and S-metolachlor come from preliminary experiments and therefore did not permit to compute the “Measured” and “Cell density” modalities.

Class	Substance	Chemical Family	Mode of action (MOA)	EC <sub>50</sub> <sup>(1)</sup> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	
				<i>T. lutea</i>	<i>S. marinoi</i>
<b>Biocide</b> <sup>(2)</sup>	diuron	phenylurea	inhibition of photosynthesis at photosystem II	2.20 $\pm$ 0.071	10.3 $\pm$ 0.80
	isoproturon	phénylurea		13.0 $\pm$ 6.76	18.3 $\pm$ 1.29
<b>Herbicide</b>	metazachlor	chloroacetamide	inhibition of elongase and geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP)	<i>n.d.</i>	370 $\pm$ 43.2
<b>Insecticide</b>	chlorpyrifos-methyl	organophosphate	inhibition of acetylcholine esterase (AChE)	406 $\pm$ 6.33	<i>n.d.</i>
<b>Fungicide</b>	azoxystrobin	strobilurine	inhibition of the respiratory chain at the level of Complex III	624 $\pm$ 207	1504 $\pm$ 386
	quinoxifen	quinoleine	disruption of early cell signalling events	320 $\pm$ 7.10	68.8 $\pm$ 33.0
	spiroxamine	morpholine	inhibition of sterol biosynthesis	5.04 $\pm$ 1.37	45.7 $\pm$ 44.6

### 3.2.2. Microalgal cultures

The marine microalga *Tisochrysis lutea* (*T. lutea*) CCAP 927/14 was purchased from the Culture Center of Algae and Protozoa (CCAP, Oban, Scotland). The marine diatom *Skeletonema marinoi* (*S. marinoi*) AC174 was purchased from the University of Caen Algobank (Caen, France). Microalgal cultures were maintained in sterile f/2 (*T. lutea*) and f/2-silica (*S. marinoi*) media (Guillard et Ryther, 1962 ; Guillard, 1975) at  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ , in a thermostatic chamber at  $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Quantometer Li-Cor Li-250 equipped with a spherical sensor), with a dark:light cycle of 8:16 h. Cultures were grown in 100 mL round borosilicate sterile glass flasks previously heated to  $450^\circ\text{C}$  for 6 h, autoclaved for 20 min at  $121^\circ\text{C}$  and then filled with 50 mL of sterile culture medium. Cultures were diluted weekly to maintain an exponential growth phase.

### 3.2.3. Exposure experiments

#### 3.2.3.1. Binary mixtures in microplates

Prior to the binary mixture experiments, concentration-response experiments were performed for each chemical and microalgal species to determine their  $\text{EC}_{50\text{s}}$ , i.e., the concentration inducing a 50% inhibition of the growth rate calculated after a 96-h exposure (Table 11; supplementary material: Table S4b, Figure S4a, S4b and S4c).

Binary mixtures were then made to evaluate the interaction effects of selected pesticide mixtures on algae growth, using the concentration-response surface approach (Gessner, 1995; White *et al.*, 2004), as previously described in Dupraz *et al.* (2018). Briefly, toxicity assays were run for 96 h in sterile 48-well transparent polystyrene microplates (Greiner Bio-One GmbH, cat. 677102, untreated), each well being filled with 0.90 mL of sterile f/2 or f/2-Si culture medium and 0.10 mL of microalgal culture. For each binary mixture, the two single chemicals (considered as mixture ratios of 100:0% and 0:100%) and their mixtures at perceived effective concentration ratios of 75:25%, 50:50% and 25:75% were tested using six concentrations in triplicate. Six solvent controls were also made up, containing the highest solvent percentage used in the microplate (supplementary material: Table S4c and Figure S4c). Chemicals and solvents (for solvent control treatment) were spiked into separate sterile glass flasks (one glass flask for each tested chemical and concentration) containing 25.0 mL of sterile culture medium prior to distribution into the triplicate wells of the microplate. For each species, after cell density measurement by flow cytometry (3.2.5.3), the microalgal culture was diluted into an intermediate culture at  $2.00 \times 10^5 \text{ cell mL}^{-1}$ . Then, 0.10 mL of this intermediate culture was added to each assay well to give  $2.00 \times 10^4 \text{ cell mL}^{-1}$  at the beginning of exposure. The final volume of each well was 1.00 mL.

Among the 36 possible binary combinations, eight were selected based on the toxicity of the chemicals singly, their expected MOA, and whether or not tests on such mixtures had been reported in the literature. The five following binary mixtures were tested on both species: ISO<sup>3</sup>+DIU; ISO+AZO; ISO+QUI; ISO+SPI; SPI+QUI. Additionally, a SPI+CHL-M mixture was tested on *T. lutea* only, as CHL-M did not induce any effect in *S. marinoi* in the range of tested concentrations. Similarly, mixtures of ISO+MET and SPI+MET were only tested on *S. marinoi* as MET did not affect *T. lutea* (Table 11).

### 3.2.3.2. Binary mixtures in culture flasks

Based on the results obtained during the microplate experiments, three binary mixtures representative of the three types of interaction effects (additivity, antagonism and synergy) were then selected to be tested in 96-h culture flask toxicity assays. These experiments were designed to evaluate the interaction effects of the selected mixtures on several physiological functions by flow cytometry and PAM-fluorescence, thus requiring more microalgal material. As toxicity in culture flasks can vary from that observed in microplates, some preliminary experiments were performed to adjust the range of concentrations to be tested in the culture flasks (data not shown); these enabled us to obtain inhibition effects similar to the ones previously observed in the microplates.

As described in §3.2.2, 100 mL round borosilicate sterile glass flasks were used for the assays and filled with 49.0 mL of sterile f/2 or f/2-Si culture medium. For each binary mixture, the two single chemicals and their 50:50% mixture ratio were tested at three concentrations in triplicate accompanied by three solvent controls containing the highest solvent percentage used in the assay (supplementary material: Table S4d). Chemicals and solvents were spiked directly into the culture flasks. The three exposure concentrations were calculated to induce specific inhibition effects of 25%, 50% and 75% using the previously determined concentration-response relationships for the single chemicals. For mixtures, concentrations of each substance were calculated based on their individual EC<sub>50</sub>s, so that the sum of Toxic Units (TU) of the 50:50% mixture ratio ( $\Sigma TU_{50:50}$ ; see §2.4.2.1 for further details) was equal to 0.5, 1 and 1.5 TU respectively. For each species, after measurement of the cell density by flow cytometry, the microalgal culture was diluted into an intermediate culture at  $1.00 \times 10^6$  cell mL<sup>-1</sup>. Then, 1.00 mL of the intermediate culture was added to each culture flask to give a concentration of  $2.00 \times 10^4$  cell mL<sup>-1</sup> at the beginning of exposure. The final volume in each culture flask was 50.0 mL.

---

<sup>3</sup> Abbreviations: ISO = isotoproturon; DIU = diuron; AZO = azoxystrobin; QUI = quinoxifen; SPI = spiroxamine; CHL-M = chlorpyrifos-methyl; MET = metazachlor.

Flasks were sampled (0.50 mL) every 24 h, during the light phase to evaluate microalgal growth using cell density measured by flow cytometry, as described below in §3.2.5. On the last day of exposure, an additional 2.00 mL were sampled for PSII effective quantum yield ( $\Phi'_M$ , §3.2.5.2) measurement; 5 × 0.50 mL were sampled for subsequent analyses of the selected physiological endpoints using fluorescent dyes.

### 3.2.4. Statistical analysis

#### 3.2.4.1. Concentration-response

Concentration-response analyses were carried out using R software 3.5.1 with the *drv* package (Ritz and Streibig, 2005; Ritz *et al.*, 2015). Each chemical was tested using six concentrations in triplicate and a single three-parameter log-logistic regression model was applied (Equation 1):

$$U = \frac{d}{\left(1 + \left(\frac{x}{EC_{50}}\right)^b\right)} \quad (1)$$

where  $U$  is the response, in our case the 96-h growth rate ( $\mu$ ,  $h^{-1}$ ), at concentration  $x$ ,  $d$  is the upper-limit corresponding to the growth rate of the untreated algae and  $b$  is the slope of the curve around  $EC_{50}$ .

#### 3.2.4.2. Mixture modelling approaches

Procedures of the two mixture modelling approaches (isobole model and MIXTOX tool) are described in detail in Dupraz *et al.* (2018). Therefore, only the concepts and basic principles are described in paragraphs below.

##### *Isobole model*

Isobolograms make it possible to visualize several isoboles, which consist of concentration combinations of two substances causing the same effect. In this study, a 50% inhibition effect on growth rate was used. Predictions from the two reference isobole models, CA and IA, were calculated for each mixture based on the concentration-response parameters of the single chemicals.

More advanced Hewlett and Vølund models (Hewlett, 1969; Vølund, 1992), which are extensions of the CA model, were also tested. Both these models make it possible to describe either synergistic or antagonistic responses relative to CA by the addition of one ( $\lambda$ , Hewlett) or two ( $\eta_1$  and  $\eta_2$ , Vølund) interaction parameters to their respective equations (Sørensen *et al.*, 2007; Ritz and Streibig, 2014).

For each binary mixture analysis (§3.2.3.1), the CA model was first tested against a simultaneous fit of all data to five concentration-response curves computed by the three-parameter log-logistic model using freely-varying slopes,  $EC_{50}$  values and a common upper-limit (eleven-parameter model). The two fits were compared using an  $F$ -test to see whether the extended model described the data significantly better than the reduced model: if  $p > 0.05$ , there was no significant difference between the model predictions; hence, the reduced model (in this case CA) was preferred. If the hypothesis of the previous tests was rejected (i.e., the CA model did not describe the data well), the extended models (Hewlett or Vølund) were tested against CA using  $F$ -tests.

The Toxic Units approach was used to calculate the concentrations of single pesticides in a 50:50% mixture that theoretically resulted in growth rate inhibitions of 25%, 50% and 75% (§3.3.2.3.2) according to the CA model. Individual concentrations of substances  $x$  and  $y$  in the mixture were calculated so that the corresponding  $\Sigma TU_{50:50}$  values were equal to 0.5, 1 and 1.5 TU, as described in Eq. 2 (example with 1 TU, for further details see Dupraz *et al.*, 2018)

$$\frac{x}{EC_{50}X} + \frac{y}{EC_{50}Y} = 1 \quad (2)$$

where  $x$  and  $y$  are the concentrations of the substances  $X$  and  $Y$  in the binary mixtures, and  $EC_{50}X$  and  $EC_{50}Y$  are their respective  $EC_{50}$ s. Since the two substances in a 50:50% mixture ratio contribute equally to the mixture toxicity, individual quotients are thus equal to 0.5 TU. Knowing the  $EC_{50}$ s for each substance as well as the desired inhibition effect, in this case 50% (corresponding to 1 TU), makes it possible to calculate  $x$  and  $y$ .

### **MIXTOX tool**

The MIXTOX tool provides an alternative approach to the Hewlett and Vølund isobole models and is implemented in an Excel<sup>®</sup> macro developed by Jonker *et al.* (2005). Both CA and IA models are implemented, and prediction of the mixture toxicity according to these models can be computed using knowledge of the upper-limit, slope and  $EC_{50}$  calculated by the three-parameter log-logistic model (Eq. 1) for the two single compounds. Deviations from the CA or IA models can be described by the addition of either a single parameter  $a$ , corresponding to symmetric deviations and using a synergism/antagonism (S/A) model; or by a second additional parameter,  $b$ , corresponding to asymmetric deviations in the dose ratio/dose level-dependent deviation (DR/DL). Mathematical derivations of the models and interpretations are given in Jonker *et al.* (2005).

In order to fit the models to the experimental data, the built-in solver function (Excel<sup>®</sup>) was used to minimize the residual sum of squares ( $SS$ ) by interacting with the following parameters: upper-limit, slope and  $EC_{50}$ , as well as interaction parameters in the case of the S/A and DR/DL model

extensions. A  $\chi^2$  test was also performed to determine whether the S/A model extension provides a significantly better fit ( $p < 0.05$ ) than the reference model (CA or IA), and similarly if DR/DL is better than S/A and CA/IA.

### 3.2.5. Measurements on microalgae

#### 3.2.5.1. Microalgal growth

##### *Microplate reader*

Microalgal growth was measured every 24 h, during the light phase using chlorophyll fluorescence. Microplates were analysed using a SAFIRE microplate reader (TECAN) with the *XFluor4beta* Excel<sup>®</sup> macro as software. Excitation/emission wavelengths were: 450/684 nm (10.0 nm bandwidth), nine reads were performed per well from the bottom, with an integration time of 20.0  $\mu$ s. Each microplate was shaken for 20 s before the reading, using an Orbis Plus (Mikura Ltd) microplate shaker in orbital mode. For each well, the growth rate was calculated for each species and substance combination tested over the 96-h exposure period, using the equation:

$$\mu = \ln(F_t - F_0)/t,$$

where  $F_t$  is the fluorescence (a.u.) of the well at  $t$  (h),  $\mu$  ( $\text{h}^{-1}$ ) is the growth rate and  $F_0$  the initial fluorescence intensity at  $t = 0$  h.

##### *Flow cytometry*

Fresh microalgal samples (0.50 mL, 2.3.2) were run on a BD-Accuri C6 flow cytometer (Becton Dickinson Accuri<sup>™</sup>) equipped with blue (488 nm) and red (640 nm) lasers, detectors of forward (FSC) and side (SSC) light scatter, and four fluorescence detectors:  $530 \pm 15$  nm (FL1),  $585 \pm 20$  nm (FL2),  $> 670$  nm (FL3) and  $675 \pm 12.5$  nm (red laser, FL4). FL1 vs FL4 channel density plots were used to determine cell density for both microalgal species, and each species was gated to avoid counting non-microalgal particles. For each culture flask, the growth rate was calculated for the species and substance/s tested over the 96-h exposure period, with the following equation:  $\mu = \ln(C_t - C_0)/t$ , where  $C_t$  is the cell density ( $\text{cell mL}^{-1}$ ) of the culture at  $t$  (h),  $\mu$  ( $\text{h}^{-1}$ ) is the growth rate, and  $C_0$  the initial cell density at  $t = 0$  h.

#### 3.2.5.2. Photosystem II effective quantum yield

Photosystem II effective quantum yield (operational yield:  $\Phi'_M$ ) was measured by Pulse Amplitude Modulated (PAM) fluorescence using an Aquapen-C AP-C 100 fluorometer (Photon System

Instruments® , Drasov, Czech Republic). Measurements were made using fresh 2.00-mL microalgal samples (§3.2.3.2) in light adapted conditions (light intensity of the culture chamber). Three measurements were performed for each culture and the mean of these values taken.

### 3.2.5.3. Physiological endpoints

The selected physiological endpoints were followed using specific fluorescent dyes. As mentioned in the introduction, some pesticides can affect the fluorescence of microalgal pigments. As a result, the fluorescence of fresh exposed cells (unstained, FL1 or FL2<sub>fresh</sub>; supplementary material: Table S4e) can significantly differ from controls. Therefore, to avoid any bias, FL1 or FL2<sub>fresh</sub> values were systematically subtracted from the fluorescence values of stained cells: FL1<sub>FDA</sub>, FL1<sub>BOD</sub>, FL1<sub>DIB</sub>, FL1<sub>DCF</sub> and FL2<sub>DHE</sub>, for cells stained with FDA, BODIPY<sup>505/515</sup>, DiBAC<sub>4</sub>(3), H<sub>2</sub>DCFDA and dihydroethidium, respectively (supplementary material: Tables S6 and S7).

### Metabolic activity

Metabolic activity of microalgal cells was estimated using the fluorescein-based lipophilic dye fluorescein diacetate (FDA, ThermoFisher Invitrogen™). The non-fluorescent FDA enters the cells freely. Once inside, acetate residues are cleaved by non-specific esterases, resulting in the formation of fluorescein, which is retained by microalgal cells with intact plasma membranes. The mean fluorescence intensity signal emitted by marked cells is thus proportional to the amount of fluorescein accumulated and the time elapsed (Prado *et al.*, 2009). Consequently, it is possible to evaluate changes in the cell metabolic activity by comparing the mean fluorescence intensity (MFI) of metabolically active (FDA+) cells (Seoane *et al.*, 2014).

FDA-derived fluorescence was detected by the FL1 detector (530 ± 15 nm) on a logarithmic scale. The protocol for metabolic activity determination was adapted from Prado *et al.* (2009). Preliminary experiments were carried out to determine the optimal FDA concentration and incubation time to use for *T. lutea* and *S. marinoi* cultures, using cultures heated to 80°C as a positive control. Fresh microalgal samples (0.50 mL, §2.3.2) were incubated with FDA at final concentrations of 2.50 (*T. suecica*, 0.005% DMSO) or 5.00 µM (*S. marinoi*, 0.01% DMSO) for 10 min in the dark at room temperature before analysis.

### Relative intracellular lipid content

The green lipophilic fluorochrome BODIPY<sup>505/515</sup> (ThermoFisher Invitrogen™) was used to estimate the relative intracellular lipid content. This fluorescent compound is accumulated in intracellular lipid

bodies (which are morphologically diverse) by a diffusion mechanism and subsequent trapping. This dye easily crosses cell and organelle membranes due to its high oil/water partition coefficient (Akimoto and Mimuro, 2007; Cooper *et al.*, 2010). Changes in relative intracellular lipid content can be detected by comparing the MFI of marked cells (BOD+).

BODIPY<sup>505-515</sup>-derived fluorescence was detected by the FL1 detector (530 ± 15 nm) on a logarithmic scale.

The protocol for relative intracellular lipid content was adapted from Brennan *et al.* (2012) and Dupraz *et al.* (2016) and preliminary experiments were carried out to determine the optimal BODIPY<sup>505/515</sup> concentration and incubation time to use for *T. lutea* and *S. marinoi* cultures. For both species, samples containing 0.50 mL of microalgal culture (§3.2.3.2) were incubated with 0.48 µM (0.01% DMSO) BODIPY<sup>505/515</sup> and left in the dark at room temperature for 10 min before analysis.

### ***Cytoplasmic membrane potential***

In this study, the cytoplasmic membrane potential of microalgal cells was monitored using the slow-response potential-sensitive probe, DiBAC<sub>4</sub>(3) (ThermoFisher Invitrogen™). This lipophilic anionic dye undergoes a potential dependent distribution between cytoplasm and intracellular medium (Prado *et al.*, 2012): increased membrane depolarization will cause an additional influx of DiBAC<sub>4</sub>(3) into microalgal cells, where it binds to intracellular protein and/or membrane, and result in increased MFI; reciprocally, membrane hyperpolarization will result in decreased MFI. Changes in cytoplasmic membrane potential can be detected by comparing the MFI of marked cells (DiBAC+). The DiBAC<sub>4</sub>(3)-derived fluorescence was detected with the FL1 detector (530 ± 15 nm) on a logarithmic scale.

Staining protocols from Prado *et al.* (2012) and Seoane *et al.* (2017) were adapted. Preliminary experiments were carried out to determine the optimal DiBAC<sub>4</sub>(3) concentration and incubation time to use for *T. lutea* and *S. marinoi* cultures. Briefly, microalgal samples (0.50 mL, §3.2.3.2) were stained with 0.97 µM of DiBAC<sub>4</sub>(3) (0.01% DMSO) and analysis was performed after 10 min incubation in the dark at room temperature.

### ***Reactive oxygen species (ROS)***

The fluorescent dyes 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCFDA or DCFH-DA, Sigma-Aldrich®) and dihydroethidium (or hydroethidine, DHE, ThermoFisher Invitrogen™) were both used to measure ROS content in microalgal cells.

Non-fluorescent and non-polar H<sub>2</sub>DCFDA enters cells freely. In presence of the ROS hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), peroxy radical (ROO•) or peroxy nitrite anion (ONOO<sup>-</sup>) acetate groups are cleaved by intracellular non-specific esterases, resulting in the formation of the highly fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF). Differences in intracellular ROS content can therefore be assessed by comparing MFI of positively-marked cells (DCF+). The FL1 detector (530 ± 15 nm, logarithmic scale) was used to detect H<sub>2</sub>DCFDA-derived fluorescence. The staining protocol was adapted from Stachowski-Haberkorn *et al.* (2013). Preliminary experiments were carried out to determine the optimal H<sub>2</sub>DCFDA concentration and incubation time to use for *T. lutea* and *S. marinoi* cultures by exposing test cultures to 1.00 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (final concentration) as a positive control. Briefly, samples containing microalgal cells (0.50 mL, §3.2.3.2) were incubated with 60.0 µM H<sub>2</sub>DCFDA (0.01% DMSO) and kept in the dark at room temperature for 30 min before analysis.

DHE enters the cells freely and is selectively oxidized by superoxide anions (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) to form 2-hydroethidium, which has orange fluorescence and subsequently intercalates in the DNA. As for H<sub>2</sub>DCFDA, differences in superoxide anion content can be monitored by comparing the MFI of positively-marked cells (DHE+). The DHE-derived fluorescence was detected with the FL2 detector (585 ± 20 nm) on a logarithmic scale. The staining protocol was adapted from Prado *et al.* (2012). Preliminary experiments were carried out to determine the optimal DHE concentration and incubation time to use for *T. lutea* and *S. marinoi* cultures by exposing test cultures to 1.00 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (final concentration) as a positive control. Fresh microalgal samples (0.50 mL, §3.2.3.2) were incubated with DHE at final concentrations of 15.85 µM (0.01% DMSO) for 30 min in the dark at room temperature before analysis.

### 3.3. Results

#### 3.3.1. Toxicity of single substances

In the microplate experiments, prior to determining the interactive effects of the eight selected binary mixtures, concentration-response experiments were performed for each chemical singly to determine their EC<sub>50</sub> on both microalgal species (Table 11). In general, EC<sub>50</sub>s later determined in the binary mixture experiments (supplementary material: Table S4h) were close to those determined in preliminary experiments. The most toxic pesticide for both microalgal species was diuron, with EC<sub>50</sub>s around 2 µg L<sup>-1</sup> for *T. lutea* and 10 µg L<sup>-1</sup> for *S. marinoi*. The herbicide isoproturon and fungicide spiroxamine were also relatively toxic to both species, with EC<sub>50</sub>s around 10 and 5 µg L<sup>-1</sup>, respectively, for *T. lutea* and ranging from 13 to 20 µg L<sup>-1</sup> and 35 and 45 µg L<sup>-1</sup> for *S. marinoi*.

EC<sub>50</sub>s determined in the culture flask experiments were generally lower than those obtained in microplates (supplementary material: Table S4e). For *T. lutea*, while a very similar EC<sub>50</sub> was obtained for diuron ( $2.21 \pm 0.48 \mu\text{g L}^{-1}$ ), a nearly two-fold lower EC<sub>50</sub> was obtained for isoproturon ( $\sim 5\text{-}6 \mu\text{g L}^{-1}$ ) and the value for spiroxamine was six-fold lower ( $0.83 \pm 0.07 \mu\text{g L}^{-1}$ ) in the flask than in the microplate. For *S. marinoi*, a similar EC<sub>50</sub> was obtained for metazachlor ( $289 \pm 48.0 \mu\text{g L}^{-1}$ ), but for diuron ( $5.74 \pm 0.28 \mu\text{g L}^{-1}$ ) and spiroxamine ( $15.1 \pm 0.79 \mu\text{g L}^{-1}$ ) the values were roughly halved in the flasks while the EC<sub>50</sub> for isoproturon was four- to six-fold lower (between  $3.22 \pm 0.17$  and  $5.17 \pm 0.33 \mu\text{g L}^{-1}$ ).

### 3.3.2. Binary mixtures in microplates

Six and seven binary mixtures were tested on *T. lutea* and *S. marinoi*, respectively, to investigate the interactive effects resulting from potential synergistic interactions. Among the eight different binary mixtures tested, only one was composed of two chemicals with the same MOA, i.e., the mixture of the PSII inhibitors isoproturon and diuron (Table 12). In general, the same main interaction effect was determined by both mixture modelling approaches, except for two mixtures (one for each species).

Table 12 : EC<sub>50</sub> values ( $\pm$  95% confidence interval) computed with the three expressions of exposure concentrations (§3.2.6.1) (see the description below the table) for the two species of microalgae. Note that only chemicals with data permitting the calculation of the EC<sub>50</sub> are displayed; data for diuron and S-metolachlor come from preliminary experiments and therefore did not permit to compute the “Measured” and “Cell density” modalities.

Mixture	<i>T. lutea</i>				<i>S. marinoi</i>			
	Isobole		MIXTOX		Isobole		MIXTOX	
	$\Sigma TU_{50:50}^{(1)}$	BFM <sup>(2)</sup> / EFF. <sup>(3)</sup> Int. param. $\pm$ s.e. <i>p</i> -value	Best Reference Model (BRM)	BFM / EFF. Int. param. <i>p</i> -value	$\Sigma TU_{50:50}$	BFM / EFF. Int. param. $\pm$ s.e. <i>p</i> -value	Best Reference Model (BRM)	BFM / EFF. Int. param. <i>p</i> -value
<b>ISO + DIU</b>	0.87 $\pm$ 0.09	Hewlett / <b>SYN.</b> $\lambda = 1.24 \pm 0.06$ <i>p</i> < 10 <sup>-3</sup>	<b>CA</b>	S/A / <b>SYN.</b> <i>a</i> = -0.67 <i>p</i> < 10 <sup>-3</sup>	0.95 $\pm$ 0.06	CA / <b>ADD.</b>	<b>CA</b>	CA / <b>ADD.</b>
<b>ISO + MET</b>				0.68 $\pm$ 0.03	Hewlett / <b>SYN.</b> $\lambda = 1.57 \pm 0.06$ <i>p</i> < 10 <sup>-3</sup>	<b>CA</b>	S/A / <b>SYN.</b> <i>a</i> = -1.67 <i>p</i> < 10 <sup>-3</sup>	
<b>ISO + AZO</b>	1.01 $\pm$ 0.28	CA / <b>ADD.</b>	<b>CA</b>	DR <sub>CA</sub> / <b>ANT.</b> <i>a</i> = 2.19 <i>b</i> <sub>ISO</sub> = -2.59 <i>p</i> < 10 <sup>-3</sup>	1.31 $\pm$ 0.05	Vølund / <b>ANT.</b> $\eta_1 = 0.80 \pm 0.57$ $\eta_2 = 7.7 \pm 1.84$ <i>p</i> < 10 <sup>-3</sup>	<b>IA</b>	DR <sub>IA</sub> / <b>ANT.</b> <i>a</i> = 5.49 <i>b</i> <sub>ISO</sub> = -7.67 <i>p</i> < 10 <sup>-3</sup>
<b>ISO + QUI</b>	1.52 $\pm$ 0.09	Vølund / <b>ANT.</b> $\eta_1 = 0.66 \pm 0.10$ $\eta_2 = 3.84 \pm 0.65$ <i>p</i> < 10 <sup>-3</sup>	<b>CA</b>	DL <sub>CA</sub> / <b>ANT.</b> <i>a</i> = 0.74 <i>b</i> <sub>ISO</sub> = -0.62 <i>p</i> < 10 <sup>-3</sup>	1.10 $\pm$ 0.11	Hewlett / <b>ANT.</b> $\lambda = 0.81 \pm 0.072$ <i>p</i> = 0.04	<b>CA</b>	DL <sub>CA</sub> / <b>ANT.</b> <i>a</i> = 3.27 <i>b</i> <sub>DL</sub> = 0.82 <i>p</i> < 10 <sup>-3</sup>
<b>ISO + SPI</b>	1.48 $\pm$ 0.10	Vølund / <b>ANT.</b> $\eta_1 = 0.66 \pm 0.10$ $\eta_2 = 4.50 \pm 0.89$ <i>p</i> < 10 <sup>-3</sup>	<b>CA</b>	DR <sub>CA</sub> / <b>ANT.</b> <i>a</i> = 2.34 <i>b</i> <sub>ISO</sub> = -1.66 <i>p</i> < 10 <sup>-3</sup>	2.19 $\pm$ 0.15	Vølund / <b>ANT.</b> $\eta_1 = 0.97 \pm 0.06$ $\eta_2 = 8.57 \pm 0.90$ <i>p</i> < 10 <sup>-3</sup>	<b>IA</b>	DR <sub>IA</sub> / <b>ANT.</b> <i>a</i> = 11.77 <i>b</i> <sub>ISO</sub> = -15.83 <i>p</i> < 10 <sup>-3</sup>
<b>SPI + QUI</b>	0.86 $\pm$ 0.01	Hewlett / <b>SYN.</b> $\lambda = 1.18 \pm 0.03$ <i>p</i> < 10 <sup>-3</sup>	<b>CA</b>	DL <sub>CA</sub> / <b>SYN.</b> <i>a</i> = -0.14 <i>b</i> <sub>SPI</sub> = -2.04 <i>p</i> < 10 <sup>-3</sup>	1.19 $\pm$ 0.03	Hewlett / <b>ANT.</b> $\lambda = 0.56 \pm 0.03$ <i>p</i> < 10 <sup>-3</sup>	<b>IA</b>	DR <sub>IA</sub> / <b>SYN.</b> <i>a</i> = -11.92 <i>b</i> <sub>SPI</sub> = 14.37 <i>p</i> < 10 <sup>-3</sup>
<b>SPI + CHL-M</b>	0.90 $\pm$ 0.18	Vølund / <b>ANT.</b> - <b>SYN.</b> $\eta_1 = 2.18 \pm 0.58$ $\eta_2 = 0.37 \pm 0.14$ <i>p</i> = 10 <sup>-3</sup>	<b>CA</b>	DR <sub>CA</sub> / <b>ANT.</b> <i>a</i> = 1.60 <i>b</i> <sub>SPI</sub> = -3.14 <i>p</i> = 0.006				
<b>SPI + MET</b>				1.42 $\pm$ 0.11	Hewlett / <b>ANT.</b> $\lambda = 0.51 \pm 0.09$ <i>p</i> < 10 <sup>-3</sup>	<b>IA</b>	S/A / <b>ANT.</b> <i>a</i> = 0.80 <i>p</i> < 10 <sup>-3</sup>	

<sup>(1)</sup>  $\Sigma TU$  for other mixture ratios (75:25% and 25:75%), as well as individual EC<sub>50</sub>s for single chemicals are available in supplementary material: Table S2); <sup>(2)</sup> BFM: Best fitting model, either a reference model (CA or IA) or a more complex model, Hewlett or S/A (one interaction parameter), Vølund or DR/DL (two interaction parameters); <sup>(3)</sup> EFF.: Main interaction effect noted for the mixture, either additivity (ADD.), antagonism (ANT.) or synergism (SYN.).

For *T. lutea*, according to the isobole model and with respect to CA model predictions, one mixture was additive (ISO+AZO), two were antagonistic (ISO+QUI and ISO+SPI), two were synergistic (ISO+DIU and SPI+QUI), and one was partly antagonistic and partly synergistic (SPI+CHL-M) (Figure 47, Table 12). Regarding the results obtained with the MIXTOX tool, the CA model always gave better predictions than the IA model: compared to CA model predictions, two mixtures were synergistic (ISO+DIU and SPI+QUI), while the four others were antagonistic (Table 12).

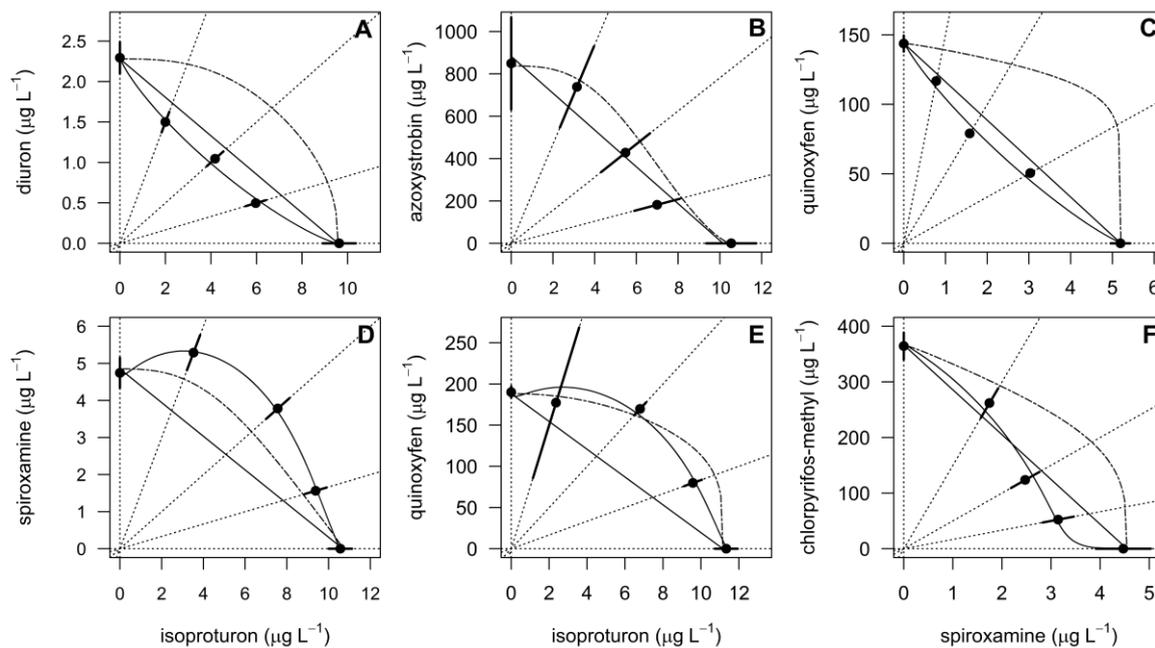


Figure 47 : Isobolograms resulting from the binary mixtures of isoprotruron with diuron (A), azoxystrobin (B), spiroxamine (D) or quinoxifen (E), as well as spiroxamine with quinoxifen (C) or chlorpyrifos-methyl (F), tested on *Tisochrysis lutea* in microplates. The points represent the  $\text{EC}_{50} \pm 2$  standard-error, s.e. The straight solid line is the CA isobole; the dot-dashed line is the IA isobole; the curved solid line (when displayed) is the best fitting isobole model when there is a significant interaction.

Regarding *S. marinoi*, the isobole model described one additive interaction (ISO+DIU), five cases of antagonism (ISO+AZO, ISO+QUI, ISO+SPI, SPI+QUI and SPI+MET) and one case of synergism (ISO+MET) (Figure 48, Table 12). Contrary to what was observed with *T. lutea*, the IA model gave better predictions for four mixtures out of seven: the mixture ISO+DIU behaved according to the CA model predictions, while the ISO+QUI and ISO+MET mixtures resulted in antagonism and synergism, respectively, compared with CA model predictions. Compared with IA model predictions, three mixtures (ISO+AZO, ISO+SPI and SPI+MET) induced antagonism, while the mixture SPI+QUI was synergistic (Table 12).

Following these experiments, three mixtures were selected to further explore their effects on the physiology of the two microalgae: ISO+DIU, as an example of concentration additivity; ISO+SPI, as an example of antagonism, and ISO+MET (tested on *S. marinoi*), as a case of synergy.

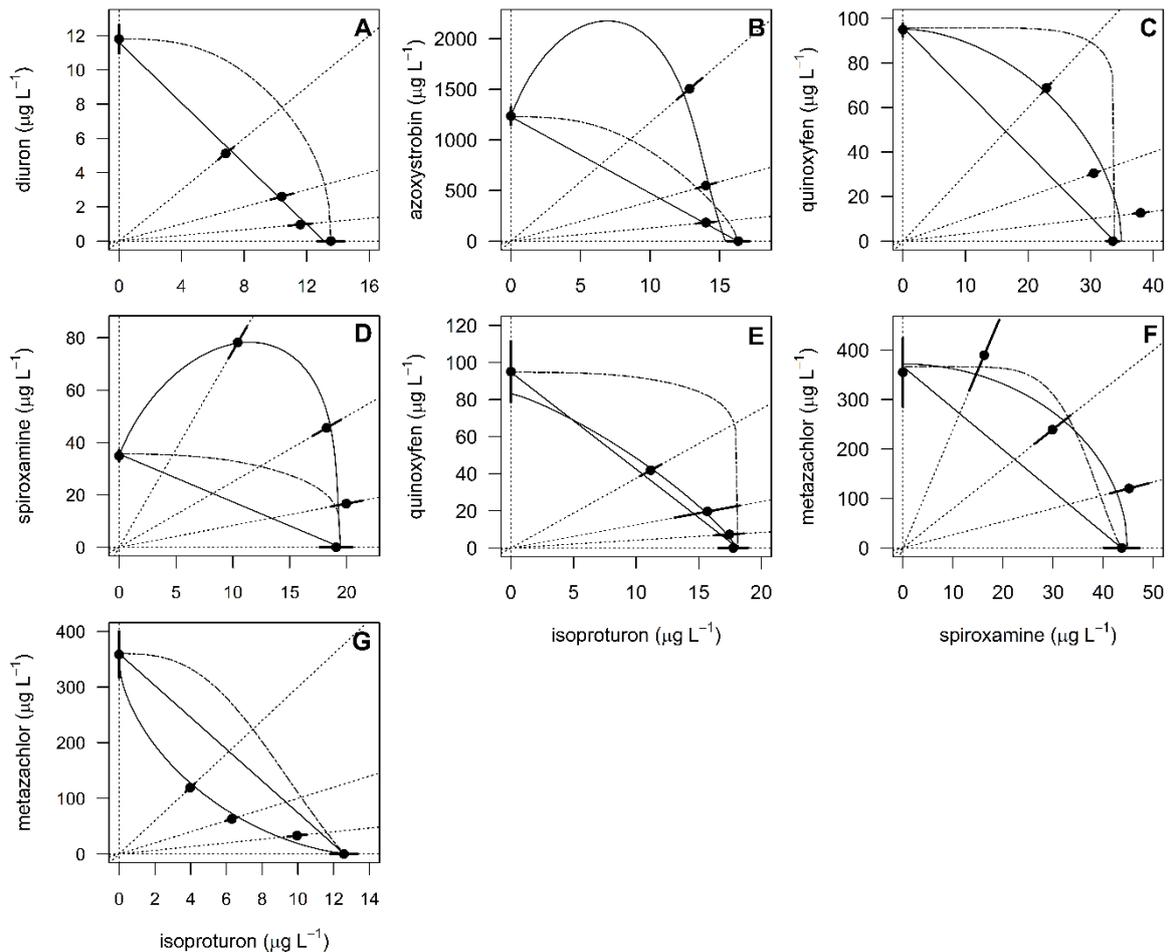


Figure 48 : Isobolograms resulting from the binary mixtures of isoproturon with diuron (A), azoxytrobin (B), spiroxamine (D), quinoxyfen (E) or metazachlor (G), as well as spiroxamine with quinoxyfen (C) or chlorpyrifos-methyl (F), tested on *Skeletonema marinoi* in microplates. The points represent the  $EC_{50} \pm 2$  standard-error, s.e. The straight solid line is the CA isobole; the dot-dashed line is the IA isobole; the curved solid line (when displayed) is the best fitting isobole model when there is a significant interaction.

### 3.3.3. Binary mixtures in culture flasks

The toxicity of the three selected combinations to the two marine microalgae was examined more closely in larger volumes. Culture flask experiments were run for each single substance and the 50:50% mixture ratio. Effects on growth, PSII quantum yield and several physiological functions were explored using PAM-fluorescence and flow cytometry.

#### 3.3.3.1. Mixture of isoproturon and diuron

The inhibition of growth rate ( $GRI\%$ ) induced by isoproturon and diuron singly, or in a mixture, was close to expected for the haptophyte *T. lutea* (supplementary material: Table S4e). Regarding the effects on  $\Phi'_M$ , similar effects were obtained at equivalent  $GRI\%$  for isoproturon, diuron and their

mixture, with decreases ranging from 17% to 34% (Figure 49). Effects of isoproturon were concentration-dependent, while for diuron and the mixture, decreases observed at 1 and 1.5 TU were similar, but significantly higher than the one at 0.5 TU. Among the other parameters measured by flow cytometry, only BODIPY<sup>505/515</sup> (FL1<sub>BOD</sub>) and dihydroethidium (FL2<sub>DHE</sub>) induced significant effects relative to the controls: decreases ranging from 23% to 39% were observed in FL1<sub>BOD</sub>. Significant differences in the decreases depending on the TU tested could only be observed for diuron, for which 1.5 TU induced a significantly higher decrease than 0.5 TU. Finally, isoproturon alone and in mixture with diuron induced equivalent increases in FL2<sub>DHE</sub>, ranging from 72% to 115%, respectively.

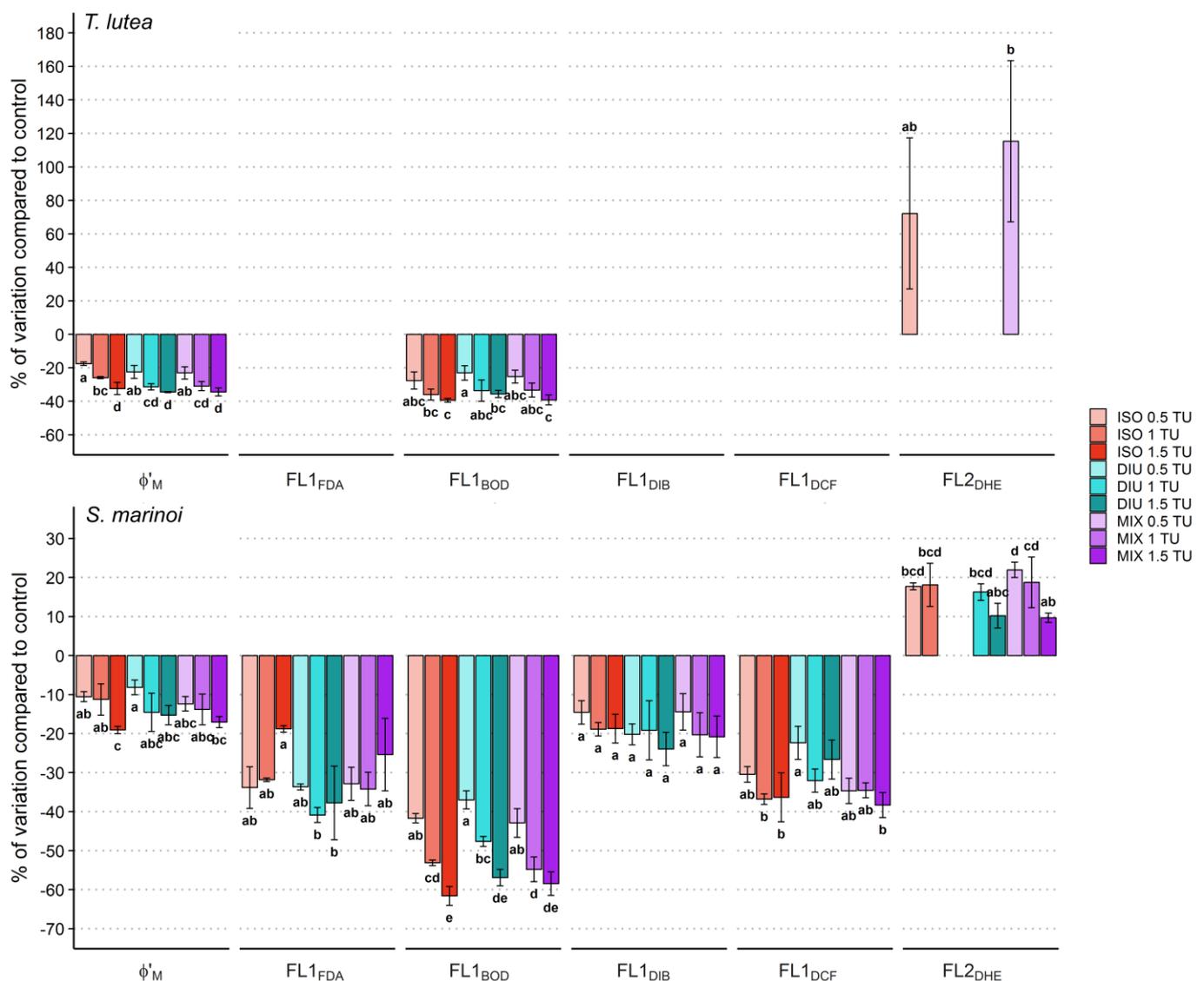


Figure 49 : Effects, measured as the % of variation compared with solvent controls, of isoproturon (ISO), diuron (DIU) and their binary mixtures (MIX) on the PSII quantum yield ( $\Phi'_M$ ), esterase activity (FL1<sub>FDA</sub>), relative lipid content (FL1<sub>BOD</sub>), cytoplasmic membrane potential (FL1<sub>DIB</sub>) and ROS content (FL1<sub>DCF</sub> and FL2<sub>DHE</sub>) in *T. lutea* and *S. marinoi*. Concentrations are expressed as TUs. Only significant effects relative to solvent controls are displayed; letters denote significant differences between treatments (ANOVA,  $p < 0.05$ ).

For the diatom *S. marinoi*, significant effects with respect to the controls (Figure 49) were observed whatever the endpoint measured. The GRi<sup>0</sup> obtained after exposure to diuron was close to that expected, while slightly higher for isoproturon and the mixture. Regarding impacts on PSII quantum yield, significant decreases in  $\Phi^*_M$ , ranging from 8% to 19% were observed, although almost no significant differences between the TU tested were observed. Significant decreases in FL1<sub>FDA</sub> were observed for all treatments tested, ranging from 19% to 41%, but almost no significant differences between treatments were observed. Interestingly, marked decreases on FL1<sub>BOD</sub> (from 37% to 62%) were induced by isoproturon, diuron and their mixture. For isoproturon and diuron, the decreases observed were concentration-dependent for all TU tested, while a significant difference was only observed between 0.5 and 1 or 1.5 TU for the mixture. On FL1<sub>DIB</sub>, a similar decrease of about 15–24% was observed for all the treatments, with no significant difference detected between them. All treatments also significantly decreased FL1<sub>DCF</sub>, from 22% to 38%, but no significant differences between the concentrations tested were found. Finally, all treatments except ISO 1.5 TU and DIU 0.5 TU significantly increased FL2<sub>DHE</sub>, from 10% to 22%. The increases caused by the mixture at 0.5 and 1 TU were significantly higher than those at 1.5 TU.

### 3.3.3.2. Mixture of isoproturon and spiroxamine

Regarding the effects of this mixture on *T. lutea*, isoproturon alone was responsible for a 15% higher inhibition of growth rate (GRi) at 0.5 and 1 TU, while the effect at 1.5 TU was close to that expected (supplementary material: Table S4e). On the contrary, spiroxamine exposure led to 18%, 12% and 14% lower GRi at 0.5, 1 and 1.5 TU, respectively. Similarly, GRi<sup>0</sup> results obtained for the mixture were lower than expected, with 5%, 15% and 22% differences between observed and expected at 0.5, 1 and 1.5 TU, respectively. Isoproturon induced significant decreases in  $\Phi^*_M$ , ranging from 17% to 29%, while only the highest concentration of spiroxamine (6%) and all mixture conditions (from 12% to 24%) resulted in significant decreases (Figure 50). At equivalent TU, isoproturon induced significantly higher decreases than the mixture. Both FL1<sub>FDA</sub> and FL1<sub>BOD</sub> increased significantly upon exposure to spiroxamine at 1 and 1.5 TU, with increases ranging from 83% to 123% and 123% to 145%, respectively. No effects of isoproturon or the mixture were observed for these parameters. FL1<sub>DIB</sub> decreased significantly after exposure to 1 (32%) and 1.5 TU (39%) isoproturon, while a 94% increase in FL1<sub>DIB</sub> was induced by spiroxamine at 1.5 TU and no significant effects were observed for the mixture. Both spiroxamine and the mixture caused significant increases in FL1<sub>DCF</sub> at all TU tested, ranging from 72% to 293% for spiroxamine and 91% to 126% for the mixture. Isoproturon had no significant effect on FL1<sub>DCF</sub>, but significant decreases of 23% and 26% in FL2<sub>DHE</sub> were observed after exposure to 1 and 1.5 TU, respectively. At equivalent TU, the mixture caused slightly

lower decreases of 14% and 17% in FL2<sub>DHE</sub>, although this result was non-significant compared with that observed with isotroturon.

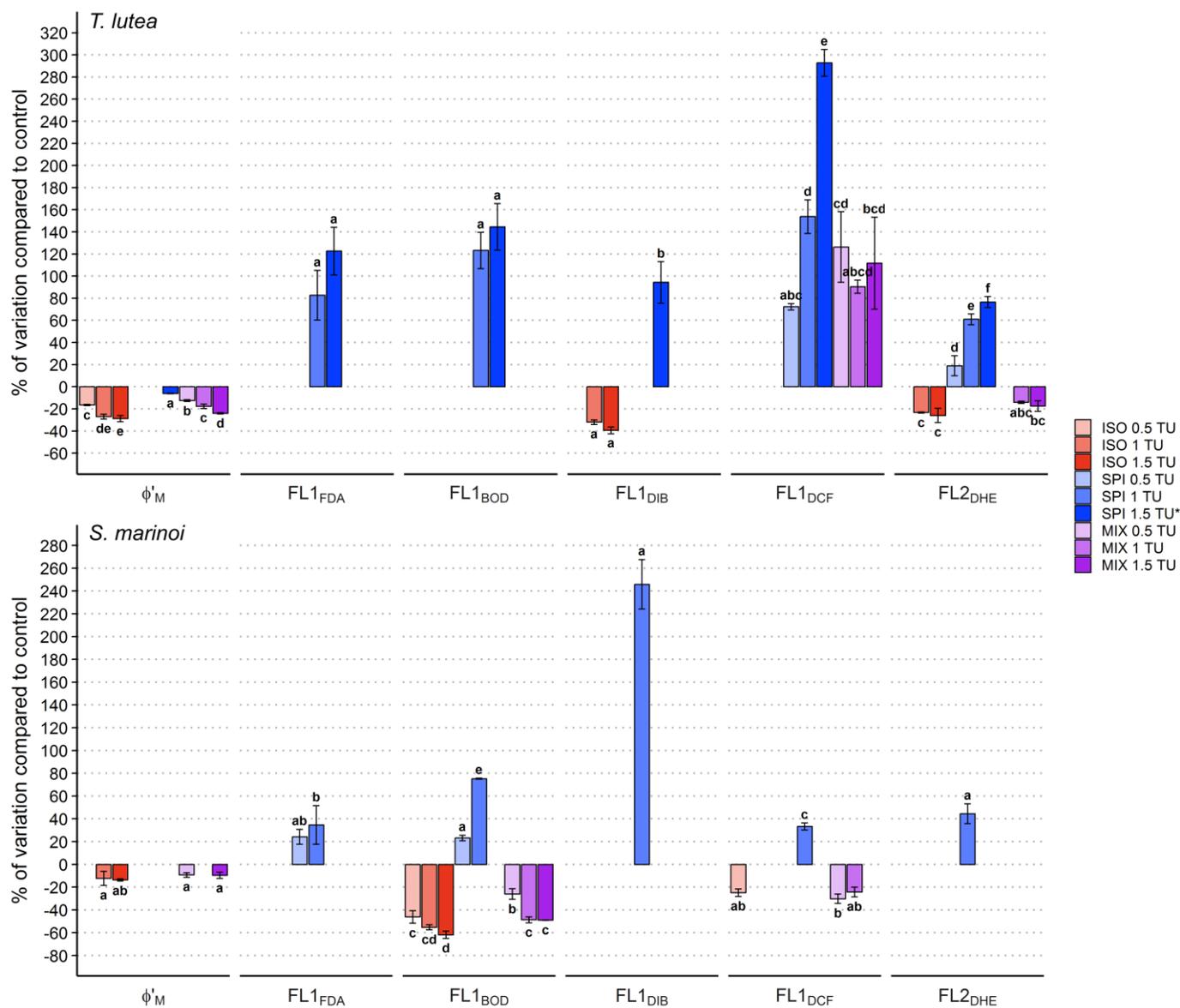


Figure 50 : Effects, measured as the % of variation compared with solvent controls, of isotroturon (ISO), spiroxamine (SPI) and their binary mixtures (MIX) on the PSII quantum yield ( $\phi'_M$ ), esterase activity (FL1<sub>FDA</sub>), relative lipid content (FL1<sub>BOD</sub>), cytoplasmic membrane potential (FL1<sub>DIB</sub>) and ROS content (FL1<sub>DCF</sub> and FL2<sub>DHE</sub>) in *T. lutea* and *S. marinoi*. Concentrations are expressed as TUs. Only significant effects relative to solvent controls are displayed; letters denote significant differences between treatments (ANOVA,  $p < 0.05$ ). \*For *S. marinoi*, effects of SPI 1.5 TU are not displayed due to total inhibition of microalgal growth.

For the diatom *S. marinoi*, only isotroturon induced the expected GRi%. At 0.5 TU, spiroxamine induced almost no effect on growth rate (6% GRi), while at 1 TU, an 84% GRi was observed, and 100% inhibition was obtained upon exposure to 1.5 TU (supplementary material: Table S4e). The effects induced by the mixture were much lower than expected, as 10%, 19% and 32% GRi were induced at 0.5, 1 and 1.5 TU, respectively. Small, but significant decreases were observed on  $\phi'_M$ : at 1 (12%) and 1.5 TU (14%) for isotroturon; and at 0.5 (9%) and 1.5 TU (10%) for the mixture (Figure

50). GRI% did not appear to be affected by spiroxamine as no effect were observed. *S. marinoi* cells exposed to spiroxamine showed an increase in FL1<sub>FDA</sub> of 24% at 0.5 TU and 35% at 1.5 TU. Both isoproturon and the mixture significantly decreased FL1<sub>BOD</sub>: the lowest decrease (26%) was caused by the mixture at 0.5 TU, while the highest (62%) was induced by 1.5 TU isoproturon. Spiroxamine, in contrast, led to 23 and 75% increases in FL1<sub>BOD</sub> after exposure to 0.5 and 1 TU, respectively. A 246% increase in FL1<sub>DIB</sub> was observed after exposure to 1 TU spiroxamine, while none of the other treatments had any effect on this parameter. Decreases of 25%, 30% and 24% were observed on FL1<sub>DCF</sub> after exposure to 0.5 TU isoproturon and the mixture at 0.5 and 1 TU, respectively. Unlike isoproturon and the mixture, spiroxamine increased FL1<sub>DCF</sub> by 33% at 1 TU. Finally, the only significant effect on FL2<sub>DHE</sub> was obtained with spiroxamine, which caused a 44% increase at 1 TU.

### 3.3.3.3. Mixture of isoproturon and metazachlor

This mixture was only tested on *S. marinoi*. The GRI% results were not those expected for this mixture. For isoproturon, and to an even greater extent for the mixture, GRI values induced were far higher than expected, especially for the lowest concentrations, with 17% and 45% differences at 0.5 TU, and 24% and 31% differences at 1 TU, respectively (supplementary material: Table S4e). The three concentrations tested for metazachlor induced quite similar GRI%. Consequently, the GRI was 18% higher than expected at 0.5 TU and 20% lower than expected at 1.5 TU. All conditions, except the lowest concentration of metazachlor, induced significant decreases in  $\Phi'_M$ , ranging from 14% to 34% (Figure 51B). At equivalent TU, the mixture induced significantly higher decreases in  $\Phi'_M$  than isoproturon or metazachlor alone, reaching dramatic inhibition rates. Decreases in FL1<sub>FDA</sub> were only observed at 0.5 (21%) and 1 (25%) TU isoproturon (Figure 51A). Highly contrasting effects were obtained on FL1<sub>BOD</sub>: isoproturon and the mixture induced similar decreases, ranging from 46% to 65%, while metazachlor caused remarkable increases ranging from 239% to 295%. Significant effects on FL1<sub>DIB</sub> were only observed for metazachlor, with increases ranging from 41% to 71%. Isoproturon induced significant decreases in FL1<sub>DCF</sub> at all concentrations tested, as well as the mixture at 1.5 TU, ranging from 21% to 30%, while metazachlor induced a 16% increase at 0.5 TU. Finally, all tested concentrations of metazachlor and the mixture at 0.5 and 1 TU induced increases in FL2<sub>DHE</sub> ranging from 15% to 42%. The effect induced by metazachlor was significantly higher than that induced by the mixture at equivalent TU.

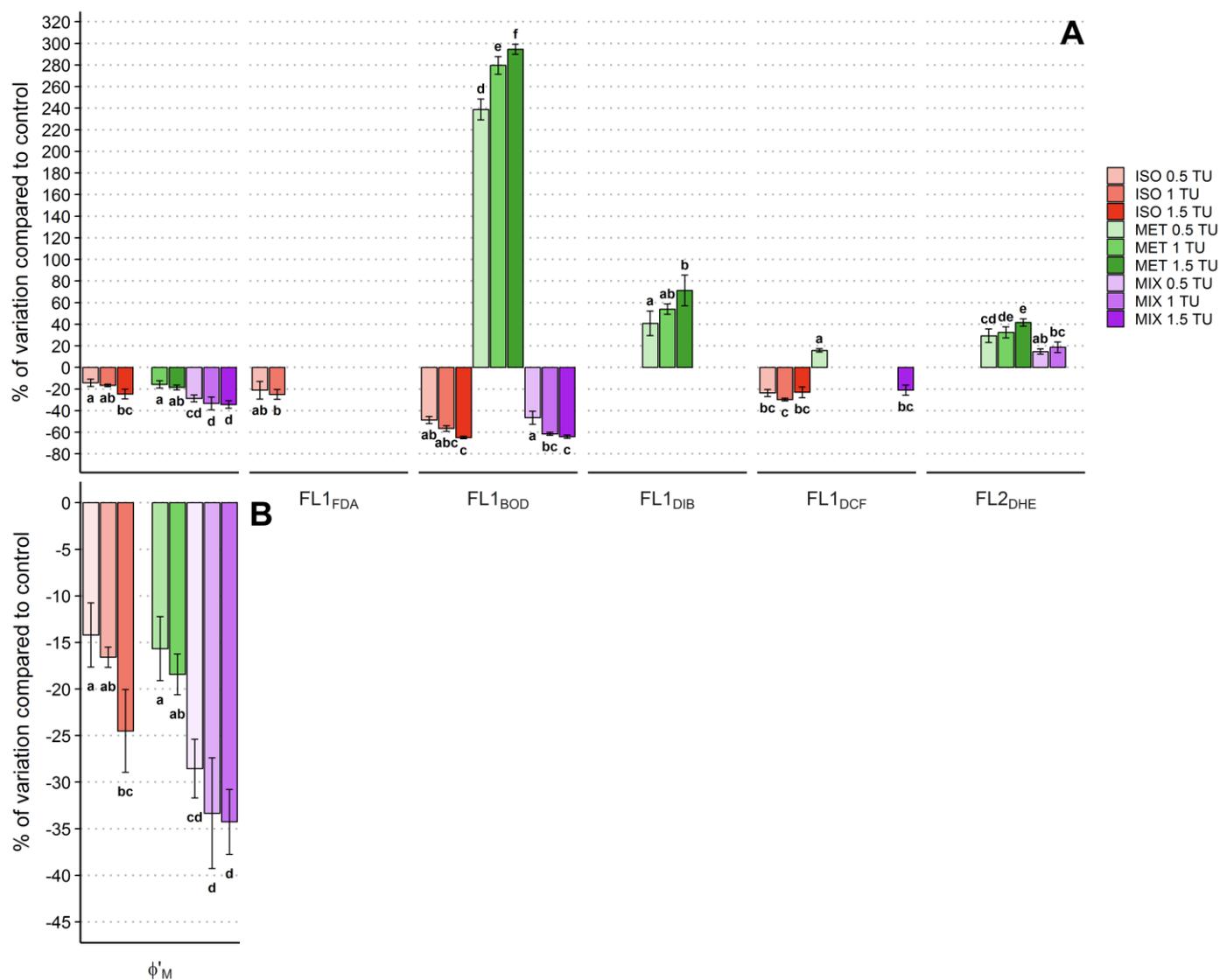


Figure 51 : Effects, measured as the % of variation compared with solvent controls, of isoproturon (ISO), metazachlor (MET) and their binary mixture (MIX), on (A) the PSII quantum yield\* ( $\phi'_M$ ) esterase activity (FL1<sub>FDA</sub>), relative lipid content (FL1<sub>BOD</sub>), cytoplasmic membrane potential (FL1<sub>DIB</sub>) and ROS content (FL1<sub>DCF</sub> and FL2<sub>DHE</sub>) in *S. marinoi*. \*A focus on the quantum yield is also shown in part B. Concentrations are expressed in TUs. Only significant effects relative to solvent controls are displayed; letters denote significant differences between treatments (ANOVA,  $p < 0.05$ ).

### 3.4. Discussion

#### 3.4.1. Toxicity of single substances in microplates and culture flasks

EC<sub>50</sub>s of isoproturon and diuron determined in this study (Table 11, supplementary table: Table S4e and S4h) were consistent with previously reported values (Arzul *et al.*, 2006; Bao *et al.*, 2011). For the other substances tested in this study, EC<sub>50</sub>s also appear to be consistent with those reported in the Pesticides Properties DataBase (PPDB) and Pesticide Ecotoxicity DataBase (PEDB) (Lewis *et al.*, 2016; U.S. EPA, 2018).

As pointed out in the results section, EC<sub>50</sub>s determined in culture flasks (supplementary material: Table S4e) were two- to six-fold lower than those in microplates, indicating a higher toxicity for exposed microalgae (Table 11 and supplementary material: Table S4h). These discrepancies are probably due to the different characteristics of the materials composing microplates and culture flasks (plastic *vs.* glass), as well as to the different growth endpoints used to assess impacts on growth in the two exposure systems (cell density in culture flasks *vs.* chlorophyll fluorescence in microplates). Indeed, microplates are composed of polystyrene, which has previously been shown to enhance chemical adsorption for the most hydrophobic substances (Hörnström, 1990; Stadnicka-Michalak *et al.*, 2014) reducing the bioavailability of the tested substances and thus leading to underestimation of toxicity. In addition, some chemicals are known to modify the fluorescence of microalgal pigments (Prado *et al.*, 2011; Stachowski-Haberkorn *et al.*, 2013), as also shown in the present study by the measurement of FL1 and FL2 fluorescence of fresh microalgal cells (supplementary material: Table S4e). As a result, the modification of pigment content and/or fluorescence might have biased growth rate measurement in microplates, leading to an underestimation of toxicity. This phenomenon was therefore considered when analysing the FL1 and FL2 fluorescence of the marked cells (§3.2.5.3).

### 3.4.2. Interactive effects of binary pesticide mixtures

The toxicity and interaction effects of binary mixtures of pesticides have been examined in several previous studies. In the review by Cedergreen (2014), none of the 120 binary mixtures of pesticides, tested on plants or algae, had significant synergy. On the contrary, a large proportion resulted in antagonism, while a few behaved according to concentration additivity. In another study considering the growth of the freshwater alga *Pseudokirchneriella subcapitata* (now called *Raphidocelis subcapitata*), the pesticides metsulfuron-methyl, terbutylazine and bentazone tested in binary combinations with the organophosphate malathion did not result in significant interactions compared with CA predictions (Munkegaard *et al.*, 2008). Recently, Mansano *et al.* (2017) reported synergy resulting from the mixture of diuron and carbofuran, a carbamate insecticide, on the growth of the microalga *Raphidocelis subcapitata*, compared with the CA model predictions.

In the present study, almost all mixtures tested were responsible for significant interaction effects compared with the predictions of the reference models and results of the statistical tests performed. However, following the recommendations of Belden *et al.* (2007), only two mixtures, ISO+AZO and ISO+SPI tested on *S. marinoi*, showed biologically significant antagonism, deviating by a factor of two or more compared with the predictions of the CA model (i.e.,  $\Sigma TU > 2$ ). Although not deviating by as much compared with CA predictions, the mixture ISO+MET on *S. marinoi* induced remarkable synergy in the microplate experiments (Figure 48, supplementary material: Table S4h). Tested in

culture flasks, the 50:50% ISO+MET mixture was responsible for a four-fold higher toxicity compared with the CA model prediction ( $0.26 \pm 0.06$  TU, Table 13). Therefore, it appears reasonable to consider the synergism observed for this mixture as biologically significant.

It is also interesting to note that some binary combinations induced very different effects depending on the ratio of the two substances in the mixture. For example, the ISO+SPI mixture caused a stronger antagonistic effect when mainly composed of spiroxamine (25% isoproturon and 75% spiroxamine, Figures 47 and 48). This phenomenon was also easily observable for the effects of the ISO+AZO mixture on *S. marinoi* (Figure 48), and SPI+CHL-M mixture on *T. lutea* (Figure 47), for which synergism at 75:25% (SPI:CHL-M) was observed to change to antagonism at 25:75%. In these cases, the MIXTOX tool corroborated these observations by characterizing the interaction as being dose<sup>4</sup>-ratio dependent (DR), describing an interaction that switches from one to another depending on the ratio between substances. Consequently, these results also illustrate the importance of testing different mixture ratios, as proposed by the ray-design used in this study, because interactions can depend on the ratio of the substances in the mixtures. Similarly, interactions can also be dose-level dependent, (DL, i.e., the interaction changes depending on the inhibition effect, e.g., for SPI+QUI mixtures on *T. lutea* and ISO+QUI on both species), although this could not be illustrated in the present study as only the 50% inhibition effect was displayed in the isobolograms.

---

<sup>4</sup> The term 'dose' is the one used by the MIXTOX tool, however, in our case the term 'concentration' would be more appropriate since 'dose' refers to an internal amount of a toxicant administered to an organism, while 'concentration' refers to the amount of a toxicant to which an organism is exposed.

Table 13 : Comparison of growth rate inhibition percentages (GRi%) and  $\Sigma TU_{50:50}$  ( $\pm 95\%$  confidence interval) obtained for the three single substances tested in culture flasks and their binary mixtures for both microalgal species. The 'TU' column indicates the targeted GRi% expressed in TU: 0.5 TU = 25%; 1 TU = 50%; 1,5 TU = 75%.

TU	isoproturon + diuron				isoproturon + spiroxamine				isoproturon + metazachlor				
	Growth rate inhibition %			$\Sigma TU_{50:50}$	Growth rate inhibition %			$\Sigma TU_{50:50}$	Growth rate inhibition %			$\Sigma TU_{50:50}$	
	isoproturon	diuron	mixture		isoproturon	spiroxamine	mixture		isoproturon	metazachlor	mixture		
<i>Tisochrysis lutea</i>	0.5	36.3 $\pm 2.23$	27.0 $\pm 2.94$	29.1 $\pm 1.17$	<b>1.01</b> $\pm 0.11$	35.7 $\pm 4.06$	6.93 $\pm 1.26$	20.3 $\pm 6.50$	<b>1.65</b> $\pm 0.36$				
	1	49.9 $\pm 1.74$	52.6 $\pm 7.30$	51.2 $\pm 2.34$		65.9 $\pm 1.88$	37.5 $\pm 1.33$	34.5 $\pm 6.35$					
	1.5	67.8 $\pm 0.20$	64.8 $\pm 2.39$	68.9 $\pm 1.40$		77.5 $\pm 5.83$	66.2 $\pm 11.3$	53.1 $\pm 9.40$					
<i>Skeletonema marinoi</i>	0.5	36.0 $\pm 1.67$	23.5 $\pm 0.76$	37.3 $\pm 0.80$	<b>0.88</b> $\pm 0.06$	23.8 $\pm 0.86$	5.71 $\pm 2.01$	9.69 $\pm 1.99$	<b>3.10</b> $\pm 0.71$	41.8 $\pm 1.07$	43.2 $\pm 0.77$	69.2 $\pm 0.74$	
	1	69.1 $\pm 0.35$	58.6 $\pm 1.40$	67.8 $\pm 1.99$		58.9 $\pm 0.31$	84.4 $\pm 1.44$	18.9 $\pm 1.93$		74.2 $\pm 0.27$	52.5 $\pm 1.06$	80.7 $\pm 1.00$	<b>0.26</b> $\pm 0.06$
	1.5	77.4 $\pm 0.22$	73.7 $\pm 0.17$	78.3 $\pm 1.19$		71.3 $\pm 1.06$	100	32.3 $\pm 0.80$		83.1 $\pm 0.98$	54.4 $\pm 0.83$	84.3 $\pm 0.24$	

### 3.4.3. Effects of the single substances on physiological parameters and implications for microalgal cells

ISO+DIU (additivity), ISO+SPI (antagonism) and ISO+MET (synergy) mixtures were chosen to be further tested in culture flask assays, allowing the effects of both individual substances and mixtures to be explored for several physiological effects besides growth. The ultimate goal was to investigate to what extent the effects of single substances on microalgal physiology can help explain the interactive effects observed for the mixtures. Consequently, effects on photosynthetic efficiency ( $\Phi'_M$ ), esterase metabolic activity (FL1<sub>FDA</sub>), relative lipid content (FL1<sub>BOD</sub>), cytoplasmic membrane potential (FL1<sub>DIB</sub>), and ROS content (FL1<sub>DCF</sub> and FL2<sub>DHE</sub>) were explored. The implication of the observed effects on microalgal cell physiology are discussed below.

The PSII inhibitors isoproturon and diuron both act as PSII inhibitors by competing with the quinone Q<sub>B</sub> on its binding site located in the D1 protein, thus preventing electron transfer between Q<sub>A</sub> and Q<sub>B</sub> and inhibiting Hill's reaction (Nimbal *et al.*, 1996; Jones and Kerswell, 2003). Consequently, significant decreases in  $\Phi'_M$  were expected and observed for both species (Figures 49, 50 and 51) when exposed to these substances.

Spiroxamine and metazachlor target the biosynthesis of sterols and VLCFAs (Table 11), through inhibition of the enzymes  $\Delta^{14}$ -sterol reductase (ERG24) and VLCFA-FAE1 synthase, respectively (Debieu *et al.*, 2000; Götz and Böger, 2004). Hence, no significant effects on  $\Phi'_M$  were expected: this was confirmed for spiroxamine (Figure 50), however, metazachlor induced a slight decrease in  $\Phi'_M$  at 1 and 1.5 TU (Figure 51B). A moderate inhibition of photosynthesis was previously reported on *Chlamydomonas reinhardtii* cells exposed to high concentrations of S-metolachlor (Korkaric *et al.*, 2015), although the mechanism of action responsible is not known.

Following the light phase of photosynthesis, the Calvin cycle permits production of many precursors including those used in lipid biosynthesis (Masojídek *et al.*, 2004). A reduced production of these precursors, and therefore lipids, might have occurred due to reduced photosynthetic efficiency, and could explain the large decreases observed in FL1<sub>BOD</sub> after exposure to isoproturon and diuron (Figures 49, 50 and 51). Indeed, in a study conducted on two strains of *T. lutea* (a wild and an oleaginous strain), the authors demonstrated that BODIPY fluorescence was correlated with reserve lipid content, measured by gas chromatography coupled with a flame ionization detector (GC-FID; da Costa *et al.*, 2017). In contrast, spiroxamine (especially for *T. lutea*, Figure 50) and metazachlor (for *S. marinoi*, Figure 51A) both caused large increases in FL1<sub>BOD</sub>. Microalgae are known to produce reserve lipids under stressful conditions as a result of reduced cell division, e.g., under nitrogen limitation conditions (Zhu *et al.*, 2016; da Costa *et al.*, 2017). In the study from Vallotton *et al.* (2008),

S-metolachlor inhibited cell division of *Scenedesmus vacuolatus*, leading to subsequent cell enlargement. Hence, metazachlor, and possibly spiroxamine, could have induced reserve lipid accumulation, as indicated by high increases in FL1<sub>BOD</sub> (Figures 50 and 51A), due to cell division inhibition: GRi% ranged from 43% to 54% for metazachlor on *S. marinoi*, and between 38% and 66% for spiroxamine on *T. lutea* (supplementary material: Table S4e).

Another consequence of photosynthesis inhibition is the potential accumulation of intracellular ROS, as previously described in many studies (Knauert and Knauer, 2008; Prado *et al.*, 2012; Stachowski-Haberkorn *et al.*, 2013; Esperanza *et al.*, 2015; Dupraz *et al.*, 2016). In the present study, significant effects, measured using either H<sub>2</sub>DCFDA or dihydroethidium, were observed after exposure to all individual substances (Figures 49, 50 and 51A). However, results obtained with these fluorescent probes did not always follow the same trend. The most obvious example was observed with *S. marinoi*: isoproturon and diuron induced a decrease in FL1<sub>DCF</sub>, but an increase in FL2<sub>DHE</sub> (Figure 49). A similar response had previously been observed with H<sub>2</sub>DCFDA and another diatom, *Chaetoceros calcitrans*, exposed to the PSII inhibitors diuron and irgarol (Dupraz *et al.*, 2016). It was thought that in diatoms, PSII inhibitors induce a stress similar to photoinhibition and consequently trigger a ROS scavenging system involving fucoxanthin, which could explain the lower ROS content in exposed cells (Pennington *et al.*, 1988; Sachindra *et al.*, 2007; Xia *et al.*, 2013). However, decreases in FL1<sub>DCF</sub> values could also be due to the functioning of H<sub>2</sub>DCFDA itself. As pointed out in Kalyanaraman *et al.* (2012), H<sub>2</sub>DCFDA first requires esterases to be converted into H<sub>2</sub>DCF, which reacts with ROS to form DCFH that is then oxidized to form the fluorescent dichlorofluorescein (DCF). In this study, the fluorescent probe FDA was used to measure the metabolic activity of non-specific esterases. Decreased esterase activity, indicated by significantly lower FL1<sub>FDA</sub> values, was observed after exposure to isoproturon and diuron for *S. marinoi* and was concomitant with decreases observed in FL1<sub>DCF</sub> values (Figures 49 and 51A). This phenomenon was not observed for the other species, although spiroxamine increased both FL1<sub>FDA</sub> and FL1<sub>DCF</sub> for the two microalgal species (Figure 50). Variations in FL1<sub>DCF</sub> observed with H<sub>2</sub>DCFDA could, therefore, be partly due to fluctuations in esterase activity, rather than modification in ROS content. Consequently, results obtained with H<sub>2</sub>DCFDA should be interpreted carefully. Dihydroethidium, which does not require prior esterase activity, could be a more reliable probe for measurement of intracellular ROS content. With respect to these findings, isoproturon and diuron seem to have increased ROS content, as measured by FL2<sub>DHE</sub>, in *S. marinoi* cells (Figure 49) but not in *T. lutea*, for which variable results were obtained (Figures 49 and 50). However, both spiroxamine and metazachlor increased ROS content (Figures 50 and 51) for the two microalgal species. Accumulation of intracellular ROS in microalgal cells could be related to a general stress caused by these toxicants (Mallick et Mohn, 2000), and often lead to

significant damages to cell constituents and cytoplasmic membranes (Knauer and Knauer, 2008; Stoiber *et al.*, 2013).

Finally, both isoproturon and diuron induced a decrease in FL1<sub>DIB</sub> values for *S. marinoi* (Figure 49), reflecting cytoplasmic membrane hyperpolarization. This might be a response to stress resulting from the blockage of photosynthesis by PSII inhibitors, although the consequences for microalgal cells are not well known. As both sterols and VLCFAs are important constituents of cell membranes (Cassagne *et al.*, 1994; Haines, 2001; Ohvo-Rekilä *et al.*, 2002), significant effects on the cytoplasmic membrane were expected upon exposure to spiroxamine and metazachlor. For both substances, significant depolarization of cell membranes was observed, as indicated by increased FL1<sub>DIB</sub> values, which could have led to membrane disruption and increased cell permeability. As mentioned above, ROS are involved in oxidative damage to cell membrane constituents. Hence, complementary analysis of lipid peroxidation (Cheloni and Slaveykova, 2013; Melegari *et al.*, 2013) might make it possible to link the effects observed on the cytoplasmic membrane potential with those observed on intracellular ROS content.

The analysis of the physiological effects of the single substances furthered our understanding of their toxic MOA, a necessary step to further investigate the interactive effects of the tested mixtures.

#### 3.4.4. Interactive effects of pesticides on microalgal physiology

It is first important to point out that, even though concentrations of the substances singly and in mixtures were theoretically calculated to induce 25%, 50% or 75% GRi (0.5, 1 and 1.5 TU, respectively), the expected GRi<sup>0</sup> was not always attained (Table 13). These discrepancies were partly due to very different slopes of the concentration-response relationships of the tested chemicals, as well as differences between the toxicity observed in microplates and in culture flasks. This issue was the most important for the mixture of isoproturon and spiroxamine (Figure 50), and to a lesser extent for the mixture of isoproturon and metazachlor (Figure 51). Thus, it was decided to only compare the effects observed on microalgal physiology among treatments with equivalent GRi<sup>0</sup> (Table 13). Starting with the mixture made up of isoproturon and diuron, similar effects were expected from the mixture and the two single substances, as both biocides share the same molecular target. As expected, their mixture resulted in concentration additivity for the two microalgal species in both microplates and culture flasks (Figures 46 and 47, Tables 12 and 13). When comparing the effects caused by the single substances with those caused by the mixture (Figure 49), almost no significant differences were observed at equivalent TU. As expected, the effects caused by the mixture corroborate the principle of the concentration addition model potency (Loewe et Muischnek, 1926): both isoproturon

and diuron can be viewed as dilutions of each other, only differing in potency. Therefore, it was shown that the concentration addition model is not only applicable to growth, but to the whole set of parameters measured in this study.

Regarding the two other mixtures, as the MOA of the mixed substances were different, effects on the measured physiological functions were less predictable. In general, isoproturon and spiroxamine had opposite effects on the monitored parameters. The effects of their mixture on  $\Phi'_M$  was probably due to the isoproturon, as spiroxamine had almost no effect on PSII quantum yield for either species (Figure 50). The mixture had no effect on FL1<sub>FDA</sub> or FL1<sub>DIB</sub> in either species, which could be due to opposite effects of the two substances on these parameters (Figures 49, 50 and 51A). The decrease in relative lipid content for *S. marinoi* exposed to the mixture of isoproturon and spiroxamine was probably related to photosynthesis inhibition caused by isoproturon, as already mentioned above. A very similar tendency was observed for *T. lutea* (supplementary material: Table S4f), although the effect was not significant. For both species, significant effects were observed with H<sub>2</sub>DCFDA, while no effects were observed on esterase activity (Figure 50). Hence, although H<sub>2</sub>DCFDA fluorescence might be influenced by esterase activity as mentioned earlier, it was not the case in these conditions. However, since dihydroethidium did not show a similar tendency, it appears difficult to interpret the effects of this mixture on ROS content in either species.

Isoproturon and spiroxamine induced opposite responses on almost all physiological endpoints monitored. Consequently, only a few significant effects were observed for the mixture, with generally the same trends as for isoproturon, except for FL1<sub>DCF</sub> in *T. lutea*. This reflects important differences in the molecular structures targeted by isoproturon and spiroxamine, which could partly explain the strong antagonism observed in both species.

The effect of the mixture of isoproturon and metazachlor on *S. marinoi* was probably the most interesting, as it resulted in biologically significant synergy. The effects obtained on the PSII quantum yield were particularly notable: significantly higher decreases in  $\Phi'_M$  were observed for the mixture compared with the two single chemicals at all TU tested (Figure 51B). High decreases in FL1<sub>BOD</sub>, ranging from 46% to 64%, were also observed for all concentrations tested, which corroborates the above-mentioned hypothesis of a link between PSII inhibition and reduced lipid content. Only a few significant effects were observed for the other measured parameters. We can therefore hypothesize that the synergy resulting from this mixture was mainly due to the higher inhibition of photosynthesis observed. Indeed, photosynthesis is a vital process for microalgal cells, and its impairment inevitably leads to starvation, reduced growth, and, ultimately, cell death.

Hypotheses can be made to explain the higher decrease in  $\Phi'_M$  observed for the mixture of isoproturon and metazachlor. Metazachlor significantly affected the cytoplasmic membrane

potential, as shown by the depolarization induced in exposed cells. This is consistent with the expected MOA of this substance, as VLCFAs are important constituents of cell membranes (Cassagne *et al.*, 1994). However, the link between membrane depolarization and an increase in its general permeability is not clear. It has been demonstrated that chloroacetamide herbicides affect the cytoplasmic membrane in plants (Matthes et Böger, 2002) by making it leaky, causing death in the treated plants. It can thus be hypothesized that a leaky membrane could have facilitated isoproturon uptake by microalgal cells and ultimately increased its toxicity, explaining the observed synergy. However, no significant depolarization was observed for microalgal cells exposed to the mixture. Therefore, this hypothesis is unlikely to explain the observed synergy. Additional analyses of the lipid composition, microscope observations, and isoproturon uptake measurements of affected and unaffected microalgal cells are all potential future avenues to further investigate this hypothesis.

Elsewhere, the morphology of thylakoid membranes, where photosynthesis takes place, could also be affected by a decreased VLCFA content, potentially disrupting the normal functioning of PSII (Schneiter and Kohlwein, 1997; Millar *et al.*, 1998; Thakkar *et al.*, 2013). In addition, a recent study demonstrated that chloroplast division was also decreased in *Arabidopsis thaliana* plants treated with an inhibitor of VLCFA synthesis (Nobusawa et Umeda, 2012). In the light of these findings, it appears reasonable to suggest that the inhibition of VLCFAs induced by metazachlor could somehow have disrupted the photosynthetic apparatus. This disruption could have enhanced the toxic effects of isoproturon on PSII and subsequently caused the observed synergy.

Phenylureas and chloroacetamides are among the most frequently detected pesticides in European watercourses (Moschet *et al.*, 2014), and are also often found in coastal waters (Watts *et al.*, 2000; Munaron *et al.*, 2012; Cruzeiro *et al.*, 2015). Hence, the synergy resulting from the combination of these substances might pose a potential threat to the environment.

### 3.5. Conclusion

The eight binary mixtures of pesticides tested on two marine microalgae *T. lutea* and *S. marinoi* in the microplate assay displayed varying responses. The majority of them showed antagonism compared with CA or IA model predictions, while few were found to be additive or synergistic. In *S. marinoi*, mixtures of isoproturon with either spiroxamine or azoxystrobin caused only half the level of toxicity predicted by the CA model. The mixture of isoproturon and metazachlor resulted in a significant synergistic effect towards *S. marinoi* in both test systems: a four-fold higher toxicity than predicted by the CA model was shown in culture flasks.

A further investigation of three selected mixtures, illustrating additivity (isoproturon + diuron), antagonism (isoproturon + spiroxamine) and synergy (isoproturon + metazachlor), was performed using flow cytometry and PAM-fluorescence.

Very contrasted effects were induced by isoproturon and spiroxamine, highlighting their different intracellular targets, which could potentially explain the antagonism resulting from their combination. Finally, the significant synergy observed for the mixture of isoproturon and metazachlor tested on *S. marinoi* could be mainly due to a combined effect of the single substances on the photosynthetic apparatus, enhancing photosynthesis inhibition.

As these substances, and others belonging to the same chemical family, are among the most frequently detected in European watercourses and coastal waters, further investigation of their effects in combination should be carried out.

### 3.6. Acknowledgements

This study was carried out with financial support from the French National Research Agency (ANR) in the framework of the Investments for the Future program, within the Cluster of Excellence COTE (ANR-10-LABX-45). We also want to thank Nathalie Coquillé and Julien Rouxel for their technical assistance, as well as Philippe Soudant for his helpful advice. We thank Helen McCombie for the English correction.

### 3.7. Supplementary material

Below is the supplementary material, Figures and Tables, for the article 3.

#### Figures

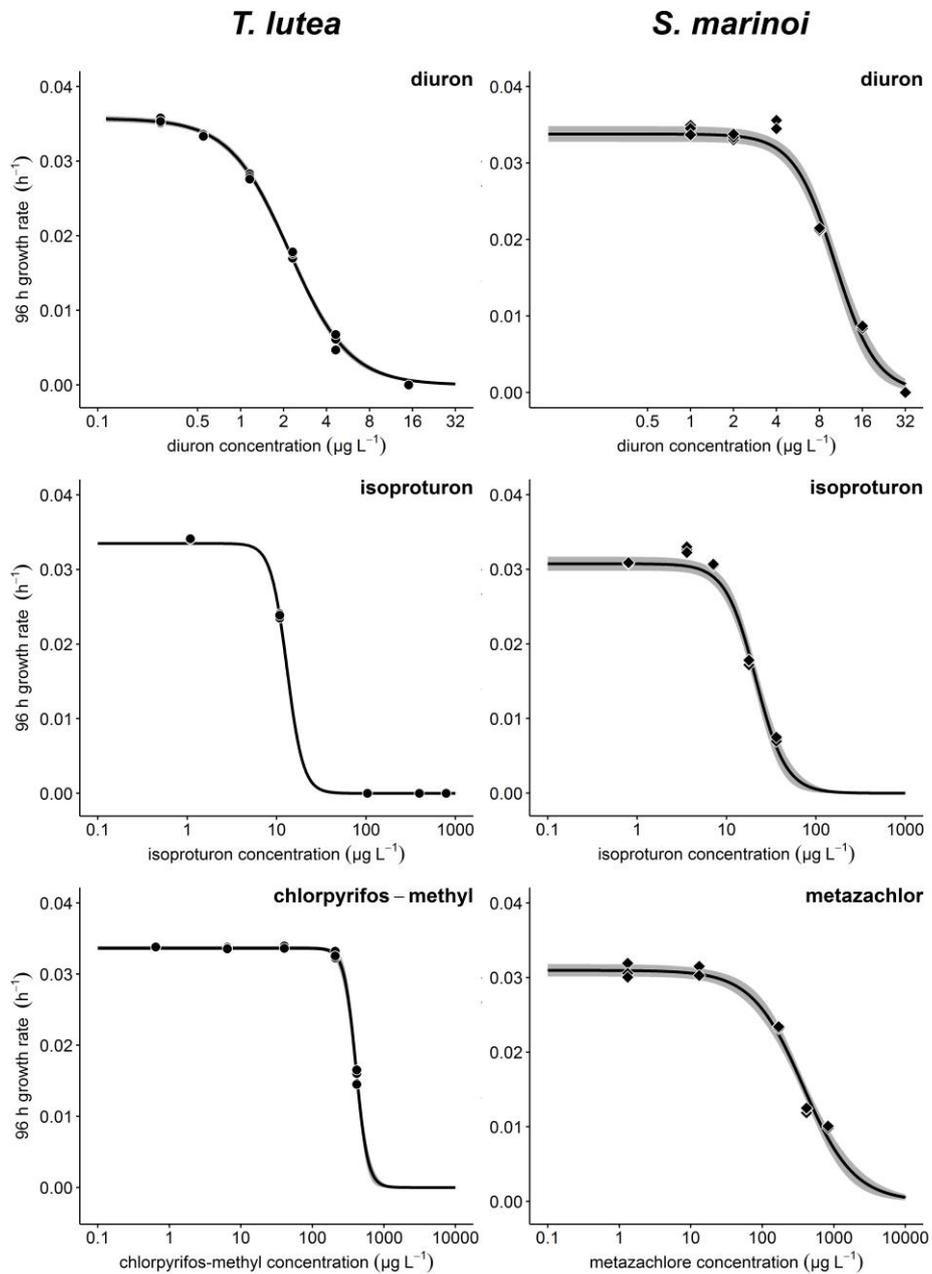


Figure S4a: Concentration-response curves for single pesticides diuron, isotoproturon, chlorpyrifos-methyl (*T. lutea*) and metazachlor (*S. marinoi*), computed using the three-parameter log-logistic regression model (§3.2.4.1). The grey area around the curves represents the 95% confidence interval. EC<sub>50</sub>s are given in Table 11.

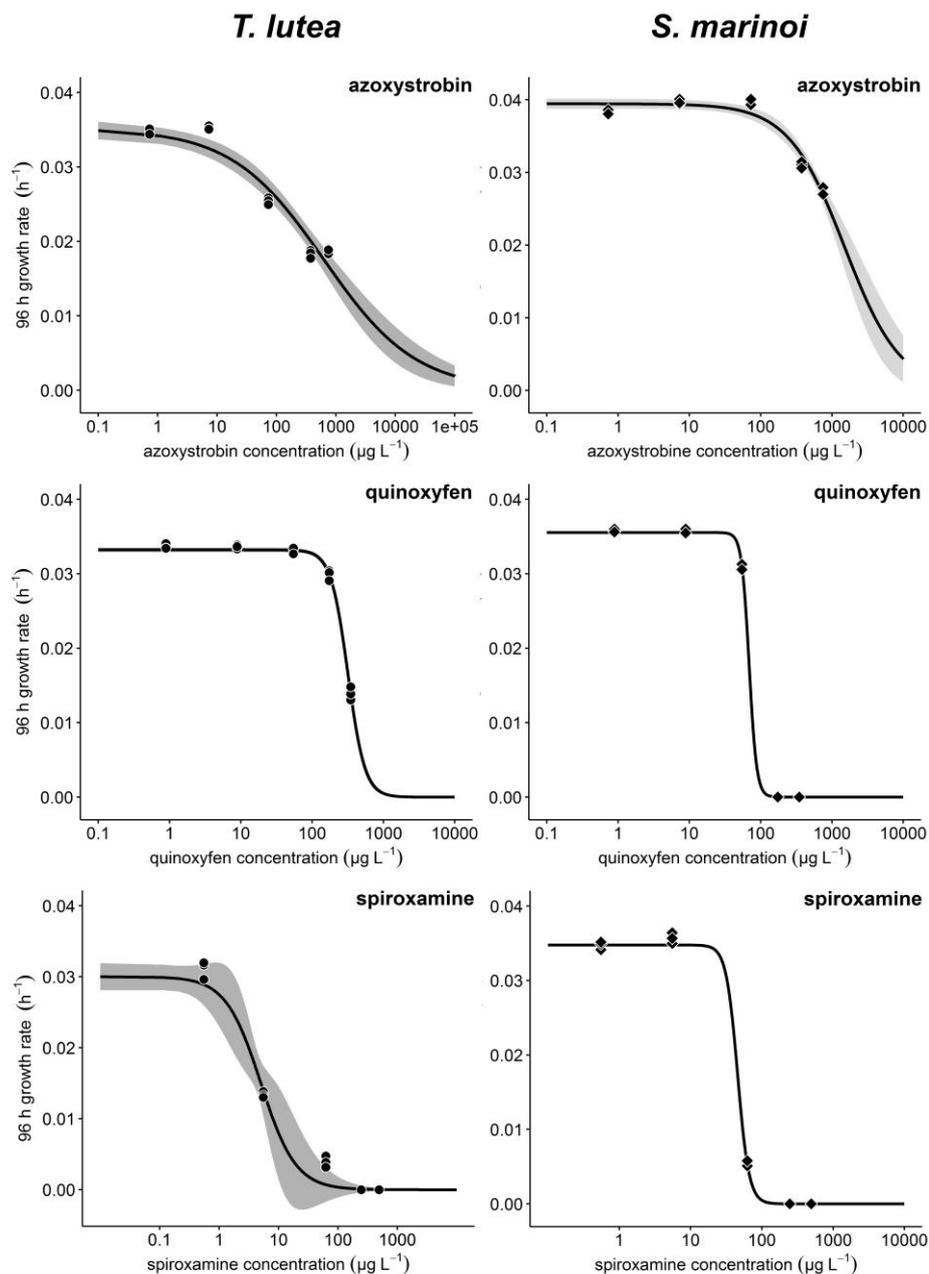


Figure S4b: Concentration-response curves for single fungicides azoxystrobin, quinoxyfen and spiroxamine for *T. lutea* and *S. marinoi*, computed using the three-parameter log-logistic regression model (§3.2.4.1). The grey area around the curves represents the 95% confidence interval. EC<sub>50</sub>s are given in Table 11.

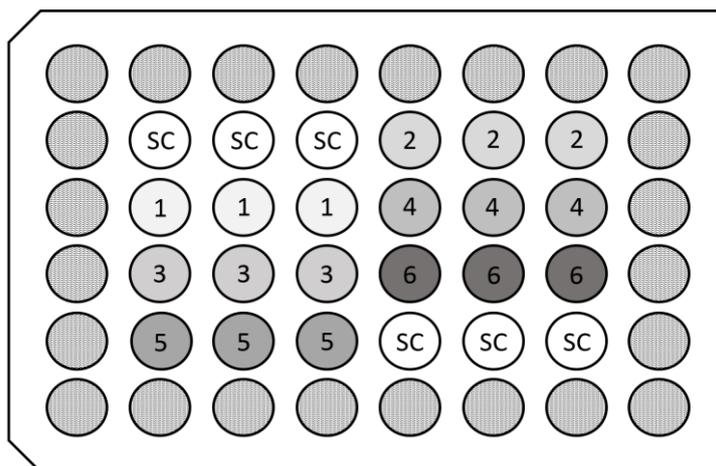


Figure S4c: Scheme of the microplate toxicity assay. SC represents the solvent controls; numbers 1 to 6 indicate the increasing concentrations of the tested chemical/binary mixture ratio. All peripheral wells were filled with sterile milli-Q water.

## Tables

Table S4a: Measured concentrations (in  $\text{mg L}^{-1}$ ) of the stock solutions for the chemicals used in this study.

Substance	Solution	Concentration ( $\text{mg L}^{-1}$ )
diuron	S1	109
	S1	873
isoproturon	S2	115
	S3	12.0
	S1	940
metazachlor	S2	190
	S3	13.7
	S1	926
chlorpyrifos-methyl	S2	97.0
	S3	14.5
	S1	1644
azoxystrobin	S2	159
	S3	18.5
	S1	780
quinoxifen	S2	124
	S3	20.1
	S1	822
spiroxamine	S2	98.3
	S3	8.30

Table S4b: Concentrations (in  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) tested in preliminary experiments in microplates (§3.2.3.1). Each nominal concentration was calculated with respect to the measured concentrations of the stock solutions (Table S4a).

Substance	Concentrations tested (in $\mu\text{g L}^{-1}$ )	
	<i>T. lutea</i>	<i>S. marinoi</i>
diuron	0.27; 0.55; 1.16; 2.32; 4.63; 15.0	1.00 ; 2.00; 4.00; 8.00; 16.0 ; 32.0
isoproturon	1.08; 10.8; 104; 393; 786	0.80; 3.60; 7.10; 17.8; 36.0
metazachlor		1.31; 13.1; 169; 415; 829
chlorypyrifos-methyl	0.64; 6.44; 40.4; 208; 417	
azoxystrobin	0.73; 7.27; 72.7; 375; 749	
quinoxifen	0.89; 8.86; 54.6; 174; 347	
spiroxamine	0.55; 5.52; 62.6; 247; 493	

Table S4c: Concentrations (in  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) tested in binary experiments performed in microplates (§3.2.3.1). Each nominal concentration was calculated with respect to the measured concentrations of the stock solutions (Table S4a). For the mixtures, nominal concentrations of each substance corresponded to the concentrations indicated in this table multiplied by the respective ratio percentage of the substance in the mixture (25%, 50% or 75%).

Substance	Range tested (in $\mu\text{g L}^{-1}$ )	
	<i>T. lutea</i>	<i>S. marinoi</i>
diuron	0.50; 1.00; 2.00; 4.00; 8.00; 16.0	1.00 ; 2.00; 4.00; 8.00; 16.0 ; 32.0
isoproturon	2.00; 4.00; 8.00; 16.0; 32.0; 64.0	4.00; 8.00; 16.0; 32.0; 64.0; 128
metazachlor		40.0; 80.0; 160; 320; 640; 1280
chlorypyrifos-methyl	50.0; 100; 200; 400; 800; 1600	
azoxystrobin	156; 313; 625; 1250; 2500; 5000	
quinoxifen	50.0; 100; 200; 400; 800; 1600	5.00; 10.0; 20.0; 40.0; 80.0; 160
spiroxamine	1.00 ; 2.00; 4.00; 8.00; 16.0; 32.0	10.0; 20.0; 40.0; 80.0; 160; 320

Table S4d Concentrations (in  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) tested in binary experiments performed in culture flasks (§3.2.3.2). Each nominal concentration was calculated with respect to the measured concentrations of the stock solutions (Table S4a). For the mixtures, nominal concentrations of each substance corresponded to the concentrations indicated in this table multiplied by the respective ratio percentage of the substance in the mixture (50%). For the signification of TU, see §Isobole model.

Substance	Concentration tested (in $\mu\text{g L}^{-1}$ )					
	<i>T. lutea</i>			<i>S. marinoi</i>		
	0.5 TU	1 TU	1.5 TU	0.5 TU	1 TU	1.5 TU
diuron	1.15	2.30	3.45	3.30	6.60	9.90
isoproturon	3.04	6.07	9.11	2.95	5.90	8.85
metazachlor				160	320	480
spiroxamine	0.35	0.70	1.05	9.75	19.5	29.3

Table S4e: For each of the three mixtures tested in culture flasks on each of the two microalgal species (§3.2.3.2), EC<sub>50</sub>s are given of each of the two single substances separately, in µg L<sup>-1</sup>, and of their binary mixtures (50:50%), in TUs. The corresponding growth rate inhibition (GRi%), PSII quantum yield (Φ'<sub>M</sub>) and FL1 and FL2 fluorescence (FL1<sub>fresh</sub> and FL2<sub>fresh</sub>, measured by flow cytometry, a.u.) of fresh unstained microalgal cells after a 96-h exposure, for each concentration yielding a predicted effect of 25%, 50% and 75% (0.5, 1 and 1.5 TU) and solvent-controls. Letters indicate significant differences between treatments (*p* < 0.05).

<i>T. lutea</i>	EC <sub>50</sub> (µg L <sup>-1</sup> or TUs)	GRi %			Φ' <sub>M</sub>			FL1 <sub>fresh</sub> (a.u.)			FL2 <sub>fresh</sub> (a.u.)		
		0.5 TU	1 TU	1.5 TU	0.5 TU	1 TU	1.5 TU	0.5 TU	1 TU	1.5 TU	0.5 TU	1 TU	1.5 TU
<b>Control</b>						0.73 ± 0.01 (a)		7207 ± 45.1 (a)				583 ± 3.37 (a)	
<b>ISO</b>	6.07 ± 0.63	35.7 ± 4.06	65.9 ± 1.88	77.5 ± 5.83	0.61 ± 0.004 (d)	0.54 ± 0.016 (ef)	0.52 ± 0.021 (f)	7937 ± 98.7 (ab)	9193 ± 163 (cd)	9368 ± 55.7 (d)	681 ± 4.69 (bc)	809 ± 13.4 (ef)	837 ± 8.64 (f)
<b>SPI</b>	0.83 ± 0.07	6.93 ± 1.26	37.5 ± 1.33	66.2 ± 11.3	0.74 ± 0.008 (a)	0.72 ± 0.002 (ab)	0.69 ± 0.002 (b)	9541 ± 630 (d)	13468 ± 289 (e)	13428 ± 615 (e)	781 ± 52.4 (ef)	1329 ± 32.8 (g)	1506 ± 25.8 (h)
<b>ISO + SPI</b>	1.65 ± 0.36	20.3 ± 6.50	34.5 ± 6.35	53.1 ± 9.40	0.64 ± 0.006 (c)	0.60 ± 0.014 (d)	0.56 ± 0.004 (e)	7561 ± 120 (a)	8423 ± 183 (bc)	8937 ± 191 (cd)	647 ± 4.73 (b)	721 ± 11.0 (cd)	775 ± 16.8 (de)
<b>Control</b>						0.75 ± 0.006 (a)		7739 ± 113 (a)				605 ± 6.58 (a)	
<b>ISO</b>	5.31 ± 0.91	36.3 ± 2.23	49.9 ± 1.74	67.8 ± 0.20	0.62 ± 0.008 (b)	0.56 ± 0.004 (cd)	0.51 ± 0.03 (e)	8522 ± 149 (b)	9373 ± 59.8 (de)	9959 ± 68.5 (g)	676 ± 5.51 (bc)	764 ± 6.15 (d)	827 ± 10.4 (f)
<b>DIU</b>	2.21 ± 0.48	27.0 ± 2.94	52.6 ± 7.30	64.8 ± 2.39	0.58 ± 0.03 (bc)	0.51 ± 0.01 (de)	0.49 ± 0.002 (e)	8289 ± 147 (b)	9347 ± 123 (d)	9842 ± 38.1 (fg)	662 ± 4.79 (b)	756 ± 8.64 (d)	806 ± 0.98 (e)
<b>ISO + DIU</b>	1.01 ± 0.11	29.1 ± 1.17	51.2 ± 2.34	68.9 ± 1.40	0.58 ± 0.03 (bc)	0.52 ± 0.02 (de)	0.49 ± 0.02 (e)	8847 ± 104 (c)	9648 ± 60.0 (ef)	9943 ± 184 (g)	694 ± 2.95 (c)	776 ± 1.96 (d)	815 ± 16.4 (ef)
<b><i>S. marinoi</i></b>						0.62 ± 0.006 (ab)		2289 ± 47.8 (a)				576 ± 10.2 (ab)	
<b>Control</b>													
<b>ISO</b>	5.17 ± 0.33	23.8 ± 0.86	58.9 ± 0.31	71.3 ± 1.06	0.58 ± 0.03 (bc)	0.54 ± 0.04 (c)	0.53 ± 0.006 (cd)	2053 ± 56.2 (bc)	1664 ± 33.6 (d)	1566 ± 5.93 (d)	593 ± 6.73 (a)	520 ± 8.46 (bc)	492 ± 5.53 (c)
<b>SPI</b>	15.1 ± 0.79	5.71 ± 2.01	84.4 ± 1.44	100	0.64 ± 0.007 (a)	0.62 ± 0.01 (ab)	0.49 ± 0.02 (d)	2286 ± 114 (a)	2889 ± 51.5 (e)	3894 ± 164 (f)	613 ± 30.1 (a)	999 ± 23.6 (d)	1495 ± 57.4 (e)
<b>ISO + SPI</b>	3.10 ± 0.71	9.69 ± 1.99	18.9 ± 1.93	32.3 ± 0.80	0.56 ± 0.01 (c)	0.57 ± 0.01 (bc)	0.56 ± 0.02 (c)	2166 ± 70.2 (ab)	1973 ± 32.4 (bc)	1957 ± 41.4 (c)	600 ± 13.2 (a)	584 ± 9.23 (a)	611 ± 11.5 (a)
<b>Control</b>						0.61 ± 0.01 (a)		2341 ± 38.2 (a)				607 ± 2.43 (a)	
<b>ISO</b>	3.69 ± 0.28	36.0 ± 1.67	69.1 ± 0.35	77.4 ± 0.22	0.55 ± 0.008 (bc)	0.54 ± 0.02 (bc)	0.50 ± 0.006 (d)	2210 ± 22.2 (bc)	1969 ± 31.6 (d)	1811 ± 15.7 (e)	663 ± 6.44 (c)	610 ± 10.0 (a)	560 ± 2.02 (b)
<b>DIU</b>	5.74 ± 0.28	23.5 ± 0.76	58.6 ± 1.40	73.7 ± 0.17	0.56 ± 0.01 (b)	0.52 ± 0.03 (bcd)	0.52 ± 0.02 (bcd)	2316 ± 60.6 (ab)	1972 ± 18.4 (d)	1862 ± 20.6 (de)	673 ± 16.0 (c)	611 ± 7.63 (a)	584 ± 1.10 (ab)
<b>ISO + DIU</b>	0.88 ± 0.06	37.3 ± 0.80	67.8 ± 1.99	78.3 ± 1.19	0.54 ± 0.01 (bcd)	0.53 ± 0.02 (bcd)	0.51 ± 0.008 (cd)	2187 ± 72.7 (c)	1885 ± 44.4 (de)	1820 ± 81.7 (e)	652 ± 16.7 (c)	585 ± 11.5 (ab)	564 ± 22.3 (b)
<b>Control</b>						0.60 ± 0.01 (a)		2216 ± 25.7 (bc)				575 ± 6.16 (a)	
<b>ISO</b>	3.22 ± 0.17	41.8 ± 1.07	74.2 ± 0.27	83.1 ± 0.98	0.52 ± 0.02 (b)	0.50 ± 0.007 (bc)	0.46 ± 0.03 (cd)	2164 ± 3.06 (cd)	1858 ± 38.3 (e)	1796 ± 64.7 (e)	663 ± 6.44 (c)	610 ± 10.0 (a)	560 ± 2.02 (b)
<b>MET</b>	289 ± 48.0	43.2 ± 0.77	52.5 ± 1.06	54.4 ± 0.83	0.59 ± 0.01 (a)	0.51 ± 0.02 (b)	0.49 ± 0.01 (bc)	2059 ± 16.7 (d)	2074 ± 28.7 (d)	2092 ± 77.3 (d)	673 ± 16.0 (c)	611 ± 7.63 (a)	584 ± 1.10 (ab)
<b>ISO + MET</b>	0.26 ± 0.06	69.2 ± 0.74	80.7 ± 1.00	84.3 ± 0.24	0.43 ± 0.02 (de)	0.40 ± 0.04 (e)	0.40 ± 0.02 (e)	2290 ± 25.4 (ab)	2393 ± 39.2 (a)	2271 ± 88.2 (abc)	652 ± 16.7 (c)	585 ± 11.5 (ab)	564 ± 22.3 (b)

Table S4f: FL1 fluorescence (measured by flow cytometry, a.u.) of microalgal cells stained with FDA (FL1<sub>FDA</sub>), BODIPY<sup>505/515</sup> (FL1<sub>BOD</sub>) and DiBAC<sub>4</sub>(3) (FL1<sub>DiB</sub>) after 96-h exposure in culture flasks (§3.2.3.2), for each concentration yielding a predicted effect of 25%, 50% and 75% (0.5, 1 and 1.5 TU) and solvent-controls. Letters indicate significant differences between treatments ( $p < 0.05$ ).

<i>T. lutea</i>	FL1 <sub>FDA</sub> (10 <sup>4</sup> a.u.)			FL1 <sub>BOD</sub> (10 <sup>4</sup> a.u.)			FL1 <sub>DiB</sub> (10 <sup>4</sup> a.u.)		
	0.5 TU	1 TU	1.5 TU	0.5 TU	1 TU	1.5 TU	0.5 TU	1 TU	1.5 TU
<b>Control</b>		142 ± 6.45 (a)			45.5 ± 3.73 (ab)			18.9 ± 3.36 (ab)	
<b>ISO</b>	128 ± 23.4 (a)	127 ± 11.4 (a)	110 ± 9.93 (a)	35.4 ± 4.00 (a)	35.3 ± 4.76 (a)	34.9 ± 4.07 (a)	15.8 ± 1.17 (bc)	12.8 ± 0.40 (c)	11.4 ± 0.56 (c)
<b>SPI</b>	169 ± 27.6 (a)	260 ± 32.0 (b)	317 ± 30.6 (b)	54.8 ± 10.4 (b)	102 ± 7.47 (c)	111 ± 9.59 (c)	19.8 ± 1.51 (ab)	23.9 ± 2.86 (b)	36.7 ± 3.54 (d)
<b>ISO + SPI</b>	148 ± 27.9 (a)	125 ± 5.67 (a)	122 ± 32.9 (a)	40.8 ± 3.22 (ab)	37.0 ± 2.63 (a)	33.4 ± 1.35 (a)	19.9 ± 0.65 (ab)	16.3 ± 2.59 (bc)	15.6 ± 0.98 (bc)
<b>Control</b>		140 ± 29.3 (abc)			54.7 ± 3.10 (a)			16.1 ± 0.60 (ab)	
<b>ISO</b>	150 ± 24.1 (bc)	115 ± 3.91 (ab)	104 ± 8.60 (a)	39.7 ± 2.81 (bc)	35.1 ± 1.79 (cd)	33.2 ± 0.65 (d)	15.8 ± 3.49 (ab)	13.7 ± 1.44 (ab)	11.4 ± 1.42 (a)
<b>DIU</b>	166 ± 14.2 (c)	138 ± 17.0 (abc)	133 ± 6.49 (abc)	42.1 ± 2.38 (b)	36.4 ± 3.49 (bcd)	35.3 ± 1.19 (cd)	16.6 ± 4.87 (ab)	14.0 ± 3.00 (ab)	15.5 ± 0.91 (ab)
<b>ISO + DIU</b>	141 ± 15.5 (abc)	115 ± 10.4 (ab)	110 ± 5.74 (ab)	40.9 ± 2.10 (bc)	36.5 ± 2.30 (bcd)	33.3 ± 1.64 (d)	18.3 ± 2.01 (b)	14.1 ± 0.29 (ab)	12.3 ± 1.43 (ab)
<b><i>S. marinoi</i></b>									
<b>Control</b>		48.8 ± 7.96 (a)			94.0 ± 4.06 (a)			13.5 ± 1.11 (ab)	
<b>ISO</b>	44.5 ± 1.98 (a)	43.4 ± 2.31 (a)	47.5 ± 1.71 (a)	50.7 ± 5.14 (f)	42.1 ± 2.07 (fg)	35.9 ± 3.01 (g)	10.8 ± 0.12 (a)	11.9 ± 1.64 (ab)	11.1 ± 1.42 (ab)
<b>SPI</b>	60.6 ± 3.22 (bc)	65.7 ± 8.32 (c)	51.9 ± 1.85 (ab)	116 ± 2.25 (b)	165 ± 0.44 (c)	189 ± 7.25 (d)	16.6 ± 1.29 (b)	46.6 ± 2.94 (c)	78.0 ± 5.35 (d)
<b>ISO + SPI</b>	46.6 ± 2.24 (a)	42.7 ± 2.09 (a)	52.5 ± 3.36 (ab)	69.6 ± 4.43 (e)	48.3 ± 2.39 (f)	47.9 ± 0.19 (f)	11.0 ± 0.28 (ab)	11.3 ± 0.32 (ab)	15.2 ± 1.80 (ab)
<b>Control</b>		77.8 ± 11.6 (a)			86.5 ± 2.32 (a)			13.3 ± 0.80 (a)	
<b>ISO</b>	51.5 ± 4.17 (bc)	53.1 ± 0.35 (bc)	63.2 ± 0.65 (b)	50.4 ± 1.04 (bc)	40.6 ± 0.63 (de)	33.2 ± 2.10 (f)	11.3 ± 0.40 (b)	10.8 ± 0.23 (b)	10.8 ± 0.49 (b)
<b>DIU</b>	51.6 ± 0.61 (bc)	46.0 ± 1.48 (c)	48.4 ± 7.35 (c)	54.5 ± 1.98 (b)	37.3 ± 1.10 (cd)	45.3 ± 1.81 (ef)	10.6 ± 0.35 (b)	10.7 ± 1.00 (b)	10.1 ± 0.57 (b)
<b>ISO + DIU</b>	52.3 ± 3.31 (bc)	51.2 ± 3.34 (bc)	58.1 ± 7.24 (bc)	49.4 ± 3.17 (bc)	39.1 ± 2.73 (e)	36.0 ± 2.62 (ef)	11.3 ± 0.62 (b)	10.6 ± 0.75 (b)	10.5 ± 0.70 (b)
<b>Control</b>		80.2 ± 4.57 (ab)			94.2 ± 3.34 (a)			13.9 ± 1.71 (ab)	
<b>ISO</b>	63.4 ± 6.56 (cd)	60.3 ± 3.63 (d)	74.8 ± 2.78 (abc)	48.4 ± 3.08 (bc)	41.6 ± 2.42 (bcd)	33.1 ± 1.13 (d)	11.9 ± 0.88 (ab)	12.3 ± 0.66 (ab)	12.5 ± 0.60 (ab)
<b>MET</b>	81.5 ± 7.64 (a)	78.7 ± 7.31 (ab)	84.6 ± 1.87 (a)	319 ± 9.16 (e)	357 ± 7.78 (f)	372 ± 4.32 (g)	19.5 ± 1.58 (c)	21.4 ± 0.65 (cd)	23.8 ± 1.96 (d)
<b>ISO + MET</b>	72.8 ± 7.10 (abcd)	74.1 ± 0.86 (abc)	67.8 ± 3.62 (bcd)	50.4 ± 5.73 (b)	36.4 ± 1.23 (cd)	33.8 ± 1.42 (d)	13.2 ± 1.10 (ab)	14.9 ± 1.01 (b)	13.0 ± 0.84 (ab)

Table S4g: FL1 and FL2 fluorescence (measured by flow cytometry, a.u.) of microalgal cells stained with H<sub>2</sub>DCFDA (FL1<sub>DCF</sub>) and dihydroethidium (FL2<sub>DHE</sub>) after 96-h exposure in culture flasks (§3.2.3.3), for each concentration yielding a predicted effect of 25%, 50% and 75% (0.5, 1 and 1.5 TU) and solvent-controls. Letters indicate significant difference between treatments (p < 0.05).

<i>T. lutea</i>	FL1 <sub>DCF</sub> (10 <sup>3</sup> a.u.)			FL2 <sub>DHE</sub> (10 <sup>3</sup> a.u.)		
	0.5 TU	1 TU	1.5 TU	0.5 TU	1 TU	1.5 TU
<b>Control</b>		12.2 ± 4.48 (a)			3.23 ± 0.08 (a)	
<b>ISO</b>	17.6 ± 5.58 (abc)	15.2 ± 0.70 (ab)	16.2 ± 4.24 (ab)	2.89 ± 0.05 (abc)	2.48 ± 0.02 (d)	2.40 ± 0.21 (d)
<b>SPI</b>	21.0 ± 0.34 (bcd)	30.9 ± 1.85 (e)	47.9 ± 1.48 (f)	3.85 ± 0.29 (e)	5.21 ± 0.16 (f)	5.71 ± 0.16 (g)
<b>ISO + SPI</b>	27.6 ± 3.88 (de)	23.2 ± 0.73 (bcde)	25.8 ± 5.06 (cde)	3.10 ± 0.13 (ab)	2.78 ± 0.03 (bcd)	2.67 ± 0.15 (cd)
<b>Control</b>		14.7 ± 4.46 (ab)			3.38 ± 0.07 (a)	
<b>ISO</b>	20.7 ± 11.1 (ab)	17.6 ± 1.96 (ab)	16.8 ± 5.47 (ab)	5.83 ± 1.53 (bc)	4.30 ± 0.41 (ab)	3.40 ± 0.22 (a)
<b>DIU</b>	17.5 ± 2.85 (ab)	14.3 ± 3.51 (ab)	12.6 ± 4.21 (a)	3.83 ± 0.35 (a)	3.12 ± 0.30 (a)	3.00 ± 0.09 (a)
<b>ISO + DIU</b>	27.9 ± 7.82 (b)	16.7 ± 3.33 (ab)	19.6 ± 0.21 (ab)	7.29 ± 1.63 (c)	4.67 ± 0.61 (ab)	2.80 ± 0.18 (a)
<b><i>S. marinoi</i></b>						
<b>Control</b>		12.3 ± 1.64 (ab)			5.48 ± 0.10 (ab)	
<b>ISO</b>	9.23 ± 0.40 (cd)	10.4 ± 0.90 (bcd)	10.9 ± 0.29 (abc)	5.88 ± 0.13 (b)	5.94 ± 0.33 (b)	5.50 ± 0.06 (ab)
<b>SPI</b>	12.8 ± 0.95 (b)	16.4 ± 0.38 (e)	10.4 ± 0.73 (bcd)	5.90 ± 0.07 (b)	7.91 ± 0.48 (c)	9.56 ± 0.08 (d)
<b>ISO + SPI</b>	8.58 ± 0.50 (d)	9.31 ± 0.52 (cd)	11.1 ± 1.00 (abc)	5.21 ± 0.09 (a)	5.60 ± 0.15 (ab)	5.93 ± 0.12 (b)
<b>Control</b>		21.0 ± 2.79 (a)			5.85 ± 0.10 (a)	
<b>ISO</b>	14.6 ± 0.42 (bc)	13.3 ± 0.28 (c)	13.4 ± 1.32 (c)	6.89 ± 0.05 (cde)	6.92 ± 0.32 (cde)	6.13 ± 0.18 (ab)
<b>DIU</b>	16.3 ± 0.90 (b)	14.3 ± 0.62 (bc)	15.4 ± 1.05 (bc)	6.27 ± 0.15 (ab)	6.81 ± 0.13 (cde)	6.45 ± 0.19 (bcd)
<b>ISO + DIU</b>	13.7 ± 0.68 (bc)	13.7 ± 0.40 (bc)	12.9 ± 0.67 (c)	7.14 ± 0.12 (e)	6.95 ± 0.38 (de)	6.42 ± 0.07 (bc)
<b>Control</b>		14.9 ± 2.33 (bc)			5.64 ± 0.09 (a)	
<b>ISO</b>	11.4 ± 0.50 (de)	10.5 ± 0.19 (e)	11.5 ± 0.74 (de)	6.15 ± 0.17 (abc)	5.91 ± 0.16 (ab)	5.64 ± 0.37 (a)
<b>MET</b>	17.3 ± 0.23 (a)	16.9 ± 0.74 (ab)	16.9 ± 0.16 (ab)	7.30 ± 0.35 (de)	7.48 ± 0.28 (ef)	7.99 ± 0.19 (f)
<b>ISO + MET</b>	14.2 ± 0.09 (c)	12.9 ± 0.11 (cd)	11.8 ± 0.70 (de)	6.47 ± 0.14 (bc)	6.70 ± 0.27 (cd)	6.24 ± 0.15 (abc)

Table S4h: EC<sub>50</sub>s of the two single substances (displayed as A and B), in µg L<sup>-1</sup>, and the three mixture ratios (x%A:x%B), in TUs, for each of the eight binary mixtures tested in microplates (§3.2.3.1) with each microalgal species.

Mixture	<i>T. lutea</i>					<i>S. marinoi</i>				
	EC <sub>50</sub> A	EC <sub>50</sub> B	ΣTU <sub>75:25</sub> (A:B)	ΣTU <sub>50:50</sub> (A:B)	ΣTU <sub>25:75</sub> (A:B)	EC <sub>50</sub> A	EC <sub>50</sub> B	ΣTU <sub>75:25</sub> (A:B)	ΣTU <sub>50:50</sub> (A:B)	ΣTU <sub>25:75</sub> (A:B)
<b>ISO(A) + DIU(B)</b>	9.52 ± 0.60	2.30 ± 0.24	0.87 ± 0.09	0.87 ± 0.09	0.87 ± 0.09	14.2 ± 1.10	11.3 ± 0.71	0.92 ± 0.08	0.95 ± 0.06	0.93 ± 0.05
<b>ISO(A) + MET(B)</b>						12.9 ± 0.32	341 ± 78.0	0.86 ± 0.03	0.68 ± 0.03	0.66 ± 0.06
<b>ISO(A) + AZO(B)</b>	10.5 ± 0.33	849 ± 400	0.89 ± 0.09	1.01 ± 0.28	1.21 ± 0.61	16.4 ± 1.10	1200 ± 120	1.00 ± 0.03	1.31 ± 0.05	2.10 ± 0.22
<b>ISO(A) + QUI(B)</b>	11.0 ± 0.40	190 ± 7.60	1.27 ± 0.08	1.52 ± 0.09	1.16 ± 0.52	17.5 ± 0.92	95.4 ± 44.0	1.02 ± 0.05	1.10 ± 0.11	1.08 ± 0.09
<b>ISO(A) + SPI(B)</b>	10.8 ± 0.28	4.74 ± 0.50	1.20 ± 0.07	1.48 ± 0.10	1.39 ± 0.25	19.5 ± 1.90	35.5 ± 1.20	1.46 ± 0.11	2.19 ± 0.15	2.76 ± 0.30
<b>SPI(A) + QUI(B)</b>	5.09 ± 0.51	146 ± 2.80	0.93 ± 0.03	0.86 ± 0.01	0.95 ± 0.02	34.1 ± 0.44	95.5 ± 4.60	1.23 ± 0.05	1.19 ± 0.03	1.40 ± 0.06
<b>SPI(A) + CHL-M(B)</b>	4.45 ± 0.59	368 ± 22.0	0.83 ± 0.09	0.90 ± 0.18	1.10 ± 0.11					
<b>SPI(A) + MET(B)</b>						43.4 ± 3.20	314 ± 120	1.44 ± 0.06	1.42 ± 0.11	1.49 ± 0.04

## Synthèse

L'objectif général de l'article 4 était d'approfondir les résultats obtenus suite au criblage de toxicité réalisé dans l'article 3. Pour ce faire, les sept pesticides les plus toxiques ont été sélectionnés et les effets combinés de huit mélanges binaires composés de ces substances ont été évalués par les approches de modélisation précédemment décrites et appliquées dans l'article 2 du chapitre 3.

Les effets d'interaction, déterminés par rapport aux prédictions du modèle CA via la méthode des isobogrammes, étaient les suivants :

- pour *T. lutea* : un mélange était additif (ISO+AZO<sup>5</sup>), deux étaient antagonistes (ISO+QUI et ISO+SPI), deux étaient synergiques (ISO+DIU et SPI+QUI) et un était en partie antagoniste et en partie synergique (SPI+CHL-M).
- pour *S. marinoi* : un mélange était additif (ISO+DIU), cinq étaient antagonistes (ISO+AZO, ISO+QUI, ISO+SPI, SPI+QUI et SPI+MET) et un était synergique (ISO+MET).

Notons que pour *T. lutea*, les interactions déterminées par l'autre approche (l'outil MIXTOX) étaient strictement les mêmes, à l'exception du mélange ISO+AZO qui était considéré comme antagoniste par le modèle MIXTOX. Cela s'explique par le fait que, pour cette espèce, le modèle de référence utilisé par les deux approches était le modèle CA. Pour *S. marinoi*, l'effet d'interaction de quatre mélanges a été déterminé en utilisant le modèle IA comme référence, cependant, celui-ci ne change que pour le mélange SPI+QUI : il est synergique par rapport aux prédictions du modèle IA et antagoniste par rapport à celles du modèle CA. Comme souligné dans l'article 2 du chapitre 3, cette étude démontre là encore la fiabilité de ces deux approches pour la détermination des effets d'interaction de mélanges binaires, au même titre que l'importance de préciser quel modèle de référence a été utilisé lorsque que l'on mentionne un effet d'interaction. Belden *et al.* (2007) préconisent l'utilisation d'une différence d'un facteur d'au moins 2 entre la toxicité prédite par le modèle de référence (uniquement le modèle CA dans cet article) et celle observée de manière expérimentale (*e.g.*  $\Sigma TU < 0,5$  ou  $> 2$ ) pour considérer une interaction comme significative au niveau biologique, c'est-à-dire ayant réellement un impact pour l'organisme considéré. En suivant cette recommandation, seuls deux mélanges ont induit un antagonisme significatif au niveau biologique : ISO+SPI et ISO+AZO et ce uniquement pour certains ratios de mélange et l'espèce *S. marinoi*. Toutefois, il faut garder à l'esprit que cette limite a été fixée en prenant une certaine marge d'erreur afin d'éviter toute interprétation erronée.

Le deuxième objectif de cet article était d'approfondir la toxicité observée pour trois des huit mélanges testés. Ainsi, trois mélanges binaires illustrant les trois types d'interactions ont été

---

<sup>5</sup> DIU : diuron ; ISO : isoproturon ; MET : métazachlore ; CHL-M : chlorpyrifos-méthyl ; AZO : azoxystrobine ; QUI : quinoxifène ; SPI : spiroxamine

sélectionnés : ISO+DIU (additivité), ISO+SPI (antagonisme) et ISO+MET (synergie, uniquement testé sur *S. marinoi*). Les effets des substances seules et du mélange 50:50% ont été observés sur l'efficacité photosynthétique par PAM-fluorescence et sur les paramètres suivants par cytométrie en flux, à l'aide de marqueurs fluorescents : métabolisme des estérases (FDA), contenu relatif en lipides (BODIPY<sup>505/515</sup>), potentiel de la membrane cytoplasmique (DiBAC<sub>4</sub>(3)) et contenu relatif en ERO (H<sub>2</sub>DCFDA et HE).

L'exploration des effets des substances seules sur les paramètres suivis a permis d'améliorer notre compréhension des mécanismes de toxicité et de leurs conséquences pour la physiologie des microalgues étudiées. Le diuron et l'isoproturon, qui sont des inhibiteurs du PSII, ont induit une diminution significative du rendement quantique du PSII ( $\Phi'_M$ ). Du fait de l'inhibition de la photosynthèse, l'énergie et les précurseurs nécessaires à la biosynthèse des lipides sont produits en quantité limitée (Masojídek *et al.*, 2004) : en conséquence, la quantité relative de lipides, mesurée par la fluorescence du BODIPY (FL1<sub>BOD</sub>) s'en trouve amoindrie. Une autre conséquence du blocage de la photosynthèse est l'accumulation d'ERO à l'intérieur des cellules, du fait d'une surproduction provoquée par l'impossibilité de convertir l'énergie lumineuse en énergie chimique (Knauer et Knauer, 2008). Seules quelques conditions ont entraîné une augmentation significative du contenu en ERO chez *T. lutea*. En revanche, deux réponses inverses ont été obtenues avec la diatomée *S. marinoi* selon le fluorochrome utilisé : le H<sub>2</sub>DCFDA semble indiquer une diminution du contenu en ERO, alors que l'HE semble montrer une augmentation. Bien que ces deux fluorochromes ne mesurent pas les mêmes ERO, il se pourrait que la réponse observée avec le H<sub>2</sub>DCFDA soit biaisée. En effet, pour fonctionner, ce fluorochrome nécessite d'être précédemment clivé par les estérases (Kalyanaraman *et al.*, 2012) dont l'activité mesurée par le FDA semble également avoir été amoindrie. Concernant la spiroxamine et le métazachlore, leur mode d'action cible la synthèse des stérols et des VLCFA, respectivement. Comme attendu, la spiroxamine n'avait donc aucun impact sur la photosynthèse, contrairement au métazachlore qui a quant à lui induit une diminution significative du  $\Phi'_M$  aux deux concentrations les plus fortes. Une augmentation significative de l'activité métabolique des estérases a pu être observée après exposition à la spiroxamine. Cette augmentation pourrait être liée à une réaction de la cellule face au stress induit par cette substance et/ou une tentative de métabolisation de la substance par la cellule. Concernant les autres paramètres, la spiroxamine et le métazachlore ont induit des réponses assez similaires : elles ont toutes deux induit une augmentation de la production de lipides, cohérente avec le stress et le ralentissement de la division cellulaire induits par ces substances (Vallotton *et al.*, 2008 ; da Costa *et al.*, 2017). Une dépolarisation de la membrane plasmique des cellules exposées a également été observée, traduisant un effet significatif de ces substances sur la membrane cytoplasmique. Cet effet pourrait s'expliquer

par le fait que les stérols et les VLCFA sont des constituants importants des membranes (Cassagne *et al.*, 1994 ; Haines, 2001 ; Ohvo-Rekilä *et al.*, 2002) : une diminution significative de leur quantité pourrait donc avoir un effet sur la perméabilité membranaire. Enfin, ces deux substances semblent avoir induit une augmentation du contenu en ERO, probablement en réponse au stress général induit par ces contaminants.

L'observation des effets induits par les substances seules sur les différentes fonctions physiologiques suivies a permis d'affiner notre compréhension des mécanismes de toxicité et de leurs conséquences pour les cellules de microalgues. Ainsi, la toxicité induite par les mélanges testés et l'effet d'interaction résultant de leur combinaison peuvent être en partie interprétés. Par exemple, l'effet combiné du diuron et de l'isoproturon était similaire à celui observé pour les substances seules et ce pour les deux espèces de microalgues. Ces observations permettent de confirmer que ces deux substances possèdent bien le même mode d'action et que par conséquent leur interaction est simplement additive. Pour ce qui est du mélange entre l'isoproturon et la spiroxamine, le fort antagonisme, observé là aussi chez les deux espèces étudiées, pourrait venir du fait que ces deux substances ont des cibles moléculaires distinctes. La toxicité de ces substances semble indépendante l'une de l'autre : le mélange ne suit pas le principe d'additivité des concentrations et n'est toxique que si au moins l'une des deux substances est présente en concentration suffisante. Finalement, la synergie induite par le mélange entre l'isoproturon et le métazachlore chez la diatomée *S. marinoi* est probablement le résultat le plus intéressant. L'intensité de la synergie était supérieure pour le mélange testé en ballons de culture par rapport à celui testé en microplaques. Ce mélange a induit une diminution du  $\Phi'_M$  bien supérieure à celle observée pour les substances seules. Le processus de photosynthèse étant d'une importance capitale pour les microalgues, l'effet accru observé sur ce paramètre pourrait être à l'origine de la synergie observée. Plusieurs études ont pu démontrer que l'inhibition de la synthèse des VLCFA pouvait induire des malformations au niveau des thylakoïdes impliqués dans le processus de photosynthèse (Schneider et Kohlwein, 1997 ; Millar *et al.*, 1998 ; Thakkar *et al.*, 2013). L'action combinée du métazachlore sur la structure des thylakoïdes et de l'isoproturon sur le transfert d'électrons au niveau du PSII pourrait donc expliquer la diminution supérieure de l'efficacité photosynthétique observée avec le mélange.

Les pesticides de la famille des phénylurées, comme le diuron ou l'isoproturon, et celles de la famille des chloroacétanilides, comme le métazachlore et surtout le S-métolachlore, sont parmi les contaminants plus fréquemment retrouvés dans les eaux continentales et côtières. En conséquence, l'interaction synergique issue du mélange de ces substances pourrait s'avérer potentiellement dangereuse pour les populations de microalgues qui y sont exposées.

En complément des deux études réalisées sur les microalgues marines, la partie suivante présente les résultats du criblage de toxicité réalisé sur les larves de l'huître creuse *C. gigas*.

## 4. Criblage de la toxicité de 17 pesticides sur le développement embryon-larvaire de *Crassostrea gigas*

### 4.1. Introduction

Les pesticides utilisés en viticulture peuvent contaminer les cours d'eau à proximité des zones de traitement du fait des pertes pendant et après leur pulvérisation (Leu *et al.*, 2004 ; Gil et Sinfort, 2005 ; Brady *et al.*, 2006). Par la suite, ces pesticides peuvent être retrouvés jusque dans les milieux estuariens et côtiers (Caquet *et al.*, 2013 ; Cruzeiro *et al.*, 2015, 2016a), et peuvent ainsi être responsables d'une toxicité significative pour les organismes qui y vivent. Les premiers stades de développement des mollusques bivalves sont particulièrement sensibles aux polluants chimiques (Jha *et al.*, 2000). En conséquence, le test embryon-larvaire réalisé avec des embryons et des larves de l'huître creuse *Crassostrea gigas* (ISO 17244:2015, 2015) a souvent été appliqué pour évaluer l'embryotoxicité de diverses substances chimiques pour les bivalves marins (His *et al.*, 1999 ; Wessel *et al.*, 2007 ; Akcha *et al.*, 2012 ; Mai *et al.*, 2012 ; Mottier *et al.*, 2013). En plus des effets observés sur le développement larvaire, des études ont également mis en évidence l'induction de lésions à l'ADN chez les larves de *C. gigas* exposées à des contaminants (Jha *et al.*, 2000 ; Wessel *et al.*, 2007 ; Mai *et al.*, 2012), notamment via le test des comètes.

Dans cette étude, la toxicité de 17 pesticides, dont quatorze produits phytosanitaires utilisés en viticulture et trois biocides régulièrement retrouvés dans les milieux aquatiques, ainsi que d'un métabolite, a été évaluée sur le développement embryon-larvaire de l'huître creuse *C. gigas* via l'application du test embryon-larvaire en microplaques. Le potentiel génotoxique des pesticides déterminés comme les plus embryotoxiques à l'issue du criblage a ensuite été évalué via le test des comètes.

Notons que ces travaux ont été réalisés en collaboration avec le stage de Master 2 de Claire Guégan intitulé « Évaluation du potentiel toxique de différentes classes de pesticides sur le développement embryon-larvaire de l'huître creuse *Crassostrea gigas* » et réalisé au Laboratoire d'Écotoxicologie de l'Ifremer de Nantes, sous la direction de Farida Akcha.

### 4.2. Matériels et méthodes

Les matériels et méthodes utilisés pour cette étude sont décrits dans le chapitre 2 de ce manuscrit : matériel chimique et préparation des solutions (section 1.1), origine des géniteurs et obtention des embryons (section 5.2.1), test de développement embryon-larvaire (section 5.2.2), test des comètes (section 5.2.3) et analyses statistiques et modélisation (section 6).

### 4.3. Résultats

#### 4.3.1. Expérimentations préliminaires

Des expérimentations préliminaires ont été réalisées afin d'adapter le test embryolo- larvaire en microplaques. En effet, ce test est traditionnellement réalisé dans des pots en plastique de 30 mL ou, lorsqu'un grand nombre de larves est nécessaire, dans des pots en verre de 2 L. Afin de valider l'adaptation du test en microplaques, une gamme de cuivre a été testée via le test embryolo- larvaire dans deux types de microplaques, microplaques de 12-puits et de 24-puits. Pour rappel, le test est validé si les témoins présentent un pourcentage de normalité (%<sub>NORM</sub>) supérieur à 80% au stade larve D (après 24 h de développement), et si la CE<sub>50</sub> de la gamme de cuivre est située entre 6 et 16 µg L<sup>-1</sup>. Les valeurs de CE<sub>50</sub> entre les deux microplaques ont été comparées (Figure 52). Notons que, de manière parallèle à ces expérimentations, la concentration « optimale » d'embryons fécondés dans les puits (embryons mL<sup>-1</sup>) a également été déterminée en comparant les résultats de tests réalisés avec différentes concentrations de 50, 100 ou 150 embryons mL<sup>-1</sup>.

Il en est ressorti que pour une concentration de 50 embryons mL<sup>-1</sup>, il était parfois impossible d'observer un nombre minimal de 100 larves D par puits, alors qu'avec la concentration de 150 embryons mL<sup>-1</sup>, le nombre trop élevé de larves D empêchait la bonne observation des anomalies de développement. De fait, il a été choisi de travailler à la concentration de 100 embryons mL<sup>-1</sup>. Comme on peut le voir sur cette figure, dans les deux microplaques analysées, le %<sub>NORM</sub> des témoins était supérieur à 80% et les CE<sub>50</sub> obtenues étaient bien situées entre 6 et 16 µg L<sup>-1</sup>, permettant ainsi de valider l'adaptation du test embryolo- larvaire dans les deux types de microplaques. La microplaque 24-puits permettant de tester un plus grand nombre de conditions simultanément, c'est celle qui a été retenue pour réaliser le criblage de toxicité.

Les solutions mères des pesticides testés au cours du criblage de toxicité n'étaient pas toutes dans le même solvant : une majorité de ces substances ont été dissoutes dans le méthanol (MeOH), d'autres

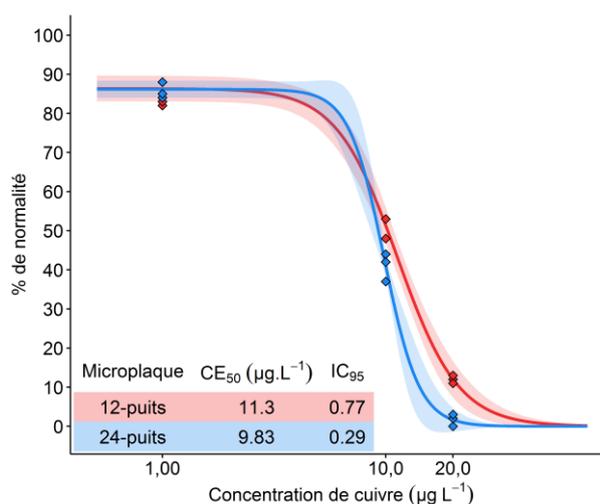


Figure 52 : Comparaison des courbes concentration-réponse obtenues après test d'une gamme de cuivre via le test embryolo- larvaire dans des microplaques 12-puits (en rouge), et 24-puits (en bleu). Les valeurs de CE<sub>50</sub> sont données avec un intervalle de confiance à 95% (IC<sub>95</sub>) également symbolisé par l'aire autour des courbes.

dans l'acétone et pour les plus solubles, dans de l'eau milli-Q. Il était donc nécessaire d'évaluer, pour chaque solvant, le pourcentage maximal admissible n'entraînant pas de différence significative au niveau du %<sub>NORM</sub> des larves d'huître par rapport au témoin eau de mer. Pour ce faire, trois pourcentages ont été testés pour chaque solvant, 0,05%, 0,10% et 0,50%, via le test embryolo- larvaire et le %<sub>NORM</sub> pour chaque condition a été calculé après 24 h de développement (Figure 53).

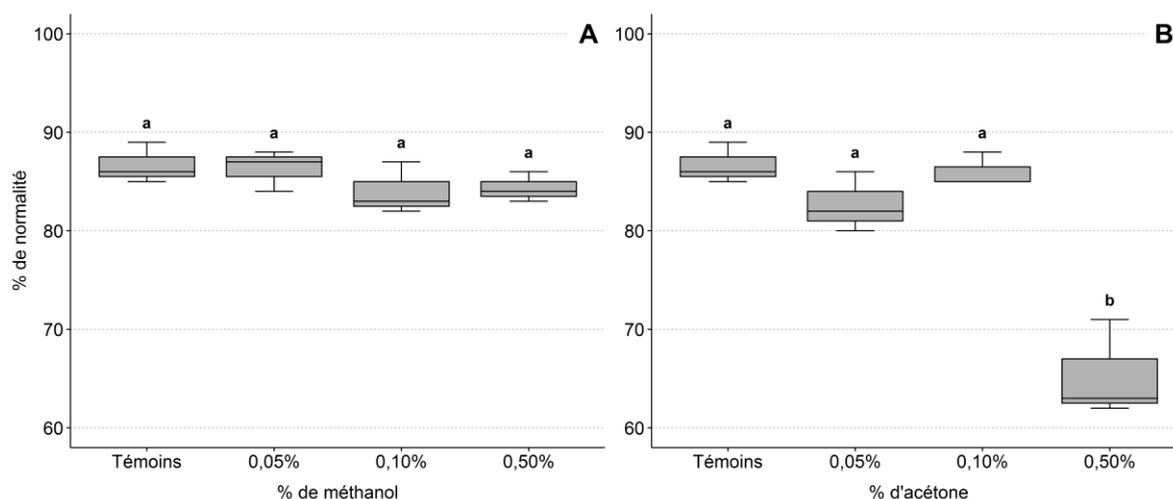


Figure 53 : Boîtes à moustaches représentant le pourcentage de normalité en fonction du pourcentage de méthanol (A) et d'acétone (B) à l'issue du test embryolo- larvaire réalisé en microplaques 24-puits. Les lettres représentent les différences significatives entre les traitements.

Comme on peut le voir sur la figure ci-dessus, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence pour les différents pourcentages de méthanol testés : toutes les conditions présentaient un %<sub>NORM</sub> > 80%. Pour l'acétone, seul le plus fort pourcentage de 0,50% a induit une baisse significative du %<sub>NORM</sub>. D'après les résultats de ce test, les pourcentages maximaux pour chaque solvant ont donc été fixés à 0,50% pour le méthanol et 0,10% pour l'acétone.

### 4.3.2. Criblage de toxicité

Quatre expérimentations distinctes de criblage de toxicité ont été réalisées, cependant, seule l'une de ces expérimentations a permis d'obtenir des résultats exploitables qui sont présentés ci-dessous.

Bien que le but de ces expérimentations consistait à déterminer des CE<sub>50</sub> pour chacune des substances testées, cela n'a été possible que pour un nombre réduit d'entre elles (voir 4.3.2.5). C'est pourquoi les résultats seront décrits, dans un premier temps, uniquement sur la base des effets significatifs observés sur le %<sub>NORM</sub>.

Notons que pour ces expérimentations, les concentrations d'exposition effectives n'ont pas été mesurées dans les puits des microplaques. Cependant, les concentrations nominales ont été corrigées en utilisant les concentrations mesurées des solutions mères utilisées (sauf pour le diquat, le glyphosate et l'AMPA).

#### 4.3.2.1. Validation du test

Pour chaque substance testée, le %<sub>NORM</sub> des témoins eau de mer et solvant (pour chaque substance, le % de solvant était le même pour toutes les concentrations testées) était supérieur à 80%. Ainsi, seuls les témoins solvant sont affichés dans les résultats présentés ci-dessous. La gamme de cuivre réalisée a permis d'obtenir une CE<sub>50</sub> située entre 6 et 16 µg L<sup>-1</sup>, égale à 9,70 ± 2,16 µg L<sup>-1</sup> (Figure 54). Sur la base de ces résultats, la validité du test est assurée, en accord avec la norme ISO 17244:2015.

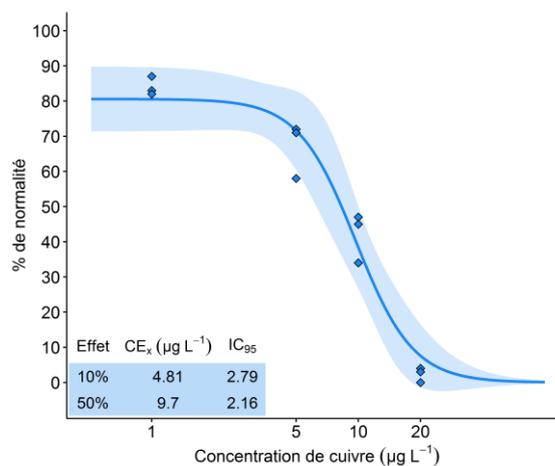


Figure 54 : Courbe concentration-réponse obtenue après test d'une gamme de cuivre via le test embryolo- larvaire. Les valeurs de CE<sub>50</sub> et CE<sub>10</sub> sont données avec un intervalle de confiance à 95% (IC<sub>95</sub>) également symbolisé par l'aire autour des courbes.

#### 4.3.2.2. Herbicides

Concernant les herbicides (incluant également les biocides diuron et isoproturon et le métabolite du glyphosate, l'AMPA), des résultats contrastés ont été obtenus. Le diuron et l'isoproturon ont tous deux induit une diminution significative du %<sub>NORM</sub> à la plus faible concentration testée (0,11 µg L<sup>-1</sup>), faisant passer celui-ci sous la barre des 80% (Figure 55). Pour le diuron, une diminution importante et significative du %<sub>NORM</sub> a été observée à 0,97, 10,6 et 26,6 µg L<sup>-1</sup> (%<sub>NORM</sub> ≈ 45%). Les deux plus fortes concentrations (53,2 et 106 µg L<sup>-1</sup>) ont induit une diminution significative par rapport aux concentrations précédentes, amenant le %<sub>NORM</sub> autour de 25-30%. Pour l'isoproturon, les diminutions observées au niveau du %<sub>NORM</sub> étaient plus faibles, et étonnamment, à 10,8 µg L<sup>-1</sup>, le %<sub>NORM</sub> n'était plus significativement inférieur à celui des témoins. Les trois plus fortes concentrations ont induit un effet similaire, réduisant le %<sub>NORM</sub> autour de 60%.

Le diquat n'a induit aucune diminution significative du %<sub>NORM</sub>, quelle que soit la concentration testée (Figure 55).

Concernant le flazasulfuron, une baisse importante et significative a été observée pour la plus faible concentration testée (0,092 µg L<sup>-1</sup>). Les plus fortes concentrations n'ont pas toujours provoqué un effet supérieur voir toujours significatif vis à vis du témoin. (Figure 55). L'effet embryotoxique ne semble pas suivre une relation concentration-réponse.

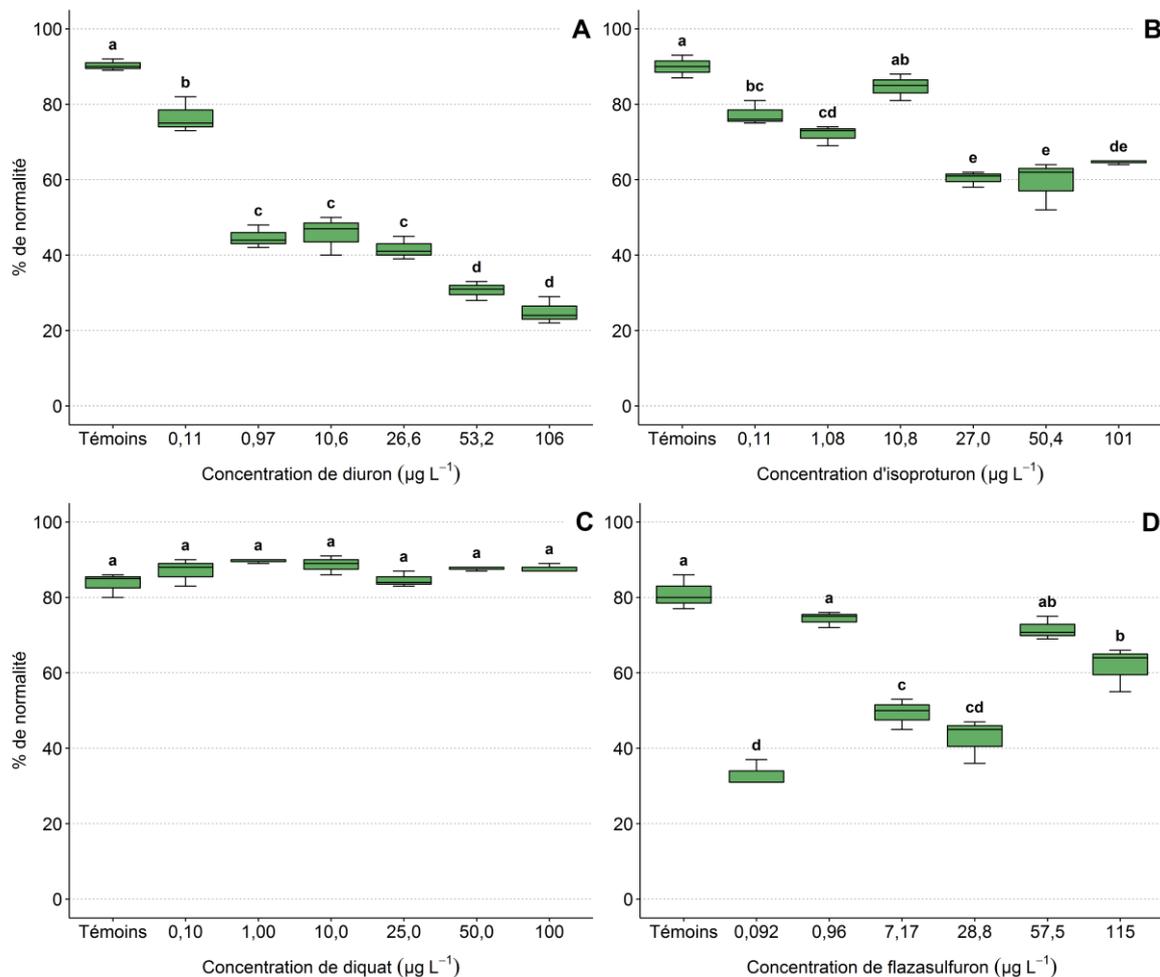


Figure 55 : Boîtes à moustaches représentant le pourcentage de normalité des larves D après 24 h de développement en fonction de la concentration de la substance testée (en  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), après exposition au diuron (A), à l’isoproturon (B), au diquat (C) et au flazasulfuron (D). Les lettres représentent les différences significatives entre les traitements (test de Tukey).

En comparant les deux herbicides de la famille des chloroacétanilides, le S-métolachlore et le métazachlore, il semblerait que le métazachlore soit davantage toxique pour les larves d’huître, si l’on fait exception de la réponse obtenue pour la plus faible concentration de S-métolachlore testée : comme pour le flazasulfuron, celle-ci a induit une réponse bien supérieure à toutes les autres concentrations testées (Figure 56). À 0,077, 0,77 et 14,6  $\mu\text{g L}^{-1}$  de métazachlore, le  $\%_{\text{NORM}}$  était significativement inférieur à celui des témoins et situé autour de 60%. À 36,5  $\mu\text{g L}^{-1}$ , le  $\%_{\text{NORM}}$  atteignait les 50%, alors que les deux plus fortes concentrations testées (94,1 et 188  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) ont induit une diminution encore supérieure, le faisant passer sous la barre des 20% de normalité. Pour le S-métolachlore, faisant fi de la plus faible concentration testée, une diminution significative a pu être observée à partir de 11,7  $\mu\text{g L}^{-1}$  ( $\%_{\text{NORM}} \approx 70\text{-}75\%$ ). Le  $\%_{\text{NORM}}$  ne diminue pas davantage hormis pour la plus forte concentration testée (117  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), amenant le  $\%_{\text{NORM}}$  autour de 50%. Le glyphosate et son métabolite, l’AMPA, n’ont induit aucun effet significatif dans la gamme de concentrations testées (Figure 56).

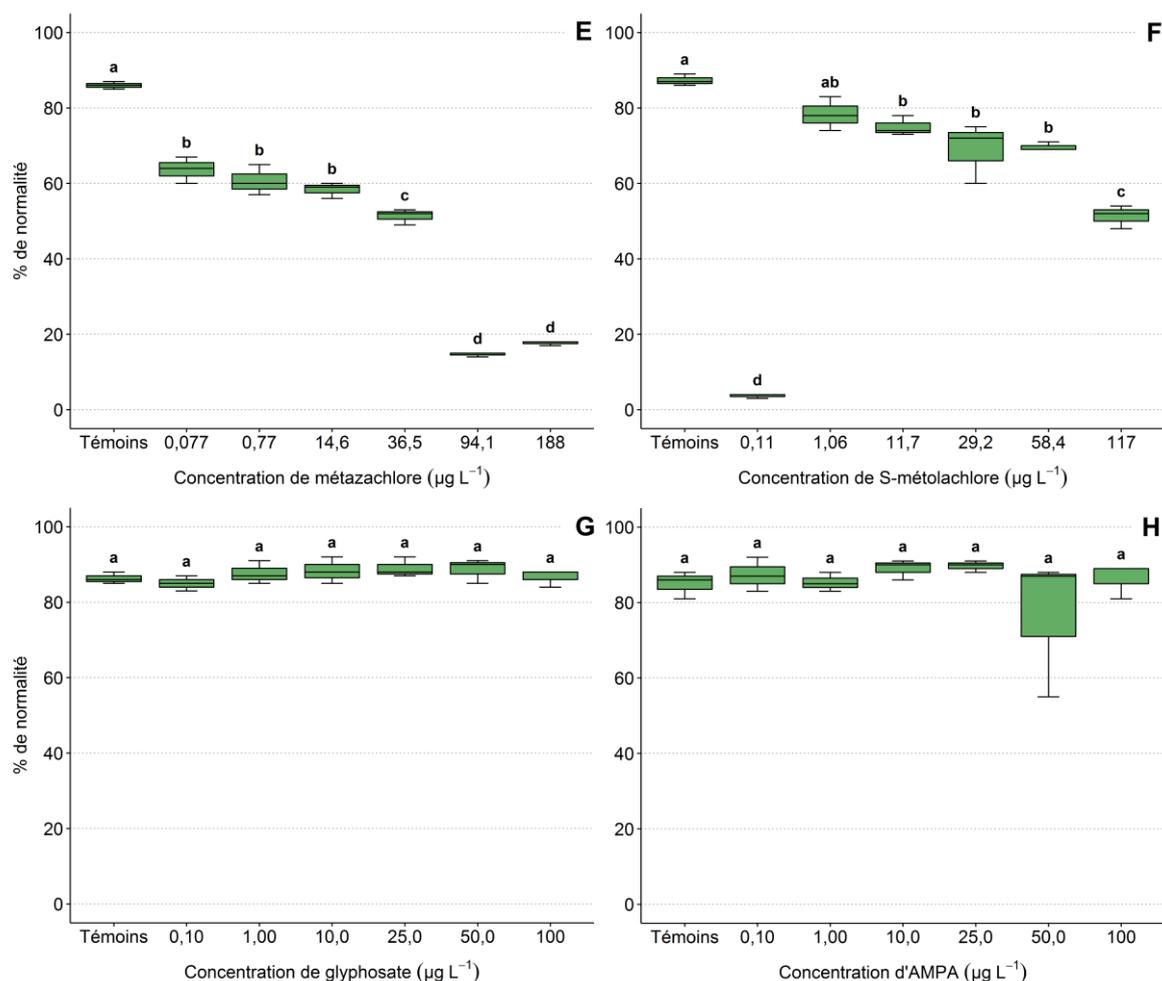


Figure 56 : Boîtes à moustaches représentant le pourcentage de normalité des larves D après 24 h de développement en fonction de la concentration de la substance testée (en  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), après exposition au métazachlore (E), au S-métolachlore (F), au glyphosate (G) et à l’AMPA (H). Les lettres représentent les différences significatives entre les traitements (test de Tukey).

#### 4.3.2.3. Insecticides

De manière similaire à ce qui a pu être observé avec certains herbicides (Figures 55 et 56), pour deux des six insecticides testés (le fipronil est ici considéré comme un insecticide), le fipronil et le chlorpyrifos-méthyl, les réponses obtenues ne suivaient pas une relation concentration-réponse (Figure 57).

Deux substances n’ont induit aucune toxicité dans la gamme de concentrations testées : l’ $\alpha$ -cyperméthrine et le chlorpyrifos (Figure 57).

En revanche, l’acrinathrine a induit une très forte toxicité pour les larves d’huître, avec une diminution du  $\%_{\text{NORM}}$  observée dès  $0,015 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $\%_{\text{NORM}} \approx 70\%$ ). Pour toutes les autres concentrations testées

(hormis la plus forte), le pourcentage de normalité était proche de 0%. De manière surprenante, les larves présentaient un  $\%_{\text{NORM}} \approx 20\%$  à la concentration la plus forte ( $3,63 \mu\text{g L}^{-1}$ ).

Enfin, l'imidaclopride s'est également avéré relativement toxique : à la plus faible concentration testée ( $0,084 \mu\text{g L}^{-1}$ ), le  $\%_{\text{NORM}}$  était inférieur à 60%. Cependant, pour des concentrations dix fois et cent fois supérieures, le  $\%_{\text{NORM}}$  n'était pas significativement différent. À  $21,1$  et  $42,2 \mu\text{g L}^{-1}$ , le pourcentage de normalité était significativement inférieur et sous la barre des 40%. Enfin, pour la concentration la plus forte, celui-ci était légèrement supérieur, et égal à celui observé pour les plus faibles concentrations ( $\approx 60\%$ ).

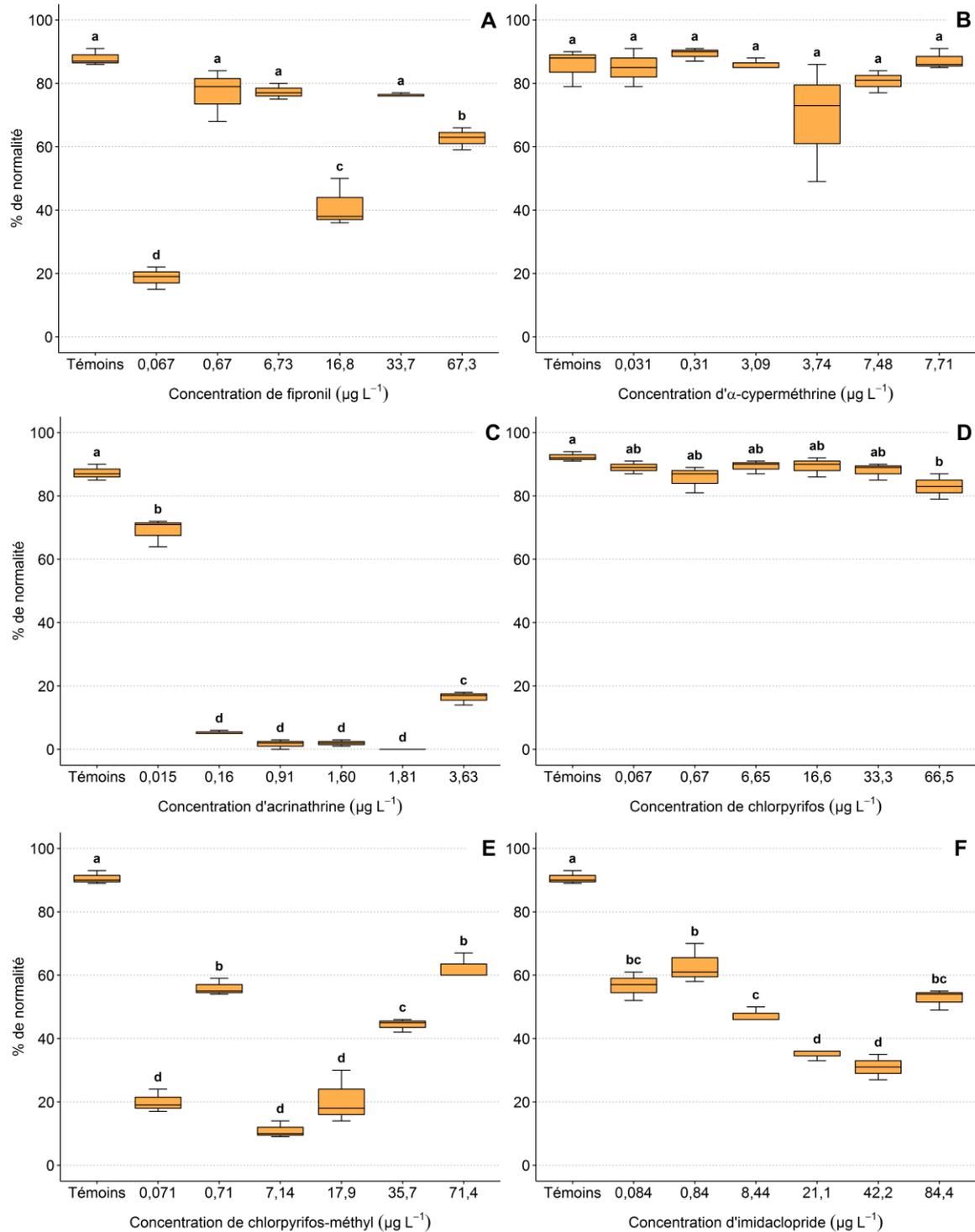


Figure 57 : Boîtes à moustaches représentant le pourcentage de normalité des larves D après 24 h de développement en fonction de la concentration de la substance testée (en  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), après exposition au fipronil (A), à l' $\alpha$ -cyperméthrine (B), à l'acrinathrine (C), au chlorpyrifos (D), au chlorpyrifos-méthyl (E) et à l'imidaclopride (F). Les lettres représentent les différences significatives entre les traitements (test de Tukey).

#### 4.3.2.4. Fongicides

Comme ce qui a pu être observé pour d'autres substances, insecticides et herbicides, la réponse induite par le quinoxyfène ne semble pas suivre de relation concentration-réponse : à la plus faible concentration, une diminution importante du %<sub>NORM</sub> a été observée, cependant, les plus fortes concentrations n'ont induit que peu ou pas d'effet par rapport aux témoins (Figure 58).

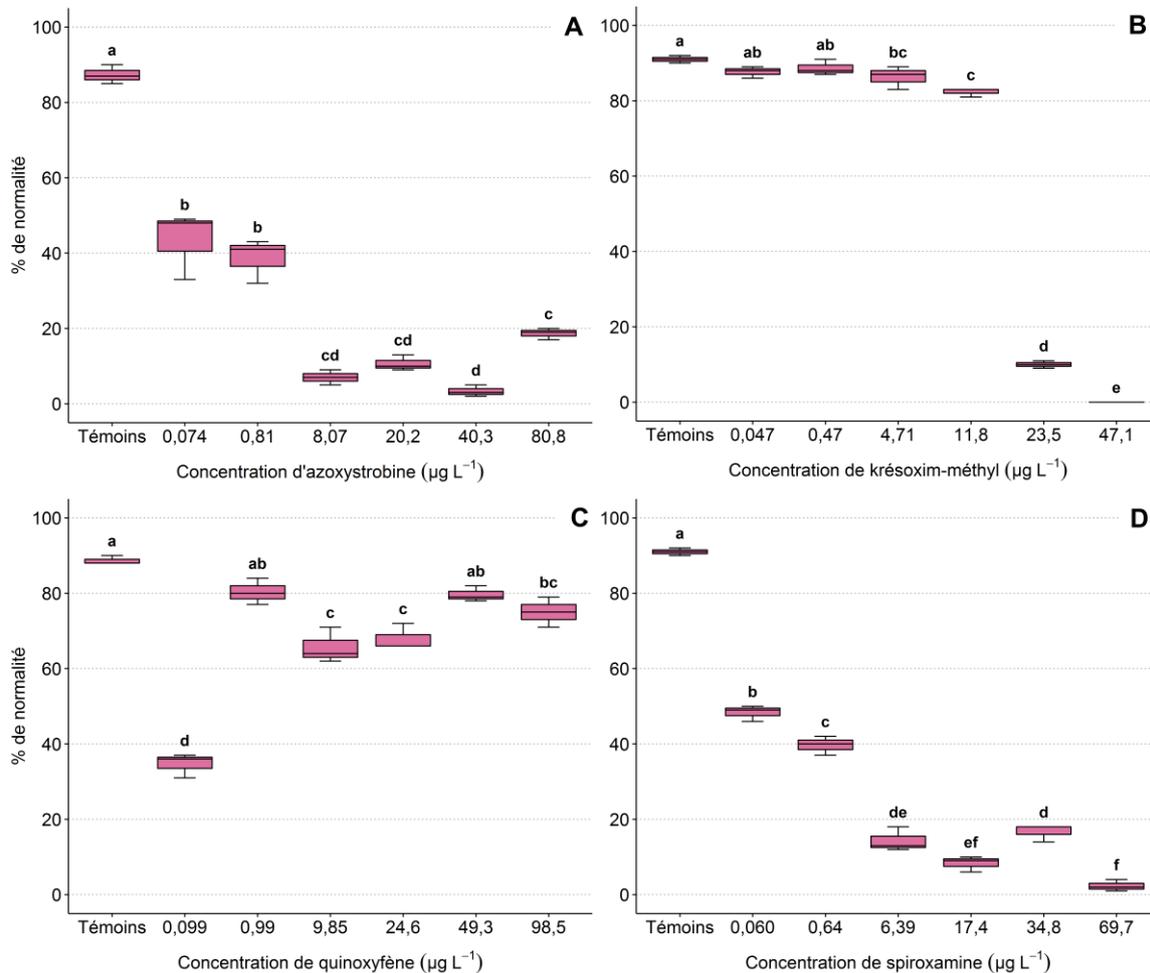


Figure 58 : Boîtes à moustaches représentant le pourcentage de normalité des larves D après 24 h de développement en fonction de la concentration de la substance testée (en  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), après exposition à l'azoxystrobine (A), au krésoxim-méthyl (B), au quinoxyfène (C) et à la spiroxamine (D). Les lettres représentent les différences significatives entre les traitements (test de Tukey).

L'azoxystrobine a induit une forte diminution du %<sub>NORM</sub> dès la plus faible concentration testée ( $0,074 \mu\text{g L}^{-1}$ ). À  $8,07 \mu\text{g L}^{-1}$ , le pourcentage de normalité est inférieur à 10%, et chute aux alentours de 5% à  $40,3 \mu\text{g L}^{-1}$  d'azoxystrobine. De manière surprenante, celui-ci atteint une valeur proche de 20% pour la plus forte concentration testée. Le krésoxim-méthyl, un autre fongicide de la famille des strobilurines, a induit un effet significatif à partir de  $4,71 \mu\text{g L}^{-1}$ , cependant à cette concentration, ainsi qu'à la suivante ( $11,8 \mu\text{g L}^{-1}$ ), le pourcentage de normalité reste supérieur à 80%. À  $23,5 \mu\text{g L}^{-1}$ , le %<sub>NORM</sub> passe sous la barre des 20% et à la plus forte concentration ( $47,1 \mu\text{g L}^{-1}$ ), le pourcentage de

normalité atteint zéro. Enfin, la spiroxamine a également induit une très forte toxicité pour les larves d’huître : à  $0,060 \mu\text{g L}^{-1}$  le  $\%_{\text{NORM}}$  est environ égal à 50%, et il passe sous la barre des 20% à partir de  $6,39 \mu\text{g L}^{-1}$ . À la concentration la plus forte ( $69,7 \mu\text{g L}^{-1}$ ) le  $\%_{\text{NORM}}$  est inférieur à 5%.

#### 4.3.2.5. Modélisation des courbes concentration-réponse

Pour une majorité de substances, le  $\%_{\text{NORM}}$  ne suivait pas une relation concentration-réponse. De fait, les courbes concentration-réponse n’ont pu être modélisées que pour un nombre réduit de substances.

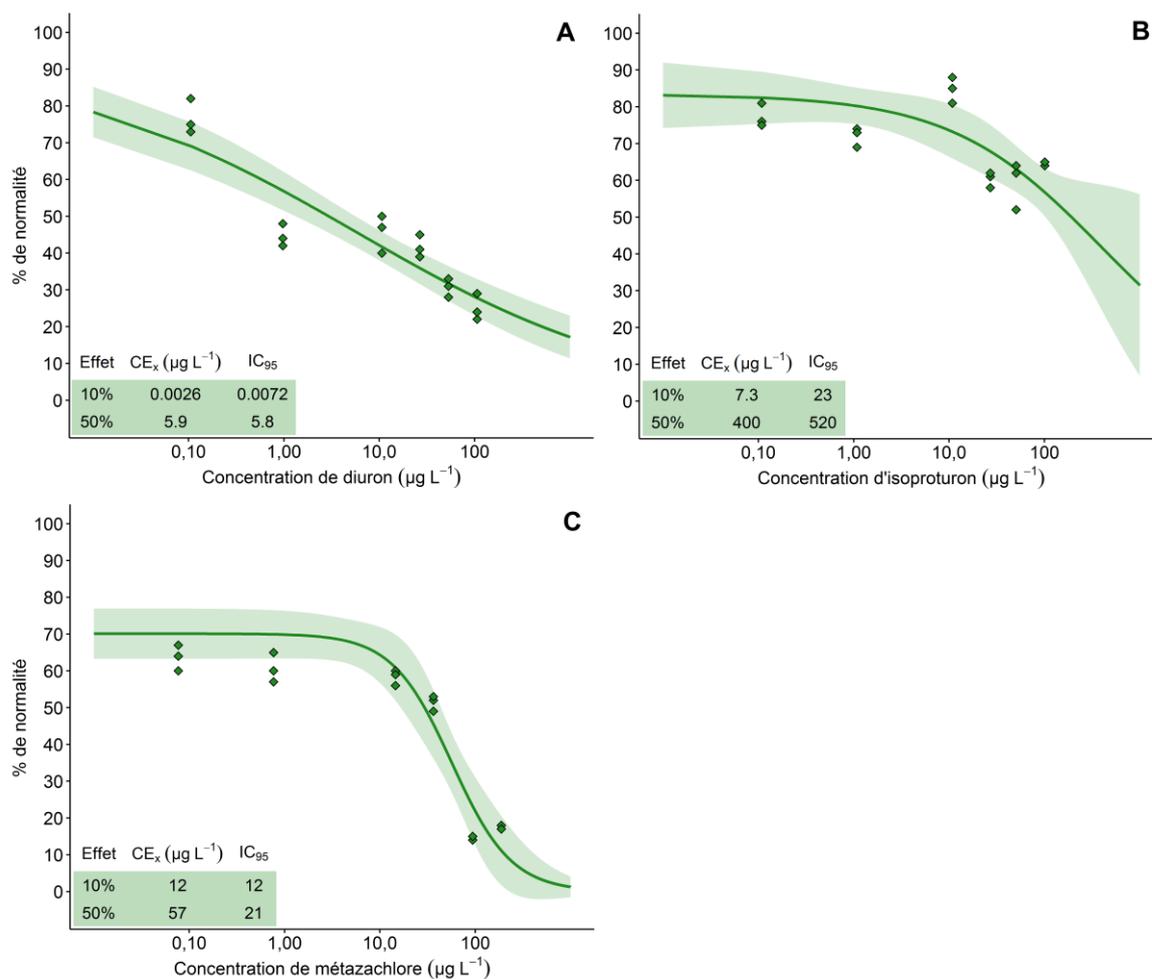


Figure 59 : Courbes concentration-réponse modélisées avec un modèle log-logistique à trois paramètres à partir du pourcentage de normalité des larves D après 24 h d’exposition au diuron (A), à l’isoprothuron (B) et au métazachlore (C). Les points représentent les valeurs du pourcentage de normalité pour chaque réplicat/concentration. L’aire autour de la courbe symbolise l’intervalle de confiance à 95% ( $IC_{95}$ ).

Ainsi, on peut remarquer sur la Figure 59 que pour le diuron (A) et encore davantage pour l’isoprothuron (B), la réponse obtenue n’est pas adaptée au calcul de valeurs de  $CE_{10}$  ou  $CE_{50}$  : les valeurs obtenues présentent une forte imprécision. En revanche, la réponse obtenue après exposition

des larves d’huître au métazachlore donne de meilleurs résultats permettant de calculer une valeur de  $CE_{50}$  égale à  $51 \pm 21 \mu\text{g L}^{-1}$ .

La modélisation des effets concentration-réponse était davantage adaptée aux substances ayant induit une toxicité forte : c’est le cas de l’acrinathrine (A), de l’azoxystrobine (B), du krésoxim-méthyl (C) et de la spiroxamine (D) (Figure 60).

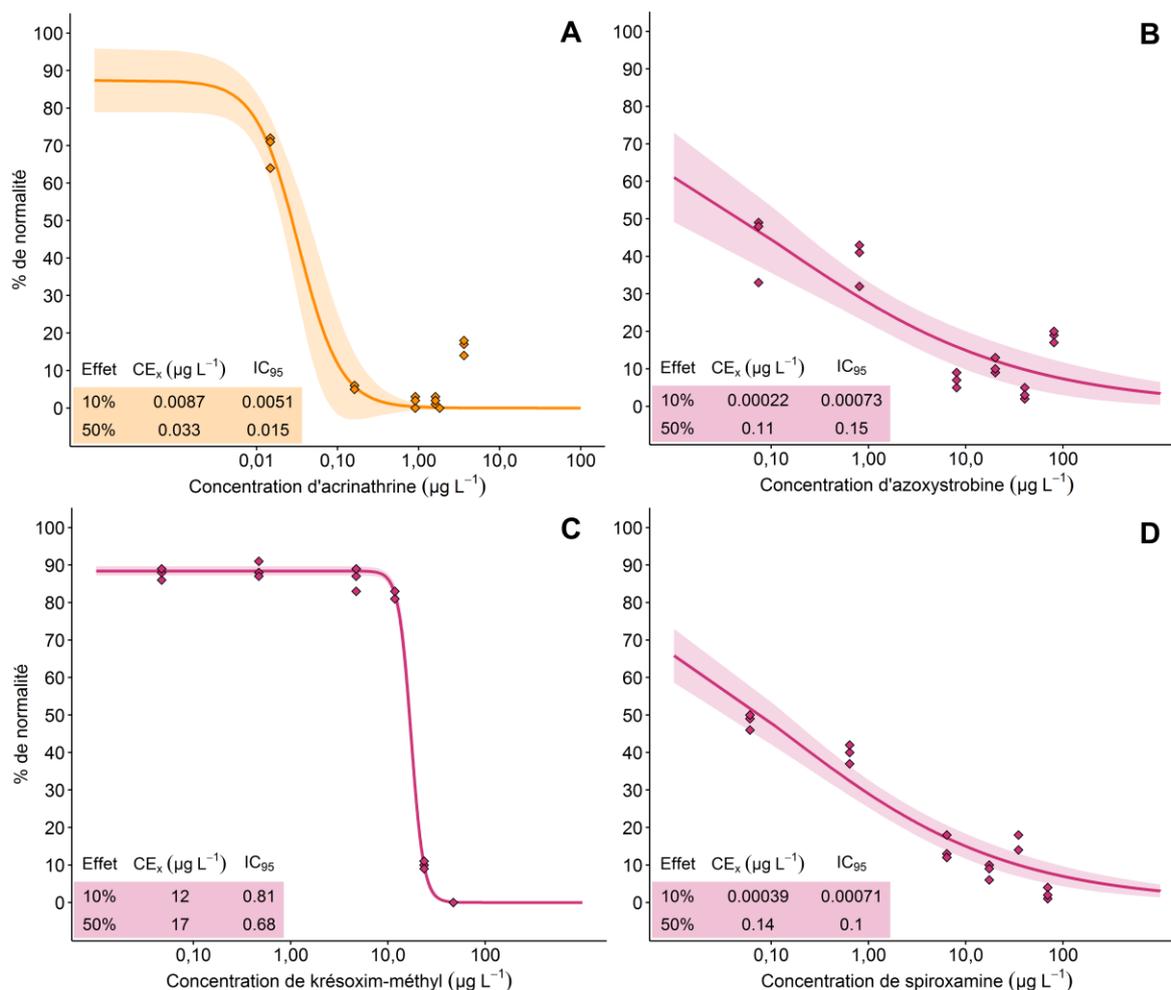


Figure 60 : Courbes concentration-réponse modélisées avec un modèle log-logistique à trois paramètres à partir du pourcentage de normalité des larves D après 24 h d’exposition à l’acrinathrine (A), à l’azoxystrobine (B), au krésoxim-méthyl (C) et à la spiroxamine (D). Les points représentent les valeurs du pourcentage de normalité pour chaque réplicat/concentration. L’aire autour de la courbe symbolise l’intervalle de confiance à 95% ( $IC_{95}$ ).

Le seul insecticide pour lequel il était possible de modéliser une relation concentration-réponse, l’acrinathrine, est aussi le pesticide le plus toxique pour les larves d’huître parmi toutes les substances testées, avec une  $CE_{50}$  égale à  $0,033 \pm 0,015 \mu\text{g L}^{-1}$  (Figure 60). La concentration induisant un effet de 10% se situerait aux alentours de  $0,0087 \pm 0,0051 \mu\text{g L}^{-1}$ . Concernant l’azoxystrobine, la  $CE_{50}$  estimée est de  $0,11 \pm 0,15 \mu\text{g L}^{-1}$ , contre  $0,14 \pm 0,10 \mu\text{g L}^{-1}$  pour la spiroxamine (Figure 60). Pour ces deux substances, les  $CE_{10}$  estimées sont également peu précises. Enfin, le krésoxim-méthyl, qui semble moins toxique que les trois autres substances mentionnées précédemment a quant à lui induit une

réponse permettant de modéliser avec une très grande précision des valeurs de  $CE_{10}$  et de  $CE_{50}$  :  $12 \pm 0,81$  et  $17 \pm 0,68 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivement (Figure 60).

#### 4.3.2.6. Récapitulatif de la toxicité obtenue

Afin de pouvoir comparer la toxicité des substances testées, des valeurs de LOEC (*i.e. lowest observed effect concentration*, la concentration la plus faible testée pour laquelle un effet significatif a pu être observé) ont été calculées pour toutes les substances testées, hormis celles pour lesquelles aucune toxicité n'a été observée ou ayant induit une réponse incohérente (*i.e. ne suivant pas une relation concentration-réponse*). Ces valeurs, ainsi que les valeurs de  $CE_{10}$  et  $CE_{50}$  pour les substances permettant leur calcul, sont récapitulées dans le Tableau 14.

Tableau 14 : LOEC,  $CE_{10}$  et  $CE_{50}$  (en  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) mesurées pour les substances testées lors du criblage de toxicité réalisé sur les larves de l'huître *C. gigas*. Les valeurs de  $CE_{10}$  et  $CE_{50}$  sont données avec leur intervalle de confiance à 95% ; n.d. : valeur non déterminée ; - : pas de toxicité dans la gamme testée.

Classe	Substance	Famille chimique	LOEC	$CE_{10}$	$CE_{50}$
<b>Herbicides</b>	sulfate de cuivre <sup>1</sup>	métal	10,0	$4,81 \pm 2,79$	$9,70 \pm 2,16$
	diuron <sup>2</sup>	phénylurée	0,11	$0,0026 \pm 0,0072$	$5,90 \pm 5,80$
	isoproturon <sup>2</sup>	phénylurée	0,11	n.d.	n.d.
	diquat dibromide	bipyridine	-	-	-
	flazasulfuron	sulfonilurée	n.d.	n.d.	n.d.
	métazachlore	chloroacétanilide	0,077	$12,0 \pm 12,0$	$57,0 \pm 21,0$
	S-métolachlore	chloroacétanilide	n.d.	n.d.	n.d.
	glyphosate AMPA	glycine (métabolite)	- -	- -	- -
<b>Insecticides</b>	fipronil <sup>3</sup>	phénylpyrazole	n.d.	n.d.	n.d.
	$\alpha$ -cyperméthrine	pyréthrianoïde	-	-	-
	acrinathrine	pyréthrianoïde	0,015	$0,0087 \pm 0,0051$	$0,033 \pm 0,015$
	chlorpyrifos	organophosphoré	66,5	n.d.	n.d.
	chlorpyrifos-méthyl imidaclopride	organophosphoré néonicotinoïde	n.d. 0,084	n.d. n.d.	n.d. n.d.
<b>Fongicides</b>	azoxystrobine	strobilurine	0,074	$0,00022 \pm 0,00073$	$0,11 \pm 0,15$
	krésoxim-méthyl	strobilurine	4,71	$12,0 \pm 0,81$	$17,0 \pm 0,68$
	quinoxifène	quinoléine	n.d.	n.d.	n.d.
	spiroxamine	morpholine	0,060	$0,00039 \pm 0,00071$	$0,14 \pm 0,10$

(<sup>1</sup>) utilisé comme témoin positif de toxicité ; (<sup>2</sup>) considérés comme des herbicides dans ce tableau, du fait de leur mode d'action ; (<sup>3</sup>) considéré comme un insecticide dans ce tableau, du fait de son mode d'action.

Ce tableau permet d'observer qu'en plus des  $CE_{10}$  et  $CE_{50}$  relativement basses obtenues pour le diuron, l'acrinathrine, l'azoxystrobine et la spiroxamine, d'autres substances ont induit une diminution significative du %<sub>NORM</sub> à des concentrations relativement faibles : l'isoproturon ( $0,11 \mu\text{g L}^{-1}$ ), le métazachlore ( $0,077 \mu\text{g L}^{-1}$ ) et l'imidaclopride ( $0,084 \mu\text{g L}^{-1}$ ).

### 4.3.3. Test des comètes

Afin d'évaluer les effets génotoxiques des quatre substances les plus toxiques (sur la base des valeurs de  $CE_{50}$  déterminées) à l'issue du criblage de toxicité, le diuron, l'acrinathrine, l'azoxystrobine et la spiroxamine, un test des comètes a été réalisé (Figure 61).

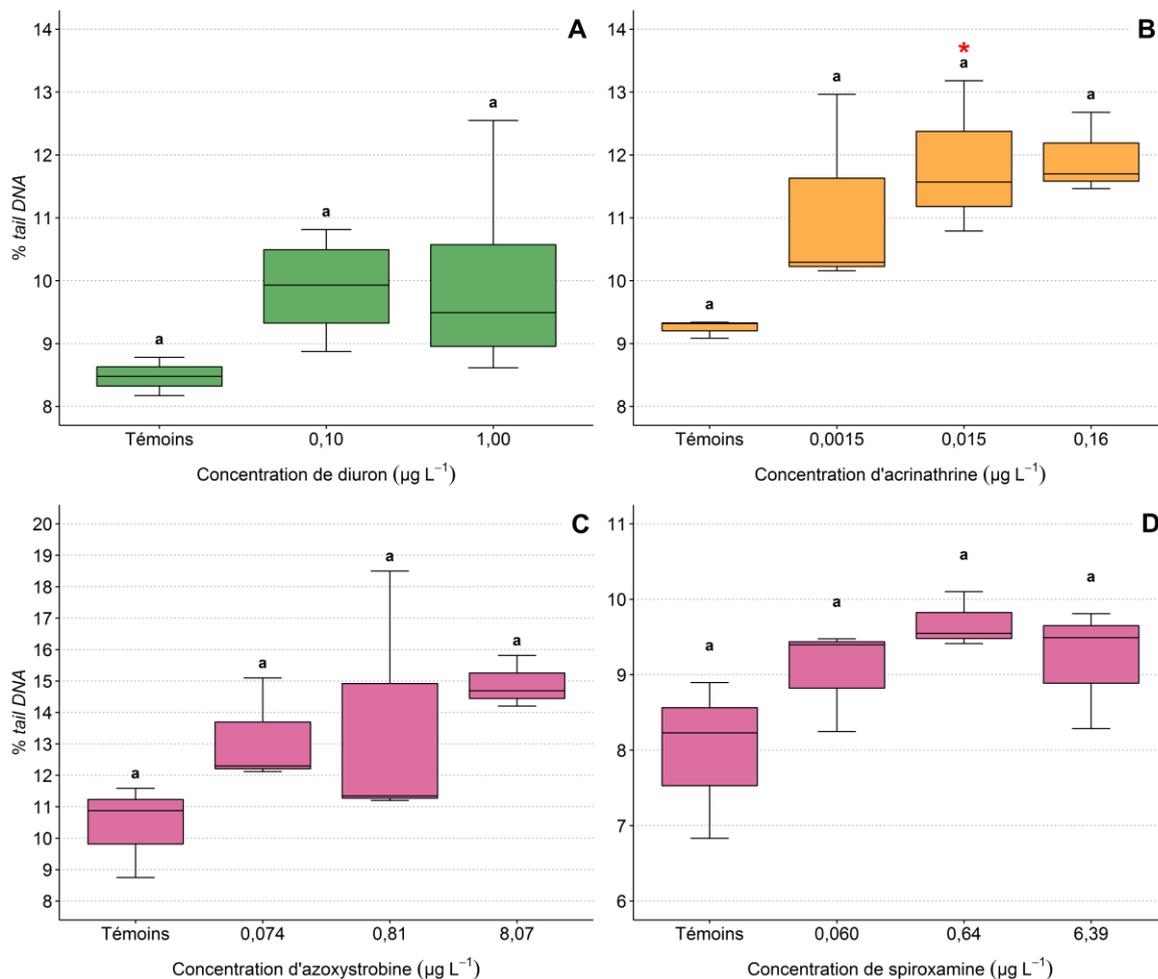


Figure 61 : Boîtes à moustaches représentant le pourcentage d'ADN dans la queue de la comète (*% tail DNA*) des larves d'huître après 6 h de développement en fonction de la concentration de la substance testée (en  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), après exposition au diuron (A) à l'acrinathrine (B), à l'azoxystrobine (C) et à la spiroxamine (D). Les lettres représentent les différences significatives entre les traitements (test de Tukey), l'étoile rouge représente un effet significatif par rapport aux témoins ( $p < 0,05$  ; test de Newman-Keuls).

Aucun effet significatif sur le % d'ADN dans la queue de la comète (*% tail DNA*) n'a pu être mis en évidence pour les larves d'huître exposées aux concentrations choisies pour les trois pesticides (Figure 61), hormis en utilisant le test *a posteriori* de Newman-Keuls : celui-ci a en effet permis de mettre en évidence un seul effet significatif sur le % *tail DNA* pour les larves d'huître exposées à  $0,015 \mu\text{g L}^{-1}$  d'acrinathrine (Figure 60B).

#### 4.4. Discussion

Ces expérimentations n'ont permis d'estimer la toxicité que d'une partie des substances testées. En effet, parmi ces 18 substances :

- le diquat, le glyphosate, l'AMPA et l' $\alpha$ -cyperméthrine n'ont induit aucune toxicité. L'isoproturon, le chlorpyrifos et l'imidaclopride ont induit une toxicité significative mais insuffisante pour permettre le calcul de valeurs de  $CE_x$  ;
- le diuron, le métazachlore, l'acrinathrine, l'azoxystrobine, le krésoxim-méthyl et la spiroxamine, ont induit une toxicité suffisante pour permettre le calcul de valeurs de  $CE_x$  ;
- le flazasulfuron, le S-métolachlore, le fipronil, le chlorpyrifos-méthyl et le quinoxifène ont induit une toxicité ne suivant pas une relation concentration-réponse.

En conséquence, la toxicité n'a pu être correctement estimée que pour deux tiers des substances testées (12/18). Concernant le tiers restant, la réponse observée ne permet pas d'estimer correctement leur toxicité. En effet, la réponse obtenue ne suit pas une relation concentration-réponse : pour chacune de ces substances, une toxicité très forte a pu être observée dès la première concentration testée, puis le %<sub>NORM</sub> remontait ensuite, pour parfois redescendre puis remonter de manière erratique (par exemple, Figures 55D, 57A et 57E). Étant donné que le schéma de réponse obtenu pour ces substances est relativement similaire, il se pourrait qu'un biais, partagé par toutes les expérimentations présentant des résultats incohérents, ait perturbé le bon déroulement du test embryon-larvaire. Cependant, toutes les expérimentations ayant été réalisées simultanément et strictement selon le même protocole, la nature exacte de ce biais est pour le moment inconnue.

De manière générale et comme souligné dans l'article précédent, les concentrations des solutions mères pour les substances les plus hydrophobes ( $\log K_{ow} \geq 3,5-4$ ) étaient relativement éloignées des concentrations théoriques. En conséquence, il a été observé *a posteriori* que les concentrations nominales d'exposition corrigées avec les concentrations mesurées des solutions mères étaient bien plus faibles que les concentrations visées : c'est notamment flagrant pour l'acrinathrine et l' $\alpha$ -cyperméthrine. De plus, dans ces expérimentations, les concentrations d'exposition n'ont pas été mesurées dans les puits des microplaques. Si l'on se fie aux résultats obtenus dans l'article 3, on peut supposer que les concentrations réelles d'expositions étaient encore inférieures aux concentrations nominales corrigées utilisées pour traiter les résultats de ces expérimentations, notamment pour les substances les plus hydrophobes.

Pour douze substances, cette expérimentation de criblage a tout de même permis de valider l'application du test embryon-larvaire dans les microplaques 24-puits. Les résultats du criblage de toxicité ont permis d'identifier plusieurs pesticides très toxiques pour le développement embryon-larvaire de l'huître creuse : pour l'acrinathrine, l'azoxystrobine et la spiroxamine, des  $CE_{50}$  inférieures

à  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  ont pu être calculées (Figure 60, Tableau 14). Pour ces substances, ainsi que pour le diuron, des  $\text{CE}_{10}$  de l'ordre du  $\text{ng L}^{-1}$  ont également pu être estimées, indiquant une toxicité significative à des concentrations très basses (Tableau 14). Il faut cependant garder à l'esprit que l'intervalle de confiance des valeurs mesurées était parfois relativement élevé en comparaison de la valeur déterminée, de fait, la précision des valeurs obtenues pourrait être améliorée. La génotoxicité de ces substances a également été évaluée via le test des comètes (Figure 61), cependant, aucun effet significatif, hormis pour  $0,015 \mu\text{g L}^{-1}$  d'acrinathrine, n'a pu être mis en évidence pour les concentrations testées. Il est important de préciser que, le test des comètes nécessitant une grande quantité de matériel biologique, les larves utilisées pour ce test ont été exposées en grand volume (0,50 L) et dans des pots en verre, ce qui change radicalement des conditions d'exposition en microplaques. De plus, le test des comètes a été réalisé après seulement 6 h de développement larvaire, contre 24 h pour le test embryo-larvaire réalisé en microplaques.

L'imprécision relativement élevée des valeurs de  $\text{CE}_{10}$  et de  $\text{CE}_{50}$  calculées (Tableau 14) peut s'expliquer par le fait que les réponses induites par la gamme de concentrations testées ne couvrent pas la totalité de la gamme de réponses possibles : par exemple, pour l'azoxystrobine et la spiroxamine (Figure 60), la plus faible concentration testée induit déjà une forte baisse du  $\%_{\text{NORM}}$  qui se retrouve aux alentours de 50%. Or, le modèle log-logistique utilisé pour calculer les concentrations effectives induisant  $x\%$  d'effet ( $\text{CE}_x$ ) nécessite idéalement l'obtention d'une gamme complète de réponses afin de pouvoir estimer ces valeurs avec une précision suffisante : absence d'effet, effet faible, effet moyen, effet fort et inhibition totale. C'est par exemple le cas pour le krésoxim-méthyl, où une gamme de complète de réponses (hormis un effet moyen qui n'entrave cependant pas le calcul) a pu être obtenue, permettant une estimation très précise des valeurs de  $\text{CE}_x$ . Comme mentionné précédemment, quatre expérimentations de criblage ont été réalisées : d'une part afin d'obtenir une réponse exploitable pour les substances ayant induit une réponse incohérente ; d'autre part afin d'affiner les valeurs de  $\text{CE}_{10}$  et/ou de  $\text{CE}_{50}$  calculées en adaptant la gamme de concentrations. Cependant, aucune de ces expérimentations n'a pu donner de résultats exploitables car les conditions de validation du test n'ont pas été remplies.

Si l'on compare les valeurs de LOEC,  $\text{CE}_{10}$  ou  $\text{CE}_{50}$  déterminées grâce au criblage de toxicité réalisées aux concentrations environnementales de ces substances, certaines pourraient présenter un risque non négligeable pour le développement embryo-larvaire des huîtres en milieu côtier. En effet, du diuron et de l'isoproturon ont été mesurés à des concentrations de  $0,13$  et  $0,042 \mu\text{g L}^{-1}$  en baie de Veys (Normandie ; Buisson *et al.*, 2008), alors que des concentration de  $0,27$  et  $0,19 \mu\text{g L}^{-1}$  ont été mesurées en baie de Vilaine (Bretagne ; Caquet *et al.*, 2013). Des concentrations de diuron atteignant les  $2,60 \mu\text{g L}^{-1}$  (Cozic et Durand, 2013) ont également été mesurées dans certaines aires de carénages

françaises. Ces concentrations étant supérieures aux LOEC déterminées dans cette étude, on peut supposer que ces substances pourraient présenter un risque pour les larves d'huître. Néanmoins, ces deux substances sont aujourd'hui interdites, aussi bien en agriculture qu'en tant que biocides pour les peintures anti-salissures, en France et dans une majorité de pays européens. En conséquence, les niveaux de contamination des eaux côtières ont tendance à diminuer (Booij *et al.*, 2015b). Le métazachlore semble en revanche être beaucoup moins fréquemment retrouvé en milieu marin, notamment en comparaison d'une autre molécule de la même famille, le S-métolachlore, comme le démontrent deux études où il a été recherché mais pas détecté (Munaron *et al.*, 2012 ; Booij *et al.*, 2013). L'imidaclopride, dont la LOEC est également relativement basse, a été détecté dans les eaux de surface de la rivière Pínios (Grèce) à une concentration maximale de  $0,31 \mu\text{g L}^{-1}$ , bien qu'aucune étude n'ait observé sa présence dans les eaux côtières européennes. Sa présence à des concentrations maximales de  $9,00$  et  $4,38 \mu\text{g L}^{-1}$  a toutefois été détectée dans un bassin d'eau pluviale à proximité des eaux côtières au niveau de la péninsule de Charleston (États-Unis ; Delorenzo *et al.*, 2012).

Enfin, parmi les trois substances les plus toxiques, seule l'azoxystrobine a pu être détectée dans les eaux côtières : dans l'étude de Cruzeiro *et al.* (2015), ce fongicide a été détecté à des concentrations moyennes de  $0,022$ ,  $2,15$ ,  $0,35$  et  $0,086 \mu\text{g L}^{-1}$  en hiver, au printemps, en été et en automne, dans les eaux côtières du lagon Ria Formosa au Portugal. Les concentrations détectées en hiver et au printemps sont plus de dix fois supérieures à la  $CE_{10}$  calculée dans cette étude, alors que les concentrations mesurées au printemps et en été sont presque vingt fois et trois fois supérieures à la  $CE_{50}$  calculée pour cette substance, respectivement. En conséquence, cette substance pourrait s'avérer très toxique pour les larves d'huître exposées dans leur milieu naturel.

## 4.5. Conclusion

Le criblage de toxicité des 18 substances sélectionnées a permis l'identification de quatre pesticides potentiellement dangereux pour le développement embryon-larvaire de l'huître creuse *C. gigas*. Ces pesticides sont le diuron, l'acrinathrine, l'azoxystrobine et la spiromaxime : les  $CE_{10}$  pour ces substances étaient inférieures à la centaine de  $\text{ng L}^{-1}$ , et leurs  $CE_{50}$ , hormis celle du diuron étaient inférieures à  $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ . L'isoproturon, le métazachlore et l'imidaclopride avaient des LOEC inférieures ou égales à  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ , démontrant leur toxicité potentielle à de faibles concentrations, cependant, la réponse obtenue n'a pas permis de calculer des valeurs de  $CE_{10}/CE_{50}$ . D'autres substances, comme le diquat, le glyphosate et son métabolite l'AMPA, ainsi que l' $\alpha$ -cyperméthrine, n'ont en revanche induit aucune toxicité dans la gamme de concentrations testées. Enfin, pour les pesticides restants, la réponse obtenue n'a pas permis d'évaluer leur toxicité, celle-ci étant erratique et ne suivant pas une relation concentration-réponse.

Cette étude met en évidence la validité du test en microplaques pour l'étude de contaminants sur le développement embryon-larvaire de l'huître creuse. Cependant, pour certaines substances, la précision de calcul des valeurs de  $CE_{10}/CE_{50}$  reste à améliorer. Ces pesticides ayant démontré une toxicité significative à des concentrations parfois mesurées dans les eaux côtières, il serait intéressant de réaliser une étude approfondie de leur toxicité et génotoxicité pour les larves de *C. gigas*.

## 5. Conclusion générale

Le premier objectif de ce chapitre visait à réaliser le criblage de toxicité de 18 substances, dont quatorze produits phytosanitaires utilisés en viticulture, trois biocides et un métabolite, sur la croissance des microalgues marines *T. lutea* et *S. marinoi* et la larve de l'huître creuse *C. gigas*.

Le test en microplaques développé dans le but de réaliser ces expérimentations a permis d'obtenir des résultats satisfaisants avec la majorité des pesticides testés, cependant certains biais ont également été identifiés. En effet, le criblage a pour but la détermination de valeurs de toxicité ( $CE_{10}$  et  $CE_{50}$  par exemple) pour chaque substance de manière à permettre l'identification des substances les plus toxiques. Afin d'assurer la fiabilité des résultats produits, il est donc primordial de s'assurer que les concentrations utilisées pour le calcul de ces valeurs soient réellement celles auxquelles les organismes ont été exposés.

Les analyses chimiques réalisées ont permis d'identifier plusieurs biais pouvant amener à une détermination erronée de ces valeurs. Ces biais étaient notamment présents pour les substances les plus hydrophobes, et donc peu solubles dans l'eau, et concernent aussi bien les tests réalisés avec les microalgues que ceux réalisés avec les larves d'huître :

- i. même dissoutes dans un solvant organique assurant théoriquement une bonne solubilisation, les concentrations réelles des solutions mères de ces substances, mesurées par chimie analytique, étaient bien inférieures aux concentrations nominales calculées par gravimétrie ;
- ii. de plus, une fois diluées dans le milieu de culture, majoritairement composé d'eau de mer, la mauvaise solubilisation des substances hydrophobes impliquait des concentrations d'exposition bien inférieures aux concentrations d'exposition visées ;
- iii. enfin, le matériel plastique, ainsi que le rapport surface/volume important des puits des microplaques tendent à favoriser l'adsorption des substances les plus hydrophobes aux parois des puits, réduisant encore davantage la concentration réelle d'exposition.

D'autre part, un second biais, spécifique cette fois aux microalgues, a pu être identifié. En effet, avec le test en microplaques, la croissance est évaluée en mesurant la fluorescence de la chlorophylle. Or, le contenu et/ou la fluorescence de la chlorophylle peuvent être significativement impactés par l'action de certains polluants. En conséquence, la mesure de la croissance et donc de la toxicité peut également être biaisée par la méthode utilisée.

Pour conclure, le test en microplaques appliqué dans ces deux études présente néanmoins un nombre significatif d'avantages par rapport aux tests écotoxicologiques plus « classiques ». Il permet notamment de tester un grand nombre de conditions simultanément, tout en minimisant l'espace attribué à l'expérimentation et en réduisant considérablement le temps alloué à sa préparation. Par son application, nous avons pu évaluer correctement la toxicité de la majorité des substances testées,

en calculant des valeurs de  $CE_{50}$  et/ou de LOEC. Notons également que ce test a permis la mise en œuvre des expérimentations de mélanges, nécessitant de tester simultanément un grand nombre de conditions. Il convient cependant, comme souligné au début de cette section, d'évaluer correctement les potentiels biais liés à l'utilisation de ce test en fonction des substances sélectionnées, afin d'éviter toute mauvaise interprétation des résultats obtenus. En effet, l'application de ce test n'était pas satisfaisante pour les substances les plus hydrophobes et/ou dont la stabilité dans les microplaques n'était pas assurée pendant la durée des expérimentations. Certaines techniques, comme le dosage passif, pourraient permettre de tester les substances les plus hydrophobes avec une précision supérieure, cependant, la mise en œuvre de telles méthodes pourrait se révéler difficile à miniaturiser.

Les résultats du criblage de toxicité ont permis d'identifier les pesticides les plus toxiques pour les deux espèces de microalgues et les larves d'huître. Bien entendu, selon l'organisme considéré, ce ne sont pas les mêmes pesticides qui sont les plus toxiques, bien qu'une partie de ces substances ait induit une toxicité significative pour les deux modèles biologiques. C'est notamment le cas des fongicides : l'azoxystrobine, le krésoxim-méthyl et la spiroxamine ont tous les trois induit une toxicité significative pour les microalgues et les larves d'huître. Alors que les deux premières étaient bien plus toxiques pour les larves d'huître, la spiroxamine a quant à elle causé une forte toxicité aussi bien chez les microalgues que chez les larves d'huître. De même, le diuron et l'isoproturon, dont le mode d'action toxique cible pourtant des structures biologiques retrouvées spécifiquement chez les végétaux, ont induit une toxicité significative chez les microalgues et les larves d'huître, et ce à des concentrations relativement basses. Concernant les insecticides, les résultats obtenus ont confirmé leur toxicité supérieure pour les larves d'huître par rapport aux microalgues. En effet, l'acrinathrine et, dans une moindre mesure, l'imidaclopride, étaient responsables d'une diminution significative du pourcentage de normalité chez les larves d'huître exposées à des concentrations inférieures à  $0,10 \mu\text{g L}^{-1}$ . Enfin, pour d'autres substances, comme le diquat, le glyphosate et son métabolite l'AMPA, l' $\alpha$ -cyperméthrine ou le chlorpyrifos, aucun effet significatif sur les paramètres suivis n'a pu être observé chez les deux espèces de microalgues et la larve d'huître dans la gamme de concentrations testées.

Pour conclure sur la toxicité des 17 pesticides sélectionnés pour les deux microalgues marines et la larve d'huître, il convient de mettre en perspective les résultats obtenus avec les usages actuels de ces substances. D'une part, la toxicité significative du diuron et de l'isoproturon a pu être démontrée aussi bien chez les microalgues que chez les larves d'huître. Cependant, du fait de leur importante toxicité pour les organismes aquatiques, démontrée dans de nombreuses études, ces deux substances sont aujourd'hui réservées à des usages très spécifiques. On peut donc supposer que les concentrations environnementales de ces substances devraient diminuer encore davantage dans les années à venir, du moins en Europe. D'autre part, la spiroxamine a également causé une forte toxicité

aussi bien pour les microalgues que pour les larves d'huître. Cependant, contrairement au diuron et à l'isoproturon, sa toxicité pour les organismes aquatiques ainsi que sa présence dans les masses d'eau dulçaquicoles et marines n'a été que très peu étudiée. Par conséquent, il apparaît aujourd'hui nécessaire de poursuivre l'effort initié par le criblage de toxicité réalisé dans cette thèse, afin de poursuivre l'identification de substances potentiellement toxiques et peu connues.

Pour compléter les résultats présentés dans l'article 3, la toxicité de mélanges binaires constitués des substances déterminées comme les plus toxiques à l'issue du criblage de toxicité a été évaluée sur les deux espèces de microalgues étudiées. Parmi les huit mélanges binaires évalués dans l'article 4, une majorité de combinaisons ont induit une interaction antagoniste et peu de mélanges se conformaient aux prédictions du modèle CA. Quelques cas de synergie ont pu être identifiés, le plus intense ayant été observé pour le mélange entre l'isoproturon et le métazachlore, testé sur la diatomée *S. marinoi*. Comme souligné dans l'article, il convient cependant de différencier les interactions statistiquement différentes des prédictions issues des modèles CA ou IA de celles réellement responsables d'une réponse différente au niveau biologique : dans cette étude, seuls les mélanges antagonistes entre l'isoproturon et la spiroxamine ou l'azoxystrobine testés sur *S. marinoi* ont induit une toxicité expérimentale deux fois inférieure à celle prédite, qui est donc considérée comme significativement antagoniste au niveau biologique.

Les tests réalisés en ballons de culture avaient pour but d'explorer les effets de trois mélanges, ainsi que des substances seules les constituant, sur quatre paramètres liés à la physiologie des deux espèces de microalgues. Les résultats obtenus ont permis d'affiner la compréhension du mode d'action toxique des substances testées, mais également d'explorer les conséquences sur la physiologie des cellules exposées et de proposer une explication aux effets d'interaction résultant des combinaisons testées. Le diuron, l'isoproturon, ainsi que leur action combinée, ont induit strictement les mêmes effets sur les fonctions physiologiques suivies. Comme attendu, ces deux substances partagent le même mode d'action et ne diffèrent que par leur potentiel toxique. La spiroxamine a induit des effets significatifs sur quasiment tous les paramètres physiologiques suivis, hormis l'efficacité photosynthétique. La toxicité de cette substance pourrait s'expliquer par une action au niveau des membranes cellulaires par inhibition de la synthèse des stérols qui en sont des constituants majeurs, comme le montre la dépolarisation de la membrane cytoplasmique observée chez les cellules exposées. D'un autre côté, cette substance semble également avoir causé un stress général chez les cellules exposées, induisant notamment une production importante d'ERO et de lipides en réponse au stress induit. Les effets de la spiroxamine et de l'isoproturon semblent indiquer des cibles moléculaires différentes : les effets observés sont opposés. De fait, la combinaison de ces substances ne peut suivre le principe d'additivité des concentrations, ce qui explique en partie l'antagonisme

observé. Comme pour la spiroxamine, la toxicité du métazachlore pourrait également impliquer une action au niveau des membranes cellulaires due à une réduction de la quantité de VLCFA, également importants dans la constitution des membranes cellulaires. En revanche, la synergie résultant des effets combinés du métazachlore et de l'isoproturon pourrait davantage s'expliquer par une action complémentaire de ces substances sur les structures impliquées dans la photosynthèse.

La synergie mise en évidence dans cet article pourrait s'avérer potentiellement dangereuse pour les microalgues exposées à ces contaminants, d'autant plus que les familles chimiques auxquelles ils appartiennent sont parmi les plus fréquemment retrouvées dans les masses d'eau continentales et côtières.

## Chapitre 5 – Utilisation d'extraits d'échantillonneurs passifs de type POCIS pour l'étude de la toxicité de mélanges environnementaux de pesticides sur deux microalgues marines

---



## 1. Avant-propos

Le chapitre 5 de ce manuscrit visait à répondre au dernier objectif identifié pour ces travaux de thèse : l’étude du potentiel toxique d’extraits d’échantillonneurs passifs de type POCIS provenant d’un site d’étude expérimental soumis à une pollution d’origine majoritairement viticole, vis-à-vis de deux microalgues marines.

Il présente donc les travaux réalisés au niveau du site d’étude du projet PhytoCOTE : le bassin versant de Marcillac.

Dans ce chapitre, les données concernant la toxicité des pesticides sélectionnés pour cette thèse (chapitre 4, articles 3 et 4) ont été utilisées pour permettre l’interprétation de la toxicité induite par les différents extraits de POCIS testés.

En complément, des données obtenues par d’autres partenaires du projet ont également été utilisées, notamment celles de :

- Naouel Aouadi (post-doc GT1, Irstea, Bordeaux), concernant le calendrier des traitements phytosanitaires réalisés sur le site d’étude durant l’année du suivi POCIS (2017) ;
- Juliette Gaillard (post-doc GT2, LPTC-EPOC, Université de Bordeaux), concernant le suivi de la contamination chimique des cours d’eau du site d’étude durant l’année 2017 ;
- Betty Chaumet (thèse GT2, Irstea, Bordeaux), concernant les mesures de pesticides dans le biofilm pour l’année 2017.

## 2. Utilisation d’extraits d’échantillonneurs passifs de type POCIS pour l’étude de la toxicité de mélanges environnementaux de pesticides sur deux microalgues marines

### 2.1. Introduction

La viticulture exerce une forte pression phytosanitaire sur l’environnement, puisqu’elle totalise 15% des usages de pesticides tout en occupant seulement 3% de la surface agricole utile (Butault *et al.*, 2011). Une part non-négligeable des produits phytosanitaires appliqués sur les vignes est perdue pendant (Gil et Sinfort, 2005) et après la pulvérisation, par les processus de lessivage foliaire et de ruissellement, notamment en cas de fortes précipitations (Leu *et al.*, 2004 ; Brady *et al.*, 2006). Toutes les substances ainsi perdues peuvent par la suite contaminer les cours d’eau situés à proximité et en aval des zones de traitement (Loos *et al.*, 2009 ; Moschet *et al.*, 2014) et ainsi atteindre les eaux côtières (Caquet *et al.*, 2013 ; Cruzeiro *et al.*, 2015). Dans les écosystèmes aquatiques traversés par ces mélanges de pesticides vivent une multitude d’organismes aquatiques, dont les microalgues qui constituent la base de ces réseaux trophiques (Hlaili *et al.*, 2014). De tels mélanges de contaminants peuvent être responsables d’effets toxiques significatifs pour les microalgues qui y sont exposées (Pesce *et al.*, 2010 ; Kim Tiam *et al.*, 2014a), entravant leur croissance et réduisant en conséquence la production primaire des écosystèmes contaminés.

Depuis les années 2000, de plus en plus de publications scientifiques ont mis en évidence et alerté la communauté scientifique sur le potentiel risque de synergie pouvant résulter des mélanges de contaminants (Kepner, 2004) : la toxicité engendrée par une contamination ne peut être correctement évaluée en mesurant uniquement la toxicité des substances seules. Depuis quelques années, une nouvelle approche associant l’utilisation d’échantillonneurs passifs, traditionnellement utilisés pour le suivi de la contamination chimique, avec plusieurs tests de toxicité standards a vu le jour (Escher *et al.*, 2008a ; Vermeirssen *et al.*, 2010). L’avantage mis en évidence par cette approche est d’évaluer directement la toxicité d’un extrait d’échantillonneur passif, qui représente une image relativement fidèle de la contamination réelle du cours d’eau suivi et intègre les potentielles interactions pouvant exister entre les substances. D’un autre côté, il est alors plus compliqué d’identifier la ou les substance(s) responsable(s) de la toxicité de l’extrait.

Dans cette étude, le potentiel toxique d’extraits d’échantillonneurs passifs de type POCIS a été évalué sur la croissance des microalgues marines *Tisochrysis lutea* et *Skeletonema marinoi*, via un test de toxicité standard basé sur l’inhibition de croissance à 96 h réalisé en microplaques. Les extraits étaient issus de trois stations, réparties selon un gradient de contamination, qui ont été suivies durant quatre périodes d’un mois.

## 2.2. Matériels et méthodes

Pour rappel, l’ensemble des matériels et méthodes utilisés dans ce chapitre est décrit dans le chapitre 2 :

- les aspects relatifs aux microalgues sont décrits dans la section 2 ;
- tout ce qui est en rapport avec le site d’étude est décrit dans la section 3 ;
- les analyses chimiques sont décrites dans la section 4 ;
- les analyses statistiques sont décrites dans la section 6.

## 2.3. Résultats

### 2.3.1. Enquêtes et calendrier de traitement 2017

Dans le cadre du projet PhytoCOTE, des entretiens (enquêtes) ont été organisés avec les viticulteurs, sur la base de leur bonne volonté, afin de recueillir des informations sur le mode de conduite de leurs parcelles, les produits phytosanitaires utilisés et leur calendrier de traitement. Les informations récoltées pour l’année 2017 permettent ainsi d’identifier les périodes présentant une pression phytosanitaire élevée, mais également d’identifier les produits phytosanitaires les plus utilisés. La Figure 62 illustre les différents traitements réalisés sur l’année 2017 pour notre période de suivi, de janvier à juin.

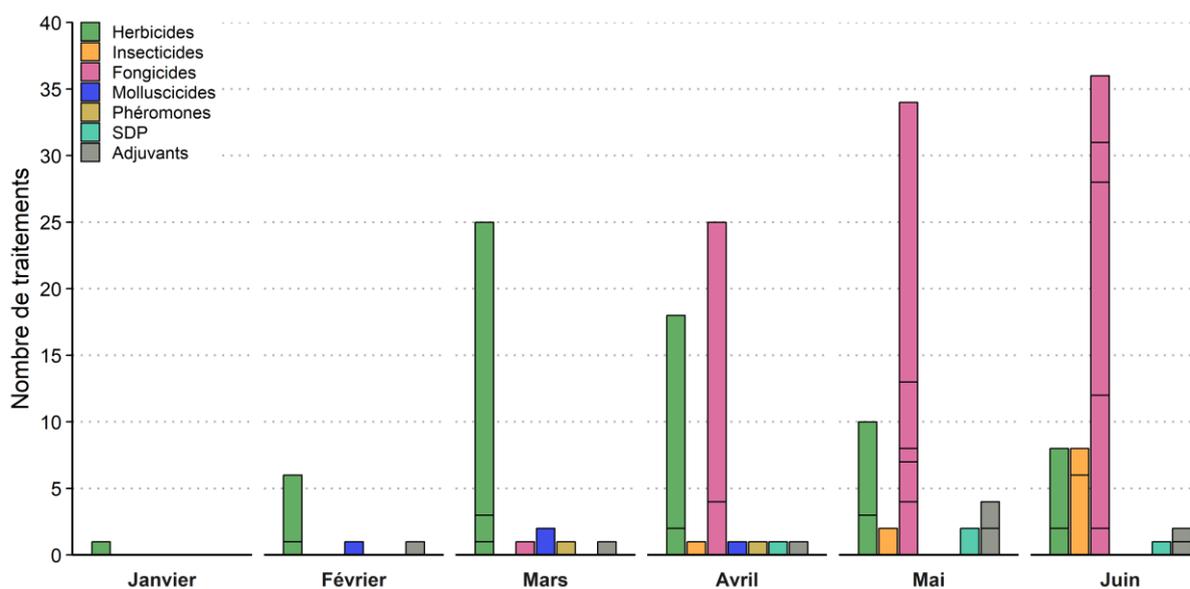


Figure 62 : Nombre de traitements phytosanitaires par mois, classés par usage, recensés sur le site d’étude de janvier à juin 2017. Les barres cumulées par couleur représentent différentes substances. SDP : stimulateurs de défense des plantes. Données : Irstea-Bordeaux, N. Aouadi.

Très peu de traitements sont réalisés en janvier et février, période choisie comme la période témoin (*i.e.* sans traitements) pour notre suivi POCIS. À partir du mois de mars, une augmentation

significative du nombre de traitements à base d'herbicides est observée, qui diminue par la suite au profit des traitements à base de fongicides à partir du mois d'avril. Seuls quelques traitements insecticides sont réalisés à partir du mois d'avril. Les trois périodes suivies, mars-avril, avril-mai et mai-juin, constituent bien les périodes présentant la pression phytosanitaire la plus forte : la première période présente une pression davantage issue des herbicides, avec une quarantaine de traitements pour les mois de mars et d'avril, contre 25 traitements fongicides ; les deux dernières périodes totalisent seulement un peu plus d'une trentaine de traitements herbicides, contre près d'une centaine de traitements fongicides.

Les produits phytosanitaires les plus utilisés, classés par usage (herbicides, insecticides et fongicides) sont illustrés par la Figure 63. Environ deux tiers des produits phytosanitaires recensés sont des fongicides, ce qui corrobore également ce qui a pu être observé au niveau du nombre de traitements par usage (Figure 62). Concernant les herbicides, plus de la moitié (54%) des traitements correspondent au glyphosate, 8% au flazasulfuron et 6% au cycloxydime. Pour les insecticides, une bonne moitié des traitements réalisés est répartie entre 5 substances : alphaméthrine ( $\alpha$ -cyperméthrine, 16%),  $\lambda$ -cyalothrine (13%),  $\tau$ -fluvaline (10%), cyperméthrine (mélange d'isomères, 10%) et thiaméthoxam (9%), soit quatre pyréthrinoïdes et un néonicotinoïde. Enfin, les fongicides les plus utilisés étaient le soufre (11%), le folpel (9%), le fosétyl-Al (9%), le cuivre (9%), le mancozèbe (8%), le métirame (5%) et la spiroxamine (4%).

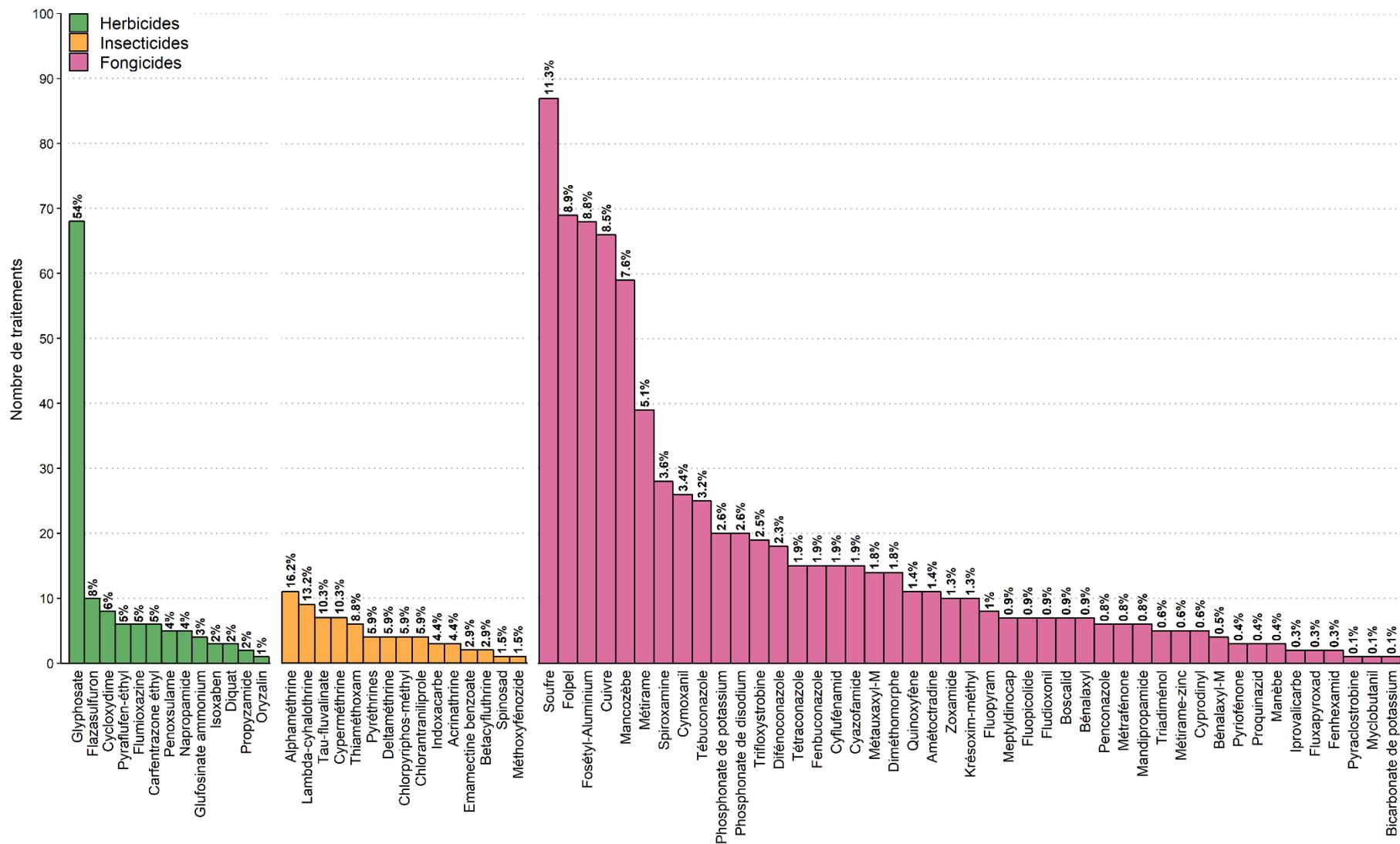


Figure 63 : Nombre de traitements par produit phytosanitaire, classés par usages. La fréquence, pour chaque substance par rapport aux autres substances du même usage, est affichée au sommet de chaque barre. Données : Irstea-Bordeaux, N. Aouadi.

### 2.3.2. Potentiel toxique des extraits de POCIS

Pour chaque période suivie<sup>6</sup>, des extraits de POCIS témoins ont été testés afin de valider : d’une part la non-toxicité de la phase Oasis HLB utilisée dans les POCIS (témoins négatifs phase, T-NEG) et des solvants utilisés pour l’extraction (méthanol et dichlorométhane, témoins négatifs solvant, T-NEG-SOLV) ; d’autre part, afin de vérifier que l’on obtient bien la toxicité attendue avec un contaminant de référence, le diuron, en utilisant la procédure d’extraction avec phase (témoin positif phase, T-POS) et sans phase (témoin positif solvant, T-POS-SOLV).

Concernant les témoins négatifs phase (T-NEG) et solvant (T-NEG-SOLV), aucune différence significative de croissance n’a été mise en évidence par rapport aux témoins solvant (0,5% de méthanol) pour les deux espèces de microalgues testées.

Pour les témoins positifs phase (T-POS) et solvant (T-POS-SOLV), la toxicité attendue a bien été obtenue pour les deux espèces de microalgues (Figure 64).

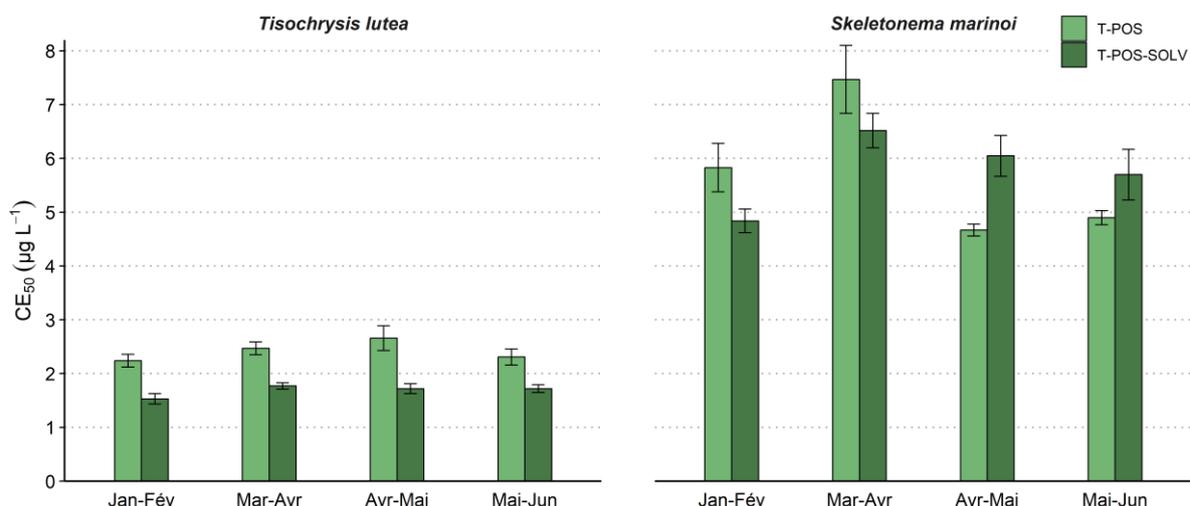


Figure 64 : Valeurs de CE<sub>50</sub> (µg L<sup>-1</sup>, ± IC<sub>95%</sub>) déterminées pour les témoins positifs phase (T-POS, en vert clair) et solvant (T-POS-SOLV, en vert foncé), pour chaque période de suivi, sur *T. lutea* (à gauche) et *S. marinoi* (à droite).

Comme on peut le voir sur la figure ci-dessus, pour une même condition T-POS ou T-POS-SOLV, les CE<sub>50</sub> obtenues étaient très similaires sur les quatre périodes de suivi pour *T. lutea*, avec des valeurs de CE<sub>50</sub> oscillant entre  $2,24 \pm 0,12$  et  $2,66 \pm 0,23$  µg L<sup>-1</sup> pour les T-POS et entre  $1,53 \pm 0,10$  et  $1,77 \pm 0,06$  pour les T-POS-SOLV. En revanche, on peut observer des différences significatives entre les témoins positifs avec et sans phase, les T-POS-SOLV étant sensiblement plus toxiques par rapport aux T-POS. Pour *S. marinoi*, des différences plus importantes ont pu être mises en évidence entre les périodes et les extraits T-POS et T-POS-SOLV : des CE<sub>50</sub> comprises entre  $4,67 \pm 0,11$  et  $7,47 \pm$

<sup>6</sup> Trois lots de témoins positifs et négatifs ont été produits : des lots spécifiques ont été utilisés pour les périodes janvier-février et mars-avril ; le même lot a été utilisé pour les périodes avril-mai et mai-juin, l’extraction de ces POCIS ayant été réalisée de manière simultanée.

0,63  $\mu\text{g L}^{-1}$  pour T-POS, et entre  $4,84 \pm 0,22$  et  $6,52 \pm 0,32 \mu\text{g L}^{-1}$  pour T-POS-SOLV, ont été déterminées. Contrairement à ce que nous avons pu observer avec *T. lutea*, ce n’était pas toujours les extraits T-POS-SOLV qui étaient les plus toxiques, les extraits T-POS ayant induit une toxicité supérieure pour les deux dernières périodes.

Afin d’obtenir les valeurs de  $\text{FD}_{50}$  (facteur de dilution de l’extrait induisant une inhibition de 50% du taux de croissance) pour chaque extrait issu des différentes stations et périodes de suivi, des courbes dilution-réponse ont été réalisées. La Figure 65 illustre trois courbes dilution-réponse, obtenues pour chaque station suivie durant la période avril-mai avec la microalgue *T. lutea*. Pour chacune des trois stations suivies, le taux de croissance suit une relation dilution-réponse : plus la dilution de l’extrait est faible, et donc plus la quantité d’extrait ajoutée au milieu de culture est importante, plus le taux de croissance diminue. En modélisant des courbes dilution-réponse pour chaque période de suivi et chaque station on peut suivre l’évolution spatio-temporelle des valeurs de  $\text{FD}_{50}$  pour les deux espèces de microalgues testées (Figure 66).

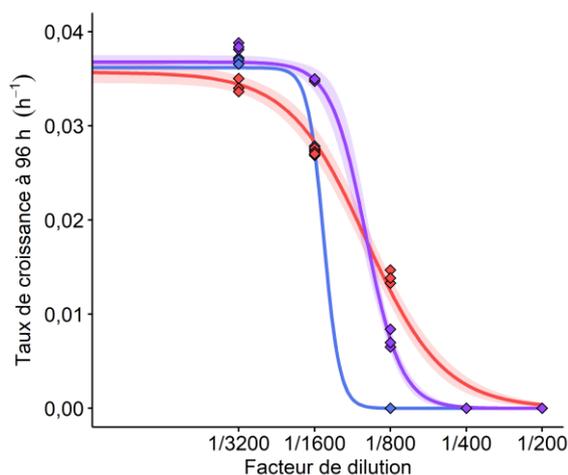


Figure 65 : Illustration des trois courbes dilution-réponse obtenues avec *T. lutea* pour la période avril-mai. En bleu, L1-MEN, en rouge, SE-REG et en violet, L4-VIG

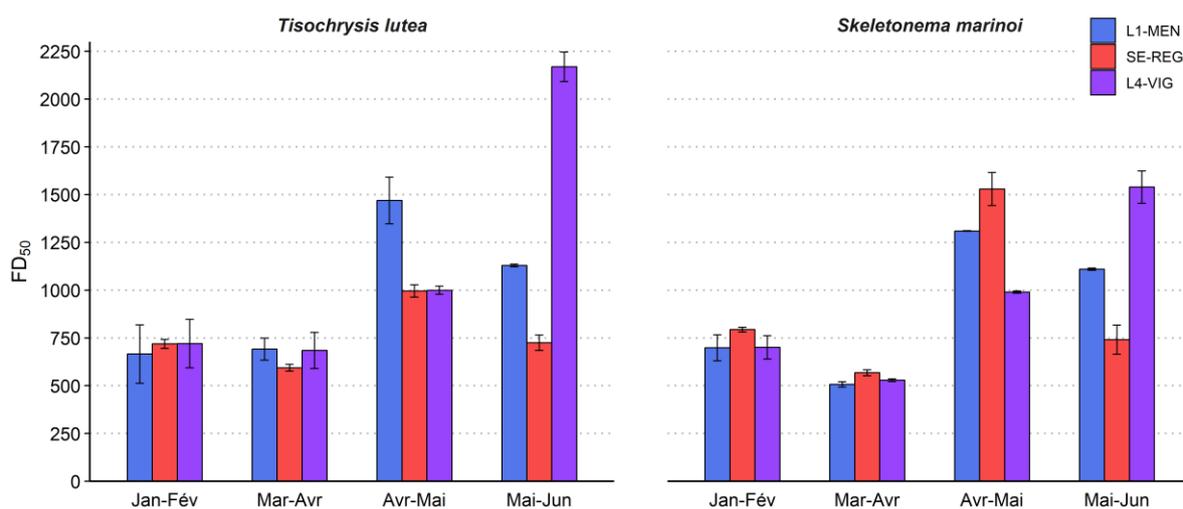


Figure 66 : Évolution des valeurs de  $\text{FD}_{50}$  (sans unité,  $\pm \text{IC}_{95\%}$ ) déterminées pour les extraits de POCIS issus des stations L1-MEN (en bleu), SE-REG (en rouge) et L4-VIG (en violet), pour les quatre périodes de suivi, sur *T. lutea* (à gauche) et *S. marinoi* (à droite). Plus la valeur de  $\text{FD}_{50}$  est élevée et plus la toxicité de l’extrait est importante.

Pour les deux premières périodes de suivi, janvier-février (période témoin, théoriquement exempte de tout traitement phytosanitaire) et mars-avril (première période de traitement), les valeurs de  $FD_{50}$  sont situées entre 500 et 750 pour les deux espèces de microalgues. Contrairement à ce qui est visible pour *T. lutea*, une diminution significative des valeurs de  $FD_{50}$  est observée entre janvier-février et mars-avril pour *S. marinoi*, impliquant une toxicité moindre pour cette espèce.

À partir d'avril-mai, la toxicité des extraits augmente de manière significative pour les deux microalgues. Pour *T. lutea*, la valeur de  $FD_{50}$  pour la station L1-MEN ( $1470 \pm 122$ ) est multipliée par deux par rapport aux périodes précédentes, impliquant une toxicité deux fois supérieure pour l'extrait issu de cette station en avril-mai. Les  $FD_{50}$  ( $\approx 1000$ ) des deux autres stations augmentent également de manière significative par rapport aux deux périodes précédentes. Pour la diatomée *S. marinoi*, un  $FD_{50}$  deux fois plus important est également obtenu pour la station L1-MEN ( $1370 \pm 1,94$ ), par rapport aux périodes précédentes. Contrairement à ce qui a été observé pour *T. lutea*, le  $FD_{50}$  de la station SE-REG ( $1530 \pm 86,8$ ) est également doublé par rapport à la période janvier-février et triplé par rapport à la période mars-avril. Le  $FD_{50}$  de la station L4-VIG pour *S. marinoi* ( $990 \pm 5,59$ ) est en revanche très similaire à celui obtenu avec *T. lutea* ( $1000 \pm 21,4$ ).

Enfin, concernant la dernière période de suivi (mai-juin), une tendance assez similaire a été obtenue pour les deux espèces. Une diminution significative de la toxicité des extraits issus des stations L1-MEN et SE-REG est observée, avec des valeurs de  $FD_{50}$  égales à  $1130 \pm 7,37$  et  $725 \pm 40,3$  pour *T. lutea*, et  $1110 \pm 5,77$  et  $741 \pm 75,9$  pour *S. marinoi*. En revanche, la toxicité de l'extrait issu de la station L4-VIG augmente de manière spectaculaire, notamment pour *T. lutea* : le  $FD_{50}$  pour cette espèce ( $2170 \pm 77,4$ ) est plus de deux fois supérieur à celui de la période précédente, et le plus élevé toutes stations/périodes/espèces confondues. Pour *S. marinoi*, la valeur de  $FD_{50}$  ( $1540 \pm 85$ ) est 1,5 fois supérieure à celle obtenue pour la période précédente à cette station.

### 2.3.3. Identification des pesticides responsables de la toxicité des extraits de POCIS

Dans le but d'identifier quelques-unes des substances responsables de la toxicité observée dans les extraits de POCIS testés, des analyses chimiques ont été réalisées sur des échantillons de milieu de culture f/2 contaminé (sans microalgues) à différentes dilutions avec les extraits de POCIS. Pour ces analyses, les huit pesticides pour lesquels une  $CE_{50}$  avait pu être calculée lors des expérimentations de criblage (article 3, chapitre 2) ont été recherchés (hormis le chlorpyrifos-méthyl, les insecticides étant peu utilisés sur le site d'étude d'après les résultats d'enquête). En effet, afin de pouvoir évaluer la part relative de chaque substance analysée dans la toxicité générale de chaque extrait, il est nécessaire

d'avoir recours à l'approche des unités toxiques (TU) qui fait appel aux  $CE_{50}$  déterminées précédemment. Pour les substances supposément présentes à de faibles concentrations dans les extraits, il fallait également s'assurer d'obtenir une capacité de détection supérieure à la limite de quantification (LQ). Pour cela, les dilutions analysées n'ont pas forcément été les mêmes pour les différents extraits, ceux-ci n'ayant pas tous induit une toxicité similaire. Ainsi, il a été choisi d'analyser des dilutions plus fortes ( $1/800^{\text{ème}}$ ) pour les extraits les plus toxiques, alors que des dilutions plus faibles ( $1/200^{\text{ème}}$  ou  $1/400^{\text{ème}}$ ) ont été analysées pour les extraits les moins toxiques. Les résultats de ces analyses sont disponibles dans le Tableau 15.

Tableau 15 : Concentration des huit pesticides recherchés dans les échantillons de milieu de culture f/2 contaminés avec les extraits de POCIS à différentes dilutions.

Période	Station	Dilution de l'extrait	Concentration ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) dans le milieu de culture f/2 contenant l'extrait dilué							
			DIU	ISO	METZ	S-MET	AZO	KRE-M	QUI	SPI
Jan-Fév	L1-MEN	1/200	0,10	0,36	0,13	0,38	0,001	0,001	0,003	0,019
		1/400	0,044	0,17	0,071	0,16	< LQ	< LQ	< LQ	0,005
	SE-REG	1/400	0,14	0,008	0,007	0,041	0,002	0,004	< LQ	0,99
	L4-VIG	1/200	0,22	0,21	0,072	0,27	0,001	0,001	0,003	0,48
		1/400	0,11	0,11	0,048	0,13	< LQ	< LQ	< LQ	0,21
Mar-Avr	L1-MEN	1/400	0,041	0,020	0,050	0,65	0,002	0,050	< LQ	0,004
	SE-REG	1/400	0,12	0,009	0,007	0,16	0,005	< LQ	< LQ	1,38
	L4-VIG	1/400	0,16	0,015	0,037	0,50	0,001	< LQ	< LQ	0,080
Avr-Mai	L1-MEN	1/200	0,15	0,047	0,30	9,31	0,001	0,001	0,003	0,24
		1/800	0,039	0,013	0,11	2,31	0,005	0,11	< LQ	0,050
	SE-REG	1/800	0,071	0,002	0,036	0,91	0,005	0,014	< LQ	1,34
	L4-VIG	1/800	0,12	0,009	0,076	1,74	0,004	0,64	< LQ	0,14
Mai-Jun	L1-MEN	1/800	0,027	0,015	0,078	0,59	0,006	0,011	< LQ	0,037
	SE-REG	1/400	0,084	0,001	0,005	0,46	0,005	0,090	< LQ	1,63
	L4-VIG	1/200	0,27	0,036	0,16	2,19	0,032	0,92	0,003	17,8
		1/800	0,080	0,011	0,050	0,60	0,006	0,22	< LQ	4,25

DIU : diuron ; ISO : isoproturon ; METZ : métazachlore ; S-MET : S-métolachlore ; AZO : azoxystrobine ; KRE-M : krésoxim-méthyl ; QUI : quinoxifène ; SPI : spiroxamine

Afin de pouvoir comparer les concentrations des différentes molécules recherchées en fonction des stations et des périodes de suivi, le facteur de dilution 1/400<sup>ème</sup> a été choisi car c'est également celui pour lequel il y a le plus de données. Pour les extraits pour lesquels cette dilution n'a pas été analysée, les concentrations mesurées dans les extraits dilués au 1/800<sup>ème</sup> (Tableau 15) ont été multipliées par deux pour calculer la concentration théorique dans un extrait dilué au 1/400<sup>ème</sup>. Dans la description des résultats ci-dessous, les concentrations données pour les pesticides analysés sont donc celles mesurées pour les extraits de POCIS dilués au 1/400<sup>ème</sup> dans le milieu de culture f/2 et présentées dans la Figure 67.

D'une manière générale, on peut voir que tous les pesticides analysés ont été retrouvés au moins une fois, hormis le quinoxifène qui n'a pas été détecté à des concentrations supérieures à sa LQ dans les extraits dilués au 1/400<sup>ème</sup> (il a toutefois été détecté dans certains extraits dilués au 1/200<sup>ème</sup>, voir Tableau 15). Tous les herbicides recherchés ont été détectés dans les extraits quelle que soit la station et la période d'échantillonnage dont ils sont issus. Pour les fongicides, seule la spiroxamine a été systématiquement détectée, alors que l'azoxystrobine et le krésoxim-méthyl étaient absents des extraits issus de certaines stations pour les périodes janvier-février et mars-avril. Le diuron est la substance dont la concentration fluctue le moins en fonction des stations et périodes échantillonnées : sa concentration est comprise entre 0,05 et 0,2  $\mu\text{g L}^{-1}$  dans les extraits dilués au 1/400<sup>ème</sup> dans le milieu de culture f/2 (Tableau 15, Figure 67). Les concentrations mesurées pour les autres herbicides fluctuent davantage : les concentrations d'isoproturon et de métazachlore sont globalement constantes pour les stations de la Livenne (L1-MEN et L4-VIG) et comprises entre 0,01 et 0,1  $\mu\text{g L}^{-1}$ , alors qu'elles sont souvent inférieures à 0,01  $\mu\text{g L}^{-1}$  à la station SE-REG. L'herbicide retrouvé à la plus forte concentration est le S-métolachlore, dont la concentration varie entre 0,05  $\mu\text{g L}^{-1}$  (à SE-REG en janvier-février) et 5  $\mu\text{g L}^{-1}$  (à L1-MEN et L4-VIG en avril-mai).

Concernant les fongicides, les concentrations mesurées pour l'azoxystrobine ne dépassent jamais les 0,01  $\mu\text{g L}^{-1}$ , contrairement au krésoxim-méthyl qui a été mesuré à une concentration avoisinant les 1  $\mu\text{g L}^{-1}$  dans l'extrait de POCIS dilués au 1/400<sup>ème</sup> issu de la station L4-VIG en avril-mai. Finalement, le produit phytosanitaire retrouvé à la concentration la plus forte est la spiroxamine. Sa concentration atteignait le  $\mu\text{g L}^{-1}$  à la station SE-REG pour les deux premières périodes de suivi, atteignant jusqu'à 2-3  $\mu\text{g L}^{-1}$  à cette même station en avril-mai. Elle a été retrouvée à une concentration maximale de 8,51  $\mu\text{g L}^{-1}$  à la station L4-VIG durant la période mai-juin.

On peut comparer la contamination des différentes stations sur la base de la somme des concentrations mesurées dans les extraits dilués au 1/400<sup>ème</sup> dans le milieu de culture, toutes substances et toutes périodes confondues. De la moins contaminée à la plus contaminée, le classement suivant est obtenu :

SE-REG ( $\Sigma = 8,07 \mu\text{g L}^{-1}$ ) < L1-MEN ( $\Sigma = 9,89 \mu\text{g L}^{-1}$ ) << L4-VIG ( $\Sigma = 17,3 \mu\text{g L}^{-1}$ ).

Si l'on compare maintenant la contamination toutes stations confondues en fonction des quatre périodes suivies, le classement des périodes, de la moins contaminée à la plus contaminée, est le suivant :

janvier-février ( $\Sigma = 2,25 \mu\text{g L}^{-1}$ ) < mars-avril ( $\Sigma = 3,28 \mu\text{g L}^{-1}$ ) << mai-juin ( $\Sigma = 14,2 \mu\text{g L}^{-1}$ ) < avril-mai ( $\Sigma = 15,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ).

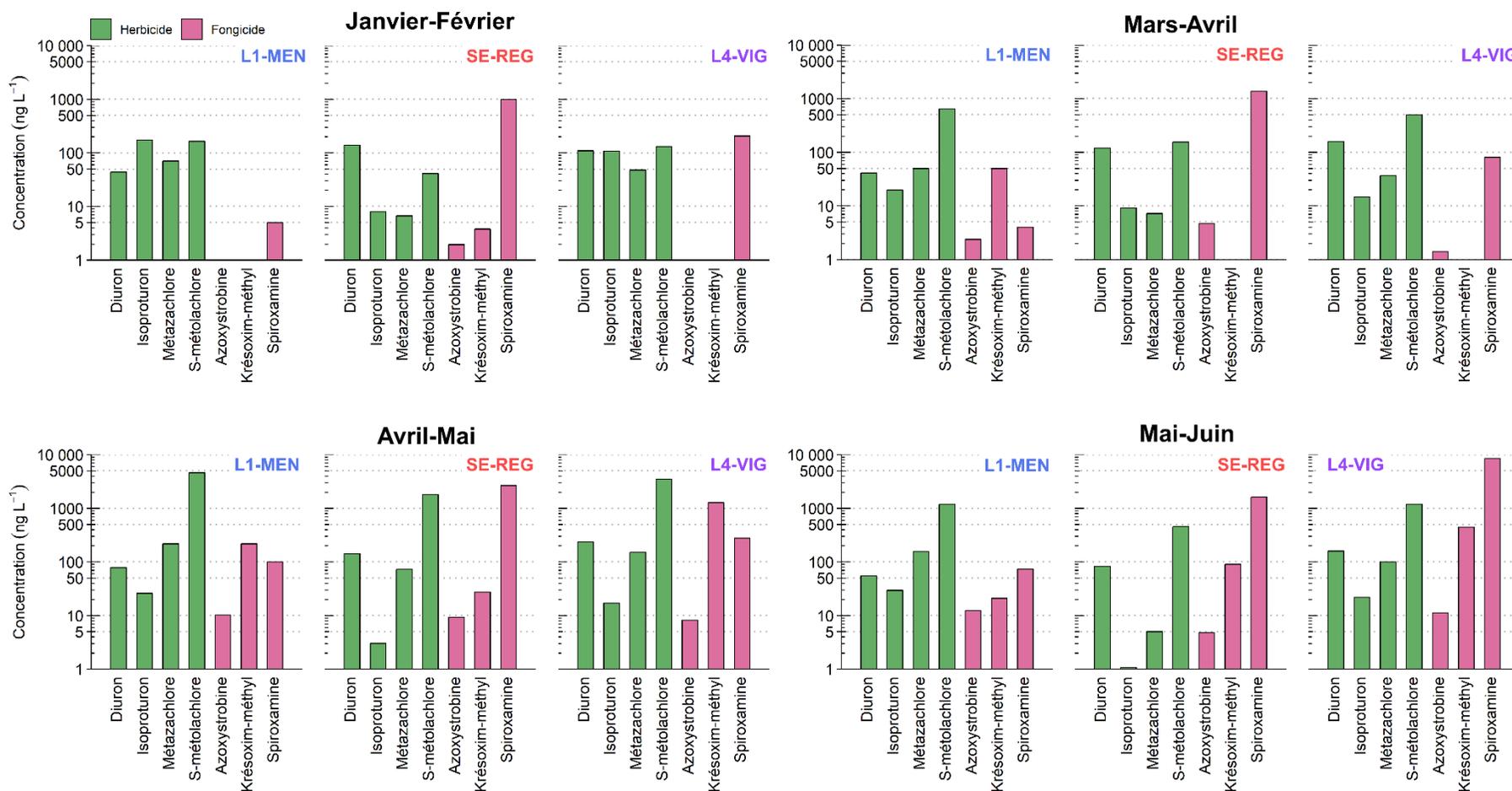


Figure 67 : Concentrations mesurées (en ng L<sup>-1</sup>) dans les extraits de POCIS dilués au 1/400<sup>ème</sup> dans le milieu de culture f/2 pour les huit pesticides recherchés (en vert, les herbicides ; en rose, les fongicides ; le quinoxyfène n’a jamais été détecté à des concentrations supérieures à sa LQ), pour chaque station et chaque période de suivi.

Les concentrations de ces pesticides (Tableau 15, Figure 67), ainsi que les valeurs de  $CE_{50}$  préalablement déterminées (calculées avec les concentrations mesurées dans les puits des microplaques et en utilisant la fluorescence comme proxy de croissance, article 3, chapitre 4) ont ensuite été combinées pour calculer une valeur de  $FD_{50}$  théorique ( $FD_{50_{pred}}$ ) en utilisant l'approche des unités toxiques (TU). Pour chaque extrait, cette approche permet d'une part, d'attribuer à chaque substance une valeur de TU représentative de sa participation relative à la toxicité générale de l'extrait ; d'autre part, de comparer le  $FD_{50}$  prédit ( $FD_{50_{pred}}$ ) avec le  $FD_{50}$  expérimental ( $FD_{50_{exp}}$ ), afin d'estimer la contribution relative des pesticides recherchés dans l'extrait à la toxicité globale observée. Les résultats de cette approche sont résumés dans le Tableau 16.

D'une manière globale, il apparaît que la toxicité des extraits issus des stations L1-MEN et L4-VIG (hormis pour la période mai-juin) ne peut être expliquée par les huit pesticides analysés : le pourcentage du  $FD_{50_{exp}}$  (% expliqué, Tableau 16) est inférieur à 10% pour les deux espèces, et souvent aux alentours de 1-3%. Au contraire, la toxicité des extraits issus de la station SE-REG, notamment pour *T. lutea*, est en partie expliquée par la présence des huit pesticides analysés dans les extraits de POCIS : pour *T. lutea*, le pourcentage de  $FD_{50_{exp}}$  expliqué varie entre 19,9% pour janvier-février et 34,5% pour avril-mai ; pour *S. marinoi*, les pourcentages sont bien plus faibles et oscillent entre 5,0% en janvier-février et 9,1% en mars-avril. Enfin, concernant la station L4-VIG, seule la toxicité de l'extrait de la période mai-juin peut en partie être expliquée par les analyses chimiques réalisées : 48-50% et 18-19% du  $FD_{50_{exp}}$  peuvent être expliqués par la présence des huit pesticides analysés dans les extraits de POCIS dilués pour *T. lutea* et *S. marinoi*, respectivement. Notons également que, dans le cas où deux dilutions différentes ont été utilisées pour le calcul du  $FD_{50_{pred}}$  et du pourcentage de toxicité expliqué, des valeurs très similaires ont été obtenues : par exemple, pour l'extrait L4-VIG et la période mai-juin : des valeurs de  $FD_{50_{pred}}$  de 1085 et 1040 ont été obtenues pour l'extrait dilué au  $1/200^{ème}$  et au  $1/800^{ème}$ , expliquant 50,0% et 47,9% du  $FD_{50_{exp}}$ , respectivement. Étant donné que la spiroxamine était la molécule retrouvée de manière majoritaire dans les extraits de POCIS (Figure 67), mais également l'une des plus toxiques pour les deux microalgues, un deuxième calcul de  $FD_{50_{pred}}$  a été réalisé en utilisant uniquement les concentrations de spiroxamine. Cela permet d'évaluer la participation relative de ce fongicide à la part de toxicité expliquée de l'extrait de POCIS, par rapport aux autres pesticides analysés (% expliqué [SPI], Tableau 16). Ainsi, on peut observer que, chaque fois que le pourcentage de  $FD_{50_{exp}}$  expliqué est supérieur à 10% (cases en vert, Tableau 16), plus de 80% du pourcentage expliqué est en fait uniquement dû à la présence de spiroxamine. Cela est également vrai pour les extraits SE-REG avec *S. marinoi*, bien que le pourcentage de toxicité expliqué soit inférieur à 10%.

Tableau 16 : Somme des unités toxiques ( $\Sigma$ TU extrait, sans unités),  $FD_{50}$  prédit ( $FD_{50\text{pred}}$ ) et expérimental ( $FD_{50\text{exp}}$ ), pourcentage du  $FD_{50}$  mesuré expliqué par le  $FD_{50}$  théorique en utilisant toutes les concentrations (% expliqué) ou seulement la spiroxamine (% expliqué [SPI]), pour chaque extrait de POCIS dilué dans le milieu de culture (et pour lesquels les huit pesticides sélectionnés ont été recherchés) en fonction des différentes stations et périodes suivies.

Période	Station	Dilution de l'extrait	<i>T. lutea</i>					<i>S. marinoi</i>				
			$\Sigma$ TU extrait	$FD_{50\text{pred}}$	$FD_{50\text{exp}}$	% expliqué	% expliqué [SPI]	$\Sigma$ TU extrait	$FD_{50\text{pred}}$	$FD_{50\text{exp}}$	% expliqué	% expliqué [SPI]
Jan-Fév	L1-MEN	1/200	0,09	18,8	666 ± 153	2,82	0,17	0,04	8,8	699 ± 68,8	1,26	0,04
		1/400	0,04	16,7		2,51	0,09	0,02	7,8		1,12	n.d.
	SE-REG	1/400	0,36	143	719 ± 23,3	19,9	16,3	0,10	40	794 ± 11,7	5,00	4,02
		L4-VIG	1/200	0,27	53,5	721 ± 127	7,41	3,94	0,09	17,1	701 ± 61,3	2,44
1/400	0,12		49,4	6,85	3,39		0,04	16,0	2,28	0,95		
Mar-Avr	L1-MEN	1/400	0,02	8,87	692 ± 57,9	1,28	0,07	0,01	3,13	507 ± 13,7	0,62	n.d.
	SE-REG	1/400	0,47	186	594 ± 17,9	31,4	27,6	0,13	51	568 ± 15,9	9,10	7,85
	L4-VIG	1/400	0,10	39,0	685 ± 94,1	5,69	1,39	0,03	11,8	529 ± 6,59	2,22	0,49
Avr-Mai	L1-MEN	1/200	0,14	28,5	1470 ± 122	1,94	0,96	0,05	10,4	1310 ± 1,94	0,79	0,29
		1/800	0,03	27,4		1,87	0,81	0,01	10,2		0,78	0,25
	SE-REG	1/800	0,43	344	996 ± 32,6	34,5	31,9	0,12	95	1530 ± 86,8	6,20	5,65
	L4-VIG	1/800	0,10	76,9	1000 ± 21,4	7,69	3,32	0,03	25,0	990 ± 5,59	2,52	0,91
Mai-Jun	L1-MEN	1/800	0,03	20,2	1130 ± 7,37	1,78	0,78	0,01	6,8	1110 ± 5,77	0,61	0,22
	SE-REG	1/400	0,52	208	725 ± 40,3	28,7	26,6	0,14	57	741 ± 75,9	7,70	7,08
	L4-VIG	1/200	5,42	1085	2170 ± 77,4	50,0	48,8	1,48	297	1540 ± 85,0	19,3	18,7
		1/800	1,30	1040		47,9	46,5	0,36	284		18,5	17,8

Note : les valeurs d’unités toxiques individuelles pour chaque pesticide recherché sont disponibles dans le matériel supplémentaire (section 2.6).

## 2.4. Discussion

Les extraits d'échantillonneurs passifs de type POCIS présentent un réel intérêt pour l'étude de la toxicité de mélanges complexes de substances chimiques présents dans le milieu naturel : ils constituent une image de la contamination chimique d'un cours d'eau pour le point et la période échantillonnés. Bien que cette image soit en réalité déformée du fait de l'existence de différences d'affinités de chaque substance pour la phase adsorbante, leur utilisation s'avère néanmoins utile pour caractériser la contamination d'un cours d'eau. De nombreuses études se sont ainsi intéressées à l'étude de la toxicité de mélanges complexes issus de l'environnement via l'utilisation de différentes approches visant à répondre à des problématiques variées (Tableau 17).

Dans notre étude, nous avons pu démontrer qu'il était possible d'évaluer la toxicité d'extraits de POCIS en diluant directement ceux-ci dans le milieu de culture f/2 utilisé pour la culture des microalgues. Le protocole du test de toxicité a pu être validé via la réalisation de multiples contrôles : non-toxicité de la phase et des solvants (témoins négatifs T-NEG et T-NEG-SOLV) ; préservation de la toxicité des substances lors de l'extraction (témoins positifs T-POS et T-POS-SOLV) ; prise en compte de la fluorescence naturelle des extraits de POCIS (témoins de fluorescence, section 3.5 du chapitre 2). Ces expérimentations ont permis d'obtenir des courbes dilution-réponse, et ainsi de calculer des valeurs de  $FD_{50}$  pour chaque extrait, permettant ainsi d'évaluer l'évolution du potentiel toxique des extraits de POCIS pour les différentes stations et périodes de suivi. En conséquence, les stations/périodes « à risque » ont pu être identifiées.

Avant de commenter la toxicité des extraits de POCIS, il convient tout de même de faire un bref commentaire par rapport aux différences obtenues sur les  $CE_{50}$  des extraits T-POS et T-POS-SOLV. La toxicité supérieure des extraits T-POS-SOLV par rapport aux extraits T-POS pour *T. lutea* pourrait s'expliquer par une extraction légèrement moindre du diuron lorsque celui-ci est ajouté à la phase Oasis HLB et non directement au mélange de solvants. Toutefois, cette hypothèse n'est pas corroborée par les résultats obtenus pour la diatomée *S. marinoi*, pour laquelle l'extrait T-POS-SOLV préparé pour les deux dernières périodes induit une toxicité légèrement inférieure au T-POS. L'analyse chimique de ces différents extraits permettrait donc de statuer sur la quantité de diuron extraite dans ces deux cas. Un des objectifs de ces témoins consistait également à vérifier la sensibilité constante des deux espèces au diuron : si pour *T. lutea* aucune différence de sensibilité n'a pu être observée pour les quatre périodes, ce n'est pas le cas de *S. marinoi* qui semble légèrement moins sensible pour la période mars-avril.

Tableau 17 : Synthèse des différentes publications ayant étudié la toxicité de mélanges complexes constitués par des échantillons environnementaux (eau ou échantillonneurs passifs) sur des microalgues et d'autres organismes

Reference	Site d'étude	Utilisation des terres	Type d'échantillon	Test de toxicité (durée)	Modèle biologique	Approche utilisée
<b>Escher <i>et al.</i> 2006</b>	Parc national de Noosa (Australie)	STEP <sup>(1)</sup> , domestique et urbaine	POS <sup>(2)</sup> - SDB-RPS <sup>(3)</sup> (Chemcatcher <sup>®</sup> )	$\Phi_{PSII}$ (1-25 h)	<i>n.d.</i>	DEQ <sup>(4)</sup> - CE(REF <sup>(5)</sup> )
<b>Muller <i>et al.</i> 2007</b>	<i>n.d.</i>	STEP	POS - SDB-RPS (Chemcatcher <sup>®</sup> )	Microtox <sup>™</sup> (15 min) $\Phi_{PSII}$ (1-25 h) umuC <sup>(6)</sup> (2+2 h)	<i>P. tricornutum</i> ( $\Phi_{PSII}$ ) <i>V. fischeri</i> (Microtox) <i>S. typhimurium</i> (umuC)	DEQ - CE(REF)
<b>Escher <i>et al.</i> 2008b</b>	Canton de Zurich (Suisse)	STEP, agricole, industrielle et urbaine	Eau concentrée (SPE)	Bioluminescence bactérienne (30 min) $\Phi_{PSII}$ (1 à 25 h) umuC (2+2 h) YES <sup>(7)</sup> ( <i>n.d.</i> ) Inhibition de l'ACHé <sup>(8)</sup> ( <i>n.d.</i> )	<i>sp. n.d.</i> ( $\Phi_{PSII}$ ) <i>V. fischeri</i> (Biolum.) <i>S. typhimurium</i> (umuC) <i>S. cerevisiae</i> (YES)	TEQ <sup>(9)</sup> - CE(REF)
<b>Muller <i>et al.</i> 2008</b>	Estuaire de la rivière Brisbane (Australie)	Agricole	Eau concentrée (SPE) + POS - SDB-RPS (Chemcatcher <sup>®</sup> )	$\Phi_{PSII}$ (30 min à 2 h)	<i>P. tricornutum</i> et <i>C. vulgaris</i> ( $\Phi_{PSII}$ )	DEQ - CE(REF)
<b>Shaw <i>et al.</i> 2009</b>	Grande barrière de corail (Australie)	Agricole	POS - SDB-RPS (Chemcatcher <sup>®</sup> )	$\Phi_{PSII}$ (2 h) Microtox <sup>™</sup> (15 min) Fixation des larves de coraux (~50 h) Dvp. embryo-larvaire des larves d'oursin (72 h)	<i>P. tricornutum</i> ( $\Phi_{PSII}$ ) <i>V. fischeri</i> (Microtox) <i>A. millepora</i> (coraux) <i>H. tuberculata</i> (oursins)	DEQ - CE(REF)
<b>Vermeirssen <i>et al.</i> 2009</b>	Nord de la Suisse	STEP	POS - SDB-RPS (Chemcatcher <sup>®</sup> )	$\Phi_{PSII}$ (2 h)	<i>R. subcapitata</i> ( $\Phi_{PSII}$ )	DEQ - CE(REF)
<b>Vermeirssen <i>et al.</i> 2010</b>	<i>n.d.</i>	STEP	POCIS	$\Phi_{PSII}$ (2 h) Bioluminescence bactérienne (30 min)	<i>R. subcapitata</i> ( $\Phi_{PSII}$ ) <i>V. fischeri</i> (Biolum.)	TEQ - CE(REF)
<b>Pesce <i>et al.</i> 2011</b>	Rivière Ruiné (France)	<i>n.d.</i>	POCIS	$\Phi_{PSII}$ (2 h)	Biofilms	Analyses spécifiques biofilm
<b>Morin <i>et al.</i> 2012</b>	Rivière Morcille (France)	Viticole	POCIS	$\Phi_{PSII}$ (48 h) Exposition chronique à faible concentration (14 j)	Biofilms	Analyses spécifiques biofilm
<b>Emelogu <i>et al.</i> 2013</b>	Fleuve Forth + estuaire (Écosse)	STEP, agricole, industrielle et urbaine	SR <sup>(10)</sup>	Taux de croissance $\mu$ (72 h)	<i>Diacronema lutheri</i>	CE(mg SREQ L <sup>-1</sup> )
<b>Booij <i>et al.</i> 2014</b>	Eaux côtières et estuariennes (Pays-Bas)	<i>n.d.</i>	POCIS + SR	$\Phi_{PSII}$ (4,5 h)	<i>D. tertiolecta</i>	EDA <sup>(11)</sup>
<b>Kim Tiam <i>et al.</i> 2014b</b>	Rivière Morcille (France)	Viticole	POCIS	$\Phi_{PSII}$ (24 h) Exposition chronique à faible concentration (13 j)	Biofilms	Analyses spécifiques biofilm
<b>Kim Tiam <i>et al.</i> 2015</b>	Rivière Trec (France)	Agricole	POCIS	Exposition chronique à faible concentration (14 j)	Biofilms	Analyses spécifiques biofilm
<b>Foulquier <i>et al.</i> 2015</b>	Rivière Morcille (France)	Viticole	POCIS + DGT	Concentration-réponse $\Phi_{PSII}$ (30 min à 3 h)	Biofilms	Analyses spécifiques biofilm

<sup>(1)</sup> station d'épuration ; <sup>(2)</sup> polar organic sampler ; <sup>(3)</sup> styrène-divinylbenzène-reverse phase sorbent ; <sup>(4)</sup> diuron equivalent concentrations ; <sup>(5)</sup> relative enrichment factor ; <sup>(6)</sup> test de génotoxicité (Oda *et al.*, 1985) ; <sup>(7)</sup> yeast estrogen screen (Routledge et Sumpter, 1996) ; <sup>(8)</sup> acétylcholine estérase ; <sup>(9)</sup> toxic equivalent concentrations ; <sup>(10)</sup> silicon rubber ; <sup>(11)</sup> effect-directed analysis.

Cette baisse de sensibilité pourrait d'ailleurs être corroborée par la toxicité légèrement inférieure des extraits de POCIS de la période mars-avril comparée à la période janvier-février, baisse qui n'a pas été observée pour *T. lutea*. Durant les deux premières périodes, bien qu'une toxicité significative ait été obtenue avec les extraits testés, elle était similaire pour toutes les stations et quasiment identique entre les deux périodes suivies. De fait, cette toxicité pourrait être considérée comme une « ligne de base ». En avril-mai, la toxicité des extraits a augmenté de manière significative, notamment à la station L1 où la toxicité a doublé par rapport aux deux périodes précédentes pour les deux espèces de microalgues. Concernant la diatomée *S. marinoi*, la toxicité de l'extrait issu de la station SE a quasiment triplé par rapport à mars-avril. En mai-juin, c'est la toxicité de l'extrait issu de la station L4 qui a très fortement augmenté, induisant la plus forte toxicité parmi tous les extraits testés, et ce pour les deux espèces de microalgues. Conformément à ce qui était attendu, ce sont donc bien les extraits issus des périodes avril-mai et mai-juin qui ont induit la plus forte toxicité. En effet, c'est au cours de ces périodes que les traitements phytosanitaires étaient les plus nombreux (Figure 62) comme l'attestent les résultats des analyses chimiques réalisées sur les extraits de POCIS dilués : les sommes des concentrations des huit pesticides analysés dans les extraits dilués au 1/400<sup>ème</sup> (Figure 67) sont cinq à sept fois plus importantes en avril-mai et mai-juin ( $\approx 14-15 \mu\text{g L}^{-1}$ ) qu'en janvier-février et mars-avril ( $\approx 2-3 \mu\text{g L}^{-1}$ ). En revanche, la tendance au niveau des différentes stations suivies est moins évidente. Alors que la station L1-MEN est censée être la moins contaminée de par sa localisation en entrée de BV, elle s'est avérée aussi, voire plus toxique que la station SE-REG ou L4-VIG. En conséquence, il apparaît finalement difficile de désigner la station pour laquelle les extraits étaient les plus toxiques, tant cela dépend de la période suivie, mais également de l'espèce considérée.

L'approche utilisée dans cette thèse s'apparente à ce qui a pu être fait dans les études réalisées par Emelogu *et al.* (2013) et Foulquier *et al.* (2015) : des extraits d'échantillonneurs passifs ont été dilués selon une gamme de dilution géométrique afin de déterminer des  $CE_{50}$  ou  $CE_{10}$  pour les extraits testés, analogues aux valeurs de  $FD_{50}$  calculées dans cette étude. Dans nos travaux, un test de toxicité basé sur l'inhibition de croissance microalgale a été utilisé, de manière similaire à l'approche utilisée par Emelogu *et al.*, et contrairement à Foulquier *et al.* qui ont choisi d'appliquer un test basé sur l'inhibition du rendement photosynthétique. Bien que relativement sensible, ce test cible spécifiquement les inhibiteurs du PSII. Il ne permet donc pas de détecter la présence de polluants présentant d'autres modes d'action toxique. D'ailleurs, il est utilisé dans l'approche décrite par Escher *et al.* (2008a) afin d'identifier spécifiquement la part de toxicité attribuable aux inhibiteurs du PSII dans des extraits d'échantillonneurs passifs. Dans notre étude, n'ayant pas d'*a priori* sur les pesticides qui seraient davantage présents dans les extraits, nous avons donc choisi un test de toxicité basé sur le taux de croissance, plus adapté pour mettre en évidence une toxicité non-spécifique.

Une critique pourrait être faite concernant la façon d’exprimer les concentrations des extraits de POCIS dans notre approche : celles-ci ont été exprimées par leur dilutions respectives dans le milieu de culture et nous avons ainsi permis de calculer un facteur de dilution induisant un effet de 50% d’inhibition, le  $FD_{50}$ . Une approche similaire a été utilisée dans les travaux de Pesce *et al.* (2011), Kim Tiam *et al.* (2014b) et Foulquier *et al.* (2015). Bien que cette approche permette de comparer de manière relativement simple la toxicité des différents extraits, ce n’était peut-être pas la façon la plus rigoureuse d’exprimer les concentrations. Dans notre étude, pour chaque extrait, la masse de phase (Oasis HLB) extraite ainsi que la masse de méthanol ont été mesurées par gravimétrie. La concentration des extraits purs aurait donc pu être calculée en divisant la masse de phase POCIS extraite par la quantité de méthanol. Ainsi, les concentrations des extraits auraient pu être exprimées en mg phase POCIS extraite  $L^{-1}$ , de manière similaire à ce qui a été fait dans l’étude d’Emelogu *et al.* (2013a). La quantité de phase extraite pour chaque extrait pouvant varier légèrement (*e.g.* perte de phase sur le terrain ou lors de l’extraction), l’expression des résultats en utilisant ces concentrations pourrait permettre d’affiner légèrement la mesure de la toxicité obtenue. D’un autre côté, il pourrait également être envisagé d’exprimer les concentrations des extraits par leur facteur d’enrichissement relatif (*relative enrichment factor*, REF en anglais) comme décrit dans l’étude d’Escher *et al.* (2006) : pour le calculer, le volume échantillonné, basé dans cet exemple sur le taux d’échantillonnage,  $R_s$ , du diuron, est alors divisé par le volume final de l’extrait. Cette façon d’exprimer la concentration est notamment utilisée dans une approche davantage développée dans une optique d’évaluation du risque environnemental, discutée dans la section 3 du chapitre 6. On pourrait cependant critiquer ce calcul sur le fait qu’il se base sur le  $R_s$  d’une seule substance, le diuron, alors qu’il est probable que ce  $R_s$  soit significativement différent pour les autres substances présentes dans l’extrait. Néanmoins, dans notre cas et selon les informations que nous avons pu trouver dans la littérature, les huit pesticides analysés dans les extraits de POCIS dilués possèdent presque tous une valeur de  $R_s$  similaire, à l’exception du krésoxim-méthyl et du quinoxifène (Tableau 18)

Tableau 18 : Taux d’échantillonnage POCIS  $R_s$  (en  $L j^{-1}$ ) issus de la littérature des huit pesticides analysés dans les échantillons de milieu de culture f/2 contaminé avec les extraits de POCIS.

Substance	$R_s$ ( $L j^{-1}$ )						
	Ahrens <i>et al.</i> 2015	Desgranges 2015	Ibrahim 2013	Lissalde <i>et al.</i> 2011	Mazzella <i>et al.</i> 2007	Thomatou <i>et al.</i> 2015	$R_s$ moyen ( $L j^{-1}$ )
<b>diuron</b>	0,18	0,12	0,257	0,199	0,247		0,201
<b>isoproturon</b>	0,37		0,237	0,167	0,218		0,248
<b>métazachlore</b>	0,5		0,256	0,205		0,178	0,285
<b>S-métolachlore</b>	0,22		0,268	0,182			0,223
<b>azoxystrobine</b>	0,18		0,154	0,179			0,171
<b>krésoxim-méthyl</b>						0,030	0,030
<b>quinoxifène</b>	0,004						0,004
<b>spiroxamine</b>	0,28	0,29					0,285

Ces taux d’échantillonnage sont toutefois issus d’études réalisées en laboratoire. Or les taux d’échantillonnage terrain pourraient être significativement différents, aussi bien entre le terrain et le laboratoire, qu’entre les différentes périodes et stations échantillonnées, en raison des différences au niveau des paramètres environnementaux (l’influence de ces paramètres est décrite en détail dans la section 1.7.2 du chapitre 1). Ainsi, l’idéal serait de corriger ce calcul avec les taux d’échantillonnage terrain pour les différentes périodes et stations suivies : cette correction est possible par l’utilisation de PRC (Mazzella *et al.*, 2010 ; Belles *et al.*, 2014b) et représente un travail actuellement effectué au laboratoire LPTC-EPOC dans le cadre du groupe de tâches 1 du projet PhytoCOTE.

La deuxième partie du travail concernant le potentiel toxique des extraits de POCIS consistait ensuite à identifier le ou les pesticide(s) responsable(s) de la toxicité observée. Notre étude se poursuit donc au-delà de ce qui a pu être fait dans les études de Pesce *et al.* (2011), Foulquier *et al.* (2015) et Emelogu *et al.* (2013), dont le but n’était pas forcément d’identifier les substances toxiques. L’identification des substances responsables de la toxicité d’un extrait d’échantillonneur passif fait généralement appel une approche appelée analyse dirigée par l’effet (*effect-directed analysis*, EDA). Dans cette approche décrite par Brack (2003), l’extrait est fractionné par chromatographie liquide, puis la toxicité des différentes fractions est évaluée. Les chromatogrammes des fractions toxiques sont ensuite analysés afin d’identifier les substances potentiellement toxiques par corrélation avec des bases de données, puis l’identification de ces substances est confirmée par leur temps de rétention respectifs. En appliquant cette approche, Booij *et al.* (2014) ont pu identifier six inhibiteurs du PSII dans des extraits d’échantillonneurs passifs issus des eaux estuariennes et côtières néerlandaises, expliquant ainsi en partie la toxicité induite par ces extraits. Néanmoins, et comme c’était le cas dans notre étude, la toxicité de certains extraits restait inexplicée. De manière similaire à Booij *et al.* (2014), l’approche des unités toxiques (TU), généralement utilisée pour l’EDA (Brack, 2003) et recommandée par l’agence de protection environnementale (EPA) des États-Unis (U.S. EPA, 1993), a été utilisée dans nos travaux. Cependant, notre approche diffère de par son déroulement : contrairement à l’approche décrite par Booij *et al.* (2014), les CE<sub>50</sub> des pesticides potentiellement retrouvés dans les POCIS et les plus toxiques pour les deux microalgues marines ont été préalablement déterminées au cours d’une étape de criblage de toxicité (article 3, chapitre 4). En combinant les CE<sub>50</sub> déterminées et les concentrations de ces substances dans les extraits dilués, il est possible, grâce à l’utilisation des TU, d’évaluer la contribution relative de chaque substance à la toxicité de l’extrait, ainsi que de calculer la  $\Sigma$ TU pour chaque extrait (Tableau 16). La  $\Sigma$ TU est ensuite convertie en FD50<sub>pred</sub> afin de pouvoir évaluer la part de toxicité expliquée par les huit pesticides mesurés. Ainsi, près d’un tiers de la toxicité des extraits SE-REG pour *T. lutea* a pu être expliqué par la présence de spiroxamine à une concentration relativement élevée (> 1 µg L<sup>-1</sup> dans les extraits dilués au 1/400<sup>ème</sup>). En revanche, cela

ne permet pas d’expliquer la toxicité des extraits SE-REG pour *S. marinoi*, car la spiroxamine est environ quatre fois moins toxique pour cette espèce. De la même façon, la toxicité de l’extrait L4-VIG pour la période mai-juin s’explique par la présence de spiroxamine à une concentration très élevée :  $8,50 \mu\text{g L}^{-1}$  dans l’extrait dilué au 1/400<sup>ème</sup>. Parmi les autres substances quantifiées dans les extraits, aucune n’est présente à une concentration suffisamment élevée par rapport à sa  $CE_{50}$  pour les deux espèces de microalgues testées. Pour autant, seule une part relativement faible de la toxicité des extraits a pu être expliquée, ce qui implique donc la présence dans l’extrait d’autres substances toxiques pour les microalgues testées. Contrairement à une approche basée sur l’EDA, aucun fractionnement des extraits n’a donc été réalisé afin d’identifier les substances responsables de la toxicité observée. C’est notre connaissance du site d’étude et de la potentielle toxicité des substances susceptibles d’être retrouvées qui a été exploitée. Cependant, cette approche n’a permis d’identifier qu’une seule substance expliquant partiellement la toxicité des extraits : la spiroxamine. On peut toutefois insister sur le fait que la toxicité de cette substance n’aurait pu être détectée via l’utilisation d’un test de toxicité ciblant spécifiquement l’inhibition du rendement photosynthétique : comme démontré dans l’article 4 (chapitre 4), la spiroxamine, malgré son importante toxicité, n’induit aucune diminution du rendement photosynthétique.

Afin de tenter d’identifier d’autres substances pouvant expliquer la toxicité des extraits de POCIS, des données issues d’analyses chimiques réalisées par d’autres équipes participant au projet PhytoCOTE ont été utilisées. Les Figures 68 et 69 présentent une partie des résultats obtenus dans le cadre du suivi de la contamination chimique des deux cours d’eau du site d’étude par le laboratoire LPTC-EPOC (UMR CNRS 5805, Université de Bordeaux ; post-doc de Juliette Gaillard). Pour ces analyses, 125 substances (pesticides et métabolites) ont été recherchées dans les extraits de POCIS (+PRC, utilisés pour le suivi de la contamination chimique sur le bassin versant de Marcillac). Il est important de préciser que dans les résultats présentés ci-dessous, seules les concentrations en  $\text{ng g}^{-1}$  de phase sont disponibles : seule une analyse qualitative est donc possible, ces concentrations étant une image déformée de la contamination du cours d’eau. Afin de faciliter la lecture de ces résultats, le Tableau 19 (ci-après), récapitule les principales statistiques réalisées sur ces analyses.

# Chapitre 5 – Utilisation d'extraits d'échantillonneurs passifs de type POCIS pour l'étude de la toxicité de mélanges environnementaux de pesticides sur deux microalgues marines

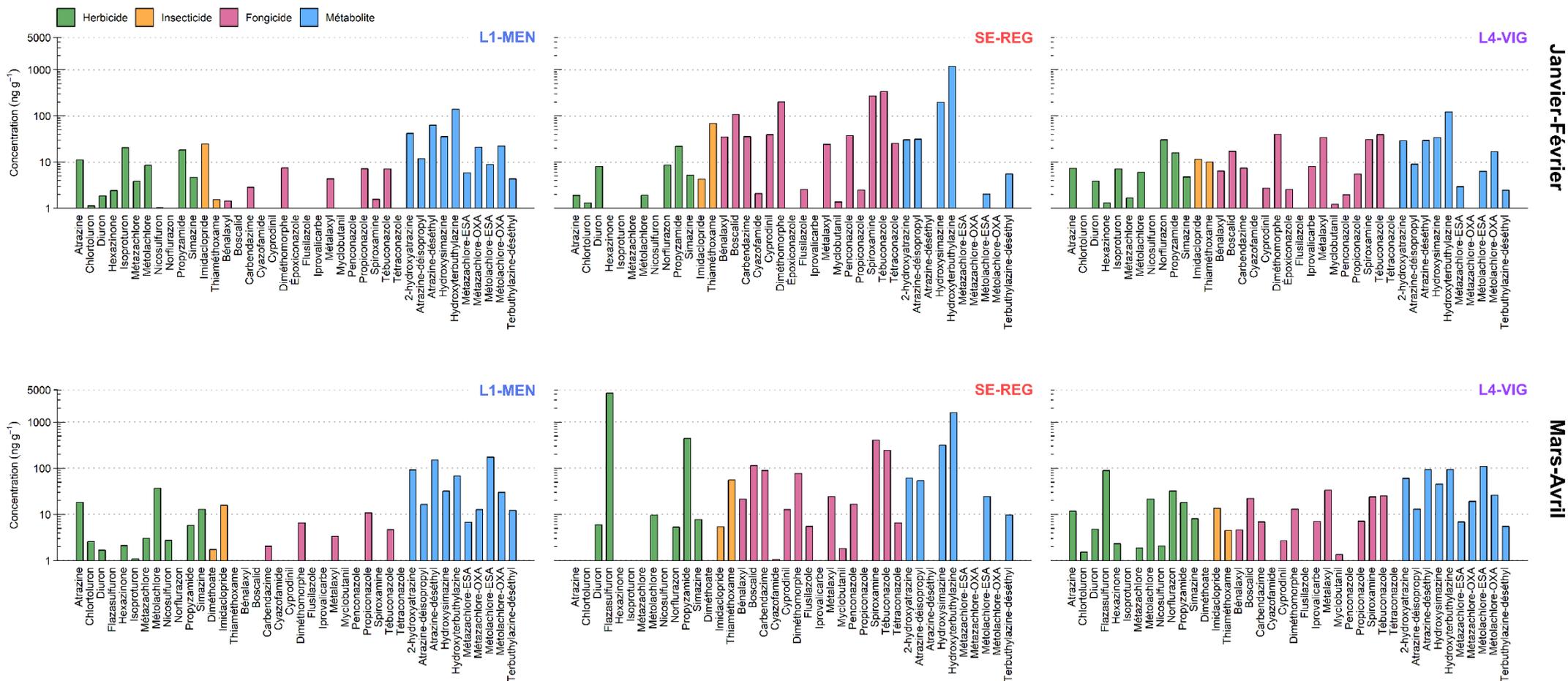


Figure 68 : Concentrations (uniquement > LQ, en ng g<sup>-1</sup> de phase, échelle logarithmique) des pesticides présents dans les extraits de POCIS « chimie » issus des stations L1-MEN, SE-REG et L4-VIG pour les périodes janvier-février et mars-avril. Données : LPTC-EPOC, J. Gaillard.

# Chapitre 5 – Utilisation d'extraits d'échantillonneurs passifs de type POCIS pour l'étude de la toxicité de mélanges environnementaux de pesticides sur deux microalgues marines

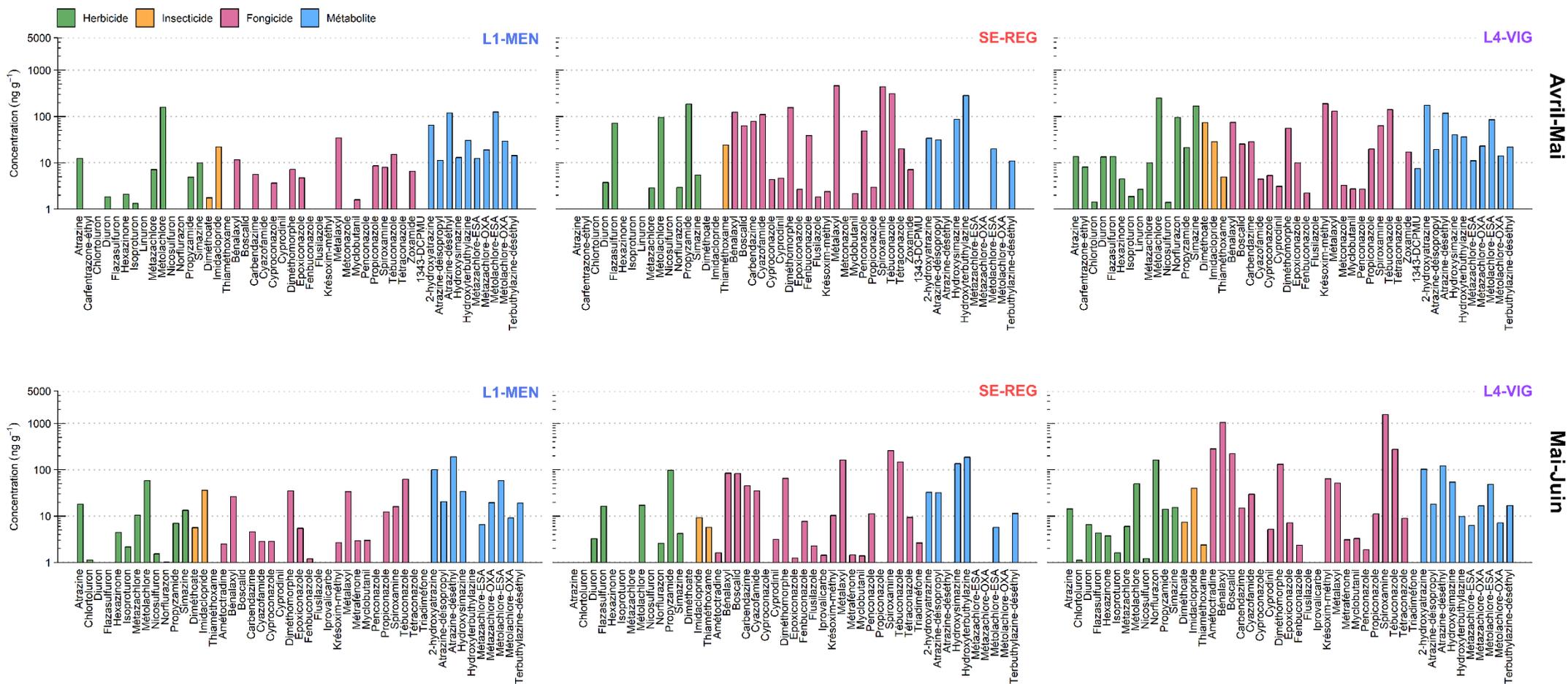


Figure 69 : Concentrations (uniquement > LQ, en ng g<sup>-1</sup> de phase, échelle logarithmique) des pesticides présents dans les extraits de POCIS « chimie » issus des stations L1-MEN, SE-REG et L4-VIG pour les périodes avril-mai et mai-juin. Données : LPTC-EPOC, J. Gaillard.

Tableau 19 : Résumé des analyses chimiques réalisées par le LPTC-EPOC. Nombre de pesticides quantifiés par usage et concentrations moyennes, maximales et totales pour les quatre périodes et les trois stations suivies.

Période	Nbr. pest. quantifiés (> LQ)				Concentration (ng g <sup>-1</sup> )		
	Herbicides	Insecticides	Fongicides	TOTAL	C <sub>moyenne</sub>	C <sub>max</sub>	ΣC <sub>TOT</sub>
<b>Jan-Fév</b>	26	6	34	66	40,9	1178	3724
<b>Mar-Avr</b>	27	6	29	62	107	4252	9454
<b>Avr-Mai</b>	29	6	48	83	50,3	459	5537
<b>Mai-Jun</b>	28	7	53	88	59,8	1551	6765
<b>Station</b>							
<b>L1-MEN</b>	38	8	38	84	22,8	192	2814
<b>SE-REG</b>	26	7	66	99	120	4252	14802
<b>L4-VIG</b>	46	10	60	116	50,4	1551	7865

Contrairement à ce que nous avons pu observer avec les analyses réalisées sur les extraits de POCIS dilués, c’est ici la période mars-avril qui présente la plus forte concentration moyenne, maximale et totale : cela est notamment dû à la présence de flazasulfuron en très forte quantité à la station SE-REG (4252 ng g<sup>-1</sup>, Figure 69). Cependant, la présence de cette substance, même à une très forte concentration ne permet pas d’expliquer davantage la toxicité des extraits, celle-ci n’ayant induit aucune toxicité dans la gamme de concentrations testées (1-1000 µg L<sup>-1</sup>) pour les deux espèces de microalgues (article 3, chapitre 4). Le nombre d’herbicides quantifiés reste constant pour les quatre périodes échantillonnées, alors que le nombre de fongicides quantifiés pour les périodes avril-mai et mai-juin est supérieur, ce qui corrobore une fois encore les résultats des enquêtes réalisées sur site (Figure 62). On peut notamment remarquer les fortes concentrations de deux fongicides, la spiroxamine et le bénomyl, à des concentrations supérieures à 1000 ng g<sup>-1</sup> pour la station L4 en mai-juin, ce qui corrobore la forte concentration de spiroxamine mesurée dans les extraits de POCIS dilués pour cette même station/période (Tableau 15, Figure 67).

Des différences importantes ont été obtenues entre les différentes stations échantillonnées. Un nombre supérieur d’herbicides a pu être retrouvé aux stations L1-MEN et L4-VIG (38 et 46) par rapport à la station SE-REG (26). Au contraire, une majorité de fongicides a été retrouvée aux stations SE-REG et L4-VIG (66 et 60) par rapport à la station L1-MEN (38). Des variations importantes au niveau des concentrations mesurées peuvent également être observées : la concentration moyenne pour la station L1 est deux fois plus faible qu’à la station L4-VIG et cinq fois plus faible qu’à la station SE-REG. Ces analyses pourraient donc indiquer une contamination par les pesticides plus élevée à la station SE-REG, ce que corrobore sa localisation géographique : cette station est située à l’exutoire du ruisseau des Souches, s’écoulant à proximité de plusieurs parcelles viticoles, et reçoit donc une quantité de produits phytosanitaires théoriquement supérieure par rapport aux autres stations. En revanche, cela pourrait également indiquer que ce ne sont pas les pesticides recherchés qui peuvent

expliquer la toxicité observée pour les extraits issus des stations L1 et L4 (hormis pour la période mai-juin). En effet, l’influence des pratiques phytosanitaires appliquées sur le BV expérimental semble limitée pour la station L1, alors que pour la station L4, une partie des pesticides retrouvés à la station SE sont inévitablement retrouvés en aval. La contamination du site L1 pourrait donc trouver son origine en amont. Pour appuyer cette hypothèse, les concentrations de plusieurs pesticides analysés dans du biofilm (prélevé sur site) pour la période mai-juin sont illustrées par la Figure 70.

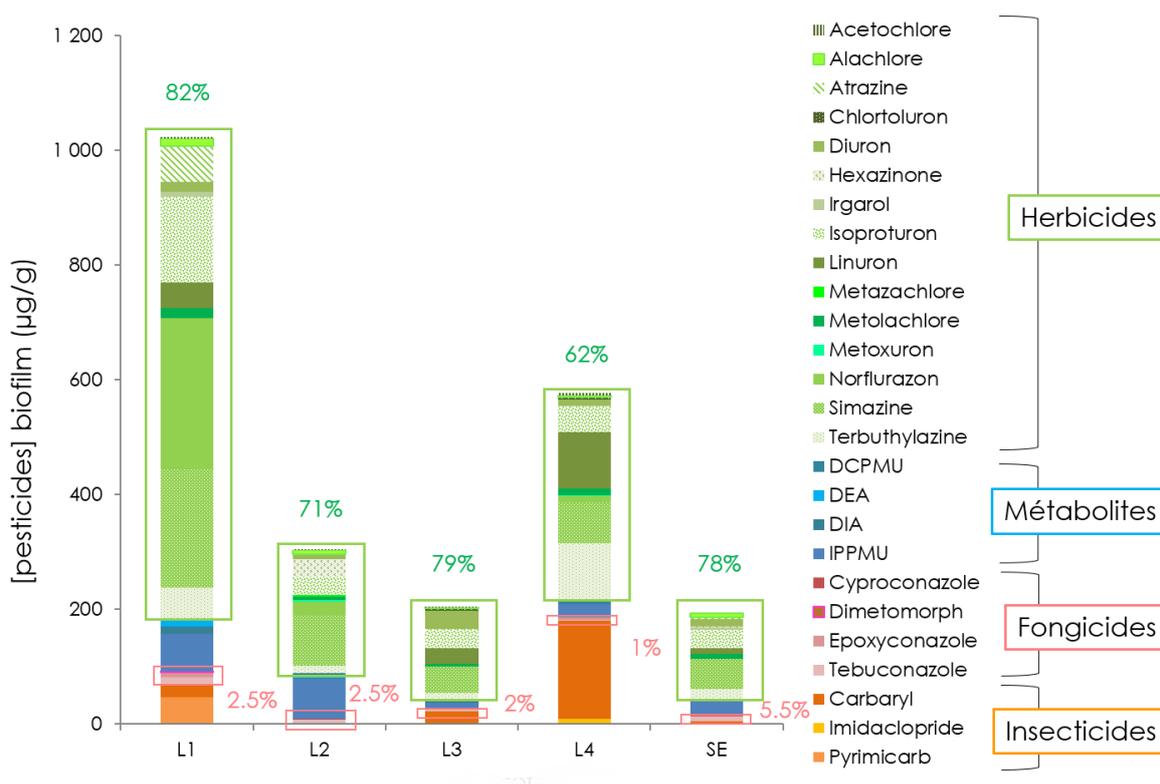


Figure 70 : Concentration de pesticides (en  $\mu\text{g g}^{-1}$  de biofilm) aux différentes stations suivies (+ L2 et L3, non suivies pour l’étude du potentiel toxique des extraits) pour la période mai-juin. Données : Irstea-Bordeaux, B. Chaumet.

Les concentrations en herbicides mesurées à la station L1 semblent bien plus élevées qu’aux autres stations. Ce point d’échantillonnage étant situé à l’entrée du bassin versant, il se pourrait donc qu’une source de contamination située en amont soit responsable de la toxicité observée pour les extraits issus de la station L1. Les quatre herbicides les plus concentrés dans le biofilm pour la période mai-juin étaient le norflurazon, la simazine (tous deux interdits en agriculture depuis 2009), l’isoproturon et le linuron (interdits en 2016 et 2017, respectivement). Les  $CE_{50}$  reportées pour le linuron, le norflurazon et la simazine vis-à-vis de la microalgue d’eau douce *R. subcapitata* sont de 16, 17,6 et 40  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivement (Lewis *et al.*, 2016). Les  $CE_{50}$  de l’isoproturon mesurées dans cette étude (article 3, chapitre 4) étaient de 8,6 et 21  $\mu\text{g L}^{-1}$  pour *T. lutea* et *S. marinoi*, respectivement. Du fait de ces  $CE_{50}$  relativement basses, ces pesticides peuvent être considérés comme des candidats potentiels pour expliquer la toxicité des extraits de POCIS issus du point L1. Néanmoins, il est important de

noter que les concentrations de ces quatre herbicides retrouvés dans le biofilm ne semblent pas toujours correspondre à ce qui a été observé pour les extraits de POCIS (Figure 69) : les concentrations semblaient supérieures pour le point L4, de plus, il s'agissait d'une majorité de fongicides, aussi bien au point L1 qu'au point L4. Il faut cependant garder à l'esprit que ces mesures ont été réalisées dans deux matrices différentes (biofilm *vs.* POCIS) et peuvent donc ne pas correspondre, du fait de l'affinité variable de ces substances pour les deux matrices. La plupart des herbicides recherchés, et notamment les quatre cités ci-dessus, agissent selon le même mode d'action, par inhibition de la photosynthèse au niveau du photosystème II : de fait, et comme cela a pu être illustré dans les articles 2 et 4 (chapitres 3 et 4), les mélanges contenant ces substances se comportent selon le principe d'additivité des concentrations (modèle CA) et agissent donc de manière additive par rapport à leur toxicité relative (*i.e.* leurs CE<sub>50</sub> respectives). La toxicité combinée de ces substances pourrait être calculée via une addition de leurs valeurs d'unités toxiques individuelles, cependant, cela n'est possible que pour des concentrations mesurées dans l'eau. Il serait donc intéressant d'obtenir les concentrations de tous les inhibiteurs du PSII dans le milieu de culture contaminé avec les extraits de POCIS pour les trois stations échantillonnées, afin de déterminer leur toxicité additionnée, et d'évaluer la participation relative de ces herbicides à la toxicité des extraits de POCIS, notamment pour L1.

Finalement, l'utilisation de données issues d'analyses chimiques complémentaires réalisées par des laboratoires participant au projet PhytoCOTE, n'ont pas permis, pour le moment, d'identifier d'autres substances (*i.e.* hormis la spiroxamine) expliquant la toxicité des extraits de POCIS. Néanmoins, certaines hypothèses peuvent être émises vis-à-vis des substances pouvant être responsables de la part de toxicité non expliquée. Par exemple, la présence de plusieurs herbicides inhibiteurs du PSII en quantité relativement importante dans le biofilm au niveau de la station L1 pour la période mai-juin, pourrait expliquer la toxicité des extraits issus de cette station. Une méthode, décrite dans plusieurs autres études (Muller *et al.*, 2007 ; Escher *et al.*, 2008a ; Vermeirssen *et al.*, 2009, 2010) pourrait potentiellement permettre d'identifier la part de toxicité spécifiquement issue des inhibiteurs du PSII, par réalisation de deux tests de toxicité supplémentaires sur les extraits de POCIS :

- d'une part, un test ciblant spécifiquement le mode d'action de ces substances, par la mesure de l'inhibition photosynthétique induite par les extraits de POCIS. Ce test pourrait être réalisé à l'aide d'un Maxi-Imaging PAM (Heinz Walz GmbH<sup>®</sup>) qui permet la mesure de l'activité photosynthétique en microplaques, et ne nécessite donc pas de réaliser une expérience supplémentaire ;

- d'autre part, un test de toxicité plus général, permettant d'identifier la toxicité « de base » (*baseline toxicity* en anglais) des extraits, par exemple basé sur l'inhibition de la bioluminescence bactérienne chez *Vibrio fischeri*.

Ensuite, il se pourrait également qu'une part de la toxicité des extraits de POCIS ait été induite par des substances autres que des pesticides. En effet, une majorité de substances pharmaceutiques ont également une affinité importante pour les POCIS et pourraient donc être présentes dans les extraits testés, bien que la localisation des stations échantillonnées ne permette théoriquement pas de suspecter la présence de ce type de substances en quantité importante. Néanmoins, plusieurs études ont pu démontrer la toxicité importante de certaines substances pharmaceutiques pour des microalgues marines, avec des CE<sub>50</sub> relativement basses : pour *Skeletonema pseudocostatum*, 28,1, 9,48 et 14,2 µg L<sup>-1</sup> pour le triclosan (antibactérien), la fluoxétine et la thioguanine (médicaments), respectivement (Petersen *et al.*, 2014) ; pour *Isochrysis galbana*, 34,1 et 24,1 µg L<sup>-1</sup> pour le triclosan et le 4-nonylphénol (détergent), respectivement (Tato *et al.*, 2018). En conséquence, ces substances, si elles sont présentes dans les extraits de POCIS en concentrations suffisantes, pourraient également expliquer en partie la toxicité observée. Ainsi, il aurait pu être intéressant d'utiliser une approche d'EDA sur nos extraits, bien que celle-ci soit aujourd'hui encore relativement lourde et délicate à appliquer.

## 2.5. Conclusion

Dans cette étude, le test de toxicité en microplaques précédemment appliqué aux études portant sur le criblage de toxicité de 17 pesticides (article 3, chapitre 4) et à l'étude des effets d'interaction de mélanges binaires (article 2, chapitre 3 et article 4, chapitre 4) a été utilisé pour évaluer la toxicité d'extraits de POCIS.

Pour les deux espèces de microalgues testées, la toxicité des extraits issus des trois stations échantillonnées était relativement similaire pour les deux premières périodes suivies (janvier-février et mars-avril) : cette toxicité pourrait donc correspondre à une « ligne de base » de toxicité. Pour la période suivante, avril-mai, la toxicité des extraits issus de la station L1-MEN a été multipliée par deux pour les deux microalgues, et celle de la station SE-REG était également plus de deux fois supérieure pour la diatomée *S. marinoi*. Pour la dernière période (mai-juin), c'est la toxicité des extraits L4-VIG qui a augmenté de manière significative, induisant la plus forte toxicité parmi toutes les stations et périodes testées, et ce pour les deux espèces de microalgues.

Les analyses chimiques réalisées sur les échantillons de milieu de culture contaminés avec les extraits de POCIS ont permis d'identifier une substance présente à des concentrations relativement élevées

et responsable d'une partie de la toxicité induite par les extraits de POCIS : un fongicide, la spiroxamine. Dans l'optique d'identifier d'autres substances ayant participé à la toxicité des extraits de POCIS, des données obtenues par des laboratoires partenaires du projet PhytoCOTE ont été utilisées, cependant, ces données n'ont pas permis d'identifier, pour le moment, d'autres substances pouvant expliquer la toxicité des extraits de POCIS.

Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer la part restante de la toxicité observée. D'une part, la présence d'herbicides de la famille des phénylurées ou des triazines, ont été retrouvées en quantité relativement importante dans le biofilm analysé à la station L1 pour la période mai-juin. Ces herbicides possédant un mode d'action similaire et potentiellement très toxique pour les microalgues (inhibiteurs du PSII), leur présence dans les extraits aurait pu induire une part significative de la toxicité observée, notamment à la station L1. D'autre part, une partie de la toxicité des extraits de POCIS pourrait également être expliquée par la présence de substances pharmaceutiques dans les extraits, celles-ci pouvant s'accumuler en quantités importantes dans les POCIS et étant relativement toxiques pour les microalgues. D'autres approches, comme l'EDA et/ou à la réalisation de bioessais ciblant des familles chimiques et/ou des modes d'action toxique spécifiques pourraient potentiellement permettre d'identifier d'autres substances ayant participé de manière majoritaire à la toxicité des extraits.

## 2.6. Matériel supplémentaire

Ci-après, deux tableaux résumant les différentes valeurs d’unités toxiques calculées pour les huit pesticides analysés dans les extraits de POCIS dilués dans le milieu de culture, pour les deux espèces de microalgues testées.

Tableau S5a : Récapitulatif des unités toxiques (TU), calculées pour chaque pesticide analysé dans les extraits de POCIS dilués dans le milieu de culture f/2 pour la microalgue *T. lutea*.

Période	Station	Dilution de l'extrait	Unités Toxiques (TU)								ΣTU extrait
			DIU	ISO	METZ	S-MET	AZO	KRE-M	QUI	SPI	
Jan-Fév	L1-MEN	200	0,05	0,04	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,006	0,09
		400	0,02	0,02	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	0,001	0,04
	SE-REG	400	0,06	0,001	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	< 0,001	< 0,001	<i>n.d.</i>	0,29	0,36
		L4-VIG	200	0,10	0,02	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,14
			400	0,05	0,01	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	0,06
	Mar-Avr	L1-MEN	400	0,02	0,002	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	< 0,001	< 0,001	<i>n.d.</i>	0,001
SE-REG		400	0,05	0,001	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	< 0,001	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	0,41	0,47
L4-VIG		400	0,07	0,002	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	< 0,001	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	0,02	0,10
Avr-Mai	L1-MEN	200	0,07	0,006	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,07	0,14
		800	0,02	0,002	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	< 0,001	< 0,001	<i>n.d.</i>	0,015	0,03
	SE-REG	800	0,03	< 0,001	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	< 0,001	< 0,001	<i>n.d.</i>	0,40	0,43
		L4-VIG	800	0,05	0,001	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	< 0,001	< 0,001	<i>n.d.</i>	0,04
Mai-Jun	L1-MEN	800	0,01	0,002	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	< 0,001	< 0,001	<i>n.d.</i>	0,01	0,03
		SE-REG	400	0,04	< 0,001	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	< 0,001	< 0,001	<i>n.d.</i>	0,48
	L4-VIG	200	0,12	0,004	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	< 0,001	< 0,001	< 0,001	5,30	5,42
		800	0,04	0,001	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	< 0,001	< 0,001	<i>n.d.</i>	1,26	1,30

Chapitre 5 – Utilisation d'extraits d'échantillonneurs passifs de type POCIS pour l'étude de la toxicité de mélanges environnementaux de pesticides sur deux microalgues marines

Tableau S5b : Récapitulatif des unités toxiques (TU), calculées pour chaque pesticide analysé dans les extraits de POCIS dilués dans le milieu de culture f/2 pour la microalgue *S. marinoi*.

Période	Station	Dilution de l'extrait	Unités Toxiques (TU)								ΣTU extrait
			DIU	ISO	METZ	S-MET	AZO	KRE-M	QUI	SPI	
Jan-Fév	L1-MEN	200	0,01	0,03	0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,002	0,04
		400	0,006	0,01	< 0,001	< 0,001	n.d.	n.d.	n.d.	< 0,001	0,02
	SE-REG	400	0,02	0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	n.d.	0,08	0,10
		L4-VIG	200	0,03	0,02	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,04
	400		0,02	0,008	< 0,001	< 0,001	n.d.	n.d.	n.d.	0,02	0,04
	Mar-Avr	L1-MEN	400	0,006	0,002	< 0,001	0,001	< 0,001	< 0,001	n.d.	< 0,001
SE-REG		400	0,02	0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	n.d.	n.d.	0,11	0,13
L4-VIG		400	0,02	0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	n.d.	n.d.	0,006	0,03
Avr-Mai	L1-MEN	200	0,02	0,004	< 0,001	0,009	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,02	0,05
		800	0,005	0,001	< 0,001	0,002	< 0,001	< 0,001	n.d.	0,004	0,01
	SE-REG	800	0,01	< 0,001	< 0,001	0,001	< 0,001	< 0,001	n.d.	0,11	0,12
		L4-VIG	800	0,02	0,001	< 0,001	0,002	< 0,001	0,001	n.d.	0,01
Mai-Jun	L1-MEN	800	0,004	0,001	< 0,001	0,001	< 0,001	< 0,001	n.d.	0,003	0,01
		SE-REG	400	0,01	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	n.d.	0,13	0,14
	L4-VIG	200	0,04	0,003	0,001	0,002	< 0,001	0,002	< 0,001	1,44	1,48
		800	0,01	0,001	< 0,001	0,001	< 0,001	< 0,001	n.d.	0,34	0,36

## Chapitre 6 – Synthèse générale et perspectives

---



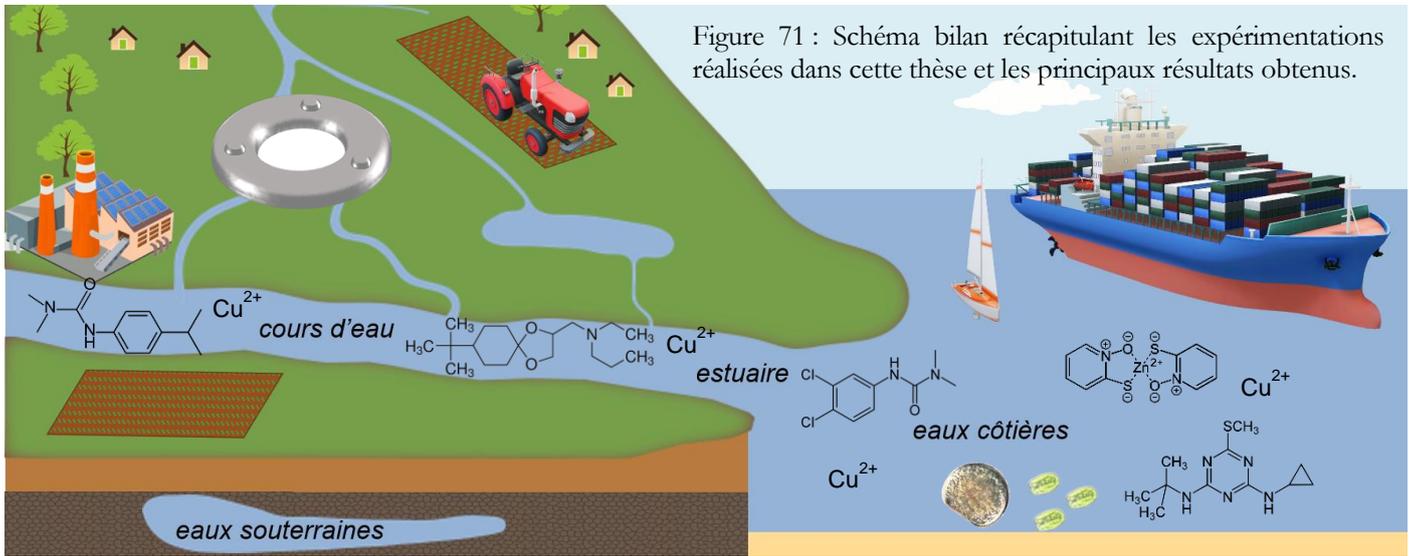
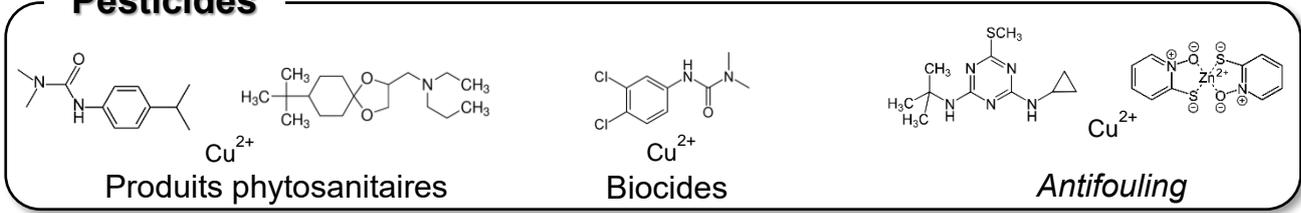


Figure 71 : Schéma bilan récapitulant les expérimentations réalisées dans cette thèse et les principaux résultats obtenus.

### Pesticides



### Criblage de toxicité

#### Microalgues

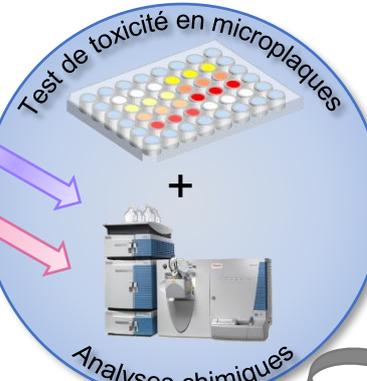
✓ Détermination des  $CE_{50}$   
Substances les plus toxiques :

- diuron
- isoproturon
- spiroxamine
- irgarol
- ZnPT
- CuPT

#### Larves d'huître

✓ Détermination des  $CE_{50}$   
Substances les plus toxiques :

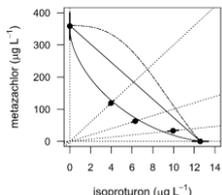
- acrinathrine
- azoxystrobine
- spiroxamine
- diuron
- $Cu^{2+}$



#### Mélanges binaires

- ✓ Isobogrammes
- ✓ Outil MIXTOX

Effets d'interaction



Mélanges synergiques

- ZnPT +  $Cu^{2+}$
- isoproturon + métrazachlore

#### Physiologie

PAM-fluorescence et cytométrie en flux

- ✓ Rendement photosynthétique
- ✓ Viabilité
- ✓ Potentiel membranaire
- ✓ Contenu lipidique
- ✓ ERO<sup>1</sup>

#### Extraits de POCIS

Mélanges complexes issus du site d'étude

Détermination de  $FD_{50}$

Évolution spatio-temporelle de la toxicité

Identification d'une substance responsable de la toxicité des extraits

spiroxamine

#### LPTC-EPOC

- ✓ Contamination du site d'étude
- ✓ Criblage SMHR<sup>2</sup>

Données partenaires  
PhytoCOTE

Identification d'autres substances ?

<sup>1</sup> espèces réactives de l'oxygène ; <sup>2</sup> spectrométrie de masse haute-résolution

La pollution environnementale engendrée par l'utilisation des pesticides est l'un des enjeux majeurs du 21<sup>ème</sup> siècle. Conscientes de la toxicité de ces substances pour l'environnement et la santé humaine, les autorités compétentes ont initié de multiples mesures, tant au niveau national (*e.g.* Ecophyto II, dispositifs DEPHY, loi Labbé) qu'européen (*e.g.* REACH, DCE, DCSMM), dans l'optique de réduire l'utilisation de ces substances et de documenter au mieux leurs effets. Les travaux présentés dans ce manuscrit de thèse viennent ajouter une pierre à l'édifice (Figure 71).

Dans cette étude, deux types de pollutions ont été étudiées : d'un côté, la toxicité de substances anti-salissures présentes dans les peintures appliquées sur les coques de bateaux, touchant majoritairement les eaux côtières et notamment les zones portuaires et les marinas (Cozic et Durand, 2013) ; d'un autre côté, la toxicité de substances phytosanitaires utilisées en viticulture. Bien que la pollution viticole prenne sa source dans les cours d'eau situés à proximité des parcelles, il a été démontré que les substances phytosanitaires utilisées en agriculture pouvaient également être retrouvées jusque dans les estuaires et les eaux côtières (Caquet *et al.*, 2013 ; Cruzeiro *et al.*, 2015). Tout au long de ce continuum, ces substances vont donc se combiner en mélanges complexes qui seront eux-mêmes altérés par les conditions environnementales biotiques et abiotiques des différents milieux traversés. Les organismes qui vivent dans les écosystèmes aquatiques exposés à cette contamination peuvent être affectés de manière significative (Pesce *et al.*, 2010 ; Kim Tiam *et al.*, 2014a), perturbant par la même occasion le fonctionnement de ces écosystèmes.

Dans ce contexte, l'un des objectifs majeurs de cette thèse consistait à évaluer la toxicité induite par ces deux types de pollution pour des microalgues marines, en testant aussi bien (i) des substances *antifouling* et phytosanitaires seules ou (ii) en mélanges binaires, ainsi que (iii) des mélanges complexes constitués d'extraits de POCIS issus d'un bassin versant à influence majoritairement viticole. En parallèle, la toxicité de produits phytosanitaires testés seuls a également été évaluée sur le développement larvaire d'un consommateur primaire associé aux microalgues marines et constituant une ressource écologique et économique non négligeable : l'huître creuse.

Ce dernier chapitre synthétise les travaux présentés dans ce manuscrit en discutant puis en mettant en perspectives les résultats obtenus. Il permet également de mettre en relation les principaux résultats obtenus dans cette thèse avec certains objectifs du projet PhytoCOTE (ANR-10-LABX-45) qui constituait le cadre de ces travaux, et notamment le volet « aquatique » du groupe de tâches n°2 « Devenir, transfert et impact des produits phytosanitaires ».

## 1. Toxicité des pesticides seuls

### 1.1. Application d'un test de toxicité en microplaques pour l'étude de la toxicité de pesticides

Dans ces travaux de thèse, un criblage de toxicité de 21 substances (biocides, *antifouling*s et produits phytosanitaires) a été réalisé sur des microalgues marines via l'utilisation d'un test de toxicité en microplaques. Le but de ces expérimentations était de déterminer la toxicité de ces substances en calculant pour chacune d'entre elles une valeur de CE<sub>50</sub> (Tableau 20). La mise au point, l'optimisation et l'application de ce test, ont donc été motivées par la nécessité de disposer d'une capacité de criblage suffisante pour mener à bien ces travaux de thèse. Par la suite, ce test a également été utilisé pour l'étude de la toxicité de mélanges binaires ainsi que d'extraits de POCIS. Il était en effet impensable de réaliser un criblage de toxicité en utilisant des ballons de culture, au vu du nombre de substances considérées et de la nécessité de tester un minimum de cinq concentrations en triplicats pour la détermination des CE<sub>50</sub>.

Tableau 20 : Récapitulatif des CE<sub>50</sub> (en µg L<sup>-1</sup>, ± IC<sub>95</sub>) pour chacun des 21 pesticides testés sur les microalgues *T. lutea*, *S. marinoi* et *T. suecica*, issues des différentes expérimentations menées durant ces travaux de thèse.

Classe	Substance	Autorisation	CE <sub>50</sub> en µg L <sup>-1</sup>		
			<i>T. lutea</i>	<i>S. marinoi</i>	<i>T. suecica</i>
Biocides	diuron	approuvé <sup>1</sup>	2,20 ± 0,071	7,26 ± 1,23	4,20 ± 0,12
	irgarol	interdit	0,34 ± 0,05	0,85 ± 0,03	0,62 ± 0,04
	isoproturon	approuvé <sup>1</sup>	8,55 ± 3,39	21,2 ± 1,80	
	fipronil	approuvé <sup>2</sup>	<i>pas d'effet</i> <sup>3</sup>		
<i>Antifouling</i> s	ZnPT		1,25 ± 0,07	1,98 ± 0,05	256 ± 18,1
	CuPT	approuvé	1,21 ± 0,04	1,16 ± 0,02	18,0 ± 1,46
	CuSO <sub>4</sub>		703 ± 28,8	1105 ± 48,3	1449 ± 45,6
Herbicides	diquat dibromide		<i>pas d'effet</i>		
	flazasulfuron				
	métazachlore	approuvé	<i>pas d'effet</i>	245 ± 24,7	
	S-métolachlore			1032 ± 138	
	glyphosate				
AMPA		<i>pas d'effet</i>			
Insecticides	α-cyperméthrine				
	acrinathrine		<i>pas d'effet</i>		
	chlorpyrifos	approuvé			
	chlorpyrifos-méthyl		449 ± 6,70	<i>pas d'effet</i>	
imidaclopride		<i>pas d'effet</i>			
Fongicides	azoxystrobine		434 ± 144	917 ± 189	
	krésoxim-méthyl	approuvé	414 ± 65	482 ± 56,9	
	quinoxyfen		378 ± 29,6	33,0 ± 8,49	
	spiroxamine		3,37 ± 0,74	12,4 ± 5,63	

<sup>1</sup> approuvé comme agent de protection des films et matériaux de construction ; <sup>2</sup> approuvé comme insecticide, acaricide et autres produits de contrôle des arthropodes, en dehors des usages agricoles (European Chemicals Agency, 2018) ; <sup>3</sup> pas d'effet dans la gamme de concentrations testées (nominal théorique : 1 à 1000 µg L<sup>-1</sup>).

Toutes les  $CE_{50}$  déterminées sont dans la gamme de celles précédemment rapportées dans le Tableau 3 (section 4.4.2, chapitre 1). Cette bonne correspondance avec d'autres valeurs tirées de la littérature scientifique (et des bases de données) nous a permis de démontrer la fiabilité du test en microplaques ainsi optimisé. De multiples expériences préliminaires ont été réalisées dans le but d'optimiser au mieux ce test en microplaques, mais également afin d'en identifier les limites. Certaines, comme « l'effet bord », ou l'évaporation excessive du milieu de culture (St-Laurent *et al.*, 1992 ; Blaise *et al.*, 1997) ont pu être résolues ; d'autres en revanche sont inextricablement liées à ce système de test, à commencer par le matériau plastique (polystyrène) favorisant l'adsorption des substances hydrophobes sur les parois et pouvant entraîner en conséquence une surestimation de la concentration d'exposition (*i.e.* une sous-estimation de la toxicité ; Hörnström, 1990 ; Stadnicka-Michalak *et al.*, 2014). Il convient donc d'identifier ces biais afin d'en tenir compte dans l'interprétation des résultats. C'est notamment pour cette raison que les concentrations en pesticides dans les puits des microplaques ont été mesurées par dilution isotopique : cela nous a permis de mettre en évidence des différences significatives entre les concentrations d'exposition nominales et réelles. De surcroît, la réalisation d'analyses chimiques en complément du test de toxicité en microplaques constitue également un des points forts de cette thèse : les  $CE_{50}$  ont pu être calculées en utilisant les concentrations réelles d'exposition (mesurées au début de l'expérimentation), et peuvent donc être considérées comme particulièrement fiables. Malgré ces points forts, nous avons aussi pu démontrer que ce test n'est pas forcément adapté lorsqu'il s'agit d'évaluer la toxicité de substances très hydrophobes ( $\log K_{ow} > 4$ ), comme l' $\alpha$ -cyperméthrine ou l'acrinathrine. Il faudra dans ce cas se tourner vers des techniques d'exposition par dosage passif, permettant de tester les substances très hydrophobes jusqu'à leur limite maximale de solubilité (Brown *et al.*, 2001 ; Vicquelin *et al.*, 2011 ; Stibany *et al.*, 2017a, 2017b). Au même titre, nous avons démontré que l'évaluation du taux de croissance par la mesure de la fluorescence de la chlorophylle *a* pouvait être biaisée dans le cas où la substance testée altérerait de manière significative la quantité et/ou la fluorescence des pigments chlorophylliens. Une des solutions permettant de s'affranchir de ce biais consiste à mesurer directement la densité cellulaire, par exemple par cytométrie en flux. Toutefois, ce genre de mesure n'est pas réalisable quotidiennement en microplaques du fait du volume d'analyse nécessaire (50  $\mu$ L) trop important par rapport au volume total des puits (1,00 mL). Surtout, réaliser ce genre d'analyse avec des microplaques rendrait caduque leur principal avantage : une évaluation rapide de la croissance pour un grand nombre de conditions simultanément. Une autre alternative à la mesure de la fluorescence est la densité optique (DO), mesurable en microplaques et également corrélée à la croissance des microalgues. Cependant, la DO présente le désavantage d'être nettement moins sensible que la fluorescence. En effet, la mesure de la croissance par la DO fut envisagée lors des

expérimentations préliminaires réalisées pour le développement du test en microplaques, cependant, aucun signal ne pouvait être obtenu avec les faibles densités cellulaires utilisées en début d'expérimentation ( $20\,000\text{ cellules mL}^{-1}$ ). Enfin, l'application de ce test en microplaques ne permet pas d'évaluer la toxicité sur un paramètre autre que la croissance, le faible volume de culture présent dans les puits limite la quantité de matériel biologique disponible pour la réalisation d'analyses plus poussées. C'est pourquoi, certaines expérimentations ont été réalisées en ballons de culture afin de disposer d'un volume de culture et donc de quantité de matériel biologique suffisante pour permettre d'évaluer les effets toxiques des substances sur la physiologie des microalgues (voir section suivante).

En parallèle des expérimentations réalisées sur les microalgues marines, un autre objectif de cette thèse visait à réaliser le criblage de toxicité des mêmes pesticides (hormis les *antifoulings*) sur la larve de l'huître creuse *C. gigas*. Pour cet organisme, le test de toxicité est un test normalisé visant à évaluer les effets sur le développement embryon-larvaire de *C. gigas* après 24 h de développement (stade larve D). Pour les mêmes raisons que celles évoquées dans le paragraphe précédent, nous avons également décidé de réaliser ce test dans des microplaques, d'autant plus que leur utilisation est suggérée dans la norme actuelle relative à ce test de toxicité (ISO 17244:2015, 2015). Cependant, la mise en œuvre de ce test de toxicité s'est avérée plus délicate pour les larves d'huître. Bien que les expérimentations aient été répétées plusieurs fois, le jeu de données d'une seule expérimentation a pu être exploité. Outre la difficulté de recevoir des lots de géniteurs (et donc de gamètes) toujours de qualité, plusieurs points nécessitent d'être améliorés pour optimiser la réalisation du test embryon-larvaire en microplaques. Notamment, l'utilisation d'enceintes thermostatées dédiées permettrait d'avoir un meilleur contrôle sur les paramètres d'exposition (température, lumière, humidité) et pourrait améliorer significativement la reproductibilité de ces expérimentations.

## 1.2. Quels sont les pesticides les plus toxiques ?

Les  $CE_{50}$  calculées pour chaque pesticide (biocides, *antifoulings* et produits phytosanitaires) ayant induit une toxicité suffisante dans la gamme de concentrations testées nous permettent d'établir un classement de la toxicité des pesticides sélectionnés. Le pesticide le plus toxique pour les trois espèces de microalgues testées<sup>7</sup> était l'irgarol avec une  $CE_{50}$  inférieure à  $1\ \mu\text{g L}^{-1}$ . Notons également que, bien qu'aucune  $CE_{50}$  n'ait pu être calculée dans l'article 1 (chapitre 3), cette substance s'est également montrée très toxique pour la quatrième espèce testée dans ces travaux de thèse : *C. calcitrans*. On retrouve ensuite deux substances *antifouling*, le ZnPT et le CuPT (hormis pour *T. suecica*, moins

---

<sup>7</sup> Quatre espèces de microalgues ont été utilisées dans ces travaux de thèse, cependant, la toxicité des 21 pesticides sélectionnés n'a été évaluée que pour *T. lutea* et *S. marinoi*. Pour *T. suecica*, seuls cinq substances (biocides et *antifoulings*) ont été testées dans le but de déterminer une  $CE_{50}$ . Aucune  $CE_{50}$  n'a été déterminée pour *C. calcitrans*.

sensible à ces deux substances par rapport aux deux autres espèces). Puis, le diuron et l'isoproturon, ainsi que la spiroxamine, un fongicide utilisé en viticulture. Concernant les autres substances pour lesquelles une  $CE_{50}$  a pu être calculée, leur toxicité est généralement bien inférieure à celle des substances précédemment citées, mis à part celle du quinoxifène pour la diatomée *S. marinoi*. Sept pesticides n'ont induit aucune toxicité dans la gamme de concentrations testées : cette absence de toxicité pourrait s'expliquer par un mode d'action *a priori* non-toxique pour les microalgues, notamment pour les quatre insecticides. En ce qui concerne les trois herbicides, leurs modes d'action ciblent probablement des structures (EPSP synthase, ALS synthase) davantage importantes chez les végétaux supérieurs que chez les microalgues, à l'exception du diquat qui cible le PSI. Leur absence de toxicité pourrait également s'expliquer par leurs propriétés physico-chimiques : quatre sont hydrophiles, voire très hydrophiles ( $-4,60 < \log K_{OW} < 0,57$ ) et trois sont hydrophobes ( $3,75 < \log K_{OW} < 5,50$ ). Les analyses chimiques réalisées nous ont permis de démontrer que les concentrations testées pour les substances les plus hydrophobes étaient largement inférieures aux concentrations visées. En conséquence, pour remettre cette observation en perspective avec ce qui a été discuté dans le paragraphe précédent, il serait préférable d'évaluer la toxicité de ces substances en utilisant une méthode d'exposition par dosage passif. Concernant les autres substances, il se pourrait que leur caractère très hydrophile entrave leur capacité à traverser la membrane plasmique des cellules de microalgues, expliquant ainsi en partie l'absence de toxicité observée. En effet, deux études basées sur les relations quantitatives structure-activité (*quantitative structure-activity relationship*, QSAR en anglais) ont démontré qu'il existe une corrélation positive entre l'hydrophobicité (mesurée via le  $\log K_{OW}$ ) et la toxicité pour des composés nitroaromatiques et des acides benzoïques chez les microalgues *S. vacuolatus* et *R. subcapitata* (Schmitt *et al.*, 2000 ; Lee et Chen, 2009). Une telle corrélation n'a cependant pas pu être observée pour les pesticides testés dans ces travaux.

Cette synthèse nous permet également de mettre en évidence le fait que les cinq substances les plus toxiques pour *T. lutea* et *S. marinoi* sont, ou étaient, des substances utilisées comme *antifouling*s. Cela n'a rien de surprenant puisque ces substances sont destinées à empêcher la colonisation des coques de bateaux, ou d'autres structures immergées, par les organismes aquatiques, dont les microalgues (OMI, 2018). Du fait de leur toxicité avérée pour les organismes aquatiques, certaines de ces substances ont fait l'objet d'une réduction (diuron et isoproturon), voire d'une interdiction (irgarol) de leur utilisation, afin de limiter leurs impacts sur l'environnement (Tableau 20). Nonobstant, le diuron, interdit depuis 2008 pour des usages agricoles, compte encore parmi les substances les plus retrouvées dans certaines régions françaises, aussi bien dans les eaux de ruissellement que dans les eaux souterraines, démontrant sa persistance dans l'environnement (Pinasseau *et al.*, 2018). En ce qui concerne le milieu marin, plusieurs études ont pu démontrer que les particules de peintures *antifouling*,

notamment générées lors des opérations de maintenance et de nettoyage des coques de bateaux (Links *et al.*, 2006), représentent une source de contamination durable : du diuron, de l'irgarol et du cuivre ont ainsi été retrouvés dans des sédiments contaminés par des particules de peintures (Turner, 2010 ; Soroldoni *et al.*, 2017, 2018). En conséquence, bien qu'interdites en Europe, ces substances pourraient aujourd'hui encore représenter un potentiel risque de toxicité pour le milieu marin. De surcroît, si l'on élargit les perspectives de cette étude au reste du monde, le diuron est par exemple encore autorisé aux États-Unis, ainsi qu'en Australie où ses effets délétères sur la grande barrière de corail ont pourtant été mis en évidence par de nombreuses études (Lewis *et al.*, 2009 ; Shaw *et al.*, 2009 ; Holmes, 2012). Notamment, dans une étude récente réalisée par O'Brien *et al.* (2016) sur la période 2011-2013, du diuron a pu être mesuré à des concentrations moyennées dans le temps (TWA, *time-weighted average concentrations*, obtenues avec des échantillonneurs passifs) maximales de 12,80 et 2,02  $\mu\text{g L}^{-1}$  en amont et dans les eaux estuariennes de la crique Barratta (Australie). De la même façon, l'irgarol a pu être mesuré à une concentration moyenne bien supérieure aux  $\text{CE}_{50}$  déterminées dans cette étude ( $2,00 \pm 1,20 \mu\text{g L}^{-1}$ ) dans les eaux côtières de Singapour (Basheer *et al.*, 2002). Ces études mettent en évidence la nécessité de continuer à s'intéresser à ces substances, qui, bien qu'interdites en Europe, sont retrouvées dans certains environnements aquatiques à des concentrations proches, voire supérieures, aux  $\text{CE}_{50}$  déterminées dans cette thèse. Enfin, on peut également souligner la forte toxicité de trois substances actuellement autorisées en Europe : les *antifoulings* ZnPT et CuPT et le fongicide spiroxamine. Ces substances, de par leur forte toxicité pour les microalgues marines testées, pourraient présenter un risque pour les écosystèmes exposés, d'autant plus que très peu de données sont disponibles concernant leurs concentrations environnementales. De surcroît, nous présentons dans ce manuscrit l'une des premières études (en dehors des valeurs de toxicité standards disponibles dans les bases de données) s'intéressant à la toxicité de la spiroxamine pour les microalgues marines. Ainsi nous mettons en évidence la nécessité de s'intéresser aux substances encore peu étudiées aujourd'hui et donc l'intérêt de développer un outil permettant de réaliser un criblage de toxicité fiable et performant.

Concernant la toxicité des pesticides pour les larves de l'huître creuse *C. gigas*, bien que nous ayons rencontré plusieurs déconvenues avec l'application du test de toxicité embryon-larvaire dans ces travaux de thèse, nous avons néanmoins pu identifier trois pesticides très toxiques : l'insecticide acrinathrine et les fongicides azoxystrobine et spiroxamine, avec des  $\text{CE}_{50}$  proches de ou inférieures à  $0,10 \mu\text{g L}^{-1}$ . Le diuron ainsi que le cuivre se sont également avérés relativement toxiques pour le développement embryon-larvaire de *C. gigas*, avec des  $\text{CE}_{50}$  inférieures à  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ . Nous pouvons insister sur le fait que les trois substances identifiées comme les plus toxiques pour le développement embryon-larvaire de l'huître creuse, n'avaient encore jamais été testées sur ce modèle biologique. Ces

pesticides se sont avérés plus embryotoxiques que le cuivre (toxique de référence) et le diuron, sur lequel le laboratoire d'écotoxicologie a beaucoup travaillé. Notons également que des concentrations d'azoxystrobine de 2,15 et 0,35  $\mu\text{g L}^{-1}$ , bien supérieures à la  $\text{CE}_{50}$  calculée dans cette étude, ont été mesurées dans le lagon Ria Formosa au Portugal au printemps et en été, respectivement (Cruzeiro *et al.*, 2015). De surcroît, ces fortes concentrations coïncident avec la période de reproduction de l'huître creuse, et pourraient donc s'avérer particulièrement dangereuses pour la reproduction de cette espèce.

L'évaluation de la toxicité sur le taux de croissance des microalgues présente l'intérêt d'intégrer les différents effets toxiques induits par les substances testées : les  $\text{CE}_{50}$  déterminées permettent ainsi d'avoir une appréciation de la toxicité générale des substances étudiées pour les microalgues testées. De manière analogue, l'observation des effets sur le développement embryon-larvaire de l'huître nous renseigne sur la toxicité des substances pour un stade particulièrement sensible de leur développement. Nous pouvons conclure, sur la base des effets toxiques observés, que la pollution par les pesticides reste donc une problématique d'actualité et un enjeu au niveau mondial concernant la qualité de l'environnement.

En revanche, la seule observation des effets sur la croissance (pour les microalgues) ou le développement embryon-larvaire (pour les huîtres) ne permet pas de déterminer quelles sont les fonctions physiologiques impactées suite à l'exposition à ces substances, ni quelles sont les capacités d'adaptation de ces organismes face à un stress induit par une pollution.

### 1.3. Qu'apporte l'étude des effets sur la physiologie ?

Dans l'article 1 (chapitre 3) et l'article 4 (chapitre 4) de ce manuscrit, nous nous sommes intéressés aux impacts induits par certains pesticides sur quelques paramètres liés à la physiologie des microalgues testées. Pour évaluer ces effets, des expérimentations spécifiques ont été réalisées afin d'obtenir suffisamment de matériel biologique pour réaliser ces analyses par PAM-fluorescence et cytométrie en flux. De manière analogue, une expérimentation visant à évaluer les impacts génotoxiques des pesticides les plus toxiques pour la larve d'huître a été entreprise (section 4.3.3, chapitre 4).

Nous avons pu démontrer que l'exposition des microalgues marines aux inhibiteurs du PSII (diuron, irgarol et isoproturon) induit une diminution significative du rendement photosynthétique. Celle-ci s'accompagne systématiquement d'une réduction de la quantité relative de lipides de réserve (mesurée par marquage au  $\text{BODIPY}^{505/515}$ ), probablement engendrée par une réduction de la production de

l'ATP et des précurseurs nécessaires à la biosynthèse des lipides (Masojídek *et al.*, 2004). Pour l'espèce *T. suecica*, l'exposition au diuron et à l'irgarol s'accompagnait également d'une augmentation significative de la quantité d'ERO, mesurée par marquage des cellules au H<sub>2</sub>DCFDA. Ce résultat n'a cependant pas pu être reproduit avec les autres microalgues : au contraire, une tendance inverse a pu être observée avec les deux diatomées, *C. calcitrans* et *S. marinoi*. Afin d'expliquer ces différences, nous avons, dans l'article 1, proposé l'hypothèse selon laquelle cette réponse pourrait refléter l'activation d'un système antioxydant performant permettant la prise en charge des ERO chez les diatomées (Pennington *et al.*, 1988 ; Sachindra *et al.*, 2007 ; Xia *et al.*, 2013). Cependant, les mesures réalisées dans l'article 4 (chapitre 4) nous ont conduit à émettre certaines réserves quant à la fiabilité de ce fluorochrome pour la mesure des ERO. En conséquence, des mesures complémentaires de l'activité de certaines enzymes comme la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) ou la glutathione-S-transférase (GST), pourraient permettre de statuer quant au stress oxydatif induit par les inhibiteurs du PSII. En effet, une étude a pu démontrer l'augmentation significative de l'activité des enzymes précédemment citées, après exposition de la microalgue *Scenedesmus obliquus* à l'atrazine, un autre inhibiteur du PSII (Mofeed et Mosleh, 2013). L'accumulation d'ERO dans le cytoplasme des cellules pouvant induire des dommages aux constituants cellulaires (Knauert et Knauer, 2008), la démonstration de leur accumulation en réponse à une exposition aux inhibiteurs du PSII pourrait permettre d'expliquer une part supplémentaire de la toxicité de ces substances.

Concernant la spiroxamine et le métazachlore, pour lesquels les effets sur la physiologie ont également été évalués, nous n'avons que peu, voire pas d'*a priori* sur la toxicité pouvant être induite et sur les mécanismes physiologiques impliqués dans cette toxicité. Étant donné la forte toxicité de la spiroxamine pour *T. lutea* et *S. marinoi*, il apparaissait primordial d'améliorer notre compréhension de son mode d'action toxique. Pour le métazachlore, la synergie résultant de son mélange avec l'isoproturon (discutée plus loin dans ce chapitre) rendait également nécessaire l'étude des effets de cette substance sur la physiologie de la diatomée *S. marinoi*, dans l'optique d'expliquer les mécanismes qui sous-tendent cette interaction. Les mesures réalisées sur les différents paramètres physiologiques suivis nous ont permis de mettre en évidence une augmentation significative de la quantité relative de lipides de réserve et d'ERO, témoignant d'un stress général induit par ces substances. Nous avons également mis en évidence une dépolarisation membranaire significative chez les cellules exposées à la spiroxamine, impliquant probablement des effets délétères au niveau de la membrane plasmique pouvant s'expliquer par l'inhibition de la synthèse des stérols (Haines, 2001 ; Ohvo-Rekilä *et al.*, 2002). Concernant le métazachlore, la déplétion en VLCFA (acides gras à très longue chaîne carbonée) pourrait avoir engendré une modification de la morphologie des thylakoïdes expliquant la diminution du rendement photosynthétique observée (Schneider et Kohlwein, 1997 ; Millar *et al.*, 1998 ; Thakkar

*et al.*, 2013). L'observation microscopique de l'ultrastructure des membranes plasmiques et thylakoïdiennes des cellules exposées à la spiroxamine et au métazachlore permettrait de valider l'hypothèse d'une toxicité induite par un effet délétère sur ces structures cellulaires. Il pourrait également être envisagé de réaliser une mesure précise de la composition en stérols et VLCFA, par exemple par CG-DIF (chromatographie gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme ; da Costa *et al.* 2017) afin de confirmer l'inhibition de ces lipides chez les microalgues exposées à la spiroxamine et au métazachlore. Une telle analyse pourrait également être envisagée pour des microalgues exposées à des inhibiteurs du PSII, leurs effets sur le rendement photosynthétique affectant également la quantité relative de lipides. Pour aller encore plus loin, on pourrait imaginer de réaliser une expérience de transfert trophique avec des microalgues exposées à ces substances afin d'évaluer l'impact de la diminution du contenu lipidique sur la qualité nutritive des microalgues, et donc sur les niveaux trophiques supérieurs.

L'étude des effets toxiques des pesticides sur la physiologie des microalgues a permis d'améliorer considérablement notre compréhension de leur mode d'action toxique. Dans ces travaux, l'étude du mode d'action toxique des pesticides testés a été réalisée via des marqueurs fluorescents spécifiques par cytométrie en flux. Les avancées récentes en biologie moléculaire (génomique, transcriptomique, métabolomique) représentent également des perspectives intéressantes pour approfondir l'étude du mode d'action toxique des contaminants sur les microalgues (Aliferis et Jabaji, 2011 ; Jamers *et al.*, 2013 ; Booij *et al.*, 2015a). La connaissance du mode d'action toxique d'une substance permet d'aller plus loin dans l'interprétation des effets induits. Notamment, elle peut également permettre de développer des tests et/ou des marqueurs ciblant spécifiquement un mode d'action et donc une famille de pesticides : c'est par exemple ce qui est fait dans les approches décrites par Escher *et al.* (2006) et Vermeirssen *et al.* (2010) où la présence d'inhibiteurs du PSII dans des extraits d'échantillonneurs passifs est spécifiquement détectée par la mesure de l'inhibition du rendement photosynthétique. Ainsi, nous verrons plus tard dans ce chapitre comment la connaissance du mode d'action toxique peut permettre d'interpréter plus finement la toxicité issue d'un mélange binaire ou complexe constitué de pesticides possédant des modes d'action similaires et/ou différents. D'un autre côté, l'étude des effets d'un pesticide sur la physiologie de deux microalgues appartenant à deux phylums distincts pourrait également permettre d'identifier les causes de leur différence en termes de sensibilité. Cet aspect est discuté dans le paragraphe suivant.

## 1.4. Place de la variabilité interspécifique et des phénomènes de résistance intraspécifique dans l'étude de la toxicité de pesticides chez les microalgues marines

Dans ces travaux de thèse, nous avons choisi d'étudier principalement deux espèces de microalgues marines : l'haptophyte *T. lutea* et la diatomée *S. marinoi*. *T. lutea* est une espèce tropicale très utilisée en biotechnologie mais également en aquaculture ; *S. marinoi* est une espèce présente sur la côte atlantique française couramment utilisée dans les études écotoxicologiques et en aquaculture. La raison qui a motivé ce choix était l'utilisation de ces espèces pour le nourrissage des larves et du naissain de l'huître creuse *C. gigas*. En effet, une expérimentation de transfert trophique avait été envisagée au début de ma thèse, et nous voulions en conséquence travailler avec les espèces qui seraient utilisées pour nourrir les larves et le naissain. Suite à une proposition du comité de suivi de thèse en première année, il a été décidé de ne pas aborder cet aspect pour consacrer plus d'efforts à l'étude de la toxicité des mélanges et approfondir les effets sur la physiologie des microalgues. Enfin, deux autres espèces ont été utilisées de manière plus sporadique, notamment pour l'étude de la toxicité des substances *antifoulings* (articles 1 et 2, chapitre 3) : la chlorophyte *T. suecica* et la diatomée *C. calcitrans*, toutes deux présentes dans les eaux de la côte atlantique française, et également utilisées en aquaculture.

Si l'on s'intéresse dans un premier temps aux biocides (hormis l'isoproturon et le fipronil qui n'ont pas été testés sur *T. suecica*) et aux *antifoulings*, c'est *T. lutea* qui est d'une manière générale l'espèce la plus sensible pour toutes les substances testées, mis à part le ZnPT et le CuPT pour lesquels sa sensibilité est plus ou moins équivalente à celle de *S. marinoi*. La chlorophyte est quant à elle plus sensible au diuron et à l'irgarol que la diatomée, mais présente en revanche une sensibilité plus faible au cuivre, ainsi qu'au CuPT et *a fortiori* au ZnPT. La diatomée *S. marinoi* est finalement l'espèce la moins sensible aux inhibiteurs du PSII. Si l'on remet en perspective cette observation avec ce qui a été discuté dans le paragraphe précédent concernant la prise en charge des ERO par les diatomées, l'hypothèse suivante peut être proposée : l'action des inhibiteurs du PSII pourrait induire une réponse similaire à celle obtenue lors d'une exposition à de très fortes intensités lumineuses (photoinhibition) et déclencher en conséquence le système antioxydant de prise en charge des ERO, particulièrement performant chez les diatomées (Lavaud *et al.*, 2004 ; Nymark *et al.*, 2009).

Alors que *T. lutea* semblait davantage sensible par rapport à *S. marinoi* au regard de la toxicité induite par les biocides et les *antifoulings* testés, nous avons pu observer que les deux herbicides de la famille des chloroacétanilides, le métazachlore et le S-métolachlore n'étaient pas toxiques pour cette espèce.

Dans une étude préliminaire, le S-métolachlore, testé à une concentration maximale de 500 µg L<sup>-1</sup> n'avait également induit aucune toxicité chez la chlorophyte *T. suecica*. Au contraire, une toxicité significative a été induite par les deux chloroacétanilides sur la diatomée *S. marinoi*, bien que les CE<sub>50</sub> restent relativement élevées. L'inverse a été observé pour l'insecticide chlorpyrifos-méthyl, pour lequel une toxicité a été observée pour *T. lutea* mais pas pour *S. marinoi*. Enfin, tous les fongicides testés ont induit une toxicité significative chez les deux espèces de microalgues. Peu de différences en termes de sensibilité entre les espèces ont pu être observées pour cette classe de pesticides, hormis la toxicité près de dix fois supérieure du quinoxifène pour la diatomée *S. marinoi* par rapport à *T. lutea*.

Nous avons pu mettre en évidence qu'il existait des différences de sensibilité parfois importantes entre les microalgues étudiées. Du fait de la grande diversité du phytoplancton marin (de Vargas *et al.*, 2015) et des différences de sensibilité de plusieurs ordres de grandeurs entre les espèces face aux polluants (Nyström *et al.*, 1999), il peut donc paraître peu réaliste d'un point de vue environnemental de n'évaluer la toxicité des pesticides que sur quelques espèces choisies. En effet, le nombre restreint d'espèces testées dans ces travaux de thèse ne nous permet pas de faire des généralités sur la sensibilité des différents phylums testés, mais cette comparaison apporte tout de même des éléments de discussion supplémentaires. Pour la plupart des substances testées, des différences de sensibilité existent mais ne perturbent pas la hiérarchisation de la toxicité des substances testées (voir section 1.1). En revanche, pour les deux organométaux, le ZnPT et le CuPT, la sensibilité bien plus faible de la chlorophyte *T. suecica* par rapport aux deux autres espèces testées reste un résultat pour le moins intrigant. Le mode d'action toxique de ces deux substances vis-à-vis des microalgues testées n'est pas connu, et de ce fait, il apparaît délicat d'émettre une quelconque hypothèse pouvant expliquer cette différence importante de sensibilité. Cette observation nous permet donc de remettre en perspective l'importance considérable d'explorer les effets toxiques de ces substances sur la physiologie des microalgues, mise en évidence dans la section précédente. Il serait en effet très intéressant d'étudier plus en détail la toxicité de ces deux substances sur la physiologie de ces trois espèces de microalgues afin de tenter d'expliquer ces différences de sensibilité.

La prise en compte de plusieurs espèces dans les études écotoxicologiques s'avère donc être un avantage considérable en termes de réalisme environnemental. C'est d'ailleurs pour répondre à cette problématique que la méthode de « distribution de sensibilité des espèces » (*species sensitivity distribution*, SSD ; Posthuma *et al.* 2001) a été développée : elle permet de déterminer la concentration HC<sub>x</sub> (*hazardous concentration* en anglais) d'un polluant pour laquelle un pourcentage *x* donné d'un pool d'espèces, appartenant ou non à un même taxon, subit une toxicité significative (évaluée sur la base de NOEC ou CE<sub>50</sub>). Ainsi, pour aller plus loin dans l'étude de la variabilité interspécifique vis-à-vis

des pesticides testés dans cette étude, une telle approche pourrait être appliquée. Notons que cette approche peut également être utilisée dans l'évaluation du risque pour déterminer quel sera le pourcentage d'espèces potentiellement affecté pour une concentration mesurée d'un contaminant. En complément, on pourrait également envisager de travailler avec des communautés algales : de multiples analyses peuvent en effet être réalisées sur les communautés, comme l'évaluation de l'efficacité photosynthétique, la diversité et la richesse spécifique ou encore la mise en évidence de marqueurs du stress oxydant (Morin *et al.*, 2009 ; Bonnineau *et al.*, 2013). Nous avons ainsi pu démontrer qu'il existait des différences de sensibilité entre les différentes espèces (variabilité interspécifique). D'un autre côté, des différences de sensibilité au sein d'une même espèce (variabilité intraspécifique) peuvent également exister : cet aspect a été brièvement abordé dans ces travaux de thèse par l'étude d'une souche résistante.

En effet, dans l'étude préliminaire présentée dans l'article 1 (chapitre 3), nous avons pu identifier une mutation chez une souche de *T. suecica* résistante au diuron (obtenue lors d'une expérimentation précédente, Stachowski-Haberkorn *et al.*, 2013), via le séquençage de l'ARNm du gène *psbA* codant pour la protéine D1 du PSII. Cette mutation avait été précédemment documentée chez des variants résistants aux inhibiteurs du PSII de la famille des phénylurées et des triazines (Galloway et Mets, 1984 ; Erickson *et al.*, 1985, 1989). Nous avons également démontré que, si cette mutation expliquait potentiellement la résistance de cette souche au diuron, elle ne conférait aucune résistance à l'irgarol. De surcroît, nous avons également observé que cette souche était davantage sensible à l'irgarol lorsque celui-ci était combiné au diuron, pourtant non toxique lorsqu'il était testé seul. Bien que ces travaux n'aient pu être approfondis durant la thèse dont ce n'était pas l'objet, cette étude soulève plusieurs questions :

- Pourquoi la mutation identifiée n'est-elle efficace que pour le diuron alors que le site de fixation moléculaire de l'irgarol est théoriquement le même que celui du diuron ?
- Quels sont les processus responsables de la toxicité supérieure observée avec le mélange diuron + irgarol chez la souche mutante ?

Ces questions laissent en effet présager que le site de fixation moléculaire identifié pour ces deux substances n'est peut-être pas l'unique site de fixation possible pour ces substances. Le projet EMIHP (Étude Moléculaire des Interactions Herbicide-Protéine D1 chez *Tetraselmis suecica*) actuellement en cours au Laboratoire d'Écotoxicologie et auquel j'ai pu contribuer par les compétences acquises dans l'étude des mélanges binaires, tente d'apporter des réponses à ces questions. Notamment, une étude de modélisation moléculaire réalisée en partenariat avec le laboratoire CEISAM (Université de

Nantes) devrait permettre d'améliorer notre compréhension des processus d'interaction entre ces deux substances et leur(s) site(s) de fixation.

-----

Dans cette première partie de synthèse, nous avons pu démontrer :

- l'utilité et la fiabilité du test en microplaques développé pour ces travaux de thèse afin de déterminer la toxicité de 21 pesticides vis-à-vis de plusieurs espèces de microalgues ;
- la pertinence d'explorer les effets des pesticides sur la physiologie des microalgues, afin d'améliorer notre compréhension de leur mode d'action toxique ;
- l'intérêt d'étudier plusieurs espèces de microalgues ainsi que l'importance de prendre en compte les phénomènes de résistance, ces deux aspects apportant un réalisme environnemental supérieur aux études écotoxicologiques.

La deuxième partie de ce chapitre synthétise les travaux réalisés sur l'un des points forts de ces travaux de thèse : l'étude de mélanges binaires et complexes de pesticides. Nous verrons ainsi comment les différents éléments de synthèse et perspectives présentés dans la première partie s'articulent avec ceux de cette deuxième partie pour contribuer à en améliorer notre compréhension.

## 2. Toxicité des mélanges de pesticides

La présence de multiples pesticides en mélange dans l'environnement pose la problématique de la toxicité induite par leurs effets combinés sur les organismes exposés : celle-ci peut être significativement supérieure à celle prédite sur la base de la toxicité des substances seules (synergie) et nécessite donc l'emploi d'une méthodologie adaptée à son évaluation. Toutefois, bien que cette problématique ait été identifiée depuis les années 1980-1990 (Konemann, 1981 ; Altenburger *et al.*, 1990), elle n'a pas toujours été prise en compte avec la même importance dans les études écotoxicologiques. Les travaux initiés en amont de cette thèse, présentés dans l'article 1 (chapitre 3), nous ont permis d'identifier la nécessité de traiter cette problématique en utilisant les outils et les approches adaptés pour répondre aux questions posées dans ce manuscrit. Dans les sections suivantes, les avantages représentés par l'étude des mélanges binaires d'une part, et par l'étude des mélanges complexes d'autre part, ainsi que les différentes approches mises en œuvre, sont discutés.

### 2.1. Étude des mélanges binaires de pesticides : avantages et limites des approches utilisées

Dans cette thèse, les interactions de quatorze mélanges binaires, dont six constitués de substances *antifoulings* et huit constitués majoritairement de produits phytosanitaires ainsi que de quelques biocides, ont été étudiées (Tableau 21).

Tableau 21 : Résumé des effets d'interaction, déterminés par rapport au modèle CA, et des  $\Sigma TU$  calculées pour le ratio de mélange 50:50%, induits par les mélanges binaires testés en microplaques pour les microalgues *T. lutea*, *S. marinoi* et *T. suecica*.

	Mélange	<i>T. lutea</i>		<i>S. marinoi</i>		<i>T. suecica</i>	
		$\Sigma TU_{50:50}$	Interaction <sup>1</sup>	$\Sigma TU_{50:50}$	Interaction	$\Sigma TU_{50:50}$	Interaction
<b>Mode d'action similaire</b>	DIU+IRG	1,01 ± 0,08	ADD	0,92 ± 0,04	SYN	0,79 ± 0,05	SYN
	DIU+ISO	0,87 ± 0,09	SYN	0,95 ± 0,06	ADD		
	ZnPT+CuPT <sup>2</sup>	0,94 ± 0,05	ADD	1,15 ± 0,03	ANT	0,81 ± 0,57	SYN
	DIU+Cu	1,95 ± 0,05	<b>ANT</b>	1,15 ± 0,04	ANT	1,47 ± 0,14	ANT
	IRG+Cu	1,95 ± 0,08	<b>ANT</b>	1,03 ± 0,05	ADD	1,53 ± 0,07	ANT
	DIU+ZnPT	1,25 ± 0,09	ANT	0,98 ± 0,02	ADD	1,08 ± 0,08	ANT
	Cu+ZnPT	2,20 ± 0,03	<b>ANT</b>	2,43 ± 0,25	<b>ANT</b>	0,16 ± 0,004	<b>SYN</b>
<b>Mode d'action différent</b>	ISO+MET			0,68 ± 0,03	SYN		
	ISO+AZO	1,01 ± 0,28	ADD	1,31 ± 0,05	ANT		
	ISO+QUI	1,52 ± 0,09	ANT	1,10 ± 0,11	ANT		
	ISO+SPI	1,48 ± 0,10	ANT	2,19 ± 0,15	<b>ANT</b>		
	SPI+QUI	0,86 ± 0,01	SYN	1,19 ± 0,03	ANT		
	SPI+CHL-M	0,90 ± 0,18	ANT/SYN				
	SPI+MET			1,42 ± 0,11	ANT		

<sup>1</sup> Effet d'interaction basé sur les tests statistiques réalisés via le module 'drc' dans R (voir section 6, chapitre 2) ; les interactions **en gras** sont celles pour lesquelles un facteur > 2 sépare les prédictions du modèle CA des données expérimentales ( $\Sigma TU_{50:50} < 0,50$  ou  $> 2,00$ ) ; <sup>2</sup> supposé par rapport aux informations disponibles dans la littérature.

Cependant, le facteur 2 défini par Belden *et al.* (2007) semble davantage utile à une problématique ayant trait à l'évaluation du risque. De fait il dispose d'une certaine marge de confiance. On pourrait en effet se demander à partir de quel seuil l'effet d'un mélange peut être considéré comme significatif au niveau biologique. On peut bien évidemment supposer qu'une synergie induisant une  $\Sigma TU_{50:50} = 0,16$ , comme c'est le cas pour le mélange entre le cuivre et le ZnPT, est potentiellement plus dangereuse pour l'environnement que celle induite par un mélange entre le diuron et l'irgarol, induisant une  $\Sigma TU_{50:50} = 0,79$ . Si l'on reste sur l'exemple du mélange diuron + irgarol, nous avons démontré grâce à l'outil MIXTOX que l'intensité de la synergie induite pouvait néanmoins dépendre de l'effet d'inhibition considéré (DL, *dose level-dependent deviation*). Or, dans ces travaux de thèse, les effets d'interaction ont été évalués uniquement sur la base d'un effet d'inhibition de 50%. Il est théoriquement possible de réaliser des isobogrammes combinant différentes isoboles, chacune correspondant à un niveau d'inhibition différent. Cependant, cette fonction n'est actuellement pas implémentée dans le module 'drc' et n'a donc pas pu être appliquée dans ces travaux de thèse. En revanche, l'étude des effets de mélange à de faibles concentrations, se basant par exemple sur un effet d'inhibition de 10% représente une perspective très intéressante à ces travaux, notamment d'un point de vue environnemental. En effet, d'une part la CE<sub>10</sub> (induisant 10% d'inhibition sur le paramètre suivi) est considérée comme une valeur seuil à partir de laquelle un effet significatif peut être observé

(Beasley *et al.*, 2015), d'autre part, elle est par définition inférieure à la CE<sub>50</sub> et donc généralement plus proche des concentrations retrouvées dans l'environnement.

Si l'on remet en perspective ces résultats avec les questions abordées dans la première partie de cette synthèse, on peut se poser les questions suivantes :

- les effets d'interaction sont-ils dépendants du test de toxicité utilisé ?

Cedergreen et Streibig (2005) ont démontré que le choix du paramètre utilisé pour évaluer le taux de croissance chez la lentille d'eau, *Lemna minor*, pouvait amener à des résultats contradictoires lors d'expérimentations réalisées avec des mélanges binaires d'herbicides. Nous avons démontré dans l'article 4 (chapitre 4) que l'intensité des interactions semblait varier pour certains mélanges (notamment pour *S. marinoi*) entre le test de toxicité réalisé en microplaques et celui réalisé en ballons de culture : l'effet antagoniste du mélange isoproturon + spiroxamine, ainsi que l'effet synergique du mélange isoproturon + métazachlore étaient supérieurs en ballons de culture par rapport aux microplaques. Dans notre cas, c'est donc à la fois le système de test, (microplaques *vs.* ballons) et le paramètre choisi pour évaluer le taux de croissance (fluorescence *vs.* densité cellulaire) qui étaient différents. Ces différences pourraient donc s'expliquer aussi bien par une biodisponibilité différente des substances entre les deux systèmes, que par une influence du paramètre choisi pour évaluer la croissance. Pour autant, hormis les différences d'intensité pour quelques interactions, l'interprétation de l'effet d'interaction restait sensiblement la même entre les deux systèmes.

- les effets d'interaction des mélanges sont-ils espèce-dépendants ?

Dans quelques études, les effets de mélanges de contaminants ont été évalués sur différentes espèces appartenant à des niveaux trophiques différents (Cedergreen *et al.*, 2007b ; Bao *et al.*, 2008). Les auteurs ont pu démontrer que les différences n'étaient pas toujours systématiques, notamment, dans le cas du mélange cuivre + ZnPT, la synergie a pu être systématiquement observée, quel que soit l'organisme considéré. Cela peut s'expliquer par la transchélation du ZnPT en CuPT en présence de cuivre, que nous avons démontrée dans l'article 2 (chapitre 3), le CuPT étant généralement bien plus toxique que le ZnPT. Dans ces travaux, différentes espèces de microalgues ont été exposées aux mélanges binaires. Nous avons pu démontrer que pour les mélanges de substances ayant un mode d'action similaire, l'interaction induite était systématiquement additive et ne déviait jamais d'un facteur > 2 par rapport aux prédictions du modèle CA. Pour les mélanges de substances ayant un mode d'action différent, des différences ont pu être mises en évidence pour certaines combinaisons, notamment celles impliquant le diuron ou l'irgarol et le cuivre, antagonistes pour *T. lutea* et *T. suecica* et plutôt additive pour *S. marinoi*. Ces différences pourraient être liées à des réponses au stress

variables chez les espèces testées, démontrant la nécessité d'évaluer l'impact des mélanges au niveau physiologique.

Pour compléter la réponse à cette question, nous avons envisagé d'évaluer la toxicité de mélanges binaires de pesticides sur les larves d'huître, représentant un niveau trophique supérieur par rapport aux microalgues. Cependant, du fait des difficultés rencontrées lors de la réalisation du test embryolaire au laboratoire, ces expérimentations n'ont pu être réalisées. Néanmoins, cela reste une des perspectives soulevées par ces travaux.

- Les effets des mélanges binaires sur la physiologie des microalgues reflètent-ils les interactions observées ?

Cette question constitue une approche novatrice, qui à notre connaissance n'a pas encore été abordée dans la littérature scientifique, tout du moins d'une manière aussi complète que celle présentée dans l'article 4 (chapitre 4). Dans cet article, nous avons en effet démontré que l'étude des effets des substances seules et en mélange pouvait être mise en relation avec le mode d'action toxique des substances testées. L'exploration des effets sur la physiologie peut apporter des éléments de réponses vis-à-vis des mécanismes qui sous-tendent les effets d'interactions observés. Nous avons ainsi mis en évidence le comportement strictement similaire du mélange isoproturon + diuron par rapport aux substances testées seules sur les différents paramètres physiologiques explorés, expliquant l'additivité observée pour ce mélange sur *T. lutea* et *S. marinoi*. De même, les effets opposés de l'isoproturon et de la spiroxamine sur la physiologie des deux microalgues testées pourraient expliquer l'antagonisme résultant du mélange de ces deux substances. Enfin, cette étude a permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle la synergie observée pour le mélange isoproturon + métazachlore sur *S. marinoi* serait issue d'une action combinée des deux substances sur l'appareil photosynthétique. Toutefois, compte tenu de la lourdeur conséquente nécessaire à la mise en œuvre de telles approches, celles-ci doivent être réservées à des études bien spécifiques, visant par exemple à identifier les mécanismes physiologiques responsables d'effets synergiques chez les microalgues. Cette perspective a en effet été précédemment identifiée dans la publication de Cedergreen (2014) et pourrait permettre d'identifier des familles chimiques qui, de par leurs modes d'action, sont davantage susceptibles d'agir en synergie. En complément des effets sur la physiologie, il pourrait également être envisagé de réaliser des études transcriptomiques afin de suivre l'expression de gènes ciblés pouvant être impliqués dans les interactions synergiques.

Finalement, parmi les différents mélanges testés, seule la synergie induite par le mélange entre le Cu et le ZnPT pourrait effectivement représenter un risque potentiel pour l'environnement, sa toxicité ayant également été démontrée pour d'autres organismes (larves de polychètes, amphipodes,

chironomes, poissons ; Bao *et al.* 2008 et Onduka *et al.* 2010). De surcroît les analyses chimiques réalisées dans l'article 2 (chapitre 3) nous ont permis d'identifier les causes de la synergie observée chez *T. suevica* : la transchélation du ZnPT en CuPT en présence de Cu. De fait, une des perspectives de ces travaux consisterait : d'une part, à quantifier la présence de ces trois substances dans les eaux côtières, mais également dans le sédiment, celui-ci pouvant contenir des quantités non négligeables de particules de peintures *antifouling*s ; d'autre part, à évaluer la toxicité des concentrations mesurées pour des organismes appartenant à différents niveaux trophiques.

Concernant le mélange isoproturon + métazachlore, bien que la  $\Sigma TU_{50:50}$  soit supérieure à 0,50 en microplaques, la synergie observée en ballons de culture sur *S. marinoi* ( $\Sigma TU_{50:50} = 0,26 \pm 0,06$  ; article 4, chapitre 4) était relativement marquée. Ces deux familles chimiques étant fréquemment retrouvées dans les cours d'eau (Meffe et de Bustamante, 2014 ; Moschet *et al.*, 2014), il pourrait être intéressant d'évaluer leur toxicité combinée sur des organismes photosynthétiques dulçaquicoles, comme le biofilm de rivière par exemple, incluant le périphyton.

Le design expérimental utilisé pour l'étude des mélanges binaires dans ce manuscrit (*ray-design*, Gessner, 1995 ; White *et al.*, 2004) est considéré comme l'une des approches les plus complètes disponibles à ce jour. De surcroît son utilisation est grandement facilitée par son implémentation dans le module 'drc' disponible dans R (Ritz et Streibig, 2014). L'un des principaux désavantages de cette méthode réside cependant dans la nécessité de réaliser un nombre conséquent d'expérimentations pour pouvoir appliquer cette approche. Cependant, cette contrainte a pu être rapidement résolue par l'utilisation du test en microplaques utilisé pour le criblage de toxicité : pour chaque mélange, celui-ci nous a permis d'obtenir le jeu de données nécessaire à l'application de cette méthode via une seule expérimentation. En conséquence nous avons ainsi pu tester un nombre conséquent de mélanges binaires sur plusieurs espèces de microalgues. La seconde approche utilisée dans ces travaux, l'outil MIXTOX (Jonker *et al.*, 2005), a permis d'obtenir des résultats très similaires à ceux obtenus via la méthode des isobogrammes. Cette méthode permet d'utiliser un design expérimental plus flexible, et bénéficie d'une interface et d'une utilisation simplifiée par une implémentation dans Microsoft Excel<sup>®</sup> sous la forme de macro, et apporte des informations supplémentaires quant aux interactions observées. À travers les articles 2 et 4 (chapitre 3 et 4) nous avons pu démontrer la très bonne correspondance des effets d'interaction déterminés par les deux méthodes. Ainsi, chacun de ces deux outils peut être appliqué à des problématiques et des contraintes variées et tend à rendre accessible l'étude de la toxicité des mélanges binaires.

Le principal inconvénient de ces deux méthodes réside néanmoins dans leur domaine d'application, se limitant à l'étude des mélanges binaires. Cedergreen *et al.* (2012) ont démontré que ces modèles

peuvent être appliqués avec succès à des mélanges ternaires, néanmoins, cela nécessite la mise en œuvre d'un nombre conséquent d'expérimentations et une modélisation mathématique relativement complexe. Ces approches permettent tout de même de poser des bases nécessaires à l'étude des mélanges plus complexes. En effet, les modèles de références CA et IA utilisés pour caractériser les effets d'interaction des mélanges binaires peuvent également être utilisés pour prédire la toxicité de mélanges complexes. En revanche, aucun modèle plus complexe (*i.e.*, Hewlett, Vølund, S/A, DR/DL-*dependent deviations* pour les mélanges binaires) n'existe actuellement pour décrire précisément l'interaction pouvant résulter d'un mélange complexe. L'interprétation de l'effet d'interaction d'un mélange complexe se limite donc à la comparaison entre la toxicité prédite par le modèle de référence (CA ou IA) et la toxicité expérimentale induite par le mélange complexe.

## 2.2. Avantages des échantillonneurs passifs pour l'étude de la toxicité des mélanges complexes issus de l'environnement

L'étude de la toxicité des mélanges complexes de polluants peut être envisagée selon deux approches. La première consiste à reproduire en laboratoire un mélange complexe en se basant sur des polluants détectés dans l'environnement (Backhaus *et al.*, 2000 ; Faust *et al.*, 2001, 2003 ; Junghans *et al.*, 2006). De telles études ont permis de démontrer l'applicabilité des modèles CA et IA pour prédire la toxicité de mélanges complexes de substances possédant des modes d'action similaires et/ou différents, en se basant sur les relations concentration-réponse individuelles des différents constituants du mélange. L'avantage de cette approche est qu'elle permet d'identifier relativement facilement les constituants les plus toxiques du mélange complexe, en calculant par exemple des valeurs d'unités toxiques (TU) individuelles de chaque constituant. En revanche, on peut facilement remettre en question la représentativité du mélange testé par rapport à la contamination réelle présente dans l'environnement. La deuxième approche, utilisée dans ces travaux de thèse, consiste à étudier la toxicité d'un mélange directement extrait de l'environnement. Dans la majorité des cas, le mélange complexe est extrait d'un échantillonneur passif qui a été utilisé pour échantillonner certaines substances présentes dans le milieu étudié sur la base de leurs propriétés physico-chimiques (Escher *et al.*, 2006 ; Muller *et al.*, 2007, 2008 ; Shaw *et al.*, 2009 ; Vermeirssen *et al.*, 2009, 2010 ; Pesce *et al.*, 2011 ; Morin *et al.*, 2012 ; Emelogu *et al.*, 2013a ; Booiij *et al.*, 2014 ; Kim Tiam *et al.*, 2014b, 2015 ; Foulquier *et al.*, 2015 et Tableau 12). De fait, la composition exacte du mélange n'est pas connue, mais peut être supposée par la connaissance des potentielles sources de contamination auxquelles le milieu échantillonné est soumis. L'avantage de cette approche réside donc dans la représentativité relative du mélange complexe ainsi obtenu vis-à-vis de la contamination réelle du milieu étudié. En revanche, il est alors plus délicat d'identifier les substances responsables de la toxicité observée. En conséquence, plusieurs

approches ont été développées selon les problématiques étudiées. En effet, certaines approches ont été davantage développées dans le but d'être appliquées à l'évaluation du risque environnemental, tandis que d'autres concernent une étude plus spécifique visant à identifier les substances responsables de la toxicité du mélange complexe extrait du milieu échantillonné.

L'approche utilisée dans ces travaux de thèse et décrite dans le chapitre 5 s'apparente davantage à la seconde catégorie, et donc à une analyse dirigée par l'effet (*effect directed analysis*, EDA en anglais). Dans ce type d'approche (Figure 72), les différents extraits environnementaux sont dans un premier temps testés via un bioessai. Dans un second temps, les extraits ayant induit une toxicité significative sont fractionnés par chromatographie gazeuse et/ou liquide, puis les différentes fractions sont à nouveau testées, parfois via différents bioessais, spécifiques ou non de certains modes d'action toxiques. Cela permet de réduire considérablement la complexité de l'extrait et ainsi d'identifier plus facilement les substances responsables de la toxicité de l'extrait de base.

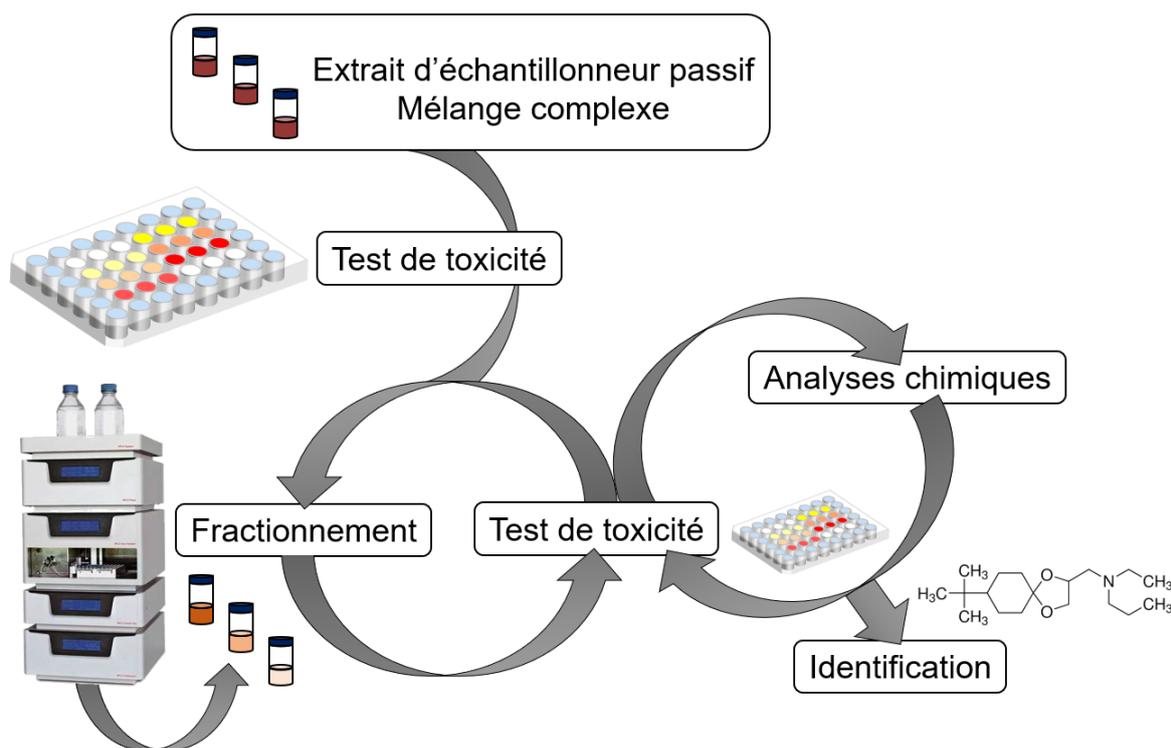


Figure 72 : Schéma illustratif de l'approche d'analyse dirigée par l'effet (EDA). Modifié d'après Brack (2003).

Dans le chapitre 5, nous avons utilisé le test en microplaques précédemment appliqué au criblage de toxicité des substances seules (article 3, chapitre 4) et des mélanges binaires (article 4, chapitre 4) pour évaluer la toxicité des différents extraits de POCIS, correspondant à la première étape de la Figure 72. Puis, des analyses chimiques ciblées ont été réalisées sur ces extraits pour y rechercher et quantifier les substances les plus toxiques identifiées grâce au criblage de toxicité. Par l'approche des unités toxiques (IU), également utilisée dans ce type d'approche (Booij *et al.*, 2014), nous avons ainsi pu

démontrer que la spiroxamine, présente à des concentrations relativement élevées dans les extraits dilués, était responsable d'une partie de la toxicité observée pour certains extraits. En revanche, pour d'autres extraits, aucune des huit substances quantifiées ne pouvait expliquer la toxicité observée. Plusieurs perspectives peuvent donc être identifiées pour cette partie de la thèse.

Le déroulement du projet PhytoCOTE n'a pas permis de mettre en place le suivi de la contamination chimique des cours d'eau avant la deuxième année de la thèse. C'est la raison pour laquelle l'étude de la toxicité des extraits de POCIS n'a pu être abordée qu'après celle des substances seules et en mélanges binaires. De fait, l'analyse dirigée par l'effet comme elle est décrite dans la Figure 72, n'a pu être appliquée dans sa totalité. En effet, il aurait été plus judicieux de commencer cette analyse par tester la toxicité des différents extraits de POCIS, puis, de réaliser un fractionnement de ces extraits afin de déterminer les fractions les plus toxiques. Ensuite, cela aurait permis, par la réalisation d'analyses chimiques, d'identifier les substances les plus concentrées dans les différentes fractions toxiques. Enfin, nous aurions alors pu évaluer la toxicité des substances identifiées, seules et en mélanges binaires, afin d'identifier précisément les substances ou combinaisons de substances expliquant la toxicité des différents extraits. En conséquence, l'une des perspectives de cette thèse consistera à poursuivre l'identification d'autres substances chimiques pouvant expliquer la part actuellement inexpliquée de la toxicité induite par les extraits de POCIS. Pour ce faire, un criblage non-ciblé par spectrométrie de masse haute-résolution est actuellement en cours au laboratoire LPTC-EPOC. Nous espérons ainsi pouvoir identifier d'autres polluants potentiels, dont il conviendra de déterminer la toxicité, seule et en mélange, sur les deux microalgues marines afin d'évaluer leur participation relative à la toxicité des extraits de POCIS. D'autre part, les POCIS avec PRC déployés par le laboratoire LPTC-EPOC dans le cadre du suivi de la contamination chimique du site d'étude (groupe de tâches 1 du projet PhytoCOTE) devrait permettre de corriger les taux d'échantillonnage *in-situ* des pesticides identifiés : cela permettra d'une part d'obtenir des concentrations moyennées dans le temps (*TWA concentrations*) pour les pesticides quantifiés et d'autre part de potentiellement corriger l'expression de la concentration pour nos extraits de POCIS, comme discuté dans la section 2.4 du chapitre 5.

Dans les études citées dans les paragraphes précédents, différents tests sont utilisés pour mettre en évidence la toxicité des extraits testés :

- un test spécifique des inhibiteurs du PSII par évaluation de l'effet des extraits sur le rendement photosynthétique de différentes espèces de microalgues, via la technique de PAM-fluorescence (Escher *et al.*, 2006 ; Booij *et al.*, 2014) ;

- un test de toxicité global, basé sur l'inhibition du taux de croissance microalgale après 72 h d'exposition (Emelogu *et al.*, 2013a) ;
- une combinaison des deux tests précédents (Escher *et al.*, 2008a ; Vermeirssen *et al.*, 2010).

Dans notre étude, n'ayant pas *a priori* sur le mode d'action des substances qui seraient présentes dans les extraits de POCIS, nous avons préféré nous limiter à un test de toxicité basé sur l'inhibition du taux de croissance qui avait de surcroît été appliqué avec succès au criblage de toxicité. De plus, étant donné la quantité relativement faible d'extrait disponible pour chaque période (280  $\mu$ L), il n'était pas envisageable de multiplier les tests de toxicité. En revanche, l'utilisation d'un Maxi-Imaging PAM (Heinz Walz GmbH, Figure 73), décrite dans l'article d'Escher *et al.* (2008), aurait pu nous permettre de réaliser une mesure de l'activité photosynthétique individuelle pour chaque puits, sans pour autant nécessiter la mise en œuvre d'une expérimentation spécifiquement dédiée à la mesure des effets sur le rendement photosynthétique. Cette technique aurait pu permettre d'identifier la part de la toxicité induite par des inhibiteurs du PSII, comme démontré dans les études de Escher *et al.* (2008) et Vermeirssen *et al.* (2010). Néanmoins, ces auteurs soulignent également l'importance de réaliser en complément un test de toxicité non-spécifique, la mesure des effets sur le rendement photosynthétique ne permettant pas d'obtenir une bonne corrélation avec la part de toxicité induite par des polluants non-spécifiques.

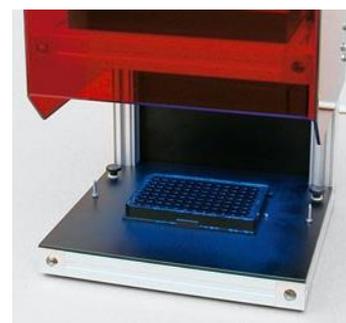


Figure 73 : Photo d'un Maxi-Imaging PAM (Heinz Walz GmbH®).

Finalement, on peut se demander comment l'approche appliquée dans ces travaux de thèse s'intègre aux questions plus générales soulevées par le projet PhytoCOTE, notamment vis-à-vis du risque de transfert des produits phytosanitaires vers le milieu aquatique et de l'influence des changements de pratiques agricoles sur ces transferts. Nous avons pu observer une évolution spatio-temporelle de la toxicité des extraits semblant correspondre avec les périodes de traitements : notamment, la toxicité supérieure des extraits pour les périodes avril-mai et mai-juin corrobore les enquêtes réalisées sur le site d'étude dans le cadre du groupe de tâches 1 du projet. De même, il semblerait que pour l'extrait issu de la station la plus soumise à la pollution viticole, SE-REG, la toxicité soit effectivement liée à la présence de produits phytosanitaires, notamment la spiroxamine. L'identification des substances responsables de la toxicité des extraits devra être poursuivie pour permettre de conclure quant à la part de la toxicité induite uniquement par les produits phytosanitaires utilisés sur le bassin versant. Le suivi de la toxicité des extraits n'ayant été réalisé que sur l'année 2017, il n'est pour le moment pas possible de faire le lien entre les changements de pratiques agricoles et la toxicité observée. En revanche, un suivi similaire à celui réalisé pour ces travaux de thèse, mais s'étalant sur plusieurs années,

constituerait une perspective intéressante au projet PhytoCOTE. Notamment, il pourrait être envisagé, en plus du suivi réalisé sur les pesticides organiques, d'évaluer la toxicité des métaux, et notamment du cuivre, davantage utilisé en agriculture biologique, seul et en mélange avec les extraits de POCIS. Pour cela, un déploiement conjoint de POCIS et de DGT pourrait être mis en place.

Pour conclure, une critique plus générale que l'on pourrait émettre quant à l'étude réalisée avec les extraits de POCIS dans ce manuscrit de thèse concerne le choix des organismes exposés. En effet, deux microalgues marines ont été exposées, dont l'une est présente sur la côte atlantique française (*S. marinoi*), et l'autre n'est utilisée qu'en aquaculture (*T. lutea*). La probabilité que ces microalgues soient exposées au mélange complexe constitué par les extraits de POCIS issus de cours d'eau dulçaquicoles soumis à une pollution viticole est donc relativement faible. Ce choix peut néanmoins se justifier :

- ces deux organismes présentent l'avantage d'être relativement sensibles aux polluants (*S. marinoi* est un organisme standard d'étude pour le milieu marin) et ont pu être adaptés facilement au test de toxicité en microplaques réalisé. Les données ainsi obtenues permettent donc de documenter la toxicité potentielle de la pollution viticole pour ce type d'organisme ;
- dans le cas de notre site d'étude, l'estuaire de la Gironde, séparant les cours d'eau échantillonnés des eaux côtières, altère probablement de manière significative le devenir du mélange complexe échantillonné au niveau du site d'étude avant qu'il n'atteigne les eaux côtières. Néanmoins, l'étude de Cruzeiro *et al.* (2015), menée dans les eaux côtières du lagon Rio Formosa au Portugal, a démontré que de nombreux pesticides utilisés en viticulture pouvaient être retrouvés en milieu côtier.

En conséquence, notre étude démontre bien l'utilité de l'approche utilisée pour évaluer la toxicité d'une pollution par les pesticides pour le phytoplancton marin. On pourrait néanmoins imaginer qu'il serait davantage pertinent d'utiliser dans ce type d'approche, des organismes endémiques du milieu échantillonné. Aussi, il serait intéressant, et notamment dans une problématique d'évaluation du risque environnemental, d'évaluer les effets d'extraits d'échantillonneurs passifs sur différents niveaux trophiques. C'est pourquoi nous avons également envisagé au début de cette thèse d'étudier la toxicité d'extraits de POCIS sur le développement embryo-larvaire de *C. gigas*. La toxicité d'un lot d'extraits de POCIS a été testée sur des embryons fécondés via le test de développement embryo-larvaire, cependant, les témoins négatifs ont induit une forte toxicité. En conséquence, et du fait des difficultés non négligeables relatives à la réalisation du test de développement embryo-larvaire dans cette thèse, ces expérimentations n'ont pas été poursuivies. La poursuite du développement de telles approches apparaît néanmoins primordiale, notamment dans un contexte d'évaluation du risque environnemental, et constitue de fait une des perspectives principales de ce travail.

Dans cette deuxième partie de synthèse, nous avons pu démontrer l'importance de prendre en compte la toxicité des mélanges de pesticides. Les deux approches décrites regroupent des avantages complémentaires. D'une part, les mélanges binaires, moins réalistes d'un point de vue environnemental, permettent néanmoins d'identifier précisément l'effet d'interaction résultant de la combinaison de deux substances et présentent donc l'avantage d'identifier clairement les pesticides pouvant agir en synergie. Cela peut ainsi permettre de renforcer le suivi des substances pour lesquelles la prédiction de la toxicité combinée par les modèles de référence CA et IA n'est pas suffisante. D'autre part, l'application d'une approche combinant des échantillonneurs passifs et un test de toxicité a permis d'étudier la toxicité de mélanges complexes représentatifs de la contamination du site échantillonné. Plusieurs perspectives ont pu être identifiées afin de permettre d'améliorer l'identification des substances responsables de la toxicité des extraits, notamment par l'application d'une analyse dirigée par l'effet (EDA).

Dans la partie finale de cette synthèse, nous verrons finalement comment replacer les différentes conclusions mises en évidence dans cette synthèse dans un contexte d'évaluation du risque environnemental.

### **3. Quelle est la place de ces travaux dans l'évaluation du risque environnemental ?**

Pour clore cette synthèse, il me semble également nécessaire de remettre en perspective la place de ces travaux de thèse dans la problématique de l'évaluation du risque chimique pour l'environnement. Comme nous avons pu le voir dans l'introduction, c'est dans un premier temps afin d'assurer une évaluation du risque rentable et performante que les microbioessais ont été développés. Dans ces travaux, nous avons démontré la fiabilité du test de toxicité en microplaques pour réaliser un criblage de toxicité d'une vingtaine de pesticides sur plusieurs espèces de microalgues. Les résultats obtenus dans l'article 3 (chapitre 3) ont permis de démontrer encore une fois l'importance capitale de mesurer les concentrations réelles d'exposition des substances testées, comme recommandé dans plusieurs normes. Le test de toxicité utilisé dans cette étude pourra être appliqué à la détermination de  $CE_{50}$  nécessaires à l'évaluation du risque chimique pour l'environnement marin et à la priorisation du suivi pour les substances les plus toxiques. En revanche, son application se limite aux molécules ayant une hydrophobicité réduite ( $\log K_{ow} < 4$ ). Pour les substances davantage hydrophobes, il faudrait envisager l'établissement d'une procédure standardisée basée sur des techniques d'exposition par

dosage passif, d'ores et déjà décrites par plusieurs études (Mayer et Reichenberg, 2006 ; Smith *et al.*, 2010 ; Stibany *et al.*, 2017a, 2017b).

De nombreuses études se sont intéressées à la façon dont la problématique des mélanges devrait être intégrée dans l'évaluation du risque chimique. Notamment, l'étude publiée par Backhaus et Faust (2010), fait l'état de l'art concernant l'évaluation du risque environnemental pour les mélanges de substances chimiques dans la réglementation REACH. Les auteurs mettent ainsi en évidence les différents types de mélanges pris en compte ou non dans la réglementation actuelle. Le type IV, concernant « les mélanges constitués de substances issues de différentes sources qui co-occurrent de manière fortuite dans l'eau, l'air, le sol, les sédiments ainsi qu'à l'intérieur des organismes et des êtres humains », correspond à celui auquel nous nous sommes intéressés dans cette thèse. Bien que l'importance de tels mélanges ait été mise en évidence par de nombreuses études, dont celles présentées dans cette thèse, aucun dispositif spécifique ne permet actuellement l'évaluation prospective de leur danger et des risques associés dans la réglementation REACH. Il en va de même pour la DCE qui, bien qu'elle fixe un objectif de « bon état écologique » des masses d'eau à l'horizon 2027, se concentre sur l'attribution de NQE aux substances individuelles et ne s'intéresse nullement aux potentiels mélanges de ces substances. Pourtant un nombre conséquent d'études a permis de valider les approches faisant intervenir les modèles de prédiction des effets de mélanges CA et IA (Faust *et al.*, 2003 ; Chèvre *et al.*, 2006 ; Junghans *et al.*, 2006 ; Cedergreen *et al.*, 2008). Dans ces travaux de thèse, un nombre relativement important de mélanges a induit une toxicité expérimentale proche de celle prédite par le modèle CA, notamment pour des mélanges de substances ayant un mode d'action similaire. Bien que le modèle IA donne occasionnellement des prédictions plus proches de la toxicité réelle pour des mélanges de substances ayant un mode d'action différent, son utilisation pour l'évaluation du risque chimique ne semble pas forcément adaptée : ses prédictions tendent à sous-estimer la toxicité des mélanges, contrairement au modèle CA qui a davantage tendance à surestimer leur toxicité et s'accorde donc mieux avec le principe de précaution dans le cadre de la protection de l'environnement. De plus, l'approche des unités toxiques (découlant du modèle CA) ne nécessite pas forcément l'obtention de courbes concentration-réponse pour être appliquée (*i.e.* les CE<sub>50</sub> peuvent être recherchées dans les bases de données et/ou la littérature scientifique) contrairement au modèle IA. En conséquence, et par respect du principe de précaution, le modèle CA pourrait être utilisé par défaut pour l'évaluation du risque représenté par les mélanges de substances chimiques, comme préconisé par plusieurs études (Junghans *et al.*, 2006 ; Kortenkamp *et al.*, 2009 ; Backhaus et Faust, 2010). Il paraît donc raisonnable de penser qu'un cadre conceptuel *a priori* basé sur le modèle CA pourrait être implémenté dans la réglementation actuelle : ce travail a été

proposé par Backhaus et Faust (2012) et constitue un premier pas vers l'implémentation de la prise en compte des mélanges dans l'évaluation du risque environnemental.

En complément, la mise en place d'une seconde approche destinée à évaluer spécifiquement les pollutions environnementales de milieux aquatiques exposés à une source de pollution connue ou inconnue pourrait également être imaginée. Ainsi, au lieu de partir des substances chimiques elles-mêmes pour évaluer les potentielles interactions d'un mélange donné, cette approche davantage intégrative viserait à évaluer la toxicité d'un échantillon environnemental en associant : d'une part différents types d'échantillonneurs passifs, chacun spécifique d'un type de contaminant, afin d'accumuler les substances présentes dans le milieu étudié ; d'autre part des bioessais spécifiques permettant d'évaluer le potentiel toxique des extraits sur différents types d'organismes et d'identifier potentiellement le/les mode(s) d'action toxique majoritaire(s). Cependant, une approche telle que celle décrite dans le chapitre 5 de cette thèse, analogue aux approches utilisant l'EDA et faisant intervenir un nombre conséquent d'analyses chimiques paraît trop lourde dans un contexte d'évaluation du risque environnemental. C'est notamment pour ces raisons que l'approche décrite par Escher *et al.* (2008) a été développée. Les principaux intérêts de cette approche résident dans :

- la possibilité de s'affranchir des analyses chimiques, en basant l'identification des substances toxiques dans les extraits environnementaux sur une batterie de bioessais spécifiques de différents modes d'action toxiques, *e.g.* inhibition de la photosynthèse et de la croissance, génotoxicité, perturbation endocrinienne, inhibition de l'AChE ;
- l'expression de la toxicité en concentrations d'équivalent toxique (*toxic equivalent concentrations*, TEQs en anglais), en utilisant des substances de référence pour chacun des modes d'action, *e.g.* le diuron pour les inhibiteurs du PSII, le 17 $\beta$ -estradiol pour les perturbateurs endocriniens, *etc.*

Cette approche a pu être utilisée avec succès pour évaluer la toxicité d'effluents de station d'épuration (Escher *et al.*, 2008b ; Vermeirssen *et al.*, 2010). Bien entendu, plusieurs limitations ont été identifiées, et notamment le besoin de poursuivre la validation de cette approche avec des analyses chimiques et d'élargir son application à d'autres types d'effluents. Vermeirssen *et al.* (2010) ont notamment démontré que le test de toxicité non-spécifique basé sur le taux de croissance microalgale était largement influencé par la présence d'inhibiteurs du PSII et n'était donc pas adapté à la mise en évidence de polluants non-spécifiques. L'autre test de toxicité non-spécifique, faisant intervenir l'inhibition de la bioluminescence chez la bactérie *Vibrio fischeri* a quant à lui démontré une bonne corrélation avec l'identification de polluants non-spécifiques tels que le diclofénac. En conséquence, il pourrait être très intéressant de comparer l'application d'une telle approche avec celle décrite dans ces travaux de thèse pour l'évaluation de la toxicité d'une pollution d'origine viticole. Notamment,

nous avons vu dans le chapitre 5 que la toxicité de certains extraits ne pouvait être expliquée par la seule présence des substances analysées : il serait donc intéressant d'évaluer la toxicité issue de polluants non-spécifiques par l'application du test de bioluminescence.

D'une manière générale, on peut donc conclure que ce type d'approche semble être relativement adaptée à l'évaluation du risque chimique pour les écosystèmes aquatiques soumis à différents types de pollutions. Il semble raisonnable d'imaginer que, dans les années à venir, cette approche sera suffisamment documentée et appliquée à différents types d'environnements et de pollutions pour être implémentée en tant qu'outil pour l'évaluation du risque chimique. Il apparaît donc primordial de poursuivre le développement de ce type d'approche : récemment, une étude a pu démontrer qu'il était également possible d'utiliser des bioessais ciblant des gènes rapporteurs spécifiques de certains modes d'action toxique afin d'identifier la ou les source(s) de pollution du cours d'eau suivi (Müller *et al.*, 2018). De fait, les récentes avancées en génomique et métabolomique pourront probablement améliorer encore davantage la précision et l'utilité de ce type d'approche.

# Bibliographie (hors articles 1 et 2)

---

- Abbott, A., Abel, P.D., Arnold, D.W., Milne, A., 2000. Cost-benefit analysis of the use of TBT: The case for a treatment approach. *Sci. Total Environ.* 258, 5-19. doi:10.1016/S0048-9697(00)00505-2
- Agence Française pour le Développement et la Promotion de l'Agriculture Biologique, 2016. Données de synthèse par filière et évolution - Productions végétales certifiées en 2016 [WWW Document]. URL [http://www.agencebio.org/sites/default/files/upload/documents/4\\_Chiffres/BrochureCC/Filieres/Filieres\\_PV\\_AgenceBio.xlsx](http://www.agencebio.org/sites/default/files/upload/documents/4_Chiffres/BrochureCC/Filieres/Filieres_PV_AgenceBio.xlsx) (consulté le 4.17.18).
- Agreste, 2015. Recensement de la chonchyliculture 2012. *Agreste Aquitaine - Chiffres Données* 4.
- Agrow, 2010. Dow pins down quinoxifen's mode of action [WWW Document]. URL <https://agrow.agribusinessintelligence.informa.com/AG002131/Dow-pins-down-quinoxifens-mode-of-action> (consulté le 4.10.18).
- Ahrens, L., Daneshvar, A., Lau, A.E., Kreuger, J., 2015. Characterization of five passive sampling devices for monitoring of pesticides in water. *J. Chromatogr. A* 1405, 1-11. doi:10.1016/j.chroma.2015.05.044
- Akcha, F., Spagnol, C., Rouxel, J., 2012. Genotoxicity of diuron and glyphosate in oyster spermatozoa and embryos. *Aquat. Toxicol.* 106-107, 104-113. doi:10.1016/j.aquatox.2011.10.018
- Akimoto, S., Mimuro, M., 2007. Application of Time-Resolved Polarization Fluorescence Spectroscopy in the Femtosecond Range to Photosynthetic Systems†. *Photochem. Photobiol.* 83, 163-170. doi:10.1562/2006-02-28-IR-825
- Aliferis, K.A., Jabaji, S., 2011. Metabolomics – A robust bioanalytical approach for the discovery of the modes-of-action of pesticides: A review. *Pestic. Biochem. Physiol.* 100, 105-117. doi:10.1016/j.pestbp.2011.03.004
- Allan, S.E., Smith, B.W., Tanguay, R.L., Anderson, K.A., 2012. Bridging environmental mixtures and toxic effects. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 2877-2887. doi:10.1002/etc.2018
- Almeida, E., Diamantino, T.C., de Sousa, O., 2007. Marine paints: The particular case of antifouling paints. *Prog. Org. Coatings* 59, 2-20. doi:10.1016/j.porgcoat.2007.01.017
- Alonso, M., Lago, F.C., Vieites, J.M., Espiñeira, M., 2012. Molecular characterization of microalgae used in aquaculture with biotechnology potential. *Aquac. Int.* 20, 847-857. doi:10.1007/s10499-012-9506-8
- Altenburger, R., Backhaus, T., Boedeker, W., Faust, M., Scholze, M., et al., 2000. Predictability of the

- toxicity of multiple chemical mixtures to *Vibrio fischeri*: Mixtures composed of similarly acting chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 2341-2347. doi:10.1002/etc.5620190926
- Altenburger, R., Bödeker, W., Faust, M., Horst Grimme, L., 1990. Evaluation of the isobologram method for the assessment of mixtures of chemicals. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 20, 98-114. doi:10.1016/0147-6513(90)90049-B
- Altenburger, R., Schmitt, H., Schüürmann, G., 2005. Algal toxicity of nitrobenzenes: Combined effect analysis as a pharmacological probe for similar modes of interaction. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 324-333. doi:10.1897/04-032R.1
- Altenburger, R., Walter, H., Grote, M., 2004. What contributes to the combined effect of a complex mixture? *Environ. Sci. Technol.* 38, 6353-6362. doi:10.1021/es049528k
- Alvarez, D.A., 1999. Development of an integrative sampling device for hydrophilic organic contaminants in aquatic environments. University of Missouri-Columbia.
- Alvarez, D.A., Cranor, W.L., Perkins, S.D., Clark, R.C., Smith, S.B., 2008. Chemical and Toxicologic Assessment of Organic Contaminants in Surface Water Using Passive Samplers. *J. Environ. Qual.* 37, 1024. doi:10.2134/jeq2006.0463
- Alvarez, D.A., Petty, J.D., Huckins, J.N., Jones-Lepp, T.L., Getting, D.T., et al., 2004. Development of a passive, in situ, integrative sampler for hydrophilic organic contaminants in aquatic environments. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 1640-1648. doi:10.1897/03-603
- Alzieu, C., 2000. Environmental impact of TBT: the French experience. *Sci. Total Environ.* 258, 99-102. doi:10.1016/S0048-9697(00)00510-6
- Amato, A., 2010. Diatom reproductive biology: Living in a crystal cage. *Int. J. Plant Reprod. Biol.* 2, 1-10.
- Ambiaud, É., 2012. Moins de désherbants dans les vignes. *Agreste Primeur* 288, 1-8.
- Ambiaud, É., 2015. Enquête - Pratiques culturales en viticulture 2013 - Nombre de traitement phytosanitaires. *Agreste Les Dossiers* 28, 1-19.
- Amiard, J.C., 2011. Les risques chimiques environnementaux: Méthodes d'évaluation et impacts sur les organismes. Tec & doc-Lavoisier, Paris, France.
- ANSES, 2018. AGRITOX - Base de données sur les substances actives phytopharmaceutiques [WWW Document]. URL <http://www.agritox.anses.fr/php/fiches.php> (consulté le 6.27.18).
- Arora, M., Anil, A.C., Leliaert, F., Delany, J., Mesbahi, E., 2013. *Tetraselmis indica* (Chlorodendrophyceae, Chlorophyta), a new species isolated from salt pans in Goa, India. *Eur. J. Phycol.* 48, 61-78. doi:10.1080/09670262.2013.768357
- Arrhenius, Å., Backhaus, T., Grönvall, F., Junghans, M., Scholze, M., et al., 2006. Effects of three antifouling agents on algal communities and algal reproduction: Mixture toxicity studies with

- TBT, Irgarol, and Sea-Nine. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 50, 335-345. doi:10.1007/s00244-005-1057-9
- Arrhenius, Å., Grönvall, F., Scholze, M., Backhaus, T., Blanck, H., 2004. Predictability of the mixture toxicity of 12 similarly acting congeneric inhibitors of photosystem II in marine periphyton and epipsammon communities. *Aquat. Toxicol.* 68, 351-367. doi:10.1016/j.aquatox.2004.04.002
- Arzul, G., Quiniou, F., Carrie, C., 2006. In vitro test-based comparison of pesticide-induced sensitivity in marine and freshwater phytoplankton. *Toxicol. Mech. Methods* 16, 431-437. doi:10.1080/15376520600698717
- Aubertot, J.N., Barbier, J.M., Carpentier, A., Gril, J.N., Guichard, L., et al., 2005. Pesticides, agriculture et environnement - Réduire l'utilisation des pesticides et en limiter les impacts environnementaux, synthèse du rapport d'expertise. INRA et Cemagref (France).
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J.G., Gray, J.S., Meyer-Reil, L.A., et al., 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 10, 257-263.
- Baas, J., Willems, J., Jager, T., Kraak, M.H.S., Vandenbrouck, T., et al., 2009. Prediction of daphnid survival after in situ exposure to complex mixtures. *Environ. Sci. Technol.* 43, 6064-6069. doi:10.1021/es901083v
- Backhaus, T., Arrhenius, Å., Blanck, H., 2004. Toxicity of a mixture of dissimilarly acting substances to natural algal communities: Predictive power and limitations of independent action and concentration addition. *Environ. Sci. Technol.* 38, 6363-6370. doi:10.1021/es0497678
- Backhaus, T., Faust, M., 2010. Hazard and Risk Assessment of Chemical Mixtures under REACH Hazard and Risk Assessment of Chemical Mixtures under REACH State of the Art , Gaps and Options for Improvement. KemI - Swedish Chemicals Agency©.
- Backhaus, T., Faust, M., 2012. Predictive environmental risk assessment of chemical mixtures: A conceptual framework. *Environ. Sci. Technol.* 46, 2564-2573. doi:10.1021/es2034125
- Backhaus, T., Scholze, M., Grimme, L.H., 2000. The single substance and mixture toxicity of quinolones to the bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri*. *Aquat. Toxicol.* 49, 49-61. doi:10.1016/S0166-445X(99)00069-7
- Balaam, J.L., Grover, D., Johnson, A.C., Jürgens, M., Readman, J., et al., 2010. The use of modelling to predict levels of estrogens in a river catchment: How does modelled data compare with chemical analysis and in vitro yeast assay results? *Sci. Total Environ.* 408, 4826-4832. doi:10.1016/j.scitotenv.2010.07.019
- Baldauf, S.L., 2003. The Deep Roots of Eukaryotes. *Science (80- )*. 300, 1703-1706.
- Baldauf, S.L., 2008. An overview of the phylogeny and diversity of eukaryotes. *J. Syst. Evol.* 46, 263-273. doi:10.3724/SP.J.1002.2008.08060

- Bao, V.W.W., Leung, K.M.Y., Kwok, K.W.H., Zhang, A.Q., Lui, G.C.S., 2008. Synergistic toxic effects of zinc pyrithione and copper to three marine species: Implications on setting appropriate water quality criteria. *Mar. Pollut. Bull.* 57, 616-623. doi:10.1016/j.marpolbul.2008.03.041
- Bao, V.W.W., Leung, K.M.Y., Lui, G.C.S., Lam, M.H.W., 2013. Acute and chronic toxicities of Irgarol alone and in combination with copper to the marine copepod *Tigriopus japonicus*. *Chemosphere* 90, 1140-1148. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.09.022
- Bao, V.W.W., Leung, K.M.Y., Qiu, J.W., Lam, M.H.W., 2011. Acute toxicities of five commonly used antifouling booster biocides to selected subtropical and cosmopolitan marine species. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 1147-1151. doi:10.1016/j.marpolbul.2011.02.041
- Barranger, A., Akcha, F., Rouxel, J., Brizard, R., Maurouard, E., et al., 2014. Study of genetic damage in the Japanese oyster induced by an environmentally-relevant exposure to diuron: Evidence of vertical transmission of DNA damage. *Aquat. Toxicol.* 146, 93-104. doi:10.1016/j.aquatox.2013.10.032
- Barranger, A., Heude-Berthelin, C., Rouxel, J., Adeline, B., Benabdelmouna, A., et al., 2016. Parental exposure to the herbicide diuron results in oxidative DNA damage to germinal cells of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 180, 23-30. doi:10.1016/j.cbpc.2015.11.002
- Barrett, K.A., McBride, M.B., 2005. Oxidative degradation of glyphosate and aminomethylphosphonate by manganese oxide. *Environ. Sci. Technol.* 39, 9223-9228. doi:10.1021/es051342d
- Basheer, C., Tan, K.S., Lee, H.K., 2002. Organotin and Irgarol-1051 contamination in Singapore coastal waters. *Mar. Pollut. Bull.* 44, 697-703. doi:10.1016/S0025-326X(01)00330-7
- Bayne, B.L., Ahrens, M., Allen, S.K., D'auriac, M.A., Backeljau, T., et al., 2017. The Proposed Dropping of the Genus *Crassostrea* for All Pacific Cupped Oysters and Its Replacement by a New Genus *Magallana*: A Dissenting View. *J. Shellfish Res.* 36, 545-547. doi:10.2983/035.036.0301
- Beardall, J., Raven, J.A., 2016. Carbon acquisition by microalgae, in: Borowitzka, M.A., Beardall, J., Raven, J.A. (Éd.), *The Physiology of Microalgae*. Springer International Publishing, p. 89-99. doi:10.1007/978-3-319-24945-2\_4
- Beasley, A., Belanger, S.E., Brill, J.L., Otter, R.R., 2015. Evaluation and comparison of the relationship between NOEC and EC10 or EC20 values in chronic *Daphnia* toxicity testing. *Environ. Toxicol. Chem.* 34, 2378-2384. doi:10.1002/etc.3086
- Belden, J.B., Gilliom, R.J., Lydy, M.J., 2007. How well can we predict the toxicity of pesticide mixtures

- to aquatic life? *Integr. Environ. Assess. Manag.* 3, 364-372. doi:10.1002/ieam.5630030307
- Belles, A., 2012. Développement et applications environnementales des échantillonneurs passifs pour la surveillance des écosystèmes aquatiques.
- Belles, A., Pardon, P., Budzinski, H., 2014a. Development of an adapted version of polar organic chemical integrative samplers (POCIS-Nylon). *Anal. Bioanal. Chem.* 406, 1099-1110. doi:10.1007/s00216-013-7286-2
- Belles, A., Tapie, N., Pardon, P., Budzinski, H., 2014b. Development of the performance reference compound approach for the calibration of « polar organic chemical integrative sampler » (POCIS). *Anal. Bioanal. Chem.* 406, 1131-1140. doi:10.1007/s00216-013-7297-z
- Bendif, E.M., Probert, I., Schroeder, D.C., de Vargas, C., 2013. On the description of *Tisochrysis lutea* gen. nov. sp. nov. and *Isochrysis nuda* sp. nov. in the Isochrysidales, and the transfer of Dicrateria to the Prymnesiales (Haptophyta). *J. Appl. Phycol.* 25, 1763-1776. doi:10.1007/s10811-013-0037-0
- Berenbaum, M.C., 1981. Criteria for Analyzing Interactions between Biologically Active Agents. *Adv. Cancer Res.* 35, 269-335. doi:10.1016/S0065-230X(08)60912-4
- Berger, R., Liaaen-Jensen, S., McAlister, V., Guillard, R.R.L., 1977. Carotenoids of Prymnesiophyceae (Haptophyceae). *Biochem. Syst. Ecol.* 5, 71-75. doi:10.1016/0305-1978(77)90034-5
- Bergtold, M., Dohmen, G.P., 2011. Biomass or growth rate endpoint for algae and aquatic plants: relevance for the aquatic risk assessment of herbicides. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 7, 237-47. doi:10.1002/ieam.136
- Biediger, D.L., Baumann, P.A., Weaver, D.N., Chandler, J.M., Merkle, M.G., 1992. Interactions Between Primisulfuron and Selected Soil-Applied Insecticides in Corn (*Zea mays*). *Weed Technol.* 6, 807-812. doi:10.1017/S0890037X00036307
- Biselli, S., Bester, K., Hühnerfuss, H., Fent, K., 2000. Concentrations of the antifouling compound Irgarol 1051 and of organotins in water and sediments of German North and Baltic Sea marinas. *Mar. Pollut. Bull.* 40, 233-243. doi:10.1016/S0025-326X(99)00177-0
- Björkman, O., Demmig, B., 1987. Photon yield of O<sub>2</sub> evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta* 170, 489-504. doi:10.1007/BF00402983
- Blaise, C., Férard, J.-F., Vasseur, P., 1997. Microplate Toxicity Tests with Microalgae: A Review, in: Wells, P.G., Lee, K., Blaise, C. (Éd.), *Microscale Testing in Aquatic Toxicology: Advances, Techniques, and Practice*. p. 269-320.
- Blaise, C., Legault, R., Bermingham, N., Van Coillie, R., Vasseur, P., 1986. A simple microplate algal assay technique for aquatic toxicity assessment. *Toxic. Assess.* 1, 261-281. doi:10.1002/tox.2540010302

- Blaise, C., Vasseur, P., 2005. Algal Microplate Toxicity Test, in: Small-scale Freshwater Toxicity Investigations. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, p. 137-179. doi:10.1007/1-4020-3120-3\_4
- Blanck, H., 2002. A Critical Review of Procedures and Approaches Used for Assessing Pollution-Induced Community Tolerance (PICT) in Biotic Communities. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 8, 1003-1034. doi:10.1080/1080-700291905792
- Blanck, H., Dahl, B., 1996. Pollution-induced community tolerance (PICT) in marine periphyton in a gradient of tri-n-butyltin (TBT) contamination. *Aquat. Toxicol.* 35, 59-77. doi:10.1016/0166-445X(96)00007-0
- Blanck, H., Eriksson, K.M., Grönvall, F., Dahl, B., Guijarro, K.M., et al., 2009. A retrospective analysis of contamination and periphyton PICT patterns for the antifoulant irgarol 1051, around a small marina on the Swedish west coast. *Mar. Pollut. Bull.* 58, 230-237. doi:10.1016/j.marpolbul.2008.09.021
- Blanck, H., Wängberg, S.-A., Molander, S., 1988. Pollution-Induced Community Tolerance—A New Ecotoxicological Tool, in: Cairns, J., Pratt, J. (Éd.), Functional Testing of Aquatic Biota for Estimating Hazards of Chemicals. ASTM International, 100 Barr Harbor Drive, PO Box C700, West Conshohocken, PA 19428-2959, p. 219-219-12. doi:10.1520/STP26265S
- Bliss, C.I., 1939. The Toxicity Of Poisons Applied Jointly. *Ann. Appl. Biol.* 26, 585-615. doi:10.1111/j.1744-7348.1939.tb06990.x
- Boland, J., Koomen, I., van Lidth de Jeude, J., Oudejans, J., 2004. Les pesticides: composition, utilisation et risques, Agrodok. Agromisa.
- Bonnineau, C., Tlili, A., Faggiano, L., Montuelle, B., Guasch, H., 2013. The use of antioxidant enzymes in freshwater biofilms: temporal variability vs. toxicological responses. *Aquat. Toxicol.* 136–137, 60-71. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.03.009
- Booij, P., H. Lamoree, M., B. Sjollema, S., de Voogt, P., E. Schollee, J., et al., 2015a. Non-target Metabolomic Profiling of the Marine Microalgae *Dunaliella tertiolecta* After Exposure to Diuron using Complementary High- Resolution Analytical Techniques. *Curr. Metabolomics* 2, 213-222. doi:10.2174/2213235X02666140922222901
- Booij, P., Sjollema, S.B., Leonards, P.E.G., de Voogt, P., Stroomberg, G.J., et al., 2013. Extraction tools for identification of chemical contaminants in estuarine and coastal waters to determine toxic pressure on primary producers. *Chemosphere* 93, 107-114. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.04.095
- Booij, P., Sjollema, S.B., van der Geest, H.G., Leonards, P.E.G., Lamoree, M.H., et al., 2015b. Toxic pressure of herbicides on microalgae in Dutch estuarine and coastal waters. *J. Sea Res.* 102, 48-56. doi:10.1016/j.seares.2015.05.001

- Booij, P., Vethaak, A.D., Leonards, P.E.G., Sjollema, S.B., Kool, J., et al., 2014. Identification of photosynthesis inhibitors of pelagic marine algae using 96-well plate microfractionation for enhanced throughput in effect-directed analysis. *Environ. Sci. Technol.* 48, 8003-8011. doi:10.1021/es405428t
- Borgå, K., Fisk, A.T., Hoekstra, P.E., Muir, D.C.G., 2004. Biological and chemical factors of importance in the bioaccumulation and trophic transfer of persistent organochlorine contaminants in Arctic marine food webs. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 2367-2385. doi:10.1897/03-518
- Bougaran, G., Rouxel, C., Dubois, N., Kaas, R., Grouas, S., et al., 2012. Enhancement of neutral lipid productivity in the microalga *Isochrysis affinis Galbana* (T-Iso) by a mutation-selection procedure. *Biotechnol. Bioeng.* 109, 2737-2745. doi:10.1002/bit.24560
- Brack, W., 2003. Effect-directed analysis: A promising tool for the identification of organic toxicants in complex mixtures? *Anal. Bioanal. Chem.* 377, 397-407. doi:10.1007/s00216-003-2139-z
- Bradshaw, A.D., Hardwick, K., 1989. Evolution and stress-genotypic and phenotypic components. *Biol. J. Linn. Soc.* 37, 137-155. doi:10.1111/j.1095-8312.1989.tb02099.x
- Brady, J.A., Wallender, W.W., Werner, I., Fard, B.M., Zalom, F.G., et al., 2006. Pesticide runoff from orchard floors in Davis, California, USA: A comparative analysis of diazinon and esfenvalerate. *Agric. Ecosyst. Environ.* 115, 56-68. doi:10.1016/j.agee.2005.12.009
- Brennan, L., Blanco Fernández, A., Mostaert, A.S., Owende, P., 2012. Enhancement of BODIPY 505/515 lipid fluorescence method for applications in biofuel-directed microalgae production. *J. Microbiol. Methods* 90, 137-143. doi:10.1016/j.mimet.2012.03.020
- Brown, R.S., Akhtar, P., Åkerman, J., Hampel, L., Kozin, I.S., et al., 2001. Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. *Environ. Sci. Technol.* 35, 4097-4102. doi:10.1021/es010708t
- Brumfield, K.M., Laborde, S.M., Moroney, J. V., 2017. A model for the ergosterol biosynthetic pathway in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur. J. Phycol.* 52, 64-74. doi:10.1080/09670262.2016.1225318
- Brusslan, J., Haselkorn, R., 1989. Resistance to the photosystem II herbicide diuron is dominant to sensitivity in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942. *EMBO J.* 8, 1237-1245.
- Bryant, D.A., Frigaard, N.U., 2006. Prokaryotic photosynthesis and phototrophy illuminated. *Trends Microbiol.* 14, 488-496. doi:10.1016/j.tim.2006.09.001
- Buisson, S., Bouchart, V., Guerlet, E., Malas, J.P., Costil, K., 2008. Level of contamination and impact of pesticides in cupped oyster, *Crassostrea gigas*, reared in a shellfish production area in Normandy (France). *J. Environ. Sci. Heal. - Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes* 43, 655-664.

doi:10.1080/03601230802352732

- Bulich, A.A., 1979. Use of luminescent bacteria for determining toxicity in aquatic environments, in: *Aquatic Toxicology: Proceedings of the Second Annual Symposium on Aquatic Toxicology*. ASTM International.
- Buma, A.G.J.J., Sjollem, S.B., van de Poll, W.H., Klamer, H.J.C., Bakker, J.F., 2009. Impact of the antifouling agent Irgarol 1051 on marine phytoplankton species. *J. Sea Res.* 61, 133-139. doi:10.1016/j.seares.2008.11.007
- Butault, J., Delame, N., Jacquet, F., 2011. L'utilisation des pesticides en France : état des lieux et perspectives de réduction, Notes et études socio-économiques, Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche, de la Ruralité et de l'Aménagement du Territoire.
- Calonne, A., Cartolar, P., Poupot, C., Dubourdieu, D., Darriet, P., 2004. Effects of *Uncinula necator* on the yield and quality of grapes (*Vitis vinifera*) and wine. *Plant Pathol.* 53, 434-445. doi:10.1111/j.1365-3059.2004.01016.x
- Calvet, R., 2005. Les pesticides dans le sol: conséquences agronomiques et environnementales. Editions France Agricole.
- Canonica, S., 2009. Matière organique, lumière et dégradation des polluants. *Eamag News*.
- Caquet, T., Roucaute, M., Mazzella, N., Delmas, F., Madigou, C., et al., 2013. Risk assessment of herbicides and booster biocides along estuarine continuums in the Bay of Vilaine area (Brittany, France). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 651-666. doi:10.1007/s11356-012-1171-y
- Carluer, N., Tournebize, J., Gouy, V., Margoum, C., Vincent, B., et al., 2011. Role of buffer zones in controlling pesticides fluxes to surface waters. *Procedia Environ. Sci.* 9, 21-26. doi:10.1016/j.proenv.2011.11.005
- Carrasco, M.F., Barón, P.J., 2010. Analysis of the potential geographic range of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) based on surface seawater temperature satellite data and climate charts: The coast of South America as a study case. *Biol. Invasions* 12, 2597-2607. doi:10.1007/s10530-009-9668-0
- Cassagne, C., Lessire, R., Bessoule, J.J., Moreau, P., Creach, A., et al., 1994. Biosynthesis of very long chain fatty acids in higher plants. *Prog. Lipid Res.* 33, 55-69. doi:10.1016/0163-7827(94)90009-4
- Caux, P.-Y., Blaise, C., Leblanc, P., Tache, M., 1992. A phytoassay procedure using fluorescence induction. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 549-557. doi:10.1002/etc.5620110413
- Cedergreen, N., 2014. Quantifying synergy: A systematic review of mixture toxicity studies within environmental toxicology. *PLoS One* 9, e96580. doi:10.1371/journal.pone.0096580
- Cedergreen, N., Christensen, A.M., Kamper, A., Kudsk, P., Mathiassen, S.K., et al., 2008. A review of independent action compared to concentration addition as reference models for mixtures of

- compounds with different molecular target sites. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1621-1632. doi:10.1897/07-474.1
- Cedergreen, N., Kamper, A., Streibig, J.C., 2006. Is prochloraz a potent synergist across aquatic species? A study on bacteria, daphnia, algae and higher plants. *Aquat. Toxicol.* 78, 243-252. doi:10.1016/j.aquatox.2006.03.007
- Cedergreen, N., Kudsk, P., Mathiassen, S.K., Sørensen, H., Streibig, J.C., 2007a. Reproducibility of Binary-Mixture Toxicity Studies. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 149. doi:10.1897/06-196R.1
- Cedergreen, N., Kudsk, P., Mathiassen, S.K., Streibig, J.C., 2007b. Combination effects of herbicides on plants and algae: do species and test systems matter? *Pest Manag. Sci.* 63, 282-295. doi:10.1002/ps.1353
- Cedergreen, N., Sørensen, H., Svendsen, C., 2012. Can the joint effect of ternary mixtures be predicted from binary mixture toxicity results? *Sci. Total Environ.* 427-428, 229-37. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.03.086
- Cedergreen, N., Streibig, J.C., 2005. Can the choice of endpoint lead to contradictory results of mixture-toxicity experiments? *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 1676. doi:10.1897/04-362R.1
- Cedergreen, N., Svendsen, C., Backhaus, T., 2013. Toxicity Prediction of Chemical Mixtures, in: Encyclopedia of Environmental Management. Taylor & Francis, New York. doi:10.1081/E-EEM-120046684
- Champ, M.A., 2000. A review of organotin regulatory strategies, pending actions, related costs and benefits. *Sci. Total Environ.* 258, 21-71. doi:10.1016/S0048-9697(00)00506-4
- Chandler, C.J., Segel, I.H., 1978. Mechanism of the Antimicrobial Action of Pyriithione : Effects on Levels , and Protein Synthesis Mechanism of the Antimicrobial Action of Pyriithione : Effects on Membrane Transport , ATP Levels , and Protein Synthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 14, 60-68. doi:10.1128/AAC.14.1.60.Updated
- Chapman, P.M., Caldwell, R.S., Chapman, P.F., 1996. A warning: NOECs are inappropriate for regulatory use. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 77-79. doi:10.1002/etc.5620150201
- Chapman, R.L., 2013. Algae: The world's most important « plants »-an introduction. *Mitig. Adapt. Strateg. Glob. Chang.* 18, 5-12. doi:10.1007/s11027-010-9255-9
- Cheloni, G., Slaveykova, V.I., 2013. Optimization of the C11-BODIPY581/591 Dye for the Determination of Lipid Oxidation in *Chlamydomonas reinhardtii* by Flow Cytometry. *Cytometry* 83, 952-961. doi:10.1002/cyto.22338
- Cherr, G., Shoffner-McGee, J., Shenker, J., 1990. Methods for assessing fertilization and embryonic or larval development in toxicity tests using the Californian mussel. *Environ. Toxicol.* 9, 1137-1145.

- Chesworth, J.C., Donkin, M.E., Brown, M.T., 2004. The interactive effects of the antifouling herbicides Irgarol 1051 and Diuron on the seagrass *Zostera marina* (L.). *Aquat. Toxicol.* 66, 293-305. doi:10.1016/j.aquatox.2003.10.002
- Chèvre, N., Loepfe, C., Singer, H., Stamm, C., Fenner, K., et al., 2006. Including mixtures in the determination of water quality criteria for herbicides in surface water. *Environ. Sci. Technol.* 40, 426-435. doi:10.1021/es050239l
- Chiaudani, G., Vighi, M., 1978. The use of *Selenastrum capricornutum* batch cultures in toxicity studies: With 2 figures and 6 tables in the text. *Int. Vereinigung für Theor. und Angew. Limnol. Mitteilungen* 21, 316-329.
- Chirapart, A., Jantana, P., Rapeeporn, R., Masahiro, N., Praiboon, J., et al., 2015. Source of marine biomass, in: Kim, S.K., Lee, C.G. (Éd.), *Marine Bioenergy: Trends and Developments*. CRC Press, p. 15-44.
- Chuecas, L., Riley, J.P., D'Alessandro, E.B., Antoniosi Filho, N.R., Dhup, S., et al., 2016. The Physiology of Microalgae, *Journal of Applied Phycology*. Springer International Publishing, Cham. doi:10.1007/978-3-319-24945-2
- Claessens, M., Monteyne, E., Wille, K., Vanhaecke, L., Roose, P., et al., 2015. Passive sampling reversed: Coupling passive field sampling with passive lab dosing to assess the ecotoxicity of mixtures present in the marine environment. *Mar. Pollut. Bull.* 93, 9-19. doi:10.1016/j.marpolbul.2015.02.028
- Collotta, M., Bertazzi, P.A., Bollati, V., 2013. Epigenetics and pesticides. *Toxicology* 307, 35-41. doi:10.1016/j.tox.2013.01.017
- Comoretto, L., Arfib, B., Chiron, S., 2007. Pesticides in the Rhône river delta (France): Basic data for a field-based exposure assessment. *Sci. Total Environ.* 380, 124-132. doi:10.1016/j.scitotenv.2006.11.046
- Comps, M., 1983. Recherches histologiques et cytologiques sur les infections intracellulaires des mollusques bivalves marins. Université des Sciences et Techniques du Languedoc.
- Cooper, M.S., Hardin, W.R., Petersen, T.W., Cattolico, R.A., 2010. Visualizing « green oil » in live algal cells. *J. Biosci. Bioeng.* 109, 198-201. doi:10.1016/j.jbiosc.2009.08.004
- Coquillé, N., 2017. Influence de la matière organique dissoute naturelle et d'herbicides, seuls et combinés, sur des microalgues marines et d'eau douce.
- Coquillé, N., Ménard, D., Rouxel, J., Dupraz, V., Éon, M., et al., 2018. The influence of natural dissolved organic matter on herbicide toxicity to marine microalgae is species-dependent. *Aquat. Toxicol.* 198, 103-117. doi:10.1016/j.aquatox.2018.02.019
- Costas, E., Carrillo, E., Ferrero, L.M., Agrelo, M., Garcia-Villada, L., et al., 2001. Mutation of algae

- from sensitivity to resistance against environmental selective agents: the ecological genetics of *Dictyosphaerium chlorelloides* (Chlorophyceae) under lethal doses of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1, 1-dimethylurea herbicide. *Phycologia* 40, 391-398. doi:10.2216/i0031-8884-40-5-391.1
- Costas, E., Flores-Moya, A., López-Rodas, V., 2008. Rapid adaptation of phytoplankters to geothermal waters is achieved by single mutations: Were extreme environments « Noah's Arks » for photosynthesizers during the Neoproterozoic « snowball Earth »? *New Phytol.* 180, 922-932. doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02620.x
- Couderchet, M., Vernet, G., 2003. Pigments as biomarkers of exposure to the vineyard herbicide flazasulfuron in freshwater algae. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 55, 271-277. doi:10.1016/S0147-6513(02)00064-7
- Cozic, V., Durand, G., 2013. Mission d'étude pour réduire les impacts du carénage sur le milieu marin. Rapport phase 2 : Evaluer les équipements existants (cales et aires de carénage avec systèmes de traitement). IDHESA Bretagne Océane.
- Cram, S.P., 1989. Challenges and opportunities of environmental-analytical measurements. *Am. Environ. Lab. Sept.* 19-26.
- Cresswell, T., Richards, J.P., Glegg, G.A., Readman, J.W., 2006. The impact of legislation on the usage and environmental concentrations of Irgarol 1051 in UK coastal waters. *Mar. Pollut. Bull.* 52, 1169-1175. doi:10.1016/j.marpolbul.2006.01.014
- Cruzeiro, C., Amaral, S., Rocha, E., Rocha, M.J., 2017. Determination of 54 pesticides in waters of the Iberian Douro River estuary and risk assessment of environmentally relevant mixtures using theoretical approaches and *Artemia salina* and *Daphnia magna* bioassays. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 145, 126-134. doi:10.1016/j.ecoenv.2017.07.010
- Cruzeiro, C., Rocha, E., Pardal, M.Â., Rocha, M.J., 2015. Uncovering seasonal patterns of 56 pesticides in surface coastal waters of the Ria Formosa lagoon (Portugal), using a GC-MS method. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 95, 1370-1384. doi:10.1080/03067319.2015.1100724
- Cruzeiro, C., Rocha, E., Pardal, M.Â., Rocha, M.J., 2016a. Environmental assessment of pesticides in the Mondego River Estuary (Portugal). *Mar. Pollut. Bull.* 103, 240-246. doi:10.1016/j.marpolbul.2015.12.013
- Cruzeiro, C., Rocha, E., Pardal, M.Â., Rocha, M.J., 2016b. Seasonal-spatial survey of pesticides in the most significant estuary of the Iberian Peninsula - The Tagus River estuary. *J. Clean. Prod.* 126, 419-427. doi:10.1016/j.jclepro.2016.03.005
- Curini, R., Gentili, a., Marchese, S., Perret, D., Arone, L., et al., 2001. Monitoring of pesticides in surface water: Off-line SPE followed by HPLC with UV detection and confirmatory analysis by mass spectrometry. *Chromatographia* 53, 244-250. doi:10.1007/BF02490418

- da Costa, F., Le Grand, F., Quéré, C., Bougaran, G., Cadoret, J.P., et al., 2017. Effects of growth phase and nitrogen limitation on biochemical composition of two strains of *Tisochrysis lutea*. *Algal Res.* 27, 177-189. doi:10.1016/j.algal.2017.09.003
- Dagostin, S., Schärer, H.J., Pertot, I., Tamm, L., 2011. Are there alternatives to copper for controlling grapevine downy mildew in organic viticulture? *Crop Prot.* 30, 776-788. doi:10.1016/j.cropro.2011.02.031
- Damiens, G., His, E., Gnassia-Barelli, M., Quiniou, F., Roméo, M., 2004. Evaluation of biomarkers in oyster larvae in natural and polluted conditions. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 138, 121-128. doi:10.1016/j.cca.2004.05.010
- de Vargas, C., Audic, S., Henry, N., Decelle, J., Mahe, F., et al., 2015. Eukaryotic plankton diversity in the sunlit ocean. *Science (80-. )*. 348, 1261605-1-1261605-11. doi:10.1126/science.1261605
- de Zwart, D., Posthuma, L., 2005. Complex mixture toxicity for single and multiple species. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 2665. doi:10.1897/04-639R.1
- Debenest, T., Pinelli, E., Coste, M., Silvestre, J., Mazzella, N., et al., 2009. Sensitivity of freshwater periphytic diatoms to agricultural herbicides. *Aquat. Toxicol.* 93, 11-17. doi:10.1016/j.aquatox.2009.02.014
- Debieu, D., Bach, J., Arnold, A., Brousset, S., Gredt, M., et al., 2000. Inhibition of Ergosterol Biosynthesis by Morpholine, Piperidine, and Spiroketalamine Fungicides in *Microdochium nivale*: Effect on Sterol Composition and Sterol  $\Delta 8 \rightarrow \Delta 7$ -Isomerase Activity. *Pestic. Biochem. Physiol.* 67, 85-94. doi:10.1006/pest.2000.2485
- Delaunois, B., Farace, G., Jeandet, P., Clément, C., Baillieul, F., et al., 2014. Elicitors as alternative strategy to pesticides in grapevine? Current knowledge on their mode of action from controlled conditions to vineyard. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 4837-4846. doi:10.1007/s11356-013-1841-4
- DeLorenzo, M.E., Scott, G.I., Ross, P.E., 2001. Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: A review. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 84-98. doi:10.1002/etc.5620200108
- Delorenzo, M.E., Thompson, B., Cooper, E., Moore, J., Fulton, M.H., 2012. A long-term monitoring study of chlorophyll, microbial contaminants, and pesticides in a coastal residential stormwater pond and its adjacent tidal creek. *Environ. Monit. Assess.* 184, 343-359. doi:10.1007/s10661-011-1972-3
- Desgranges, N., 2015. Développement d'échantillonneurs passifs de type POCIS pour l'évaluation de la contamination en pesticides des eaux de bassins versants languedociens. Université de Bordeaux.
- Domozych, D.S., Ciancia, M., Fangel, J.U., Mikkelsen, M.D., Ulvskov, P., et al., 2012. The Cell Walls of Green Algae: A Journey through Evolution and Diversity. *Front. Plant Sci.* 3, 1-7.

doi:10.3389/fpls.2012.00082

- Dupraz, V., Coquillé, N., Ménard, D., Sussarellu, R., Haugarreau, L., et al., 2016. Microalgal sensitivity varies between a diuron-resistant strain and two wild strains when exposed to diuron and irgarol, alone and in mixtures. *Chemosphere* 151, 241-252. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.02.073
- Dupraz, V., Stachowski-Haberkorn, S., Ménard, D., Limon, G., Akcha, F., et al., 2018. Combined effects of antifouling biocides on the growth of three marine microalgal species. *Chemosphere*. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.06.139
- Ebenezer, V., Ki, J.-S.S., 2013. Quantification of toxic effects of the herbicide metolachlor on marine microalgae *Ditylum brightwellii* (Bacillariophyceae), *Prorocentrum minimum* (Dinophyceae), and *Tetraselmis suecica* (Chlorophyceae). *J. Microbiol.* 51, 136-139. doi:10.1007/s12275-013-2114-0
- Edwardsen, B., Eikrem, W., Green, J.C., Andersen, R.A., Moon-van der Staay, S.Y., et al., 2000. Phylogenetic reconstructions of the Haptophyta inferred from 18S ribosomal DNA sequences and available morphological data. *Phycologia* 39, 19-35. doi:10.2216/i0031-8884-39-1-19.1
- Eisentraeger, A., Dott, W., Klein, J., Hahn, S., 2003. Comparative studies on algal toxicity testing using fluorometric microplate and Erlenmeyer flask growth-inhibition assays. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 54, 346-354. doi:10.1016/S0147-6513(02)00099-4
- Emelogu, E.S., Pollard, P., Dymond, P., Robinson, C.D., Webster, L., et al., 2013a. Occurrence and potential combined toxicity of dissolved organic contaminants in the Forth estuary and Firth of Forth, Scotland assessed using passive samplers and an algal toxicity test. *Sci. Total Environ.* 461-462, 230-239. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.05.011
- Emelogu, E.S., Pollard, P., Robinson, C.D., Webster, L., McKenzie, C., et al., 2013b. Identification of selected organic contaminants in streams associated with agricultural activities and comparison between autosampling and silicone rubber passive sampling. *Sci. Total Environ.* 445-446, 261-72. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.12.053
- Emelogu, E.S., Seiler, T.B., Pollard, P., Robinson, C.D., Webster, L., et al., 2014. Evaluations of combined zebrafish (*Danio rerio*) embryo and marine phytoplankton (*Diacronema lutheri*) toxicity of dissolved organic contaminants in the Ythan catchment, Scotland, UK. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 5537-5546. doi:10.1007/s11356-013-2488-x
- Erickson, J.M., Pfister, K., Rahire, M., Togasaki, R.K., Mets, L., et al., 1989. Molecular and biophysical analysis of herbicide-resistant mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*: structure-function relationship of the photosystem II D1 polypeptide. *Plant Cell* 1, 361-371. doi:10.1105/tpc.1.3.361
- Erickson, J.M., Rahire, M., Rochaix, J.-D.D., Mets, L., 1985. Herbicide resistance and cross-resistance: changes at three distinct sites in the herbicide-binding protein. *Science* (80-. ). 228,

- 204-207. doi:10.1126/science.228.4696.204
- Eriksson, K.M., Clarke, A.K., Franzen, L.-G.G., Kuylenstierna, M., Martinez, K., et al., 2009. Community-level analysis of psbA gene sequences and irgarol tolerance in marine periphyton. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 897-906. doi:10.1128/AEM.01830-08
- Ermolayeva, E., Sanders, D., Ermolayeva, E., 1995. Mechanism of Pyrithione-Induced Membrane Depolarization in *Neurospora crassa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3385-3390.
- Escher, B.I., Bramaz, N., Mueller, J.F., Quayle, P., Rutishauser, S., et al., 2008a. Toxic equivalent concentrations (TEQs) for baseline toxicity and specific modes of action as a tool to improve interpretation of ecotoxicity testing of environmental samples. *J. Environ. Monit.* 10, 612-621. doi:10.1039/b800949j
- Escher, B.I., Bramaz, N., Quayle, P., Rutishauser, S., Vermeirssen, E.L.M., 2008b. Monitoring of the ecotoxicological hazard potential by polar organic micropollutants in sewage treatment plants and surface waters using a mode-of-action based test battery. *J. Environ. Monit.* 10, 622-631. doi:10.1039/b800951a
- Escher, B.I., Quayle, P., Muller, R., Schreiber, U., Mueller, J.F., 2006. Passive sampling of herbicides combined with effect analysis in algae using a novel high-throughput phytotoxicity assay (Maxi-Imaging-PAM). *J. Environ. Monit.* 8, 456-464. doi:10.1039/b517512g
- Esperanza, M., Cid, Á., Herrero, C., Rioboo, C., 2015. Acute effects of a prooxidant herbicide on the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*: Screening cytotoxicity and genotoxicity endpoints. *Aquat. Toxicol.* 165, 210-21. doi:10.1016/j.aquatox.2015.06.004
- European Chemicals Agency, 2018. ECHA [WWW Document]. URL <https://echa.europa.eu/fr/home>
- European Commission, 2018. EU Pesticides database [WWW Document]. URL <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.selection&language=EN#>
- Eurostat, 2018. Pesticide sales [WWW Document]. URL [http://ec.europa.eu/eurostat/web/products-datasets/-/aei\\_fm\\_salpest09](http://ec.europa.eu/eurostat/web/products-datasets/-/aei_fm_salpest09) (consulté le 4.16.18).
- Expósito, N., Kumar, V., Sierra, J., Schuhmacher, M., Giménez Papiol, G., 2017. Performance of *Raphidocelis subcapitata* exposed to heavy metal mixtures. *Sci. Total Environ.* 601-602, 865-873. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.05.177
- FAO, 1993. FAO specifications for plant protection products. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- FAO, 2018. Fisheries and Aquaculture Information and Statistics Branch [WWW Document]. URL

- <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/fr> (consulté le 6.19.18).
- Faust, M., Altenburger, R., Backhaus, T., Blanck, H., Boedeker, W., et al., 2001. Predicting the joint algal toxicity of multi-component s-triazine mixtures at low-effect concentrations of individual toxicants. *Aquat. Toxicol.* 56, 13-32. doi:10.1016/S0166-445X(01)00187-4
- Faust, M., Altenburger, R., Backhaus, T., Blanck, H., Boedeker, W., et al., 2003. Joint algal toxicity of 16 dissimilarly acting chemicals is predictable by the concept of independent action. *Aquat. Toxicol.* 63, 43-63. doi:10.1016/S0166-445X(02)00133-9
- Fauvelle, V., 2012. Evaluation de la contamination en pesticides des tributaires du bassin d'Arcachon et développement d'un échantillonneur passif spécifique des herbicides anioniques.
- Fauvelle, V., Nhu-Trang, T.T., Feret, T., Madarassou, K., Randon, J., et al., 2015. Evaluation of Titanium Dioxide as a Binding Phase for the Passive Sampling of Glyphosate and Aminomethyl Phosphonic Acid in an Aquatic Environment. *Anal. Chem.* 87, 6004-6009. doi:10.1021/acs.analchem.5b00194
- Fenner, K., Canonica, S., Wackett, L.P., Elsner, M., 2013. Evaluating Pesticide Degradation in Emerging Opportunities. *Science (80- )*. 341, 752-758. doi:10.1126/science.1236281
- Fernandez-Alba, A.R.R., Piedra, L., Mezcuca, M., Hernando, M.D.D., 2002. Toxicity of Single and Mixed Contaminants in Seawater Measured with Acute Toxicity Bioassays. *Sci. World J.* 2, 1115-1120. doi:10.1100/tsw.2002.221
- Fernández, D., Voss, K., Bundschuh, M., Zubrod, J.P., Schäfer, R.B., 2015. Effects of fungicides on decomposer communities and litter decomposition in vineyard streams. *Sci. Total Environ.* 533, 40-48. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.06.090
- Fish, F., Lampert, I., Halachmi, A., Riesenfeld, G., Herzberg, M., 1987. The SOS chromotest kit: a rapid method for the detection of genotoxicity. *Environ. Toxicol.* 2, 135-147.
- Flores-Moya, A., Costas, E., López-Rodas, V., 2008. Roles of adaptation, chance and history in the evolution of the dinoflagellate *Prorocentrum triestinum*. *Naturwissenschaften* 95, 697-703. doi:10.1007/s00114-008-0372-1
- Fneich, S., 2014. La contribution de l'épigénétique dans l'expression des variants phénotypiques essentiels pour l'interaction : *Schistosoma mansoni* / *Biomphalaria glabrata*. University of Perpignan Via Domitia.
- Fogg, G.E., 2001. Algal Adaptation to Stress - Some General Remarks, in: Rai, L.C., Gaur, J.P. (Éd.), *Algal Adaptation to Environmental Stresses*. Springer, Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, p. 1-19.
- Foulquier, A., Morin, S., Dabrin, A., Margoum, C., Mazzella, N., et al., 2015. Effects of mixtures of dissolved and particulate contaminants on phototrophic biofilms: new insights from a PICT

- approach combining toxicity tests with passive samplers and model substances. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 4025-4036. doi:10.1007/s11356-014-3289-6
- Fox, D.R., Billoir, E., Charles, S., Delignette-Muller, M.L., Lopes, C., 2012. What to do with NOECS/NOELS-prohibition or innovation? *Integr. Environ. Assess. Manag.* 8, 764-766. doi:10.1002/ieam.1350
- Franklin, N.M., Adams, M.S., Stauber, J.L., Lim, R.P., 2001. Development of an improved rapid enzyme inhibition bioassay with marine and freshwater microalgae using flow cytometry. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 40, 469-480. doi:10.1007/s002440010199
- Fučíková, K., Leliaert, F., Cooper, E.D., Škaloud, P., D'Hondt, S., et al., 2014. New phylogenetic hypotheses for the core Chlorophyta based on chloroplast sequence data. *Front. Ecol. Evol.* 2, 12. doi:10.3389/fevo.2014.00063
- Fuerst, E.P., Norman, M.A., 1991. Interactions of herbicides with photosynthetic electron transport. *Weed Sci.* 458-464.
- Galgani, F., Cadiou, Y., Gilbert, F., 1992. Simultaneous and iterative weighted regression analysis of toxicity tests using a microplate reader. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 23, 237-243. doi:10.1016/0147-6513(92)90061-7
- Galloway, R.E., Mets, L.J., 1984. Atrazine, bromacil, and diuron resistance in *Chlamydomonas*: A single non-mendelian genetic locus controls the structure of the thylakoid binding site. *Plant Physiol.* 74, 469-474. doi:10.1104/pp.74.3.469
- Gamain, P., Gonzalez, P., Cachot, J., Clérandeau, C., Mazzella, N., et al., 2016. Combined effects of temperature and copper and S-metolachlor on embryo-larval development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Mar. Pollut. Bull.* doi:10.1016/j.marpolbul.2016.12.018
- Gao, J., Wang, Y., Gao, B., Wu, L., Chen, H., 2012. Environmental fate and transport of pesticides, in: Rathore, H.S., Nollet, L.M.L. (Éd.), *Pesticides*. CRC Press, p. 29-46. doi:doi:10.1201/b11864-510.1201/b11864-5
- Garnier, M., Carrier, G., Rogniaux, H., Nicolau, E., Bougaran, G., et al., 2014. Comparative proteomics reveals proteins impacted by nitrogen deprivation in wild-type and high lipid-accumulating mutant strains of *Tisochrysis lutea*. *J. Proteomics* 105, 107-120. doi:10.1016/j.jprot.2014.02.022
- Gauroy, C., Gouy, V., Carluer, N., 2012. Interprétation des données de surveillance de la contamination des eaux de surface par les pesticides par hydro-écorégion 1-8.
- Geis, S.W., Fleming, K.L., Korthals, E.T., Searle, G., Reynolds, L., et al., 2000. Modifications to the algal growth inhibition test for use as a regulatory assay. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 36-41. doi:10.1002/etc.5620190105

- Genty, B., Briantais, J.M., Baker, N.R., 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 990, 87-92. doi:10.1016/S0304-4165(89)80016-9
- Geret, F., Burgeot, T., Haure, J., Gagnaire, B., Renault, T., et al., 2013. Effects of low-dose exposure to pesticide mixture on physiological responses of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Environ. Toxicol.* 28, 689-99. doi:10.1002/tox.20764
- Gessner, P.K., 1995. Isobolographic analysis of interactions: an update on applications and utility. *Toxicology* 105, 161-179. doi:10.1016/0300-483X(95)03210-7
- Ghasemi, Y., Rasoul-Amini, S., Fotooh-Abadi, E., 2011. The biotransformation, biodegradation, and bioremediation of organic compounds by microalgae. *J. Phycol.* 47, 969-980. doi:10.1111/j.1529-8817.2011.01051.x
- Gil, Y., Sinfort, C., 2005. Emission of pesticides to the air during sprayer application: A bibliographic review. *Atmos. Environ.* 39, 5183-5193. doi:10.1016/j.atmosenv.2005.05.019
- Gimeno, R.A., Marcé, R.M., Borrull, F., 2004. Determination of organic contaminants in coastal water. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 23, 341-350. doi:10.1016/S0165-9936(04)00402-9
- Gobas, F.A.P.C., De Wolf, W., Burkhard, L.P., Verbruggen, E., Plotzke, K., 2009. Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 5, 624-637. doi:10.1897/IEAM\_2008-089.1
- Gómez-Gutiérrez, A.I., Jover, E., Bodineau, L., Albaigés, J., Bayona, J.M., 2006. Organic contaminant loads into the Western Mediterranean Sea: Estimate of Ebro River inputs. *Chemosphere* 65, 224-236. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.02.058
- Gómez, J.A., Llewellyn, C., Basch, G., Sutton, P.B., Dyson, J.S., et al., 2011. The effects of cover crops and conventional tillage on soil and runoff loss in vineyards and olive groves in several Mediterranean countries. *Soil Use Manag.* 27, 502-514. doi:10.1111/j.1475-2743.2011.00367.x
- Górecki, T., Namienik, J., 2002. Passive sampling. *Trends Anal. Chem.* 21, 276-291. doi:10.1016/S0165-9936(02)00407-7
- Götz, T., Böger, P., 2004. The very-long-chain fatty acid synthase is inhibited by chloroacetamides. *Zeitschrift für Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* 59, 549-553.
- Griffini, O., Bao, M.L., Barbieri, C., Burrini, D., Pantani, F., 1997. Occurrence of pesticides in the Arno river and in potable water - A survey of the period 1992-1995. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 59, 202-209. doi:10.1007/s001289900465
- Grunnet, K.S., Dahllöf, I., 2005. Environmental fate of the antifouling compound zinc pyrithione in seawater. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 3001. doi:10.1897/04-627R.1
- Guillard, R.R.L., 1975. Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates, in: Smith, W.L.,

- Chanley, M.H. (Éd.), Culture of Marine Invertebrate Animals SE - 3. Springer US, Boston, MA, p. 29-60. doi:10.1007/978-1-4615-8714-9\_3
- Guillard, R.R.L., Ryther, J.H., 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.* 8, 229-239. doi:10.1139/m62-029
- Guiry, M.D., Guiry, G.M., 2017. AlgaeBase. World-wide electronic publication [WWW Document]. URL <http://www.algaebase.org>
- Haines, T.H., 2001. Do sterols reduce proton and sodium leaks through lipid bilayers? *Prog. Lipid Res.* 40, 299-324. doi:10.1016/S0163-7827(01)00009-1
- Hapeman, C.J., Dionigi, C.P., Zimba, P. V., McConnell, L.L., 2002. Agrochemical and Nutrient Impacts on Estuaries and other aquatic systems. *J. Agric. Food Chem.* 50, 4382-4384. doi:10.1021/jf020457n
- Hasan, C.K., Turner, A., Readman, J., Frickers, T., 2014. Environmental Risks Associated with Booster Biocides Leaching from Spent Anti-Fouling Paint Particles in Coastal Environments. *Water Environ. Res.* 86, 2330-2337. doi:10.2175/106143014X14062131178835
- Herrero-Hernández, E., Andrades, M.S., Álvarez-Martín, A., Pose-Juan, E., Rodríguez-Cruz, M.S., et al., 2013. Occurrence of pesticides and some of their degradation products in waters in a Spanish wine region. *J. Hydrol.* 486, 234-245. doi:10.1016/j.jhydrol.2013.01.025
- Hewlett, P.S., 1969. Measurement of the potencies of drug mixtures. *Biometrics* 25, 477-487. doi:10.2307/2528900
- Hickey, C.W., Blaise, C., Costan, G., 1991. Microtesting appraisal of ATP and cell recovery toxicity end points after acute exposure of *Selenastrum capricornutum* to selected chemicals. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 6, 383-403. doi:10.1002/tox.2530060404
- Hildebrandt, A., Guillamón, M., Lacorte, S., Tauler, R., Barceló, D., 2008. Impact of pesticides used in agriculture and vineyards to surface and groundwater quality (North Spain). *Water Res.* 42, 3315-3326. doi:10.1016/j.watres.2008.04.009
- Hilz, E., Vermeer, A.W.P., 2013. Spray drift review: The extent to which a formulation can contribute to spray drift reduction. *Crop Prot.* 44, 75-83. doi:10.1016/j.cropro.2012.10.020
- Hirrmann, D., Loibner, A.P., Braun, R., Szolar, O.H.J., 2007. Applicability of the bioluminescence inhibition test in the 96-well microplate format for PAH-solutions and elutriates of PAH-contaminated soils. *Chemosphere* 67, 1236-1242. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.10.047
- His, E., Heyvang, I., Geffard, O., de Montaudouin, X., 1999. A comparison between oyster (*Crassostrea gigas*) and sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larval bioassays for toxicological studies. *Water Res.* 33, 1706-1718. doi:10.1016/S0043-1354(98)00381-9
- Hlaili, A.S., Niquil, N., Legendre, L., 2014. Planktonic food webs revisited: Reanalysis of results from

- the linear inverse approach. *Prog. Oceanogr.* 120, 216-229. doi:10.1016/j.pocean.2013.09.003
- Holmes, G., 2012. Diuron and the Great Barrier Reef – A review of the latest science. WWF.
- Hörnström, E., 1990. Toxicity test with algae — A discussion on the batch method. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 20, 343-353. doi:10.1016/0147-6513(90)90011-S
- Huckins, J.N., Petty, J.D., Lebo, J.A., Almeida, F. V., Booi, K., et al., 2002. Development of the permeability/performance reference compound approach for in situ calibration of semipermeable membrane devices. *Environ. Sci. Technol.* 36, 85-91. doi:10.1021/es010991w
- Huckins, J.N., Tubergen, M.W., Manuweera, G.K., 1990. Semipermeable membrane devices containing model lipid: A new approach to monitoring the bioavailability of lipophilic contaminants and estimating their bioconcentration potential. *Chemosphere* 20, 533-552. doi:10.1016/0045-6535(90)90110-F
- Huertas, I.E., Rouco, M., López-Rodas, V., Costas, E., 2010. Estimating the capability of different phytoplankton groups to adapt to contamination: Herbicides will affect phytoplankton species differently. *New Phytol.* 188, 478-487. doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03370.x
- Hunt, J.W., Anderson, B.S., Phillips, B.M., 1997. Recent Advances in Microscale Toxicity Testing with Marine Mollusks, in: Wells, P.G., Lee, K., Blaise, C. (Éd.), *Microscale Testing in Aquatic Toxicology: Advances, Techniques, and Practice*. p. 423-436.
- Hyka, P., Lickova, S., Přibyl, P., Melzoch, K., Kovar, K., 2013. Flow cytometry for the development of biotechnological processes with microalgae. *Biotechnol. Adv.* 31, 2-16. doi:10.1016/j.biotechadv.2012.04.007
- Ibrahim, I., 2013. Etude de l'applicabilité des échantillonneurs passifs POCIS et Chemcatcher pour le suivi des pesticides en milieux aquatiques. 481pp.
- Ichimi, K., Kawamura, T., Yamamoto, A., Tada, K., Harrison, P.J., 2012. Extremely high growth rate of the small diatom *Chaetoceros salsugineum* isolated from an estuary in the eastern seto inland sea, japan. *J. Phycol.* 48, 1284-1288. doi:10.1111/j.1529-8817.2012.01185.x
- ISO 10253:2016, 2016. Water quality - Marine algal growth inhibition test with *Skeletonema sp.* and *Phaeodactylum tricornutum*. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO 17244:2015, 2015. Water quality -- Determination of the toxicity of water samples on the embryo-larval development of Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) and mussel (*Mytilus edulis* or *Mytilus galloprovincialis*). Geneva, Switzerland.
- ISO 8692:2012, 2012. Water quality - Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae. Geneva, Switzerland.
- IUPAC, 2014. Acute toxicity, in: *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*. IUPAC, Research Triangle Park, NC, p. 6800. doi:10.1351/goldbook.AT06800

- Jamers, A., Blust, R., De Coen, W., Griffin, J.L., Jones, O.A.H., 2013. An omics based assessment of cadmium toxicity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquat. Toxicol.* 126, 355-364. doi:10.1016/j.aquatox.2012.09.007
- Jeffrey, S.W., Vesk, M., 1997. Introduction to marine phytoplankton and their pigment signatures, in: Jeffrey, S.W., Mantoura, R.F.C., Wright, S.W. (Éd.), *Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods*. UNESCO Publishing, Paris, p. 37-84. doi:10.1023/A:1007168802525
- Jha, A., Hagger, J., Hill, S., Depledge, M., 2000. Genotoxic, cytotoxic and developmental effects of tributyltin oxide (TBTO): an integrated approach to the evaluation of the relative sensitivities of two marine species. *Mar. Environ. Res.* 50, 565-573. doi:10.1016/S0141-1136(00)00112-4
- Jha, A.N., Cheung, V. V, Foulkes, M.E., Hill, S.J., Depledge, M.H., 2000. Detection of genotoxins in the marine environment: adoption and evaluation of an integrated approach using the embryo–larval stages of the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 464, 213-228. doi:10.1016/S1383-5718(99)00188-6
- Jones, R.J., Kerswell, A.P., 2003. Phytotoxicity of Photosystem II (PSII) herbicides to coral. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 261, 149-159. doi:10.3354/meps261149
- Jonker, M.J., Svendsen, C., Bedaux, J.J.M., Bongers, M., Kammenga, J.E., 2005. Significance testing of synergistic/antagonistic, dose level-dependent, or dose ratio-dependent effects in mixture dose-response analysis. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 2701. doi:10.1897/04-431R.1
- Junghans, M., Backhaus, T., Faust, M., Scholze, M., Grimme, L., 2006. Application and validation of approaches for the predictive hazard assessment of realistic pesticide mixtures. *Aquat. Toxicol.* 76, 93-110. doi:10.1016/j.aquatox.2005.10.001
- Junghans, M., Backhaus, T., Faust, M., Scholze, M., Grimme, L.H., 2003. Predictability of combined effects of eight chloroacetanilide herbicides on algal reproduction. *Pest Manag. Sci.* 59, 1101-1110. doi:10.1002/ps.735
- Kalyanaraman, B., Darley-USmar, V., Davies, K.J.A., Dennery, P.A., Forman, H.J., et al., 2012. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: Challenges and limitations. *Free Radic. Biol. Med.* 52, 1-6. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.030
- Kapusta, G., Krausz, R.F., 1992. Interaction of Terbufos and Nicosulfuron on Corn (*Zea mays*). *Weed Technol.* 6, 999-1003.
- Kepner, J., 2004. Synergy: The big unknowns of pesticide exposure. *Pestic. You* 23, 17–20.
- Kim, T.H., Jung, G.H., Lee, E.H., Park, H.R., Lee, J.K., et al., 2017. Development and validation of liquid chromatography–tandem mass Spectrometry method for simultaneous determination of zinc pyrithione and pyrithione in shampoos. *Acta Chromatogr.* 1-6. doi:10.1556/1326.2017.00294

- Kim Tiam, S., Fauvelle, V., Morin, S., Mazzella, N., Tiam, S.K., et al., 2016. Improving toxicity assessment of pesticide mixtures: The use of polar passive sampling devices extracts in microalgae toxicity tests. *Front. Microbiol.* 7, 1388. doi:10.3389/fmicb.2016.01388
- Kim Tiam, S., Libert, X., Morin, S., Gonzalez, P., Feurtet-Mazel, A., et al., 2014a. Single and mixture effects of pesticides and a degradation product on fluvial biofilms. *Environ. Monit. Assess.* 186, 3931-3939. doi:10.1007/s10661-014-3669-x
- Kim Tiam, S., Morin, S., Bonet, B., Guasch, H., Feurtet-Mazel, A., et al., 2015. Is the toxicity of pesticide mixtures on river biofilm accounted for solely by the major compounds identified? *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 4009-4024. doi:10.1007/s11356-014-3373-y
- Kim Tiam, S., Morin, S., Pesce, S., Feurtet-Mazel, A., Moreira, A., et al., 2014b. Environmental effects of realistic pesticide mixtures on natural biofilm communities with different exposure histories. *Sci. Total Environ.* 473-474, 496-506. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.12.060
- Kingston, J.K., Greenwood, R., Mills, G.A., Morrison, G.M., Björklund Persson, L., 2000. Development of a novel passive sampling system for the time-averaged measurement of a range of organic pollutants in aquatic environments. *J. Environ. Monit.* 2, 487-495. doi:10.1039/b003532g
- Knauert, S., Knauer, K., 2008. The role of reactive oxygen species in copper toxicity to two freshwater green algae. *J. Phycol.* 44, 311-319. doi:10.1111/j.1529-8817.2008.00471.x
- Konemann, H., 1981. Fish toxicity tests with mixtures of more than two chemicals: a proposal for a quantitative approach and experimental results. *Toxicology* 19, 229-238. doi:10.1016/0300-483X(81)90132-3
- Korkaric, M., Behra, R., Fischer, B.B., Junghans, M., Eggen, R.I.L., 2015. Multiple stressor effects in *Chlamydomonas reinhardtii* – Toward understanding mechanisms of interaction between effects of ultraviolet radiation and chemical pollutants. *Aquat. Toxicol.* 162, 18-28. doi:10.1016/j.aquatox.2015.03.001
- Kortenkamp, A., Backhaus, T., Faust, M., 2009. State of the Art Report on Mixture Toxicity - Final Report. *Report* 1-391. doi:http://ec.europa.eu/environment/chemicals/pdf/report\_Mixture%20toxicity.pdf
- Koutsaftis, A., Aoyama, I., 2006. The interactive effects of binary mixtures of three antifouling biocides and three heavy metals against the marine algae *Chaetoceros gracilis*. *Environ. Toxicol.* 21, 432-439. doi:10.1002/tox.20202
- Kovanci, O.B., Schal, C., Walgenbach, J.F., Kennedy, G.G., 2005. Comparison of mating disruption with pesticides for management of Oriental fruit moth (Lepidoptera: Tortricidae) in North Carolina apple orchards. *J. Econ. Entomol.* 98, 1248-1258. doi:10.1603/0022-0493-98.4.1248

- Krause, G.H., Weis, E., 1991. Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis: The Basics. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42, 313-349. doi:10.1146/annurev.pp.42.060191.001525
- Kuczynska, P., Jemiola-Rzeminska, M., Strzalka, K., 2015. Photosynthetic pigments in diatoms. *Mar. Drugs* 13, 5847-5881. doi:10.3390/md13095847
- Lacas, J.-G., Voltz, M., Gouy, V., Carluer, N., Gril, J.-J., 2005. Using grassed strips to limit pesticide transfer to surface water: a review. *Agron. Sustain. Dev.* 25, 253-266. doi:10.1051/agro:2005001
- Lango-Reynoso, F., Chávez-Villaba, J., Le Pennec, M., 2006. Reproductive patterns of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in France. *Invertebr. Reprod. Dev.* 49, 41-50. doi:10.1080/07924259.2006.9652192
- Larras, F., Rimet, F., Gregorio, V., Bérard, A., Leboulanger, C., et al., 2016. Pollution-induced community tolerance (PICI) as a tool for monitoring Lake Geneva long-term in situ ecotoxic restoration from herbicide contamination. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 4301-4311. doi:10.1007/s11356-015-5302-0
- Latowski, D., Kuczyńska, P., Strzalka, K., 2011. Xanthophyll cycle – a mechanism protecting plants against oxidative stress. *Redox Rep.* 16, 78-90. doi:10.1179/174329211X13020951739938
- Lavaud, J., Rousseau, B., Etienne, A.L., 2004. General features of photoprotection by energy dissipation in planktonic diatoms (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 40, 130-137. doi:10.1046/j.1529-8817.2004.03026.x
- Lê, S., Josse, J., Husson, F., 2008. FactoMineR : An R Package for Multivariate Analysis. *J. Stat. Softw.* 25, 253-258. doi:10.18637/jss.v025.i01
- Lee, P.Y., Chen, C.Y., 2009. Toxicity and quantitative structure-activity relationships of benzoic acids to *Pseudokirchneriella subcapitata*. *J. Hazard. Mater.* 165, 156-161. doi:10.1016/j.jhazmat.2008.09.086
- Lennartz, B., Louchart, X., Voltz, M., Andrieux, P., 1997. Diuron and Simazine Losses to Runoff Water in Mediterranean Vineyards. *J. Environ. Qual.* 26, 1493-1502. doi:10.2134/jeq1997.00472425002600060007x
- Leonard, R.A., 1990. Movement of pesticides into surface waters., in: Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts, and Modeling. Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin, p. 303-349.
- Leu, C., Singer, H., Stamm, C., Mülllell, S.R., Schwarzenbach, R.P., 2004. Simultaneous assessment of sources, processes, and factors influencing herbicide losses to surface waters in a small agricultural catchment. *Environ. Sci. Technol.* 38, 3827-3834. doi:10.1021/es0499602
- Levitan, O., Dinamarca, J., Hochman, G., Falkowski, P.G., 2014. Diatoms: A fossil fuel of the future. *Trends Biotechnol.* 32, 117-124. doi:10.1016/j.tibtech.2014.01.004

- Lewis, K.A., Tzilivakis, J., Warner, D.J., Green, A., 2016. An international database for pesticide risk assessments and management. *Hum. Ecol. Risk Assess. An Int. J.* 22, 1050-1064. doi:10.1080/10807039.2015.1133242
- Lewis, S.E., Brodie, J.E., Bainbridge, Z.T., Rohde, K.W., Davis, A.M., et al., 2009. Herbicides: A new threat to the Great Barrier Reef. *Environ. Pollut.* 157, 2470-2484. doi:10.1016/j.envpol.2009.03.006
- Li, H., Helm, P.A., Metcalfe, C.D., 2010a. Sampling in the great lakes for pharmaceuticals, personal care products, and endocrine-disrupting substances using the passive polar organic chemical integrative sampler. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 751-762. doi:10.1002/etc.104
- Li, H., Helm, P.A., Paterson, G., Metcalfe, C.D., 2011. The effects of dissolved organic matter and pH on sampling rates for polar organic chemical integrative samplers (POCIS). *Chemosphere* 83, 271-280. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.12.071
- Li, H., Vermeirssen, E.L.M., Helm, P.A., Metcalfe, C.D., 2010b. Controlled field evaluation of water flow rate effects on sampling polar organic compounds using polar organic chemical integrative samplers. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 2461-2469. doi:10.1002/etc.305
- Links, I., Van Der Jagt, K.E., Christopher, Y., Lurvink, M., Schinkel, J., et al., 2006. Occupational Exposure During Application and Removal of Antifouling Paints. *Ann. Occup. Hyg.* 51, 207-218. doi:10.1093/annhyg/mel074
- Liscio, C., Magi, E., Di Carro, M., Suter, M.J.F., Vermeirssen, E.L.M., 2009. Combining passive samplers and biomonitors to evaluate endocrine disrupting compounds in a wastewater treatment plant by LC/MS/MS and bioassay analyses. *Environ. Pollut.* 157, 2716-2721. doi:10.1016/j.envpol.2009.04.034
- Lissalde, S., Mazzella, N., Fauvelle, V., Delmas, F., Mazellier, P., et al., 2011. Liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry method for thirty-three pesticides in natural water and comparison of performance between classical solid phase extraction and passive sampling approaches. *J. Chromatogr. A* 1218, 1492-1502. doi:10.1016/j.chroma.2011.01.040
- Liu, X., Wang, Y., Chen, H., Zhang, J., Wang, C., et al., 2018. Acute toxicity and associated mechanisms of four strobilurins in algae. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* doi:10.1016/j.etap.2018.03.021
- Loewe, S., Muischnek, H., 1926. Combined effects I Announcement - Implements to the problem. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 114, 313-326.
- Loos, R., Gawlik, B.M., Locoro, G., Rimaviciute, E., Contini, S., et al., 2009. EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters. *Environ. Pollut.* 157, 561-8. doi:10.1016/j.envpol.2008.09.020

- López-Mancisidor, P., Carbonell, G., Fernández, C., Tarazona, J. V., 2008. Ecological impact of repeated applications of chlorpyrifos on zooplankton community in mesocosms under Mediterranean conditions. *Ecotoxicology* 17, 811-825. doi:10.1007/s10646-008-0239-4
- López-Rodas, V., Agrelo, M., Carrillo, E., Ferrero, L., Larrauri, A., et al., 2001. Resistance of microalgae to modern water contaminants as the result of rare spontaneous mutations. *Eur. J. Phycol.* 36, 179-190. doi:10.1080/09670260110001735328
- Louchart, X., Voltz, M., Andrieux, P., Moussa, R., 2001. Herbicide Transport to Surface Waters at Field and Watershed Scales in a Mediterranean Vineyard Area. *J. Environ. Qual.* 30, 982-991. doi:10.2134/jeq2001.303982x
- Louchart, X., Voltz, M., Coulouma, G., Andrieux, P., 2004. Oryzalin fate and transport in runoff water in Mediterranean vineyards. *Chemosphere* 57, 921-930. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.07.021
- Lozano, P., Trombini, C., Crespo, E., Blasco, J., Moreno-Garrido, I., 2014. ROI-scavenging enzyme activities as toxicity biomarkers in three species of marine microalgae exposed to model contaminants (copper, Irgarol and atrazine). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 104, 294-301. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.03.021
- Luria, S., Delbrück, M., 1943. Mutations of Bacteria from Virus Sensitivity to Virus Resistance. *Genetics* 28, 491-511. doi:10.1038/nature10260
- Ma, J., 2002. Differential sensitivity to 30 herbicides among populations of two green algae *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 68, 275-281. doi:10.1007/s001280249
- Ma, J., Wang, S., Wang, P., Ma, L., Chen, X., et al., 2006. Toxicity assessment of 40 herbicides to the green alga *Raphidocelis subcapitata*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 63, 456-462. doi:10.1016/j.ecoenv.2004.12.001
- Magnusson, M., Heimann, K., Negri, A.P., 2008. Comparative effects of herbicides on photosynthesis and growth of tropical estuarine microalgae. *Mar. Pollut. Bull.* 56, 1545-52. doi:10.1016/j.marpolbul.2008.05.023
- Magnusson, M., Heimann, K., Quayle, P., Negri, A.P., 2010. Additive toxicity of herbicide mixtures and comparative sensitivity of tropical benthic microalgae. *Mar. Pollut. Bull.* 60, 1978-1987. doi:10.1016/j.marpolbul.2010.07.031
- Magnusson, M., Heimann, K., Ridd, M., Negri, A.P., 2012. Chronic herbicide exposures affect the sensitivity and community structure of tropical benthic microalgae. *Mar. Pollut. Bull.* 65, 363-372. doi:10.1016/j.marpolbul.2011.09.029
- Mai, H., Cachot, J., Brune, J., Geffard, O., Belles, A., et al., 2012. Embryotoxic and genotoxic effects

- of heavy metals and pesticides on early life stages of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Mar. Pollut. Bull.* 64, 2663-70. doi:10.1016/j.marpolbul.2012.10.009
- Mai, H., Gonzalez, P., Pardon, P., Tapie, N., Budzinski, H., et al., 2014. Comparative responses of sperm cells and embryos of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) to exposure to metolachlor and its degradation products. *Aquat. Toxicol.* 147, 48-56. doi:10.1016/j.aquatox.2013.11.024
- Mai, H., Morin, B., Pardon, P., Gonzalez, P., Budzinski, H., et al., 2013. Environmental concentrations of irgarol, diuron and S-metolachlor induce deleterious effects on gametes and embryos of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Mar. Environ. Res.* 89, 1-8. doi:10.1016/j.marenvres.2013.04.003
- Malev, O., Klobučar, R.S., Fabbretti, E., Trebše, P., 2012. Comparative toxicity of imidacloprid and its transformation product 6-chloronicotinic acid to non-target aquatic organisms: Microalgae *Desmodesmus subspicatus* and amphipod *Gammarus fossarum*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 104, 178-186. doi:10.1016/j.pestbp.2012.07.008
- Mallick, N., Mohn, F.H., 2000. Reactive oxygen species: Response of algal cells. *J. Plant Physiol.* 157, 183-193. doi:10.1016/S0176-1617(00)80189-3
- Maltby, L., Brock, T.C.M., Van Den Brink, P.J., 2009. Fungicide risk assessment for aquatic ecosystems: Importance of interspecific variation, toxic mode of action, and exposure regime. *Environ. Sci. Technol.* 43, 7556-7563. doi:10.1021/es901461c
- Mansano, A.S., Moreira, R.A., Dornfeld, H.C., Freitas, E.C., Vieira, E.M., et al., 2017. Effects of diuron and carbofuran and their mixtures on the microalgae *Raphidocelis subcapitata*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 142, 312-321. doi:10.1016/j.ecoenv.2017.04.024
- Maraldo, K., Dahllöf, I., 2004. Seasonal variations in the effect of zinc pyriithione and copper pyriithione on pelagic phytoplankton communities. *Aquat. Toxicol.* 69, 189-198. doi:10.1016/j.aquatox.2004.05.006
- Marie, D., Simon, N., Vaultot, D., 2005. Phytoplankton Cell Counting by Flow Cytometry. *Algal Cult. Tech.* 1, 253-556.
- Martin-Creuzburg, D., Merkel, P., 2016. Sterols of freshwater microalgae: potential implications for zooplankton nutrition. *J. Plankton Res.* 38, 865-877. doi:10.1093/plankt/fbw034
- Martin, M., Osborn, K.E., Billig, P., Glickstein, N., 1981. Toxicities of ten metals to *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* embryos and *Cancer magister* larvae. *Mar. Pollut. Bull.* 12, 305-308. doi:10.1016/0025-326X(81)90081-3
- Martínez Bueno, M.J., Hernando, M.D., Agüera, A., Fernández-Alba, A.R., 2009. Application of passive sampling devices for screening of micro-pollutants in marine aquaculture using LC-MS/MS. *Talanta* 77, 1518-1527. doi:10.1016/j.talanta.2008.09.047

- Marvá, F., López-Rodas, V., Rouco, M., Navarro, M., Toro, F.J., et al., 2010. Adaptation of green microalgae to the herbicides simazine and diquat as result of pre-selective mutations. *Aquat. Toxicol.* 96, 130-4. doi:10.1016/j.aquatox.2009.10.009
- Masojídek, J., Koblizek, M., Torzillo, G., 2004. Photosynthesis in Microalgae, in: Handbook of Microalgal Culture. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, p. 20-39. doi:10.1002/9780470995280.ch2
- Massis, D., Hild, F., 2016. La pratique de l'agriculture biologique créatrice d'emploi ? - Une évaluation de l'impact du bio sur la quantité de travail agricole. *Agreste Les Dossiers* 35, 1-32.
- Massjuk, N.P. (2006)., 2006. Chlorodendrophyceae class. nov. (Chlorophyta, Viridiplantae) in the ukrainian flora: I. The volume, phylogenetic relations and taxonomical status. *Ukr. Bot. J.* 63, 601-614.
- Matthes, B., Böger, P., 2002. Chloroacetamides affect the plasma membrane. *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* 57, 843-852.
- Maxwell, K., Johnson, G.N., 2000. Chlorophyll fluorescence--a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51, 659-668. doi:10.1093/jexbot/51.345.659
- Mayer, P., Cuhel, R., Nyholm, N., 1997. A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. *Water Res.* 31, 2525-2531. doi:10.1016/S0043-1354(97)00084-5
- Mayer, P., Reichenberg, F., 2006. Can highly hydrophobic organic substances cause aquatic baseline toxicity and can they contribute to mixture toxicity? *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 2639-2644. doi:10.1897/06-142R.1
- Mazzella, N., Dubernet, J.F., Delmas, F., 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. *J. Chromatogr. A* 1154, 42-51. doi:10.1016/j.chroma.2007.03.087
- Mazzella, N., Lissalde, S., Moreira, S., Delmas, F., Mazellier, P., et al., 2010. Evaluation of the use of performance reference compounds in an oasis-HLB adsorbent based passive sampler for improving water concentration estimates of polar herbicides in freshwater. *Environ. Sci. Technol.* 44, 1713-1719. doi:10.1021/es902256m
- McCarty, L.S., Borgert, C.J., 2006. Review of the toxicity of chemical mixtures containing at least one organochlorine. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 45, 104-118. doi:10.1016/j.yrtph.2006.03.002
- Meffe, R., de Bustamante, I., 2014. Emerging organic contaminants in surface water and groundwater: A first overview of the situation in Italy. *Sci. Total Environ.* 481, 280-295. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.02.053

- Melegari, S.P., Perreault, F., Costa, R.H.R., Popovic, R., Matias, W.G., 2013. Evaluation of toxicity and oxidative stress induced by copper oxide nanoparticles in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquat. Toxicol.* 142-143, 431-440. doi:10.1016/j.aquatox.2013.09.015
- Miège, C., Mazzella, N., Allan, I., Dulio, V., Smedes, F., et al., 2015. Position paper on passive sampling techniques for the monitoring of contaminants in the aquatic environment - Achievements to date and perspectives. *Trends Environ. Anal. Chem.* 8, 20-26. doi:10.1016/j.teac.2015.07.001
- Milenkovski, S., Bååth, E., Lindgren, P.E., Berglund, O., 2010. Toxicity of fungicides to natural bacterial communities in wetland water and sediment measured using leucine incorporation and potential denitrification. *Ecotoxicology* 19, 285-294. doi:10.1007/s10646-009-0411-5
- Millar, a a, Wrischer, M., Kunst, L., 1998. Accumulation of very-long-chain fatty acids in membrane glycerolipids is associated with dramatic alterations in plant morphology. *Plant Cell* 10, 1889-1902. doi:10.1105/tpc.10.11.1889
- Mochida, K., Ito, K., Harino, H., Kakuno, A., Fujii, K., 2006. Acute toxicity of pyrethrin antifouling biocides and joint toxicity with copper to red sea bream (*Pagrus major*) and toy shrimp (*Heptacarpus futilirostris*). *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 3058-64. doi:10.1897/05-688r.1
- Mofeed, J., Mosleh, Y.Y., 2013. Toxic responses and antioxidative enzymes activity of *Scenedesmus obliquus* exposed to fenhexamid and atrazine, alone and in mixture. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 95, 234-240. doi:10.1016/j.ecoenv.2013.05.023
- Moisset, S., Kim Tiam, S., Feurtet-Mazel, A., Morin, S., Delmas, F., et al., 2015. Genetic and physiological responses of three freshwater diatoms to realistic diuron exposures. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 4046-4055. doi:10.1007/s11356-014-3523-2
- Montero, M.F., Aristizábal, M., García Reina, G., 2011. Isolation of high-lipid content strains of the marine microalga *Tetraselmis suecica* for biodiesel production by flow cytometry and single-cell sorting. *J. Appl. Phycol.* 23, 1053-1057. doi:10.1007/s10811-010-9623-6
- Morin, N.A.O., Mazzella, N., Arp, H.P.H., Randon, J., Camilleri, J., et al., 2018. Kinetic accumulation processes and models for 43 micropollutants in “pharmaceutical” POCIS. *Sci. Total Environ.* 615, 197-207. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.08.311
- Morin, S., Bottin, M., Mazzella, N., Macary, F., Delmas, F., et al., 2009. Linking diatom community structure to pesticide input as evaluated through a spatial contamination potential (Phytopixal): A case study in the Neste river system (South-West France). *Aquat. Toxicol.* 94, 28-39. doi:10.1016/j.aquatox.2009.05.012
- Morin, S., Pesce, S., Kim Tiam, S., Libert, X., Coquery, M., et al., 2012. Use of polar organic chemical integrative samplers to assess the effects of chronic pesticide exposure on biofilms. *Ecotoxicology*

- 21, 1570-1580. doi:10.1007/s10646-012-0910-7
- Moschet, C., Wittmer, I., Simovic, J., Junghans, M., Piazzoli, A., et al., 2014. How a complete pesticide screening changes the assessment of surface water quality. *Environ. Sci. Technol.* 48, 5423-5432. doi:10.1021/es500371t
- Mottier, A., Kientz-Bouchart, V., Dubreule, C., Serpentine, A., Lebel, J.M., et al., 2014. Effects of acute exposures to mecoprop, mecoprop-p and their biodegradation product (2-MCP) on the larval stages of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquat. Toxicol.* 146, 165-175. doi:10.1016/j.aquatox.2013.11.008
- Mottier, A., Kientz-Bouchart, V., Serpentine, A., Lebel, J.M., Jha, A.N., et al., 2013. Effects of glyphosate-based herbicides on embryo-larval development and metamorphosis in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquat. Toxicol.* 128-129, 67-78. doi:10.1016/j.aquatox.2012.12.002
- Mottier, A., Séguin, A., Devos, A., Pabic, C. Le, Voiseux, C., et al., 2015. Effects of subchronic exposure to glyphosate in juvenile oysters (*Crassostrea gigas*): FROM molecular to individual levels. *Mar. Pollut. Bull.* 95, 665-677. doi:10.1016/j.marpolbul.2014.10.026
- Muller-Feuga, A., Moal, J., Kaas, R., 2003a. The Microalgae of Aquaculture, in: Live Feeds in Marine Aquaculture. p. 206-252.
- Muller-Feuga, A., Robert, R., Cahu, C., Robin, J., Divanach, P., 2003b. Uses of Microalgae in Aquaculture, in: Live Feeds in Marine Aquaculture. p. 253-299.
- Müller, M.E., Escher, B.I., Schwientek, M., Werneburg, M., Zarfl, C., et al., 2018. Combining in vitro reporter gene bioassays with chemical analysis to assess changes in the water quality along the Ammer River, Southwestern Germany. *Environ. Sci. Eur.* 30. doi:10.1186/s12302-018-0148-y
- Muller, R., Schreiber, U., Escher, B.I., Quayle, P., Bengtson Nash, S.M., et al., 2008. Rapid exposure assessment of PSII herbicides in surface water using a novel chlorophyll a fluorescence imaging assay. *Sci. Total Environ.* 401, 51-9. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.02.062
- Muller, R., Tang, J.Y.M., Thier, R., Mueller, J.F., 2007. Combining passive sampling and toxicity testing for evaluation of mixtures of polar organic chemicals in sewage treatment plant effluent. *J. Environ. Monit.* 9, 104-109. doi:10.1039/b612430e
- Munaron, D., Tapie, N., Budzinski, H., Andral, B., Gonzalez, J.-L.L., 2012. Pharmaceuticals, alkylphenols and pesticides in Mediterranean coastal waters: Results from a pilot survey using passive samplers. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 114, 82-92. doi:10.1016/j.ecss.2011.09.009
- Munkegaard, M., Abbaspoor, M., Cedergreen, N., 2008. Organophosphorous insecticides as herbicide synergists on the green algae *Pseudokirchneriella subcapitata* and the aquatic plant *Lemna minor*. *Ecotoxicology* 17, 29-35. doi:10.1007/s10646-007-0173-x
- Nagai, T., 2017. Predicting herbicide mixture effects on multiple algal species using mixture toxicity

- models. *Environ. Toxicol. Chem.* 36, 2624-2630. doi:10.1002/etc.3800
- Nagai, T., De Schamphelaere, K.A.C., 2016. The effect of binary mixtures of zinc, copper, cadmium, and nickel on the growth of the freshwater diatom *Navicula pelliculosa* and comparison with mixture toxicity model predictions. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 2765-2773. doi:10.1002/etc.3445
- Nagai, T., Taya, K., Annoh, H., Ishihara, S., 2013. Application of a fluorometric microplate algal toxicity assay for riverine periphytic algal species. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 94, 37-44. doi:10.1016/j.ecoenv.2013.04.020
- Nagai, T., Taya, K., Yoda, I., 2016. Comparative toxicity of 20 herbicides to 5 periphytic algae and the relationship with mode of action. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 368-375. doi:10.1002/etc.3150
- Nestler, H., Groh, K.J., Schönenberger, R., Behra, R., Schirmer, K., et al., 2012. Multiple-endpoint assay provides a detailed mechanistic view of responses to herbicide exposure in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquat. Toxicol.* 110-111, 214-224. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.01.014
- Nimbal, C.I., Yerkes, C.N., Weston, L.A., Weller, S.C., 1996. Herbicidal Activity and Site of Action of the Natural Product Sorgoleone. *Pestic. Biochem. Physiol.* 54, 73-83. doi:10.1006/pest.1996.0011
- Nobusawa, T., Umeda, M., 2012. Very-long-chain fatty acids have an essential role in plastid division by controlling Z-ring formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genes to Cells* 17, 709-719. doi:10.1111/j.1365-2443.2012.01619.x
- Nogueira, D.J., Mattos, J.J., Dybas, P.R., Flores-Nunes, F., Sasaki, S.T., et al., 2017. Effects of phenanthrene on early development of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1789). *Aquat. Toxicol.* 191, 50-61. doi:10.1016/j.aquatox.2017.07.022
- Nowell, L.H., Norman, J.E., Moran, P.W., Martin, J.D., Stone, W.W., 2014. Pesticide toxicity index - a tool for assessing potential toxicity of pesticide mixtures to freshwater aquatic organisms. *Sci. Total Environ.* 476-477, 144-157. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.12.088
- Nymark, M., Valle, K.C., Brembu, T., Hancke, K., Winge, P., et al., 2009. An integrated analysis of molecular acclimation to high light in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *PLoS One* 4. doi:10.1371/journal.pone.0007743
- Nyström, B., Björnsäter, B., Blanck, H., 1999. Effects of sulfonylurea herbicides on non-target aquatic micro-organisms - Growth inhibition of micro-algae and short-term inhibition of adenine and thymidine incorporation in periphyton communities. *Aquat. Toxicol.* 47, 9-22. doi:10.1016/S0166-445X(99)00007-7
- O'Brien, D., Lewis, S., Davis, A., Gallen, C., Smith, R., et al., 2016. Spatial and Temporal Variability in Pesticide Exposure Downstream of a Heavily Irrigated Cropping Area: Application of Different Monitoring Techniques. *J. Agric. Food Chem.* 64, 3975-3989.

doi:10.1021/acs.jafc.5b04710

OCDE, 2006. Essai n° 201: Algues, Essai d'inhibition de la croissance, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 2 : Effets sur les systèmes biologiques. Éditions OCDE. doi:10.1787/9789264069930-fr

Ochoa-Acuña, H.G., Bialkowski, W., Yale, G., Hahn, L., 2009. Toxicity of soybean rust fungicides to freshwater algae and *Daphnia magna*. *Ecotoxicology* 18, 440-6. doi:10.1007/s10646-009-0298-1

Oda, Y., Nakamura, S., Oki, I., Kato, T., Shinagawa, H., 1985. Evaluation of the new system (umu-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens. *Mutat. Res. Mutagen. Relat. Subj.* 147, 219-229. doi:10.1016/0165-1161(85)90062-7

OECD 201, 2011. Test No. 201: Alga, Growth Inhibition Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2: Effects on Biotic Systems. OECD Publishing, Paris, France. doi:10.1787/9789264069923-en

Oehlmann, J., Fioroni, P., Stroben, E., Markert, B., 1996. Tributyltin (TBT) effects on *Ocinebrina aciculata* (Gastropoda: Muricidae): imposex development, sterilization, sex change and population decline. *Sci. Total Environ.* 188, 205-223. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0048-9697(96)05173-X

Oettmeier, W., 1992. Herbicides of photosystem II, in: Barber, J. (Éd.), The photosystems: structure, function and molecular biology. Elsevier, Amsterdam, p. 349-408. doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-444-89440-3.50018-7

Oettmeier, W., 1999. Herbicide resistance and supersensitivity in photosystem II. *Cell. Mol. Life Sci. C.* 55, 1255-1277. doi:10.1007/s000180050370

Ohvo-Rekilä, H., Ramstedt, B., Leppimäki, P., Peter Slotte, J., 2002. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Prog. Lipid Res.* 41, 66-97. doi:10.1016/S0163-7827(01)00020-0

OMI, 2018. Anti-fouling systems [WWW Document]. URL <http://www.imo.org/fr/OurWork/Environment/Anti-foulingSystems/Pages/Default.aspx> (consulté le 5.24.18).

Onduka, T., Mochida, K., Harino, H., Ito, K., Kakuno, A., et al., 2010. Toxicity of Metal Pyrethrin Photodegradation Products to Marine Organisms with Indirect Evidence for Their Presence in Seawater. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 58, 991-997. doi:10.1007/s00244-009-9430-8

Overmyer, J.P., Rouse, D.R., Avants, J.K., Garrison, a. W., DeLorenzo, M.E., et al., 2007. Toxicity of fipronil and its enantiomers to marine and freshwater non-targets. *J. Environ. Sci. Heal. Part B* 42, 471-480. doi:10.1080/03601230701391823

Parrott, J.L., Backus, S.M., Borgmann, A.I., Swyripa, M., 1999. The use of semipermeable membrane devices to concentrate chemicals in oil refinery effluent on the Mackenzie River. *Arctic* 52,

- 125-138. doi:10.14430/arctic917
- Paschke, A., Schwab, K., Brümmer, J., Schüürmann, G., Paschke, H., et al., 2006. Rapid semi-continuous calibration and field test of membrane-enclosed silicone collector as passive water sampler. *J. Chromatogr. A* 1124, 187-195. doi:10.1016/j.chroma.2006.06.094
- Pavlič, Ž., Stjepanović, B., Horvatić, J., Peršić, V., Puntarić, D., et al., 2006. Comparative sensitivity of green algae to herbicides using erlenmeyer flask and microplate growth-inhibition assays. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 76, 883-890. doi:10.1007/s00128-006-1001-3
- Pearson, B.L., Simon, J.M., McCoy, E.S., Salazar, G., Fragola, G., et al., 2016. Identification of chemicals that mimic transcriptional changes associated with autism, brain aging and neurodegeneration. *Nat. Commun.* 7, 1-12. doi:10.1038/ncomms11173
- Pennington, F., Guillard, R.R.L.L., Liaaen-Jensen, S., 1988. Carotenoid Distribution Patterns in Bacillariophyceae (Diatoms). *Biochem. Syst. Ecol.* 16, 589-592. doi:10.1016/0305-1978(88)90067-1
- Pérès, F., Florin, D., Grollier, T., Feurtet-Mazel, A., Coste, M., et al., 1996. Effects of the phenylurea herbicide isoproturon on periphytic diatom communities in freshwater indoor microcosms. *Environ. Pollut.* 94, 141-152. doi:10.1016/S0269-7491(96)00080-2
- Pérez, G.L., Solange, V.M., Miranda, L., 2011. Effects of herbicide glyphosate and glyphosate-based formulations on aquatic ecosystems, in: Kortekamp, A. (Éd.), *Herbicides and environment*. InTech, Argentina, p. 343-368.
- Persoone, G., 1986. Ecotoxicological testing for the marine environment, in: *Strategies and Advanced Techniques for Marine Pollution Studies*. Springer, p. 405-416.
- Pesce, S., Lissalde, S., Lavieille, D., Margoum, C., Mazzella, N., et al., 2010. Evaluation of single and joint toxic effects of diuron and its main metabolites on natural phototrophic biofilms using a pollution-induced community tolerance (PICT) approach. *Aquat. Toxicol.* 99, 492-499. doi:10.1016/j.aquatox.2010.06.006
- Pesce, S., Morin, S., Lissalde, S., Montuelle, B., Mazzella, N., 2011. Combining polar organic chemical integrative samplers (POCIS) with toxicity testing to evaluate pesticide mixture effects on natural phototrophic biofilms. *Environ. Pollut.* 159, 735-741. doi:10.1016/j.envpol.2010.11.034
- Petersen, K., Heiaas, H.H., Tollefsen, K.E., 2014. Combined effects of pharmaceuticals, personal care products, biocides and organic contaminants on the growth of *Skeletonema pseudocostatum*. *Aquat. Toxicol.* 150, 45-54. doi:10.1016/j.aquatox.2014.02.013
- Pinasseau, L., Wiest, L., Volatier, L., Mermillod-Blondin, F., Vulliet, E., 2018. Echantillonnage passif et screening de pesticides et pharmaceutiques des eaux souterraines et de ruissellement, in: *Forum SEM (Santé, Environnement, Molécules)*. Valence-TGV, France.

- Pospíšil, P., 2016. Production of Reactive Oxygen Species by Photosystem II as a Response to Light and Temperature Stress. *Front. Plant Sci.* 7, 1-12. doi:10.3389/fpls.2016.01950
- Posthuma, Leo Suter II, Glen W. Traas, T.P., 2001. Species Sensitivity Distributions in Ecotoxicology. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, United States.
- Poulier, G., Lissalde, S., Charriau, A., Buzier, R., Delmas, F., et al., 2014. Can POCIS be used in Water Framework Directive (2000/60/EC) monitoring networks? A study focusing on pesticides in a French agricultural watershed. *Sci. Total Environ.* 497-498, 282-292. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.08.001
- Prado, R., García, R., Rioboo, C., Herrero, C., Abalde, J., et al., 2009. Comparison of the sensitivity of different toxicity test endpoints in a microalga exposed to the herbicide paraquat. *Environ. Int.* 35, 240-247. doi:10.1016/j.envint.2008.06.012
- Prado, R., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, Á., 2011. Characterization of cell response in *Chlamydomonas moenussii* cultures exposed to the herbicide paraquat: Induction of chlorosis. *Aquat. Toxicol.* 102, 10-17. doi:10.1016/j.aquatox.2010.12.013
- Prado, R., Rioboo, C., Herrero, C., Suárez-Bregua, P., Cid, Á., 2012. Flow cytometric analysis to evaluate physiological alterations in herbicide-exposed *Chlamydomonas moenussii* cells. *Ecotoxicology* 21, 409-420. doi:10.1007/s10646-011-0801-3
- Prasad, A., Ferretti, U., Sedlářová, M., Pospíšil, P., 2016. Singlet oxygen production in *Chlamydomonas reinhardtii* under heat stress. *Sci. Rep.* 6, 20094. doi:10.1038/srep20094
- Pujol, J., 2014. Enquête - Pratiques phytosanitaires en arboriculture 2012 - Nombre de traitements. *Agreste Les Dossiers* 22, 1-17.
- Quiniou, F., Compère, C., 2012. La chimie à l'assaut des biosalissures, in: La Chimie et la Mer : ensemble au service de l'homme. p. 207.
- Quiniou, F., His, É., Delesmont, R., Caisey, X., 2005. Bio-indicateur de la toxicité potentielle de milieux aqueux : bio-essai « développement embryon-larvaire de bivalve », Quæ. ed.
- R Development Core Team, 2008. R: A language and environment for statistical computing.
- Rabiet, M., Margoum, C., Gouy, V., Carluer, N., Coquery, M., 2010. Assessing pesticide concentrations and fluxes in the stream of a small vineyard catchment - Effect of sampling frequency. *Environ. Pollut.* 158, 737-748. doi:10.1016/j.envpol.2009.10.014
- Ran, Y., Jain, N., Yalkowsky, S.H., 2001. Prediction of Aqueous Solubility of Organic Compounds by the General Solubility Equation (GSE). *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 41, 1208-1217. doi:10.1021/ci010287z
- Rand, G.M., 1995. Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment. CRC Press.

- Rand, G.M., Petrocelli, S.R., 1985. Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications. FMC Corp., Princeton, NJ.
- Rao, G.V.R., Rupela, O.P., Rao, V.R., Reddy, Y.V.R., 2007. Role of pesticides in crop protection: present status and future prospects. *Indian J. Plant Prot.*
- Rastogi, A., Lin, X., Lombard, B., Loew, D., Tirichine, L., 2015. Probing the evolutionary history of epigenetic mechanisms: what can we learn from marine diatoms. *AIMS Genet.* 2, 173-191. doi:10.3934/genet.2015.3.173
- Ravier, I., Haouisee, E., Clément, M., Seux, R., Briand, O., 2005. Field experiments for the evaluation of pesticide spray-drift on arable crops. *Pest Manag. Sci.* 61, 728-736. doi:10.1002/ps.1049
- Readman, J.W., Kwong, L.L.W., Grondin, D., Bartocci, J., Villeneuve, J.P., et al., 1993. Coastal water contamination from a triazine herbicide used in antifouling paints. *Environ. Sci. Technol.* 27, 1940-1942. doi:10.1021/es00046a027
- Reeder, N.L., Xu, J., Youngquist, R.S., Schwartz, J.R., Rust, R.C., et al., 2011. The antifungal mechanism of action of zinc pyrithione. *Br. J. Dermatol.* 165, 9-12. doi:10.1111/j.1365-2133.2011.10571.x
- Ricard, M., 1987. Atlas du phytoplancton marin: Diatomophycées, Atlas du phytoplancton marin. Editions du Centre national de la recherche scientifique, 1986, Paris.
- Riedl, J., Altenburger, R., 2007. Physicochemical substance properties as indicators for unreliable exposure in microplate-based bioassays. *Chemosphere* 67, 2210-2220. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.12.022
- Rioboo, C., González-Barreiro, Ó., Abalde, J., Cid, Á., 2011. Flow cytometric analysis of the encystment process induced by paraquat exposure in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Eur. J. Phycol.* 46, 89-97. doi:10.1080/09670262.2011.561775
- Ritz, C., Baty, F., Streibig, J.C., Gerhard, D., 2015. Dose-Response Analysis Using R. *PLoS One* 10, e0146021. doi:10.1371/journal.pone.0146021
- Ritz, C., Streibig, J.C., 2005. Bioassay analysis using R. *J. Stat. Softw.* 12, 1-22. doi:10.18637/jss.v012.i05
- Ritz, C., Streibig, J.C., 2014. From additivity to synergism – A modelling perspective. *Synergy* 1, 22-29. doi:10.1016/j.synres.2014.07.010
- Robert, R., Chretiennot-Dinet, M.-J., Kaas, R., Martin-Jezequel, V., Moal, J., et al., 2004. Amélioration des productions phytoplanctoniques en éclosion de mollusques: caractérisation des microalgues fourrage. Ifremer, CNRS.
- Robert, R., His, E., 1987. Croissance et spectre de taille de trois algues en cultures non renouvelées, utilisées pour la nutrition de larves de bivalves en éclosion. *Haliotis* 16, 393-402.

- Rodrigues, E.T., Alpendurada, M.F., Ramos, F., Pardal, M.Â., 2018. Environmental and human health risk indicators for agricultural pesticides in estuaries. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 150, 224-231. doi:10.1016/j.ecoenv.2017.12.047
- Rogers, K.R., Harper, S.L., Robertson, G., 2005. Screening for toxic industrial chemicals using semipermeable membrane devices with rapid toxicity assays. *Anal. Chim. Acta* 543, 229-235. doi:10.1016/j.aca.2005.04.016
- Rojíková, R., Dvofáková, D., Marešlek, B., 1998. The use of miniaturized algal bioassays in comparison to the standard flask assay. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 13, 235-241. doi:10.1002/(SICI)1098-2256(1998)13:3<235::AID-TOX5>3.0.CO;2-8
- Ronot, X., Grunwald, D., Mayol, J.-F., Boutonnat, J., Maynadié, M., et al., 2006. La cytométrie en flux, Editions T. ed. Lavoisier, Paris.
- Roubeix, V., Fauvelle, V., Tison-Rosebery, J., Mazzella, N., Coste, M., et al., 2012a. Assessing the impact of chloroacetanilide herbicides and their metabolites on periphyton in the Leyre River (SW France) via short term growth inhibition tests on autochthonous diatoms. *J. Environ. Monit.* 14, 1655. doi:10.1039/c2em10887a
- Roubeix, V., Pesce, S., Mazzella, N., Coste, M., Delmas, F., 2012b. Variations in periphytic diatom tolerance to agricultural pesticides in a contaminated river: An analysis at different diversity levels. *Fresenius Environ. Bull.* 21, 2090-2094.
- Routledge, E.J., Sumpter, J.P., 1996. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 241-248. doi:10.1002/etc.5620150303
- Rusina, T.P., Smedes, F., Koblizkova, M., Klanova, J., 2010. Calibration of silicone rubber passive samplers: Experimental and modeled relations between sampling rate and compound properties. *Environ. Sci. Technol.* 44, 362-367. doi:10.1021/es900938r
- Sachindra, N.M., Sato, E., Maeda, H., Hosokawa, M., Niwano, Y., et al., 2007. Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of marine carotenoid fucoxanthin and its metabolites. *J. Agric. Food Chem.* 55, 8516-8522. doi:10.1021/jf071848a
- Saison, C., Cattan, P., Louchart, X., Voltz, M., 2008. Effect of spatial heterogeneities of water fluxes and application pattern on cadusafos fate on banana-cultivated andosols. *J. Agric. Food Chem.* 56, 11947-11955. doi:10.1021/jf802435c
- Salvi, D., Macali, A., Mariottini, P., 2014. Molecular phylogenetics and systematics of the bivalve family Ostreidae based on rRNA sequence-structure models and multilocus species tree. *PLoS One* 9, 19-21. doi:10.1371/journal.pone.0108696
- Salvi, D., Mariottini, P., 2017. Molecular taxonomy in 2D: A novel ITS2 rRNA sequence structure

- approach guides the description of the oysters' subfamily Saccostreinae and the genus *Magallana* (Bivalvia: Ostreidae). *Zool. J. Linn. Soc.* 179, 263-276. doi:10.1111/zoj.12455
- Sánchez, Á., Maceiras, R., Cancela, Á., Pérez, A., 2013. Culture aspects of *Isochrysis galbana* for biodiesel production. *Appl. Energy* 101, 192-197. doi:10.1016/j.apenergy.2012.03.027
- Santos-Ballardo, D.U., Font-Segura, X., Ferrer, A.S., Barrena, R., Rossi, S., et al., 2015. Valorisation of biodiesel production wastes: Anaerobic digestion of residual *Tetraselmis suecica* biomass and co-digestion with glycerol. *Waste Manag. Res.* 33, 250-257. doi:10.1177/0734242X15572182
- Sarno, D., Kooistra, W.H.C.F., Medlin, L.K., Percopo, I., Zingone, A., 2005. Diversity in the genus *Skeletonema* (Bacillariophyceae). II. An assessment of the taxonomy of *S. costatum*-like species with the description of four new species. *J. Phycol.* 41, 151-176. doi:10.1111/j.1529-8817.2005.04067.x
- Schmitt, H., Altenburger, R., Jastorff, B., Schüürmann, G., 2000. Quantitative Structure–Activity Analysis of the Algae Toxicity of Nitroaromatic Compounds. *Chem. Res. Toxicol.* 13, 441-450. doi:10.1021/tx9901635
- Schneider, R., Kohlwein, S.D., 1997. Organelle structure, function, and inheritance in yeast: A role for fatty acid synthesis? *Cell* 88, 431-434. doi:10.1016/S0092-8674(00)81882-6
- Scholze, M., Boedeker, W., Faust, M., Backhaus, T., Altenburger, R., et al., 2001. A general best-fit method for concentration-response curves and the estimation of low-effect concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 448-457. doi:10.1002/etc.5620200228
- Schultz, M.P., 2007. Effects of coating roughness and biofouling on ship resistance and powering. *Biofouling* 23, 331-341. doi:10.1080/08927010701461974
- Semple, K.T., Dew, N.M., Doick, K.J., Rhodes, A.H., 2006. Can microbial mineralization be used to estimate microbial availability of organic contaminants in soil? *Environ. Pollut.* 140, 164-172. doi:10.1016/j.envpol.2005.06.009
- Seoane, M., Esperanza, M., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, Á., 2017. Flow cytometric assay to assess short-term effects of personal care products on the marine microalga *Tetraselmis suecica*. *Chemosphere* 171, 339-347. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.12.097
- Seoane, M., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, Á., 2014. Toxicity induced by three antibiotics commonly used in aquaculture on the marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butch. *Mar. Environ. Res.* 101, 1-7. doi:10.1016/j.marenvres.2014.07.011
- Shatkin, G., Shumway, S.E., Hawes, R., 1997. Considerations regarding the possible introduction of the pacific oyster (*Crassostrea gigas*) to the Gulf of Maine: A review of global experience. *J. Shellfish Res.* 16, 463-477.
- Shaw, M., Negri, A., Fabricius, K., Mueller, J.F., 2009. Predicting water toxicity: Pairing passive

- sampling with bioassays on the Great Barrier Reef. *Aquat. Toxicol.* 95, 108-116. doi:10.1016/j.aquatox.2009.08.007
- Sherr, E.B., Sherr, B.F., 1988. Role of Microbes in Pelagic Food Webs: A Revised Concept. *Limnol. Oceanogr.* 33, 1225-1227.
- Simpson, S.L., Roland, M.G.E., Stauber, J.L., Batley, G.E., 2003. Effect of declining toxicant concentrations on algal bioassay endpoints. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 2073-9. doi:10.1897/02-418
- Sjollema, S.B., MartínezGarcía, G., van der Geest, H.G., Kraak, M.H.S., Booij, P., et al., 2014. Hazard and risk of herbicides for marine microalgae. *Environ. Pollut.* 187, 106-111. doi:10.1016/j.envpol.2013.12.019
- Smedbol, É., Gomes, M.P., Paquet, S., Labrecque, M., Lepage, L., et al., 2018. Effects of low concentrations of glyphosate-based herbicide factor 540® on an agricultural stream freshwater phytoplankton community. *Chemosphere* 192, 133-141. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.10.128
- Smith, A.E., Secoy, D.M., 1976. A Compendium of Inorganic Substances used in European Pest Control before 1850. *J. Agric. Food Chem.* 24, 1180-1186. doi:10.1021/jf60208a048
- Smith, K.E.C., Dom, N., Blust, R., Mayer, P., 2010. Controlling and maintaining exposure of hydrophobic organic compounds in aquatic toxicity tests by passive dosing. *Aquat. Toxicol.* 98, 15-24. doi:10.1016/j.aquatox.2010.01.007
- Sniegowski, P.D., 2005. Linking mutation to adaptation: overcoming stress at the spa. *New Phytol.* 166, 360-362. doi:10.1111/j.1469-8137.2005.01419.x
- Sniegowski, P.D., Lenski, R.E., 1995. Mutation and Adaptation: The Directed Mutation Controversy in Evolutionary Perspective. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 26, 553-578. doi:10.1146/annurev.es.26.110195.003005
- SOeS, 2017. Les pesticides dans les eaux [WWW Document]. URL <http://www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr/lessentiel/ar/246/0/presence-pesticides-eaux-2014-evolution-depuis-2008.html> (consulté le 5.18.18).
- Soleilhavoup, M., 2016. Enquête - Pratiques phytosanitaires sur les grandes cultures 2014 - Nombre de traitements et indicateurs de fréquence de traitement. *Agriste Les Dossiers* 36, 1-64.
- Sørensen, H., Cedergreen, N., Skovgaard, I.M., Streibig, J.C., 2007. An isobole-based statistical model and test for synergism/antagonism in binary mixture toxicity experiments. *Environ. Ecol. Stat.* 14, 383-397. doi:10.1007/s10651-007-0022-3
- Soroldoni, S., Abreu, F., Castro, Í.B., Duarte, F.A., Pinho, G.L.L., 2017. Are antifouling paint particles a continuous source of toxic chemicals to the marine environment? *J. Hazard. Mater.* 330, 76-82. doi:10.1016/j.jhazmat.2017.02.001

- Soroldoni, S., Castro, Í.B., Abreu, F., Duarte, F.A., Choueri, R.B., et al., 2018. Antifouling paint particles: Sources, occurrence, composition and dynamics. *Water Res.* 137, 47-56. doi:10.1016/j.watres.2018.02.064
- Soudant, P., Le Coz, J.R., Marty, Y., Moal, J., Robert, et al., 1998. Incorporation of microalgae sterols by scallop *Pecten maximus* (L.) larvae. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* 119, 451-7. doi:10.1016/S1095-6433(97)00451-0
- St-Laurent, D., Blaise, C., Macquarrie, P., Scroggins, R., Trottier, B., 1992. Comparative assessment of herbicide phytotoxicity to *Selenastrum capricornutum* using microplate and flask bioassay procedures. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 7, 35-48. doi:10.1002/tox.2530070104
- Stachowski-Haberkorn, S., Jérôme, M., Rouxel, J., Khelifi, C., Rincé, M., et al., 2013. Multigenerational exposure of the microalga *Tetraselmis suecica* to diuron leads to spontaneous long-term strain adaptation. *Aquat. Toxicol.* 140-141, 380-388. doi:10.1016/j.aquatox.2013.06.016
- Stadnicka-Michalak, J., Tanneberger, K., Schirmer, K., Ashauer, R., 2014. Measured and modeled toxicokinetics in cultured fish cells and application to in vitro - In vivo toxicity extrapolation. *PLoS One* 9. doi:10.1371/journal.pone.0092303
- Steele, J.H., 1974. *The Structure of Marine Ecosystems*, Harvard Un. ed. Cambridge.
- Steinmaus, S., Elmore, C.L., Smith, R.J., Donaldson, D., Weber, E.A., et al., 2008. Mulched cover crops as an alternative to conventional weed management systems in vineyards. *Weed Res.* 48, 273-281. doi:10.1111/j.1365-3180.2008.00626.x
- Stenersen, J., 2004. *Chemical pesticides mode of action and toxicology*, New York. CRC Press, Boca Raton, FL, United States. doi:10.1201/9780203646830
- Stibany, F., Ewald, F., Miller, I., Hollert, H., Schäffer, A., 2017a. Improving the reliability of aquatic toxicity testing of hydrophobic chemicals via equilibrium passive dosing – A multiple trophic level case study on bromochlorophene. *Sci. Total Environ.* 584-585, 96-104. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.01.082
- Stibany, F., Schmidt, S.N., Schäffer, A., Mayer, P., 2017b. Aquatic toxicity testing of liquid hydrophobic chemicals – Passive dosing exactly at the saturation limit. *Chemosphere* 167, 551-558. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.10.014
- Stoiber, T.L., Shafer, M.M., Armstrong, D.E., 2013. Induction of reactive oxygen species in *Chlamydomonas reinhardtii* in response to contrasting trace metal exposures. *Environ. Toxicol.* 28, 516-523. doi:10.1002/tox.20743
- Støttrup, J.G., 2003. Production and Nutritional Value of Copepods, in: Støttrup, J.G., McEvoy, L.A. (Éd.), *Live Feeds in Marine Aquaculture*. Blackwell Science Ltd, p. 145-205.

doi:10.1002/9780470995143.ch5

- Stummer, B.E., Francis, I.L., Zanker, T., Lattey, K.A., Scott, E.S., 2005. Effects of powdery mildew on the sensory properties and composition of Chardonnay juice and wine when grape sugar ripeness is standardised. *Aust. J. Grape Wine Res.* 11, 66-76. doi:10.1111/j.1755-0238.2005.tb00280.x
- Sussarellu, R., Lebreton, M., Rouxel, J., Akcha, F., Rivière, G., 2018. Copper induces expression and methylation changes of early development genes in *Crassostrea gigas* embryos. *Aquat. Toxicol.* 196, 70-78. doi:10.1016/j.aquatox.2018.01.001
- Takahashi, K., 2009. Chapter 1: Release Rate of Biocides from Antifouling Paints, in: Arai, T., Harino, H., Ohji, M., Langston, W.J. (Éd.), *Ecotoxicology of Antifouling Biocides*. Springer Tokyo Berlin Heidelberg New York, p. 22. doi:10.1007/978-4-431-85709-9
- Tanneberger, K., Knöbel, M., Busser, F.J.M., Sinnige, T.L., Hermens, J.L.M., et al., 2013. Predicting fish acute toxicity using a fish gill cell line-based toxicity assay. *Environ. Sci. Technol.* 47, 1110-1119. doi:10.1021/es303505z
- Tapie, N., Menach, K. Le, Pasquaud, S., Elie, P., Devier, M.H., et al., 2011. PBDE and PCB contamination of eels from the Gironde estuary: From glass eels to silver eels. *Chemosphere* 83, 175-185. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.12.044
- Tato, T., Salgueiro-González, N., León, V.M., González, S., Beiras, R., 2018. Ecotoxicological evaluation of the risk posed by bisphenol A, triclosan, and 4-nonylphenol in coastal waters using early life stages of marine organisms (*Isochrysis galbana*, *Mytilus galloprovincialis*, *Paracentrotus lividus*, and *Acartia clausi*). *Environ. Pollut.* 232, 173-182. doi:10.1016/j.envpol.2017.09.031
- Tezdogan, T., Demirel, Y.K., 2013. An overview of marine corrosion protection with regards to cathodic protection and coatings. *RINA, R. Inst. Nav. Archit. - Int. Conf. Mar. Coatings* 65.
- Thakkar, M., Randhawa, V., Wei, L., 2013. Comparative responses of two species of marine phytoplankton to metolachlor exposure. *Aquat. Toxicol.* 126, 198-206. doi:10.1016/j.aquatox.2012.10.002
- Thellen, C., Blaise, C., Roy, Y., Hickey, C., 1989. Round Robin testing with the *Selenastrum capricornutum* microplate toxicity assay. *Hydrobiologia* 188-189, 259-268. doi:10.1007/BF00027791
- Thies, F., Backhaus, T., Bossmann, B., Grimme, L.H., 1996. Xenobiotic biotransformation in unicellular green algae (involvement of cytochrome P450 in the activation and selectivity of the pyridazinone pro-herbicide metflurazon). *Plant Physiol.* 112, 361-370. doi:10.1104/pp.112.1.361
- Thomas, K. V., 1999. Determination of the antifouling agent zinc pyrithione in water samples by copper chelate formation and high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 833, 105-109. doi:10.1016/S0021-

9673(98)01009-7

- Thomatou, A.A., Antonopoulou, M., Michail, F., Konstantinou, I., 2015. Laboratory calibration of twelve pesticides using polar organic chemical integrative samplers. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 95, 1230-1241. doi:10.1080/03067319.2015.1070405
- Thouvenin, M., Peron, J.J., Charreteur, C., Guerin, P., Langlois, J.Y., et al., 2002. A study of the biocide release from antifouling paints. *Prog. Org. Coatings* 44, 75-83. doi:10.1016/S0300-9440(01)00246-6
- Thuillier-Bruston, F., Calvayrac, R., Duval, E., 1996. Partial molecular analysis of the psbA gene in *Euglena gracilis* mutants exhibiting resistance to DCMU and atrazine. *Zeitschrift für Naturforsch. Sect. C - J. Biosci.* 51, 711-720.
- Togola, A., Budzinski, H., 2007. Development of polar organic integrative samplers for analysis of pharmaceuticals in aquatic systems. *Anal. Chem.* 79, 6734-6741. doi:10.1021/ac070559i
- Tolhurst, L.E., Barry, J., Dyer, R.A., Thomas, K. V., 2007. The effect of resuspending sediment contaminated with antifouling paint particles containing Irgarol 1051 on the marine macrophyte *Ulva intestinalis*. *Chemosphere* 68, 1519-1524. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.03.005
- Topaz, T., Egozi, R., Eshel, G., Chefetz, B., 2018. Pesticide load dynamics during stormwater flow events in Mediterranean coastal streams: Alexander stream case study. *Sci. Total Environ.* 625, 168-177. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.12.213
- Turley, P.A., Fenn, R.J., Ritter, J.C., 2000. Pyrithiones as antifoulants: Environmental chemistry and preliminary risk assessment. *Biofouling* 15, 175-182. doi:10.1080/08927010009386308
- Turner, A., 2010. Marine pollution from antifouling paint particles. *Mar. Pollut. Bull.* 60, 159-171. doi:10.1016/j.marpolbul.2009.12.004
- Turner, A., Singh, N., Millard, L., 2008. Bioaccessibility and bioavailability of Cu and Zn in sediment contaminated by antifouling paint residues. *Environ. Sci. Technol.* 42, 8740-8746. doi:10.1021/es801923e
- U.S. EPA, 1993. Phase III, Toxicity identification procedures for samples exhibiting acute and chronic toxicity - EPA/600/3-88/036, Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations.
- U.S. EPA, 2018. Pesticide Ecotoxicity Database [WWW Document]. URL <http://www.ipmcenters.org/ECotox/index.cfm> (consulté le 6.27.18).
- Vallotton, N., Moser, D., Eggen, R.I.L., Junghans, M., Chèvre, N., 2008. S-metolachlor pulse exposure on the alga *Scenedesmus vacuolatus*: Effects during exposure and the subsequent recovery. *Chemosphere* 73, 395-400. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.05.039
- van den Hoek, C., Mann, D.G., Jahns, H.M., 1995. *Algae: An Introduction to Phycology*. Cambridge

- Univ. Press.
- Vandegheuchte, M.B., Janssen, C.R., 2011. Epigenetics and its implications for ecotoxicology. *Ecotoxicology* 20, 607-624. doi:10.1007/s10646-011-0634-0
- Vandegheuchte, M.B., Janssen, C.R., 2014. Epigenetics in an ecotoxicological context. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 764-765, 36-45. doi:10.1016/j.mrgentox.2013.08.008
- Vanhaecke, P., Persoone, G., 1984. The ARC-test: A standardized short-term routine toxicity test with *Artemia nauplii*. Methodology and evaluation, in: Persoone, G., Jaspers, E., Claus, C. (Éd.), *Ecotoxicological Testing for the Marine Environment*. State University of Ghent and Institute for Marine Scientific Research, Ghent, p. 143.
- Vassiliou, V.A., 2009. Control of *Lobesia botrana* (Lepidoptera: *Tortricidae*) in vineyards in Cyprus using the Mating Disruption Technique. *Crop Prot.* 28, 145-150. doi:10.1016/j.cropro.2008.09.013
- Vaulot, D., Birrien, J.-L., Marie, D., Casotti, R., Veldhuis, M.J.W., et al., 1994. Morphology, ploidy, pigment composition, and genome size of cultured strains of *Phaeocystis* (Prymnesiophyceae). *J. Phycol.* 30, 1022-1035. doi:10.1111/j.0022-3646.1994.01022.x
- Veluchamy, A., Lin, X., Maumus, F., Rivarola, M., Bhavsar, J., et al., 2013. Insights into the role of DNA methylation in diatoms by genome-wide profiling in *Phaeodactylum tricornutum*. *Nat. Commun.* 4. doi:10.1038/ncomms3091
- Vendrell, E., Ferraz, D.G. de B., Sabater, C., Carrasco, J.M., 2009. Effect of glyphosate on growth of four freshwater species of phytoplankton: a microplate bioassay. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 82, 538-42. doi:10.1007/s00128-009-9674-z
- Venkatesan, J., Manivasagan, P., Kim, S.-K., 2015. Marine Microalgae Biotechnology, in: Kim, S.-K. (Éd.), *Handbook of Marine Microalgae*. Elsevier, p. 1-9. doi:10.1016/B978-0-12-800776-1.00001-7
- Vermeire, T., Rikken, M., Attias, L., Boccardi, P., Boeije, G., et al., 2005. European union system for the evaluation of substances: the second version. *Chemosphere* 59, 473-485. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.01.062
- Vermeirssen, E.L.M., Bramaz, N., Hollender, J., Singer, H., Escher, B.I., 2009. Passive sampling combined with ecotoxicological and chemical analysis of pharmaceuticals and biocides - evaluation of three Chemcatcher<sup>TM</sup> configurations. *Water Res.* 43, 903-914. doi:10.1016/j.watres.2008.11.026
- Vermeirssen, E.L.M., Dietschweiler, C., Escher, B.I., Van Der Voet, J., Hollender, J., 2012. Transfer kinetics of polar organic compounds over polyethersulfone membranes in the passive samplers pocis and chemcatcher. *Environ. Sci. Technol.* 46, 6759-6766. doi:10.1021/es3007854

- Vermeirssen, E.L.M., Hollender, J., Bramaz, N., Van Der Voet, J., Escher, B.I., 2010. Linking toxicity in algal and bacterial assays with chemical analysis in passive samplers deployed in 21 treated sewage effluents. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 2575-2582. doi:10.1002/etc.311
- Vermeirssen, E.L.M., Körner, O., Schönenberger, R., Suter, M.J.F., Burkhardt-Holm, P., 2005. Characterization of environmental estrogens in river water using a three pronged approach: Active and passive water sampling and the analysis of accumulated estrogens in the bile of caged fish. *Environ. Sci. Technol.* 39, 8191-8198. doi:10.1021/es050818q
- Vicquelin, L., Leray-Forget, J., Peluhet, L., LeMenach, K., Deflandre, B., et al., 2011. A new spiked sediment assay using embryos of the Japanese medaka specifically designed for a reliable toxicity assessment of hydrophobic chemicals. *Aquat. Toxicol.* 105, 235-245. doi:10.1016/j.aquatox.2011.06.011
- Voutchkova, A., Kostal, J., Anastas, P., 2012. Property-Based Approaches to Design Rules for Reduced Toxicity. *Handb. Green Chem.* 9, 349-374. doi:10.1002/9783527628698.hgc107
- Vrana, B., Allan, I.J., Greenwood, R., Mills, G.A., Dominiak, E., et al., 2005. Passive sampling techniques for monitoring pollutants in water. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 24, 845-868. doi:10.1016/j.trac.2005.06.006
- Walles, B., Mann, R., Ysebaert, T., Troost, K., Herman, P.M.J., et al., 2015. Demography of the ecosystem engineer *Crassostrea gigas*, related to vertical reef accretion and reef persistence. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 154, 224-233. doi:10.1016/j.ecss.2015.01.006
- Warne, M.S.J., Hawker, D.W., 1995. The number of components in a mixture determines whether synergistic and antagonistic or additive toxicity predominate: The funnel hypothesis. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* doi:10.1006/eesa.1995.1039
- Watts, D.W., Novak, J.M., Johnson, M.H., Stone, K.C., 2000. Storm flow export of metolachlor from a coastal plain watershed. *J. Environ. Sci. Heal. - Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes* 35, 175-186. doi:10.1080/03601230009373262
- Wauchope, R.D., Ahuja, L.R., Arnold, J.G., Bingner, R., Lowrance, R., et al., 2003. Software for pest-management science: Computer models and databases from the United States Department of Agriculture - Agricultural Research Service. *Pest Manag. Sci.* 59, 691-698. doi:10.1002/ps.682
- Wessel, N., Rousseau, S., Caisey, X., Quiniou, F., Akcha, F., 2007. Investigating the relationship between embryotoxic and genotoxic effects of benzo[a]pyrene, 17 $\alpha$ -ethinylestradiol and endosulfan on *Crassostrea gigas* embryos. *Aquat. Toxicol.* 85, 133-142. doi:10.1016/j.aquatox.2007.08.007
- White, D.B., Faessel, H.M., Slocum, H.K., Khinkis, L., Greco, W.R., 2004. Nonlinear response surface and mixture experiment methodologies applied to the study of synergism. *Biometrical J.*

- 46, 56-71. doi:10.1002/bimj.200210002
- Wickham, H., 2009. *Ggplot2 : elegant graphics for data analysis*. Springer.
- Wightwick, A., Walters, R., Allinson, G., Reichman, S., Menzies, N., 2010. Environmental Risks of Fungicides Used in Horticultural Production Systems. *Fungicides* 273-304. doi:10.5772/555
- Williams, R.T., 1959. *Detoxification Mechanisms: The Metabolism and Detoxification of Drugs, Toxic Substances and Other Organic Compounds*. Chapman and Hall.
- Wisler, G.C., Norris, R.F., 2005. Interactions between weeds and cultivated plants as related to management of plant pathogens. *Weed Sci.* 53, 914-917. doi:10.1614/WS-04-051R.1
- Xia, S., Wang, K., Wan, L., Li, A., Hu, Q., et al., 2013. Production, characterization, and antioxidant activity of fucoxanthin from the marine diatom *Odontella aurita*. *Mar. Drugs* 11, 2667-81. doi:10.3390/md11072667
- Xiong, J.Q., Kurade, M.B., Jeon, B.H., 2018. Can Microalgae Remove Pharmaceutical Contaminants from Water? *Trends Biotechnol.* 36, 30-44. doi:10.1016/j.tibtech.2017.09.003
- Yamada, H., 2007. Behaviour, occurrence, and aquatic toxicity of new antifouling biocides and preliminary assessment of risk to aquatic ecosystems. *Bull. Fish. Res. agenceie*.
- Zalizniak, L., Nugegoda, D., 2006. Effect of sublethal concentrations of chlorpyrifos on three successive generations of *Daphnia carinata*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64, 207-214. doi:10.1016/j.ecoenv.2005.03.015
- Zhang, H., Davison, W., 1995. Performance Characteristics of Diffusion Gradients in Thin Films for the in Situ Measurement of Trace Metals in Aqueous Solution. *Anal. Chem.* 67, 3391-3400. doi:10.1021/ac00115a005
- Zhou, X., Okamura, H., Nagata, S., 2006. Remarkable Synergistic Effects in Antifouling Chemicals against *Vibrio fischeri* in a Bioluminescent Assay 52, 243-251.
- Zhu, L.D., Li, Z.H., Hiltunen, E., 2016. Strategies for Lipid Production Improvement in Microalgae as a Biodiesel Feedstock. *Biomed Res. Int.* 2016, 7-9. doi:10.1155/2016/8792548
- Zonta, R., Collavini, F., Zaggia, L., Zuliani, A., 2005. The effect of floods on the transport of suspended sediments and contaminants: A case study from the estuary of the Dese River (Venice Lagoon, Italy). *Environ. Int.* 31, 948-958. doi:10.1016/j.envint.2005.05.005

# Annexe

Composition des milieux de culture f/2 et f/2-Si (Guillard et Ryther, 1962 ; Guillard, 1975).



## f/2 Medium

(Guillard and Ryther 1962, Guillard 1975)

This is a common and widely used general enriched seawater medium designed for growing coastal marine algae, especially diatoms. The concentration of the original formulation, termed "f Medium" (Guillard and Ryther 1962), has been reduced by half.

To prepare, begin with 950 mL of filtered natural seawater and add the following components. The trace element and vitamin solutions are provided below. Bring the final volume to 1 liter with filtered natural seawater. If the alga to be grown does not require silica, then it is recommended that the silica be omitted because it enhances precipitation. Autoclave.

Component	Stock Solution	Quantity	Molar Concentration in Final Medium
NaNO <sub>3</sub>	75 g/L dH <sub>2</sub> O	1 mL	8.82 x 10 <sup>-4</sup> M
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	5 g/L dH <sub>2</sub> O	1 mL	3.62 x 10 <sup>-5</sup> M
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> 9H <sub>2</sub> O	30 g/L dH <sub>2</sub> O	1 mL	1.06 x 10 <sup>-4</sup> M
trace metal solution	(see recipe below)	1 mL	---
vitamin solution	(see recipe below)	0.5 mL	---

## f/2 Trace Metal Solution

To prepare, begin with 950 mL of dH<sub>2</sub>O, add the components and bring final volume to 1 liter with dH<sub>2</sub>O. Autoclave. Note that the original medium (Guillard and Ryther 1962) used ferric sequestrene; we have substituted Na<sub>2</sub>EDTA · 2H<sub>2</sub>O and FeCl<sub>3</sub> · 6 H<sub>2</sub>O.



Component	Primary Stock Solution	Quantity	Molar Concentration in Final Medium
FeCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	---	3.15 g	1.17 x 10 <sup>-5</sup> M
Na <sub>2</sub> EDTA 2H <sub>2</sub> O	---	4.36 g	1.17 x 10 <sup>-5</sup> M
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	9.8 g/L dH <sub>2</sub> O	1 mL	3.93 x 10 <sup>-8</sup> M
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	6.3 g/L dH <sub>2</sub> O	1 mL	2.60 x 10 <sup>-8</sup> M
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	22.0 g/L dH <sub>2</sub> O	1 mL	7.65 x 10 <sup>-8</sup> M
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	10.0 g/L dH <sub>2</sub> O	1 mL	4.20 x 10 <sup>-8</sup> M
MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	180.0 g/L dH <sub>2</sub> O	1 mL	9.10 x 10 <sup>-7</sup> M

### f/2 Vitamin Solution

First, prepare primary stock solutions. To prepare final vitamin solution, begin with 950 mL of dH<sub>2</sub>O, dissolve the thiamine, add the amounts of the primary stocks as indicated in the quantity column below, and bring final volume to 1 liter with dH<sub>2</sub>O. At the NCMA we autoclave to sterilize. Store in refrigerator or freezer.

Component	Primary Stock Solution	Quantity	Molar Concentration in Final Medium
thiamine HCl (vit. B <sub>1</sub> )	---	200 mg	2.96 x 10 <sup>-7</sup> M
biotin (vit. H)	0.1 g/L dH <sub>2</sub> O	10 mL	2.05 x 10 <sup>-9</sup> M
cyanocobalamin (vit. B <sub>12</sub> )	1.0 g/L dH <sub>2</sub> O	1 mL	3.69 x 10 <sup>-10</sup> M





**Titre :** Étude de la toxicité de pesticides seuls et en mélanges sur des microalgues marines et la larve d'huître creuse : approche combinant des tests miniaturisés en laboratoire avec l'utilisation d'extraits d'échantillonneurs passifs de type POCIS

**Mots-clés :** microalgues ; pesticides ; toxicité ; mélanges ; bioessais ; échantillonneurs passifs de type POCIS

**Résumé :** La viticulture génère un potentiel risque de toxicité pour les écosystèmes aquatiques. Dans ce contexte, cette thèse visait à : i) effectuer le screening de toxicité de pesticides choisis sur des microalgues marines et la larve d'huître creuse ; ii) évaluer la toxicité de mélanges binaires de pesticides sur des microalgues marines via des approches de modélisation ; iii) comparer la toxicité de mélanges complexes issus de l'environnement d'étude par l'utilisation d'extraits d'échantillonneurs passifs de type POCIS. Des POCIS ont été déployés mensuellement, d'une part pour évaluer la contamination chimique du bassin versant de Marcillac (Gironde, France), d'autre part afin de les extraire pour en étudier le potentiel toxique. Les extraits constituaient un mélange complexe représentatif de la contamination chimique pour la station/période suivie. Un test de toxicité en microplaques a été optimisé pour permettre de répondre aux différents objectifs identifiés.

Deux fongicides et un insecticide ont induit une très forte toxicité pour les larves d'huître. Deux herbicides et un fongicide ont induit une toxicité importante pour les microalgues testées. Des interactions additives, antagonistes et synergiques ont pu être mises en évidence. Les effets de ces mélanges sur la physiologie des microalgues étudiées ont également été évalués. Les extraits de POCIS ont induit une toxicité significative et variable en fonction des stations et périodes suivies. Les résultats obtenus au cours de cette thèse contribuent à améliorer nos connaissances sur les potentiels effets toxiques associés au transfert des pesticides issus de la viticulture vers les milieux aquatiques.

**Title:** Toxicity of pesticides, singly and in mixtures, towards marine microalgae and oyster larvae: approach combining laboratory micro-bioassays with the use of POCIS passive sampler extracts

**Keywords:** microalgae; pesticides; toxicity; mixtures; bioassays; POCIS passive samplers

**Abstract:** Viticulture is responsible for a potential toxicity risk towards aquatic ecosystems. In this context, this thesis aimed to: i) perform a toxicity screening of chosen pesticides towards marine microalgae and oyster larvae; ii) evaluate the toxicity of pesticides binary mixtures on marine microalgae using modelling approaches; iii) compare the toxicity of complex mixtures from the study site using POCIS passive sampler extracts. POCIS were deployed monthly, firstly to evaluate the chemical contamination of the watershed of Marcillac (Gironde, France), secondly in order to study the toxic potential of the extracts. The extracts constituted in a complex mixture representative of the chemical contamination for the followed station/period. A toxicity test using microplates was optimized to meet the identified objectives.

Two fungicides and one insecticide induced a very strong toxicity for oyster larvae. Two herbicides and one fungicide induced a significant toxicity for the tested microalgae. Additive, antagonistic and synergistic interactions were highlighted. Effects of these mixtures on the physiology of the studied microalgae were also evaluated. POCIS extracts induced a significant toxicity that varied depending on the stations and periods considered. Results obtained during this thesis contributed to improve our knowledge towards the potential toxic effects associated with the transfer of pesticides used in viticulture towards aquatic environments.