

DIPLOME D'ETUDES APPROFONDIES EN TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT
UNIVERSITES DE METZ - ROUEN - STRASBOURG



**ELEMENTS DE CARACTERISATION BIOLOGIQUE D'UN
ENSEMBLE DE MESOCOSMES AQUATIQUES ET DE
L'EFFET D'UN INSECTICIDE CARBAMATE, LE
CARBOFURAN, SUR LES PERFORMANCES DE JEUNES
BROCHETS (*Esox lucius*)**

GERALDINE AMBLARD

sous la direction de Mr. C. BR Y

Stage de D.E.A. effectué à
l'Unité d'Ecotoxicologie Aquatique
de l'I.N.R.A. de Rennes
IFR Biologie et Ecologie du Poisson

Année académique 1995-1496

Résumé

Cette étude aborde l'utilisation de deux approches expérimentales complémentaires dans l'étude des polluants dans les écosystèmes aquatiques : le test des effets d'un polluant sur un organisme en laboratoire et le suivi d'installations expérimentales en mésocosmes en conditions semi-naturelles.

L'étude en laboratoire traite des effets de concentrations sublétales d'un insecticide carbamate, le carbofuran, sur les performances de jeunes stades de brochet (*Esox lucius* L.). Cette expérimentation permet de préciser les effets de ce pesticide pour différents niveaux d'étude (comportemental et biochimique). Ce produit phytosanitaire est homologué en agriculture et sa période d'utilisation recouvre celle de la fiai des brochets.

Tout d'abord, l'étude comportementale permet d'établir que le carbofuran diminue la Hauteur Moyenne de Fixation (HMF) des embryons libres de brochet aux doses 50 et 250 ppb ($\mu\text{g/l}$). Ces concentrations d'effet sont inférieures à la CL50 admise pour les organismes aquatiques ($<1\text{mg/l}$) ainsi qu'à la CL50 de la truite arc-en-ciel (280 ppb). Le test d'efficacité de prédation des larves de brochet révèle que les individus exposés à 250 ppb ne mangent pas. L'étude de leur développement a mis en évidence une taille moyenne des individus plus petite pour les échantillons exposés à 50 et 250 ppb. De plus, les individus exposés à 250 ppb ont une vésicule vitelline très peu résorbée et présentent une courbure de la colonne vertébrale, ce qui démontre une perturbation importante du développement embryonnaire.

L'étude biochimique révèle une inhibition de la cible enzymatique connue du carbofuran, l'acétylcholinestérase. Cet enzyme est inhibé significativement par rapport au témoin pour les doses 10, 50 et 250 ppb. L'effet enzymatique intervient donc avant l'effet comportemental, ce qui confirme le rôle de biomarqueur d'exposition de l'acétylcholinestérase. Les formes moléculaires identifiées sont typiques des poissons à savoir une forme « asymétrique », A_{12} , et deux formes « globulaires », G_4 et G_2 . La forme G_2 n'apparaît que dans les lots à forte exposition soit 50 et 250 ppb (hypothèse d'une néosynthèse remplaçant les enzymes inhibés).

La caractérisation biologique d'un ensemble de mésocosmes aquatiques non traités a fourni des informations concernant la variabilité inter-bassins sur les 6 semaines de mise en eau. La variabilité étudiée sur des paramètres biotiques et abiotiques montre des différences d'évolution. Les paramètres abiotiques ont un coefficient de variabilité inter-mésocosmes plus faible que les paramètres biotiques. La seule exception est la turbidité dont les coefficients de variation assez élevés seraient peut-être dus au protocole plutôt qu'au système lui-même.

Les paramètres biotiques concernant la fratrie de jeunes brochets introduits en mésocosmes juste avant le début de leur alimentation exogène, ont des coefficients de variation peu élevés. Ceci est révélateur d'une certaine uniformité du développement des larves pendant les 3 semaines passées en mésocosmes. De plus, les valeurs de survie sont tout à fait satisfaisantes car très proches de celles obtenues dans des étangs de pré-grossissement. Ces résultats suggèrent que sur la durée de l'étude les larves de brochet ont été exposées à des conditions environnementales satisfaisantes du point de vue trophique.

Les catégories d'organismes zooplanctoniques examinées pour la dernière date de mesure de la variabilité (V_2) ont des coefficients de variation très hétérogènes. Certaines catégories, en raison d'un faible coefficient et d'une densité suffisante, pourraient être intéressantes à étudier dans le cas de la présence d'un xénobiotique. Ces catégories, que sont les copépodes cyclopoïdes, les chydoridés, les larves nauplii et les daphnies, appartiennent à des niveaux différents du réseau trophique (respectivement prédateurs, détritivores et filtreurs).

Cependant, il faut rester prudent quant à l'interprétation des données concernant la variabilité inter-mésocosmes. car ces systèmes sont complexes du point de vue structure et fonction. Ce genre d'étude préliminaire du système et de sa variation dans le temps sont autant d'acquis qui font partie de la connaissance de base de cet outil de travail. Cette connaissance de l'outil est un critère indéniable pour l'estimation et la quantification des effets d'un xénobiotique en mésocosmes.

Sommaire

1. INTRODUCTION.....	1
2. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE	3
2.1 INTRODUCTION	3
2.2 METHODOLOGIES EN ECOTOXICOLOGIE	3
2.3 PRESENTATION DU SUJET DE STAGE	5
2.3.1 Etude en laboratoire	5
2.3.2 Etude en mésocosmes.....	8
3. MATERIEL ET METEODES	14
3.1 ETUDE EN LABORATOIRE : EFFETS DE CONCENTRATIONS SUBLETALES DE CARBOFURAN (INSECTICIDE, CARBAMATE) SUR L'EMBRYON ET LA LARVE DE BROCHET (ESOX LUCIUS L.)	14
3.1.1 Matériel animal	14
3.1.2 Carbofuran (Insecticide, Carbamate).....	14
3.1.3 Etude comportementale.....	15
3.1.4 Etude biochimique : Effets de concentrations sublétales de Carbofuran sur l'activité acétylcholinestérase de jeunes stades de brochet	16
3.1.5 Traitement des données.....	19
3.2 ETUDE EN CONDITIONS SEMI-NATURELLES : EVALUATION DE LA VARIABILITE INTER-MESOCOSMES DE PARAMETRES BIOTIQUES ET ABIOTIQUES	21
3.2.1 Constitution des mésocosmes	21
3.2.2 Etude de la variabilité inter-mésocosmes	22
3.2.3 Traitement des données.....	24
4. RESULTATS	25
4.1 ETUDE EN LABORATOIRE : EFFETS DE CONCENTRATIONS SUBLETALES DE CARBOFURAN (INSECTICIDE, CARBAMATE) SUR L'EMBRYON ET LA LARVE DE BROCHET (ESOX LUCIUS L.)	25
4.1.1 Etude comportementale.....	25
4.1.2 Effet du carbofuran sur la taille finale des embryons libres.....	27
4.1.3 Etude biochimique	28
4.2 ETUDE EN CONDITIONS SEMI-NATURELLES : EVALUATION DE LA VARIABILITE INTER-MESOCOSMES DE PARAMETRES BIOTIQUES ET ABIOTIQUES	31
4.2.1 Variabilité des paramètres abiotiques	31
4.2.2 Variabilité de paramètres biotiques.....	31
5. DISCUSSION	34
5.1 ETUDE EN LABORATOIRE : EFFETS DE CONCENTRATIONS SUBLETALES DE CARBOFURAN (INSECTICIDE, CARBAMATE) SUR L'EMBRYON ET LA LARVE DE BROCHET (ESOX LUCIUS L.)	34
5.2 ETUDE EN CONDITIONS SEMI-NATURELLES : EVALUATION DE LA VARIABILITE INTER-MESOCOSMES DE PARAMETRES BIOTIQUES ET ABIOTIQUES	37
6. CONCLUSION	40
7. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	41
8. ANNEXES	47
8.1 ANNEXE 1 : BIOLOGIE DU BROCHET, <i>Esox lucius L.</i>	47
8.2 ANNEXE 2 : LE CARBOFURAN	49
8.3 ANNEXE 3 : GENERALITES SUR LES ORGANISMES ZOOPLANCTONIQUES IDENTIFIES DANS LES CONTENUS STOMACaux ET EN MESOCOSMES	50
8.4 ANNEXE 4 : TABLEAUX DE DONNEES DES PARAMETRES ABIOTIQUES ET BIOTIQUES MESURES EN MESOCOSMES AQUATIQUES.....	52

1. Introduction

La connaissance scientifique des modalités de pollution de la biosphère, celle de ses effets sur les individus et sur les écosystèmes, a beaucoup progressé depuis le milieu des années soixante-dix. C'est en partie grâce à la science de l'Ecotoxicologie qui, d'une part, s'occupe des effets toxiques des agents chimiques ou physiques sur les organismes vivants et sur les communautés qui peuplent des écosystèmes définis et, d'autre part, étudie les voies de transfert de ces agents et leurs interactions avec l'environnement. Les conséquences d'exposition à un xénobiotique peuvent être évaluées à différents niveaux (individus, communautés, écosystèmes) par diverses approches expérimentales. Le stade le plus élémentaire de ces approches est le test de toxicité monospécifique, qui s'effectue à l'échelle du laboratoire, de même que les niveaux plus complexes comme les chaînes trophiques expérimentales et les microcosmes. Les approches expérimentales en milieu naturel ou semi-naturel, dont le degré de complexité écologique est plus élevé, utilisent des systèmes expérimentaux comme les mésocosmes, les enclos et les fractions d'écosystèmes isolés (RAMADE, 1992). Grâce à ces outils, les écotoxicologues peuvent estimer les effets et le devenir des substances toxiques dans les écosystèmes, et notamment dans les écosystèmes aquatiques (CAIRNS, 1994 ; ODUM, 1984).

L'étude, menée à l'Unité d'Ecotoxicologie Aquatique de l'INRA de Rennes, a pour finalité d'estimer, dans un premier temps et dans des conditions de laboratoire, les effets de doses sublétales d'un insecticide carbamate, le carbofuran, sur de jeunes stades de brochet aux niveaux comportemental et biochimique. Dans un second temps et dans des conditions semi-naturelles, l'étude menée dans des mésocosmes aquatiques non traités tente d'évaluer la variation inter-mésocosmes de paramètres biotiques et abiotiques, et d'établir l'adéquation de ces systèmes avec le développement de jeunes stades de brochet.

Ces deux approches sont complémentaires du point de vue méthodologique et de l'estimation des effets d'un xénobiotique. En effet, dans l'évaluation des risques écotoxicologiques d'un xénobiotique, il est recommandé d'effectuer des tests de toxicité monospécifique complétés par des données de terrain (TOUART, 1994).

Hormis les grands accidents de l'environnement (marées noires, déversements accidentels de produits chimiques dans les cours d'eau, etc.), les xénobiotiques sont le plus souvent présents dans les écosystèmes à de faibles concentrations, exposant ainsi la majorité des organismes vivants à des doses dites sublétales. Ces doses sublétales de polluants ont des répercussions importantes sur les populations à long terme (effets sur la croissance, la reproduction, etc.) (RAMADE, 1992).

Les poissons présentent un intérêt certain par leur aspect « révélateur » de modifications du milieu aquatique, et les jeunes stades, qui sont des stades clé du cycle vital, sont souvent sensibles aux xénobiotiques (HALL *et al.*, 1984 ; LENWOOD *et al.*, 1993 ; WEIS & WEIS, 1995). Les changements de comportement et/ou de physiologie ont été utilisés avec succès chez le poisson comme des indicateurs sensibles et rapides d'un stress dans des tests de laboratoire (HE *et al.*, 1994 ; LITTLE & FINGER, 1990).

Parmi les nombreux pesticides employés en agriculture, le carbofuran est un insecticide carbamate homologué en Bretagne sur maïs et cultures légumières (DABENE & MARIE, 1993) et qui est retrouvé dans les cours d'eau et les eaux de ruissellement (P.R.B., 1991 ; TROTTER *et al.*, 1991).

Aussi, l'expérimentation en laboratoire, menée en première partie de cette étude, s'intègre dans le cadre de la surveillance biologique des eaux de surface dans la perspective d'y déceler des pollutions chroniques sublétales.

En effet, le carbofuran est un neurotoxique relativement soluble dans l'eau (DABENE & MARIE, 1993), inhibant l'activité de l'acétylcholinestérase (TOUTANT & MASSOULIE, 1987). Son action se situe dans les régions du cerveau impliquées dans la régulation de l'activité motrice et du comportement du poisson (*Channa punctatus*) (GOPAL & RAM, 1995). Parmi les poissons d'eaux douces, le brochet, *Esox lucius*, présente un aspect « intégrateur » des conditions de milieu par sa haute position trophique (CRAIG, 1996). Il constitue une espèce représentative des populations piscicoles et sa période de frai, qui s'étend sur les mois d'avril-juin, coïncide avec la période d'utilisation du carbofuran. Il est donc probable que les concentrations environnementales de cet insecticide (0,25 ppb à 158,5 ppb, selon les cas) aient des effets sur les jeunes stades de brochet puisque des études ont évalué la concentration de sécurité pour les poissons entre 15 et 23 ppb (EISLER, 1985).

Cette étude se propose donc d'évaluer les modifications comportementales directement visibles chez de jeunes stades de brochet, comme le déplacement embryonnaire (Hauteur Moyenne de Fixation ou HMF) et l'aptitude des larves à la capture de proies vivantes (test de prédation), pour différentes doses de carbofuran (2, 10, 50 et 250 ppb). L'effet du carbofuran sur un aspect du développement embryonnaire, la taille des larves, est évalué juste après le test de prédation. Dans un second temps, l'inhibition de l'activité de l'acétylcholinestérase des embryons de brochet exposés, enzyme particulièrement sensible aux carbamates, est évaluée et les formes moléculaires de cet enzyme sont identifiées.

Cependant, de nos jours, pour qu'une nouvelle substance de type pesticide soit homologuée, de simples tests de laboratoire sont insuffisants et, il faut d'après l'E.P.A. (Environmental Protection Agency) des études d'impact en mésocosmes (TOUART, 1988). Les mésocosmes sont utilisés pour deux caractéristiques principales : ils sont similaires aux écosystèmes naturels de part leur structure et fonction, et ils peuvent être manipulés expérimentalement avec suffisamment de réplicats pour permettre des analyses statistiques (CROSSLAND, 1994 ; TOUART, 1994).

Les mésocosmes doivent être construits, aménagés et utilisés selon un protocole précis, afin de limiter au maximum la variabilité initiale inter-mésocosmes. Il est important que ce protocole soit préétabli en fonction des buts de l'étude (CROSSLAND, 1994 ; TOUART, 1988, 1994 ; FERRINGTON, 1994).

Peu d'études en mésocosmes prévoient une étude préliminaire sur la variabilité naturelle du système expérimental, afin d'en distinguer les changements statistiquement attribuables aux traitements. Ce point est d'autant plus important car le mésocosme est raisonnablement proche d'un écosystème naturel : sa variabilité est souvent plus grande que celle de systèmes de test de laboratoire (BOYLE *et al.*, 1985).

L'expérimentation de terrain, menée en seconde partie de cette étude, s'inscrit dans un programme de mise en place progressive de mésocosmes aquatiques ayant pour finalité l'expérimentation en Ecotoxicologie Aquatique. Dans un premier temps, la mise en place des différents composants (sédiment, eau, organismes) tente de reconstituer, à partir d'éléments importés, des écosystèmes simplifiés de type roselière en eau peu profonde (milieux où séjournent les jeunes stades de poissons d'eau calme).

Dans un second temps, et après constitution des mésocosmes, l'étude de variabilité inter-mésocosmes de paramètres biotiques et abiotiques, et de son évolution dans le temps (6 semaines), tente de préciser la variabilité naturelle de ces systèmes, pour une période d'étude permettant la mise en situation de jeunes brochets. Ceci a pour but le classement des différents paramètres mesurés en fonction de leur variabilité d'un bassin à l'autre et les raisons de cette variabilité plus ou moins grande. Ces éléments de caractérisation biologique participeront, à terme, à distinguer la variabilité naturelle de la variabilité induite par la présence d'un xénobiotique.

6. Conclusion

L'étude en laboratoire a démontré l'effet de concentrations sublétales de carbofuran sur de jeunes stades de brochet aussi bien au niveau comportemental que biochimique.

En ce qui concerne l'étude en conditions semi-naturelles d'évaluation de la variabilité de paramètres biotiques et abiotiques en mésocosmes aquatiques non traités, les catégories de paramètres se comportent différemment les unes des autres. Les conditions environnementales créées par la constitution des mésocosmes semblent satisfaire au bon développement des jeunes stades de brochet.

Il faut cependant bien garder à l'esprit que le but d'une étude en mésocosme est déterminant pour l'élaboration du protocole (taille, nombre de mésocosmes ; fréquence des prélèvements, etc.). De même, la nature du polluant (herbicide, fongicide, insecticide) influence le choix des espèces retenues. C'est pour cela que la précision des objectifs est essentielle avant tout test en mésocosme, et qu'elle passe, entre autre, par la connaissance initiale, et sans perturbation, du milieu. L'étude de l'évaluation des risques écologiques pour les organismes aquatiques doit inclure des tests de toxicité en laboratoire sur une espèce seule et être complétée par des études de terrain (TOUART, 1994).

Aussi, les études menées en laboratoire et en mésocosmes au cours de ce stage s'intègrent dans une démarche expérimentale progressive de l'effet du carbofuran en mésocosmes.

En effet, les résultats de la première étude montrent que des doses sublétales et environnementales de carbofuran affectent la biologie des jeunes stades de brochet. Cette étape pourrait être complétée par une étude similaire avec les différentes catégories zooplanctoniques retenues lors de l'étude en mésocosmes (copépodes cyclopoïdes, chydoridés, daphnies, larves nauplii). Ces tests monospécifiques donneraient une idée du comportement des espèces choisies pour l'étude en mésocosmes face à cet insecticide.

Cependant, il est bien évident que l'effet évalué sur la somme des parties (tests monospécifiques) ne peut être équivalent à l'effet sur le tout (mésocosme). Aussi, afin d'extrapoler les effets du carbofuran et les concentrations adéquates au test en mésocosmes, il serait possible d'effectuer des tests sur une chaîne trophique puis en microcosmes. Les conséquences d'une exposition au carbofuran pourrait être détaillées sur la chaîne trophique des espèces choisies pour le test en mésocosme : phytoplancton. microcrustacé filtreur (daphnie), microcrustacé prédateur (copépodes cyclopoïdes), poisson zooplanctonophage (larves de brochet), détritivores (chydoridés, nauplii). Des facteurs tels que la bioconcentration et la bioaccumulation pourraient être évalués. Les études en microcosmes prendraient en compte d'autres facteurs telle que la biodégradabilité et la biodisponibilité du polluant (adsorption sur les végétaux, dans le sédiment, etc.).

L'ensemble des résultats de ces tests approfondiraient le protocole du test en mésocosmes (choix des concentrations d'application) (STAY & JARVINEN, 1995).

Une fois le test en mésocosmes commencé (milieux contaminés), il serait intéressant d'évaluer les effets de l'exposition d'organismes de références (élevés en laboratoire : daphnies, embryons de brochet) à l'eau polluée des mésocosmes. Les critères comportementaux et biochimiques (HMF, activité de l'AChE) seraient utilisés. L'évaluation de ces effets pourraient être faite régulièrement sur la durée de la mise en eau des mésocosmes.

Il est évident que l'approche faite en laboratoire des effets de polluants sur les organismes est plutôt réductionniste, et que celle effectuée en mésocosmes est au contraire holistique. Habituellement ces méthodes sont utilisées en complémentarité dans l'interprétation des effets du polluant. Cependant, leurs éléments biologiques respectifs ne sont pas mélangés (eau de mésocosmes et organismes de laboratoire). L'utilisation en laboratoire de matériaux obtenus en milieux semi-naturels pourrait affiner l'extrapolation des résultats à l'environnement.