

Ecotoxicité de 13 pesticides sur des décapodes d'eau douce de Martinique



Dr Eric GISMONDI

Prof. Célia JOAQUIM-JUSTO

Laboratoire d'Ecologie Animale et
Ecotoxicologie
(LEAE, Université de Liège, Belgique)

Octobre 2022

Auteurs :

Dr Eric GISMONDI, Assistant de Recherche en écotoxicologie (Laboratoire d'Ecologie Animale et Ecotoxicologie – Université de Liège, Belgique), eric.gismondi@uliege.be

et

Prof. Célia JOAQUIM-JUSTO, Agrégée de faculté (Laboratoire d'Ecologie Animale et Ecotoxicologie – Université de Liège, Belgique), celia.joaquim-justo@uliege.be

Table des matières

INTRODUCTION

1. PESTICIDES ÉTUDIÉS.....	8
A. CHOIX DES PESTICIDES.....	8
B. CHOIX DES CONCENTRATIONS D'EXPOSITION EN LABORATOIRE	9
C. ESPÈCE ÉTUDIÉE	10
2. BIOMARQUEURS	11
A. BIOMARQUEURS D'EXPOSITION.....	11
B. BIOMARQUEURS D'EFFET	11
C. APPROCHE MULTI-BIOMARQUEUR ET INDICE INTEGRATIF	12
3. MÉTHODOLOGIE EXPÉRIMENTALE EN LABORATOIRE	13
A. EXPOSITION SIMPLE OU EN MELANGES	13
B. DISSECTION ET CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS	14
C. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS ET DOSAGES DES BIOMARQUEURS	14

EXPERIMENTATION EN LABORATOIRE - EXPOSITIONS SIMPLES

1. RÉSULTATS LORS EXPOSITION SIMPLE.....	16
A. BIOMARQUEUR DE NEUROTOXICITÉ	16
B. ACTIVITÉS ANTIOXYDANTES ET ANTITOXIQUES	17
C. BIOMARQUEUR DE CYTOTOXICITÉ	20
D. EFFET DE DÉRÉGULATION ENDOCRINIENNE.....	21
E. INTEGRATED BIOMARKER RESPONSES (IBR)	22
2. BILAN DES EXPOSITIONS SIMPLES EN LABORATOIRE	25

EXPERIMENTATION EN LABORATOIRE - EXPOSITIONS DE MELANGE

1. METHODOLOGIE EXPERIMENTALE – EFFETS DE MÉLANGE.....	29
2. RÉSULTATS.....	31
A. BIOMARQUEUR DE NEUROTOXICITE	31
B. ACTIVITES ANTIOXYDANTES ET ANTITOXIQUES	32
C. BIOMARQUEUR DE CYTOTOXICITE	35
D. EFFET DE DEREGULATEUR ENDOCRINIEN	36
E. INTEGRATED BIOMARKER RESPONSES (IBR)	37
3. BILAN DES EXPOSITIONS EN MELANGES.....	38

EXPERIMENTATION IN-SITU – EVALUATION DE LA TOXICITE DE 6 RIVIERES DE MARTINIQUE

1. METHODOLOGIE.....	41
2. RESULTATS.....	41
A. BIOMARQUEUR DE NEUROTOXICITE	41
B. ACTIVITÉS ANTIOXYDANTES ET ANTITOXIQUES	42
C. BIOMARQUEUR DE CYTOTOXICITÉ	45
D. EFFET DE DEREGULATEUR ENDOCRINIEN	46
E. INTEGRATED BIOMARKER RESPONSES (IBR)	47
3. BILAN DES EXPERIMENTATIONS IN-SITU	47

CONCLUSION

Liste des tableaux

Tableau 1 Liste des pesticides retrouvés majoritairement dans les eaux de surface de Martinique.....	9
Tableau 2 Concentrations moyennes annuelles et triennale des 13 pesticides étudiés mesurées, et concentrations définies pour l'étude en laboratoire.....	9
Tableau 3 Concentrations léthales 50% (CL_{50}) de chaque pesticide étudié, déterminées selon des expérimentations en laboratoire sur poisson, cladocères et algues. ND : non déterminé.....	10
Tableau 4 Liste des biomarqueurs et des effets analysés dans ce projet.....	13
Tableau 5 Valeurs IBR calculées selon les réponses des biomarqueurs étudiés.....	23
Tableau 6 Classement des pesticides du moins toxique au plus toxique, après exposition 7 jours (gauche) et 21 jours (droite), sur base des valeurs moyennes IBR, et sans tenir compte des concentrations d'exposition.....	24
Tableau 7 Récapitulatif des réponses de chaque biomarqueur en fonction du pesticide, de sa concentration et du temps d'exposition. Le '+' représente une augmentation significative par rapport au à la condition témoin et le '-' une diminution significative par rapport à la condition témoin.....	26
Tableau 8 Résumé des effets toxiques provoqués par chaque pesticide indépendamment de la concentration et du temps d'exposition.....	27
Tableau 9. Critères de classification des 4 stations du suivi pesticide retenus pour l'étude des effets de mélanges et l'étude in-situ. Un gradient croissant a été établi de la couleur jaune au rouge.....	29
Tableau 10. Concentrations des 13 pesticides étudiés dans 4 stations du suivi pesticide, en 2019 (Rapport ODE, 2019).....	29
Tableau 11. Composition en pesticides des 5 mélanges étudiés.	30
Tableau 12. Résumé des effets toxiques provoqués par chaque mélange indépendamment du temps d'exposition.....	38
Tableau 13. Récapitulatif des réponses de chaque biomarqueur en fonction du mélange et du temps d'exposition. Le '+' représente une augmentation significative par rapport au à la condition témoin et le '-' une diminution significative par rapport à la condition témoin.	38
Tableau 14. Critères utilisés pour le choix des différents sites étudiés	41
Tableau 15. Comparaison des valeurs IBR obtenues en exposition de mélange en laboratoire et in-situ.....	48
Tableau 16. Récapitulatif des effets significatifs mesurés pour chaque biomarqueur en fonction du site d'étudié.	49

Liste des figures

Figure 1 Décapode du genre <i>Neocaridina</i> sp. (photo E. Gismondi).....	11
Figure 2 Enceinte thermostatée comprenant les cristallisoirs de chaque condition expérimentale étudiée.	13
Figure 3 Dissection des tissus nécessaires et analyses des biomarqueurs correspondants..	14
Figure 4 Activité AchE (nmol/min/mL) mesurées chez <i>Neocaridina</i> sp. exposées à 2 concentrations de 13 pesticides durant 7 et 21 jours. L'astérisque représente une différence significative par rapport au témoin. La ligne pointillée représente la valeur moyenne des témoins.	16
Figure 5 Activité catalase (nmol/min/mL) mesurées chez <i>Neocaridina</i> sp. exposées à 2 concentrations de 13 pesticides durant 7 et 21 jours. L'astérisque représente une différence significative par rapport au témoin. La ligne pointillée représente la valeur moyenne des témoins.	17
Figure 6 Activité GPx (nmol/min/mL) mesurées chez <i>Neocaridina</i> sp. exposées à 2 concentrations de 13 pesticides durant 7 et 21 jours. L'astérisque représente une différence significative par rapport au témoin. La ligne pointillée représente la valeur moyenne des témoins.	18
Figure 7 Activité GST (nmol/min/mL) mesurées chez <i>Neocaridina</i> sp. exposées à 2 concentrations de 13 pesticides durant 7 et 21 jours. L'astérisque représente une différence significative par rapport au témoin. La ligne pointillée représente la valeur moyenne des témoins.	19
Figure 8 Activité SOD (nmol/min/mL) mesurées chez <i>Neocaridina</i> sp. exposées à 2 concentrations de 13 pesticides durant 7 et 21 jours. L'astérisque représente une différence significative par rapport au témoin. La ligne pointillée représente la valeur moyenne des témoins.	20
Figure 9 Concentration en MDA (nmol/mL) mesurées chez <i>Neocaridina</i> sp. exposées à 2 concentrations de 13 pesticides durant 7 et 21 jours. L'astérisque représente une différence significative par rapport au témoin. La ligne pointillée représente la valeur moyenne des témoins.	21
Figure 10 Concentration en 20-HE (nmol/mL) mesurées chez <i>Neocaridina</i> sp. exposées à 2 concentrations de 13 pesticides durant 7 et 21 jours. L'astérisque représente une différence significative par rapport au témoin. La ligne pointillée représente la valeur moyenne des témoins.	22
Figure 11 Valeurs moyennes IBR de chaque pesticide après 7 et 21 jours d'exposition, et sans tenir compte de la concentration.	24
Figure 12: Activité AchE (nmol/min/mL) mesurées chez <i>Neocaridina</i> sp. exposées aux 5 mélanges de pesticides durant 7 et 21 jours. Les lettres différentes sur les histogrammes indiquent une différence significative.	31
Figure 13. Activité Cat (nmol/min/mL) mesurées chez <i>Neocaridina</i> sp. exposées aux 5 mélanges de pesticides durant 7 et 21 jours. Les lettres différentes sur les histogrammes indiquent une différence significative.	32
Figure 14. Activité GPx (nmol/min/mL) mesurées chez <i>Neocaridina</i> sp. exposées aux 5 mélanges de pesticides durant 7 et 21 jours. Les lettres différentes sur les histogrammes indiquent une différence significative.	33
Figure 15. Activité GST (nmol/min/mL) mesurées chez <i>Neocaridina</i> sp. exposées aux 5 mélanges de pesticides durant 7 et 21 jours. Les lettres différentes sur les histogrammes indiquent une différence significative.	34

Figure 16. Activité SOD (U/mL) mesurées chez <i>Neocaridina</i> sp. exposées aux 5 mélanges de pesticides durant 7 et 21 jours. Les lettres différentes sur les histogrammes indiquent une différence significative.	35
Figure 17. Concentration en MDA (nmol/mL) mesurées chez <i>Neocaridina</i> sp. exposées aux 5 mélanges de pesticides durant 7 et 21 jours. Les lettres différentes sur les histogrammes indiquent une différence significative.	36
Figure 18. Concentration en 20-HE (pg/mL) mesurées chez <i>Neocaridina</i> sp. exposées aux 5 mélanges de pesticides durant 7 et 21 jours. Les lettres différentes sur les histogrammes indiquent une différence significative.	37
Figure 19. Valeurs IBR de chaque mélange après 7 et 21 jours d'exposition.....	37
Figure 20. Activité AchE (nmol/min/mL) mesurées chez des décapodes Atyidae prélevés dans les 6 sites martiniquais étudiés. Les lettres différentes sur les histogrammes indiquent une différence significative.	42
Figure 21. Activité Cat (nmol/min/mL) mesurées chez des décapodes Atyidae prélevés dans les 6 sites martiniquais étudiés. Les lettres différentes sur les histogrammes indiquent une différence significative.	43
Figure 22. Activité GPx (nmol/min/mL) mesurées chez des décapodes Atyidae prélevés dans les 6 sites martiniquais étudiés. Les lettres différentes sur les histogrammes indiquent une différence significative	43
Figure 23. Activité GST (nmol/min/mL) mesurées chez des décapodes Atyidae prélevés dans les 6 sites martiniquais étudiés. Les lettres différentes sur les histogrammes indiquent une différence significative.	44
Figure 24. Activité SOD (nmol/min/mL) mesurées chez des décapodes Atyidae prélevés dans les 6 sites martiniquais étudiés. Les lettres différentes sur les histogrammes indiquent une différence significative.	45
Figure 25. Concentration en MDA (nmol/mL) mesurées chez des décapodes Atyidae prélevés dans les 6 sites martiniquais étudiés. Les lettres différentes sur les histogrammes indiquent une différence significative.	45
Figure 26. Concentration en 20-HE (pg/mL) mesurées chez des décapodes Atyidae prélevés dans les 6 sites martiniquais étudiés. Les lettres différentes sur les histogrammes indiquent une différence significative.	46
Figure 27. Valeur IBR calculée pour chacun des 6 sites martiniquais étudiés.	47

INTRODUCTION

Le climat tropical de la Martinique est favorable au développement de parasites et d'agents pathogènes néfastes pour l'agriculture, encourageant ainsi les producteurs à utiliser de nombreux pesticides pour y faire face. Ces substances, une fois répandues sur les terres, se retrouvent dans les eaux douces par des processus tel que le lessivage, et sont en contact direct avec la faune aquatique.

Bien qu'il soit clairement établi maintenant que les pesticides peuvent avoir des effets toxiques sur les organismes exposés, très peu d'études se sont focalisées à évaluer leurs impacts dans les rivières martiniquaises.

La pollution par des pesticides est suivie depuis plusieurs années par l'Office de l'Eau de Martinique (Rapport ODE-Martinique, 2019), permettant ainsi de mettre en évidence que plusieurs pesticides, encore autorisés, sont très largement retrouvés dans les rivières martiniquaises, à des concentrations de l'ordre du ng/L au µg/L. Par ailleurs, bien que les concentrations léthales 50% (CL₅₀ – concentration causant la mort de 50% de la population testée) de la plupart de ces composés envers les algues, daphnies et poissons d'eau douce (chaîne trophique) aient été évaluées grâce aux tests écotoxicologiques classiques et normalisés (ISO 8692 :2012 ; ISO 6341 ; ISO 7346-3), ces pesticides peuvent avoir des effets néfastes sur les organismes, à des concentrations bien inférieures à ces CL₅₀ déterminées (i.e. effets subléthaux).

Le but de cette étude est d'évaluer les effets subléthaux des pesticides autorisés, majoritairement retrouvés dans les rivières martiniquaises, chez les crustacés décapodes *Atyidae*, à l'aide d'une approche multi-biomarqueurs. Dans un premier temps, une expérimentation en laboratoire a permis de déterminer les effets subléthaux de chaque pesticide en exposition seule (volet 1). Ensuite, dans une seconde partie (volet 2), les effets observés en laboratoire lors d'exposition en cocktail ont été comparés à ceux mesurés lors de prélèvements *in-situ*.

1. PESTICIDES ETUDIES

a. Choix des pesticides

Les pesticides étudiés ont été sélectionnés selon les données obtenues par l'ODE lors des suivis réalisés entre 2017 et 2019, en se focalisant principalement sur les molécules pesticides toujours autorisées en France et retrouvées dans la majorité des eaux de surface de Martinique.

Les pesticides étudiés sont présentés dans le tableau 1. La molécule de chlordécone a été ajoutée à cette liste car, bien qu'elle soit interdite d'utilisation, sa rémanence dans les écosystèmes n'est plus à démontrer, et ne permet donc pas de la négliger dans l'évaluation des effets toxiques de pesticides. De même, l'AMPA, métabolite du glyphosate, a été ajouté à cette étude car il représente une molécule récurrente dans les cours d'eau.

Tableau 1 Liste des pesticides retrouvés majoritairement dans les eaux de surface de Martinique.

	Pesticides	Rôle
AUTORISES	2,4-D	Herbicide
	Azoxystrobine	Fongicide
	Difénoconazole	Fongicide
	Glyphosate	Herbicide
	AMPA	Herbicide
	Imazalil	Fongicide
	Imidaclopride	Insecticide
	Mésotrione	Herbicide
	Propiconazole	Fongicide
	S-metolachlore	Herbicide
	Thiabendazole	Fongicide
	Triclopyr	Herbicide
INTERDIT	Chlordécone	Insecticide

b. Choix des concentrations d'exposition en laboratoire

Les études écotoxicologiques en laboratoire demandent de définir des concentrations d'expositions permettant d'être le plus réaliste possible par rapport aux concentrations retrouvées dans l'environnement. Pour cela, les rapports ODE de la biosurveillance des pesticides dans 26 rivières martiniquaises des 3 dernières années (2017, 2018, 2019) ont été examinés afin d'en extraire les concentrations moyennes annuelles de chaque pesticide d'intérêt (Tableau 1) et ainsi définir les concentrations étudiées en laboratoire (Tableau 2).

Tableau 2 Concentrations moyennes annuelles et triennale des 13 pesticides étudiés mesurées, et concentrations définies pour l'étude en laboratoire.

	Moyenne (26 sites) ng/L				Concentrations étudiées	
Pesticides	2017	2018	2019	Moyenne triennale (ng/L)	Concentration 1 (ng/L)	Concentration 2 (ng/L)
2,4-D	234.31	52.90	37.14	108.12	10	100
Azoxystrobine	54.34	103.73	55.71	71.26	10	100
Difénoconazole	8.77	42.00	23.75	24.84	5	50
Glyphosate	54.66	37.37	97.69	63.24	10	100
AMPA	100.29	115.25	147.78	121.11	20	200
Imazalil	136.33	212.80	69.09	139.41	20	200
Imidaclopride	9.25	-	20.00	14.63	10	100
Mésotrione	3.01	14.85	25.00	14.29	5	50
Propiconazole	7.34	20.80	40.00	22.71	10	100
S-metolachlore	7.84	5.47	10.00	7.77	2	20
Thiabendazole	137.97	53.15	65.45	85.53	10	100
Triclopyr	7.88	9.30	23.33	13.50	2	20
Chlordécone	807.99	1146.42	840.00	931.47	200	2000

Les concentrations définies pour l'étude en laboratoire ont été choisies afin d'encadrer la concentration moyenne triennale et ainsi représenter une large gamme de concentrations retrouvées dans les rivières martiniquaises. De plus, le choix de 2 concentrations pour chaque pesticide permet d'évaluer et caractériser au mieux la toxicité de ces composés à « faible » et « fortes » concentrations.

Les concentrations définies ont ensuite été comparées aux données écotoxicologiques disponibles dans le Pesticide Properties DataBase (PPDB) de l'Université

de Hertfordshire (Royaume-Uni)¹ afin de s'assurer qu'elles ne dépassaient pas les concentrations léthales 50% (Tableau 3), et donc qu'aucun risque de forte mortalité serait observé lors des expositions en laboratoire.

Tableau 3 Concentrations léthales 50% (CL₅₀) de chaque pesticide étudié, déterminées selon des expérimentations en laboratoire sur poisson, cladocères et algues. ND : non déterminé.

	Pesticides	CL ₅₀ (mg/L)		
		Poisson	Daphnies	Algues
AUTORISES	2,4-D	4	153	25
	Azoxystrobine	0.47	0.28	0.36
	Difénoconazole	1.1	0.77	0.032
	Glyphosate	38	40	19
	AMPA			
	Imazalil	1.48	3.5	0.87
	Imidaclopride	> 83	85	> 10
	Mésotrione	> 120	180	3.5
	Propiconazole	2.6	10.2	0.093
	Thiabendazole	0.56	0.31	ND
	Triclopyr	0.65	1.7	ND
INTERDIT	Chlordécone	0.02	0.03	0.27
	S-metolachlore	1.23	11.2	0.017

Il ressort de cette comparaison que l'ensemble des concentrations choisies pour l'étude en laboratoire était inférieur aux CL₅₀. Par conséquent, aucune mortalité liée à la toxicité du composé ne devrait être observé durant les expositions.

c. Espèce étudiée

Les organismes invertébrés sont des modèles de choix pour les études écotoxicologiques en laboratoire du fait de leur petite taille, leur manipulation aisée et la moindre demande éthique, en comparaison aux organismes vertébrés type poisson. Pour cela, cette étude a été réalisée sur un organisme crustacé arthropode, qui est l'un des embranchements les plus représentés dans les organismes aquatiques.

Les crustacés *Atyidae* sont des décapodes largement observés dans les milieux dulçaquicoles et notamment dans les rivières martiniquaises. Cette famille regroupe un grand nombre de genre, dont *Micratya* qui apparait comme le genre majoritaire en Martinique. Toutefois, il n'a pas été possible de se procurer ces organismes pour l'étude en laboratoire ; c'est pourquoi il a été choisi d'utiliser un autre genre de la famille des *Atyidae*, très proche comme organisme modèle ; il s'agit de *Neocaridina* sp., réparties sur une large zone du globe (de l'Asie à l'Europe continentale).

Neocaridina sp. (Figure 1) présente de nombreux avantages pour les études écotoxicologiques de laboratoire, notamment une tolérance à de grandes variabilités de température (4-28°C) et de pH (6-8). De plus, leur petite taille (~2cm à l'âge adulte) permet de travailler dans un espace restreint et donc de réaliser des expositions en petits aquariums (ou cristallisoirs), sans être une contrainte pour l'analyse de biomarqueurs, qui est généralement peu demandeuse en matière (e.g. 10 à 20 mg de tissu frais).

¹ <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/index.htm>



Figure 1 Décapode du genre *Neocaridina* sp.
(photo E. Gismondi)

2. BIOMARQUEURS

La notion de biomarqueur est apparue dans les années 80 surtout dans le domaine médical, puis s'est peu à peu développée dans les années 90 dans le domaine environnemental. Les biomarqueurs ont pour but de fournir un outil complémentaire, à l'échelle individuelle, aux indices biotiques tels que l'Indice Biologique Global Normalisé (IBGN) ou l'Indice Biologique Diatomées (IBD) utilisés à l'échelle de la population, pour évaluer la qualité des écosystèmes.

Un biomarqueur est un « *changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, physiologique ou comportemental qui révèle une exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant* ». Ce sont donc des variables biologiques permettant à la fois de caractériser l'état physiologique des individus dans un environnement donné et de détecter de façon précoce tout dérèglement pouvant avoir des répercussions à plus long terme sur les organismes et leurs écosystèmes (populations et communautés).

Deux principales catégories de biomarqueurs sont couramment utilisées en écotoxicologie, en fonction de la réponse apportée : les *biomarqueurs d'exposition* et les *biomarqueurs d'effets*.

a. Biomarqueurs d'exposition

Un biomarqueur d'exposition met en évidence l'exposition d'un organisme à au moins une substance polluante, sans pour autant démontrer les effets induits par celle-ci. Cette catégorie de biomarqueurs regroupe de nombreuses molécules dont le rôle majeur est d'assurer la protection des cellules de l'organisme.

Parmi les systèmes de protection, les défenses antioxydantes et antitoxiques font intervenir de nombreuses enzymes de détoxification telles que la **catalase (Cat)**, les **superoxydes dismutases (SOD)**, les **glutathion peroxydases sélénium-dépendante et indépendante (GPx)** ou encore la **glutathion-S-transférase (GST)**. Ces enzymes permettent : la prise en charge des espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites lors d'exposition à des contaminants, et causant des effets délétères au niveau de l'organisme (ex. destruction cellulaire, adduit à l'ADN,...). Elles peuvent également jouer un rôle dans le processus de biotransformation, rendant le contaminant généralement moins toxique, plus hydrosoluble et donc plus facilement éliminable par l'organisme.

b. Biomarqueurs d'effet

Un biomarqueur d'effet met en évidence un ou des effet(s) toxique(s) subit(s) par un organisme suite à une exposition à au moins une substance polluante. Les biomarqueurs d'effets peuvent être par exemple des produits de dégradation, des enzymes ou encore

des modifications structurales. C'est notamment le cas du **malondialdehyde (MDA)** qui est le produit final de la dégradation des membranes lipidiques (i.e. lipopéroxidation). C'est le composé le plus étudié à ce jour pour définir la cytotoxicité d'un xénobiotique sur l'organisme, c'est pourquoi il est qualifié de biomarqueur d'effets toxiques.

Parmi les biomarqueurs d'effet, l'**activité acétylcholinestérase (AChE)** est également largement utilisée pour définir la neurotoxicité d'une substance chimique. En effet, cette enzyme est la cible privilégiée de nombreuses molécules neurotoxiques notamment des insecticides organophosphorés et carbamates. Toutefois, il s'est avéré par la suite que l'AChE répondait également à d'autres contaminations, telles qu'aux métaux, aux hydrocarbures, ou encore aux détergents.

Enfin, les effets les plus préoccupants de ces dernières décennies et notamment pour la conservation de la biodiversité, sont les effets de dérégulations endocriniennes. A ce jour, aucun biomarqueur spécifique à la perturbation endocrinienne n'a été développé chez les invertébrés, alors que la concentration en vitellogénine est utilisée chez les vertébrés (poissons) pour définir le potentiel oestrogénique d'une substance chimique. Il est cependant possible d'évaluer cette perturbation chez des invertébrés, en mesurant la concentration d'hormone spécifique à l'organisme. Chez les crustacés, le système endocrinien régulant la croissance et la reproduction est basé sur des hormones ecdystéroïdes, et notamment la **20-hydroxyecdysone (20-HE)**, qui est également appelée « hormone de mue » car elle permet de déclencher les processus physiologiques pour la croissance de l'organisme.

c. Approche multi-biomarqueur et indice intégratif

Bien que les biomarqueurs soient des outils très intéressants dans l'évaluation de la toxicité de xénobiotiques, l'un des inconvénients majeurs de leur utilisation est leur manque de spécificité vis-à-vis des contaminants. En effet, comme indiqué précédemment, les biomarqueurs peuvent répondre à différents types de substances chimiques. C'est pourquoi, l'utilisation d'un seul biomarqueur pour analyser la toxicité d'un polluant n'est pas suffisant. Il est donc conseillé de faire appel à une **batterie de biomarqueurs** différents pour améliorer la pertinence des résultats. La liste des effets et biomarqueurs étudiés dans ce projet est présentée dans le tableau 4.

Toutefois, la lecture et l'interprétation des résultats peut être compliquée lorsque plusieurs réponses de biomarqueurs doivent être exploitées. C'est pourquoi, l'utilisation d'indices intégratifs, tels que l'**indice de réponses intégrées des biomarqueurs (IBR - Integrated Biomarker Responses** – Sanchez et al. 2013²) permet de synthétiser la réponse de la batterie de biomarqueurs, en une valeur unique. La valeur obtenue lors du calcul de l'indice IBR traduit alors la toxicité globale mesurée par rapport à une condition de référence (témoin) dont la valeur IBR est toujours égale à 0. Ainsi, plus la valeur de l'indice IBR est élevée, plus la toxicité globale du composé l'est aussi.

² Sanchez, W., Burgeot, T., & Porcher, J. M. (2013). A novel "Integrated Biomarker Response" calculation based on reference deviation concept. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(5), 2721-2725.

Tableau 4 Liste des biomarqueurs et des effets analysés dans ce projet

Effets	Biomarqueurs
Stress oxydatif et défense antitoxiques	Glutathion-S-transférase (GST)
	Glutathion peroxydases (GPx)
	Catalase (Cat)
	Superoxyde dismutase (SOD)
Neurotoxicité	Acétylcholinestérase (AChE)
Cytotoxicité (dommage cellulaire)	Malondialdéhyde (MDA - lipoperoxydation)
Perturbation endocrinienne	20-hydroxyecdysone (20-HE)

3. MÉTHODOLOGIE EXPÉRIMENTALE EN LABORATOIRE

a. Exposition simple ou en mélanges

Pour les expérimentations en laboratoire, les décapodes *Neocaridina* sp. ont été achetées dans un magasin d'aquariophilie (Bubba's Shrimps – Liège) afin d'obtenir des organismes adultes, calibrés de même taille (~2cm) et de même sexe. En effet, certains paramètres biotiques (sexe, taille, âge), appelés également facteurs confondants, pourraient influencer les réponses des biomarqueurs et donc biaiser l'analyse de la toxicité des substances étudiées. Pour cela, seuls des mâles ont été utilisés, pour s'affranchir de l'influence du cycle reproducteur, beaucoup plus marqué chez les femelles (ex. ovogenèse, présence d'œufs,...).

Avant toute exposition, une étape de saturation des aquariums est nécessaire. Celle-ci consiste à remplir les cristallisoirs (3 répliqués par condition) avec la solution d'exposition correspondante, et laisser l'équilibre se faire durant 2-3 jours. Cette étape est nécessaire afin de s'assurer que la concentration du polluant ne diminue pas durant la phase d'exposition des organismes.

A la fin de l'étape de saturation, les cristallisoirs ont été vidés puis remplis de nouveau avec la solution d'exposition correspondante, auquel ont été ajoutées 5 *Neocaridina* sp. (5 crevettes par cristallisoir, soit 15 crevettes par condition). Ensuite, ces derniers ont été placés dans **un incubateur thermostatée réglé à 24°C et mimant un cycle nyctéméral de 12h jour et 12h nuit** (Figure 2). Ces conditions ont été choisies pour être les plus réalistes par rapport aux conditions environnementales de Martinique. De plus, des pompes à oxygène ont permis d'alimenter chaque cristallisoir en oxygène durant toute la durée de l'exposition.



Figure 2 Enceinte thermostatée comprenant les cristallisoirs de chaque condition expérimentale étudiée.

Les organismes ont ainsi été exposés durant **7 et 21 jours**, afin d'évaluer les effets toxiques de chaque pesticide, à court et moyen terme. Par ailleurs, les milieux d'expositions ont été renouvelés tous les 3 jours, afin de garantir une concentration d'exposition relativement constante, mais aussi de s'assurer une absence d'accumulation de nitrates qui seraient délétère pour les décapodes.

b. Dissection et conservation des échantillons

Après chaque temps d'exposition, 4 à 6 crevettes (selon le nombre de crevettes restantes) ont été prélevé et endormies sur glace, afin de prélever les tissus nécessaires aux différents dosages, à savoir le céphalothorax et le muscle abdominal. **Le céphalothorax sera utilisé pour doser les activités enzymatique Cat, SOD, GPx, GST et la concentration en MDA ; alors que le muscle sera divisé en deux pour analyser l'activité AchE et la concentration en 20-HE** (Figure 3). Les tissus disséqués ont immédiatement été congelés à et conservés jusqu'aux traitements des échantillons.

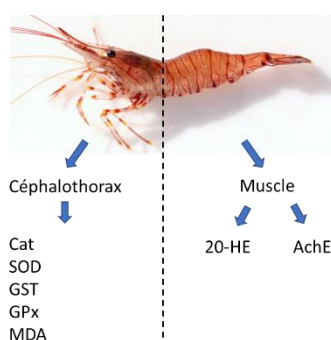


Figure 3 Dissection des tissus nécessaires et analyses des biomarqueurs correspondants

c. Préparation des échantillons et dosages des biomarqueurs

Au moment des analyses, les échantillons ont été décongelés sur glace, puis pesés afin de déterminer le poids frais de tissu qui permet de calculer la quantité de tampon phosphate 100 mM, pH 7,6 à ajouter pour l'homogénéisation. Un volume de 10µL de tampon est ajouté pour 1mg de tissu (ex. un tissu de 30mg est homogénéisé dans 300µL de tampon).

Après broyage des tissus à l'aide d'un Potter mécanique, les échantillons sont centrifugés à 10.000g pendant 15min à 4°C, afin de récupérer la fraction cytosolique nécessaire aux dosages des biomarqueurs. Le surnageant est ensuite aliquoté selon le volume adéquate, dans différents microtubes (un microtube par biomarqueur) qui sont congelés et conservés jusqu'aux analyses des biomarqueurs.

Les différents biomarqueurs ont été analysés selon des protocoles obtenus dans la littérature et optimisés au laboratoire LEAE.

**EXPERIMENTATION
EN LABORATOIRE**

—

EXPOSITION SIMPLE

1. RÉSULTATS LORS EXPOSITION SIMPLE

a. Biomarqueur de neurotoxicité

L'activité AchE, représentative de l'influx nerveux, a été mesurée dans le muscle des décapodes exposés aux différents pesticides durant 7 et 21 jours. Les résultats sont présentés sur la figure 4.

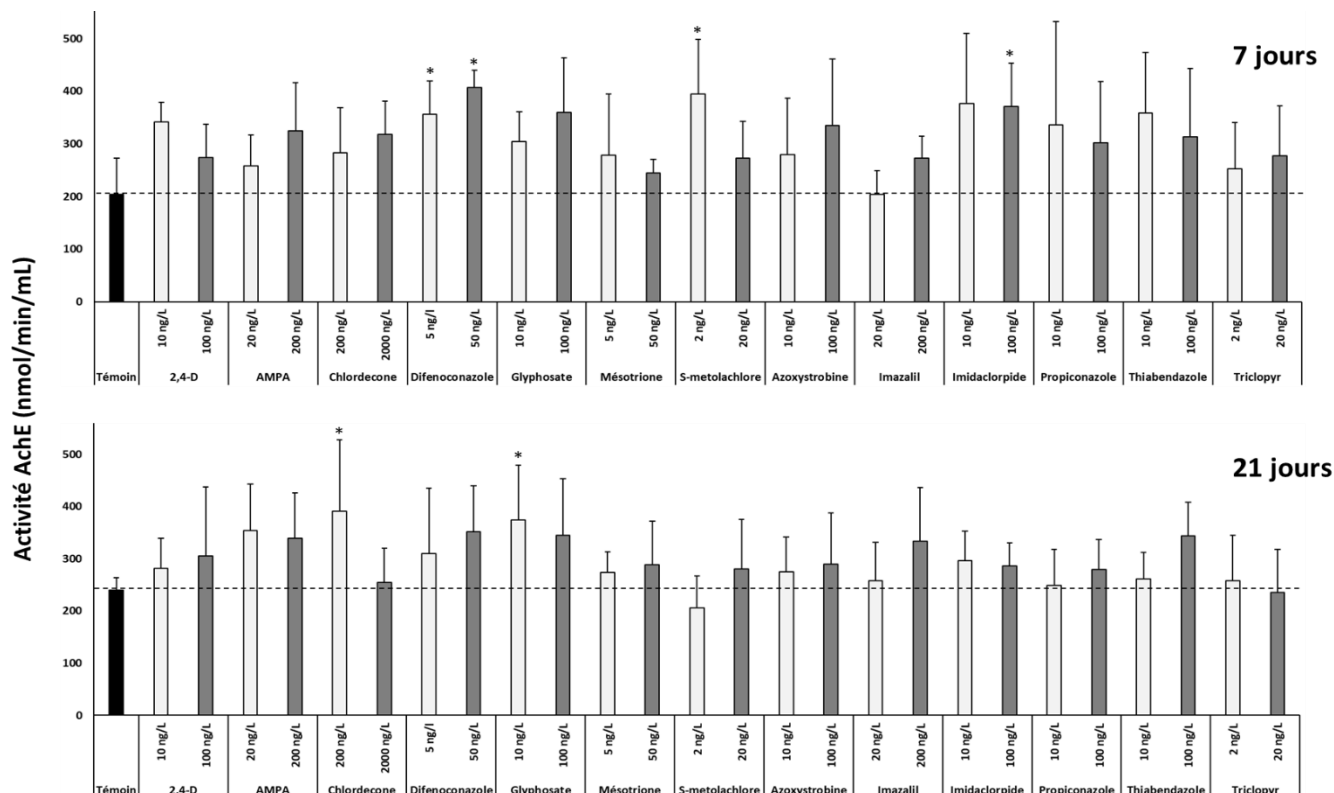


Figure 4 Activité AchE (nmol/min/mL) mesurées chez *Neocardina sp.* exposées à 2 concentrations de 13 pesticides durant 7 et 21 jours. L'astérisque représente une différence significative par rapport au témoin. La ligne pointillée représente la valeur moyenne des témoins.

Les résultats mettent en évidence que l'activité AchE était globalement modifiée par les expositions aux pesticides, mais seulement certaines conditions d'exposition ont causé une augmentation significative (Figure 4).

En effet, après 7 jours d'exposition, seul le **difénoconazole** a provoqué une augmentation significative de l'activité AchE aux 2 concentrations étudiées, alors que le même résultat a été observé pour la plus faible concentration de **S-metolachlore**, ainsi qu'à la plus forte concentration d'**imidaclopride**. Ces pesticides pourraient donc être qualifiés de neurotoxique pour le décapode. Cependant, après 21 jours d'exposition, ces effets ne sont plus observés, laissant suggérer une adaptation des organismes après un long temps d'exposition à ces pesticides.

En revanche, après 21 jours, les faibles concentrations de **chlordécone** et **glyphosate** ont causé des augmentations significatives de l'activité AchE. Ce résultat reste surprenant, notamment pour le glyphosate, dont l'effet inhibiteur de l'AchE a été observé chez de nombreuses espèces aquatiques.

Les augmentations d'activité AchE mesurées au cours de cette expérience suggèrent donc un affaiblissement de l'influx nerveux car l'AchE agit sur la dégradation du neurotransmetteur acétylcholine. Lors d'une augmentation d'activité AchE, la dégradation de l'acétylcholine serait donc accrue, et celui-ci ne pourrait donc plus jouer son rôle de transmission nerveux.

b. Activités antioxydantes et antitoxiques

✓ Catalase (Cat)

L'analyse de l'activité catalase a démontré très peu de variations en comparaison au témoin, quel que soit le temps d'exposition (Figure 5). Toutefois, après 7 jours d'exposition, l'activité catalase a été significativement augmentée lors de l'exposition à 100 ng/L de **S-metolachlore**, d'**azoxystrobine** ou de **triclopyr**, et à 10 ng/L de **thiabendazole**. Il est à noter tout de même, que bien que non significative, l'activité catalase semblait être augmentée par les pesticides suivant : **imazalil** (10 et 100 ng/L), **imidaclopride** 100 ng/L, ou encore **propiconazole** (10 et 100 ng/L).

De même, après 21 jours d'exposition, très peu de variations de l'activité catalase ont été observées en comparaison au témoin. Les expositions au **S-metolachlore** 2 et 20 ng/L ont provoqué une inhibition de l'activité catalase, de même que l'exposition à 100 ng/L de **thiabendazole**.

L'absence de modification de l'activité catalase pourrait suggérer une absence d'effet du pesticide considéré, à savoir une absence de production de ROS (stress oxydatif). Cela pourrait également être dû au fait que la catalase a été activée avant le moment de la mesure, c'est-à-dire avant 7 jours d'exposition, et qu'elle a ensuite été stabilisée. En revanche, l'inhibition de la catalase observée à long terme pourrait être due à un stress toxique. En effet, il est connu qu'un polluant peut causer une induction des enzymes antioxydantes permettant aux organismes de surmonter partiellement ou totalement le stress résultant de l'exposition à un environnement dangereux. Cependant, une trop grande toxicité peut également entraîner l'inhibition de ces mêmes enzymes. De même, il a été démontré qu'une concentration élevée d'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ (principal ROS) conduit à une inhibition de la catalase.

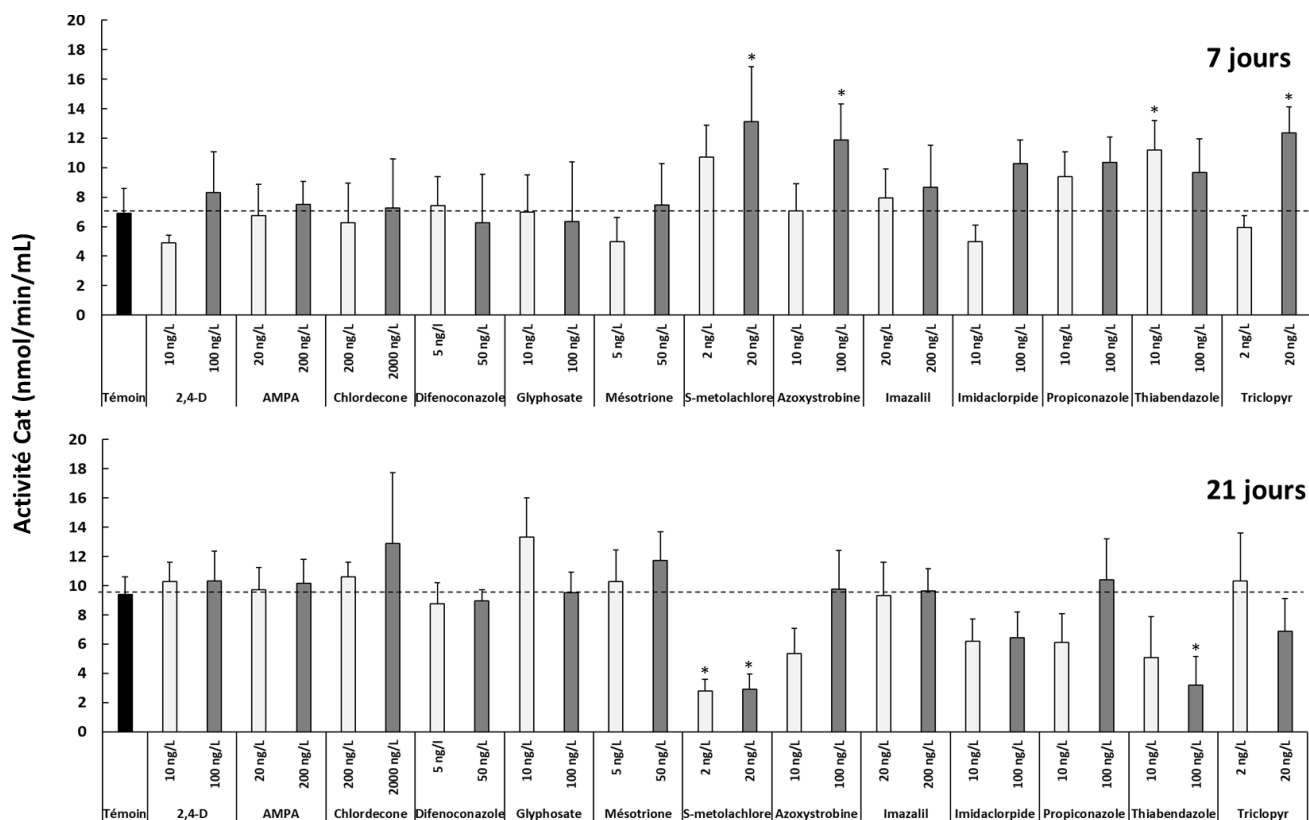


Figure 5 Activité catalase (nmol/min/mL) mesurées chez *Neocaridina* sp. exposées à 2 concentrations de 13 pesticides durant 7 et 21 jours. L'astérisque représente une différence significative par rapport au témoin. La ligne pointillée représente la valeur moyenne des témoins.

Les glutathion peroxydases assurent la transformation de l'espèce réactive de l'oxygène H_2O_2 (peroxyde d'hydrogène), mais des hydroperoxydes organiques de type ROOH en ROH.

Bien que l'activité GPx mesurée dans la plupart des conditions après 7 jours d'exposition, était supérieure au témoin, peu de résultats étaient significatifs (Figure 6). En effet, seules les deux concentrations d'**imazalil** ont augmenté de manière significative l'activité GPx ; de même que le **2,4-D** 100 ng/L et le **difenoconazole** 50 ng/L.

Après 21 jours d'exposition, la majeure partie des conditions d'exposition n'ont pas causé une modification significative de l'activité GPx, à l'exception de la **chlordécone** qui a significativement augmenté l'activité, quelle que soit la concentration. A l'inverse, une diminution significative a été provoqué par l'exposition au **S-metolachlore** 2 et 20 ng/L, mais aussi au **triclopyr** 2 ng/L.

Ces résultats démontrent une forte production de peroxyde d'hydrogène et/ou hydroperoxydes après 7 jours d'exposition au **2,4-D**, **difenoconazole**, et **imazalil** ; alors que la **chlordécone** provoque le même effet mais après une exposition long terme. Cependant, tout comme la catalase, l'activité GPx était inhibée par les **S-metolachlore** 2 et 20 ng/L probablement du fait d'un stress toxique trop élevé.

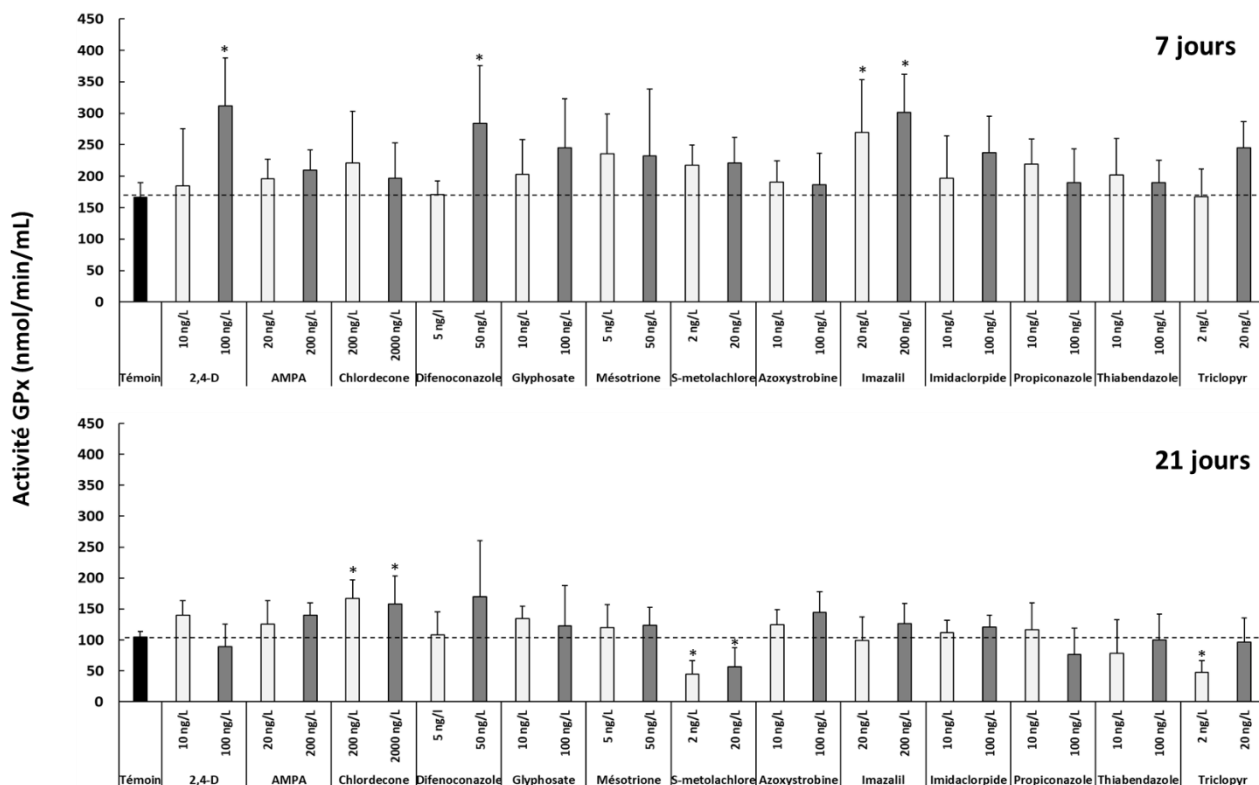


Figure 6 Activité GPx (nmol/min/mL) mesurées chez *Neocardina sp.* exposées à 2 concentrations de 13 pesticides durant 7 et 21 jours. L'astérisque représente une différence significative par rapport au témoin. La ligne pointillée représente la valeur moyenne des témoins.

✓ Glutathion-S-transférase (GST)

La glutathion-S-transférase n'intervient pas uniquement dans les défenses antioxydantes, mais intervient également dans la biotransformation des contaminants organiques. Avant de pouvoir être excrétés, les contaminants lipophiles (ex : HAP, PCB) doivent être métabolisés par voies enzymatiques. Ce processus de biotransformation est organisé en plusieurs phases successives :

- La phase I : production des métabolites moins lipophiles que le substance mère,

- La phase II : conjugaison des métabolites à des substrats endogènes. C'est ici qu'intervient notamment la GST qui catalyse la conjugaison avec le glutathion réduit (GSH)
- La phase III : excrétion

Après 7 jours d'exposition, les résultats obtenus (figure 7) ont montré que les pesticides **2,4-D, AMPA, chlordécone, difénoconazole, glyphosate et imazalil** avaient tendance à augmenter l'activité GST de *Neocaridina* sp.. Ceci suggère donc que l'organisme a mis en place des systèmes de défenses antitoxiques, notamment pour la biotransformation de ces pesticides. Notons toutefois, que seule l'exposition au **glyphosate** 10 ng/L a augmenté l'activité GST de manière significative en comparaison aux témoins.

A l'inverse, les pesticides **S-metolachlore, azoxystrobine, imidaclopride, propiconazole, thiabendazole et triclopyr** avaient tous tendance à inhiber l'activité GST, et ce de manière significative pour le **propiconazole** 10 et 100 ng/L, le **S-metolachlore** 2ng/L et le **thiabendazole** 10ng/L. Cette diminution d'activité pourrait de nouveau s'expliquer par une forte toxicité des composés. Cependant, il ne peut être négligé que cela soit expliquer par un manque de glutathion réduit (GSH) qui est le co-facteur de cette enzyme, mais qui est également un tripeptide jouant un rôle de détoxification direct grâce à sa fonction thiol.

Par ailleurs, après 21 jours d'exposition, ces variations d'activité GST n'étaient pas observés, démontrant un retour à une activité proche des témoins, et donc à une probable adaptation des organismes sur une exposition long terme. Toutefois, l'augmentation d'activité GST, observée après 7 jours d'exposition au **glyphosate** 10 ng/L, a également été mesurée après 21 jours, démontrant une mise en place de défense antitoxique continue de l'organisme face à ce pesticide. De même, bien qu'aucune augmentation d'activité n'ait été démontrée après 7 jours d'exposition, une exposition de 21 jours au **2,4-D** 10 ng/L et **mésotrione** 50 ng/L a causé une activité des défenses antitoxiques, à savoir de la biotransformation par la GST.

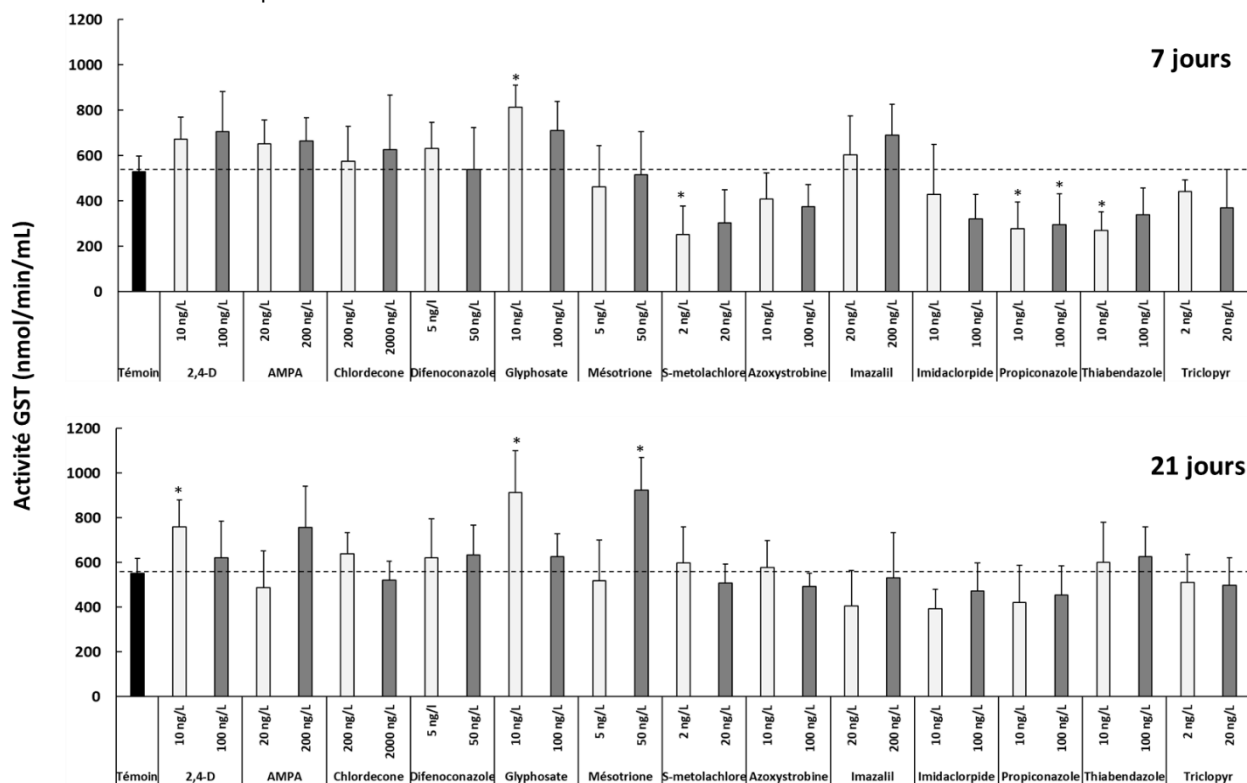


Figure 7 Activité GST (nmol/min/mL) mesurées chez *Neocaridina* sp. exposées à 2 concentrations de 13 pesticides durant 7 et 21 jours. L'astérisque représente une différence significative par rapport au témoin. La ligne pointillée représente la valeur moyenne des témoins.

Les superoxydes dismutases (SOD) ont un rôle important dans la prise en charge de l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$). Ces enzymes ne traversent pas les membranes et agissent donc dans le compartiment même où les $O_2^{\bullet-}$ sont formés. Elles constituent une première ligne de défense efficace pour empêcher l'accumulation cellulaire de l'anion superoxyde.

Les activités SOD mesurées après l'exposition aux différents pesticides durant 7 et 21 jours n'ont pas démontré de variations en comparaison aux témoins (Figure 8). Comme indiqué précédemment, ces enzymes sont les premières lignes de défenses, et donc ce résultat pourrait s'expliquer par une toxicité survenue avant la mesure de 7 jours d'exposition. Les activités ainsi mesurées pourraient être, par conséquent, le résultat d'une adaptation de l'organisme. Par ailleurs, il ne peut être négligé que l'exposition à ces pesticides n'a pas causé la production d'anion superoxyde, et donc que l'activité SOD soit restée inchangée.

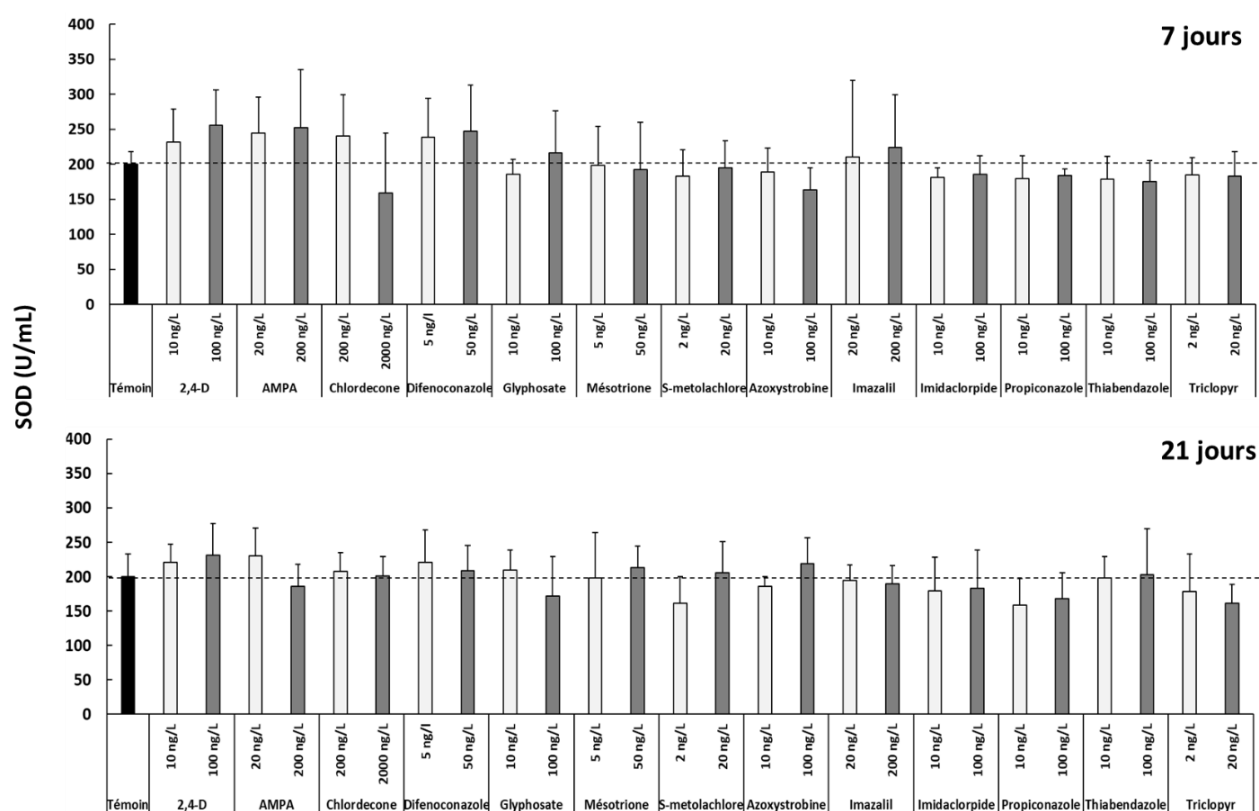


Figure 8 Activité SOD (nmol/min/mL) mesurées chez *Neocaridina* sp. exposées à 2 concentrations de 13 pesticides durant 7 et 21 jours. L'astérisque représente une différence significative par rapport au témoin. La ligne pointillée représente la valeur moyenne des témoins.

c. Biomarqueur de cytotoxicité

Le malondialdéhyde est le produit final de la dégradation des lipides membranaires (lipoperoxydation). De ce fait, plus sa concentration sera élevée, plus l'effet toxique subi par l'organisme est important.

Après 7 jours d'exposition, 6 pesticides sur 13 ont causé une augmentation significative de la concentration en MDA (Figure 9). Il s'agit du **2,4-D**, **chlordécone**, **difénoconazole**, **mésotrione**, **imazalil** et **triclopyr**. En effet, concernant les pesticides 2,4-D, mésotrione et imazalil, la concentration de MDA était significativement augmentée quelle que soit la concentration d'exposition, alors que seules la **chlordécone** 200 ng/L, **difénoconazole** 50 ng/L et **triclopyr** 2 ng/L ont eu le même effet. Il est cependant important

de noter que l'ensemble des conditions d'exposition avaient tendance à augmenter la concentration de MDA après 7 jours.

Après 21 jours d'exposition, les concentrations significativement élevées de MDA étaient maintenues pour les pesticides suivants : **2,4-D**, **chlordécone**, **mésotrione**, et **imazalil**. Seuls les organismes exposés au **triclopyr** ont vu leurs concentrations de MDA revenir à une valeur similaire aux témoins lors de l'exposition long terme. Ces résultats démontrent que les effets cytotoxiques causés par le 2,4-D, chlordécone, mésotrione, et imazalil semblent être maintenus sur le long terme, bien que les organismes mettent en place des moyens de défenses ; alors que celles-ci semblent efficace pour lutter contre la toxicité du triclopyr (retour à une concentration de MDA similaire à celle des témoins).

Par ailleurs, même si une exposition de 7 jours au **glyphosate** 10 et 100 ng/L n'a pas eu d'effet significatif sur la concentration en MDA, l'exposition de 21 jours à 100 ng/L a causé une forte lipo-péroxydation (concentration de MDA significativement augmentée).

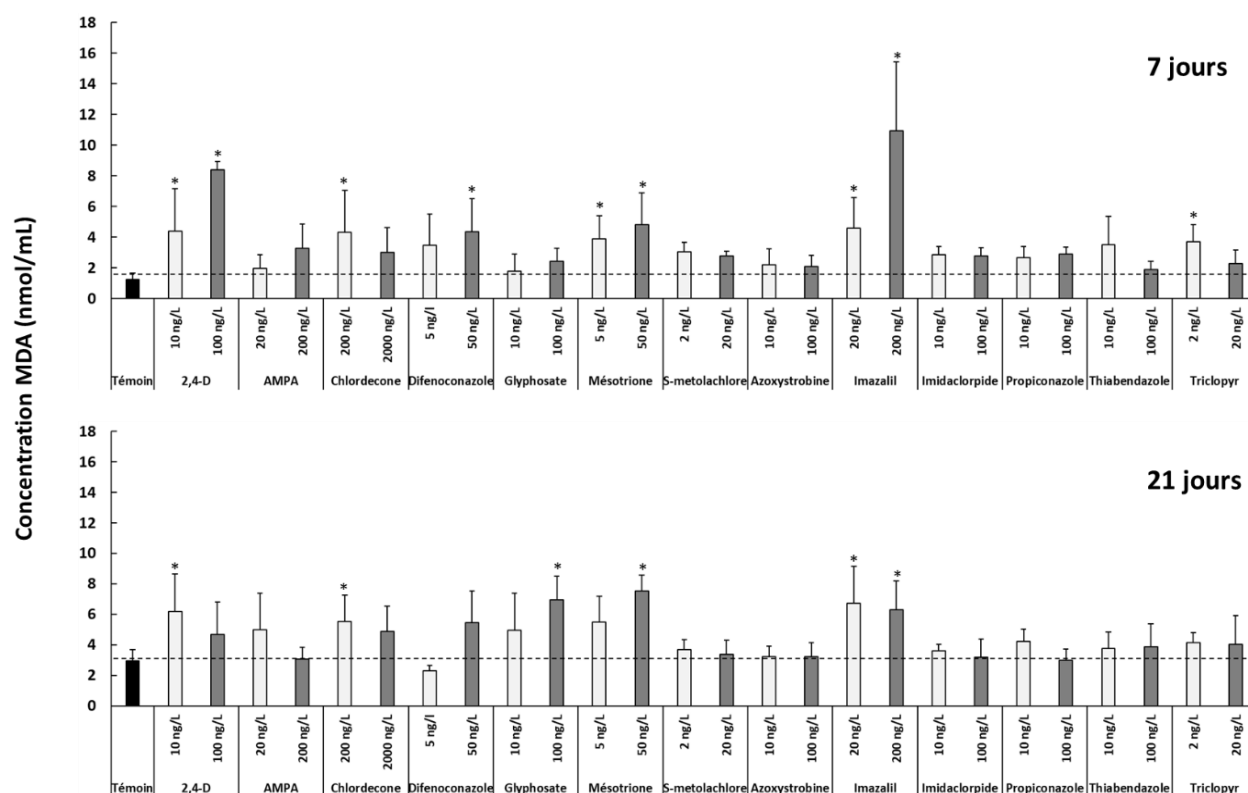


Figure 9 Concentration en MDA (nmol/mL) mesurées chez *Neocardina* sp. exposées à 2 concentrations de 13 pesticides durant 7 et 21 jours. L'astérisque représente une différence significative par rapport au témoin. La ligne pointillée représente la valeur moyenne des témoins.

d. Effet de dérégulation endocrinienne

Le système endocrinien des crustacés est basé sur des hormones ecdystéroïdes et principalement la 20-hydroxyecdysone (20-HE) qui est responsable du déclenchement de la mue, donc de la croissance et la reproduction des organismes.

Après 7 jours d'exposition, il a été observé que la concentration en 20-HE était significativement augmentée ou diminuée selon les conditions d'exposition (Figure 10). En effet, l'exposition au **difenoconazole** 5 ng/L, **glyphosate** 100 ng/L, **mésotrione** 5ng/L, **S-metolachlore** 20 ng/L, **imazalil** 20 ng/L ou **triclopyr** 2 ng/L a provoqué une augmentation significative de la quantité de 20-HE chez *Neocardina* sp. En revanche, l'exposition à la **chlordécone** 200 ng/L, **difenoconazole** 50 ng/L, **S-metolachlore** 2 ng/L ou **thiabendazole** 10 ng/L a conduit à une diminution significative de la concentration en 20-HE.

Après 21 jours d'exposition, la majorité des pesticides testés avaient tendance à causer une diminution de la concentration en 20-HE, exceptés **le S-metolachlore** 20 ng/L et l'**imidaclopride** 10 ng/L qui ont augmenté significativement ce paramètre. Par ailleurs, une diminution significative a été mesurée chez les organismes exposés à l'**AMPA** 20 ng/L ou au **mésotrione** 5 ng/L. Il est important de noter que l'exposition à la **chlordercone** est la seule à avoir provoquer une diminution significative de la concentration en 20-HE, aux deux concentrations.

Ces modifications de concentration en 20-HE après exposition à des pesticides pourraient provoquer des retards ou des accélérations dans le processus de mue. Cela pourrait par exemple avoir pour conséquence des mues incomplètes aboutissant à la mort de l'organisme. De plus, comme la reproduction des décapodes est directement liée à leur mue (ex : fécondation des femelles, relargage des juvéniles du marsupium), un retard ou une accélération de la mue pourrait causer un décalage dans la reproduction (ex. désynchronisation des mâles et femelles) ou des anomalies de développement des œufs dans le marsupium (ex. œufs aberrants). A plus large échelle, ces conséquences pourraient être la cause d'une diminution des populations.

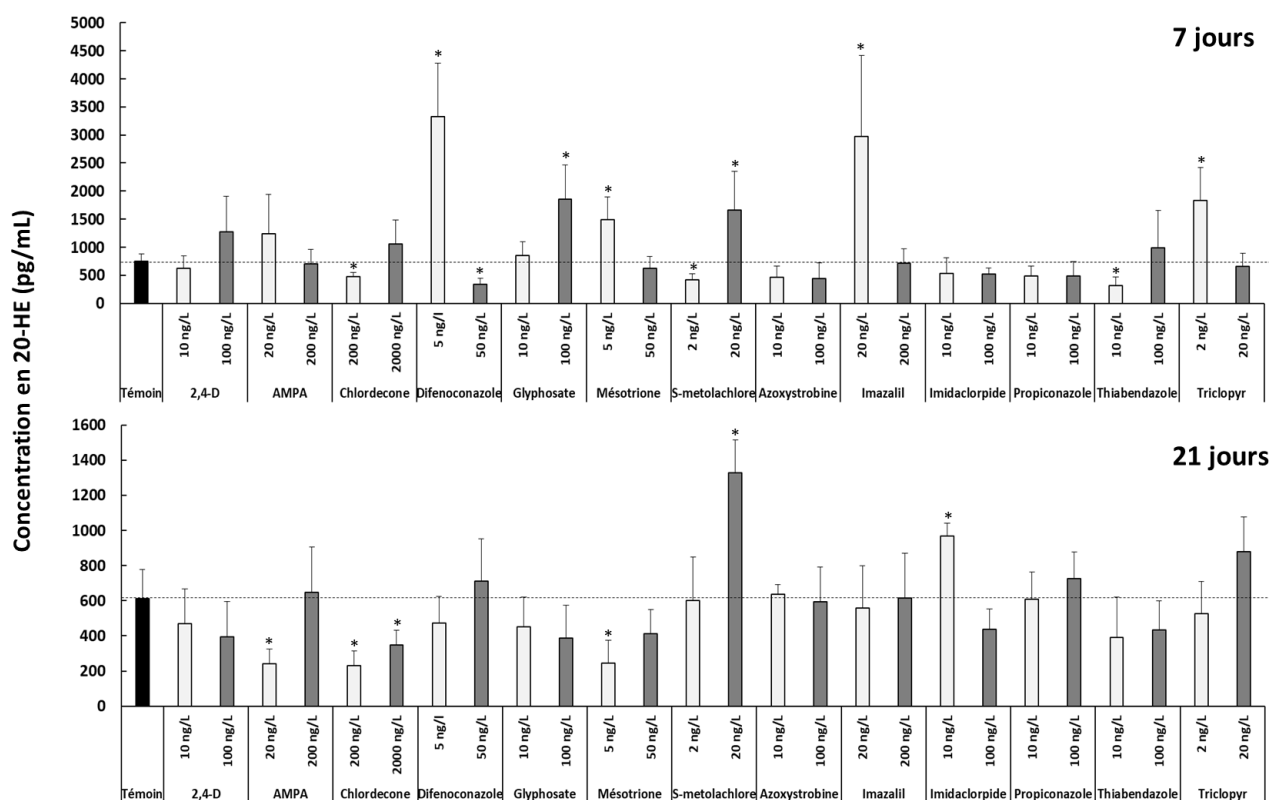


Figure 10 Concentration en 20-HE (nmol/mL) mesurées chez *Neocaridina* sp. exposées à 2 concentrations de 13 pesticides durant 7 et 21 jours. L'astérisque représente une différence significative par rapport au témoin. La ligne pointillée représente la valeur moyenne des témoins.

e. Integrated Biomarker Responses (IBR)

L'une des difficultés dans l'évaluation de la toxicité d'une substance chimique à l'aide d'une approche multi-biomarqueurs, est de réaliser une interprétation globale des réponses des biomarqueurs en lien avec leurs réponses individuelles. Pour cela, l'approche IBR est la méthode la plus populaire, qui fournit une valeur numérique intégrant toutes les réponses des biomarqueurs en une seule, par rapport à une situation témoin, dont la valeur IBR est toujours égale à 0. Ainsi, **plus la valeur de l'indice IBR est élevée, plus la**

molécule d'exposition a causé des effets toxiques. De ce fait, dans le cas de cette étude, l'utilisation de l'indice IBR permet de comparer la toxicité de chaque substance.

Les résultats mettent en évidence que la majorité des substances semblerait avoir des effets plus toxiques après une exposition à court terme, à savoir 7 jours, plutôt que lors d'une exposition à long terme (21 jours) (Tableau 5). Cette observation est valable quelle que soit la concentration considérée. Certaines exceptions sont cependant soulignées, tel que l'AMPA 20 ng/L, chlordécone 200 ng/L, glyphosate 10 ng/L, mésotrione 50 ng/L et thiabendazole 100 ng/L qui semblaient provoquer plus d'effets toxiques après 21 jours qu'après 7 jours d'exposition.

Tableau 5 Valeurs IBR calculées selon les réponses des biomarqueurs étudiés.

Les cases rouges indiquent la valeur IBR la plus élevée lors d'une comparaison des expositions 7 et 21 jours pour une substance et concentration données.

Les cases vertes indiquent la valeur moyenne IBR la plus élevée, lors d'une comparaison entre les expositions 7 et 21 jours, sans tenir compte de la concentration.

		7 jours		21 jours	
		IBR	Moyenne	IBR	Moyenne
Témoins		0.0	0.0	0.0	0.0
2,4-D	10 ng/L	5.4	6.8	4.9	4.4
	100 ng/L	8.3		3.9	
AMPA	20 ng/L	3.5	4.3	5.5	4.4
	200 ng/L	5.0		3.3	
Chlordecone	200 ng/L	5.0	5.0	6.1	4.8
	2000 ng/L	5.0		3.4	
Difenoconazole	5 ng/L	6.3	7.1	2.6	3.7
	50 ng/L	7.9		4.8	
Glyphosate	10 ng/L	3.4	4.9	5.9	5.6
	100 ng/L	6.4		5.3	
Mésotrione	5 ng/L	5.8	5.1	4.5	5.3
	50 ng/L	4.3		6.1	
S-metolachlore	2 ng/L	8.2	7.6	6.3	6.4
	20 ng/L	7.1		6.5	
Azoxystrobine	10 ng/L	3.6	4.9	2.7	2.4
	100 ng/L	6.2		2.0	
Imazalil	20 ng/L	6.0	7.0	4.1	3.8
	200 ng/L	8.0		3.6	
Imidaclopride	10 ng/L	5.8	6.4	4.9	4.1
	100 ng/L	7.0		3.3	
Propiconazole	10 ng/L	6.5	6.4	4.1	3.8
	100 ng/L	6.2		3.6	
Thiabendazole	10 ng/L	8.1	6.3	4.3	4.9
	100 ng/L	4.5		5.4	
Triclopyr	2 ng/L	4.6	5.3	3.8	3.7
	20 ng/L	6.1		3.6	

En considérant chaque pesticide, sans tenir compte de la concentration d'exposition, le constat est similaire, à savoir des effets toxiques plus marqués à 7 jours d'exposition, qu'à 21 jours d'exposition, à l'exception de l'AMPA, glyphosate et mésotrione dont les effets toxiques semblent être supérieurs à 21 jours d'expositions.

Enfin, les valeurs IBR-moyen dans leur globalité mettent en évidence que le **S-métolachlore est le pesticide causant le plus d'effets toxiques après 7 et 21 jours d'exposition, alors que l'AMPA et l'azoxystrobine sont les moins toxiques après respectivement 7 et 21 jours.** (Figure 10, Tableau 6).

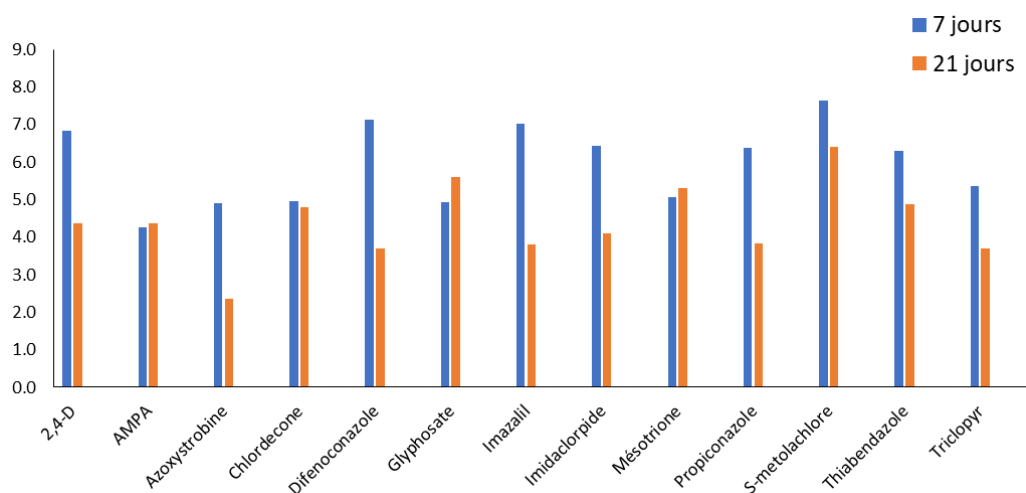


Figure 11 Valeurs moyennes IBR de chaque pesticide après 7 et 21 jours d'exposition, et sans tenir compte de la concentration.

Tableau 6 Classement des pesticides du moins toxique au plus toxique, après exposition 7 jours (gauche) et 21 jours (droite), sur base des valeurs moyennes IBR, et sans tenir compte des concentrations d'exposition.

	7 jours
AMPA	4.3
Azoxystrobine	4.9
Glyphosate	4.9
Chlordecone	5.0
Mésotrione	5.1
Triclopyr	5.3
Thiabendazole	6.3
Propiconazole	6.4
Imidaclopride	6.4
2,4-D	6.8
Imazalil	7.0
Difenoconazole	7.1
S-metolachlore	7.6

	21 jours
Azoxystrobine	2.4
Difenoconazole	3.7
Triclopyr	3.7
Imazalil	3.8
Propiconazole	3.8
Imidaclopride	4.1
AMPA	4.4
2,4-D	4.4
Chlordecone	4.8
Thiabendazole	4.9
Mésotrione	5.3
Glyphosate	5.6
S-metolachlore	6.4

2. BILAN DES EXPOSITIONS SIMPLES EN LABORATOIRE

Ce travail avait pour objectif d'évaluer les effets toxiques de 12 pesticides encore autorisés en France et utilisés en Martinique et 1 pesticide interdit, sur des invertébrés décapodes d'eaux douces. Ces substances sont retrouvées dans la majorité des cours d'eau de surface de Martinique et à ce jour, aucune étude écotoxicologique, n'a été réalisée pour définir leur toxicité sur le biote de ces écosystèmes.

Pour cela, une expérimentation en laboratoire a été proposée pour évaluer les effets de chaque pesticide individuellement sur une batterie de biomarqueurs analysée chez le décapode *Neocaridina* sp., décapode modèle représentatif des décapodes retrouvés dans les eaux douces de Martinique. Cette batterie de biomarqueur a été choisie pour représenter les effets toxiques les plus couramment analysés en écotoxicologie, à savoir : le stress oxydatif, la neurotoxicité, la cytotoxicité et la dérégulation endocrinienne.

Les résultats obtenus ont démontré que **l'ensemble des pesticides provoqués des effets néfastes sur les décapodes**, car la réponse des biomarqueurs était modifiée par rapport à une condition témoin (Tableau 7). Cependant, tous les pesticides n'ont pas causé l'ensemble des effets toxiques analysés (Tableau 8). En effet, **les effets majeurs provoqués par la plupart des pesticides étaient un stress oxydatif (11 pesticides sur 13) et une dérégulation endocrinienne (10 pesticides sur 13), alors que la cytotoxicité et la neurotoxicité étaient les effets les moins mesurés (respectivement 7 et 5 pesticides sur 13).**

Par ailleurs, il est important de remarquer que la plupart des effets toxiques significatifs mesurés après 7 jours d'exposition ne sont généralement pas observés après 21 jours d'exposition, suggérant une probable adaptation des décapodes aux milieux contaminés. A l'inverse, de nombreux effets toxiques ont été observés après une longue exposition soulignant la dangerosité de telles expositions sur le long terme. Il est important de souligner également que la cytotoxicité (destruction des cellules) observée après 7 jours d'exposition est, pour la plupart des pesticides, encore présente après 21 jours d'exposition (ex. 2,4-D, chlordécone, mésotrione, imazalil). Les organismes ont donc subi des effets délétères dus à l'exposition aux pesticides sur le long terme, même si des défenses antitoxiques ont été mises en place pour lutter. Cela suggère que des expositions longues à certains pesticides (notamment 2,4-D, chlordécone, mésotrione, imazalil) pourraient aboutir à un dysfonctionnement de la physiologie de l'organisme, voire à la mort des individus exposés. Ces résultats mettent également en avant la nécessité de réaliser des suivis réguliers de batterie de biomarqueurs afin d'évaluer au plus juste la santé des organismes.

Enfin, bien que l'ensemble de ce travail en laboratoire ait démontré la toxicité des pesticides, encore autorisés et utilisés, sur des organismes non-cibles tels que les décapodes, il faut garder à l'esprit qu'il s'agit d'exposition unique et donc que la toxicité subie par les organismes dans l'environnement pourrait être plus ou moins forte, du fait d'expositions à des cocktails de polluants (ex. effets synergiques, antagonistes, ...). Cet aspect de l'étude a été évalué dans la suite de ce travail, à travers la réalisation d'expositions de décapodes en laboratoire à des cocktails de polluants, représentatifs des mélanges observés dans quatre rivières martiniquaises. En parallèle, des prélèvements de décapodes ont été effectués sur ces mêmes rivières afin d'évaluer les effets toxiques en conditions réelles.

Tableau 7 Récapitulatif des réponses de chaque biomarqueur en fonction du pesticide, de sa concentration et du temps d'exposition. Le '+' représente une augmentation significative par rapport à la condition témoin et le '-' une diminution significative par rapport à la condition témoin.

Pesticides		Neurotoxique	Stress oxydatif						Cytotoxique	Dérégulateur endocrinien
		AchE	Cat	GPx	GST	SOD	MDA	20-HE		
		7j21j	7j21j	7j21j	7j21j	7j21j	7j21j	7j21j		
2,4-D	10 ng/L									
	100 ng/L			+	+		+	+		
AMPA	20 ng/L								-	
	200 ng/L									
Chlordecone	200 ng/L						+	+	-	
	2000 ng/L								-	
Difenoconazole	5 ng/l	+							+	
	50 ng/L	+		+			+		-	
Glyphosate	10 ng/L				+	+				
	100 ng/L							+	+	
Mésotrione	5 ng/L					+	+		-	
	50 ng/L						+	+		
S-metolachlore	2 ng/L	+		-	-				-	
	20 ng/L		+	-					+	
Azoxytrobine	10 ng/L									
	100 ng/L		+							
Imazalil	20 ng/L			+			+	+	+	
	200 ng/L			+			+	+		
Imidaclopride	10 ng/L								+	
	100 ng/L	+								
Propiconazole	10 ng/L				-					
	100 ng/L				-					
Thiabendazole	10 ng/L		+		-				-	
	100 ng/L			-						
Triclopyr	2 ng/L			-			+		+	
	20 ng/L		+							

Tableau 8 Résumé des effets toxiques provoqués par chaque pesticide indépendamment de la concentration et du temps d'exposition.

	Neurotoxicité	Stress oxydatif	Cytotoxicité	Dérégulation endocrinienne
2,4-D		✓	✓	
AMPA				✓
Chlordecone	✓	✓	✓	✓
Difenoconazole	✓	✓	✓	✓
Glyphosate	✓	✓	✓	✓
Mésotrione		✓	✓	✓
S-metolachlore	✓	✓		✓
Azoxystrobine		✓		
Imazalil		✓	✓	✓
Imidaclopride	✓			✓
Propiconazole		✓		
Thiabendazole		✓		✓
Triclopyr		✓	✓	✓

**EXPERIMENTATION
EN LABORATOIRE**

—

**EXPOSITION DE
MELANGES**

1. METHODOLOGIE EXPERIMENTALE – EFFETS DE MELANGE

La méthodologie expérimentale utilisée pour cette partie de l'étude est identique à la précédente, seul diffère les conditions d'exposition qui font ici intervenir des cocktails de pesticides.

Ces cocktails ont été choisis afin d'être représentatif de mélanges de pesticides retrouvés sur quatre rivières martiniquaises, utilisées comme stations de suivi des concentrations en pesticides.

Pour cela, le rapport ODE de 2019 a été analysé selon plusieurs critères choisis, tel que le nombre de molécules de pesticides identifiées, la concentration totale en pesticides, le nombre de pesticides autorisés mesurés, Il ressort de cette analyse que les 4 stations choisies sont **Pont de chaînes (rivière Madame)**, **Pont Belle-Ile (rivière Lézarde)**, **Grand Galion (rivière du Galion)** et **Pont Séraphin 2 (rivière Deux Courants)** (Tableau 9).

Tableau 9. Critères de classification des 4 stations du suivi pesticide retenus pour l'étude des effets de mélanges et l'étude in-situ. Un gradient croissant a été établi de la couleur jaune au rouge.

Stations	Nb molécules pesticides totaux (en 2019)	Concentration moyenne en pesticides totaux (en 2019)	Nb molécules pesticides autorisés (en 2019)	Concentration moyenne en pesticides autorisés (en 2019)	Chlordécone
Pont de chaînes	3	0.006 µg/L	2	0.01 µg/L	Non
Grand Galion	14	0.011 µg/L	9	0.006 µg/L	Oui
Pont Séraphin 2	15	0.028 µg/L	9	0.02 µg/L	Oui
Pont Belle-île	11	0.018 µg/L	10	0.005 µg/L	Oui

Selon le rapport ODE de 2019, les concentrations des 13 pesticides étudiés dans ce travail en fonction de la station étaient les suivantes (tableau 10):

Tableau 10. Concentrations des 13 pesticides étudiés dans 4 stations du suivi pesticide, en 2019 (Rapport ODE, 2019)

Pesticides (µg/L)	Pont de chaînes	Grand Galion	Pont Belle Ile	Pont Séraphin 2
2,4-D		0.08		0.03
AMPA	0.76	0.08	0.15	0.25
Azoxystrobine		0.03	0.06	0.11
Chlordécone		1.06	1.35	0.92
Difénoconazole			0.02	0.02
Glyphosate	0.05		0.05	0.06
Imazalil		0.02	0.04	0.04
Imidaclopride				
Mésotrione		0.03		
Propiconazole			0.09	0.08
S-metolachlore		0.12		0.02
Thiabendazole		0.03	0.05	0.07
Triclopyr			0.02	

Ces 4 mélanges de pesticides ont été recréés en laboratoire afin d'y exposer les décapodes selon une méthodologie identique à celle utilisée en exposition simple (p. 11-12). Les organismes ont ainsi été exposés durant **7 et 21 jours**, afin d'évaluer les effets toxiques de chaque mélange, à court et moyen terme.

Afin d'éviter toutes confusions avec l'étude *in-situ* ci-après, qui comprend l'entièreté des contaminants de chaque stations (pesticides et autres pollutions), chaque mélange a été codifié :

M1 = Pont de Chaines

M2 = Grand Galion

M3 = Pont Belle-Ile

M4 = Pont Séraphin 2

Enfin, une **5^{ème} condition d'exposition en mélange (M5)** a été définie afin d'évaluer le « **worse case** » d'exposition en pesticide (Tableau 11). Il s'agit de l'ensemble des pesticides retrouvés dans la station Pont Séraphin 2. Cela inclut, outre les 13 pesticides étudiés, le 2-hydroxy atrazine, le méthanal, et la roténone. Concernant les métabolites du chlordécone (chlordécol et 5b-hydrochlordécone), il n'a pas été possible d'acheter la solution standard chez un quelconque fournisseur ; toutefois, la dégradation naturelle du chlordécone (ex. par action des UV, micro-organismes des fèces,...) dans le mélange initial, conduit à la présence de ces métabolites dans l'exposition.

Tableau 11. Composition en pesticides des 5 mélanges étudiés.

Pesticides (µg/L)	Pont de chaines (M1)	Grand Galion (M2)	Pont Belle Ile (M3)	Pont Séraphin 2 (M4)	Pont Séraphin 2 "worse case" (M5)
2,4-D		X		X	X
AMPA	X	X	X	X	X
Azoxystrobine		X	X	X	X
Chlordécone		X	X	X	X
Difénoconazole			X	X	X
Glyphosate	X		X	X	X
Imazalil		X	X	X	X
Imidaclopride					
Mésotrione		X			
Propiconazole			X	X	X
S-metolachlore		X		X	X
Thiabendazole		X	X	X	X
Triclopyr			X		
2-hydroxy atrazine					X
Chlordécol					X
Roténone					X

2. RESULTATS

a. Biomarqueur de neurotoxicité

Comme précédemment, les potentiels effets neurotoxiques des mélanges ont été évalués à travers la mesure de l'AchE (Figure 12).

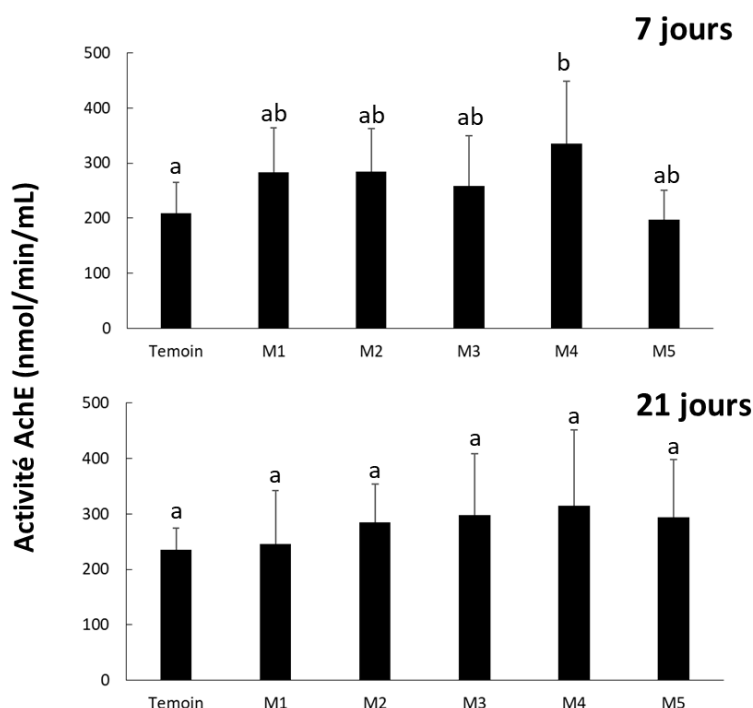


Figure 12: Activité AchE (nmol/min/mL) mesurées chez *Neocaridina* sp. exposées aux 5 mélanges de pesticides durant 7 et 21 jours. Les lettres différentes sur les histogrammes indiquent une différence significative.

En observant les résultats, il est mis en évidence que l'activité AchE a été légèrement impactée par l'exposition aux mélanges. En effet, après 7 jours d'exposition, seul le mélange M4 a causé une augmentation significative de l'activité, alors que 3 autres mélanges (M1, M2, et M4) ont provoqué d'une tendance à l'augmentation. En revanche, de manière surprenante, le mélange M5, dont la composition est relativement similaire à M4, n'a provoqué aucun changement ou seulement une légère diminution de l'activité AchE.

Des résultats semblables (i.e. notamment tendance à l'augmentation de l'activité pour M1, M2, M3 et M4) ont été mesurés après 21 jours d'exposition. Toutefois, l'effet significatif de M4 à 7 jours n'a pas été mesuré à 21 jours, suggérant une possible adaptation des organismes, comme observé pour de nombreux paramètres mesurés en exposition unique (voir 1^{ère} partie du rapport).

La tendance à l'augmentation de l'activité AchE après 7 jours d'exposition, et ce de manière similaire quel que soit le mélange d'exposition, pourrait ne pas être liée à la composition du milieu, mais simplement à la nécessité de réguler l'influx nerveux, du fait d'une agitation des décapodes dans leur nouveau milieu. En effet, ce nouveau milieu de vie provoquerait une augmentation de déplacements pour explorer le moindre recoin, conduisant à une activité AchE accrue, indépendamment des substances chimiques présentes dans l'eau. Cette hypothèse est d'ailleurs soutenue par la quasi absence de modification d'activité après un long temps d'exposition comme à 21 jours, en comparaison aux témoins.

b. Activités antioxydantes et antitoxiques

✓ Catalase (Cat)

L'activité catalase a montré très peu de variation après 7 jours d'exposition à chaque mélange, bien que la plupart eût tendance à provoquer une augmentation de l'activité de cette enzyme (Figure 13). Cette tendance à une activité plus importante lors des expositions démontre un stress oxydatif provoqué par les mélanges. Par ailleurs, ce stress oxydatif a pu être subi dès la première semaine d'exposition, et il s'agirait ici d'un retour à la normal (témoin), donc non significatif. Cependant, il est également possible que l'augmentation observée ici soit liée à un début de stress oxydatif, qui pourrait s'intensifier après 7 jours d'exposition.

Cette seconde hypothèse semble privilégiée du fait que l'activité catalase était fortement diminuée après 21 jours d'exposition, probablement à cause des effets délétères et toxique des mélanges sur le long terme. Par ailleurs, il est toutefois intéressant de constater que le mélange ayant le plus impacté l'activité catalase est M1 composé de glyphosate et AMPA. Cet effet résulte possiblement d'une interaction des deux composés car aucune de ces substances n'a causé de diminution d'activité catalase lors des expositions uniques. Cette observation pourrait également être la cause des diminutions observées lors des expositions M2 et M3, mais ces mélanges sont également composés de S-metolachlore et thiabendazole qui sont les deux composés ayant provoqués une inhibition de l'activité catalase après 21 jours en exposition unique.

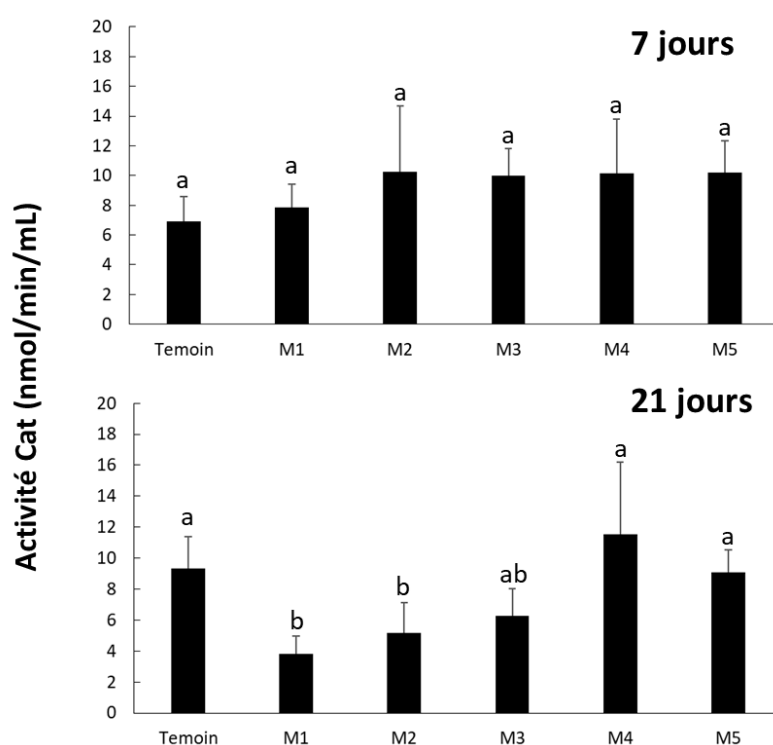


Figure 13. Activité Cat (nmol/min/mL) mesurées chez *Neocaridina sp.* exposées aux 5 mélanges de pesticides durant 7 et 21 jours. Les lettres différentes sur les histogrammes indiquent une différence significative.

✓ Glutathion peroxydases (GPx)

Très peu d'effets des pesticides avaient été mesurés lors des expositions uniques, bien qu'une tendance à l'augmentation avait été mise en évidence après 7 jours d'exposition. Cette augmentation d'activité était d'ailleurs significative lors de l'exposition à l'imazail seul (voir 1^{ère} partie), qui est présent dans les mélanges M3 et M4, ayant également causés des augmentations significatives de l'activité GPx.

Après 21 jours d'exposition, les activités GPx mesurées étaient légèrement supérieures à l'activité des témoins, à l'exception du mélange M5, comprenant un plus grand nombre de composés toxiques et qui a causé une augmentation significative de cette activité. L'absence d'effets significatifs des mélanges M3 et M4 pourraient de nouveau être la conséquence d'une adaptation des organismes à leur milieu. Toutefois, cela pourrait également être due à la mise en place d'autres défenses antitoxiques (non mesurées dans ce travail) qui ont permis aux décapodes de faire face à ces composés toxiques.

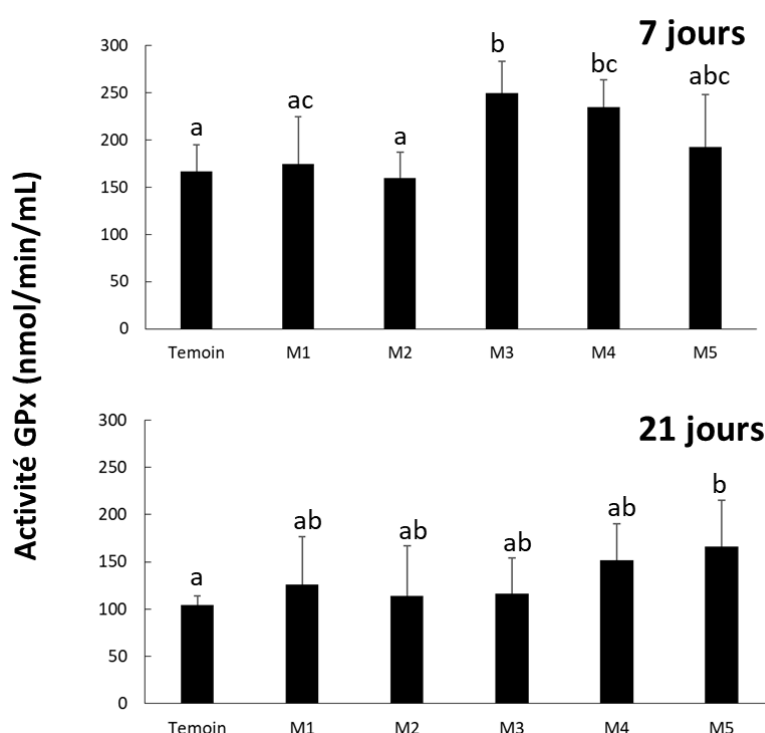


Figure 14. Activité GPx (nmol/min/mL) mesurées chez *Neocaridina sp.* exposées aux 5 mélanges de pesticides durant 7 et 21 jours. Les lettres différentes sur les histogrammes indiquent une différence significative.

✓ Glutathion-S-transférase (GST)

Comme indiqué précédemment, la GST intervient dans la défense antioxydante, mais également dans la biotransformation des composés exogènes. Pour rappel, lors d'exposition unique, un effet d'inhibition a majoritairement été observé après 7 jours, et aucun effet n'a été mesuré après 21 jours (Figure 14).

Concernant les expositions en mélange, les résultats ont été similaires, à savoir des effets d'inhibition après 7 jours et aucun effet après 21 jours. Le seul effet significatif a été mesuré après l'exposition à M5, qui est le mélange comprenant le plus de substances.

Les inhibitions mesurées après 7 jours d'exposition pourraient être la conséquence d'un effet toxique des mélanges, mais également être dues à un manque de glutathion réduit (GSH) qui est le substrat de la GST. En effet, du fait de son groupement thiol (-SH), le GSH peut également être directement utilisé par les organismes comme moyen de défense à part entière.

Par ailleurs, comme indiqué pour l'activité catalase, le résultat obtenu pour le mélange M1 laisse suggérer une interaction des composés glyphosate et AMPA, puisque de nouveau aucun effet n'avait été observé lors des expositions uniques.

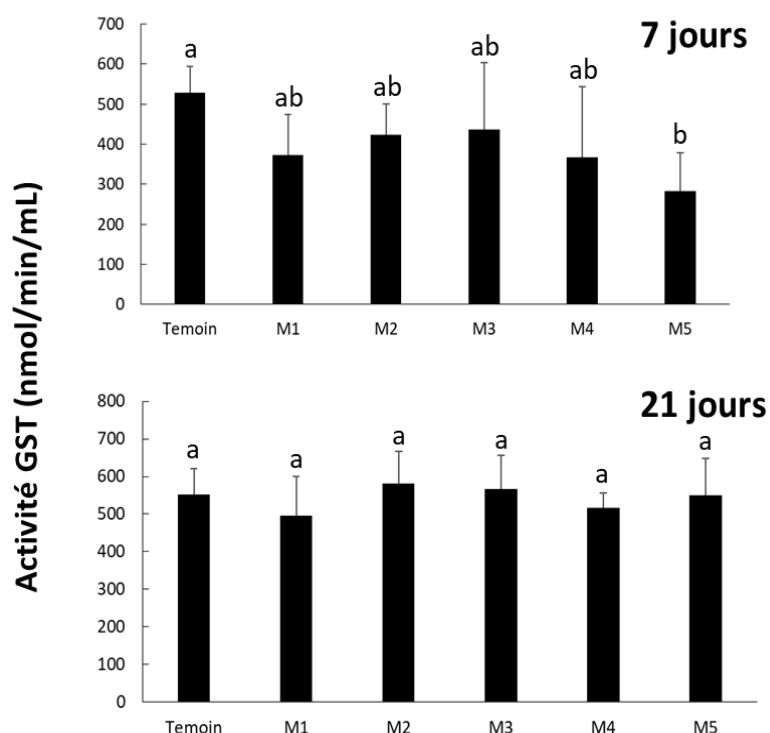


Figure 15. Activité GST (nmol/min/mL) mesurées chez *Neocaridina sp.* exposées aux 5 mélanges de pesticides durant 7 et 21 jours. Les lettres différentes sur les histogrammes indiquent une différence significative.

✓ Superoxyde dismutase (SOD)

L'activité SOD était l'activité la moins impactée lors des expositions uniques. Ce résultat a également été retrouvé lors des expositions de mélanges, car aucun effet significatif n'a été mesuré. En effet, quel que soit le mélange considéré et le temps d'exposition, l'activité SOD était similaire à celle mesurée chez les organismes témoins (Figure 16), suggérant l'absence de production d'anion superoxyde, toxique pour l'organisme.

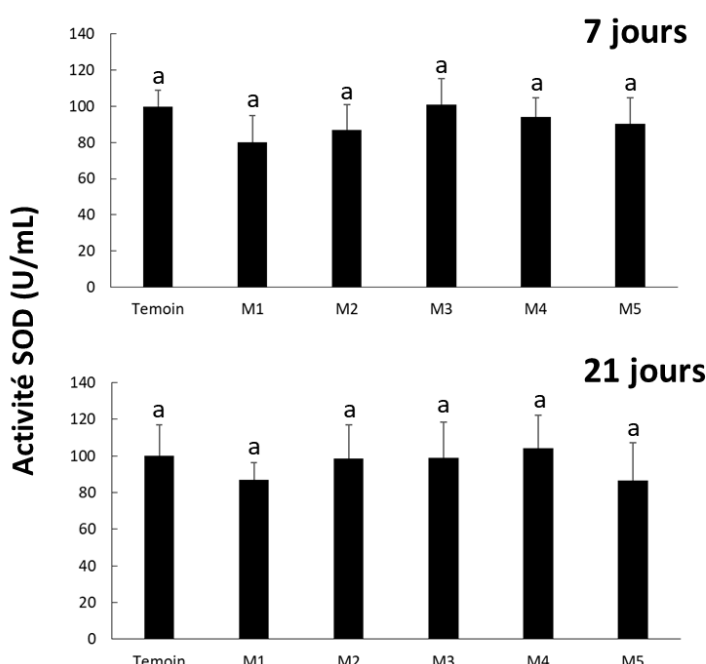


Figure 16. Activité SOD (U/mL) mesurées chez *Neocaridina* sp. exposées aux 5 mélanges de pesticides durant 7 et 21 jours. Les lettres différentes sur les histogrammes indiquent une différence significative.

c. Biomarqueur de cytotoxicité

Pour rappel, le malondialdéhyde est le produit final de la dégradation des lipides membranaires (lipoperoxydation). De ce fait, plus sa concentration sera élevée, plus l'effet toxique subi par l'organisme est important.

L'analyse de la concentration en MDA mesurée après 7 jours d'exposition aux différents mélanges a révélé des concentrations supérieures chez les décapodes exposés par rapport aux témoins, et ce, quel que soit le mélange considéré (Figure 17). Ces tendances à de plus fortes concentrations en MDA mettent en évidence une destruction des membranes cellulaires et donc une cytotoxicité. Toutefois, les analyses statistiques n'ont pas mis en évidence de différences significatives, à l'exception de l'exposition au mélange M4. De manière surprenante, le mélange M5 dont la composition est très proche de celle de M4, n'a pas conduit à une augmentation de la concentration en MDA. Ce résultat laisse à penser que les organismes ont mis en place une meilleure défense antitoxique lors de l'exposition à un mélange plus complexe (M5), ce qui a conduit à l'absence de destruction membranaire accrue.

Après 21 jours d'exposition, la concentration en MDA a continué à augmenter par rapport aux concentrations mesurées après 7 jours d'exposition, démontrant une toxicité continue (Figure 17). Cependant, il est important de noter qu'aucune différence significative ou tendance à l'augmentation n'a été mesurée chez les décapodes exposés par rapport aux témoins, à l'exception des décapodes exposés à M4. En effet, bien que les organismes aient réussi à s'adapter aux autres milieux d'exposition, les systèmes de défenses mis en place n'ont pas semblé suffisante pour faire face à la toxicité du mélange M4.

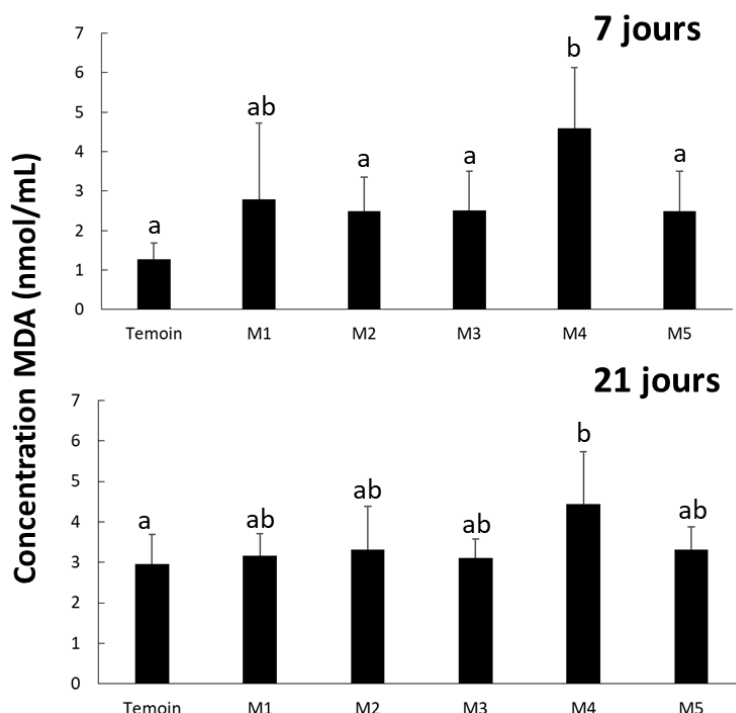


Figure 17. Concentration en MDA (nmol/mL) mesurées chez *Neocardina* sp. exposées aux 5 mélanges de pesticides durant 7 et 21 jours. Les lettres différentes sur les histogrammes indiquent une différence significative.

d. Effet de dérégulateur endocrinien

Les effets sur le système endocrinien ont été analysées par la mesure de la concentration en hormone 20-HE.

Après 7 jours d'exposition, l'ensemble des mélanges ont eu tendance à diminuer la concentration en 20-HE (diminution non-significative), à l'exception du mélange M3 qui a significativement augmenté la concentration de l'hormone (Figure 18). Ces résultats démontrent un possible ralentissement dans le processus de mue chez les décapodes exposés à la plupart des mélanges de pesticides. En revanche, une accélération de celle-ci semble être observée après exposition au mélange M3. Ce résultat pourrait être la conséquence de la présence de triclopyr dans le mélange M3 et non dans les autres mélanges. En effet, lors des expositions uniques, le triclopyr avait provoqué une augmentation de la concentration en 20-HE chez les décapodes. Cependant, cet effet avait été mesurée à 2 ng/L, alors que la concentration de ce pesticide dans le mélange était de 20 ng/L. De ce fait, l'autre hypothèse serait une interaction du triclopyr avec une autre substance présente dans le mélange.

Après 21 jours d'exposition, aucune différence significative n'a été mesuré entre les témoins et les organismes exposés aux mélanges M1, M2 et M5. En revanche, les décapodes des mélanges M3 avaient toujours tendance à avoir une concentration en 20-HE supérieure à celle des témoins. Il est possible que ces organismes aient mué entre le 7^{ème} et le 21^{ème} jour d'exposition. Cependant, il n'a pas été possible de vérifier cette hypothèse car les décapodes ont tendance à réingérer leur ancienne mue, source de calcium. Par ailleurs, l'exposition au mélange M4 a causé une augmentation de la concentration 20-HE, suggérant que sur le long terme, ce mélange, qui également celui comprenant le plus de molécules (excepté M5) conduirait à une accélération du processus de mue des décapodes.

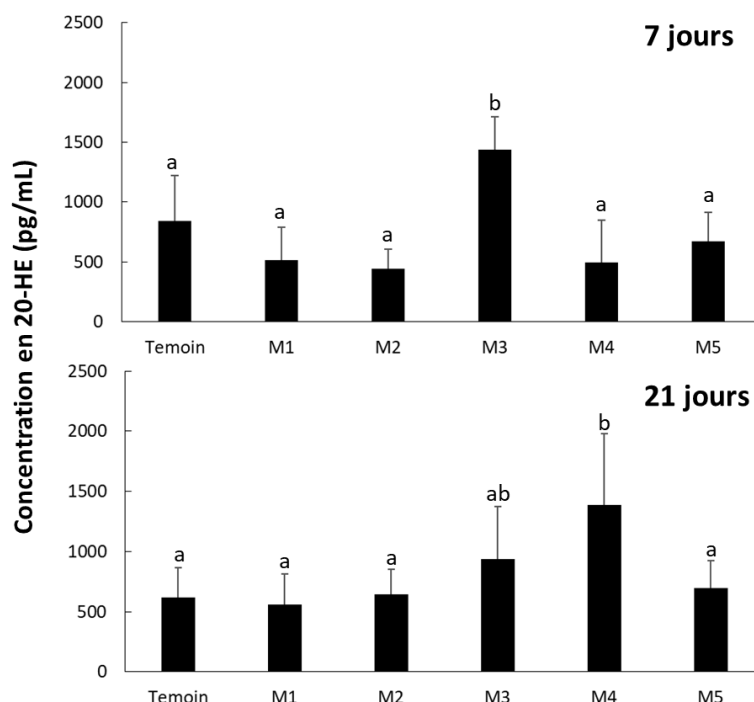


Figure 18. Concentration en 20-HE (pg/mL) mesurées chez *Neocardina* sp. exposées aux 5 mélanges de pesticides durant 7 et 21 jours. Les lettres différentes sur les histogrammes indiquent une différence significative.

e. Integrated Biomarker Responses (IBR)

Afin de compiler l'ensemble des variations de biomarqueur et rendre plus facile la comparaison des effets toxiques des mélanges, les résultats ont été combinés dans l'indice IBR (Figure 19).

Les résultats ont mis en évidence qu'après 7 jours d'exposition, le mélange M4 avait une valeur IBR plus élevée que les autres mélanges, traduisant ainsi qu'il s'agit du mélange causant le plus de modification physiologique chez les décapodes. En effet, les mélanges M1, M2, M3 et M5, bien qu'ayant des compositions différentes en pesticides, aboutissaient à un effet globalement similaire sur les organismes.

Après 21 jours d'exposition, de manière générale, les valeurs IBR étaient inférieures à celles calculées après 7 jours d'exposition, et ce, pour chaque mélange, démontrant une adaptation des décapodes aux milieux toxiques (i.e. mise en place de défense antitoxique, ...). Toutefois, il a été observé que le mélange M4 restait celui qui a causé le plus de modifications physiologiques chez les décapodes, et que les organismes ont eu tendance à plus facilement s'adapter aux milieux M2 et M3.

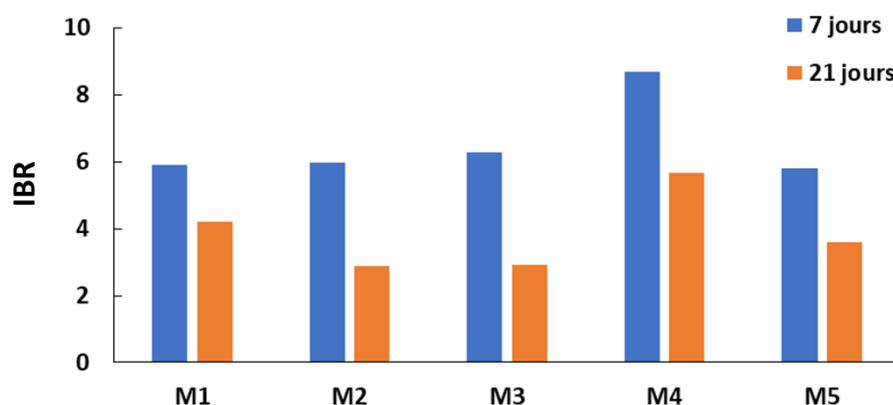


Figure 19. Valeurs IBR de chaque mélange après 7 et 21 jours d'exposition

3. BILAN DES EXPOSITIONS EN MELANGES

Cette partie de l'étude visait à évaluer les effets toxiques de mélange de pesticide reproduit en laboratoire et mimant les mélanges retrouvés dans 4 rivières martiniquaises, à savoir : **Pont de Chaines (M1)**, **Grand Galion (M2)**, **Pont Belle-Ile (M3)**, **Pont Séraphin 2 (M4)** et **M5** reprenant l'entièreté des substances mesurées à Pont Séraphin 2 et que l'on appellera « **worse case** ».

Il ressort de cette analyse que l'ensemble des mélanges étudiés dans cette partie du travail ont conduit à des effets toxiques sur les organismes, quel que soit la composition du mélange et sans tenir compte du temps d'exposition. **L'effet principal causé par l'ensemble des mélanges est un effet de stress oxydatif** (Tableau 12). En effet, indépendamment du temps d'exposition, tous les mélanges ont provoqué un stress oxydatif, probablement par la formation d'espèces réactives de l'oxygène, qui peuvent être délétère pour les organismes si elles ne sont pas prises en charge par les défenses antitoxiques.

Tableau 12. Résumé des effets toxiques provoqués par chaque mélange indépendamment du temps d'exposition.

	Neurotoxicité	Stress oxydatif	Cytotoxicité	Dérégulation endocrinienne
M1		✓		
M2		✓		
M3		✓		✓
M4	✓	✓	✓	✓
M5		✓		

En regardant le détail des effets mesurés, il apparaît que **le mélange M4 semblerait être le plus toxique** pour les décapodes car c'est le seul mélange à avoir provoqué des **effets cytotoxiques à 7 et 21 jours d'exposition** (Tableau 12). Pour rappel, ces effets témoignent d'une destruction des membranes cellulaires et sont donc des effets irréversibles pour les organismes. Cependant, de manière surprenante, le mélange M5 qui contient les mêmes substances que le mélange M4 ainsi que le 2-hydroxy atrazine, le méthanal et la roténone n'a pas causé les mêmes effets toxiques. Au contraire, celui-ci n'a provoqué qu'un léger stress oxydatif. Cette différence de toxicité pourrait s'expliquer par une possible interaction d'au moins une des 3 substances supplémentaire avec au moins un des pesticides du mélange. De manière moins surprenante, **les mélanges M1 et M2**, contenant le moins de molécules, **ont provoqué le moins d'effets toxiques** (Tableaux 11 et 12).

Tableau 13. Récapitulatif des réponses de chaque biomarqueur en fonction du mélange et du temps d'exposition. Le '+' représente une augmentation significative par rapport à la condition témoin et le '-' une diminution significative par rapport à la condition témoin.

	Neurotoxique AchE		Cat		Stress oxydatif				SOD		Cytotoxique MDA		Dérégulateur endocrinien 20-HE	
	7j	21j	7j	21j	GPx	GPx	GST	GST	7j	21j	7j	21j	7j	21j
					7j	21j	7j	21j						
M1				-										
M2				-										
M3					+								+	
M4	+				+						+	+		+
M5						+	-							

En résumé, au regard des résultats obtenus dans cette étude, la classification des mélanges du moins toxique au plus toxiques serait : **M1 = M2 < M3 < M5 < M4**, ce qui reviendrait à dire que le site de **Pont de Chaines (M1)** aurait une toxicité similaire au site du **Grand Galion (M2)** qui seraient tous deux moins toxique que le site **Pont Belle-Ile (M3)**. En revanche, le site de **Pont Séraphin 2 (M4 et M5)** serait quant à lui le plus toxique des 4 sites. Cependant, il est prématuré d'établir une telle conclusion car l'ensemble des rivières n'est pas uniquement contaminé par les pesticides étudiés dans ce travail, mais peuvent contenir de nombreuses autres substances susceptibles d'interagir à leur tour avec les pesticides. Seule une étude *in-situ* permettrait de comparer la toxicité de divers sites.

EXPERIMENTATION *IN-SITU*

—

EVALUATION DE LA TOXICITE DE 6 RIVIERES DE MARTINIQUE

1. METHODOLOGIE

Cette dernière partie de l'étude a été dédiée à l'évaluation de la toxicité de différentes rivières martiniquaises sur des décapodes prélevés directement sur les sites. Par ailleurs, ces analyses ont également permis d'approfondir les résultats obtenus lors des expositions en mélange en laboratoire. En effet, les analyses *in-situ* ont permis de tenir compte de l'ensemble de la contamination du site (pesticides, HAPs, métaux, ...) et ainsi définir la « réelle » toxicité des mélanges de pesticides étudiés en laboratoire.

Pour cela, les différents sites ont été choisis selon plusieurs critères repris dans le tableau 14. En plus de 4 sites contaminés, deux sites témoins ont été choisis du fait de l'absence de molécules des pesticides mesurées lors du suivi pesticide réalisé par l'ODE (Rapport ODE, 2019). Les 6 sites sélectionnés étaient donc : **Pont de Chaines**, **Grand Galion**, **Pont Belle-Ile** et **Pont Séraphin 2** (sites contaminés), ainsi que **Palourde Lézarde** et **Fond Baise** (sites témoins) (Tableau 14).

Tableau 14. Critères utilisés pour le choix des différents sites étudiés

Stations	Nb molécules pesticides totaux (en 2019)	Concentration moyenne en pesticides totaux (en 2019)	Nb molécules pesticides autorisés (en 2019)	Concentration moyenne en pesticides autorisés (en 2019)	Concentration moyenne en glyphosate (en 2019)	Concentration moyenne en AMPA (en 2019)	Chlordécone présente
Fond Baise	0	ND	0	ND	ND	ND	Non
Palourde Lézarde	0	ND	0	ND	ND	ND	Non
Pont de chaines	3	0.006 µg/L	2	0.01 µg/L	0.04 µg/L	0.75 µg/L	Non
Grand Galion	14	0.011 µg/L	9	0.006 µg/L	0.005 µg/L	0.05 µg/L	Oui
Pont Séraphin 2	15	0.028 µg/L	9	0.02 µg/L	0.025 µg/L	0.25 µg/L	Oui
Pont Belle-île	11	0.018 µg/L	10	0.005 µg/L	0.025 µg/L	0.15 µg/L	Oui

L'ensemble des 6 sites sélectionnés ont été échantillonnés entre le 3 et 10 novembre 2021. Pour chacun des sites, **6 individus de la famille des Atyidae ont été prélevés, congelés puis expédiés au laboratoire de l'Université de Liège**, en vue de réaliser les analyses de biomarqueurs comme décrites dans les précédentes parties.

2. RESULTATS

a. Biomarqueur de neurotoxicité

L'analyse de l'activité AchE a montré que les sites faiblement contaminés en pesticides, tels que Pont de Chaines, Pont Belle-Ile et moyennement contaminés comme Grand Galion, avaient tendance à causer une diminution de l'activité AchE par rapport aux deux sites témoins, Fond Baise et Palourde Lézarde (Figure 20). Par ailleurs, le site de Pont Séraphin 2, qui est le site le plus contaminé en termes de nombres de molécules de pesticides et de concentrations, a provoqué une inhibition significative de l'activité AchE, par rapport aux sites témoins. **Bien que les résultats mesurés sur Pont de Chaines, Grand Galion et Pont Belle-Ile soient relativement similaire à celui obtenu dans les mélanges M1, M2 et M3 ; le résultat obtenu pour Pont Séraphin 2 est différent que le mélange M5.** En effet, le mélange étudié en laboratoire n'a pas montré d'effet majeur sur l'activité Aches, à l'inverse de l'étude *in-situ*. Ce résultat suggérait que les pesticides étudiés n'affecteraient pas l'activité AchE, cependant, lors de l'analyse de ce biomarqueur sur des organismes provenant directement du milieu correspondant, l'activité se trouvait être inhibée. Cette

inhibition pourrait être expliquée par une **interaction d'un ou des pesticide(s) avec une autre molécule présente dans ce milieu contaminé** (HAP, métaux,...) qui n'était pas présente dans le mélange M5. Cependant, il n'est pas à exclure que **l'inhibition mesurée soit liée à l'action d'une (ou d') autre(s) substance(s) polluante(s)** puisqu'il a également été démontré que l'exposition à des molécules telles que les hydrocarbures (HAPs) ou encore des métaux lourds pouvaient conduire à l'inhibition de l'activité AchE.

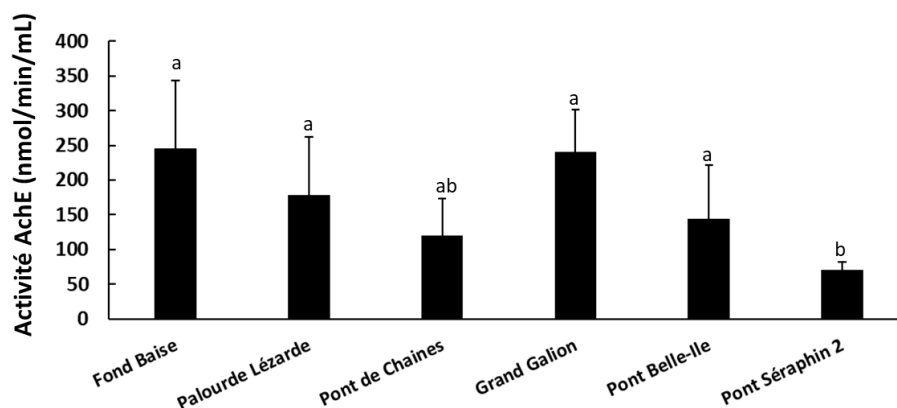


Figure 20. Activité AchE (nmol/min/mL) mesurées chez des décapodes *Atyidae* prélevés dans les 6 sites martiniquais étudiés. Les lettres différentes sur les histogrammes indiquent une différence significative.

b. Activités antioxydantes et antitoxiques

✓ Catalase

La catalase est une enzyme majeure dans les systèmes de défenses antioxydantes. Les résultats obtenus au cours de l'étude *in-situ* ont mis en évidence une tendance à l'inhibition de l'activité catalase pour les sites de Pont de Chaines, Grand Galion et Pont Belle-Ile, ce qui semble être en adéquation avec les résultats obtenus en laboratoire après 21 jours d'exposition (Figure 21). La similarité des résultats laisse suggérer que les mélanges de pesticides de ces différents sites induisent bien une toxicité conduisant à l'inhibition de l'activité catalase. Cette inhibition pourrait avoir pour conséquence une défense antioxydante moins efficace et par conséquent une plus grande vulnérabilité des organismes si un stress supplémentaire devait survenir.

En revanche, une diminution significative a été mesurée pour le site Pont Séraphin 2 lors de l'étude *in-situ*, alors qu'une différence significative n'avait été observée en laboratoire (Figure 21). Tout comme les hypothèses émises lors de l'analyse des effets neurotoxiques, cette observation *in-situ* suggèrent une interaction entre les substances de ce milieu, conduisant probablement à une toxicité plus importante que celle mesurée en laboratoire. Cela pourrait par exemple être la conséquence d'une plus forte destruction des membranes cellulaires, causant ainsi une diminution de la concentration en catalase efficace pour la défense.

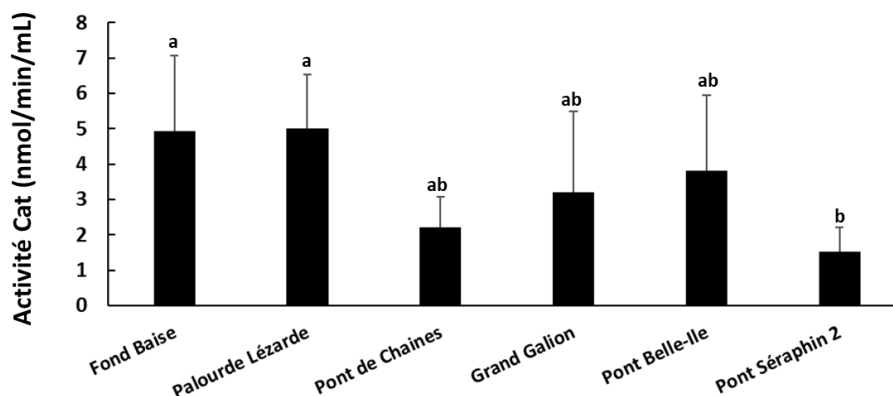


Figure 21. Activité Cat (nmol/min/mL) mesurées chez des décapodes *Atyidae* prélevés dans les 6 sites martiniquais étudiés. Les lettres différentes sur les histogrammes indiquent une différence significative.

✓ Glutathion peroxydases (GPx)

L'activité GPx a été significativement augmentée dans l'ensemble des quatre sites contaminés en comparaison aux sites témoins (Figure 22). De plus, aucune différence significative n'a été observée entre les sites contaminés, suggérant un effet toxique similaire quelle que soit la composition en pesticide. Les résultats obtenus *in-situ* sont relativement similaires à ceux mesurés lors des mélanges. En effet, les mélanges reproduits au laboratoire ont provoqué une tendance à l'augmentation (non-significative) de l'activité GPx chez les décapodes exposés.

Les glutathion peroxydases sont en charge de la détoxification des hydroperoxydes ($R\text{-OOH}$) et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ce dernier étant également pris en charge par la catalase, l'absence d'augmentation de l'activité catalase suggère que l'exposition *in-situ* n'a pas provoqué de formation de peroxyde d'hydrogène (qui est une espèce réactive de l'oxygène toxique pour l'organisme). Par conséquent, l'augmentation de l'activité GPx semblerait être due à la formation de ces composés toxiques que les GST prendraient en charge.

Les résultats mettent également en avant que le site Pont de Chaines était celui qui a causé la plus grande augmentation d'activité GPx, bien que non-significativement différent des autres sites contaminés. Cet effet pourrait être expliqué par la présence de glyphosate et/ou d'AMPA, qui sont les seules molécules pesticides retrouvées à Pont de Chaines. Cette hypothèse est d'autant plus corroborée par le fait que les expositions uniques au glyphosate et à l'AMPA avaient tous deux causé une légère augmentation de l'activité GPx (non-significatif) après 7 et 21 jours d'exposition.

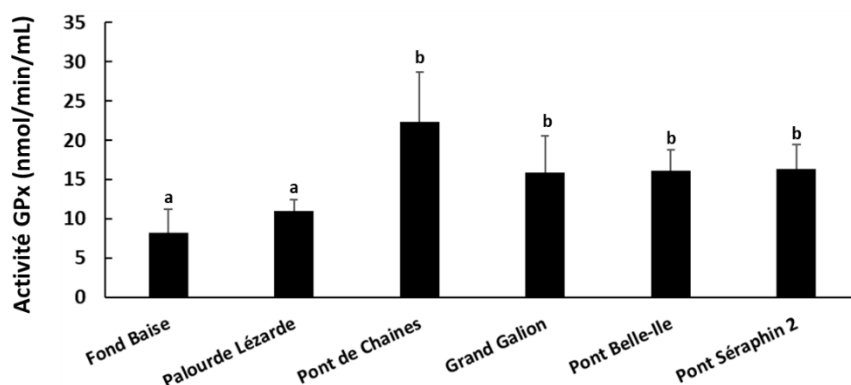


Figure 22. Activité GPx (nmol/min/mL) mesurées chez des décapodes *Atyidae* prélevés dans les 6 sites martiniquais étudiés. Les lettres différentes sur les histogrammes indiquent une différence significative.

✓ Glutathion-S-transférase (GST)

Les résultats de la mesure de l'activité GST ont mis en évidence que celle-ci était très peu impactée selon le site de contamination (Figure 23). En effet, l'activité GST n'a pas été significativement impactée, quel que soit le site de prélèvement.

Ce résultat reste néanmoins surprenant car les GST représentent un système de détoxification efficace pour faire face à des composés exogènes. Toutefois, il est en accord avec ceux obtenus lors de l'étude en laboratoire des mélanges, qui sur le long terme (21 jours) n'ont pas démontré d'effets sur l'activité GST. De même, l'activité GST n'a que très peu été impactée lors des expositions uniques. L'ensemble de ces résultats laissent donc supposer que les pesticides étudiés n'ont que très peu d'effet sur ce système de détoxification, mais également qu'il est possible que les organismes aient mis en place un autre système de défense (ex. système des thiorédoxine, multixebiotic resistance pump) leur permettant de lutter contre ce milieu contaminé.

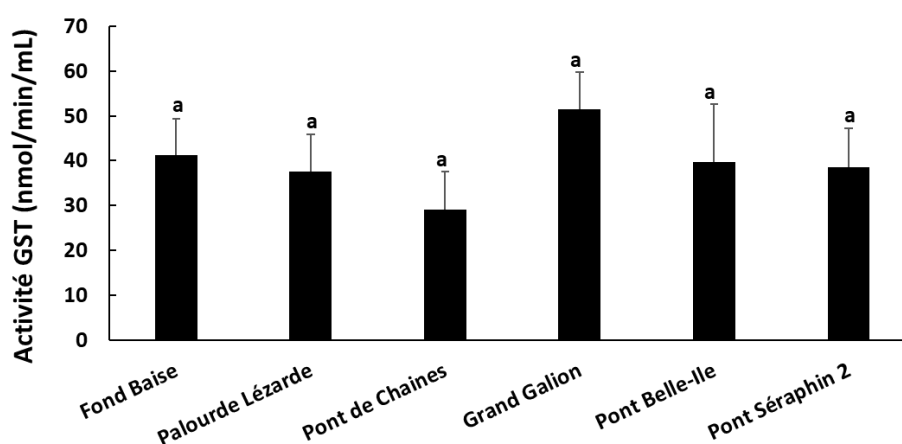


Figure 23. Activité GST (nmol/min/mL) mesurées chez des décapodes *Atyidae* prélevés dans les 6 sites martiniquais étudiés. Les lettres différentes sur les histogrammes indiquent une différence significative.

✓ Superoxyde dismutase (SOD)

Contrairement à ce qu'il a été observé lors des expositions uniques et en mélanges, l'activité SOD mesurée dans les 4 sites contaminés était significativement supérieure aux témoins (Figure 24), attestant d'une formation d'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) qui est détoxiqué par la SOD pour donner du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

Cette conclusion est renforcée par l'activité GPx qui était également augmenté dans l'ensemble des sites contaminés. Pour rappel, les GPx sont les enzymes permettant la prise en charge des peroxydes (dont le H_2O_2) afin d'en réduire leur toxicité.

Ainsi, l'exposition des décapodes à ces différents milieux a provoqué la formation de l'espèce réactive de l'oxygène, anion superoxyde, qui a été pris en charge la SOD pour former le H_2O_2 , lui-même détoxiqué par les GPx.

Toutefois, l'absence de modification de l'activité SOD durant les expositions uniques et en mélanges laissent penser qu'aucun des pesticides étudiés n'est responsable de cette formation d'espèce réactive de l'oxygène, que ce soit seul ou en interaction entre eux. Il s'agirait donc plus probablement d'une interaction entre l'un (ou des) pesticides étudiés et d'autres polluants présents dans le milieu, ou plus « simplement » de l'effet unique d'autres molécules (ex. métaux lourds, HAPs, PCBs,...).

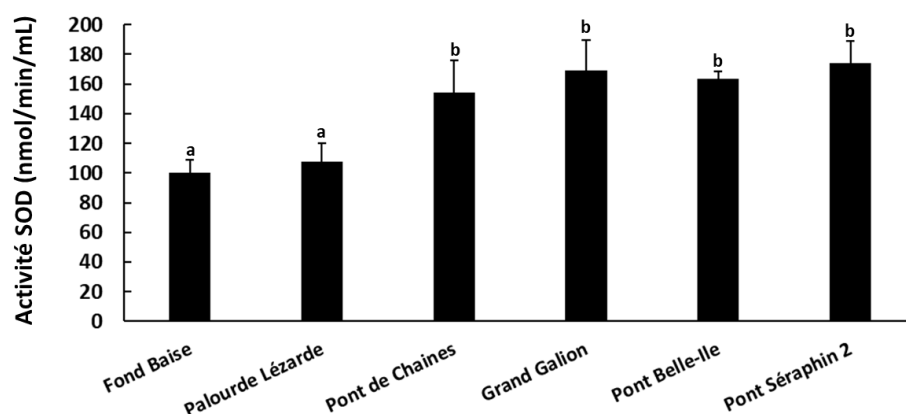


Figure 24. Activité SOD (nmol/min/mL) mesurées chez des décapodes *Atyidae* prélevés dans les 6 sites martiniquais étudiés. Les lettres différentes sur les histogrammes indiquent une différence significative.

c. Biomarqueur de cytotoxicité

L'analyse des concentrations en MDA chez les individus prélevés dans chacun des cours d'eau a révélé aucune différence significative entre les deux sites témoins (Fond Baise et Palourde Lézarde) (Figure 25). En revanche, les organismes prélevés sur les 4 sites contaminés présentaient des concentrations en MDA significativement supérieures à ceux des sites témoins. Par ailleurs, il apparaît des analyses que les concentrations en MDA augmentaient en fonction de la contamination du milieu. En effet, plus le milieu était contaminé, plus la concentration en MDA mesurée était élevée.

Cette augmentation traduit donc une destruction des membranes cellulaires plus importante dans une rivière contaminée que dans une rivière dites « témoins ». De plus, cette destruction semble proportionnelle à la contamination du milieu, puisque le site Pont Séraphin 2, qui est le site le plus contaminé, et également le celui où les concentrations de MDA sont les plus élevées.

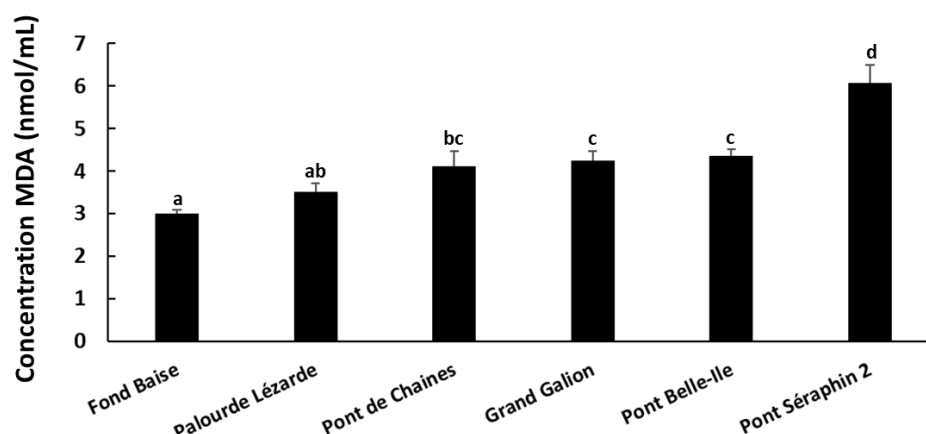


Figure 25. Concentration en MDA (nmol/mL) mesurées chez des décapodes *Atyidae* prélevés dans les 6 sites martiniquais étudiés. Les lettres différentes sur les histogrammes indiquent une différence significative.

d. Effet de dérégulateur endocrinien

La dérégulation endocrinienne a été évaluée par la mesure de la concentration en 20-HE (Figure 26).

Les résultats ont montré qu'aucune différence significative n'était observée entre les sites contaminés et les sites témoins, à l'exception du site du Grand Galion, où la concentration en 20-HE était significativement supérieure à l'ensemble des sites étudiés.

Ce résultat traduit l'absence de perturbation de la concentration hormonale, et donc probablement l'absence de dérégulation endocrinienne dans les différents sites.

Toutefois, cette absence de variation des concentrations en 20-HE ne concorde pas avec les résultats obtenus en laboratoire lors de la reproduction des conditions de terrains. En effet, il avait été observé une augmentation de la concentration en 20-HE dans le mélange 3, correspondant aux conditions recréées pour le site du Pont Belle-Ile, alors qu'aucune augmentation n'a été observée sur le terrain. De plus, le résultat inverse a été observé pour Grand Galion, avec une augmentation en 20-HE sur le terrain, mais aucune augmentation dans la condition recréée en laboratoire.

Ce résultat suggère donc de possibles interactions de molécules sur le terrain n'ont prises en compte en laboratoire, c'est-à-dire des interactions avec d'autres molécules que les pesticides étudiés (ex. PCB, HAP, métaux, ...). Cependant, il faut également garder en mémoire que les organismes utilisés lors des expositions de terrains étaient des organismes « calibrés » c'est-à-dire de même sexe, de même taille et venant d'un élevage en aquariophilie. Dans le cas du travail de terrain, il n'a pas été possible de vérifier le stade de mue des individus prélevés, ce qui a probablement induit à biais dans les analyses et les conclusions qui en découlent pour ce paramètre.

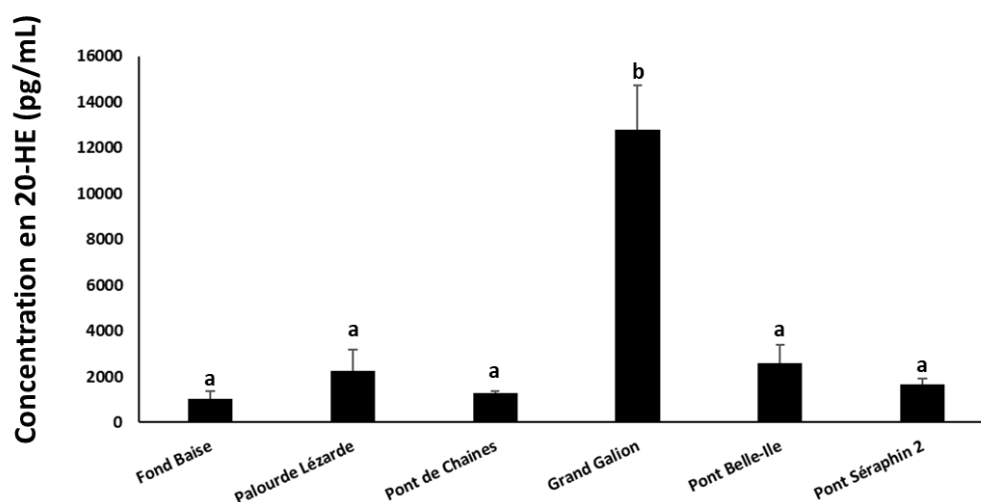


Figure 26. Concentration en 20-HE (pg/mL) mesurées chez des décapodes Atyidae prélevés dans les 6 sites martiniquais étudiés. Les lettres différentes sur les histogrammes indiquent une différence significative.

e. Integrated Biomarker Responses (IBR)

Comme pour les autres expérimentations, l'indice IBR a été calculé afin d'intégrer les résultats obtenus des biomarqueurs. Afin de permettre une comparaison des valeurs IBR calculées pour chaque site, il a été choisi de fixer le site « Fond Baise » comme seul témoin (Tableau 27), d'où l'absence de valeur IBR sur le graphique, car celle-ci est égale à 0.

Les résultats d'IBR montrent que bien que le site Palourde Lézarde soit également exempt de contamination en pesticides, la valeurs IBR supérieure à zéro, démontre que les organismes n'ont pas réagit de la même manière que ceux provenant de Fond Baise. Ce résultat peut découler de nombreux autres paramètres, telle qu'une variation de la température entre les deux sites, ou encore de physico-chimie (pH, conductivité, ...).

Par ailleurs, les quatre sites étudiés ont tous obtenus des valeurs IBR bien plus élevées que Fond Baise et Palourde Lézarde, démontrant bien une modification de la physiologie des organismes prélevés. Il apparaît que les sites Pont-de-Chaines et grand Galion, bien qu'ayant des contaminations différentes, présentaient une toxicité globale similaire. Le site Pont Belle-Ile semblait être celui des 4 contaminés présentaient les plus faibles modifications physiologiques car la valeur BR étaient inférieures aux valeurs des 3 autres sites contaminés.

Enfin, le site Pont Séraphin 2, qui est le site le plus contaminé, a été celui provoquant les plus fortes variations de physiologie des individus, puisque sa valeur IBR étaient bien supérieure à l'ensemble des autres sites.

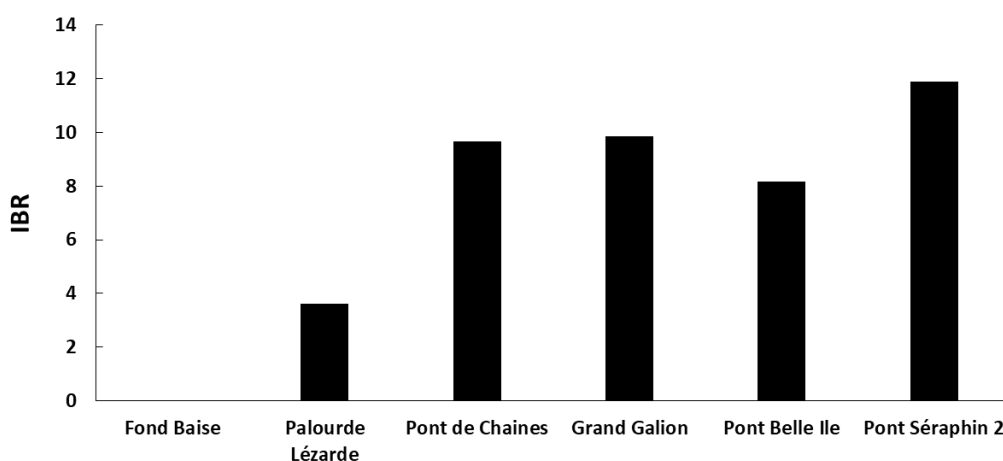


Figure 27. Valeur IBR calculée pour chacun des 6 sites martiniquais étudiés.

3. BILAN DES EXPERIMENTATIONS IN-SITU

Cette dernière partie de l'étude visait à évaluer les effets toxiques subits par les organismes prélevés directement dans 6 rivières martiniquaises, choisies selon un gradient de contamination en pesticides, à savoir : **Fond Baise** et **Palourde Lézarde** (témoins), **Pont de Chaines**, **Grand Galion**, **Pont Belle-Ile**, et **Pont Séraphin 2**.

Les résultats ont mis en avant que **le site causant le plus de modifications physiologiques sur les organismes était Pont Séraphin 2**, qui est également le site présentant la plus forte contamination et le plus grand nombre de molécules pesticides retrouvées. Celui-ci est suivi par le site du Grand Galion, où de nombreuses molécules pesticides ont également été retrouvées. En revanche, de manière surprenante, le site de Pont de Chaines qui est le site ayant le moins de molécules pesticides mesurées, a provoqué une modification physiologique similaire à Grand Galion (IBR égaux entre ces deux sites). Ce résultat peut être expliqué par la présence d'autres polluants tels que des métaux ou polluants organiques, qui accentueraient les effets subits par les organismes. Cette hypothèse est corroborée par la comparaison des valeurs IBR obtenus en laboratoire lors de l'expérimentation en mélanges et ceux obtenus dans l'expérience *in-situ*. En effet, les IBR *in-situ* sont tous supérieurs aux IBR obtenus lors des expositions en mélanges de pesticides, suggérant ainsi des effets plus marqués chez les organismes prélevés directement sur le terrain (Tableau 15). Du fait que l'expérience en laboratoire ne se focalisait que sur les mélanges de molécules pesticides pour recréer les conditions de terrain, il apparaît donc que l'hypothèse la plus probable pour expliquer les valeurs IBR *in-situ* supérieures, serait donc l'implication d'autres molécules toxiques. Les indices IBR plus importants lors de l'étude *in-situ* pourraient également être la cause d'une exposition plus longue des organismes aux contaminants. En effet, l'âge des organismes de cette partie de l'étude n'a pas été mesurable (ou calibré), à l'inverse des expérimentations en laboratoire, où les organismes provenaient d'élevage et donc où il a été possible de calibrer le sexe et l'âge. Une hypothèse serait donc qu'une exposition plus longue des organismes aux contaminants (exposition supérieure à 21 jours si l'on fait un parallèle aux expérimentations de laboratoire) aboutiraient à des modifications physiologiques plus importantes, et par conséquent des valeurs IBR plus élevées.

Tableau 15. Comparaison des valeurs IBR obtenues en exposition de mélange en laboratoire et *in-situ*.

	IBR		Terrain	
	7 jours	21 jours		
M1	5.9	4.2	9.7	Pont de Chaines
M2	6.0	2.9	9.9	Grand Galion
M3	6.3	2.9	8.2	Pont Belle Ile
M4	8.7	5.7	11.9	Pont Séraphin 2
M5	5.8	3.6	11.9	Pont Séraphin 2

En regardant le détail des résultats obtenus, les effets que l'on retrouve le plus souvent dans les sites étudiés étaient le stress oxydatif et une cytotoxicité (Tableau 16). En revanche, seul le site du Grand Galion a provoqué un changement dans le système endocrinien des crustacés, alors que Pont Séraphin 2 était le seul site provoquant une modification de l'influx nerveux, donc du système nerveux. Ces observations n'étaient toutefois pas mises en évidence lors des expositions en mélanges en laboratoire, accentuant de nouveau l'hypothèse d'interaction des molécules pesticides étudiées, avec d'autres molécules présentes dans le milieu naturel. De même, l'effet de destruction membranaire n'avait été observé que pour le mélange 4, correspondant

au Pont Séraphin 2, alors que celui-ci apparaît sur l'ensemble des sites contaminés et étudiés *in-situ*.

Tableau 16. Récapitulatif des effets significatifs mesurés pour chaque biomarqueur en fonction du site d'étudié.

	Neurotoxicité	Stress oxydatif	Cytotoxicité	Dérégulation endocrinienne
Fond Baise				
Palourde Lézarde				
Pont de Chaines		✓	✓	
Grand Galion		✓	✓	✓
Pont Belle-Ile		✓	✓	
Pont Séraphin 2	✓	✓	✓	

En conclusion de cette partie « expérimentation *in-situ* », les résultats mettent en évidence qu'il est difficile d'évaluer les effets toxiques de mélange de contaminants en laboratoire et que des expérimentations directement sur le terrain sont nécessaires afin de permettre de se rapprocher au plus juste de la réalité des effets subits par les organismes. Il apparaît également qu'il est incorrect d'évaluer ou estimer la toxicité d'un cours d'eau sur seul base du nombre de molécules présentes dans le milieu.

CONCLUSION

Cette étude, divisée en 3 volets, avait pour objectif d'évaluer les effets toxiques de 13 pesticides autorisés et utilisés sur les cultures de Martinique, et dont la présence a été mesurée dans les rivières martiniquaises, causant ainsi un risque pour la santé des écosystèmes, et la biodiversité.

Dans un premier temps, l'étude a évalué les effets sublétaux de 13 pesticides sur un décapode d'eau douce, lors d'exposition simple en laboratoire. Les résultats obtenus ont démontré que **l'ensemble des pesticides provoquait des effets néfastes sur les décapodes**. En effet, la réponse des biomarqueurs sélectionnés pour étudier divers effets toxiques (cytotoxicité, neurotoxicité, stress oxydatif,...), était modifiée par rapport à la condition témoin. Cependant, il est intéressant de noter que tous les pesticides n'ont pas causé l'ensemble des effets toxiques analysés. En effet, les effets majeurs provoqués par la plupart des pesticides étaient **un stress oxydatif (11 pesticides sur 13) et une dérégulation endocrinienne (10 pesticides sur 13), alors que la cytotoxicité et la neurotoxicité étaient les effets les moins mesurés (respectivement 7 et 5 pesticides sur 13)**.

Dans une seconde partie, afin de mieux évaluer la toxicité de ces composés, des mélanges de pesticides, retrouvés dans 4 rivières martiniquaises, à savoir : **Pont de Chaines (M1), Grand Galion (M2), Pont Belle-Ile (M3), Pont Séraphin 2 (M4) et M5** reprenant l'entièreté des substances mesurées à Pont Séraphin 2, ont été recréés en laboratoire pour étudier la toxicité des mélanges.

Ce volet a permis de démontrer que tous les mélanges testés ont conduit à des effets toxiques sur les organismes, quelle que soit la composition du mélange et sans tenir compte du temps d'exposition. **L'effet principal causé par l'ensemble des mélanges est un effet de stress oxydatif**, tout comme cela a également été observé lors des expositions simples. **Le mélange M4 semblerait être le plus toxique** pour les décapodes car c'est le seul mélange à avoir provoqué des **effets cytotoxiques à 7 et 21 jours d'exposition**. Le calcul de l'indice IBR a permis de définir une hiérarchie dans la toxicité des mélanges qui est : **M1 = M2 < M3 < M5 < M4**. Ceci reviendrait donc à dire que le site de **Pont de Chaines (M1)** aurait une toxicité similaire au site du **Grand Galion (M2)** qui seraient tous deux moins toxiques que le site **Pont Belle-Ile (M3)**. En revanche, le site de **Pont Séraphin 2 (M4 et M5)** serait quant à lui le plus toxique des 4 sites.

Enfin, une dernière étude a été réalisée *in-situ*, en condition réelle, afin de mieux appréhender les effets toxiques subits par les organismes, mais également pour comparer les résultats obtenus en laboratoire. Pour cela, des décapodes ont été prélevés dans chacune des 4 rivières, ainsi que deux rivières témoins (non contaminées). Les résultats ont mis en avant que **le site causant le plus de modifications physiologiques sur les organismes était Pont Séraphin 2**, qui est également le site présentant la plus forte contamination et le plus grand nombre de molécules pesticides retrouvées. Ce résultat est en adéquation avec les résultats obtenus en laboratoire, puisque le mélange correspondant à la contamination de Pont Séraphin 2 était également le mélange provoquant le plus d'effets toxiques.

Celui-ci est suivi par le site du Grand Galion, où de nombreuses molécules pesticides ont également été retrouvées. Ce résultat est différent de l'étude en laboratoire, puisqu'il avait été démontré que le mélange correspondant à Grand Galion (M2) provoquait que peu d'effets toxiques sur les organismes.

En revanche, de manière surprenante, le site de Pont de Chaines qui est le site ayant le moins de molécules pesticides mesurées, a provoqué des effets toxiques importants chez les organismes, à Grand Galion (IBR égaux entre ces deux sites).

Ces résultats différents pourraient principalement être expliqués par la présence d'autres substances (non étudiées en laboratoire) dans les sites, tels que les HAP, les métaux, qui conduirait à des interactions entre molécules, et donc une toxicité différente.

Cette étude a permis de démontrer la toxicité de 13 pesticides encore utilisés actuellement sur les cultures de Martinique, sur la biodiversité aquatique et notamment les décapodes. Bien qu'aucune mortalité n'ait été observée lors des deux expériences en laboratoire, les pesticides étudiés ont provoqué des effets subléthaux à court et moyen termes sur les organismes, qui à long terme pourrait causer la mort des organismes et possiblement le déclin des populations. Il a également été démontré la difficulté d'évaluer la toxicité de substances chimiques sur un organisme, en expérimentation de laboratoire. Bien qu'il soit facile de connaître les effets toxiques que cela peut engendrer quand le composé est seul, leurs effets avec les autres composants du milieu peut-être totalement autre. En effet, du fait de l'interaction entre les substances présentes dans le milieu, la toxicité évaluée en exposition seule pourrait être augmenter, mais également diminuer. C'est pourquoi, de plus en plus d'études menées à l'aide de système d'encagement des organismes directement dans les cours d'eau sont déployés pour évaluer l'impact de celui-ci sur le biote.

De plus, il est important de noter que les effets mesurés dans cette étude, ont été observés lors d'exposition à des concentrations plus faibles que les NQEs (Rapport ODE, 2019). Cette constatation donne réflexion sur les normes établies pour les cours d'eau, et la prise en compte d'effets subléthaux mesurés à l'aide de biomarqueurs. En effet, les biomarqueurs n'étant pas reconnu comme outils de diagnostic de l'état de santé des organismes, ils ne sont intégrés dans l'établissement des normes de qualités environnementales.